



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**KOLOREKTAL KANSERLERDE
KODLANMAYAN Lnc-RNA CRNDE GEN İFADE
DÜZEYLERİNİN ANALİZİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Koray TOKLU

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Ersin BORAZAN

GAZİANTEP-2020

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KOLOREKTAL KANSERLERDE
KODLANMAYAN Lnc-RNA CRNDE GEN İFADE
DÜZEYLERİNİN ANALİZİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Koray TOKLU

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

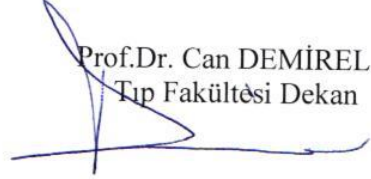
Dr. Öğr. Üyesi Ersin BORAZAN

GAZİANTEP-2020

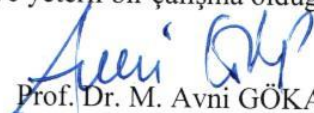
T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

Kolorektal Kansерlerde Kodlanmayan Lnc-RNA CRNDE'nin Gen İfade Düzeylerinin Analizi
Dr. Koray TOKLU
25.06.2020

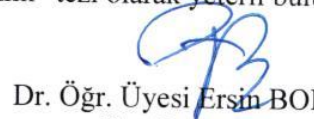
Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı


Prof. Dr. Can DEMİREL
Tıp Fakültesi Dekan

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.


Prof. Dr. M. Avni GÖKALP
Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak yeterli bulunmuştur.


Dr. Öğr. Üyesi Ersin BORAZAN
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. M. Avni GÖKALP ()
2. Prof. Dr. Ali UZUNKÖY ()
3. Dr. Öğr. Üyesi Ersin BORAZAN ()

Yedek Liste

1. Doç. Dr. İlyas BAŞKONUŞ
2. Dr. Öğr. Üye Alper AYTEKİN

I. ÖNSÖZ

Bilgi ve tecrübelerini eğitimim süresince, benimle paylaşan her konuda yardımlarına başvurduğum başta tez danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ersin BORAZAN'a, laboratuvar ve klinik çalışmamıza deneyimleri ile yön veren Dr. Öğr. Üyesi Gülper NACARKAHYA'ya, literatüre katkı sağlayacağını düşündüğümüz bu bilimsel projeyi destekleyen Gaziantep Üniversitesi Rektörlüğü'ne, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Komisyonu'na teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. M. Avni GÖKALP, Prof. Dr. Ahmet A. BALIK, Prof. Dr. Sacid A. ÇOBAN, Prof. Dr. Fahrettin YILDIZ, Doç. Dr. İlyas BAŞKONUŞ, Dr. Öğr. Üye. Alper AYTEKİN, Dr. Öğr. Üye. Latif YILMAZ, Dr. Öğr. Üye. Aziz BULUT hocalarıma da saygılarımı sunar, eğitimimdeki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, tüm genel cerrahi kliniği ekibine ve bu zorlu eğitim sürecinde bana destek olan aileme teşekkür ederim.

Dr. Koray TOKLU

Gaziantep 2020

II. İÇİNDEKİLER

I. ÖNSÖZ	I
II. İÇİNDEKİLER	II
III. ÖZET	IV
IV. ABSTRACT	V
V. KISALTMALAR	VI
VI. TABLO LİSTESİ	VII
VII. ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.Kolorektal Kanser Etiyolojisi	2
2.1.1.Genetik Faktörler	2
2.1.2.Çevresel Faktörler	3
2.1.3.Kolorektal kansere eğilimli Hastalıklar	3
2.2.Klinik Bulgular	6
2.2.1. Tanısal Laboratuvar Tetkikleri	6
2.2.2. Radyolojik Tanı	7
2.2.3.Endoskopik incelemeler	9
2.2.4.Patoloji	9
2.3. Evrelendirme	11
2.4. Kolorektal kanserin yayılma yolları	11
2.5. Tedavi	12
2.6. Prognostik Faktörler	16
2.7.Kolorektal kanserlerde Nüks Nedenleri	18

2.8.Lnc-RNA'ların Klinik Önemi	19
3.GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1.Kolorektal Kanserli Hastaların Biyopsi Örneklerinin Toplanması	21
3.2. Kolorektal Kanserli Hastaların Biyopsi Örneklerinden Total RNA eldesi	21
3.3. mRNA Örneklerinden qRT-PCR Yöntemi ile cDNA Elde edilmesi	23
3.4. qPCR analizleri	24
3.5. Gen ifade düzeylerinin istatistiksel analizi	25
4.BULGULAR	26
4.1. Tümörlü ve bitişik tümörsüz kolon dokusunda CRNDE ΔCt düzeylerinin karşılaştırılması	27
4.2. Tümörlü ve bitişik tümörsüz kolon dokusunda CRNDE gen ekspresyon düzeylerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduyla karşılaştırılması:	29
5.TARTIŞMA	30
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	36
7.KAYNAKLAR	37

III. ÖZET

KOLOREKTAL KANSERLERDE Lnc-RNA CRNDE GEN İFADE DÜZEYLERİNİN ANALİZİ

Dr. Koray TOKLU

Uzmanlık Tezi, Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ersin BORAZAN

Mayıs 2020, 52 Sayfa

Amaç: Uzun kodlanmayan RNA (Lnc-RNA)'ların son zamanlarda yapılan çalışmalar ile kanser gelişiminin çeşitli aşamalarında etkisi bulunmuştur. Lnc-RNA'ların DNA, RNA ve proteinlerle etkileşerek kromatin organizasyonu, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzenlemelerde önemli düzenleyiciler olduğu keşfedilmiştir. Lnc-RNA'ların bozulmuş gen ifadeleri; kanser başlaması, ilerlemesi ve metastazda rol oynamaktadır. Bu çalışmada kolorektal kanserde bir Lnc-RNA olan CRNDE geninin ifade düzeylerinin analizi ve klinik değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Bu prospektif çalışma için Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulundan 26.09.2018 tarihli 2018/204 karar ile onay alındı. Çalışma Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi (BAP) TF.UT.19.22 no'lu desteğiyle, Gaziantep Üniversitesi Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı'nda 2014-2016 yılları arasında kolorektal adenokarsinom nedeniyle sağ hemikolektomi, sol hemikolektomi, rektum anterior rezeksiyon, low anterior rezeksiyon, abdominoperineal rezeksiyon yapılan 52 hastada gerçekleştirildi. Her hastanın tümörlü ve bitişik tümörsüz dokusunda Lnc-RNA CRNDE gen ifadeleri Real Time PCR ile değerlendirildi. Normalize edilen ΔC_t değerleri Wilcoxon testi ile karşılaştırıldı. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile gen ekspresyonları arasındaki kat sayı farkı kıyaslandı.

Bulgular: Kolorektal kanser tanısıyla ameliyat edilen 52 hastanın ortalama yaşları $58,1 \pm 13,1$ idi. Ortalama %80'ini evre 2-3 hastalar oluşturmaktaydı. Real time PCR'da tümörlü dokuda CRNDE ekspresyon seviyesi ΔC_t değeri $7,48 \pm 3,21$ bulundu. Bitişik tümörsüz dokudaki CRNDE ΔC_t değeri $5,57 \pm 0,95$ bulundu. Tümörlü dokuda CRNDE ekspresyon düzeyleri tümörsüz dokuya göre ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile) yaklaşık 5 kat azaldığı tespit edildi. Bu ekspresyon farkı hastalığın evresi arttıkça yükselmekteydi. Yalnızca rektum kanserli hastalar değerlendirildiğinde, tümörlü dokuda gen ekspresyon düzeyinin 8 kat azaldığı görüldü.

Tartışma ve sonuç: Bu çalışma kolorektal adenokarsinom dokularında CRNDE gen ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığını göstermiştir. Aksine literatürde yapılan birçok çalışmada kolorektal kanserde CRNDE ekspresyonunun yükseldiği belirtilmektedir, sonuçların uyumsuz olması CRNDE ekspresyonunda tanımlanmamış başka gen sinyal yollarının olabileceğini akla getirmektedir. Ayrıca hasta gruplarının daha homojen seçilip sayılarının yeterli düzeyde çoğaltılarak ilgili yollarla birlikte değerlendirilmesi ve hücre kültürleri ile desteklenmesi gerekmektedir. Henüz tanı ve tedavide klinik olarak tek başına yeterli olmadığı görüşündeyiz.

Anahtar kelimeler: Kolon, Rektum, Adenokarsinom, Lnc-RNA, CRNDE, Gen ekspresyonu.

IV. ABSTRACT

ANALYSIS Lnc-RNA CRNDE GENE EXPRESSION LEVELS IN COLORECTAL CANCER

Koray TOKLU M.D.

Specialist Thesis, General Surgery Department

Supervisor: Ersin BORAZAN M.D. Asst. Prof.

May 2020, 52 Pages

BACKGROUND: Long non-coding RNA (Lnc-RNA) has been found to be effective at various stages of cancer development with recent studies. Lnc-RNAs have been discovered to be important regulators in chromatin organization, transcriptional and post-transcriptional arrangements by interacting with DNA, RNA and proteins. The degraded gene expression of Lnc-RNAs is involved in cancer initiation, progression and metastasis. The aim of this study is to analyze the expression levels of the CRNDE gene, a Lnc-RNA in colorectal cancer, and to evaluate it clinically.

MATERIALS AND METHODS: For this prospective study, approval was received from Gaziantep University Faculty of Medicine Local Ethics Committee with the decision of 2018/204 dated 26.09.2018. The study was conducted with the support of Gaziantep University Scientific Research Project (BAP) TF.UT.19.22. The study was carried out in 52 patients who underwent right hemicolectomy, left hemicolectomy, rectum anterior resection, low anterior resection, abdominoperineal resection in Gaziantep University General Surgery Department between 2014-2016. Lnc-RNA CRNDE gene expressions in each patient's tumor and adjacent non-tumor tissue were evaluated by Real Time PCR. Normalized ΔC_t values were compared with Wilcoxon test. The coefficient difference between the gene expressions was compared with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

RESULTS: The mean age of 52 patients operated on with colorectal cancer was $58, 1 \pm 13, 1$. On average, 80% of patients were stage 2-3. In real time PCR, CRNDE expression level ΔC_t value in tumor tissue was found to be $7, 48 \pm 3, 21$. CRNDE ΔC_t value in adjacent tumor-free tissue was $5, 57 \pm 0, 95$. It was determined that the expression levels of CRNDE in tumor tissue decreased approximately 5-fold compared to adjacent tumor-free tissue (by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method). This expression difference increased as the stage of the disease increased. When only patients with rectal cancer were evaluated, it was seen that the level of gene expression in tumor tissue decreased by 8 times.

DISCUSSION AND CONCLUSION: This study showed that CRNDE gene expression was significantly reduced in colorectal adenocarcinoma tissues. In contrast, many studies in the literature indicate that CRNDE expression is increased in colorectal cancer. Inconsistent results suggest that there may be other gene signal pathways that are not defined in CRNDE expression. In addition, the patient groups should be selected more homogeneously and their numbers should be increased sufficiently to be evaluated together with the relevant pathways and supported by cell cultures. We are of the opinion that it is not clinically sufficient alone in diagnosis and treatment.

Key words: Colon, Rectum, Adenocarcinoma, Lnc-RNA, CRNDE, Gene expression

V. KISALTMALAR

CEA: Karsino Embriyonik Antijen

CRC: Colorektal Cancer

CRP: C-Reaktif Protein

CRNDE: Colorectal Neoplasia Differentially Expressed

DPP10: Dipeptidyl-Peptidase 10

GAPDH: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz

H19: Tumor suppressor gene keeping cells from growing and dividing

İMA: İnferior Mezenterik Arter

İMV: İnferior Mezenterik Ven

KRK: Kolorektal Kanser

KT: Kemoterapi

Lnc-RNA: Long non-coding Ribonükleic Acid

LINC00675: Long intergenic non-protein coding RNA 675

miRNA: Micro RNA

NCBI: National Center For Biotechnology Information

qRT-PCR: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RT: Radyoterapi

SMA: Süperior Mezenterik Arter

SMV: Süperior Mezenterik Ven

TPA: Tissue Polipeptit Antijen

TPS: Tissue Polipeptit Spesifik Antijen

VI. TABLO LİSTESİ

Tablo 1: American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) tarafından oluşturulan TNM evrelemesi	11
Tablo 2: RNase-free tüplerin bileşenleri.....	23
Tablo 3: Reaksiyon tüpünün bileşenleri	23
Tablo 4: Primer dizileri.....	24
Tablo 5: Eş zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri.....	24
Tablo 6: Eş zamanlı PCR prosedürü.....	25
Tablo 7: Hastaların demografik ve klinik özellikleri.....	26
Tablo 8: Tümörlü ve bitişik tümörsüz dokudaki CRNDE Δ Ct ekspresyon düzeyleri....	27

VII. ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Formülü	25
Şekil 2: Tümörlü ve bitişik tümörsüz dokudaki ΔCt CRNDE ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	27
Şekil 3: Gen Amplifikasyonları	28
Şekil 4: CRNDE geni ile GAPDH geni qRT-PCR’de döngüye göre amplifikasyon seviyeleri.....	28



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser günümüzde başlıca sağlık problemi olup dünyanın önde gelen ölüm nedenlerinden biri durumundadır. Kanserın moleküler temeli geçtiğimiz on yıllarda geniş çaplı araştırılmış olmasına rağmen, oluşumunu ve kanser ilerlemesi hakkında bilgilerimiz hala yetersizdir. Kolorektal kanser (KRK) yaygın ve ölümcül bir hastalıktır. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 97220 kolon ve 43030 rektum kanseri olmak üzere yaklaşık 140250 yeni KRK vakaları olduğu tahmin edilmektedir (1). Her yıl yaklaşık 50630 Amerikalının kalın barsak kanserinden ölmesi beklenmektedir. Her ne kadar KRK mortalitesi 1990'dan bu yana kademeli olarak azalmakla birlikte (1), hala erkeklerde ikinci ve kadınlarda üçüncü sıklıkta rastlanan kanserden ölüm nedenidir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2014 yılı verilerine göre KRK hem kadınlarda hem de erkeklerde üçüncü sırada yer almaktadır. Erkeklerde yüz binde 22,8 ve kadınlarda ise yüz binde 13,8 sıklığında görülmektedir (2). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Lnc-RNA (uzun kodlanmayan RNA)'ların kanser gelişiminde çeşitli adımlarında rol aldığı ortaya çıkarılmıştır. Lnc-RNA'lar, DNA, RNA, protein molekülleri ve/veya kombinasyonları ile etkileşmektedir. LncRNA'lar, kromatin organizasyonu, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenlemede önemli bir düzenleyici olarak rol almaktadır. Lnc-RNA'ların yanlış ifadeleri, kanser başlaması ilerlemesi ve metastaza neden olabilmektedir.

Bu prospektif çalışmada, KRK ile seçilmiş Lnc-RNA geni CRNDE arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi planlandı. CRNDE'nin tanısal belirteç olarak değerinin olabileceği hipotezi kurgulandı. KRK rezeksiyonu yapılan hastaların tümörlü ve tümörsüz kolon dokularında seçilmiş CRNDE primerlerinin gen ifade düzeylerine bakılması hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Kolorektal Kanser Etiyolojisi

Kolon kanserleri kolon mukozasını etkileyen genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak gelişmektedir (3). Erkeklerde KRK'nın görülme sıklığı kadınlara oranla biraz daha fazladır, ancak kadınlarda mortalite oranı daha yüksektir. KRK'nın yerleşim yerleri farklı kaynaklarda değişiklikler göstermektedir. Kolonda rektumdan daha sıktır. Görülme yerleri ve sıklıkları yaklaşık olarak; sigmoid kolon %23, çekum %12, çıkan kolon %10, transvers kolon %15, inen kolon %5, rektumda ise %40 civarı görülür. KRK'da kolonda birden fazla senkron veya metakron tümör odağı olabilir. Senkron tümörler; bir veya birden fazla odakta aynı anda görülen tümörlerdir. Metakron tümörler; farklı zamanlarda birbiriyle ilişkisiz primer odak olarak tespit edilen tümörlerdir (4).

2.1.1.Genetik Faktörler

Onkojenlerde, tamir genlerinde ve tümör supresör(baskılayıcı) genlerdeki genetik değişimler normal hücrenin neoplastik şekle dönüşümüne sebep olur. Kolon kanserlerinde genelde ilk basamak APC (Adenomatous Polyposis Coli) gen defektidir. Adenomatöz poliplerin yaklaşık %80'i APC gen mutasyonları içerir. K-ras protoonkojen değişimi kolon kanserinde görülen en önemli değişimdir. P53 geni kolon kanserlerinde etkili olan supresör gendir. P53geni 17p kromozomunda yer alır, p53'teki mutasyonlar kanser oluşmasında önemli bir faktördür. DNA-fosfoprotein bileşimini sağlayarak DNA hasarlarını onarır. P53 geninin; hücrenin canlılığının devamında, proliferasyonunda, farklılaşmasında ve apoptozisinde önemli rolü vardır (5). KRK gelişiminde iki moleküler yolağın rol aldığı tespit edilmiştir. Bunlar kromozomal instabilite ve mikrosatellit instabilitedir. Kanserin moleküler patogenezinin açıklanmasında protein kodlama yeteneğine sahip olmayan, ancak protein kodlayan genlerin ifadelerini negatif yönde düzenleyen miRNA (mikro RNA) molekülleri tespit edilmiştir.

Hücrede miRNA'nın birçok biyolojik sürece katıldığı görülmüştür; hücre gelişimi, hücre farklılaşması, proliferasyon ve apoptozis gibi süreçlere katıldığı bildirilmiştir.

Tümörlü dokuda miRNA ekspresyonu ve buna bağlı olarak serum miRNA düzeyinde belirgin farklılıklar görülmüştür. Karsinom gelişiminde miRNA'ların rol oynadığı düşünülmektedir. Bazılarının tümör süpresör gen gibi işlevleri mevcutken, bazı miRNA'lar onkogen gibi işlev görmektedir. Bunların ifade düzeylerinin artması ya da azalması KRK gelişiminde önemli olabileceği düşünülmektedir (6).

2.1.2.Çevresel Faktörler

Gelişmiş ülkelerde KRK daha fazla görülürken, Afrika ve Asya'da daha az görülür. Yüksek ısıda pişirilen tütülenmiş etler, şeker ve yağ-kolesterol oranı fazla, yüksek kalorili, lifli gıda içermeyen beslenme şekli, karsinojen maddeler, alkol, sigara, radyasyon maruziyeti, hazır gıdalardaki katkı maddeleri ve serbest oksijen radikallerinin kanser oluşumunda önemli etkileri vardır. Taze sebze-meyve, lifli gıdalar, vitaminler (A, C, E), kalsiyum, selenyum, beta karoten benzeri antioksidan maddelerin kolon kanseri oluşmasını önleyici rolleri vardır. Ayrıca balık yağının gaitada mutasyon yapan maddelerin üretimini azaltarak kanser oluşumunu önleyici etkisi mevcuttur (5,7).

2.1.3.Kolorektal kansere eğilimli Hastalıklar

- A) Kolorektal polipler
- B) İnflamatuvar (iltihabi) bağırsak hastalıkları
- C) KRK açısından yüksek riskli gruplar

A) Kolorektal Polipler: Barsak lümenine çıkıntı yapan herhangi bir epitelyal lezyon polip olarak tanımlanabilir. Polipler endoskopiyle tespit edilerek makroskopik olarak tanımlar yapılabilir. Kolorektal poliplerin ortaya çıktığı mukozayla bağlantısı olabilir, bunlara saplı veya pediküllü polip denir. Polipler geniş tabanıyla mukozaya oturmuş halde görülebilir, bunlara da sesil veya sapsız polip denir. Ancak poliplerin histolojik özellikleri daha önemlidir. Poliplerde büyüme, ülserasyon görülürse kanserleşme açısından dikkat edilmelidir. Polipler fazla sayıda ve yaygın olarak görüldüğünde polipozis denir. Ancak tanı histopatolojik incelemeyle kesinleştirilir (5,7).

B) İnflamatuvar (İltihabi) Barsak Hastalıkları: İltihabi barsak hastalıkları crohn ve ülseratif kolit kolorektal mukozanın prekanseröz ve tümöral lezyonlarında kripta tabanında yer alan hücrelerin aşırı proliferasyonuna neden olur. İnflamatuvar barsak hastalığı zemininde displazi gösteren adenomatöz, hiperplazik, polipoid lezyonlar görülür. İltihabi barsak hastalıklarının nedeni tam olarak bilinmemektedir. Özellikle ülseratif kolitli hastalarda displazinin yaşla birlikte artmasıyla KRK riski artmaktadır. Uzun yıllar içerisinde mukozadaki yaygın ülserlerde, psödopolipoid lezyonlarda, kripta ve yüzey epitelinde mukozal atrofinin görülmeye başlamasıyla birlikte, erken yassı adenom tipinde displazik hücresel değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Bu tip hastalarda ilk 10 yılda %5, ikinci 10 yılda %20'ye ulaşan kanserleşme riski mevcuttur (7,8).

C) KRK açısından yüksek riskli gruplar

- Birinci derece akrabasında (En az iki kişide) KRK hikayesi olanlar,
- KRK hikayesi mevcut olanlar,
- Meme, endometrium, over kanseri hikayesi olanlar,
- Kolonda adenomatöz polip tespit edilenler,
- FAP (Familyal adenomatozis polipozis) sendromlular,
- İltihabi barsak hastalıklı kişiler,
- Lynch I-II sendromlular,
- Radyoterapi almış kişiler (7,8).

Genetik ilişkisi olduğu bilinen kolon hastalıklar ve sendromlar aşağıda sınıflandırılmıştır.

Hereditör Nonpolipozis Kolon Kanseri Sendromları (HNPCC)

Genetik olarak otozomal dominant geçişli, genç yaşta görülen, genelde sağ kolonda kanserin olduğu hastalıklardır. Lynch I, Lynch II Sendromları olarak adlandırılmışlardır. Lynch I'de genç hastalarda, sadece kolon ve rektumda kanserler görülür başka bölgelerde kanser görülmez.

Lynch II sendromunda Lynch I den farklı olarak kolon dışında; mide, pankreas, ince bağırsak, jinekolojik, üriner sistem ve meme kanserleri birlikte görülebilir. Bu hastaların yaklaşık %20'sinde senkron, %25'inde metakron kanserler görülebilir (5,7).

A) Familial Adenomatöz Polipozis Sendromları

Familial polipozis koli (FAP)

Kanser gelişiminde 5q21 kromozomundaki APC isimli tümör supresör genin mutasyonu sebep olur. Fap'lı hastaların göz muayenesinde retinal pigment epitelinin kalınlaşması yani konjenital hipertrofisi mevcuttur. Genetik olarak Otozomal dominant geçişli bir hastalıktır. Genelde kolon ve rektumda çok sayıda polipoid oluşum görülse de tüm gastrointestinal sistemi tutabilir. Adenomlar ortalama 10 yaş civarında ortaya çıkar ve adenokarsinom gelişme riski 30-40 yaşlarında %80 civarındadır (5,6).

Gardner Sendromu

Genetik olarak otozomal dominant geçişli bir sendromdur. Adenomlar sadece kolonda oluşmaz; mide, duodenum ve ince barsakta da görülebilir. Gastrointestinal adenomatoz polipozisle birlikte başka lezyonlar bulunur. Eşlik eden lezyonların bazıları; epidermoid kist, fibrom, glioblastoma, hepatoblastoma, desmoid tümör, tiroid papiller karsinom, diş anomalileri, safra yolları kanserleri, pankreas kanseri, mandibula ve kraniumda osteomdur (5,7).

Turcot Sendromu

Otozomal dominant genetik geçişli bir hastalıktır. Kolon yerleşimli adenomatozis poliplerine, nöroepitelyal santral sinir sistemi tümörleri; gliom ve medullablastom eşlik eder (5,7).

B) Hamartamatöz Polipozis Sendromları

Peutz-Jeghers Sendromu

Gastrointestinal sistemde en çok ince barsaklarda, daha az oranda mide, duodenum ve kolonda olmak üzere ortalama 1-4 cm büyüklüğünde hamartamatöz polipler görülür. Aynı zamanda dudaklar ve ağız mukozasında kahverengi, mavi-siyah melanin pigment lekeleri karakteristiktir.

Otozomal dominant geçişli olup, LKB1/STK11(19p13) gen mutasyonları görülür. Kansерleşme riski ortalama %2-3 civarındadır (5).

Famіlyal Juvenіl Polіpozіs

En sık görülen hamartomatöz polіpozіs sendromudur. Otozomal dominant genetik geçişlidir. SMAD4(18q21) mutasyonu mevcuttur. Polіpler genellikle kolon ve rektumda görülür. Polіpler ergenlik döneminde kaybolabilir. Hastaların yaklaşık %70'inde tek polip, geri kalanında 2-3 polip bulunabilir. Nadir olarak polip sayısı 10'dan fazla olduğunda hastalık juvenіl polіpozіs olarak değерlendirilir. Kansерleşme riski mevcuttur(5).

C)Akkız(Edinsel) Somatik Defektler: Sonradan kazanılan Kalıtsal olmayan genetik mutasyonlardır(8).

2.2.Klinik Bulgular

Karın ağrısı, anorektal bölgede ağrı, dışkılama alışkanlığında değışiklik, makatta kanama, rektal akıntı şeklinde veya dışkıyla karışık mukus görülmesi, gaitanın özelliğinde ve çapında değışiklik, tenesmus, kötü kokulu gaz yapma, obstrüksiyon, konstipasyon, distansiyon, tümör perforasyonu, perianal abse, perianal fistül, kilo kaybı, halsizlik, iştahsızlık ve anemi görülebilir. Fizik muayene esnasında rektum tümörlerinin yaklaşık 1/3'ü tuşe mesafesinde palpe edilebilir (7).

2.2.1. Tanısal Laboratuvar Tetkikleri

Giatada gizli kan (Guaiac), CEA, CRP, Prokalsitonin, CA 19-9, CA 50, CA 242, TPA (Tissue polipeptit antijen) ve TPS (Tissue polipeptit spesifik antijen) KRK'da kullanılabilen tetkiklerdir. Takiplerde genel olarak en fazla kullanılan CEA'dır.

Ameliyat öncesi CEA düzeyi bakılırsa tümör rezeke edildikten sonraki düzeyi takip açısından anlamlı olabilir. Gaitada gizli kanı araştıran testler, gizli gastrointestinal sistem kanamalarının taranmasında yaygın olarak kullanılan, tanısal açıdan değерli testlerdir.

Guaiac testi gaitada gizli kanı tarama amaçlı geliştirilen yöntemler içinde en yaygın kullanılanı olmakla birlikte bu testin hatalı pozitif ve hatalı negatif sonuç verme oranları da oldukça yüksek bulunmuştur. Birçok sebze ve meyvede bulunan peroksidaz enzimi tarama testlerinde interferans oluşturması sebebiyle problem oluşturmaktadır. KRK hastalarında tam kan tetkiki de önemlidir, hastaların yaklaşık %30-90'ında anemi görülmektedir.

Anemi sıklığı kanserin evresi ve süresi yanı sıra uygulanan kemoterapi, cerrahi ve radyoterapiye bağlı olarak değişmektedir. Anemili hastalarda halsizlik (%70-90) en önemli şikayettir. Anemi nedeniyle fiziksel işlevler yanında emosyonel ve bilişsel işlevler de etkilenmektedir. Anemi hem yaşam kalitesini kötüleştirir, hem de mortalite ve morbiditeyi arttırmaktadır. Lokal olarak tümör kontrolünü zorlaştırdığı gibi tümörün hipoksik kalması nedeniyle anjiogeneze uyarılmakta tümörün saldırganlığı artmaktadır. Radyoterapi ve kemoterapiye direnç gelişmektedir. Ancak bu tetkiklerin hiçbirisi tek başına tanı koydurucu değildir. Anamnez, fizik muayene ve radyolojik görüntülemeyle de desteklenmesi gereklidir (7,8).

2.2.2. Radyolojik Tanı

KRK yavaş gelişim gösteren bir malignitedir. Başlangıçta hastaların birçoğunda benign adenom görülür. Prognoz açısından 8-10 yıl gibi uzun bir süreç önem taşımaktadır.

Ultrasonografi (USG)

Kısa sürede yapılabilmesi, ucuz olması ve radyasyon riski taşımaması nedeniyle tercih edilir. Karın içi kitlelerin ve sıvı koleksiyonlarının değerlendirilmesinde, karaciğer metastazlarının tespit edilmesinde ve rektum tümörlerinin evrelendirilmesinde kullanılmaktadır. Rektumda stenoz olmayan hastalarda endorektal USG ile yaklaşık 15 cm' ye kadar tümörün yayılım derinliği, perirektal bölgede lenf nodu tutulumu, etraf dokular ve organlara invazyonun derecesi tespit edilebilmektedir. Rektum kanserinin evrelendirilmesi açısından MRG ve BT ile karşılaştırılırsa; endorektal USG'nin hem sensitivitesi hem de spesifitesi daha fazladır. Endoskopik olarak USG yapılarak; mukoza, muskularis ve serozada tümörün penetrasyonu saptanabilir (7,9,10).

Bilgisayarlı Tomografi (BT)

KRK hastalarında iv, oral veya rektal yolla dilue iyotlu kontrast madde ile opaklaştırılmasının ardından gerçekleştirilen abdomino-pelvik bilgisayarlı tomografik inceleme, rutinde en sık kullanılan kesitsel radyolojik görüntülemedir. Ameliyat öncesi karın içi ve organların değerlendirilmesini mümkün kılar. Karaciğer, akciğer, lenf nodları, overler, adrenal glandlar ve pelviste bulunan organların metastazları tespit edilebilmektedir. Nüks ya da rezidü karsinom araştırılması açısından da yararlıdır.

BT ve Anjiografinin beraber çekildiği dinamik-trifazik BT'de karaciğer metastazlarının tespit edilme oranı %95 civarına kadar çıkmaktadır. Barsak duvarı tabakalarındaki invazyon derinliğini ayırt edememesi tek dezavantajıdır (7,9,10).

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

BT'ye göre yumuşak dokuların daha iyi gösterilebilmesi ve çoklu planda inceleme imkanı vermesi avantajlı yönleridir. T1 ve T2 ağırlıklı sekanslarla incelemeler mevcuttur. T1 ağırlıklı görüntülemelerde primer tümör ile perirektal bölge ortaya konulabilmektedir ve fibrotik dokuyla normal doku ayırt edilebilmektedir. MRG ameliyat öncesi evrelendirmede ve karaciğer metastazının tespit edilmesinde BT ile eşdeğerlidir. Ancak nükslerin tespiti yönünden tomografiden daha üstün bir görüntüleme yöntemidir (7,9,10).

Pozitron Emisyon Tomografisi (PET)

Hastaya florodeoksiglukoz isimli işaretlenmiş glukoz enjekte ederek doku metabolizmasındaki farklılığı ortaya koyma prensibine dayanmaktadır. Kanserli hücrelerde metabolizmanın hızlı olmasından dolayı kanser hücrelerinin bulunduğu bölgede aktivite ve tutulumu artmış şekilde görülür. KRK hastalarında metastatik odakların araştırılmasında, özellikle pelvisteki nüks tümör ile fibröz dokunun ayırt edilmesinde kullanılır (8). PET ve BT ile küçük nüksler veya lenf nodlarındaki tümöral odaklar gösterilebilmektedir. Helikal BT birçok planda üç boyutlu görüntüleme yapabilmesi ve artefaktların az görülmesi ile farklı avantajlar sağlamaktadır (12).

2.2.3.Endoskopik incelemeler

Endoskopik incelemeler öncesi iyi bir barsak temizliği yapılması gerekli ve önemlidir.

Rektosigmoidoskopi: Linea dentatanın yaklaşık 20-25 cm proksimalinde bulunan lezyonları görüntüleyebilir. 40 yaş altındaki düşük risk taşıyan bireylerin taramasında uygun bir yöntemdir.

Fleksibl sigmoidoskop: 60 cm uzunluğundadır. Splenik fleksuraya kadar olan lezyonların tespitinde kullanılmaktadır. KRK'ların yaklaşık %50'si bu bölgede görüldüğünden, çift kontrastlı baryumlu grafiyle beraber yapılırsa kolonoskopiye alternatif bir yöntem olabilir.

Kolonoskopi: Kolonun tamamını, rektumu ve terminal ileumu değerlendirebilmek amacıyla mutlaka kolonoskopiyle inceleme yapılmalıdır. Kolonoskop standart olarak 160 cm uzunluğundadır, kolonoskopiyle yaklaşık 1 cm'den küçük polipler de tespit edilebilmektedir. Kolonoskopik incelemeyle; gastrointestinal kanama, inflamatuvar barsak hastalığı, sigmoid volvulus, kolon divertikülü, kolonda iskemi, , non-toksik megakolon, endometriozis, kolonda yabancı cisim, kolonik striktür, neoplazm ve sebebi anlaşılamayan diyarenin tanısı konulabilmektedir. Ayrıca kanama kontrolü, biyopsi alınması, polip eksizyonu, ve striktür dilatasyonu da yapılabilmektedir. En önemli komplikasyonları ise; perforasyon, kanama ve anesteziik madde (meperidin, midazolam) komplikasyonlarıdır, bu komplikasyonlar sıklık olarak %0,2'den daha azdır. Radyolojik görüntülemeyle teşhis yöntemlerine göre endoskopik incelemenin en önemli üstünlüğü; biyopsi alabilme, tanıyı doğrulama ve gereğinde aynı anda tedavinin gerçekleştirilmesidir (10,13).

2.2.4.Patoloji

KRK'da makroskopik bulgular:

- a) Polipoid tip: Lümen içine büyürler, gelişmeleri yavaş seyreder.
- b) Ülseratif tip: Hızlı gelişim görülür, bu yüzden prognozu kötü seyreder.
- c) İnfiltratif tip: Bağırsağı annüler (halka biçiminde) şekilde sarar. Lenfatiklerin sirküler dizilimleri annüler büyümeye sebep olur.
- d) Linitis plastika: Geniş bir kolon segmentini tutar ve sınırları belirsizdir. Bağırsak duvarındaki bütün tabakalar kalınlaşır (5,8).

KRK'da mikroskopik bulgular:

American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından önerilmiş olan evrelendirme sisteminde KRK'nın differansiyasyon derecesi, histopatolojik evresini belirtir ve prognoz açısından önemi vardır.

Grade I: İyi diferansiye (Low grade)

Grade II: Orta derecede diferansiye (Intermediate grade)

Grade III: Kötü diferansiye (High grade)

Grade IV: Undiferansiye (High grade)

İyi diferansiye tümörler vakaların yaklaşık %10'unu oluştururlar. Bol miktarda büyük glandüler yapı içerirler. Glandlar yüksek kolumnar epitelle döşelidir, genelde papiller komponent içerirler. Yapısal komplekslik çok az görülür. Bol miktarda müsin salgırlar. Orta diferansiye tümörlerde biraz yapısal komplekslik görülür. Nukleus orta büyüklüktedir ve polaritesini korumuş haldedir. Orta diferansiye kolon karsinomları bir miktar glandüler yapı ihtiva eder ve değişik miktarlarda müsin sekresyonu yapar. Kötü diferansiye tümörlerde yapısal komplekslik artmıştır. Yoğun periferik kromatin oluşumu ve polarite kaybı gözlenir. Glandüler yapı azalmıştır ya da hiç yoktur. Müsin salgısı azalmıştır ya da hiç yoktur. Kötü diferansiye tümörler vakaların yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. KRK'da tümör rezeke edildikten sonra ve cerrahi eksplorasyonda anatomik inceleme yapılarak yayılma boyutu, metastaz varlığı belirlendikten sonra evreleme sistemi uygulanabilir. Evrelemedeki amaç; sağ kalımı tespit etmektir. KRK kolon duvarında muskularis mukoza invazyonuna göre iki gruba ayrılır.

1-Erken Tip Kolorektal Karsinomlar: Endoskopik ve makroskopik olarak en fazla 1 cm çapa ulaşır. Polipoid ve yassı olarak iki tiptir. Sadece mukoza içinde mevcut olup, muskularis mukozayı aşmayan tümörlerdir. Metastaz son derece nadir görülür (8).

2-İnvaziv kolorektal karsinomlar: Kolon mukozasındaki kanser intramukozal yüzeyden muskularis mukozayı aşır, submukozaya girdiğinde invaziv hale gelmiş olur. Muskularis mukozada ve submukozada bol miktarda lenfatik kanallar olduğundan, bu seviyedeki tümörlerin metastaz riski yüksektir. En fazla görülen tipi adenokarsinom olup, invaziv KRK'ların yaklaşık %85 'ini oluşturur (7).

2.3. Evrelendirme

KRK'da ilk kez patolojik evrelendirmeyi Londra'da St. Mark's Hastanesi'nin patoloğu Cuthbert E. Dukes 1932 yılında yapmıştır. Sınıflandırma kanserin direkt yayılımı ve lenfatik tutulum üzerine dayanmaktadır. 1954 yılında Astler-Coller tarafından tümör derinliğinin önemine dayanarak, Dukes klasifikasyonu modifiye edilmiştir. 1967 yılında Turnbull, Dukes sistemine uzak metastazla ilgili olan D evresini eklemiştir.

Günümüzde American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) tarafından oluşturulan TNM evrelemesi kullanılmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1: American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) tarafından yapılan TNM evrelemesi

T0	Primer tümöre ait bulgu yok.
Tis	Sadece mukozada sınırlı. Karsinoma insitu.
T1	Tümör submukozaya ulaşmış.
T2	Tümör muskularis propriayı tutmuş.
T3	Tümör serozaya ulaşmış, perikolik yağ dokusu invazyonu mevcut.
T4	Tümör periton boşluğuna veya organlara yayılım yapmış.
N0	Lenf nodu tutulumu yok.
N1	Perikolik veya perirektal lenf nodlarından 1-3 adet metastaz.
N2	Perikolik veya perirektal lenf nodlarından en az 4 adet metastaz.
N3	Major arterlerin trasesinde pozitif lenf nodları.
M0	Bilinen uzak organ metastaz yok.
M1	Uzak organ metastazı var.

2.4. Kolorektal kanserin yayılma yolları

- a) Komşu dokulara direkt invazyon
- b) İmplantasyonla
- c) Lenfatik yolla yayılım
- d) Hematojen yolla yayılım.

KRK'ların genelde bağırsak duvarında distale doğru invazyonu sınırlıdır, bağırsak duvarının derinliğine doğru invazyon yaparlar. Buna neden olan; lenfatik dokuların anatomik olarak sirküler biçimde dizilim göstermesidir. Bu anatomik dizilim nedeniyle tümörlerin longitudinal intramural invazyonu sınırlıyken, annüler (halka gibi) lezyonlarla bağırsağın etrafını sirküler biçimde sarmaya meyillidirler. Bağırsağın tüm katlarının tümörle tutulumunun ardından, yakınındaki komşu organa direkt yayılım yapabilirler. Tümöral hücreler deskuamasyonla bağırsak lümenine dökülebilirler, ancak bu dökülen hücrelerin mukoza invazyonu tespit edilememiştir. İntraperitoneal implantasyon ise peritoneal karsinomatozise sebep olur. Metastaz en sık lenfatik kanallar aracılığıyla olur. Bağırsak duvarında tam kat invazyonu olan hastalarda yaklaşık %50 oranında lenf nodunda metastaz tespit edilmektedir. Hematojen yolla kanser hücrelerinin dolaşım sistemine geçmesi sonucu en sık metastaz karaciğere, ikinci sıklıkta metastaz ise akciğere olmaktadır. Ameliyat esnasında kan dolaşımına yaklaşık %50 civarında kanser hücrelerinin geçtiği tespit edildiğinden, bağırsak rezeksiyonunun 'No-Touch' tekniğiyle yapılması önerilmektedir (13).

2.5. Tedavi

KRK'da cerrahi tedavideki asıl amaç; tümör bulunan kolon segmentiyle beraber bu segmentin lenfatik drenajını sağlayan mezenterin rezeksiyonu, kanserin invaze olduğu çevre organ ve yapıların rezeksiyonu prensibine dayanmaktadır. Kolonun lenfatik drenajı; bu bölgenin kanlanması sağlayan arterlerle paralel seyrettiğinden rezeksiyon yapılacak bağırsağın uzunluğu o segmenti besleyen arterlere göre ayarlanmaktadır (5).

Radikal Cerrahi Tedavi: Ana damarları bağlayarak, tümörsüz rezeksiyon sınırları oluşturmak ve tümörün invaze ettiği çevre doku ve organları çıkarmak hedeftir. Ameliyat sırasında kanser hücrelerinin karın içine dökülmesini ve yayılmasını minimum düzeyde tutan yöntemler kullanmak gereklidir. Bundan dolayı damar yapılarını, kolon lümenini proksimal ve distalden bağlayarak (no-touch) tekniğinin uygulanması gereklidir. Günümüzde rezeksiyon açısından tümörün distalinden ve proksimalinden 2 cm'lik sağlam kısmın çıkarılması yeterli görülmektedir.

Palyatif Cerrahi Tedaviler: Tümörün parsiyel rezeksiyonu, tümör çıkarılamıyorsa bypass yapılması ya da rezeksiyon yapılmadan kalıcı stoma açılmasıdır. Ameliyat esnasında yapılan eksplorasyonda karaciğer, periton gibi uzak metastazlar mevcut olsa da, obstrüksiyon ve kanama gibi komplikasyonları önlemek için, eğer mümkünse primer tümörün rezeksiyonu yapılmalıdır (5,7).

Kolorektal kanserlerde modern cerrahi ilkeleri:

1. Ameliyat öncesinde bağırsak temizliği tam olarak yapılmalıdır.
2. Ameliyatta çevre dokular ve tümörün manuplasyonu minimal olmalıdır.
3. Tümörden bağırsak lümeni içine döküntü olmamasına dikkat edilmelidir.
4. Anastomoz yapılacak bağırsak segmentleri tam olarak serbestleştirilmelidir ve anastomoz yapılacak uçlar gerginlik olmadan karşı karşıya getirilmelidir.
5. Hemostaz kontrol edilmeli ve anastomoz yapılacak uçlarda kanlanma bozukluğu olmamalıdır.
6. Anastomoz sirküler stapler yardımıyla yapıldığında, sirküler staplerin ucunda kalan iki bağırsak halkasının tam dairesel olduğu kontrol edilmelidir (7).

Sağ hemikolektomi: Çekum, çıkan kolon, hepatik fleksura, transvers kolonun sağ tarafı gibi sağ kolon kanserlerinde uygulanır. Yaklaşık 10-15 cm'lik ileum segmentiyle ile birlikte transvers kolonun ortasına kadar olan kısım (çekum, çıkan kolon, hepatik fleksura ve transvers kolonun yarısı) çıkarılarak, ileotransversostomi yapılır. Anastomoz manuel ya da staplerle; uç-uca, uç-yan, yan-yana yapılır. Cerrahların birçoğu ileokolik, sağ kolik ve orta kolik arterin sağ dalını ameliyatın başında, diseksiyona başlamadan önce bağlamayı tercih eder. Eğer orta kolik arter süperior mezenterik arterin çıkış yerinden bağlanırsa daha geniş olarak transvers kolon segmentinin rezeksiyonu yapılır. Bu sayede genişletilmiş sağ hemikolektomi yapılmış olur (5,7).

Sol hemikolektomi: Transvers kolonun sol tarafı, splenik fleksura, inen kolon, sigmoid kolonun proksimalinde olan sol kolon kanserlerinde uygulanmaktadır. Sol kolonun tamamen çıkarılmasının ardından kolo-kolostomi şeklinde anastomoz yapılır.

İnferior mezenterik arterin aorttan çıkış yerinden bağlanması sonucu, distal transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve üst rektumun rezeksiyonu yapılabilir. Buna da genişletilmiş ya da radikal sol hemikolektomi denir (7).

Transvers kolektomi: Hepatik fleksuraya yakın tümörlerde sağ hemikolektomi, splenik fleksuraya yakın tümörlerde sol hemikolektomi yapılır. Transvers kolonun orta kısmındaki tümörler ise transvers kolektomi, genişletilmiş sağ ya da sol hemikolektomilerle tedavi edilirler. Transvers kolektomide orta kolik arter bölgesindeki segmentin rezeksiyonu yapılır (6). Sigmoid kolon ve proksimal rektum tümörlerinde; inen kolon, sigmoid kolon, rektumun proksimali çıkartılır ve transvers kolonun sol tarafıyla rektumun distali arasında anastomoz yapılır.

Özel durumlar: Obstrüksiyon, perforasyon, lokal olarak ilerlemiş hastalık, tam tıkanma durumunda, bağırsak temizliği yapılmamış olması, ödem veya enfeksiyona bağlı proksimal ile distal bağırsak anslarının lümen çaplarının farklı olduğu durumlarda Hartmann (uç kolostomi) prosedürü uygulanmaktadır. Ameliyat esnasında proksimal kolon segmentinin temizlenmesinin ardından primer rezeksiyon-anastomoz, subtotal kolektomi ve ileosigmoid anastomoz veya total kolektomi ve ileorektal anastomoz yapılabilir. Ancak yapılacak işleme ameliyat öncesi karar vermek yerine ameliyat esnasındaki bulgulara ve hastanın durumuna göre karar verimek daha doğrudur (7).

Anterior Rezeksiyon (Mayo ameliyatı-Dixon ameliyatı): Rektosigmoid bölgede ve rektumun proksimal 1/3 üst bölümünde yer alan tümörlerde bu ameliyat yapılmaktadır. Anterior rezeksiyonda distal diseksiyonun sınırı, bağırsak duvarında tümörün alt sınırının yaklaşık 3 cm ötesine kadar, mezorektumda tümörün 5 cm altına kadar sürdürülmesi yeterli olmaktadır. Bu ameliyatta anastomoz peritonu açmadan karın içerisinde kalarak yapılabilmektedir (5,7).

Low Anterior Rezeksiyon (LAR): Rektumun 1/3 orta kısmındaki tümör ile linea dentata arasında 4 cm'den daha fazla mesafesi olan hastalarda uygulanır. Sigmoid kolon ve mezosu, tümörün 2 cm altına incek şekilde diseksiyon yapılır. Rektum ve tüm mezorektum rezeksiyonu yapılır. Anastomozda oluşabilecek gerginliğini azaltmak için splenik fleksura ve transvers kolonun sol yarısı diseksiyonlarla serbest hale getirilir. Kolorektal anastomoz sirküler stapler yardımıyla yapıldığında, stapler ucundan çıkarılan halkalar kontrol edilir.

Bu halkaların tam dairesel oluşu, bağırsak duvarındaki tüm katları ihtiva etmesi, yapılan anastomozun güvenliği açısından çok önemlidir. Anastomozda gerginlik olması halinde, anastomoz yapılan uçların kanlanmasıdan emin olunamadığında, anal kanala çok yakın distal bölgede anastomoz yapılması gibi durumlarda, hastaya anastomoz koruyucu olarak loop ileostomi ya da kolostomi açılabilir (5,7).

Abdomino-Perineal Rezeksiyon (Miles ameliyatı, APR): APR genelde tümör alt sınırı ile linea dentata arasında 4 cm'den daha az mesafe olan tümörlerde, low anterior rezeksiyonun mümkün olmadığı hastalarda uygulanan bir tekniktir. Sigmoid kolonu ve mezosunu, rektum ve mezorektumu, levator ani kasının önemli bir bölümünü, anal sfinkterleri, anüs, anal kanal, çevredeki cilt ve cilt altı dokusunu, bu bölgedeki lenfatiklerle birlikte bütün halinde total olarak çıkarma işlemidir. İnen kolon sol iliak bölgeye kalıcı kolostomi olarak ağızlaştırılır. Anastomoz yapma imkanı olmayan dar pelviste, anal sfinkter disfonksiyonu, tümörün direkt anal sfinkteri invaze etmesi, anorektal bölgede kötü diferansiye büyük tümörler gibi durumlarda APR en uygun tedavidir. Ameliyat esnasında rektumun tamamen serbestleştirilmesiyle, tümörün alt sınırı genelde yukarıya doğru yer değiştirmekte ve başlangıçta abdomino-perineal rezeksiyon (APR) planlanan hastalarda low anterior rezeksiyon (LAR) yapılarak sfinkterleri korumak ve kalıcı stoma açılmasını engellemek mümkün olabilmektedir (5,7).

Kolo-anal Anastomoz: Rektumun 1/3 alt kısmında tespit edilen tümörlerin tedavisinde kullanılan anastomoz tekniklerinden birisi kolo-anal anastomozdur. Bu teknikte; kitle rezeksiyonun ardından linea dentata üzerinde kalan anal kanal mukozası soyulur, kolon aşağı doğru çekilerek transanal yolla ve tek tek elle dikişlerle linea dentataya sütüre edilir. Sütür yetersizliğine bağlı olarak yüksek oranda anastomoz kaçağı ve pelvik sepsis ortaya çıkabilmektedir, bu nedenle anastomozun geçici bir stoma ile korunması önerilmektedir. Ameliyat sonrası dışkılama problemleri gelişmesi nedeniyle son yıllarda distal kolonda yaklaşık 8-10 cm uzunluğunda J biçiminde bir cep (poş) oluşturularak, poş ile anal kanal arasında anastomoz yapılması da tercih edilmektedir. J poşun uç kısmında kanlanmanın daha iyi olmasından dolayı, sütür yetersizliğine düz anastomozlara göre daha az oranda rastlanmaktadır (5,7).

Kemoradyoterapi

KRK'da primer tedavi şekli cerrahidir. Cerrahi tedavi uygulanmasına rağmen hastaların çoğu, karın içi nüks ve metastazlar nedeniyle hayatlarını kaybetmektedirler. Bundan dolayı gerek sistemik ve gerekse lokal etkilerinin olması nedeniyle kemoterapi ve radyoterapi tedaviye dahil edilmiştir. Kemoradyoterapi, neoadjuvan (ameliyat öncesi), adjuvan (ameliyat sonrası) veya palyatif amaçlı sistemik ve intraperitoneal olarak uygulanabilmektedir (5).

Neoadjuvan Kemoradyoterapi: Özellikle rektum karsinomlarında neoadjuvan kemoradyoterapi uygulanmasıyla rezektabilitenin artırılması, tümör evresinin düşürülmesi, etkili sistemik tedaviye erken başlanması ve anal sfinkterin korunması sağlanabilmektedir. Ancak bu tedavinin başarısı için hasta seçiminde endoskopik ultrason (EUS) veya MRG ile preoperatif iyi bir evreleme yapılmasına bağlıdır (14).

Adjuvan Kemoradyoterapi: Günümüzde en çok kullanılan kemoterapi modelleri;

5-Fluorourasil + Leucovorin (Folinik asit)

5-Fluorourasil + Levamizol

Radyoterapinin kolon kanserinde adjuvan tedavideki yeri tartışmalıdır. Radyoterapi uygulanan bölgede geniş ince bağırsak segmentlerinin bulunması ve toksisitesi, etkili biçimde uygulanmasını engellemektedir. Çevre dokulara invaze olan ve perfore olan tümörlerde yapıldığı zaman bölgesel ve lokal nüksü azalttığı görülmüş, ancak sağ kalımda anlamlı değişiklik görülmemiştir. Rektum kanserini adjuvan tedavisinde 5-Fluorourasil'in aynı zamanda radyo-duyarlaştırıcı olduğunun keşfedilmesiyle, Kemoterapi ve radyoterapinin birlikte uygulanması yönünde büyük avantaj sağlamıştır. Cerrahiyle kombine RT+ KT tedavide %33, sadece cerrahi yapılan kontrol grubunda %55 oranında nüks tespit edilmiştir (5, 15-17).

2.6. Prognostik Faktörler

KRK'da tümör muskularis propriayı tam olarak invaze etmemişse 5 yıllık sağkalım %95, muskularis propria tamamen invaze olmuş ancak lenf nodu tutulumu yoksa 5 yıllık sağkalım %80, lenf nodu metastazı varsa 5 yıllık sağkalım %20-40 civarındır. KRK'nın prognozu çok sayıda klinik ve patolojik parametreyle alakalıdır.

Bu parametreler önem sırası gözetilmeden aşağıda belirtilmiştir:

Cinsiyet: Prognoz kadınlarda erkeklere oranla daha iyidir.

Yaş: Çok genç bireylerde ve yaşlılarda prognoz daha kötüdür.

Lokal yayılım: Poliplerde insidental olarak tespit edilen fokal mikroskopik karsinomun prognozu çok iyidir. Mukoza ve submukozada sınırlı tümörlerde prognoz iyidir. Bağırsak duvarını aşarak bölgesel lenf nodlarına metastaz yapmış tümörlerde ise prognoz kötüdür.

Perforasyon: Bağırsak duvarında tümörün aşırı penetrasyonu nedeniyle meydana gelen perforasyon kötü prognozla ilişkilidir.

Mikroskopik tip ve grade: Mikroskopik evre ve klinik seyir arasında belirgin ilişkinin olduğu tespit edilmiştir. Mikroskopik alt gruplarından müsinöz karsinom, signet ring cell karsinom, small cell karsinom, diğer adenokarsinom tiplerinden daha kötü prognozludur. Müsin ilişkili antijenler olan Sialyl-Tn ve Sialyl Lewis antijeni bulunduran KRK'nın çok agresif klinik seyirlerinin olduğu görülmüştür.

İnflamatuvar reaksiyon: Bağırsak stromasının eozinofiller ve S100 protein pozitif dendritik hücrelerle infiltrasyonu, Crohn hastalığına benzer peritümöral lenfositik infiltrasyon iyi prognozla alakalıdır.

Vasküler ve perinöral invazyon: Vasküler invazyon oluştuğunda 5 yıllık yaşam süresi belirgin olarak düşmektedir. Perinöral invazyon ilerlemiş hastalığın işaretidir ve genel olarak kötü bir prognostik bulgudur.

Lenf nodu invazyonu: Tümör lenf nodlarına invaze olduğunda 5 yıllık sağkalım oranı azalır. Lokalizasyon ve lenf nodu tutulumunun yaygınlığı da önemlidir. Tümörün hemen komşuluğunda tutulan lenf nodları haricinde uzak lenf nodlarında da metastaz mevcutsa çok nadir kür sağlanır. Apikal lenf nodu tutulumu kötü prognoz işaretidir. Çok sayıda lenf nodunda metastaz olması halinde klinik seyir kötüdür. Lenf nodu tutulumu derecesi ve tümörün boyutları arasında korelasyon tespit edilmiştir (12).

Kromozom 18q'nun alellik kaybı: Bu karyotipik değişiklik KRK'da kötü bir prognostik bulgudur.

Tümör belirteçleri: KRK için günümüzde birçok tümör belirteci kullanılmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanlar; CEA, CA 50, CA 19-9, CA 242, TPS (tissue polipeptit spesifik antijen), TPA (tissue polipeptit antijen)'dir. TPA ve TPS tümör DNA'sının S fazını, dolayısıyla tümör hücrelerinin proliferasyon hızını gösterir. CEA, CA 19-9 ve TPA primer tümörün tanısında, nükslerin tespit edilmesinde, cerrahi ve adjuvan tedaviye tümörün verdiği cevabın takibinde kullanılmaktadır. İlk ameliyat esnasında safra kesesi içinden alınan sıvıda yapılan CEA ölçümlerinde yüksek değerlerin görülmesi, gizli karaciğer metastazlarının tespit edilmesine yardımcı olabilir. Ameliyat sonrası kolonoskopiyle anastomoz kenarlarından alınan biyopsilerde, human metallo panstimulin (MPS-I) yüksek düzeyde olması da kolon karsinomunun daha agresif prognozunu gösterir. Adenamatöz polipi olan kişilerin kolon biyopsilerinde tirozinaz artışının karsinom gelişiminin erken belirtisi olduğu bildirilmiştir (18,21).

Tümör hücrelerinin DNA indeksi: Flow sitometre yardımıyla tümör hücrelerinin DNA indeksi gösterilebilmektedir. Erken evre kanser hücreleri genelde diploid nükleusludur ve anöploid nükleuslu tümörlere göre daha az metastaz yapmaktadırlar. İleri evrede tümör hücrelerinde anöploid olma eğilimi görülür. Bazı çalışmalar; tümörün DNA indeksinin, tümörün klinik ve patolojik evresinden bağımsız olarak prognostik değerinin olduğu ortaya koymaktadır (22,23).

2.7.Kolorektal kanserlerde Nüks Nedenleri

KRK hastalarının kliniğe ilk başvurularında kanser vakalarının ortalama %70'inde uzak metastaz tespit edilmemektedir. Bu hastalara küratif tedavi amacıyla radikal rezeksiyon uygulanabilmektedir. Fakat radikal rezeksiyon yapılmış hastaların %25-50 civarında hastalık nüks etmektedir. Başlıca nüks yerleri; önceki ameliyat bölgesi, karaciğer ve akciğerdir. Nüksün ameliyat sonrası neden meydana geldiği konusunda çok net bilgiler bulunmamaktadır. Genel olarak iki tür sebepten ortaya çıktığı söylenebilir (24).

A) Tümörle ilgili sebepler: Tümör histolojisinin kötü differansiye (high grade) olması, tümörde artmış mûsin yapımı, tümörün venöz ve lenfatik dokulara invazyon göstermesi, tümör hücrelerinde anöploidi ve p53 gen mutasyonu olması başlıca nüks nedenleridir.

İleri evre tümörlerde (özellikle evre III-IV), adezyon, obstrüksiyon ve perforasyon mevcut olan tümörlerde rekürrens daha fazla görülebilmektedir (8,24).

B) Teknik faktörler: Primer tümörün total rezeksiyonunun yapılamaması en önemli etkindir. Özellikle rektum karsinomlarında mezorektal eksizyon ve pelvik lenfadenektomi de yapılmalıdır. No-touch tekniği ile tümörlü kolon segmentinin her iki ucundan naylon teyple sıkılarak bağlanması lümen içine olabilecek metastazları azalttığı, tümörlü kolon segmentini besleyen mezenterik damarların da erkenden bağlanmasının venöz ve lenfatik metastazları azalttığı tespit edilmiştir. Radyoterapinin ve kemoterapinin, neoadjuvan ve adjuvan tedavilerde etkin şekilde uygulanmasıyla nüksleri azalttığı bildirilmektedir. Ameliyat öncesi kan transfüzyonu yapmanın ve splenektominin tümöral hücrelerin davranışını olumsuz yönde etkilediği belirtilmiştir (8, 13, 22-25).

2.8.Lnc-RNA'ların Klinik Önemi

İnsan genomunun yaklaşık %75'inden fazlası seçici olarak kopyalandığı halde, transkriptlerin yalnızca küçük bir kısmı son olarak protein ürünlerine dönüştürülmektedir (26). Protein kodlama yeteneğine sahip olmayan transkriptlerin geri kalanı kodlamayan RNA (ncRNA) olarak isimlendirilmiştir. Bu kodlamayan RNA'lar, uzunluklarına göre iki ana gruba ayrılır. Küçük kodlamayan RNA'lar (Small Non-coding RNA: sncRNA), 200 nükleotidden daha kısadır ve büyük oranda mikroRNA'lar (miRNA) ve küçük nükleolar RNA'ları (snRNA) kapsamaktadır. Uzun kodlamayan RNA'lar (Long Non-coding RNA: lnc-RNA) ise; 200 nükleotidden daha uzun ve kodlama yeteneği olmayan farklı RNA moleküllerini içeren bir gruptur. Yapılan son çalışmalarda, insan genomunda yaklaşık 15,000 farklı lnc-RNA'nın olduğu tespit edilmiştir (27). Farklı fonksiyonlara sahip bu kodlamayan transkriptlerin sayısı giderek arttığı için, isimlendirilmeleri de zamanla değişmiştir. Bazı kaynaklarda bu transkriptler lincRNA (uzun intergenik kodlamayan RNA)'lar olarak isimlendirilirken, bazı kaynaklarda intergenik tanımı atlanarak basitçe lnc-RNA (uzun kodlamayan RNA)'lar olarak isimlendirilmiştir (28). Lnc-RNA'lar protein kodlayamazlar. Ancak epigenetik, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası aşamalarda gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görevleri vardır (29). Kanser ve Lnc-RNA'lar arasındaki ilişki, gelişme ve hücrel farklılaşmalar çalışmalar neticesinde ortaya çıkmıştır (30).

İnsan genomunda kanser gelişimiyle alakalı biyolojik süreçlere katılan çok sayıda Lnc-RNA keşfedilmiştir. Bu sebeple, Lnc-RNA düzensizliklerinin, mutasyonların veya anormal ifadelerinin kanser gelişimine yol açabileceğini düşündürmektedir. Genom çapında yapılan çalışmalarda, çok sayıda tek nükleotid polimorfizmin, intergenik veya intronik bölgelerde bulunduğunu ve Lnc-RNA işlevini etkileyebileceğini ortaya çıkarmıştır (31). Protein kodlayan genlere benzer şekilde, Lnc-RNA'lar da tümör oluşumunu etkileyen onkogenler ve tümör baskılayıcı genler gibi fonksiyonları olabilir. Belirli bir Lnc-RNA ile belirli bir kanser türü arasındaki ilişkinin araştırılması amacıyla, kanserli hücreler ve bitişik tümörsüz dokulardaki Lnc-RNA'nın ifade düzeylerinin revers transkripsiyon-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemiyle karşılaştırılması gereklidir (32). Kanserle ilişkisi iyi incelenmiş bir lncRNA, HOX antisens intergenik RNA (HOTAIR)'dır. Meme kanseri hücrelerinde HOTAIR'in düzensizliği, gen ekspresyonunda PRC2'nin yeniden hedeflenmesine sebep olur ve embriyonik fibroblastlara benzer yeni bir gen ifadesi kalıbı oluşturulur (33). Bu yönlendirme meme kanseri kliniğine, kanser invazyonunun ve metastazın artmasıyla etki eder (27). CCAT2 (Kolon-kanser İlişkili Transkript 2), KRK ifade düzeyi aşırı miktarda olan bir lnc-RNA'dır (34). CCAT2 meme kanserinde de ekspresyon düzeyi artar ve kötü prognozla ilişkilidir (35, 36). Lnc-RNA'ların birçok kanserde önemli rolleri vardır ve bu sebepten nüks ve klinik seyiri öngörebilmek amacıyla biyolojik marker olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Lnc-RNA'lar kanserin metastazında promotör ve inhibitör olarak görev alabilmektedir. Aşırı düzeyde ifade edilen ve metastazı teşvik eden Lnc-RNA'lar, tedavi amacıyla muhtemel hedefler olarak görülmektedir. Çeşitli kanser türlerini anlamak, teşhis etmek, prognozunu tahmin etmek ve tedavi etmek için Lnc-RNA'ların gelecekte önemli ara bileşenler olabileceği öngörülmektedir.

Bu çalışmada 16. kromozomda bulunan Lnc-RNA CRNDE geninin KRK'da gen ifade düzeyinin araştırılması, klinik kullanıma katkısı değerlendirildi.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu prospektif çalışma için Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulundan 26.09.2018 tarihli 2018/204 karar ile onay alındı. Çalışma protokolü oluşturularak Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi (BAP) birimine başvuruldu. TF.UT.19.22 no'lu BAP projesi 22.04.2019 tarihinde kabul edildi. Bu çalışma Nisan 2019 – Mayıs 2020 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi A.D. ve Tıbbi Biyoloji A.D. Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1.Kolorektal Kanserli Hastaların Biyopsi Örneklerinin Toplanması

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi kliniğinde 2014-2016 tarihleri arasında kolorektal adenokarsinom tanısı ile abdominoperineal rezeksiyon, rektum anterior rezeksiyon, low anterior rezeksiyon, sağ hemikolektomi, sol hemikolektomi, segmenter kolon rezeksiyonu ameliyatları yapılan hastaların patoloji laboratuvarındaki parafin blok spesimenlerinden, her hastanın tümörlü ve tümörsüz kolon dokularından örnekler (n:52) alındı. Çalışmaya dahil edilen hastalar ayrıca yaş, cinsiyet, KRK evresi bakımından değerlendirildi.

3.2. Kolorektal Kanserli Hastaların Biyopsi Örneklerinden Total RNA eldesi

RNA izolasyonu için RNeasy FFPE Kiti (Qiagen 73504) kullanarak kitin protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

Kitin çalışma protokolü şu şekildedir:

- 1) Örneğin bulunduğu parafin dokudaki fazla kısımlar skalpel ile kesildi.
- 2) Doku kesitleri 5–20 µm kalınlığında kesildi.
- 3) Bölmeleri 2 ml olan mikrosantrifüj tüpüne koyuldu ve kapağı kapatıldı.
- 4) 160 µl Deparafinizasyon Solusyonu eklendi. 10 saniye santrifüjlendi

- 5) 56 °C'de 3 dakika inkübe edildi, daha sonra oda sıcaklığında soğuması beklendi.
- 6) 150 µl Tampon PKD çözeltisi ekleyip vortekslendi.
- 7) 11,000 x g (10,000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlendi.
- 8) Renksiz faza 10 µl proteinase K çözeltisi eklendi ve pipetlendi.
- 9) 56 °C de 15 dk inkübe edildi, daha sonra 80°C de 15 dk inkübe edildi.
- 10) Alt kısımdaki renksiz fazı yeni 2 ml mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi.
- 11) Karışımı buzda 3 dakika inkübe ettikten sonra 20,000 x g (13,500 rpm) de 15 dakika santrifüjlendi.
- 12) Süpernatant yeni tüpe aktarıldı.
- 13) Üzerine 10 µl DNase I stok solüsyonu ve örnek hacmi kadar DNase Booster tampon çözeltisi eklendi (yaklaşık 16 µl). Kısa bir süre santrifüjlendi.
- 14) Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- 15) 320 µl tampon RBC çözeltisi eklendi ve karıştırıldı.
- 16) 720 µl Ethanol (%100) eklendi ve pipetlendi.
- 17) 2 ml toplama tüpü içine yerleştirilmiş RNeasy MinElute spin kolon içine örneğin 700 µl'sini transfer edildi. Kapak kapatıldı ve $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) de 15 saniye santrifüjlendi. Süzüntü uzaklaştırıldı.
- 18) 17. Adım tüp örnek kolondan geçinceye kadar tekrarlandı.
- 19) Kolona 500 µl tampon RPE eklendi ve $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) de 15 saniye santrifüjlendi. Süzüntü uzaklaştırıldı.
- 20) Kolona 500 µl tampon RPE eklendi ve $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) de 2 dakika santrifüjlendi. Süzüntü uzaklaştırıldı.
- 21) Yeni 2 ml koleksiyon tüpüne RNeasy MinElute spin kolonu yerleştirildi. Spin kolonun kapağı açıldı, maksimum devirde 5 dakika santrifüjlendi. Koleksiyon tüpü süzüntü ile birlikte uzaklaştırıldı.
- 22) Yeni 1,5 ml koleksiyon tüpüne RNeasy MinElute spin kolonu yerleştirildi. Spin kolon membranına 14–30 µl RNase-freewater eklendi. RNA ayırımı için kapak kapatıldı ve maksimum hızda 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpündeki birikinti total RNA'yı içermekteydi.

3.3. mRNA Örneklerinden qRT-PCR Yöntemi ile cDNA Elde edilmesi

Elde edilen RNA örnekleri smART First Strand cDNASynthesis kiti (EURxcat. no. E0804) random hexamer primer (1 μ L) seçeneği kullanarak 10 μ L RNA; 20 μ L reaksiyon hacminde yapılmıştır.

cDNA sentezinde kullanılan protokol şu şekildedir:

- 1- 5 x cDNA bufferı oda sıcaklığına koyulup, eritilmiştir ve hafifçe vortekslenmiştir. Gözle görülen beyaz çökelti dağılacak ve temiz buffer kullanıma hazır hale getirilmiştir.
- 2- RNase-free tüplerde, bileşenleri aşağıdaki gibi birleştirilmiştir;

Tablo 2: RNase-free tüplerin bileşenleri

BİLEŞENLER	MİKTAR
RNA (10 ng-5 μ g)	10 μ l
* primer	1 μ l
10 mM dNTP Mix	1 μ l
RNase-free Water	to 12.5 μ

3-Hafifçe karıştırılıp, santrifüjlenmiştir ve 65 °C’de 5 dakika inkübe edilmiştir, sonrasında buzda soğutulmuştur.

4- Reaksiyon tüpüne diğer bileşenler eklenmiştir.

Tablo 3: Reaksiyon tüpünün bileşenleri

BİLEŞENLER	MİKTAR
5 x cDNA Buffer	4 μ l
DTT 0.1 M	2 μ l
RNase Inhibitor 50 U/ μ l	0.5 μ l
smART (200 U/ μ l)	1 μ l
Total volume	20

5- Örnekler önceden ısıtılmış uygun sıcaklıktaki termal döngüleyici içine transfer edilmiştir. Sırayla şu şekilde inkübe edilmiştir: RNA'dan cDNA eldesinde revers transkripsiyon için termal döngüleyici ayarları 10 dakikada 25°C'de, 60 dakikada 50°C'de, 5 dakikada 80°C'de ayarlandı.

3.4. qPCR analizleri

Çalışmada CRNDE Lnc-RNA hedef gen bölgesi ile birlikte GAPDH geni House keeping geni (referans) olarak kullanılmıştır. CRNDE, GAPDH primerleri NCBI veri tabanında yer alan gen arayüzü (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) kullanılarak tasarlandı.

Tablo 4: Primer dizileri

CRNDE-F	GGCGGAGGAGAGGTGTTAAG
CRNDE-R	ACCAGCCTTGGGATGAATTT
GAPDH-F	CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC
GAPDH-R	GACCAAATCCGTTGACTCCG

Real time PCR analizlerinde kullanılan reaksiyon karışımının içeriği ve döngü programı alttaki gibidir.

Tablo 5: Eş zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri

Reagent	Stok Con.	Final Con.	Volume (µl)
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Cat No: 08-24-00001)	5X	1X	5
Primer-F	10 µM	0,3 µM	0,6
Primer-R	10 µM	0,3µM	0,6
PCR grade water			10,8
cDNA Template			3

Tablo 6: Eş zamanlı PCR prosedürü

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	15 dk.	1
95	15 sn.	40
60	60sn.	

3.5. Gen ifade düzeylerinin istatistiksel analizi

Tanımlayıcı istatistik olarak sayısal değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma, medyan (%25-%75) değerleri, kategorik değişkenler için ise sayı ve % değerleri verilmiştir. CRNDE ve GAPDH ekspresyon düzeyleri qRT-PCR sonuçlarında Ct değeri olarak kaydedildi. PCR tarafından sayısal Ct değeri olarak ölçülebilen tümörlü ve normal doku verileri, referans gen ile kıyaslanıp Δ Ct değerleri saptandı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu için Shaphiro-wilk testi yapıldı. Normal dağılıma uygun olmadığı görülen Δ Ct düzeylerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon testi kullanıldı. İstatistiksel analizler için SPSS Windows versiyon 24.0 paket programı kullanıldı ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tümörlü ve tümörsüz dokuların Δ Ct değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü (Şekil 1) kullanılarak kıyaslandı. Bu değer ile ilgili genin tümörlü kolon dokusundaki ifade düzeyinin, kontrol (normal doku) baz alınarak kıyaslanmasını sağlar ve katsayı bilgisi vermektedir.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\text{Örnek } \Delta Ct (\text{Gen-Referans}) - \text{Kontrol } \Delta Ct (\text{Gen-Referans})]}$$

Şekil 1: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Formülü

4.BULGULAR

Bu çalışmaya Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında KRK tanısı ile ameliyat edilen 52 hasta dahil edildi. KRK tanılı 52 hastanın %48,1'i kolon ca, %51,9'u rektum ca tanısı mevcuttu. TNM Evreleme sistemine göre %11,5'i evre 1, %46,2'si evre 2, %36,5'i evre 3, %5,8'i evre 4 idi. Cinsiyet dağılımı açısından %51,9'u erkek %48,1'i kadındı. KRK tanılı hastaların yaş ortalaması 58 (25-87) idi. Hastalar histopatolojik değerlendirildiğinde çoğunluğunu (%92,3) adenokarsinomlar oluşturmakta idi (Tablo 7).

Tablo 7: Hastaların demografik ve klinik özellikleri

		n=52	
		Ortalama±SS	Median (Min-maks)
Yaş		58,1±13,1	58 (25-87)
		n	Yüzde (%)
Cinsiyet	K/E	25/27	48,1/51,9
Tanı	Kolon Ca	25	48,1
	Rektum Ca	27	51,9
T	1	2	3,8
	2	7	13,5
	3	39	75,0
	4	4	7,7
N	0	30	57,7
	1	7	13,5
	2	14	26,9
	3	1	1,9
M	0	49	94,2
	1	3	5,8
Evreleme	Evre 1	6	11,5
	Evre 2	24	46,2
	Evre 3	19	36,5
	Evre 4	3	5,8

SS: Standart sapma Ca: Adenokarsinom K: Kadın E: Erkek T:Tümör N: Lenf nodu M: Metastaz
n: Hasta Sayısı

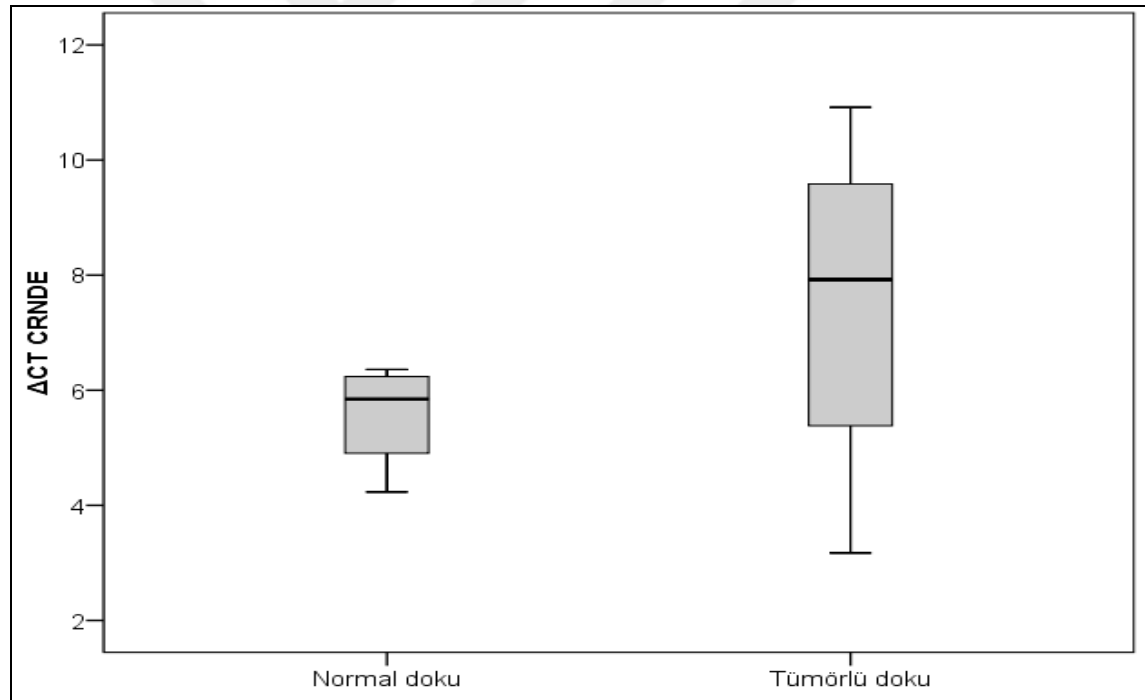
4.1. Tümörlü ve bitişik tümörsüz kolon dokusunda CRNDE Δ Ct düzeylerinin karşılaştırılması

Tümörlü dokuda CRNDE Δ Ct düzeyleri ile bitişik tümörsüz dokudaki CRNDE Δ Ct düzeyleri arasında anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır (Tablo 8, Şekil 2).

Tablo 8: Tümörlü ve bitişik tümörsüz dokudaki CRNDE Δ Ct ekspresyon düzeyleri

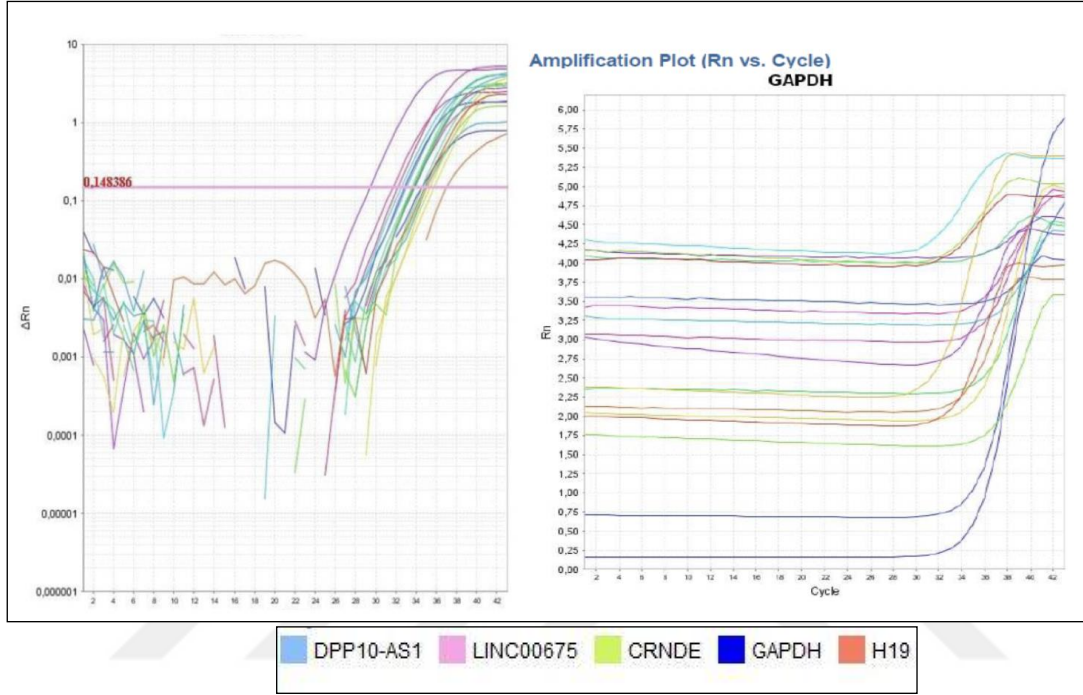
	Normal doku		Tümörlü doku		
	Mean $\pm$ SD	Median (%25-%75)	Mean $\pm$ SD	Median (%25-%75)	P
Δ Ct CRNDE	5,57 $\pm$ 0,95	5,84 (4,57 -6,3)	7,48 $\pm$ 3,21	7,92 (4,28 -10,25)	0,144

P< 0,05

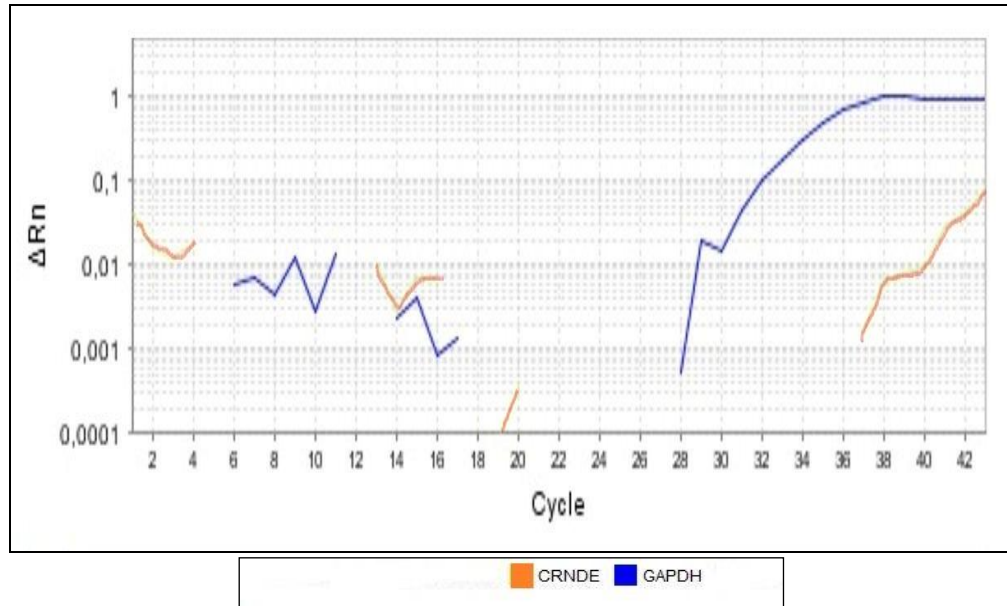


Şekil 2: Tümörlü ve bitişik tümörsüz dokudaki Δ Ct CRNDE ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.

RNDE ve referans genin (GAPDH) erken-geç dönem eksponansiyel amplifikasyon düzeyleri grafikte görülmektedir (Şekil 3-4). Referans gen amplifikasyon düzeyleri ile CRNDE amplifikasyon seviyeleri çalışmanın değerlendirilmesi için uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 3: Gen Amplifikasyonları



Şekil 4: CRNDE geni ile GAPDH geni qRT-PCR'de döngüye göre amplifikasyon seviyeleri

4.2. Tümörlü ve bitişik tümörsüz kolon dokusunda CRNDE gen ekspresyon düzeylerinin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoduyla karşılaştırılması:

Tüm kolorektal hastalarda tümörlü bölgenin dokusunda CRNDE ekspresyonunda, bitişik tümörsüz bölgenin dokusundaki CRNDE ekspresyonuna göre 5,06 kat azalma görülmüştür.

Yalnızca rektum kanserli hastalar değerlendirildiğinde tümörlü bölgenin dokusundaki CRNDE ekspresyonunda, bitişik tümörsüz bölgenin dokusundaki CRNDE ekspresyonuna göre yaklaşık 8 kat azalma görülmüştür.

Evre I-II kolon ve rektum kanserli hastalarda tümörlü bölgenin dokusundaki CRNDE ekspresyonunda, bitişik tümörsüz bölgenin dokusundaki CRNDE ekspresyonuna göre yaklaşık 4,7 kat azalma görülmüştür.

Evre III-IV kolon ve rektum kanserli hastalarda tümörlü bölgenin dokusundaki CRNDE ekspresyonunda, bitişik tümörsüz bölgenin dokusundaki CRNDE ekspresyonuna göre yaklaşık 5,9 kat azalma görülmüştür.

Yaşa göre kıyaslamalar yapıldığında, 55 yaş altı KKK hastalarında tümörlü bölgenin dokusundaki CRNDE ekspresyonu, bitişik tümörsüz bölge dokusundaki CRNDE ekspresyonuna göre yaklaşık 4,9 kat azalma görülmüştür.

5.TARTIŞMA

T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumunun 2014 yılı istatistik verilerine göre KRK, akciğer ve meme kanserinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. KRK etiyolojisinde birçok etkenin rolü mevcuttur. KRK hastalarının az bir kısmında genetik geçiş tespit edilmiştir. Kanserlerin çoğunun başlama ve ilerlemesinde ortalama on yıllık bir süreç görülür. Bu dönem hastalık ortaya çıkmadan önlemek ve tedavi etmek için yeterli bir süredir. Yapılan güncel çalışmalarda Lnc-RNA'ların kanser oluşumuyla ilişkileri araştırılmıştır ve bu araştırmaların sonucunda Lnc-RNA'ların kolorektal kanserlerin ortaya çıkması ve ilerlemesi açısından sebeplerden biri olabileceği öne sürülmüştür.

KRK'lı 80 hastanın tümörlü ve tümörsüz dokularının karşılaştırıldığı bir çalışmada, CRNDE geninin artmış ifade düzeylerinde EZH2 molekülüne bağlanarak, DUSP5 (dual specificity phosphatase 5) ve CDKN1A genlerinin epigenetik olarak ifadelerini susturduğu tespit edilmiştir. Bunun sonucunda KRK hücrelerinde apoptozisi engelleyerek, proliferasyona ve tümör büyümesine sebep olduğu görülmüştür. Bu çalışma CRNDE'nin KRK'da muhtemel bir terapötik hedef olduğunu desteklemektedir (37).

Shandong Üniversitesi Qilu Hastanesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Temmuz 2007 - Ekim 2009 tarihleri arasında radikal rezeksiyon uygulanan 142 KRK hastasının aynı spesimende tümörlü ve tümörsüz dokularında Lnc-RNA CRNDE-h geninin ekspresyonunun kolorektal tümörlü numunelerde büyük ölçüde artmış olduğu gösterildi. Dikkat çekici bir şekilde CRNDE-h'nin eşleştirilmiş bitişik kanserli olmayan dokulara ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi) kıyasla KRK'lı dokularda kuvvetle ifade edildiğini ve sonuçların çoğunun iki kattan fazla artış gösterdiğini bulmuşlardır. Hatta birkaç KRK'lı örnekte, CRNDE-h ekspresyonunda 50 katından fazla artış tespit etmişlerdir (38).

Yu ve arkadaşları(39), KRK'da CRNDE geninin seviyelerinin artmasıyla TCF7L2 (transcription factor7-like2) ile yarışmalı biçimde mikro RNA 217 'yi bağlayarak proliferasyon, progresyon ve invazyonu arttırdığı ortaya çıkarılmıştır.

Han ve arkadaşları(40) da koleraktal kanserli 64 adet doku ve hücre hattında CRNDE ve miR-181a-5p ekspresyon seviyelerini qRT-PCR yöntemiyle incelemişlerdir.

CRNDE ve miR-181a-5p'nin KRK hücrelerinin proliferasyonu ve kemorezistansı üzerine etkisini incelemek için fonksiyon kazancı, fonksiyon kaybı analizleri yapmışlardır. KRK doku örneklerinde CRNDE ekspresyon düzeylerinin artmış olduğu bulunmuştur. miR-181a-5p, CRNDE'nin inhibitör hedefi olarak belirlenmiştir. KRK hücre hatlarında hem CRNDE yıkımı hem de miR-181a-5p aşırı ekspresyonunun, hücre proliferasyonunun inhibe olmasına ve kemoresistansın azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Wnt / β -katenin sinyalleşmesinin hem CRNDE yıkımı hem de miR-181a-5p aşırı ekspresyonu tarafından inhibe edildiğini belirlenmiştir. Sonuç olarak CRNDE'nin miR-181a-5p ekspresyon seviyelerini ve Wnt / β -katenin sinyalleşmesinin aktivitesini modüle ederek, KRK'nın ilerlemesini ve kemorezistansını düzenleyebildiğini göstermiştir.

Bir çalışma CRC'de tanı ve prognozu için yeni bir serum bazlı biyobelirteç olarak eksozomal CRNDE-h'yi incelemişlerdir. Lnc-RNA'lar dahil olmak üzere RNA'ların tümör kanseri hücrelerinden eksozomlar yoluyla kan, idrar, süt ve tükürük gibi vücut sıvılarına salgılandığını göstermişlerdir. Bu çalışmada serumda saptanabilen RNA'nın eksozomlarda konsantre edildiğini ve eksozomların saflaştırılmasının dolaşımdaki RNA amplifikasyon testinin hassasiyetini artırabileceğini açıklamışlardır. Dolaşımdaki eksozomlar, düzenleyici RNA molekülleri taşıyıcı ve uzun mesafeli hücre-hücre iletişimde rol oynar. 468 hastada KRK için eksozomal CRNDE-h'nin tanısal ve prognostik değeri çalışılmıştır. Eksozomal CRNDE-h'nin KRK hastalarının serumunda saptanabilir ve stabil olduğunu ve tümör hücrelerinden türetildiğini göstermiştir. CRNDE-h'nin eksozomda saptanması, KRK tanısı ve prognozu için invaziv olmayan serum bazlı bir tümör belirteci olarak kullanılmasına ışık tutmuştur. Ayrıca eksozomal CRNDE-h düzeylerinin pozitif uzak metastaz ve pozitif lenf nodu metastazı da dahil olmak üzere kötü klinik sonuç faktörleri ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Ortaya çıkan kanıtlar spesifik eksozomal Lnc-RNA'ların ekspresyonunun kanserin klinikopatolojik özellikleri ile ilişkili olduğunu ve dolayısıyla anlamlı biyobelirteçler olarak işlev görebildiğini göstermiştir. Bu gözlemlerin ışığında eksozomal CRNDE-h saptanmasının, KRK tanısı ve prognozu için invaziv olmayan bir yol sağlayabileceğini varsaymışlardır (41).

Serum belirteci olarak KRK'de eksozomal CRNDE-p ve microRNA-217'nin tanısal potansiyelini araştıran bir çalışmada, KRK ksenograft farelerinden ve KRK hastalarından alınan serumda salgılanan eksozomlarda yüksek CRNDE-p ve düşük miR-217 seviyeleri tespit ettiler. Tersine, kemoterapi sonrası serum ekzomomlarında kemoterapi öncesi hasta örneklerine göre daha düşük CRNDE-p ve daha yüksek miR-217 seviyeleri gözlemlenildi. Yüksek CRNDE-p ve düşük miR-217 serum eksozom düzeyleri ileri klinik evreler (III / IV), tümör sınıflaması (T3 / T4) ve lenf nodu veya uzak metastaz ile ilişkili olduğunu tespit ettiler. Bu nedenle serum eksozomal CRNDE-p ve miR-217 düzeylerinin birlikte değerlendirilmesinin KRK hastaları için tanısal ve prognostik potansiyeli olduğunu göstermişlerdir (42).

Graham ve arkadaşları(43), 454 doku örneğinde qRT-PCR deneyleri ile kolorektal adenomların ve adenokarsinomların %90'ında yüksek CRNDE ekspresyonu gösterdiğini tespit ettiler. CRNDE-h ekspresyon seviyeleri, normal dokuya karşı adenom için %95 duyarlılık ve %96 özgüllük göstermiştir. Plazmada CRNDE-h seviyelerini ölçen bir qRT-PCR deneyi, 15 KRK hastasının 13'ünde (%87) pozitif, ancak 15 sağlıklı bireyin sadece 1'inde (%7) pozitif bulunmuştur. Bireysel CRNDE transkriptlerinin, doku ve plazma biyobelirteçleri olarak umut verdikleri ve potansiyel olarak kolorektal adenomlar ve kanserler için yüksek hassasiyet ve özgüllük sergilediği sonucuna varmışlardır.

Gao ve arkadaşları(44) Lnc-RNA CRNDE'nin aşırı ekspresyonunun, KRK hücrelerinin göçünü ve yayılma gücünü arttırdığını, ayrıca CRNDE'nin KRK hücrelerine oksaliplatine karşı kemorezistans kazandırdığını buldular.

KRK dışında da CRNDE üzerine çalışmalar mevcuttur. Bir çalışma insan hepatoselüler karsinom (HCC) hücre dizileri ve dokularında, Lnc-RNA CRNDE'nin ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. CRNDE'nin in vitro olarak HCC hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve istilasını desteklediğini göstermişlerdir. İnsan HCC hücre çizgileri ve dokularında CRNDE'nin ekspresyon seviyesinin arttığını tespit etmişlerdir. Bu da HCC teşhisi için ideal bir biyobelirteç görevi görebileceğini işaret etmiştir (45).

Mide kanserinde CRNDE ekspresyonunun klinik önemini ve fonksiyonel mekanizmalarını araştıran bir çalışmada, mide kanseri örneklerinde ve hücre çizgilerinde qRT-PCR ile değerlendirilmiştir.

CRNDE ekspresyonunun mide kanser dokularında ve hücrelerinde, normal gastrik doku ve hücre çizgileri ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğunu gözlemlenmiştir. CRNDE'nin yüksek ekspresyonu invazyon derinliği, TNM evresi ve lenf nodu metastazı ile korele olduğunu, ayrıca yüksek CRNDE ekspresyonunun daha kısa genel sağkalımı ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Çok değişkenli analizlerde yüksek CRNDE ekspresyonunun kötü prognozun anlamlı bir bağımsız öngörücüsü olduğunu doğrulamışlardır. İn vitro analizlerde CRNDE'nin parçalanmasının hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve mide kanser hücrelerinin istilasını inhibe ettiğini göstermişlerdir (46).

Serviks kanserinde CRNDE ekspresyonunun klinik öneminin araştırıldığı bir çalışmada, CRNDE servikal kanser hücresi büyümesini arttırmak için p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) bağının gerekli olduğunu doğrulamışlardır. CRNDE aşırı ekspresyonunun ise serviks kanseri hücre büyümesini önemli ölçüde arttırdığını tespit etmişlerdir. qRT-PCR ve western blot analizi, CRNDE yıkımının PUMA ekspresyonunu belirgin şekilde arttırdığını bunun sonucunda serviks kanseri hücre proliferasyonunu azalttığını, CRNDE ekspresyonunda artışın PUMA ekspresyonu azaltarak serviks kanseri hücre proliferasyonunu arttırdığını tespit etmişlerdir (47).

Liang ve arkadaşları (48) yapmış oldukları metaanalizde, CRNDE'nin solid tümörlerde potansiyel bir prognostik biyobelirteç olup olmadığını araştırmışlardır. Araştırmaya 1570 hasta, 13 çalışma dahil edilmiş. Toplanan sonuçlar CRNDE aşırı ekspresyonunun kötü prognoz ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu ve kanserli hastalar için bağımsız bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini gösterilmiştir. CRNDE'nin lenf nodu metastazı ve ileri evre hastalık ile ilişkili olduğunu gösterilmiş, CRNDE ile cinsiyet, tümör boyutu ve farklılaşma arasında bir ilişki saptanmamıştır. CRNDE ekspresyonunun kanser hastalarında genel sağkalım için bağımsız bir faktör olabileceğini tespit etmişlerdir. Dolayısıyla kanser hastaları için potansiyel bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini öne sürülmüştür.

Ellis ve arkadaşları(49) çeşitli kanser türlerinde CRNDE ekspresyonunu araştırmışlardır. Lösemilerde ve bazı solid tümörlerde, değiştirilmiş CRNDE ekspresyonunun farklı alt sınıfların özelliği olduğu ve farklı klinik sonuçlarla ilişkili olabileceğini açıklamışlardır. CRNDE çoğu akut miyeloid lösemide orta derecede yukarı regüle edilir.

CRNDE transkriptleri, hepatoselüler karsinomda (HCC) ekspresyonu en yüksek olan (kanseri olmayan dokuya göre 21 kat), yüksek JNK1 aktivitesi ile ilişkili HCC alt kümesinde daha büyük bir artış (35 kat) olanlardır. Prostat kanserinde CRNDE ekspresyonu hafifçe yükselirken, yukarı regülasyon kötü prognozu olan bir alt prostat kanseri grubuyla ilişkilidir ve metastazların yaklaşık üçte biri yüksek seviyelerde CRNDE eksprese eder. CRNDE ekspresyonu genellikle kanserlerde yükselirken, bazı durumlarda normal kontrol dokusundan daha düşüktür. Örneğin böbreğin berrak hücreli karsinomlarının ve böbreğin tip I papiller tümörlerinin aksine, kromofob hücreli tümörlerinde ve onkositomlarında CRNDE'nin önemli ölçüde(ortalama 6 kat) düşük ekspresyon göstermiştir. Seröz over karsinomu için ekspresyon önemli ölçüde(ortalama 32 kat) azalmıştır.

Shao ve arkadaşları(50) on beş tedavi edilmemiş ve patolojik olarak doğrulanmış primer renal hücreli karsinom (RCC) tümör örneği üzerinde Lnc-RNA CRNDE'nin ekspresyon düzeyini çalışmışlardır. CRNDE'nin RCC hücre hatlarında Wnt / β -katenin sinyalini aktive ettiğini gösterdiler. Birlikte ele alındığında, mevcut çalışmada, Lnc-RNA CRNDE'nin RCC malign dokularında yüksek oranda eksprese edildiğini ve artmış CRNDE'nin Wnt / β -katenin sinyalini aktive ederek RCC hücre proliferasyonunu güçlü bir şekilde desteklediğini buldular. Lnc-RNA CRNDE'nin RCC malign dokularında yüksek oranda eksprese edildiğini ve RCC hücrelerinde CRNDE'nin ekspresyon paterninin daha proliferatif bir fenotip elde ettiğini buldular.

Bazı Lnc-RNA'ların çeşitli akciğer hastalıklarında karmaşık roller oynadığını, küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında (KHDAK) Lnc-RNA CRNDE işlevlerinin büyük ölçüde bilinmediğini ortaya konulmuştur (51). Bu çalışmada, KHDAK progresyonunda CRNDE'nin rolünü ve mekanizmasını araştırdılar. KHDAK hastalarında ve hücrelerinde CRNDE'nin mRNA seviyesi qRT-PCR ile tespit edildi. CRNDE susturma veya aşırı ekspresyonunun KHDAK hücre proliferasyonu ve büyümesi üzerindeki etkisi sırasıyla MTT ve akış sitometrisi ile değerlendirildi.

Ayrıca anormal CRNDE ekspresyonunun siklinler ve PI3K / AKT yolu üzerindeki etkisi araştırıldı. CRNDE'nin KHDAK hücre proliferasyonunu ve hem in vitro hem de in vivo büyümeyi desteklediği gösterildi. Ayrıca CRNDE, G0 / G1 aşamasından S aşamasına hücre döngüsü geçişini düzenledi. Ayrıca, CRNDE'nin KHDAK hücre hatlarında PI3K / AKT sinyalini aktive ettiğini gösterildi.

Sonuç olarak, CRNDE KHDAK malign dokularında yüksek oranda eksprese edildi ve yüksek CRNDE, PI3K / AKT sinyalini aktive ederek KHDAK hücre proliferasyonunu ve büyümesini kuvvetle destekledi. Sonuçlar KHDAK tedavisi için yeni bir potansiyel terapötik hedef olarak CRNDE kullanımına ışık tuttu.

Bu çalışma kolorektal adenokarsinom dokularında CRNDE gen ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığını göstermiştir. Aksine literatürde yapılan birçok çalışmada KRK'da CRNDE ekspresyonunun yükseldiği belirtilmektedir, sonuçların uyumsuz olması CRNDE ekspresyonunda tanımlanmamış başka gen sinyal yollarının olabileceğini akla getirmektedir.

Hasta gruplarının daha homojen seçilip sayılarının yeterli düzeyde çoğaltılarak ilgili yollarla birlikte değerlendirilmesi ve hücre kültürleri ile desteklenmesi gerekmektedir. Henüz tanı ve tedavide klinik olarak tek başına yeterli olmadığı görüşündeyiz.

Ayrıca KRK oluşumunda patofizyolojide rol oynayan diğer etkenlerin (diyet, ailesel faktörler, Alkol kullanımı, sigara alışkanlığı gibi) çalışmaya dahil edilmemesi, sonucu etkilemektedir. Daha anlamlı sonuçlar elde edebilmek için tüm risk faktörlerinin beraber değerlendirildiği detaylı çalışmalar gerekmektedir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda Lnc-RNA'ların kanserli dokularda ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda KRK hastalarının tümörlü dokularıyla bitişik normal dokular arasında Lnc-RNA CRNDE ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştırarak kolonda kitlesel değişiklik meydana gelmeden genetik analizler ile erken tanı konulabilmesini hedefledik.

Çalışmamızda tümörlü dokularda ve bitişik normal dokularda CRNDE ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır, istatistiksel olarak CRNDE geni ekspresyon seviyesinde ΔCt değerlerinin kıyaslamasında anlamlı fark görülmemiştir. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine göre kıyaslamalar yapıldığında ise kolon ve rektum kanserli hastalarda CRNDE geni ekspresyonunda yaklaşık 5 kat azalma görülmüştür. Bulgularımız CRNDE geni ekspresyonunun azalmasının KRK'da erken tanıda kullanılabilecek bir biyobelirteç olduğunu düşündürmektedir.

Bu nedenle; diğer kanser türlerinde olduğu gibi kolon kanserlerinde de gen ekspresyon çalışmalarının sayısının ve çalışılan populasyon sayısının artırılması ve Lnc-RNA gen ailesinin polimorfizm çalışmalarıyla desteklenmesi önerilmektedir.

7.KAYNAKLAR

- 1) Cronin KA, Lake AJ, Scott S, Sherman RL, Noone AM, Howlader N, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part 1: National cancer statistics. Cancer 2018; 124: 2785.
- 2) Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Türkiye Kanseri İstatistikleri (pdf) 2017. T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara, S:44. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2014-RAPOR._uzuuun.pdf
- 3) Sayek İ, Kolon-Rektum Kanseri, Temel Cerrahi. Ed: İ Sayek, 3. baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 2004: 1243-9
- 4) Buğra D. Anatomi. In: Alemdaroğlu K, Akçal T, Buğra D.(eds). Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları, İstanbul, 2004, Alemdaroğlu K, Akçal T, Buğra D, Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları, 2. Baskı, İstanbul, Türk kolon ve rektum cerrahisi derneği, 2004: 17-20.
- 5) Keçer M. Kolon Kanseri. In: Kalaycı G, Genel Cerrahi cilt 2 (2.baskı), İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2002: 1343-59.
- 6) Köksal F: Kolorektal karsinogenezi mikroiRNA'nın rolü. Tıpta Uzmanlık Tezi. Çukurova Tıp Fakültesi, Adana, 2011.
- 7) Topuz E, Aykan FN, Sindirim Sistemi Kanseri. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları,1998; 373-475.
- 8) Malazgirt Z, Kolon Kanseri Etiyolojisi. Genel Cerrahi. Nobel Tıp Kitabevi İstanbul,1996, 1: 371-72.
- 9) Kodner IJ, Fry OR, Fleshman JW, Rimbaum EH. Colon Rektum and Anus: Diagnosis Schwartz Principles of Surgery,1994, 2;1262-64.
- 10) Schrock TR, Colon and rectum: Diagnostic Techniques. In: G. D. Zuidema (ed.) Shackelford's surgery of the alimentary tract (4th ed.) Philadelphia, W.B. Saunders, 1996: 23-38.
- 11) Fabbri C, Cirocchi R, Rossi P, Mazieri M, Pacifici A, Volpi G, et al. Surgery of local recurrence in rectal cancer. Minevra Chir. 1997; 52: 21-24.
- 12) Waxner SD, Forde KA, Sellers G, Geron N, Lopes AJ, Weisse C. How well can surgeons perform colonoscopy. Surg. End. 1998; 12: 1410-14.
- 13) Sayek İ, Kolorektal Kanseri, Temel Cerrahi,1991; 830-39.
- 14) Minsky BD. Preoperative combined modality treatment for rectal cancer. Oncology. 1994; 8: 53-68.

- 15) Wiatt T, Eggerding F, Aaleriote F. Combined effect of X radiation and 5-fluorouracil on survival of transplanted leukemic cells. *J Natl Cancer Inst.* 1971; 47: 865-870.
- 16) Moertel CG, Childs DS, Reitemeier RJ, Colby MY, Holbrook MA. Combined 5-fluorouracil and supervoltage radiation therapy of locally unresectable gastrointestinal cancer. *Lancet.* 1969; 2: 865- 867.
- 17) Douglass HO, Moertel CG, Mayer RJ, Thomas PR, Lindblad AS, Mittleman A, et al. Survival after postoperative combination treatment of rectal kanser. *N Engl J Med.* 1986; 315: 1294-1295.
- 18) Lindmark G, Gerdin B, Pahlman L, Prognostic predictors in colorectal carsinom Colon, Rectum. 1991; 37 ,12, 1219-29.
- 19) Wojciechowicz DC, Mallon RG, Picon A, Paty PB. Characterization of lectin resistant cell populations derived from human colon carcinoma: Correlation of K-Ras with beta1-6 branching of N-linked carbohydrate and CEA production. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 259: 588-593.
- 20) Ganger DR, Hamilton PD, Fletcher JW, Fernandez-Pol JA. Metallopanstimulin is overexpressed in a patient with colonic carcinoma. *Anticancer Res.* 1997; 17: 1993-1999.
- 21) Malecka -Panas E, Kordek R, Biernat W, Tureaud J, Liberski PP, Majumdar AP. Differential activation of total and EGF receptor tyrosine kinase in the rectal mucosa in patients with adenomatous polyps, ulcerative colitis and colon cancer. *Hepatogastroenterology.* 1997; 44: 435-440.
- 22) Jones DJ, Moore M, Schofield PF. Prognostic significance of DNA ploidy in colorectal cancer: A prospective flow cytometric study. *Br J Surg.* 1988; 75: 28-33.
- 23) Kokal WA, Gardine RL, Sheibani K, Morris PL, Prager E, Zak IW, et al. Tumor DNA content in resectable primary colorectal carcinoma. *Ann. Surg.* 1989; 209: 188-93.
- 24) Füzün M. Rektum kanserinde lokorejyonel rekürrense yaklaşım. *Kolon, rektum ve anüs hastalıkları.* 2002; 27-29.
- 25) Pilipshen SJ, Heilweil M, Quan SH, Sternberg SS, Enker WE. Patterns of pelvic recurrence following definitive resections of rectal cancer. *Cancer.* 1984; 53: 1354-1362.
- 26) Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature.* 2012; 489: 101-108.
- 27) Deniz E, Erman B. Long noncoding RNA a new paradigm in gene expression control. *Funct Integr Genomics.* 2017; 17: 135-143.

- 28) Laurent GS, Wahlestedt C, Kapranov P. The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends Genet.* 2015; 31: 239-251.
- 29) Chen LL, Carmichael GG. Long noncoding RNAs in mammalian cells: What, where, and why? *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2010; 1: 2-21.
- 30) Cogill SB, Wang L. Co-expression network analysis of human lncRNAs and cancer genes. *Cancer Inform.* 2014; 13: 49-59.
- 31) Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 9362-9367.
- 32) Zhang R, Xia LQ, Lu WW, Zhang J, Zhu JS. LncRNAs and cancer. *Oncol Lett.* 2016; 12: 1233-1239.
- 33) Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature.* 2010; 464: 1071-1076.
- 34) Ling H, Spizzo R, Atlasi Y, Nicoloso M, Shimizu M, Redis SR, et al. CCAT2, a novel noncoding RNA mapping to 8q24, underlies metastatic progression and chromosomal instability in colon cancer. *Genome Res.* 2013; 23: 1446-1461.
- 35) Cai Y, He J, Zhang D. Long noncoding RNA CCAT2 promotes breast tumor growth by regulating the Wnt signaling pathway. *Onco Targets Ther.* 2015; 8: 2657-2664.
- 36) Redis RS, Sieuwerts AM, Look MP, Tudoran O, Ivan C, Spizzo R, et al. CCAT2, a novel long non-coding RNA in breast cancer: expression study and clinical correlations. *Oncotarget.* 2013; 4: 1748-1762.
- 37) Ding J, Li J, Wang H, Tian Y, Xie M, He X, et al. Long noncoding RNA CRNDE promotes colorectal cancer cell proliferation via epigenetically silencing DUSP5/CDKN1A expression. *Cell Death Dis.* 2017; 8: e2997.
- 38) Liu T, Zhang X, Yang YM, Du LT, Wang CX. Increased expression of the long noncoding RNA CRNDE-h indicates a poor prognosis in colorectal cancer, and is positively correlated with IRX5 mRNA expression. *Onco Targets Ther.* 2016; 9: 1437-1448.
- 39) Yu B, Ye X, Du Q, Zhu B, Zhai Q, Li XX. The Long non-coding RNA CRNDE promotes colorectal carcinoma progression by competitively binding miR-217 with TCF7L2 and enhancing the Wnt/ β -Catenin signaling pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2017; 41: 2489-2502.

- 40) Han P, Li JW, Zhang BM, Chen LJ, Li YM, Gu XY, et al. The lncRNA CRNDE promotes colorectal cancer cell proliferation and chemoresistance via miR-181a-5p-mediated regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Cancer* 2017; 16: 9.
- 41) Liu T, Zhang X, Gao S, Jing F, Yang Y, Du L, et al. Exosomal long noncoding RNA CRNDE-h as a novel serum-based biomarker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016; 7: 85551-85563.
- 42) Yu B, Du Q, Li H, Li H, Ye X, Zhu B, et al. Diagnostic potential of serum exosomal colorectal neoplasia differentially expressed long non-coding RNA (CRNDE-p) and microRNA-217 expression in colorectal carcinoma. *Oncotarget*. 2017; 8: 83745-83753
- 43) Graham LD, Pedersen SK, Brown GS, Ho T, Kassir Z, Moynihan AT, et al. Colorectal neoplasia differentially expressed (CRNDE), a novel gene with elevated expression in colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Genes Cancer*. 2011; 2: 829-840.
- 44) Gao H, Song X, Kang T, Yan B, Feng L, Gao L, et al. Long noncoding RNA CRNDE functions as a competing endogenous RNA to promote metastasis and oxaliplatin resistance by sponging miR-136 in colorectal cancer. *Onco Targets Ther*. 2017; 10: 205-216.
- 45) Chen Z, Yu C, Zhan L, Pan Y, Chen L, Sun C. LncRNA CRNDE promotes hepatic carcinoma cell proliferation, migration and invasion by suppressing miR-384. *Am J Cancer Res*. 2016; 6: 2299-2309.
- 46) Du DX, Lian DB, Amin BH, Yan W. Long non-coding RNA CRNDE is a novel tumor promoter by modulating PI3K/AKT signal pathways in human gastric cancer. *Eur Rev Med and Pharmacol Sci*. 2017; 21: 5392-5398.
- 47) Zhang JJ, Fan LP. Long non-coding RNA CRNDE enhances cervical cancer progression by suppressing PUMA expression. *Biomed Pharmacother*. 2019; 117: 108726
- 48) Liang C, Zhang B, Ge H, Xu Y, Li G, Wu J. Long non-coding RNA CRNDE as a potential prognostic biomarker in solid tumors: A meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 2018; 481: 99-107.
- 49) Ellis BC, Molloy PL, Graham LD. CRNDE: A long non-coding RNA involved in cancer, neurobiology, and development. *Front Genet*. 2012; 3: 270.
- 50) Shao K, Shi T, Yang Y, Wang X, Xu D, Zhou P. Highly expressed lncRNA CRNDE promotes cell proliferation through Wnt/ β -catenin signaling in renal cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2016; 37: 15997-16004.

51) Liu XX, Xiong HP, Huang JS, Qi K, Xu JJ. Highly expressed long non-coding RNA CRNDE promotes cell proliferation through PI3K/AKT signaling in non-small cell lung carcinoma. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2017; 44: 895-902.

