

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**KOLOREKTAL KANSERLERDE miR520a-3p/b/d-3p/e VE miR302a/b EKSPRESYON
PROFİLİNİN ÇIKARILMASI**

Dr. Abdulkadir Yasir Bahar
TIPTA UZMANLIK TEZİ

KAHRAMANMARAŞ – 2014

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

KOLOREKTAL KANSERLERDE miR520a-3p/b/d-3p/e VE miR302a/b EKSPRESYON
PROFİLİNİN ÇIKARILMASI

Dr. Abdulkadir Yasir Bahar
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Hamide Sayar

KAHRAMANMARAŞ - 2014

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın oluşmasında ve yürütülmesinde her türlü desteği gösteren ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli tez hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hamide SAYAR'a,

Asistanları olmakla övündüğüm, eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığıım Kahramanmaraş Tıbbi Patoloji Anabilimdalı ve Gaziantep Tıbbi Patoloji Anabilimdalı'nda değerli hocalarıma,

Gaziantep Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŐLI ve Dr. Recep BAYRAKTAR'a

Eğitimim süresince dostluklarını benden esirgemeyen, birlikte çalıőmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve patoloji labaratuvarlarının tüm çalıőanlarına en içten dileklerle teşekkür ediyorum.

Her zaman sevgi ve sabırla yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Dr. Abdulkadir Yasir BAHAR

2014

ÖZET

Kolorektal Kanserlerde miR520a-3p/b/d-3p/e Ve miR302a/b Ekspresyon Profiline Çıkarılması

GİRİŞ VE AMAÇ: Kolorektal kanserler tüm dünyada 3. en sık görülen kanserlerdir. Kanserden ölümlerde 4. sıradadır. Türkiye’de 2008 yılı verilerine göre kadınlarda 3. en sık (insidans 13,5/100000), erkeklerde 4. en sık (insidans 20,8/100000) görülen kanserlerdir. Otofaji, sellüler organel ve proteinlerin yıkımını gerçekleştiren homeostatik bir süreçtir. LC3 (microtubule-associated protein1 light chain 3), hücrede otofaji aktive olduğunda otofagozom üzerinde görülen ve otofaji aktivitesini gösteren bir proteindir. MikroRNA’lar (miRNA) küçük, protein kodlamayan 20-25 nükleotidli RNA’lardır. Nükleotid dizinlerinin tamamlayıcısı mRNA’lara bağlanıp transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlerler. miR520a-3p, miR520b, miR520d, miR520e, miR02-a, miR302-b otofaji yolağındaki çeşitli genlerle de ilişkili olabilecek miRNA’lardır. Bu çalışmada kolon kanserinde LC3C ekspresyonunu ve prognostik faktörlerle ilişkisini ve otofaji yolağını kontrol eden genlerle (ULK1/2, UVRAG, ATG7) ilişkili olabilecek miRNA’ların (miR520a-3p, miR520b, miR520d-3p, miR520e, miR302-a, miR302-b) ekspresyonları ve bunun prognostik klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini değerlendirdik.

GEREÇ VE YÖNTEM: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji bölümü arşivinden Ağustos 2009-Ocak 2014 tarihleri arasında kolorektal karsinom nedeni ile kolektomi uygulanmış lokal ileri evre (T3-T4) 50 olgu seçildi. Prognostik klinikopatolojik özellikler belirlendi. İmmünohistokimyasal olarak LC3C ekspresyonu değerlendirildi. LC3C ekspresyonu ile prognostik klinikopatolojik veriler arasındaki ilişki ki-kare analizi ile, bağımsız parametreler Kaplan-Meier cox-regresyon analizi ile karşılaştırıldı. Olgulara ait tümörlü ve tümörsüz dokuların miRNA ekspresyon analizi Corbett Research (Model: RG-600, Avustralya) RT-PCR cihazı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel işlemler SPSS 17.0 programı ile yapıldı.

BULGULAR: Kolorektal karsinomda %52 (26/50) oranında yüksek LC3C ekspresyonu tespit edildi. LC3C ile tümör çapı, histolojik grade ve tümör yerleşim yeri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. Tümörlü kolon dokularında, tümörsüz kolon dokularına oranla miRNA520b (mean FC=-1,7±0,30 SEM) , miRNA520d-3p (mean FC=-1,46±0,33 SEM) ve miRNA520e (mean FC=-0,66±0,29 SEM)'de anlamlı ekspresyon kaybı izlendi. Ancak miRNA ekspresyon seviyeleri ile LC3C ekspresyonu, cinsiyet, yaş, histolojik grade, TNM evre, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı ve sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.

SONUÇ: Çalışmamızın sonucuna göre kolorektal kanser tanısı ve hedefe yönelik tedavi ajanlarının geliştirilmesi açısından miRNA520e, miRNA520d-3p, miRNA520b ekspresyonunda azalmanın gösterilmesi faydalı olabilir. Kolorektal kanserlerde, otofaji aktivitesi ve miRNA520e ,miRNA520d-3p, miRNA520b ekspresyonunda azalma arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılması için, ULK-1/2, UVRAG, ATG-7 gen ekspresyon profilinin çıkarılması yararlı olacaktır.

ANAHTAR KELİMELER: Kolorektal karsinom, otofaji, LC3C, miRNA, miR520a-3p, miR520b, miR520d-3p, miR520e, miR302a, miR302b

ABSTRACT

INTRODUCTION: Colorectal cancer is the third most common cancer in the world. It is the fourth in deaths due to cancer. In Turkey, it is the third most common cancer in women (incidence 13,5/100000) and fourth in men (incidence 20,8/100000) according to 2008 data. Autophagy is a cellular self-digestion pathway involved in proteins and organelles degraded through delivery to lysosomes for promoting cell survival, development and homeostasis. LC3 (microtubule-associated protein1 light chain 3) is a protein seen on the autophagosome when the autophagy activated. It shows the aotophagic activity of cells immunohistochemically. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs approximately 20–25 nucleotides in length. They regulate the post-transcriptional gene expression by binding to target complementary mRNA genes. mir-520a-3p, mir-520d-3p, mir520-b, mir-

520-e, mir-302-a, mir-302-b, and may be associated with autophagy pathway genes. In this study, we investigated the relationship between autophagy activity and prognostic factors in colon cancer. Also the expression of miRNAs (mir-520a-3p, mir520-d-3p, mir520-b, mir-520-e, mir-302-a, mir-302-b) associated with the genes controlling autophagy pathway in colon cancer and its relationship with clinicopathologic parameters were evaluated.

MATERIAL AND METOD: 50 patients who underwent colectomy for local advanced stage (T3 and T4) colorectal carcinoma between August 2009 and February 2014, were selected. Prognostic clinicopathological features were evaluated. Immunohistochemical testing were performed to evaluating LC3C expression status. Chi-square analyses were used to test associations between parameters. The Kaplan-Meier, and Cox regression analyses were used to test associations and independent predictor status of LC3C and prognostic clinicopathological factors. miRNA expression profiling was detected using Real Time PCR (Corbett Research Model: RG-600, Australia). Statistical analyses were performed with SPSS 17.0 software.

FINDINGS: High expression of LC3C was observed in 52% (26/50) of colorectal cancers. There was statistically significant relation between high LC3C expression with tumor size, histological grade and tumor site. Expression levels of miRNA520b (mean FC=-1,7±0,30 SEM), miRNA520d-3p (mean FC=-1,46±0,33 SEM) and miRNA520e (mean FC=-0,66±0,29 SEM) were significantly downregulated in tumoral colorectal tissues when compared to non-tumoral colorectal tissues. We did not find a significant relation between downregulated expressions of miRNA520e, miRNA520d-3p, miRNA520b and various clinicopathological parameters (Age, tumor size, tumor site, histological grade, TNM stage, lymphovascular invasion, perineural invasion, LC3C expression).

CONCLUSION: In our study, we found downregulated expressions of miRNA520e, miRNA520d-3p and miRNA520b in colorectal carcinomas. This findings may be usefull for diagnosis and molecular targeted cancer therapies of colorectal carcinomas. Evaluation of the ULK-1/2, UVRAG and ATG-7 gene expressions will be usefull for understanding of

relations between autophagy activity and miRNA520e, miRNA520d-3p, miRNA520b downregulated expression, in colorectal carcinoma.

KEYWORDS: Colorectal Carcinoma, autophagy, LC3C, miRNA, miR520a-3p, miR520b, miR520d-3p, miR520e, miR302a, miR302b

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
TEŞEKKÜR	I
ÖZET	II
İNGİLİZCE ÖZET	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	V
TABLolar DİZİNİ	VI
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.KOLON	3
2.1.1.KOLON EMBRİYOLOJİSİ	3
2.1.2. KOLON ANATOMİSİ	3
2.1.3.KOLON HİSTOLOJİSİ	5
2.1.4.KOLON FİZYOLOJİSİ	6
2.2.KOLOREKTAL KARSİNOM	7
2.2.1.EPİDEMİYOLOJİ VE GENEL ÖZELLİKLER	8
2.2.2.ETYOLOJİ	9
2.2.3.ADENOMDAN KARSİNOMA PROGRESYON	14
2.2.4.KOLOREKTAL KARSİNOGENEZ	14
2.2.5.KLİNİK ÖZELLİKLER	18
2.2.6. MAKROSKOPİK BULGULAR	19
2.2.7.MİKROSKOPİK BULGULAR	20
2.2.8. TÜMÖR YAYILIMI	22
2.2.9.KOLOREKTAL KARSİNOMLARDA EVRELEME	24

2.2.10. PROGNOZ	26
2.2.11. TEDAVİ	29
2.3.OTOFAJİ	30
2.3.1. TANIM VE GENEL BİLGİLER	30
2.3.2.OTOFAJİ DÜZENLENMESİ	30
2.3.3.HÜCRE ÖLÜMÜ VE OTOFAJİ	31
2.3.4.OTOFAJİ VE HÜCRE YAŞLANMASI	32
2.3.5.OTOFAJİ VE APOPİTOZ İLİŞKİSİ	32
2.3.6. OTOFAJİNİN KANSERLERDEKİ ROLÜ	32
2.3.7. LC3C (Cytosolic-associated protein light chain 3-C)	36
2.4.MİRNA	36
2.4.1.miRNA VE KANSER	38
2.4.2. miRNA VE OTOFAJİ	38
2.4.3. miRNA VE KOLOREKTAL KANSER	39
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	41
4.BULGULAR	46
5.TARTIŞMA	65
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	73
7.KAYNAKLAR	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

	SAYFA NO
Şekil 1. Kolonun anatomik görüntüsü	5
Şekil 2. Adenom –karsinom sekansı	17
Şekil 3: Otofaji yolağında anahtar role sahip olan genler	30
Şekil 4:miRNA Sentezi Ve İşlevi	37
Şekil 5:CAP gradeleme sistemi ile sağkalım arasındaki ilişki	49
Şekil 6:LC3C ekspresyonunun sağkalımla ilişkisi	57

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1:Adenokarsinom , kribriiform yapılar oluşturmuş glandlar	50
Resim 2 :Müsinöz karsinom	50
Resim 3: Low grade adenokarsinom	51
Resim 4: High grade adenokarsinom	51
Resim 5: Lenfovasküler invazyon	52
Resim 6: Perinöral invazyon	52
Resim 7: Yüksek LC3C ekspresyonu izlenen tümöral alanlar	55
Resim 8: LC3C stoplazmik boyanma paterni	55
Resim 9:LC3C stoplazmik noktasal (dot-like) patern boyanma	56
Resim 10: LC3C stoplazmik noktasal (dot-like) patern boyanma (400x)	56
Resim11: LC3C ile stoplazmik noktasal (dot-like) patern boyanma (1000x)	57
Resim 12: Normal kolon mukazası ve tümör hücrelerinde LC3C boyanması	68
Resim 13: Plazma hücrelerinde kuvvetli LC3C ekspresyonu	69

TABLolar DİZİNİ

	SAYFA NO
Tablo 1. HNPCC tanısında yaygın olarak kullanılan tanı kriterleri	11
Tablo 2. Kolon tümörleri ve rektal tümörlerin metastaz insidansları	24
Tablo 3. Kolorektal karsinomlarda AJCC/UICC TNM evreleme sınıflaması	26
Tablo 4: Otofaji yolağında anahtar role sahip genler ve ilişkili miRNA'lar	39
Tablo 5: cDNA Reaksiyonunda kullanılan maddelerin içerikleri ve miktarları	43
Tablo 6: Real-Time PCR Reaksiyonunda kullanılan maddelerin içerik ve miktarları	44
Tablo 7 : Vakaların cinsiyetlere göre yaş grupları	45
Tablo 8: Tümör yerleşim yeri ve tümör çapı dağılımı	46
Tablo 9: Prognostik faktörlerin histolojik gradele karşılaştırılması ve p değerleri	47
Tablo 10:Klinikopatolojik verilerin sağkalım üzerine etkisi	48
Tablo 11 :Vakaların anti-LC3C ile pozitif boyanma yüzdesi ve boyanma yoğunluğu skorları toplamları	49
Tablo 12: LC3C ekspresyonunun klinikopatolojik verilerle karşılaştırılması	53
Tablo 13: Kolorektal kanserde miRNA302a ekspresyonundaki değişim grafiği	54
Tablo 14: Kolorektal kanserde miRNA302b ekspresyonundaki değişimin grafiği	58
Tablo 15: Kolorektal kanserde miRNA520a-3p ekspresyonundaki değişimin grafiği	59
Tablo 16: Kolorektal kanserde miRNA520b ekspresyonundaki değişimin grafiği	60
Tablo 17: Kolorektal kanserde miRNA520d-3p ekspresyonundaki değişimin grafiği	60
Tablo 18: Kolorektal kanserde miRNA520d-3p ekspresyonundaki değişimin grafiği	61
Tablo19:Artmış ve azalmış miRNA ekspresyon ortalamalarının istatistiksel olarak karşılaştırılması	61
Tablo 20:Histolojik grade ve miRNA FC değerlerinin istatistiksel Karşılaştırılması	62
Tablo 21: TNM Evre ve miRNA FC değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	62
Tablo 22: LC3C Ekspresyonu ve miRNA FC değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	62
Tablo23: Hasta cinsiyeti ve miRNA FC değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	63
Tablo 24: Hasta yaşı ve miRNA FC değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	63
Tablo25: Tümör çapı ve miRNA FC değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	63
Tablo 26: Lenf Nodu Metastazı ve miRNA FC değerlerinin istatistiksel Karşılaştırılması	64
Tablo 27: miRNA Log2 FC değerleri ile sağkalım arasında ilişki	64

1.GİRİŞ VE AMAÇ

KRK tüm dünyada 3. en sık görülen kanserlerdir. 2008 yılı verilerine göre dünya genelinde 1.24 milyon kişi KRK tanısı almıştır ve tüm kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. KRK, kanserden ölümlerde dünya genelinde 4. sıradadır ve yaklaşık 610,000 ölümden sorumludur. Türkiye'de 2008 yılı verilerine göre kadınlarda 3. en sık (insidans 13,5/100000), erkeklerde 4. en sık (insidans 20,8/100000) görülen kanserlerdir. Erken teşhis edildiğinde sağkalım yüksektir. 5 yıllık sağkalım erken evrelerde %90'a yaklaşmaktadır. Ancak ileri evre ve metastatik olgularda prognoz kötüdür.

Otofaji kendi kendini yeme olarak bilinen hücrel bir sindirim mekanizmasıdır. Otofaji, hücrenin sağ kalımını, büyümesini ve homeostasisini sağlamak için hücre içerisindeki proteinleri veya zarar görmüş organelleri çift zarlı bir kesecik içerisine alarak lizozoma taşır ve sindirimini sağlar. Otofaji kesintiye uğradığında tümörigenez desteklenir ve hızlanır. Otofaji yolağı aktive olduktan sonra otofagozomların oluşmasında ve lizozoma füzyon aşamalarında birçok otofajik gen rol almaktadır. Bu genlerden bazıları ise anahtar role sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda otofajinin nörolojik hastalıklar, karaciğer hastalıkları, kalp hastalıkları, ve kanser gibi patolojilerde rol aldığı gösterilmiştir. LC3 (microtubule-associated protein1 light chain 3) otofagozom oluşumunda anahtar role sahiptir. İmmunohistokimyasal olarak gösterilmesi otofaji aktivitesini göstermektedir.

miRNA'lar (miRNA) küçük, protein kodlamayan 20-25 nükleotidli RNA'lardır. Protein kodlamayan bu RNA molekülleri, kendi nükleotid dizilerinin tamamlayıcısı olan hedef mRNA'lara bağlanıp transkripsiyon baskılaması veya mRNA yıkımı ile transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesini gerçekleştirirler. miRNA'lar birçok hastalıkta olduğu gibi kanserin başlamasında ve ilerlemesinde görev almaktadır. miRNA'lar hücre ölüm sinyali yollarının düzenlenmesinde de alternatif role sahiptir.

“mir-520a-3p, mir-520b, mir-520d-3p, mir-520e, mir-302-a, mir-302-b” otofaji yolağındaki çeşitli genlerle de ilişkili olabilecek miRNA'lardır. miRNA'lar hücre zarından geçebilmektedirler. Bu sayede kan ve vücut sıvılarından izolasyonları mümkündür. Bu nedenlerle miRNA'lar kanser teşhisi ve hedefe yönelik tedavi için alternatif olanaklar sunmaktadır.

Kolon kanserinde otofaji aktivitesini ve prognostik faktörlerle ilişkisini araştırdık. Bu tezde kolon kanserinde, otofaji yolağını kontrol eden genlerle (ULK1/2, UVRAG, ATG7) ilişkili olan miRNAların (mir520-a-3p, mir-520b, mir-520d-3p, mir-520e, mir-302-a, mir-302-b) ekspresyonunu ve bunun prognostik klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini değerlendirdik.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.KOLON

2.1.1 KOLON EMBRİYOLOJİSİ

Vitellus kesesi ile ilişkili bulunan basit endoderm diski yani primitif bağırsak, erken diferansiyasyona uğrayarak ön bağırsak, orta bağırsak ve arka bağırsak olmak üzere üç kısma ayrılır. Orta bağırsaktan çekum, apendiks, çıkan kolon, 2/3 proksimal transvers kolon gelişir. Arka bağırsaktan 1/3 distal transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon, rektum ve anal kanal gelişir. Zamanla proksimal kolon mezosu batın sol yanında rezorbe olur ve fikse bir duruma geçer. Transvers kolonla sigmoid kolon mezoları kalır. Böylece en uzun mezoya transvers ile sigmoid kolonda rastlanır. Klinikte pratik olarak ilk yarıya sağ kolon, ikinci yarıya sol kolon denmektedir (1).

2.1.2. KOLON ANATOMİSİ

İleumun son kısmından anüse kadar uzanır ve 1.5m uzunluğundadır. Çekumda en büyük çapa sahiptir. Rektuma doğru gittikçe küçülür. İnce bağırsaktan, haustra koli denilen boğumlarla, dış kısımda appendices epiploica denilen yağ kesecikleri ile ve longitudinal kas liflerinin bir araya toplanması ile oluşan tenialar ile ayrılmaktadır (1).

Kalınbağırsak sağ iliak bölgeden başlar, sağ lumbar ve hipokondriyak bölgeler boyunca karaciğerin alt yüzüne kadar yükselir. Fleksura koli dekstra denilen bükümle sola kıvrılır. Epigastrik ve umbilikal bölgeleri çaprazlayıp sol hipokondriyak bölgeye gelir. Burada fleksura koli sinistra ile aşağı doğru kıvrılır. Sol lumbar ve sol iliak bölgelerden geçerek pelvis boşluğuna ulaşır. Sol iliak bölgede fleksura sigmoidayı yapar. Buradan pelvis arka duvarı boyunca inerek anüse ulaşır (Şekil 1) (1).

ÇEKUM: Kalın barsağın kese şeklindeki başlangıç kısmıdır. Boyu 6.5cm, genişliği 7.5cm'dir. Geniş bir lümeneye sahip olması ve duvarının ince olması nedeni ile intestinal obstrüksiyonlarda kolonun en sık perfore olan kısmıdır (1).

APENDİKS: 5-10mm çapında tüp şekilli uzantıdır. Çekum tepesinden başlar. Ortalama 8cm uzunluğundadır (1).

ÇIKAN KOLON: Çekumdan, karaciğer sağ lobunun alt yüzüne, fleksura kolika dekstraya kadar uzanır. Ön ve yan yüzleri peritonla kaplıdır, 15-20cm uzunluğundadır (1, 2).

TRANSVERS KOLON: En uzun ve en hareketli kısmıdır. Fleksura kolika dekstradan dalağın alt ucundaki fleksura kolika sinistraya kadar uzanır. Tamamen periton içindedir. Yaklaşık 50cm'dir (1).

İNEN KOLON: Sol böbrek dış yüzü boyunca aşağı doğru iner. Böbreğin alt ucunda biraz içe dönerek, psoas ile quadratus lumborum arasındaki açıda seyrederek. Crista iliaca'dan sonra iliak kolon adını alır. Ön ve yan yüzleri periton ile örtülüdür (1). Ortalama 25 cm uzunluğunda olup, kolonun en kalın kas tabakasına sahip bölümüdür (2) .

SİGMOİD KOLON: S şeklinde kıvrılmıştır. 40cm uzunluğundadır. Pelvis boşluğundadır. Apertura pelvisis superior hizasında başlar. 3. sakral vertebranın ön yüzünde, rektum ile sonlanır. Çapı 2.5cm'dir ve kolonun en dar yeridir (2).

REKTUM: Sakrum eğikliğini takip ederek kıvrımlı şekilde aşağı iner ve anal kanalda sonlanır. Proksimal 2/3 kısmının ön ve yan yüzü ile distalin sadece ön yüzü periton ile kaplıdır (1).

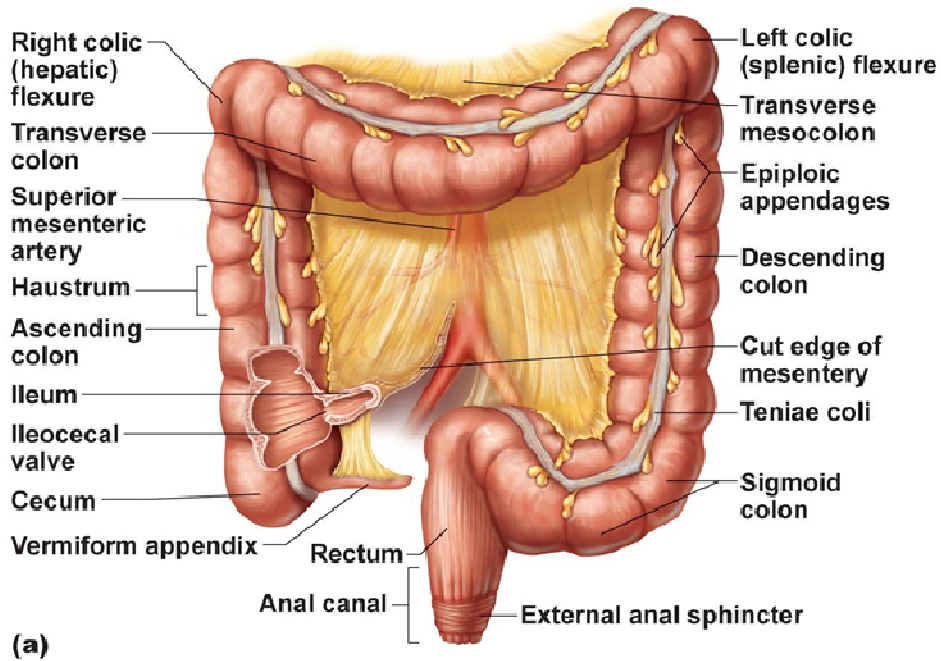
ANAL KANAL: 2.5-4cm uzunluğundadır. Rektumun alt kısmı ile arkaya doğru açı yapar. Peritonu yoktur (1).

Çekum, apendiks, inen kolon, transvers kolonun büyük kısmı arteria mesenterika superior'dan ve transvers kolonun sol ucu, inen kolon, sigmoid kolon arteria mesenterika inferior'dan beslenmektedir. Rektum ise a.mesenterika inferior, a. iliaca interna, a. pudenda interna olmak üzere üç farklı kaynaktan beslenmektedir. Kalın barsağın venleri arterler ile yandaş, onlarla aynı planda dağılırlar ve aynı isimleri alırlar. Sonunda hepsi vena portayı oluştururlar (1, 2).

Fleksura kolika sinistraya kadar olan kısmının lenf drenajı nodi lymphatici mesenterika superior'a dökülür. İnen kolon ve sigmoid kolonun lenfatikleri nodi lymphatici mesenterika inferiora, buradan üst preaortik nodlar yoluyla kolayca truncus intestinalis ve cisterna chyli'ya ulaşır. Bu nedenle burada lokalize kanserin yayılması daha büyük riskler doğurur. Rektum

ve anal kanal üst yarısının lenfatikleri, para rektal nodlar yoluyla nodi lymphatici mesenterika inferiora ve orta rektal lenf nodlar yoluyla nodi lymphatici iliaca communise gider. Anal kanal alt yarısı lenfatikleri, diğerlerinden farklı olarak perine derisinin derininden ve bağ dokunun arasından nodi lymphatici inguinalis superficialis'e dökülürler (1).

Kalın barsağın inervasyonuna baktığımızda, fleksura kolika sinistraya kadar olan bölümün sempatikleri, plexus ve ganglion mezenterika superioridan (10.Th-1.L) gelirken parasempatikleri, n.vagustan gelir. Fleksura kolika sinistra ile rektum üst kısmı arasındaki barsağa sempatikler plexus ve ganglion mezenterika inferior (1.L-2.L) yoluyla ve parasempatikleri n.erigentes ile gelir. Ano-rektal bölgede linea pectinata'nın üstündeki kısma sempatikleri plexus hypogastrikus inferior ve parasempatikleri n.erigentes verir. Linea pectinata'nın altında kalan anal kısım somatik bir sinir olan n.pudenda interna'nın dalı olan n.hemorrhoidalis inferioridan inerve olmaktadır (1).



Şekil 1. Kolonun anatomik görüntüsü (Toolopp.com Human Anatomy Picture)

2.1.3.KOLON HİSTOLOJİSİ

Kalın bağırsak duvarı da tüm gastrointestinal sistem gibi histolojik olarak tunika mukoza, tunika submukoza, muskularis eksterna ve tunika seroza/adventisya olmak üzere 4 tabakadan oluşmaktadır (3).

Tunika Mukoza

Mukoza ise epitel, lamina propriya ve muskularis mukoza olarak 3 tabakaya ayrılır. Mukozal yüzey tek sıralı alçak kolumnar veya küboidal epitel ile döşelidir. Karakteristik olarak villuslar yoktur. İntestinal glandlar (liberkühn glandları ya da kriptleri) uzundur ve çok sayıda goblet ve emici (absorbif) hücre içermektedir. Bunlara ek olarak immatür ve andiferansiye prekürsör hücreler, endokrin hücreler ve paneth hücreleri de kriptlerin bazalinde bol miktarda bulunmaktadır. Çekum ve proksimal sağ kolon mukozasında yer alan paneth hücrelerinde, lizozim, epidermal büyüme faktörü gibi ürünler içeren çok sayıda eozinofilik sekretuar granül bulunur. Kolonun endokrin hücreleri proksimal ve distal kolonda yerleşmişlerdir (4). Lamina propria fibroblastlar, damarlar, sinirler, düz kas ve inflamatuvar hücrelerin birikimini içerir. Muskularis mukoza iki ince düz kas tabakasından oluşmaktadır. İçte sirküler ve dışta ise longitudinal kas bulunmaktadır (3).

Tunika Submukoza

Lenfatik damarlar, büyük kan damarları, ve sinir pleksusları ile arada düzensiz bağ dokudan oluşmaktadır. Sinir lifleri ve ganglion hücreleri Meissner pleksusunu meydana getirmektedir (3).

Muskularis Eksterna

İçte sirküler, dışta longitudinal olarak düzenlenmiş düz kas hücreleri mevcuttur. İki kas tabakası arasında Auerbach pleksusu bulunmaktadır (3).

Seroza

Mezotel, tek katlı skuamöz epitel hücreleri içeren seröz membrandır. Altında az miktarda bağ doku mevcuttur. Mezenter olarak devam eder (3).

2.1.4. KOLON FİZYOLOJİSİ

Kolonun fonksiyonu,

- 1) Kimusdan su ve elektrolitlerin absorpsiyonu (proksimal yarısı)
- 2) Feçesin atılma zamanına kadar depo edilmesidir (distal yarısı).

Kalın bağırsak hareketleri yavaş olmalarına rağmen, tüm Gİ kanalın diğer kısımlarındaki gibi karıştırıcı ve itici (propulsif) hareketler olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır (5).

Karıştırıcı hareketler-haustrasyonlar; kalın bağırsaklarda segmentasyon hareketlerine benzer hareketler ve ayrıca büyük sirküler kasılmalar meydana gelir. Kasılma noktalarının her birinde sirküler kaslar 2,5cm. kadar kasılabilirler. Sirküler kaslar ile birlikte üç ayrı şerit halinde bulunan ve ‘tenya koli’ adı verilen longitudinal kaslar da kasılır. Feçes bu kontraksiyon periyodları esnasında anal yöne doğru yavaş yavaş ilerlerler (5).

İtici hareketler-“Kitle hareketleri”; ince bağırsakta görülen peristaltik hareketler kalın bağırsaklarda meydana gelmez. Bunun yerine kitle hareketleri denilen başka bir hareket ile fekal içerik anüse doğru itilir. Bu hareketler ancak her gün ancak birkaç defa oluşur. Kitle hareketleri duodenokolik ve gastrokolik refleksler ile kasılma noktasından başlar (5).

Kalın bağırsakta en önemli sekresyon mukustur. Mukus sekresyonu esas olarak mukoza yüzeyindeki goblet hücrelerinin direkt temas ile uyarılmaları ve Liberkühn kriptalarındaki goblet hücrelerine gelen lokal myenterik refleksler ile düzenlenir. Mukus kalın bağırsak duvarını zedelenmelere karşı korur ve ayrıca fekal maddeyi bir arada tutar. Kalın bağırsak ve distal ileumda bulunan epitel hücrelerinin klor iyonlarını aktif olarak absorbe edici özel bir yeteneği vardır. Eş zamanlı olarak bikarbonat iyonları salgılanır ve ortamın alkali olması sağlanır (5).

İleoçekal valv yoluyla günlük 500-1000ml kimus kalınbarsağa geçer ancak 100-200ml sıvı feçesle atılır. Ayrıca sodyum emiliminde de görevi vardır (5).

Kolonun proksimal yarısında çok sayıda bakteri bulunur ve selülozu az miktarda sindirme yeteneğindedir. Böylece her gün vücuda biraz kalori temin ederler, fakat bu enerji insanlarda son derece azdır. Bakteriyel aktivite sonucu; K vitamini, B12 vitamini, tiamin, riboflavin vitaminleri ve çeşitli gazlar oluşmaktadır (5).

2.2.KOLOREKTAL KARSİNOM

TANIM

Kolon ve rektumun malign epitelyal tümürüdür. Bu alanlar için muskularis mukozadan submukozaya girmiş olan tümörler malign olarak tanımlanır. Arada seyrek paneth hücreleri, nöroendokrin hücreler ve skuamöz diferansiyasyon gösteren hücreler olması adenokarsinom tanımı ile bağdaşır (6).

Kolorektal karsinomlarda WHO klasifikasyonu (2010) (6)

Adenokarsinom

Kribriform komedo tip adenokarsinom

Meduller karsinom

Mikropapiller karsinom

Müsinöz adenokarsinom

Serrated adenokarsinom

Taşlı yüzük hücreli karsinom

Adenoskuamöz karsinom

Spindle hücreli karsinom

Skvamöz hücreli karsinom

Andiferansiye karsinom

2.2.1.EPIDEMİYOLOJİ VE GENEL ÖZELLİKLER

Kalın bağırsak tümörlerinin %98'i adenokarsinomlardır. KRK tüm dünyada 3. en sık görülen kanserlerdir. En yeni kanser verileri 2008 yılına aittir ve buna göre dünya genelinde 1.24 milyon kişi KRK tanısı almıştır ve tüm kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. KRK, kanserden ölümlerde dünya genelinde 4. sıradadır ve dünya genelinde yaklaşık 610,000 ölümden sorumludur (7). Gelecek 2 dekatta insidansın 2 milyonu aşması beklenmektedir (8). Türkiye'de 2008 yılı verilerine göre kadınlarda 3. en sık (insidans 13,5/100000), erkeklerde 4. en sık (insidans 20,8/100000) görülen kanserlerdir.

KRK, Kuzey Amerika, Kuzeybatı Avrupa ve Diğer Anglo-sakson bölgelerde yüksekken Afrika, Asya ve Güney Amerikada daha düşüktür. Bu farklılığın çevresel faktörlerden, özellikle diyetten kaynaklandığını destekleyen önemli miktarda veri mevcuttur (9). Bir diğer farklılıkta KRK gelişmiş ülkelerde daha erken yaşlarda oluşmaktadır (Ortalama yaş 50). Dünya genelinde ortalama görülme yaşı 62'dir.

Erkek ve kadınlar eşit olarak etkilenir. Yaş ilerledikçe görülme sıklığı artar. ABD'de 40 yaş altı olgular tüm olguların %1-2'sini oluşturmaktadır (10). Kolorektal karsinom görülme

sıklığı bölgesel farklılıklar gösterdiği gibi etnik farklılıklar da göstermektedir. Örnek olarak ABD’de siyahlarda insidans yüksekken amerikan yerlilerinde düşüktür (11).

Kolon tümörlerinin % 5-10'nun genetik olarak yatkın bireylerde geliştiği gösterilmiştir. Kolon kanserine yatkın kalıtsal hastalıklar dominant olarak geçen Familial Adenomatöz Polipozis (FAP) ve Herediter Nonpolipozis KRK (HNPCC) sendromudur (12).

Genç bir erişkinde kolorektal ca ortaya çıkarsa ülseratif kolit veya polipozis sendromlarından birinin varlığı araştırılmalıdır.

KRK gastrointestinal sistem tümörleri içinde en tedavi edilebilir olanlarıdır.

2.2.2.ETYOLOJİ

2.2.2.1.DİYET VE YAŞAM

Batı tipi diyetle yani, yüksek kalorili, hayvansal besinlerden zengin diyetle beslenen toplumlarda KRK insidansının yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Et tüketimi, sigara, sedanter yaşam ve alkol risk faktörleridir. Sebze tüketimi, NSAİD, östrojen replasmanı ve fiziksel aktivite riski azaltmaktadır. Lifli gıdaların KRK’ya karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir (13). Bu risk ve koruyucu faktörlerin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılammakla birlikte etli yemeklerden açığa çıkan heterosiklik aminlerin, safra asitlerini ve reaktif oksijen radikalleri oluşumunu uyararak tümör gelişimine etki ettiği düşünülmektedir (14). Sebze tüketiminin antioksidanlar, detoksifiye enzimler, luminal karsinojenleri bağlama ve pasajı hızlandırarak kolorektal epitelyumla teması azaltarak koruyucu etki yaptığı düşünülmektedir.

2.2.2.2.KRONİK İNFLAMASYON

Kronik inflamatuvar bağırsak hastalıkları KRK riskini arttırmaktadır. Risk 8-10 yıllık vakalarda ve pankolit vakalarında belirgin artmaktadır (15).

Ülseratif kolit prekanseröz bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Tutulumun yaygınlığı KRK riski ile orantılıdır (16). Kolonun yarısından fazla tutulumda kanser gelişme olasılığı %15 olarak bulunmuştur (17). Crohn hastalığında hem ince hem kalın bağırsakta tümör gelişimi riski artmaktadır (18).

2.2.2.3.RADYASYON

Nadir ancak iyi tanımlanmış bir risk faktörü de teropatik pelvik radyasyondur (19).

2.2.2.4.GENETİK FAKTÖRLER

2.2.2.4.1. Herediter nonpolipozis kolon kanseri sendromları: FAP ve HNPCC en sık kalıtsal kolon kanser sendromlarıdır ve tüm KRK vakalarının % 10'unu oluşturmaktadır (20).HNPCC'de kanser daha erken yaşta (21) ortaya çıkmaktadır ve sağ kolona daha sık yerleşmektedir. Müsinöz ve kötü diferansiye kanser ile senkron ve metakron kanser gelişme riski yüksektir (22).Klinik tanısında Amsterdam kriterlerinden yararlanır.HNPCC iki sendromdan oluşur.

Lynch I sendromu; erken başlangıçlıdır, başlıca sağ tarafta ve sıklıkla birden çok lokalizasyonda kolon kanserinin görülmektedir.

Lynch II sendromu; Lynch I'e ek olarak endometrium, meme, mide, over gibi kolorektal dışı kanser sıklığında artmaktadır (23).

Amsterdam I kriterleri ⁽²⁴⁾	1) ≥ 3 KRK'lı akraba
	2) Bunlardan birisi 1. derece akraba
	3) 50 yaştan önce ≥ 1 aile ferdinde KRK gelişmesi
	4) ≥ 2 nesilde kanser görülmesi
	5) FAP dışlanmalı
Amsterdam	1) ≥ 3 HNPCC ilişkili kanseri (KRK,

IIkriterleri ⁽²⁵⁾	endometrium, ince bağırsak, üreter ya da renal pelvis) olan akraba
	2) Bunlardan birisi 1. derece akraba
	3) 50 yaştan önce ≥ 1 aile ferinde KRK gelişmesi
	4) ≥ 2 nesilde kanser görülmesi
	5) FAP dışlanmalı
Bethesda kriterleri ⁽²⁶⁾	1) < 50 yaş KRK
	2) Yaştan bağımsız senkron ya da metakron KRK ya da HNPCC ile ilişkili kanser görülmesi
	3) < 60 yaş, HNPCC ile ilişkili karakteristik patolojik özellikleri olan KRK
	4) HNPCC ile ilişkili tümörü olan ≥ 1 birinci derece akrabasında (birisi < 50 yaş tanı almış) KRK
	5) HNPCC ile ilişkili tümörü olan ≥ 2 birinci ya da ikinci derece akrabasında (yaştan bağımsız) KRK

Tablo 1. HNPCC tanısında yaygın olarak kullanılan tanı kriterleri.

2.2.2.4.2. Ailesel polipozis koli (FAP): Otozomal dominant (OD) olarak geçer ve tüm kolonda çok sayıda adenomatöz polip gelişimiyle karakterizedir. Kalıtsal kolon kansinomlarının %5 i FAP'dan kaynaklanmaktadır. 5q21'de lokalize Adenomatöz Polipozis Koli (APC) geninde mutasyon vardır ve 2. dekatta görülebilir. FAP tanısı için 100'den fazla polip olmalıdır. Tedavi edilmezse hemen daima kalın bağırsakta bir veya daha fazla kansinom gelişir. Çoğu kansinom üçüncü dekatta başlayacağından proflaktik kolektomi en geç 20-25 yaşlarında yapılmalıdır. Sulindac, siklooksijenaz aktivitesini (COX-2) inhibe eder, ayrıca defektif apoptozisi de düzeltir ve adenomda gerilemeye neden olur⁽²⁷⁾.

2.2.2.4.3. Peutz-Jeghers sendromu: LKB1 gen mutasyonu olan OD kalıtım gösterir ve atipili adenomatöz polipler mevcuttur. Bu poliplerin bazılarında KRK gelişebilir. Pankreas, meme, over, uterus ve akciğer kanser gelişim riski de artmıştır⁽²⁸⁾.

2.2.2.4.4. Cowden sendromu: Mukokutanöz lezyonlar (fasyal trişilemmoma, akrall keratoz ve oral mukozal papillom), kolorektal polipler ve değişik bölgelerde artmış malignite riski ile karakterize OD bir hastalıktır. 10. kromozomda lokalize PTEN geninde mutasyon vardır (28).

2.2.2.4.5. Muir-Torre sendromu: OD geçer, sporadik kolon kanserinden daha iyi prognozludur (29).

2.2.2.4.6. Gardner sendromu: OD geçişlidir. KRK gelişme riski artmıştır. Kalın bağırsakta adenomatöz polipler, kafatası ve mandibulada osteomlar, ciltte keratinöz kistler ve yumuşak doku neoplazilerinin görüldüğü kalıtsal bir hastalıktır (29).

2.2.2.4.7. Turcot sendromu: OD geçişlidir. Kolorektal adenomatöz poliplerle birlikte glioblastom görülür (29).

2.2.2.4.8. Cronkhite-Canada sendromu: Mide, ince bağırsak ve kolon boyunca, juvenil tipte jeneralize gastrointestinal polipozis ile kutanöz hiperpigmentasyon, alopesi, onikodistrofi, diyare, kanama, kilo kaybı vardır. Poliplerde adenomatöz değişiklikler ve kolon kanseri gelişebilir (28).

2.2.2.5. ADENOMLAR

Adenomatöz polipler benign neoplastik lezyonlardır. Ortalama görülme yaşı 52'dir (30). Endoskopik çalışmalarda sıklıkla rektosigmoid yerleşimlidir (31). Tüm adenomlar prekanseröz kabul edilirler. Saplı, sapsız ve düz ya da deprese büyüme paternleri vardır. Epitelin yapılanmasına göre üç alt gruba ayrılır.

TÜBÜLER ADENOM: %75 oranında görülür. En düşük riskli gruptur. Tübüler glandlardan oluşmaktadır.

VİLLÖZ ADENOM: %10 oranında görülür. En riskli gruptur. Villöz uzantılardan oluşur.

TÜBÜLOVİLLÖZ ADENOM: %15 oranında görülür. Risk oranı villöz bölümün oranı ile korelasyon göstermektedir.

2.2.2.6.HORMONAL FAKTÖRLER

Kolon kanser gelişiminde seks hormonları, gastrin ve büyüme hormonu da etkilidir. Kadınlarda, sağ kolon karsinomları her yaşta sol kolon karsinomlarından daha fazla görülmektedir. Gebelik KRK gelişimine karşı korumaktadır (32, 33). Ekzojen hormonlar kalın bağırsak kanseri riskini özellikle rektal kanser riskini arttırmaktadır (34-36).

Gastrin bazen kolon tümör gelişimine yol açmaktadır (37-39). Tümörler gastrin mRNA, progastrin ve gastrin içerebilir (40, 41).

Akromegalik hastalarda adenom ve kolon kanser riski artmıştır (41, 42). Bu risk erkeklerde daha yüksektir. Bu hastalarda kolon kanseri erken yaşta görülür ve daha agresif seyreder.

2.2.2.7.DİĞER FAKTÖRLER

Üreterosigmoidostomi uygulanan hastalarda kolon kanseri insidansı 500 kat artar. Peptik ülser için cerrahi tedavi geçiren hastalarda KRK gelişme riski artmıştır. Pernisiyöz anemi, diabetes mellitus, çöliak hastalığı, AIDS hastalarında kolorektal adenokarsinom riski artmış olabilir (43).

2.2.2.8.DÜZENLEYİCİ FAKTÖRLER

Aspirin ve diğer NSAİ ilaçların kolon kanserine karşı koruyucu etkisi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.

Siklooksijenaz enziminin neoplastik hücrelerden aşırı salınımının anjiogenez ve apoptoz ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Familial adenomatöz polipozis sendromlu hastalarda koruyucu olarak COX-2 inhibitörleri kullanılması önerilmektedir.

Bazı anahtar rol oynayan enzimlerde (Metilen tetrahidrofolat redüktaz, N-asetil transferaz, aldehyd dehidrogenaz, sitokrom P-450 gibi) polimorfizm toplumsal farklılıkları açıklayabilir. Bu polimorfizm koruyucu yada zararlı olabilir (44).

2.2.3.ADENOMDAN KARSİNOMA PROGRESYON

Çoğu KRK'nın adenomlardan geliştiği kabul edilmektedir (21). Olguların %10-30'unda rezidü adenom tespit edilmektedir. Adenomdan karsinom gelişimi için gereken süre yaklaşık 15 yıldır. Endoskopik polipektomi kolorektal karsinom insidansını azaltmıştır (45). Çoğu çalışmada normal epitelyumla adenom arasında anormal kript fokusu oluşumunun olduğu gösterilmiştir (46). Anormal kript fokusu mikroskopik olarak kript çapında ve epitelyal hücrelerde sayıca artma (hiperplastik özellikler) olarak tanımlanabilir. Çok küçük çaplı (<1cm) bazı kanser olgularında rezidüel adenom izlenmemesi bu olgularda de novo gelişimi düşündürmektedir (47).

2.2.4.KOLOREKTAL KARSİNOGENEZ

Kolorektal karsinomların çoğu sporadik olarak gelişmektedir (48). Kolorektal karsinoma öncülük eden iyi tanımlanmış genetik değişiklikler dizisi vardır. Fearon ve Vogelstein'in önerdikleri model, KRK gelişiminde prototipik genetik değişiklikler dizisi örneği olarak herkes tarafından kabul edilmiştir (49). Bu modelin patolojik temeli adenokarsinom gen dizisidir (Şekil 2). Öncesinde adenomatöz prekürsör olmadan kolorektal karsinom gelişmesi, bazı displastik lezyonların polipoid evreden geçmeden maligniteye ilerleyebileceğini de düşündürmektedir (49).

Kolorektal karsinom gelişiminde iki farklı yolak olduğuna inanılır (50). Birinci yolak APC/β-katenin yolağı, ikinci yolak ise mikrosatellit instabilite yolağıdır.

Birinci yolak, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde basamaklı mutasyon birikimi ile sonlanan kromozomal instabilite ile karakterizedir. Başlangıçta kolonda, lokal epitel proliferasyonu vardır. Bunu küçük adenom oluşması takip eder, adenom zamanla büyür ve displastik olur ve sonunda invaziv kanser gelişir (Şekil 2). Adenomatöz polipozis koli (APC) gen kaybı, K-RAS mutasyonu, SMAD'ların kaybı, p53 kaybı, telomeraz aktivasyonu bu yolakta görülen genetik değişikliklerdir (50).

İkinci yolakta, DNA yanlış eşleşme ("mismatch") onarım genlerinde oluşan genetik lezyonlar izlenmektedir. Yanlış eşleşme onarım genleri, MSH2, MLH1, MSH6, PMS1 ve PMS2 DNA replikasyonu sırasında genetik olarak "hataları düzeltici" bir rol üstlenirler ve koruyucu ("care-taker") genler adını alırlar. Bu yolak HNPCC sendromu ve sporadik olguların %10-15'inde görülmektedir. Mutasyonların üst üste birikimi söz konusudur ve açıkça saptanabilen morfolojik korelasyon yoktur (50).

2.2.4.1.Kromozomal İnstabilite

Prototipi olup tüm kromozomda veya kromozomun büyük kısmında kayıp veya kazanma ile oluşan (aneuploidi)v bir durumdur. Diğer taraftan wild tipi denem somatik mutasyon sonucu etkilenen loss of heterozigot (LOH) her iki genin bir kısmının etkilendiği durumdur. KRK % 80 mekanizmasında yer alır. Daha birçok genetik predispozan faktörler olmasına rağmen esasen kazanılmış olan somatik mutasyonlar daha fazla sorumludur. Birçok somatik mutasyon olmasına rağmen bunlardan dört tanesi önemlidir. Bir tanesi RAS onkogen aktivasyonu, diğerleri tümör süpresör gen inaktivasyonları olan 5q (APC), 17p (DCC, SMAD4 ve SMAD2)“dur (50).

2.2.4.2.APC Gen

Adenom karsinom gen dizininde esas anahtarı çeviren gendir ve pediatrik yaş grubundaki FAP hastalarında tespit edilmiştir. APC gen mutasyonu adenom karsinom dönüşümünde en erken tespit edilen mutasyondur. İlk önce mikroskopik olarak tespit edilen aberran mikroskopik kriptom foku ardından adenom ve karsinom dönüşümü olur. Tümör süpresör olup WNT sinyal iletiminde önemli rol oynar. Normal APC gen β -catenin seviyesini düşürerek β -catenin/T cell faktör ilişkili transkripsiyon önlenmiş olur. Aksi takdirde transkripsiyonel ilişkili büyüme genleri örneğin MYC geni aktive olur (51).

2.2.4.3.RAS Onkogen

Kitsen ve Harvey tarafından ilk defa farelerde tanımlanan ve ara aşamada kolorektal adenomdan karsinoma dönüşüm aşamasında kullanılmış bir onkogendir. Doku kültüründeki transform hücrelerinde tespit edilmiştir. Daha sonra KRAS (Kirsten RAS) ve NRAS (neuroblastom RAS) 1 cm' den büyük poliplerde % 50 den fazla oranda saptandı. 1 cm' den küçük poliplerde çok az rastlandı. KRAS mutasyonlarının % 85' i kodon 12 ve 13 üzerinde yer alır. KRAS gen GTP bağlayıcı proteini kodlar. Bu protein hücre membranındaki mitojenik sinyal değişimini sağlar. KRAS aktivasyonu ile GDT den GTP oluşur. Bu şekilde spesifik transkripsiyonel faktörler kaskadı başlar (52, 53).

2.2.4.4. Kromozom 18q (DCC: deleted in colorectal cancer)

Yeni bir tümör süpresör gen olup hepatik metastazları olan KRK'ların hemen hepsinde tespit edilmiştir. 18q nun LOH (loss of heterozigot) sonucu orta ve geç evrede (APC ve K-ras mutasyonundan sonra) adenomlara dönüşüm olur. Bu mutasyonun saptanması kötü prognoz işaretidir. Sadece kolorektal tümörlerde değil, prostat, endometrial, over, özefagus, meme, testis, glial, nöroblastom ve hematolojik malignitelerde de düzeyleri düşük bulunmuştur. Evre III hastalarda adjuvan fluorourasil bazlı kemoterapiye yanıtızlıkla da ilişkilidir. Yine DCC kolorektal epitelyal RAC1 proteini sinyalinini down regüle ederler ve caspas-9 ile hücre ölümünü indükler (54-56).

2.2.4.5.P53 Gen

1979 yılında tümör virusleri tarafından enfekte edilen hücrelerde tespit edilmiştir. 17p üzerinde lokalizedir. Tümör süpresör gen olup hücre büyümesini inhibe ederler. P53 393 aa protein kodlar bu da özgül dizinlerde büyüme inhibisyonunda bağlanır ve transkripsiyonu aktive eder. P53 geni 20 farklı gen ilişkili olup, apoptozis ilişkilidir. En iyi tanımlanmış olan p21 ekspresyonu ile ilgili olanıdır. P21 G1 ve G2 hücre siklusunda durmayı sağlar. p53 mutasyonu sıklıkla rektal tümörlerde izlenmektedir. Proksimal tümörlerde lenfatik invazyon ile ilişkili olup, distal tümörlerde düşük survi ile ilişkilidir (57, 58).

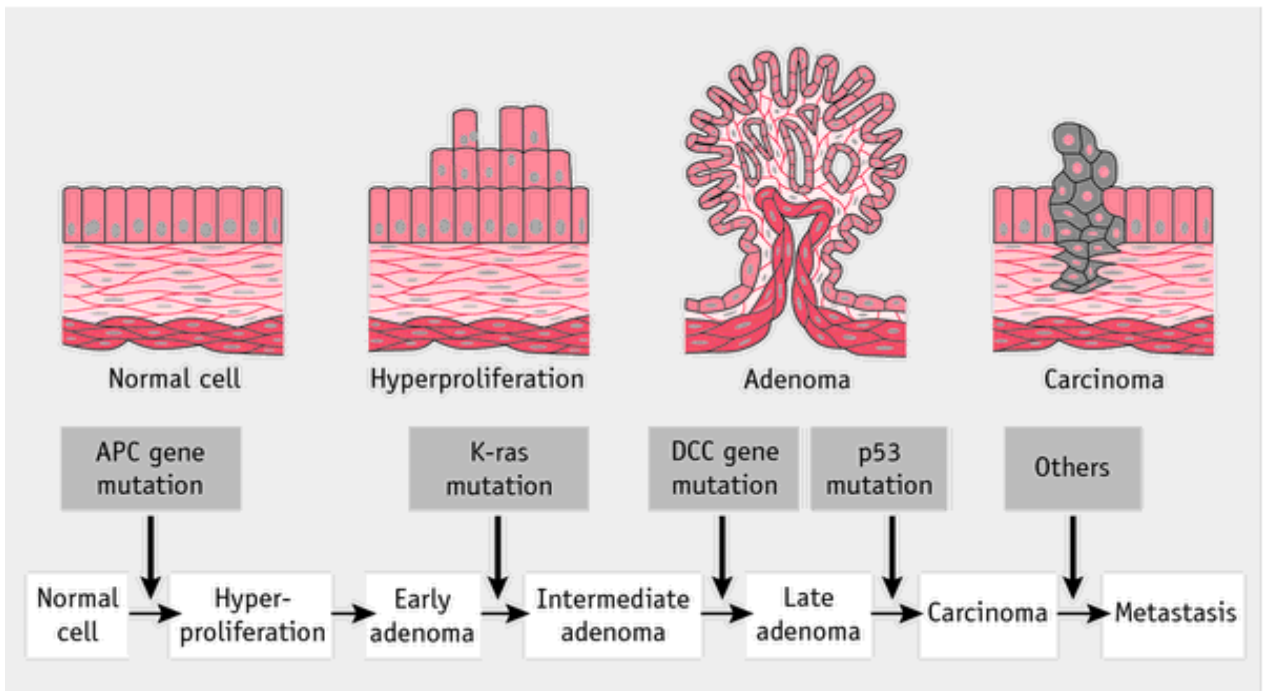
2.2.4.6.Mikrosatellit İnstabilite

Hücre bölünmesi sırasında spontan ya da çevresel etkilerle birçok DNA hasarı oluşur. Replikasyon hataları DNA polimerazın 3'-5' eksonükleaz aktivitesi ile hemen düzeltilir. Bu onarımdan kaçan hatalar ise mismatch repair (MMR) denilen bir sistem yoluyla onarılır. DNA mismatch tamir genlerinin kaybı sonucu mikrosatellit adı verilen tekrarlayan kısa DNA dizileri, DNA replikasyonu sırasında dengesizleşir ve bu durum tekrarlayan dizilerde devam ederek mikrosatellit dengesizliği oluşturur. Mikrosatellit dizilerinin çoğu genlerin kodlayıcı bölgeleri üzerinde bulduklarından bu genlerde meydana gelen mutasyonlar sessizdir. Fakat bazıları hücre büyüme regülasyonu ile ilişkili genlerin kodlayıcı bölgelerinde yer alır. Tekrarlayan ünitelerde insersiyon veya kaybolmaya neden olur. TGFβ sinyalizasyonu kolon epitelyum hücrelerinde büyümeyi engeller. Mismatch tamir genlerinin kaybı bu genlerde ve diğer genlerde mutasyonlarının birikmesine ve KRK yol açar. KRK'lerin % 15-20'sinde tanımlanmıştır. MMR genleri hMLH1, hMSH2, hMSH6, PM1S, hPMS2'dir (59, 60).

2.2.4.7. Metilasyon

Gen metilasyonları gen fonksiyonlarını etkilerler örneğin metilasyonun azalması sonucu normalde sessiz olan genin ekspresyonuna neden olurlar. Ters olarak bir genin metilasyonu sonucu ise gende büyüme aktivasyonu olabilir. Bir tümör süpresör gen olan CDKN2A mutasyonu kolorektal adenomada ve KRK'ların % 40' ında saptanmaktadır. p16 metilasyonu ise daha çok yaşlı hastalarda ve sağ kolon yerleşimli tümörlerde görülmektedir (61, 62).

Adenom → karsinoma dizininin aşamaları şu şekilde şematize edilebilir: Normal epitel → Kromozom 5q üzerinde APC ve MCC lokusunun kaybı veya mutasyonu → Hiperproliferatif epitel → DNA metilasyon kaybı → Erken evredeki adenom → Kromozom 12p üzerindeki ras geninin mutasyonu → Orta evredeki adenom → Kromozom 18q üzerindeki DCC geninin kaybı → Geç evredeki adenom → Kromozom 17p üzerindeki p53 geni kaybı → Karsinom (Şekil-2) (63).



Şekil 2. Adenom –karsinom dizini (Aspinall and Taylor-Robinson, 2001.)

2.2.5.KLİNİK ÖZELLİKLER

2.2.5.1.SEMPTOMLAR VE BULGULAR

Kolorektal karsinomlar uzun bir dönemde geliştikleri için semptomlar yok veya yavaş ilerleme göstermektedir. Bu nedenle tanı anında hastaların semptomları hafiftir. Olguların %5-12.5'i asemptomatiktir (64, 65). Klinik, yerleşim yerine ve erken yada geç evrede olmasına göre değişmektedir. İlk semptomlar belirsiz veya nonspesifiktir. Demir eksikliği anemisine bağlı kilo kaybı, yorgunluk, güçsüzlük, halsizlik, anjina görülür. Sağ taraf yerleşimli tümörlerde obstrüksiyon veya görünür melena olur.

%22-55 vakada bağırsak alışkanlıkları değişmektedir (65, 66), bu tümörler sıklıkla sol kolon yerleşimlidir. Şikayetler sıklıkla hafiftir ancak ilerlediğinde ishal, inkomplet rektal boşalma hissi veya inkontinans gelişebilir. Tümör büyüdükçe kabızlık ve obstrüksiyon gelişir.

%50 vakada rektal kanama vardır ve bu hastaların %70'i sol kolon yerleşimlidir. Karın ağrısı serozal tutulumla ilgili olarak %50 vakada vardır. Bu hastalar sıklıkla rektal karsinomlu vakalardır (66, 67).

Sigmoid karsinomda, akut bağırsak obstrüksiyonu veya akut perforasyona bağlı peritonit tablosu gelişebilir. Nadiren abdominal kitle, hepatomegali, gluteal apse, kolokutanöz fistül, sebebi bilinmeyen ateş veya pyojenik artrit görülebilir (43).

2.2.5.2.GÖRÜNTÜLEME

Görüntüleme yöntemleri non invaziv tarama ve klinik stajelemede önemlidir. BT kolonografi tarama için kullanışlı bir yöntem olabilir (68). Manyetik rezonans ve transrektal ultrasonografi, tümör invazyon derinliği ve lokal-uzak metastaz değerlendirmede kullanılmaktadır. Ayrıca sintigrafi ve pozitron emisyon tomografi de tümör yayılımını araştırmada kullanılmaktadır (69).

2.2.5.3.ENDOSKOPI

Kolonoskopi esnasında bağırsak mukozası değerlendirirken aynı zamanda tedavi de uygulanabilmektedir. Özellikle adenomlar ve yüzeysel karsinomlar için polipektomi, endoskopik mukozal rezeksiyon veya submukozal diseksiyon yapılmaktadır (70).

2.2.6. MAKROSKOPİK BULGULAR

Kolorektal karsinomlar makroskopik olarak polipoid, egzofitik, ülseratif, diffüz infiltratif veya stenozaan olabilir. Polipoid lezyonlar, yüzeyi ülsera intraluminal egzofitik kitle şeklinde olabilir. Genel olarak nodüler, lobüler veya papiller görüntüde olabilir. Tümörlerin üçte biri ülseratif, üçte biri egzofitik olmaktadır. Büyük egzofitik lezyonlar sıklıkla çekum ve çıkan kolon yerleşimlidir (43).

Ülseratif lezyonlar bağırsak duvarına derin invazyon gösteren tümörlerdir. Normal mukoza ile çevrilidir ya da tamamen düz görünümündedir. Transvers ve inen kolon kaynaklı tümörler infiltratif ve ülseratif olmaktadır. Halka tarzında, lümeni daraltır. Düzensiz, yuvarlak, ortası çökük soluk pembe veya beyaz kenarlıdır. Diffüz infiltratif tip, bağırsak segmentini çevresel biçimde, nodüler kitle oluşturmada infiltrate etmektedir, nadir görülür. Kolonu rijit tüp şekline çevirir, midenin linitis plastikasına benzer (43).

Küçük karsinomlar 1-2cm çapında, sıklıkla kırmızı, granüler, düğme benzeri, mukozadan değişken yüksekliklerdedir. Düzgün sınırlı, adenoma benzer (71).

2.2.7.MİKROSKOPİK BULGULAR

2.2.7.1.GENEL ÖZELLİKLER

Kalın bağırsak tümörlerinin %90-95'i adenokarsinomdur. Bunlar sıklıkla kolay tanınan iyi-orta diferansiye düzensiz gland formasyonundadır ve tanımlayıcı özelliği muskularis mukozayı aşarak submukozaya girmesidir. %25 iyi diferansiye, %60 orta diferansiye, %15 az diferansiye'dir (72). Düzensiz glandlar ve malign kolumnar hücreler vardır. Sitolojik anaplazi göstermektedir. Güçlü desmoplastik yanıt vardır minimal invaziv karsinomlarda tanı vermeye yardımcıdır. Değişik miktarlarda müsin üretimi görülebilir. Nadiren papiller komponentin baskın olduğu karsinomlar da olabilir.

KRK'lar değişik oranlarda diferansiye enterositler, goblet hücreleri, paneth hücreleri, endokrin hücreler, melanositler, skuamöz hücrelerden oluşmaktadır. Özellikle papiller karsinomlarda ve müsinöz karsinomlar paneth hücrelerinden zengindir (73, 74).

Nöroendokrin hücreler KRK'ların %8-51'inde mevcuttur (75). Endokrin hücreler glandların kollarında bulunur ve şeffaf veya granüler eozinofilik sitoplazmalıdır. Varlıkları

özel boyalar ve İHK'sal olarak gösterilmelidir. Bazı otörler prognostik değeri olduğunu düşünürken bazıları ise buna katılmamaktadır (76, 77).

Kolorektal karsinomlar lenfositik infiltrasyon gösterebilir, infiltrasyonun belirgin olup olmaması Jass kriterlerinde kullanılmaktadır (78). Ayrıca mast hücreleri, eozinofiller, makrofajlar, plazma hücreleri ve S100 pozitif dentritik hücreler de görülebilir.

2.2.7.2.HİSTOLOJİK GRADELEME

Prognostik belirteç olarak patoloji raporlarında rutinde kullanılmaktadır. Histolojik gradeleme, tümörün yapısal özelliklerini belirlemektedir. Gland yapısı >%50 ise düşük (low) grade , <%50'den az ise yüksek (high) grade karsinom olarak ayrılmaktadır (79).

Düşük (low) grade karsinomlarda, glandlar nükleer polaritesini korumuş hücreler ile dizilmiştir. Glandlar mevcut olan adenomlara benzemektedir. Yüksek (high) grade karsinomlarda pleomorfik, nükleer polaritesini kaybetmiş solid tümör adaları mevcuttur. Bazen dev hücreler görülebilir. Solid komponentteki hücreler tamamen anaplastik veya taşlı yüzük morfolojide olabilir (79).

2.2.7.3.KOLOREKTAL KARSİNOMLARDA ÖZEL HİSTOLOJİK TİPLER

2.2.7.3.1.MÜSİNÖZ KARSİNOMLAR: Müsinöz komponent tümörün >%50'sinden fazla ise müsinöz adenokarsinom olarak sınıflandırılır (76). Müsinöz karsinomlar kolon kanserlerinin %10-15'i, rektal kanserlerin %33'üdür (80). Kolloid karsinom ve taşlı yüzük hücreli karsinom olarak iki tipi vardır (80).

Kolloid karsinomlarda ekstrasellüler müsin taşlı yüzük hücreli karsinomlarda intrasellüler müsin vardır. Her iki tipte periyodik asit-schiff (PAS), müsikarmin, asidik anilin blue pozitif asit olan mukopolisakkarit sekrete etmektedir (80).

Müsinöz karsinomlar sıklıkla genç hastalarda ve HNPCC'lularda görülmektedir. Kötü prognoza sahiptir (81).

2.2.7.3.1.1. KOLLOİD KARSİNOMLAR: Kolorektal karsinomların %10-15'ini oluşturmaktadır (80). Sıklıkla villöz adenomlardan, (81) villöz displazili ülseratif kolitten, (82) anorektal fistüllerden (83) gelişmektedir. Büyük ve jelatinöz neoplazmlardır (83).

Abondan intraluminal müsin varlığı arasına sıkışmış malign glandların varlığı yada konnektif stromada müsin gölcüklerinin olması yada süperfisyal müsin gölleri içinde malign hücre kümeleri veya şeritleri bulunması tanı koydurucudur. Kolumnar hücreler müsin göllerini döşerler (83).

2.2.7.3.1.2. TAŞLI YÜZÜK HÜCRELİ KARSİNOMLAR: İntrasellüler müsin içeren karsinom tipidir. KRK'ların yaklaşık %1,1'ini (81) oluşturmaktadır. Sıklıkla genç hastalarda (18y-29y) görülmektedir (84). Agresif davranış gösterirler (84).

2.2.7.3.2. LİNİTİS PLASTİKA: Neoplastik hücrelerin diffüz infiltrasyonu ile karakterizedir. Bağırsak duvarında kalınlaşma, fibrotik ve rijit bir görünüm vardır. Ortalama 20-60 yaş arası görülmektedir. Bazı hastalarda ülseratif kolit öyküsü vardır. Histolojik olarak mukozaya sağlamdır. Submukozada diffüz, koyu boyanmış, küçük, atipik hücreler mevcuttur (85).

2.2.7.3.3. SKUAMÖZ HÜCRE İÇEREN KARSİNOMLAR: Çok nadirdir. Ülseratif kolitli hastalarda insidans yüksektir. Skuamöz hücreli karsinomlar, Crohn hastalığı ve uzun süren rektal fistüllerde de gelişmektedir (86). Her iki cinsiyette eşit oranda görülmektedir (86).

2.2.7.3.3.1. ADENOSKUAMÖZ KARSİNOMLAR: Genç hastalarda görülür ve agresiftir. Erken dönemde uzak metastazlar görülür. Histolojik olarak malign glandlar ve değişken keratinizasyon gösteren malign skuamöz hücrelerden oluşmaktadır. Nadiren müsinöz ve/veya taşlı yüzük hücreli karsinomlar ile kombine olabilir (87).

2.2.7.3.3.2. SKUAMÖZ KARSİNOMLAR: Primer skuamöz hücreli karsinom tanı kriterleri mevcuttur: (a) primer başka bir odak olmamalı, (b) etkilenen bağırsak segmentinde skuamöz fistül olmamalı, (c) tümör ve anal skuamöz epitel arasında devamlılık olmamalı, (d) glandüler diferansiyasyon olmamalıdır (43).

2.2.7.3.4. BAZALOİD KARSİNOMLAR: Diğeri bir adı kloakojenik karsinomdur. Nadir görülür ve metastaz yeteneği yüksektir. Paratiroid hormon veya adrenokortikotropik hormon üretebilirler ⁽⁸⁸⁾. Periferik palizatlanması olan küçük adalar halindedir. Bazen küçük odaklar halinde keratinize hücreler olabilir ⁽⁸⁸⁾.

2.2.7.3.5. KARSİNOSARKOMLAR: Derin invazyon, yaygın metastaz gösteren tümördür. Kemoterapiye dirençlidir. Tümör karsinom veya adenoskuamöz karsinom ile kemik, kırık ve nonspesifik iğsi hücre diferansiyasyonu gösteren sarkom alanların kombinasyonudur. Sarkomatoid ve karsinomatoid alanlar sitokeratin pozitifdir ⁽⁸⁹⁾.

2.2.7.3.6. DİĞERLERİ: Germ hücre elementleri içeren karsinomlar, osseos metaplazili adenokarsinomlar, kök hücre karsinomları, pleomorfik (dev hücre) karsinom, şeffaf hücreli karsinomlar bunlara örnektir ⁽⁷¹⁾.

2.2.8. TÜMÖR YAYILIMI

2.2.8.1. İNTRAMURAL BÜYÜME

Bağırsak duvar tabakalarına doğru büyür ve damarları infiltre eder. Mural yayılım sonucu direkt olarak komşu organ ve dokular ile peritoneal yayılıma neden olabilmektedir ⁽⁷¹⁾.

2.2.8.2. YÜZEYSEL YAYILIM

Mukoza boyunca yüzeysel yayılım nadir izlenir. Çekal karsinomlarda apendiks ve terminal ileum tutulumu buna örnektir ⁽⁹⁰⁾.

2.2.8.3. KOMŞU ORGAN YAYILIMI

Kolorektal karsinomların %10'unda görülmektedir. Hepatik fleksur, transvers kolon, splenik fleksur tümörleri karaciğer, pankreas, dalak, mesane, mideye invaze olurken çıkan ve inen kolon, retroperitona direk invazyon gösterir. Vezikokolik veya vezikorektal fistül ile mesaneye, rektovajinal veya kolovajinal fistül ile vajene invaze olur ⁽⁹¹⁾.

2.2.8.4. PERİTONEAL YAYILIM

Az diferansiye, özellikle müsinöz karsinomlarda daha sıktır. Kolloid karsinomlarda psödomiksoma peritona neden olmaktadır (91).

2.2.8.5. LENFATİK VE LENF NODU YAYILIMI

Kolon kanserleri sıklıkla bölgesel lenf nodu metastazı yapmaktadır. Rektosigmoid lezyonlarda lenfatik invazyon sıktır (92). İlk önce muskularis mukozadaki lenfatikleri penetre etmektedir. Öncelikle bağırsak duvarına yakın lenf nodlarına, oradan perikolik, intermediate, prinsipal lenf nodlarına gitmektedir. Tutulan lenf nodu sayısı prognozu etkilemektedir (93). Bu nedenle rezeksiyon spesmeninde dikkatli incelenmelidir.

2.2.8.6. VENÖZ YAYILIM

KRK'larda %17-61 oranında venöz invazyon gözlenmektedir. Venöz tutulum, bölgesel lenf nodu tutulumu ve az diferansiyasyon ile koreledir. Venöz invazyon olan hastalarda hepatik metastaz olma olasılığı yüksektir. Ayrıca akciğer ve kemik metastazları ile ilişkilidir (85).

2.2.8.7. PERİNÖRAL VEYA İNTRANÖRAL YAYILIM

Perinöral invazyon KRK'ların %14-32'sinde görülmektedir (94).

2.2.8.8. EKSTRANODAL METASTAZLAR

Kolorektal karsinomlar lenf nodlarından sonra en sık karaciğere metastaz yapmaktadır (95). Tablo 2'de metastazlar özetlenmiştir.

Metastatik Bölge	Kolon Karsinomu	Rektal karsinom
Karaciğer	%75.5	%61.9
Akciğer	%47.7	%64.2
Lenf nodları	%77	%70.4
Periton	%49.4	%25.4
Adrenal	%13.8	%18.7
Over	%17.3	%3.6
Kemik	%11.7	%19.4

Plevra	%11.3	%12.7
Dalak	%6.7	%2.2
Beyin	%6.3	%8.2
Böbrek	%5	%4.5
Deri	%5	%3

Tablo 2. Kolon tümörleri ve rektal tümörlerin metastaz insidanslarının kıyaslanması. (71)

2.2.9. KOLOREKTAL KARSİNOMLARDA EVRELEME

Bütün kanser evreleme sistemleri hastalığın prognozunu ve tedaviyi etkilemektedir. Kolorektal karsinomları evrelemede en sık TNM sınıflaması kullanılmaktadır (Tablo 3).

Primer Tümör (T)

Tx: Primer tümörü bilinmeyen

T0: Primer tümör yok

Tis: Karsinoma insitu

T1: Tümör submukozaya invaze

T2: Tümör muskularis propriaya invaze

T3: Tümör subseroza veya peritonsuz perikolik dokuya invaze

T4a: Tümör visseral peritona perfore olmuş

T4b: Direkt invazyon veya diğer organ tutulumu

Bölgesel Lenf Nodülleri (N)

Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilememekte

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1a: Perikolik 1 lenf nodunda metastaz

N1b: Perikolik 2-3 lenf nodunda metastaz

N1c: Subserozada, peritonsuz perikolik ya da perirektal dokuda tümör depozitlerinin bulunması

N2a: Perikolik 4-6 lenf nodunda metastaz

N2b: Perikolik 7 ve üzeri lenf nodunda metastaz

Uzak Metastaz (M)

Mx: Uzak metastaz varlığı değerlendirilememekte

M0: Uzak metastaz yok

M1a: Tek bir organ ya da bölgesel olmayan lenf nodu metastazı

M1b: Birden fazla organ ya da periton metastazı

TNM gruplaması	evre	TNM kriteri
Evre 0		Tis,N0,M0
Evre I		T1,N0,M0
		T2,N0,M0
Evre IIA		T3,N0,M0
Evre IIB		T4a,N0,M0
Evre IIC		T4b,N0,M0
Evre IIIA		T1-T2,N1,M0
		T1,N2a,M0
Evre IIIB		T3-T4a,N1,M0
		T2-T3,N2a,M0
		T1-T2,N2b,M0
Evre IIIC		T4a,N2a,M0
		T3-T4a,N2b,M0
		T4b,N1-N2,M0
Evre IVA		Herhangi bir T, Herhangi bir N,M1a
Evre IVB		Herhangi bir T, Herhangi bir N,M1b

Tablo 3. Kolorektal karsinomlarda AJCC/UICC TNM evreleme sınıflaması (6).

2.2.10. PROGNOZ

KRK'larda prognozu etkileyen bir çok faktör vardır. Tanı anındaki tümör evresi en önemli prognostik faktördür (71).

2.2.10.1. TÜMÖR EVRESİ

Bağırsak duvar penetrasyon derecesi ile lenf nodu tutulumu ve uzak organ metastazı olup olmaması prognozu etkileyen önemli bir faktördür (71). Beş yıllık sağkalım lokalize hastalarda %91,8, lokal yayılmış hastalarda %65,8 ve uzak metastaz yapmış hastalarda %8,8 olarak gösterilmiştir (96). Tutulan lenf nodu sayısı da prognozu etkileyen önemli faktörlerden biridir (93).

2.2.10.2. HİSTOLOJİK GRADE VE TİP

Tümör diferansiyasyonu prognostik öneme sahip diğer parametredir (139). Az diferansiye tümörlerde %50'den fazla lenf tutulumu mevcut iken orta ve iyi diferansiye tümörlerde daha az lenf nodu tutulumu mevcuttur (97).

Küçük hücreli karsinom, müsinöz karsinom ve taşlı yüzük hücreli karsinom daha kötü prognoza sahip türlerdir (97).

2.2.10.3. TÜMÖR LOKALİZASYONU

Prognoz üzerine etkisi tartışmalıdır. İnen kolon, sigmoid kolon ve rektumda rekürrens daha fazla olduğu iddia edilirken büyük bir çalışmada ise sigmoid kolon ve rektum yerleşimli tümörlerde sağkalımın kötü olduğu gösterilmiştir (97).

2.2.10.4. MAKROSKOPİK BÜYÜME PATERNİ

Ülsere kanserler, polipoid, sesil yada ekzofitik kanserlere göre daha kötü prognozludur ayrıca uzak ve yakın metastaz insidansı da yüksektir (98).

2.2.10.5. BİR DEN FAZLA TÜMÖR ODAĞI VARLIĞI

Birden fazla tümör odağı olmasının tek başına sağ kalıma etkisi yoktur (99).

2.2.10.6. TÜMÖR SINIRLARI

Proksimal distal ve radial cerrahi sınırlarda tümör olması lokal rekürrens gelişme ihtimalini arttırmaktadır (99).

2.2.10.7. LENFATİK YAYILIM

Lenfatik invazyon tümör grade'ini ve evresini arttırmaktadır ve sağkalım ile ilişkilidir (100). Ayrıca lokal rekürrensle korele bulunmuştur (101).

2.2.10.8. VENÖZ İNVAZYON

Venöz invazyon varlığı viseral metastaz, sağkalım, tümör rekürrensi insidansını arttırmaktadır. Ekstramural invazyon ve kalın duvarlı ven tutulumu kötü prognoza sahiptir (102).

2.2.10.9. PERİNÖRAL İNVAZYON

Perinöral invazyon insidansı özellikle evre 3 hastalarda çok yüksektir. Evre 3 perinöral invazyon olan vakalar ile olmayan vakalar lokal rekürrens ve 8 yıllık sağkalıma göre kıyaslandığında belirgin bir fark belirtilmiştir (103).

2.2.10.10. OBSTRÜKSİYON VE PERFORASYON

Tamamen tıkalı kalın bağırsak karsinomlu hastalarda, aynı evredeki hastalar ile kıyaslandığında 5 yıllık sağ kalımı azaltmaktadır (104).

Perforasyon sonucu tümör bağırsak duvarına yayılır ve kötü prognozu gösterir (105).

2.2.10.11. PERİTÜMÖRAL LENFOSİTİK İNVAZYON

Belirgin peritümöral lenfositik infiltrasyon iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir (106).

2.2.10.12. PERİTONEAL VE SEROZAL YAYILIM

Lokal peritoneal yayılım intraperitoneal rekürrens, pelvik rekürrensin güçlü bir kanıtıdır. Prognostik olarak TNM klasifikasyonunda da kullanılmaktadır (107).

2.2.10.13. HASTAYA BAĞLI FAKTÖRLER

Genç hastalarda prognoz daha kötüdür. Çünkü bu yaş grubunda müsinöz karsinomlar daha fazladır (108). Bazı yayınlarda kadınlarda prognoz daha iyi iken bazı yayınlarda ise fark olmadığı gösterilmiştir (109).

2.2.11. TEDAVİ

2.2.11.1. KOLON REZEKSİYONU

Kolorektal karsinomların birincil tedavisi cerrahi rezeksiyondur. Cerrahi tipi tümörün yerleşim yeri ve yaygınlığı ile ayrıca anatomi ve lenfatik drenaja göre değişmektedir (110).

2.2.11.2. REKTAL LEZYON REZEKSİYONU

Cerrahi strateji rektumun üç farklı bölgesine ve endosonografik veya BT tümör evresine ve tümör diferansiyasyonuna göre değişmektedir (111).

2.2.11.3. KEMOTERAPİ

Evre III kanserli hastalarda 5-Fluorouracil /leucovorin tedavisinin, rekürrens riskini azalttığı gösterilmiştir (112).

2.2.11.4. RADYOTERAPİ

Rektal karsinomların tedavisinde radyoterapinin rolü vardır. Kolon karsinomlarının bazılarının tedavisinde yeri vardır (113). Preoperatif, postoperatif veya rekürren hastalıkların tedavilerinde kullanılmaktadır (114).

2.2.11.5. PREOPERATİF KEMORADYASYON

5-Fluorouracil ve preoperatif radyasyon kombinasyonu, lokal eksizyon veya lokal yayılmış rektal kanserli vakalarda sfinkter koruyucu radikal cerrahi öncesi uygulanmaktadır (113, 114).

2.3.OTOFAJİ

2.3.1. TANIM VE GENEL BİLGİLER

Otofaji sellüler organel ve proteinlerin yıkımını gerçekleştiren homeostatik bir süreçtir. Hücresel biyosentez sırasında hücreyi substrat eksikliğinden ve metabolik stresten korur (115). Kısa ömürlü proteinler ubiquitin-proteozom sisteminde parçalanırken, uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji sistemi tarafından parçalanırlar ve oluşan yapı taşları hücreye yeniden kazandırılırlar (115).

Otofaji, otofagozom denen çift katlı membranın stoplazmik içeriği yutması ile başlar. Otofagozom daha sonra lizozom ile birleşir ve içerik indirgenme ve geri dönüşüme uğrar (115). Otofaji hasarlı ve eskimiş organel ve proteinlerin kaldırılması için çok önemlidir.

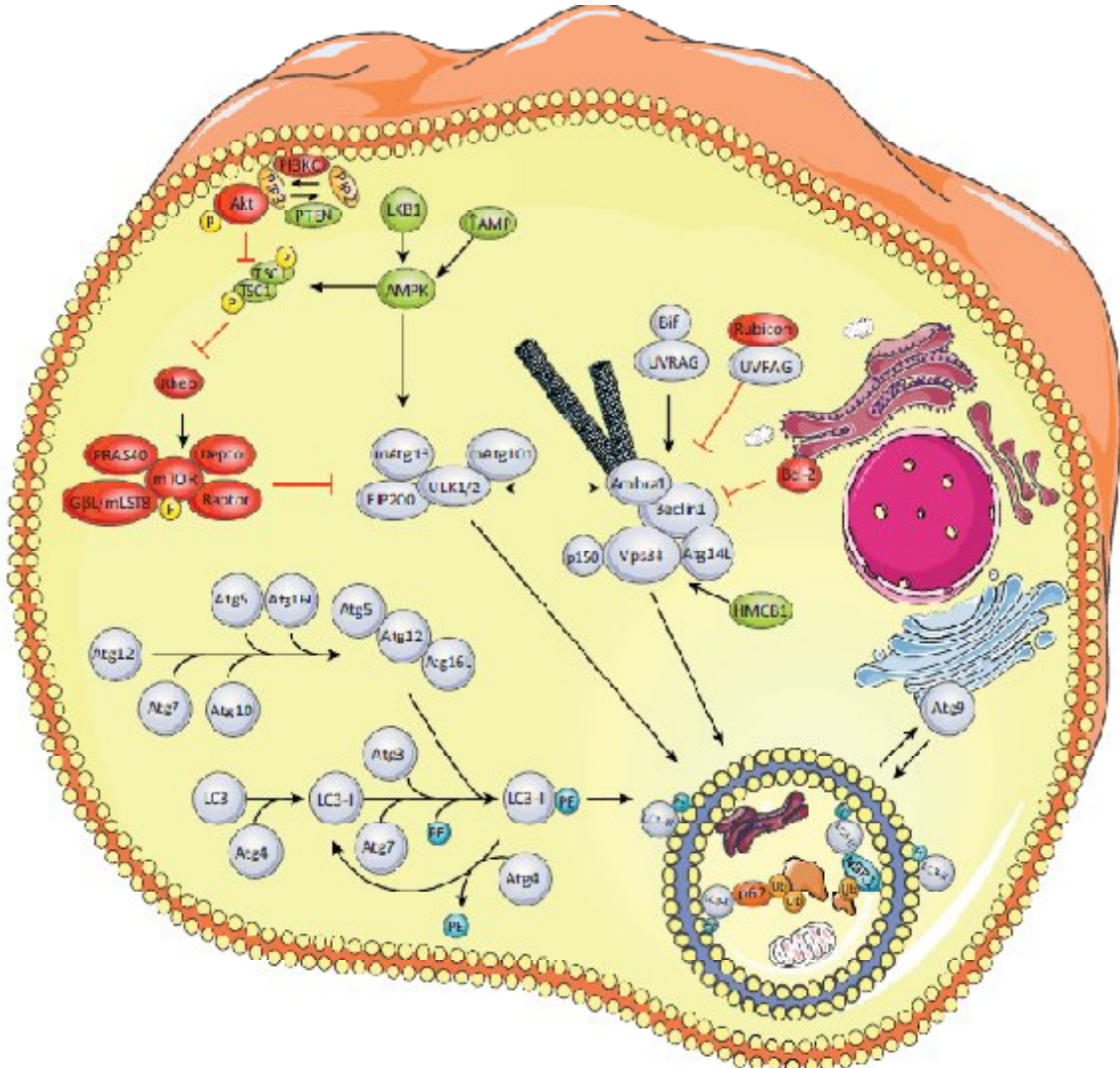
Her hücrede bazal seviyelerde otofaji oluşur ve homeostazın devamını sağlar. Disfonksiyone proteinlerin (unfolded) ve mitokondride oluşan serbest oksijen radikallerinin elemine edilmesi otofajiye örnektir. Bu katabolik süreçle hücreye hayati substratlar geri kazandırılır. Gerekliğinde enerji ihtiyacı için substrat oluşturulur (115).

Otofaji defektlerinin farelerde metabolik stres, genomik hasar ve tümörigenezde rolü olduğu ve ayrıca tümör supresyonunu indüklediği gösterilmiştir (116).

2.3.2.OTOFAJİ DÜZENLENMESİ

Otofajinin ana düzenleyicisi mTOR yolağıdır. mTOR kompleks-1 kinaz aktivitesi inhibe edildiğinde otofagozom oluşumu aktive olur (117). Yani mTOR otofajiyi durdurucudur.

mTOR aktivasyonu tümör supresör gen kaybı nedeniyle oluşabilir. Hücrel stres mTOR' u inhibe ederek otofajiyi tetikler. mTOR inhibitörleri (rapamisin gibi) otofajiyi tetiklemek için kullanılmaktadır (118). Hücrede enerji azalması, lipid ve glikoz metabolizmasında önemli rolü olan AMPkinaz'ı aktive eder. Bu aktivasyon mTOR'u inhibe eder ve otofaji aktive olur (119). Hipoksi AMPkinaz'ı aktive eder (119).



Şekil 3: Otofaji yolağında anahtar role sahip olan genler ve rol aldıkları yerler detaylarıyla gösterilmektedir (120).

2.3.3.HÜCRE ÖLÜMÜ VE OTOFAJİ

Hücre koruyucu özelliği yanı sıra otofajinin hücre ölümünü de indüklediğine dair pek çok kanıt vardır. Otofajinin non-apoptotik hücre ölümüne eşlik ettiği gösterilmiştir (121, 122).

Uzun süren stres ve sürekli otofaji aktivitesi hücrenin kapasitesini zorladığında hücreyi ölüme sürükleyebilir. Tümör tipi ve genetik yapısına göre antikanser ilaçlarla otofajik hücre ölümü indüklenebilir (121).

VHL-eksik renal hücreli karsinomda STF-62247 molekülü ile otofajik hücre ölümü indüklenmiştir (123).

2.3.4.OTOFAJİ VE HÜCRE YAŞLANMASI

Otofajinin, Ras onkogeninin indüklediği yaşlanmanın mediatörü olduğu gösterilmiştir (124). Hücresel yaşlanma hücre siklusu inhibitörlerince siklusun durdurulması ile gerçekleşmektedir. Yaşlanma onkogenler, DNA hasarlandıran ilaçlar, oksidatif stres ile indüklenebilir (125).

Yaşlanma, otofaji ilişkili tümör dormansisini (uyku moduna geçmesi) açıklayan bir mekanizma olabilir (126). Başka bir çalışmada da tümör hücrelerinde otofaji inhibisyonun yaşlanmayı geciktirdiği görülmüştür (124). ULK1 ve ULK3 yaşlanma sürecinde upregüledir ve ULK3'ün indüklenmesi otofaji ve yaşlanmayı indükleyebilir (124).

2.3.5.OTOFAJİ VE APOPİTOZ İLİŞKİSİ

Otofaji inhibe edildiğinde intakt apoptotik sinyalizasyonla kanser hücreleri apoptoza gider. Apoptozun engellenmesi sık görülen bir kanser oluşum mekanizmasıdır. Tümör stres durumlarında diğer hücre ölüm mekanizmaları ile ölür (127). Apoptoza dirençli tümörlerde otofaji alternatif bir ölüm mekanizması olabilir (127).

Güncel çalışmalar, TRAIL-mediated apoptoz gibi apoptoz ile otofaji arasındaki bağlantı yollarını tanımlamaktadır. TRAIL birçok tümöre karşı apoptozu indükleyen bir sitokindir (128).

Anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesi pek çok tümörde aşırı eksprese olmakta ve tedavi direnci oluşturmaktadır. Bcl-2 apoptozu inhibe ettiği gibi Beclin-1'i inhibisyonu ile otofajiyi de inhibe eder (129).

2.3.6. OTOFAJİNİN KANSERLERDEKİ ROLÜ

Otofaji iki uç keskin bıçak gibidir. Otofaji tümör supresyonunda rol aldığı gibi tümör hücrelerinde de strese tolerans gelişiminde rol almakta yani olumsuz koşullara direnç sağlamaktadır (115). Tümör hücrelerinde stres, hızlı hücre proliferasyonuna yol açan yüksek metabolik talep oluşturur (130).

Otofaji yolağında anahtar genlerden Beclin-1'de prostat, over ve meme kanserinde %40-75 kayıp olduğu görülmüştür (116).

Otofaji tümörde özellikle hipoksik alanlarda indüklenir. Stresin indüklediği otofaji tedavi direnci ve tümörün uyku moduna geçmesine yol açabilmektedir. Sonuç olarak tümörde tekrar büyüme (rekürrens) ve progresyon görülür (131). Preklinik çalışmalarda "prosurvival" otofajinin genetik ve farmakolojik olarak inhibe edilmesi, tümör hücrelerinin öldürülmesini ve apoptotik hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (115, 132-136).

Otofaji inhibitörleri (klorokin, hidroklorokin) ile kombine edilmiş kemoterapinin sadece kemoterapi ile kıyaslandığında çok daha etkin olduğu gösterilmiştir (137).

Otofajinin kanser tedavisindeki yerinin anlaşılması çok önemlidir. Pek çok antikanser tedavisinin otofajiyi aktive ettiği bilinmektedir. Yani otofaji inhibitörleri de aktivatörleri de kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bu kompleks rol araştırılmaya devam etmektedir. Otofaji sinyalizasyonunun analizi, yeni tedavi modaliteleri geliştirme ve tedavi hedefleri belirleme açısından önem taşımaktadır (137).

Tümör supresör p53 hücredeki yerine göre; nükleusta pek çok otofaji aktivatörünü indüklerken, stoplazmik p53 otofajiyi inhibe etmektedir (138).

Tümör supresyonunda otofaji, homeostatiktir. Kesintiye uğradığında tümörigenez desteklenir ve hızlanır. Otofajinin tümör supresyonundaki başlıca rolleri hasarlı protein ve organellerin kaldırılması, hücre büyümesinin sınırlanması ve genomik instabilitedir (139).

2.3.6.1.Otofaji Ve Tümör Hücre Sağkalımı (Direnci)

Otofaji strese karşı direnç sağlar ve tümör hücrelerini metabolik stresten korur. Esansiyel otofaji genlerinin baskılanması tümör hücrelerinin ölümüne yol açabilir. Metabolik strese uğratılan otofaji baskınmış kanser hücrelerinde otofaji indüklenmiş kanser hücrelerine göre surveyin azaldığı gösterilmiştir (139).

Hipoksi ve metabolik stresde ATP sağlamak için gerekli substratların temini için otofaji aktive olmaktadır. Tümörlerde damarlardan uzaklaştıkça otofaji aktivitesi artmaktadır (137). Hipoksi ilişkili otofajinin HIF1- α bağımlı ve bağımsız aktivasyonu tanımlanmıştır (140).

Otofaji bazal seviyelerinde yükselme saptanan pankreas kanseri hücrelerinde, yükselmenin hücreye enerji sağlamak için olabileceği düşünülmüş ve otofaji inhibe edildiğinde bu tümör hücrelerinin regrese olduğu ve farelerde surveyin uzadığı gösterilmiştir (141).

Kemoterapi ve radyasyon tedavisi sonrası hayatta kalan tümör hücrelerinde otofaji aktivasyonu bu hücrelerin uyku modunda kalmasına ve tümör rekürrensi ve progresyonuna yol açabilir (131).

Hücre kültürü çalışmalarında h-ras ve k-ras mutasyonu olan kanser hücrelerinde otofaji bazal seviyelerinin çok arttığı gösterilmiştir (142). Bu hücrelerde esansiyel otofaji proteinlerinin inhibisyonu hücre büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Otofaji inhibisyonu Ras mutasyonu olan tümörler için efektif tedavi olanakları sunabilir (137).

2.3.6.2. Otofaji Ve Kanser Tedavisi

2.3.6.2.1.Otofaji indüksiyonu:

Otofaji indüklenmesi için gerekli proteinlerden belcin-1'in farelerde kaybında tümör gelişirken aşırı ekspresyonunda tümör gelişimi baskılanmaktadır (116). Konvansiyonel sitotoksik ilaçlar ve radyasyon otofajiyi indükler (132, 143-147).

Bunların dışında BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörü imatinip (148), anti-EGFR reseptörü cetuximap (149) proteaz inhibitörleri (150) TNF ilişkili apoptoz inducing ligand (TRAIL) (151) ,

HDAC inhibitörü vorinostat ve OSU-HDAC42 (152) gibi diğer antikanser ilaçlarının otofajiyi aktive ettiği gösterilmiştir.

Proteaz inhibitörleri (153), siklooksijenaz inhibitörleri (154), tamoksifen (155) de otofajiyi indüklemektedir.

Devamlı ve aşırı otofaji indüksiyonu tümör hücre ölümünü indükler (123). mTOR inhibitörleri –otofajiyi indüklerler- nöroendokrin karsinom, renal hücreli karsinom ve lenfoma tedavisinde sınırlı bir başarı sağlamıştır (156).

Antidiyabetik biguanid grubundan metforminin mTOR inhibisyonu ile otofajiyi aktive ettiği görülmüştür (157, 158).

2.3.6.2.2.Otofaji inhibitörleri:

Pek çok çalışmada antikanser ilaçların otofaji inhibisyonu ile tümöral hücre ölümünü arttırdığı görülmüştür (134). Alkilleyici ajanların tümör hücrelerinde otofaji inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir (132).

Apopitoz-defekti saptanan kolon kanser ve lösemik hücre soylarında otofaji inhibisyonunun dirençli hücrelerde TRAIL-mediated apopitoza duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir (151).

Farmakolojik inhibitörler yolağın erken veya geç basamaklarını inhibe edenler olarak ayrılabilir. Erken evre inhibitörler class3 PI3K yı etkilerken antimalaryal klorokin, hidroksiklorokin ve bafilomisin geç evre inhibitörlerdir (159).

Farelerde Myc-ile indüklenmiş lenfomada klorokin+siklofosfamid kombinasyonu ile otofaji inhibisyonu yapılarak tümöral hücre ölümü indüklenmiş ve benzeri etki Atg5 in shRNA ile susturulması ile de sağlanmıştır. Sonuçta tümör rekürrensi geciktirilmiştir (132).

Kolon kanseri ksenograft modelinde klorokin+vorinostat kombinasyonu ile tümör kitlesinde belirgin küçülme ve apopitozda artış sağlanmıştır (160).

Yine prostat karsinomu ksenograft modelinde saratinib ile tümör büyümesinde kontrol grubuna göre %26 azalma görülürken saratinib+klorokin kombinasyonu ile %64 azalma sağlanmıştır (161).

2.3.6.3.TÜMÖRDEN KORUNMADA OTOFAJİ HEDEFİ

Tümör supresyonunda otofajinin önemli rolü mevcuttur. PI3K-AKT-mTOR sinyalizasyonu çoğu tümörde disregüledir ve mTOR inhibisyonu otofajiyi indükleyebilir. Fare deneyinde karsinojenle indüklenen akciğer kanserinde mTOR inhibitörü rapamisinle %90 redüksiyon sağlanmıştır (162). Başka bir çalışmada da metforminle mTOR inhibisyonu ile benzer sonuç elde edilmiştir (163).

Otofaji tümör supresyonunda ve tümörün strese adaptasyonunda ikili bir rol oynamaktadır. Pek çok prelinik çalışmada stresin indüklediği otofajinin tümörün hayatta kalması ve büyümesi yönünde etki ettiği dolayısıyla antikanser terapilerle bu etki hedeflenebileceği gösterilmiştir. Bu bilgiler otofaji inhibisyonunun kanser tedavi hedefi olabileceğini göstermektedir. Otofaji inhibisyonu yapan pek çok ilaç spesifik değildir ve direk antitümöral etkisi yoktur. Bu ölçüde faz 1-2 çalışmalarında en çok klorokin ve hidrosiklorokin kombine olarak kullanılmaktadır (163).

2.3.7.ANTİ-LC3C (Cytosolic-associated protein light chain 3-C)

Cytosolic-associated protein light chain 3-II (LC3-C) otofaji yolağında otofagozom oluşumunda rol alan bir proteindir ve matür otofagozomlarda bulunur. Bu sayede otofagozomların gösterilmesinde kullanılır. Normal hücrelerde LC3C stoplazmada (stoplazmik boyanma) bulunurken otofaji aktive olduğunda otofagozom üzerinde yerleşir (vezikülerboyanma) (164).

2.4.MİRNA

DNA'nın yüksek seviyede korunan alanlarından kodlanan ancak protein kodlamayan miRNA'lar yaklaşık 18-24 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli RNA molekülüdür. miRNA'lar mRNA zincirinin sonuna (3' ucu) komplementer olarak bağlanır, hedeflenen mRNA'ları direk parçalayarak yada translasyonunu inhibe ederek mRNA'nın işlevini sonlandırır. Böylece gen ekspresyonunu (negatif olarak) düzenler. Gen hedeflenerek yapılan bu düzenleme pek çok biyolojik procesde (kök hücre farklılaşması, apoptoz, yaşlanma, hastalıklar, kanser gibi...) görev alır. Bir miRNA birden çok transkripsiyonu

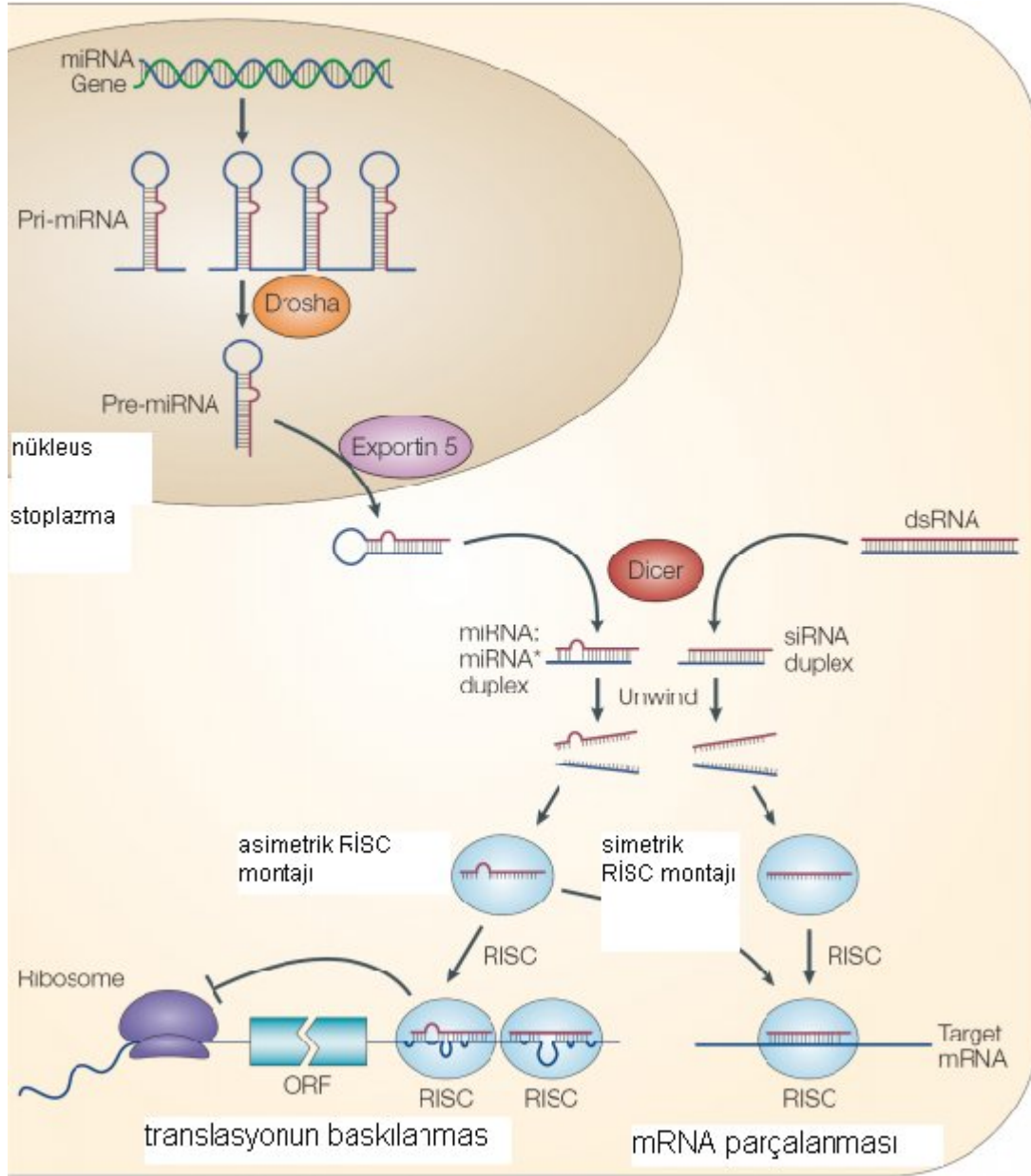
hedefleyebildiği gibi, bir gen de birden çok miRNA tarafından düzenlenebilir. Yani miRNA ile gen transkripsiyonu arasında özgüllük ilişkisi yoktur (165).

Hücre çekirdeği içinde DNA'dan RNA Polimeraz II (Pol II) veya III ile transkripsiyonla oluşturulan ilk formuna pri-miRNA denir. Bu form birkaç yüz nükleotidlidir ve hücre çekirdeği içinde -minimal enerji gerektiren- katlanmış halde bulunur (165).

pri-miRNA'lar RNAz III endonukleaz "Drosha" enzimi ve çift iplikçikli RNA bağlayıcı protein "Pasha" kompleksi tarafından işlenerek pre-miRNA'ya dönüştürülür (165). Çekirdek zar proteini "exportin-5" aracılığıyla stoplazmaya aktarılan pre-miRNA'lar doğrudan RNAz III endonukleaz "Dicer"a bağlanır. Dicer, pre-miRNA sap-ilmliğini kestikten sonra, iki tamamlayıcı kısa RNA molekülü meydana gelir, ama bunlardan sadece biri RNA-indüklenmiş susturma kompleksine (RISC) dahil olur (166). RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNAz olan argonaute'in etkisiyle bu ikisinden 5' ucu daha kararlı olanı (kılavuz iplikçik) seçilip bu komplekse dahil olur. Diğer iplikçik, anti-kılavuz veya yolcu iplikçik olarak adlandırılır ve RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. Hedef mRNA'nın 3' ucuna bağlanarak gen translasyonunu sonlandırır. Çoğunlukla RISC kompleksi mRNA'nın kodlanmayan (UTR) kısmına bağlanır. (Şekil 4) (167).

Hedef geni hangi miRNA'nın regüle edeceği genle miRNA arasındaki komplementerlik derecesi ile belirlenir. Tam yada tama yakın komplementerlik mRNA'yı parçalayabilirken eksik komplementerlik translasyonu baskılar (168). miRNA'nın 22 nükleotidlik dizisinin 2-8 arası nükleotidlerine 'seed' dizin denir. Bu kısım hedef dizin tanımada önemlidir. Çünkü seed dizin hedef UTR ile tam komplementer olmalıdır (169).

Memelilerde miRNA ile mRNA arasında tam komplementerlik hemen hemen hiç olmadığından bir miRNA ile ilgili alt hedef grubunu hesaplamak oldukça zordur. Bugün bazı bilgisayar programları ile mRNA kaynak dizinleri baz alınarak muhtemel miRNA'lar belirlenmektedir (170). Bu muhtemel miRNAlar in vivo ve in vitro ortamda mRNAlarla eşleştirilerek etkinlikleri kanıtlanmalıdır.



Şekil 4:miRNA Sentezi Ve İşlevi (167)

Bazı miRNA'ların (aşırı ifadelenmiş ve/veya amplifiye olmuş) onkogen, bazılarının (az ifadelenmiş ve/veya delesyona uğramış) ise tümör baskılayıcı gen gibi işlev görmesi, tümör progresyonu, metastazı ve invazyonunda miRNA'ların modulator olduğunu düşündürmektedir (171). Çoğu miRNA'ların lokalizasyon ve ifadelenme profilleri göz önüne alındığında karsinogeneze anahtar rollere sahip olabileceği öngörülmüştür (172, 173).

2.4.1.miRNA VE KANSER

Mirna'ların çeşitli kanserlerde anormal ekspresyon paternleri göstermesi, tümörigenezde önemli roller oynadıklarını düşündürmektedir. Bu rol onkogen ve tümör supresör genlerin yeni bir sınıfı olarak tanımlanmaktadır. Kanserlerde ekspresyonları artan miRNAlar onkojenik miRNAlar (onkomiRs) olarak isimlendirilmektedir. Bu miRNAlar tümör supresyonunu, apoptozu ve hücre diferansiyasyonunu kontrol eden genleri durdurarak tümör gelişimini uyarılmaktadır. Bununla birlikte çeşitli kanserlerde ekspresyonu azalmış miRNA'larda mevcuttur. Bunlarda tümör supresör olarak sınıflandırılmaktadır (174).

2.4.2. miRNA VE OTOFAJİ

Mirna'ların, otofajinin; indüksiyon, vezikül nükleasyonu, vezikül elongasyonu, maturasyon ve otofagozom oluşumu gibi aşamalarını kontrol eden genlerle ilişkisi ortaya konulmuştur (175) .

Çalışmamız hazırlanırken otofaji yolağında görevli genlerle ilişkili miRNA'ların seçiminde ' <http://www.targetscan.org/>' adlı siteden yararlanılmıştır. Tablo 4'te otofaji yolağında anahtar role sahip genler ve ilişkili miRNAlar görülmektedir.

2.4.3. miRNA VE KOLOREKTAL KANSER

KRK'larda düzeyleri artan veya azalan çeşitli miRNA'lar tanımlanmıştır. Örneğin miR-133b, miR-143, miR-145 ekspresyon seviyeleri düşerken miR-17-92, miR-18a, miR-20a, miR-21, miR-31, miR-92, miR-96, miR-135b ve miR-183 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (176). Vickers ve arkadaşlarının çalışmasında miR-18a, miR-21, miR-20a, miR-31, miR-143, miR-145, miR-155, miR-181b, miR-200c, miR-203, miR-106a'nın KRK'larda prognozla ilişkisi vurgulanmıştır (177). miR-125b, miR-137, miR-143, miR-145, miR-192, miR-622, miR-630'nın tümör regresyonu ile ilişkisi gösterilmiştir (178).

<i>ULK1/2</i>	<i>UVRAG</i>	<i>ATG2A/B</i>	<i>ATG3</i>	<i>ATG4A,B,C,D</i>	<i>ATG5</i>
hsa-miR-520e	hsa-miR-520d-3p	hsa-miR-106b	hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-4319	hsa-miR-30d
hsa-miR-520d-3p	hsa-miR-520a-3p	hsa-miR-106a	hsa-miR-4477a	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-30a
hsa-miR-520a-3p	hsa-miR-520e	hsa-miR-17		hsa-miR-125b	hsa-miR-30e
hsa-miR-372	hsa-miR-373	hsa-miR-20b		hsa-miR-8	hsa-miR-30b

hsa-miR-302d	hsa-miR-520b	hsa-miR-20a		hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-30c
hsa-miR-373	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-93		hsa-miR-34a	
hsa-miR-302e	hsa-miR-302e	hsa-miR-519d		hsa-miR-449b	
hsa-miR-302a	hsa-miR-302c	hsa-miR-143		hsa-miR-449a	
hsa-miR-302c	hsa-miR-302b	hsa-miR-4770		hsa-miR-607	
hsa-miR-520b	hsa-miR-302d			hsa-miR-410	
hsa-miR-302b	hsa-miR-302a			hsa-miR-1279	
hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-372			hsa-miR-3163	
hsa-miR-139-5p				hsa-miR-340	
hsa-miR-370				hsa-miR-4528	
hsa-miR-596				hsa-miR-4803	
				hsa-miR-101	
<i>BECN1</i>	<i>ATG7</i>	<i>ATG9A,B</i>	<i>ATG10</i>	<i>ATG12</i>	
hsa-miR-30d	hsa-miR-520e	hsa-miR-96	hsa-miR-4435	hsa-miR-23c	
hsa-miR-30b	hsa-miR-520d-3p	hsa-miR-1271	hsa-miR-4659b-3p	hsa-miR-23b	
hsa-miR-30a	hsa-miR-520a-3p	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-4659a-3p	hsa-miR-130	
hsa-miR-30e	hsa-miR-302b	hsa-miR-4316	hsa-miR-371b-3p	hsa-miR-23a	
hsa-miR-376b	hsa-miR-520b		hsa-miR-4775		
hsa-miR-30c	hsa-miR-372		hsa-miR-3941		
hsa-miR-519a	hsa-miR-520c-3p		hsa-miR-603		
	hsa-miR-302d		hsa-miR-1266		
	hsa-miR-302c				
	hsa-miR-373				
	hsa-miR-302a				
	hsa-miR-302e				
	hsa-miR-375				

Tablo 4: Otofaji yolağında anahtar role sahip genler ve ilişkili miRNA'lar (<http://www.targetscan.org/>)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji bölümü arşivinden Ağustos 2009-Ocak 2014 tarihleri arasında kolorektal karsinom nedeni ile kolektomi uygulanmış lokal ileri evre (T3-T4) 50 olgu seçildi. Vakalar daha önce preoperatif neo-adjuvan terapi almamışlardı.

Olgulara ait Hematoksilen Eozin boyalı tüm lamalar gözden geçirildi ve aşağıdaki parametreler tekrar değerlendirildi.

1) Yaş- Cinsiyet: Elektronik dosyaları ve patolojik raporları incelenerek elde edildi. 65 yaş altı ile 65 yaş ve üzeri olarak ikiye ayrıldı.

2) Lokalizasyon: Tümörün anatomik yerleşim yerine göre çekum, sağ kolon, transvers kolon, sol kolon, sigmoid kolon ve rektum olarak belirlendi.

3) Tümör Boyutu: : En büyük boyut baz alındı. Birden fazla tümör odağı olan vakalarda ise en büyük tümör hacmi dikkate alındı.

4) Perinöral İnvazyon: İnvazyon bulunan tümörler (+), bulunmayanlar (-) olarak gruplandırıldı.

5) Lenfo-vasküler İnvazyon: İnvazyon bulunan tümörler (+), bulunmayanlar (-) olarak gruplandırıldı.

6) Histolojik Grade: CAP (Collage Of American Pathologist) protokollerine göre düşük/low-grade (>%50 gland formasyonu) ve yüksek/high-grade (<%50 gland formasyonu) karsinom olarak sınıflandırıldı. Müsinöz karsinomlar ayrı olarak gruplandı.

7) Histolojik tip: Tümörler histolojik tipe göre adenokarsinom ve müsinöz karsinom olarak 2 gruba ayrıldı.

8) T,N,M Evreleme: WHO 2010 kriterlerine göre evreleme yapıldı. Lokal invazyonun derecesine göre submukozaya invaze tümörler pT1, muskularis propriaya invaze

tümörler pT2, subseroza veya nonperitonealize perikolik dokuya invaze tümör pT3, visseral peritona perfore olmuş ya da direk invazyon veya diğer organ tutulumu olan tümörler pT4 olarak gruplandırıldı.

Lenf nodu tutulumu olmayan tümörler N0, 1-3 lenf nodu tutulumu olanlar N1, 4 ve üzeri lenf nodu tutulumu olanlar N2 olarak değerlendirildi.

Metastaz olup olmamasına göre üç gruba ayrıldı. Uzak metastaz yok (M0), Tek bir organ ya da bölgesel olmayan lenf nodu metastazı olan (M1a), birden fazla organ ya da periton metastaz (M1b) olarak sınıflandırıldı.

9) Metastaz: Hastanın takiplerinde metastaz görülüp, görülmemesine göre sınıflandırıldı.

10) Hasta takibi: Hastalar 1-46 ay takip edildi.

3.2.İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMA

KRK'larda otofaji aktivitesini immunohistokimyasal olarak göstermek için matür makrotofagozom membranında bulunan LC3C (Ligth Chain 3-C) proteinini hedefleyen anti-LC3C antikoru seçildi. Olgulara ait tümörü temsil eden parafin bloklar seçildikten sonra manuel immünohistokimyasal boyama protokolü uygulandı.

3.2.1.İmmünohistokimya prosedürü

Mikrotom cihazı ile 3.5 mikron kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı polilizinli lamlara alındı. Slaytlar 60° 'lik etüvde 45 dakika bekletilerek kurutuldu. Slaytlar 3 kez 5'er dakika ksilenle yıkanarak deparafinize edildi. Slaytlar rehidrate edilmek için sırasıyla 3 kez 3'er dakika %100'lük etil alkol, 2 kez 3'er dakika %95'lik etil alkol, 2 kez 3'er dakika %80'lik etil alkol ile yıkandıktan sonra 5 dakika distile suda bekletildi. Antijen geri kazanımı aşaması için Tris/EDTA pH 9.0 buffer ile 20 dakika yüksek ısı ayarlı mikrodalga fırına alındı. Mikrodalga fırından çıkarıldıktan sonra 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İmmünboyama aşamasında dokuların etrafı hidrofobik kalemle çizildikten sonra Dokudaki endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için kesitler üzerine %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi damlatılıp 10 dakika bekletildi. Kesitler tekrar TBS'de 5 dakika bekletilip, nonspesifik bağlanmaları

önlemeye yönelik 5 dakika blokaj solüsyonu uygulandı. 1/300 oranında dilüe edilmiş Anti-LC3C (ABCAM rabbit poliklonal-ab64122) antikoru damlatılarak 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Slaytlar 4 kez 5 dakika TBS'de yıkandı. Sekonder antikor damlatılıp 30 dakika bekletildi. Tekrar 4 kez 5 dakika TBS'de yıkandıktan sonra immün reaksiyonu gözlemlemek için isaret olarak streptavidin peroksidaz damlatılarak 10 dakika bekletildi. TBS'de 5 dakika bekletilen kesitlerin üzerine AEC (Aminoetil karbezil) kromojen damlatıldı ve 15 dakika bekletildi. Daha sonra kesitler distile suyla yıkanarak Mayer hematoksilen ile boyandı. Su bazlı kama solüsyonu ile kapatıldı.

3.2.2. İmmünohistokimya değerlendirme

İmmünohistokimyasal değerlendirme, boyanma yoğunluğu ve pozitif boyanan hücre yüzdesine göre yapıldı. Pozitif boyanan hücre yüzdesi ; $<1=0$ puan , $1-39=1$ puan , $40-69=2$ puan , $>70=3$ puan olarak derecelendirildi. Boyanma yoğunluğu; zayıf=1puan, orta=2 puan , kuvvetli= 3 puan olarak derecelendirildi. Her iki kategori puanları toplanarak 0-3 puan= düşük ekspresyon, 4-6= yüksek ekspresyon olarak tanımlandı.

3.3.miRNA ANALİZİ

3.3.1.Parafin Bloktan Total RNA Elde Edilmesi

Parafin bloklardan total RNA izolasyonu miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak yapılmıştır. Üretici firmanın tavsiyesine göre protokol izlenmiştir.

Aynı hastaya ait tümörlü bloklar ve kontrol grubu olarak tümörsüz (temiz cerrahi sınırlar) parafin bloklar seçildi. Parafin bloklardan 3,5 µm kalınlığında 10-12 kesit 1,5 ml'lik ependorf tüpüne alındı. Tüplere 200 µm ksilen eklenerek 10sn vortekslendikten sonra kısa süre santrifüj edildi. 56°de 3 dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında soğutuldu. 200 µm PKD buffer eklendikten sonra vortekslenerek 1dk 10000 rpm de santrifüj edildi. 10 µm proteinaz K eklenerek karıştırıldı. Önce 56C° de 15 dakika sonra 80° C' de 15 dakika inkübe edilerek proteinler yok edildi. 3 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 15 dakika 13500 rpm de santrifüj edildi. Süpernatant 2ml tüpe alınıp pellet atıldı. Süpernatanta 10 µm DNase booster buffer eklenerek kısa süre santrifüj edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. 400 µm RBC buffer eklendi. 1250 µm %100 etil alkol eklenerek pipetle karıştırıldı. Karışımdan 700 µm alınarak RNA filtreli (RNeasy MinElute spin) tüpe aktarıldı. 15 sn 10000 rpm de santrifüj edildi. Filtre yeni tüpe alınarak tekrar 700 µm eklenerek karışım bitene kadar bu adımlar tekrar edildi. RNeasy MinElute spin filtreye 500 µm RPE buffer eklenerek 2

dk 10000 rpm de santrifüj edildi. RNeasy MinElute spin filtre yeni bir tüpe alınarak 5 dk yüksek hızda santrifüj edildi. RNeasy MinElute spin filtre yeni bir tüpe alınarak 25 µm RNase free water eklenerek 1dk yüksek hızda santrifüj edildi. Total RNA filtreden tüpe aktarılmış oldu. RNA örnekleri - 80° C’de saklanmıştır.

3.3.2. miRNA Revers Transkriptaz Sentezi

Elde edilen total RNA’dan miScript II RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak cDNA elde etme işlemi tamamlanmıştır. Protokol üretici firmanın tavsiyesine göre takip edilmiştir. Bütün aşamalar buz üzerinde yapılmıştır.

Kalıp RNA çözündürülür. 10x miScript Nucleics Mix, 5x miScript HiSpec tamponu, su ve primerler oda sıcaklığında çözündürülüp homojenize edilir ve spin yapılır.

Aşağıdaki Tablo’da cDNA reaksiyonu için karışım miktarları gösterilmiştir.

Eklene Madde	µl
5x miScript HiSpec Buffer	4
10x Nucleics Mix	2
RNase-free water	7
miScript RT Mix	2
Total RNA (10-2000ng/ µl)	5

Tablo 5: cDNA Reaksiyonunda kullanılan maddelerin içerikleri ve miktarları

Kalıp RNA, RT master karışımı içeren her tüpe eklenir. Yavaşça karıştırılır, kısa bir şekilde santrifüj edilir ve hızlı bir şekilde kaldırılır. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra tüpler 37°C’de 60 dk, ve 95°C’de 5 dk olmak üzere cihaza konulur. Reaksiyon sonunda örnekler hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak -20 °C’de çalışılmaya başlanıncaya kadar saklanır.

3.3.3. Real-Time PCR ile miRNA Analizi

miRNA revers transkriptaz sentezi gerçekleştirildikten sonra örneklerde miRNA ekspresyon analizi Corbett Research (Model: RG-600, Avustralya) RT-PCR cihazı kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyonda kullanılan maddelerin içerikleri ve miktarları aşağıdaki

tabloda ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Analiz sonucunda cihazın her örnek için verdiği Ct değerleri kullanılarak normal ve tümörlü dokulardaki değişimleri hesaplanmıştır.

Eklenen Madde	μ l
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix,	12,5
10X Universal Primer	2,5
!0X miScript Primer Assay	2,5
Rnaz içermeyen su	5
Kalıp cDNA	2,5

Tablo 6: Real-Time PCR Reaksiyonunda kullanılan maddelerin içerikleri ve miktarları

3.4. İSTATİKSEL İŞLEMLER

Kategorik değişkenler arasındaki ilişkilerin saptanmasında Ki-kare analizleri kullanıldı. Sağ kalım olasılıkları Kaplan Meier yöntemi ile tahmin edildi ve Log-Rank yöntemi yardımıyla olasılıklar karşılaştırıldı. Klinikopatolojik verilerin sağkalıma etkisi Cox Regresyon testi ile araştırıldı. Tümörlü dokularla normal dokuların miRNA fold change değerleri tek örnek T testi ile karşılaştırıldı. miRNA fold change değerleri ile klinikopatolojik veriler arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde Mann-Whitney U Test analizi kullanıldı. Analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences, versiyon 17.0, ABD) for Windows programında yapıldı. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1 TANIMLAYICI BİLGİLER

Kolorektal karsinom nedeni ile opere edilen 50 vakanın 20 (%40) tanesi kadın, 30 (%60) tanesi erkek hastadır. Vakalar 26 ile 86 (ortalama 63) yaş arasındadır. <65 yaş grupta 23 (%46) hasta vardır, bunun 9 tanesi kadın, 14 tanesi ise erkektir. ≥65 yaş üstü grupta ise 27 (%54) vakanın 16 tanesi erkek, 11 tanesi kadındır (Tablo 7).

	Tanı Yaşı		Toplam	
	65 Yaş Altı	65 Yaş Ve Üstü		
Hasta Cinsiyeti	Erkek	14	16	30
	Kadın	9	11	20
Toplam		23	27	50

Tablo 7 : Vakaların cinsiyetlere göre yaş grupları

Lokalizasyona göre değerlendirildiğinde, en sık tutulum sigmoid kolonda izlenmektedir. Rektum ve çekum sırasıyla bunu takip etmektedir. Yerleşim yerleri proksimal kolon, distal kolon ve rektum olarak olarak gruplandırıldığında 16 olgu (%32) proksimal kolon, 24 olgu (%48) distal kolon, 10 olgu (%20) rektum yerleşimlidir.

Tümör boyutları değerlendirildiğinde ortalama 5.4 cm, minimum 2 cm, maksimum 11 cm ölçüsünde izlenmiştir. 15 (%30) olguda en büyük tümör çapı 4cm altında iken, 35 (%70) olguda 4cm ve daha büyüktür (Tablo 7).

Histolojik tip değerlendirildiğinde 47 olgu (%94) adenokarsinom, 3 olgu (%6) müsinöz karsinom olarak izlenmiştir.

Vakaların 43 tanesinde (%86) infiltratif yayılım görülürken 7 tanesinde (%14) ekspanzil yayılım gözlemlendi.

Tümör Yerleşim Yeri	Tümör Çapı		Toplam
	<4 cm	≥4 cm	
Çekum	0	7	7
Sağ kolon	1	5	6
Transvers kolon	1	2	3
Sol kolon	3	5	8
Sigmoid kolon	6	10	16
Rektum	4	6	10
Toplam	15	35	50

Tablo 8: Tümör yerleşim yeri ve tümör çapı dağılımı

50 vakanın 14 tanesinde (%28) lenfovasküler invazyon izlenirken 36 vakada (%72) lenfovasküler invazyon izlenmemiştir.

50 vakanın 6 tanesinde (%12) perinöral invazyon izlenirken 44 vakada (%88) perinöral invazyon izlenmemiştir.

CAP (Collage Of American Pathologist) protokollerine göre histolojik olarak 36 vaka (%72) low grade (düşük dereceli) olarak değerlendirilirken, 11 vaka (%22) high grade (yüksek dereceli) olarak değerlendirilmiştir. Müsinöz karsinomlar ayrı olarak gruplandı.

WHO TNM sınıflamasına göre tümörlerin yayılımı ve evreleri değerlendirildi. Çalışma grubumuz tümör yayılımı olarak, T3 ve T4 olgulardan oluşmaktadır. 50 vakanın 48 tanesi (%96) tümör yayılım derecesi olarak T3'ken 2 tanesi (%4) T4 olarak değerlendirildi. Vakaların 30 tanesinde (%60) lenf nodu metastazı saptanmadı. Lenf nodu metastazının yaygınlığına göre, 11 vakada N1 (%22), 9 vakada N2 (%18) olarak değerlendirildi. 4 vakada (%8) tanı anında uzak metastaz mevcutken, 46 vakada uzak metastaz yoktu. Bu bulgulara dayanarak; 29 olgu (%58) evre 2, 17 olgu evre 3 (%34), 4 olgu evre 4 (%8) olarak sınıflandırıldı.

Histolojik grade ile klinikopatolojik veriler ki-kare testi ile karşılaştırıldığında; cinsiyet (kadın, erkek), yaş (≥ 65 yaş, <65 yaş), lenfovasküler invazyon ve perinöral invazyon ile CAP histolojik gradeleme sistemi arasında anlamlı ilişki görülmezken; WHO

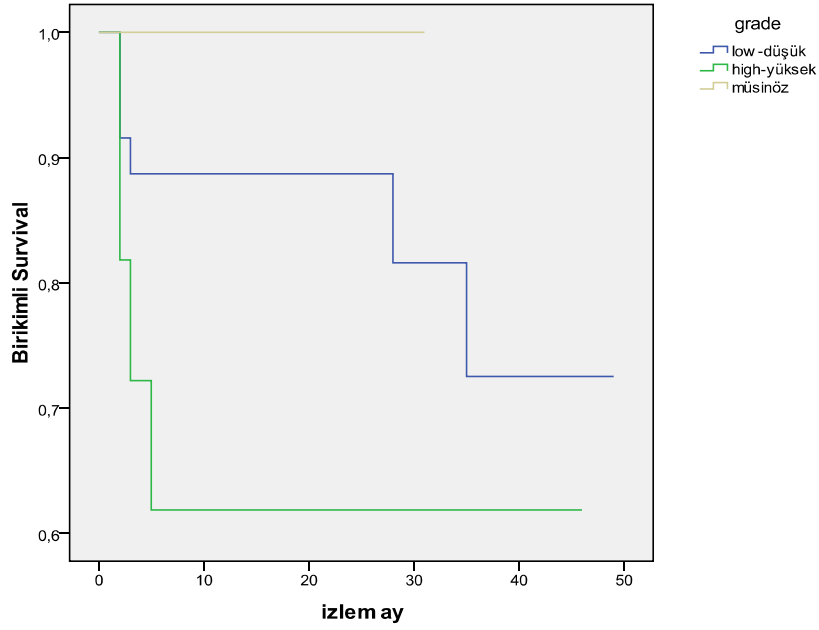
TNM evre (stage), tümör çapı ($\geq 4\text{cm}$, $<4\text{cm}$) ve lenf nodu metastazı arasında anlamlı ilişki görülmüştür (Tablo 9) .

		HİSTOLOJİK GRADE			Toplam	p Değeri
		Müsinöz	Low-Düşük Grade	High-Yüksek Grade		
Cinsiyet	Kadın	1	13	6	20	0,535
	Erkek	2	23	5	30	
Yaş	≥ 65 yaş	4	20	6	36	0,759
	<65 yaş	0	16	5	14	
Tümör yerleşim yeri	Proksimal	2	9	5	16	0,179
	Distal	0	21	3	24	
	Rektum	1	6	3	10	
Tümör çapı	$\geq 4\text{cm}$	2	22	11	35	0,048
	$<4\text{cm}$	1	14	0	15	
Lenf Nodu	N0	0	25	4	29	0,044
	N1	2	5	4	11	
	N2	1	5	3	9	
TNM	EVRE 2	0	25	4	29	0,017
	EVRE 3	2	8	7	17	
	EVRE 4	1	3	0	4	
L.V invazyon	+	0	9	5	14	0,259
	-	4	25	7	36	
P.N invazyon	+	0	5	1	6	0,210
	-	4	29	11	34	

Tablo 9: Prognostik faktörlerin histolojik gradele karşılaştırılması ve p değerleri

Olgular ortalama 20,6 ay (Minimum 1,05 - maksimum 48,13) izlendi. İzlem sırasında 10 olgu ex. oldu. Yapılan sağkalım değerlendirilmesinde ex. olan 10 hastanın 6 tanesi düşük grade, 4 tanesi yüksek gradedir. Ortalama sağkalım düşük gradelilerde 48 ay, yüksek gradelerde 45 ay, müsinözlerde 30 ay olarak hesaplandı. Yapılan istatistiksel çalışmada

p=0,202 (Log Rank(mantel-Cox)) olması, bize CAP grade sistemi ile sağkalım arasında ilişki bulunamamıştır (Şekil 5).



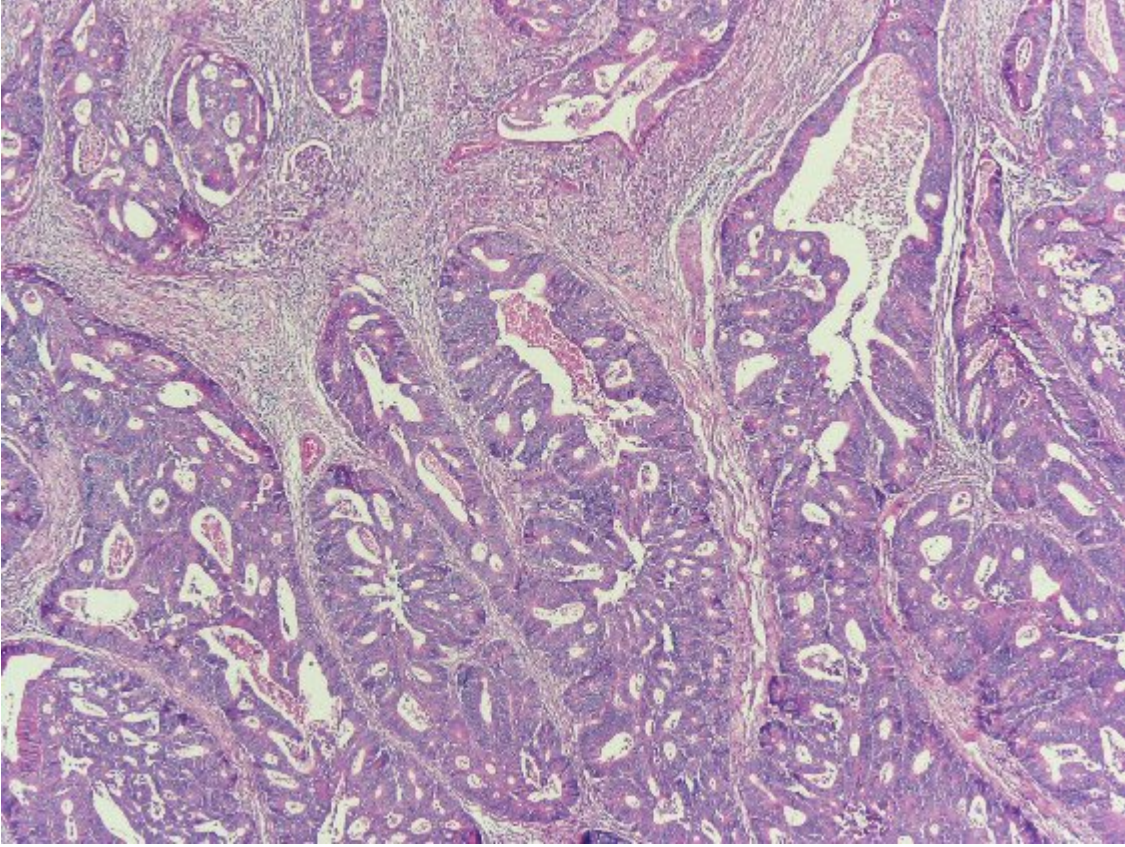
Şekil 5:CAP gradeleme sistemi ile sağkalım arasındaki ilişki

Klinikopatolojik verilerin sağkalım üzerine etkisi Cox regresyon testi ile değerlendirildi.Cinsiyet (p=0,037) ve lenf nodu tutulumu (0,020) ile sağkalımlarında anlamlı ilişki bulundu(Tablo 10)

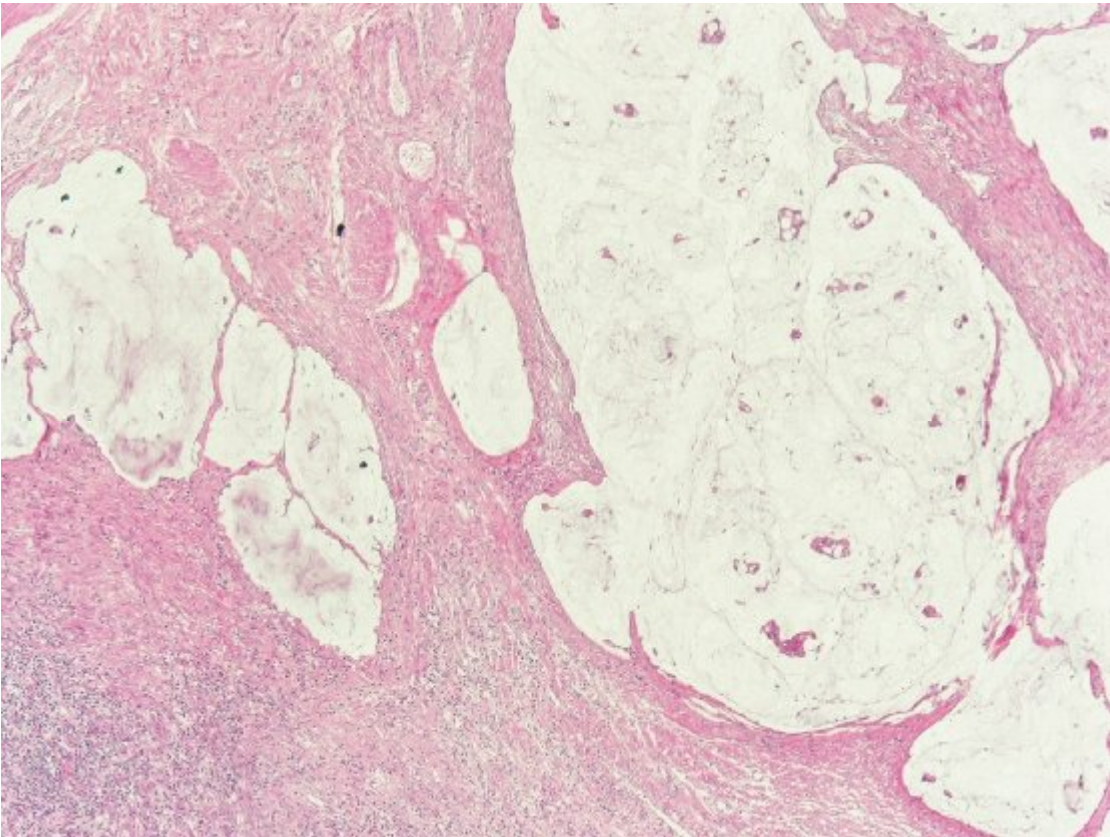
Cox Regresyon Sağkalım Analizi

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Cinsiyet	2,091	1,000	4,368	1	,037	8,093
Yaş	1,269	,879	2,086	1	,149	3,558
Tümör çapı	1,913	1,320	2,100	1	,147	6,771
tyeri	,432	,286	2,282	1	,131	1,541
Histolojik Grade	-1,118	1,041	1,153	1	,283	,327
Lenf nodu met.	2,496	1,073	5,414	1	,020	12,130
Lenfovasküler inv.	,346	,898	,148	1	,700	1,413
Perinöral inv.	,873	1,345	,422	1	,516	2,395
TNM Evre	-2,728	1,507	3,278	1	,070	,065
LC3C Ekspresyonu	-1,242	,902	1,897	1	,168	,289

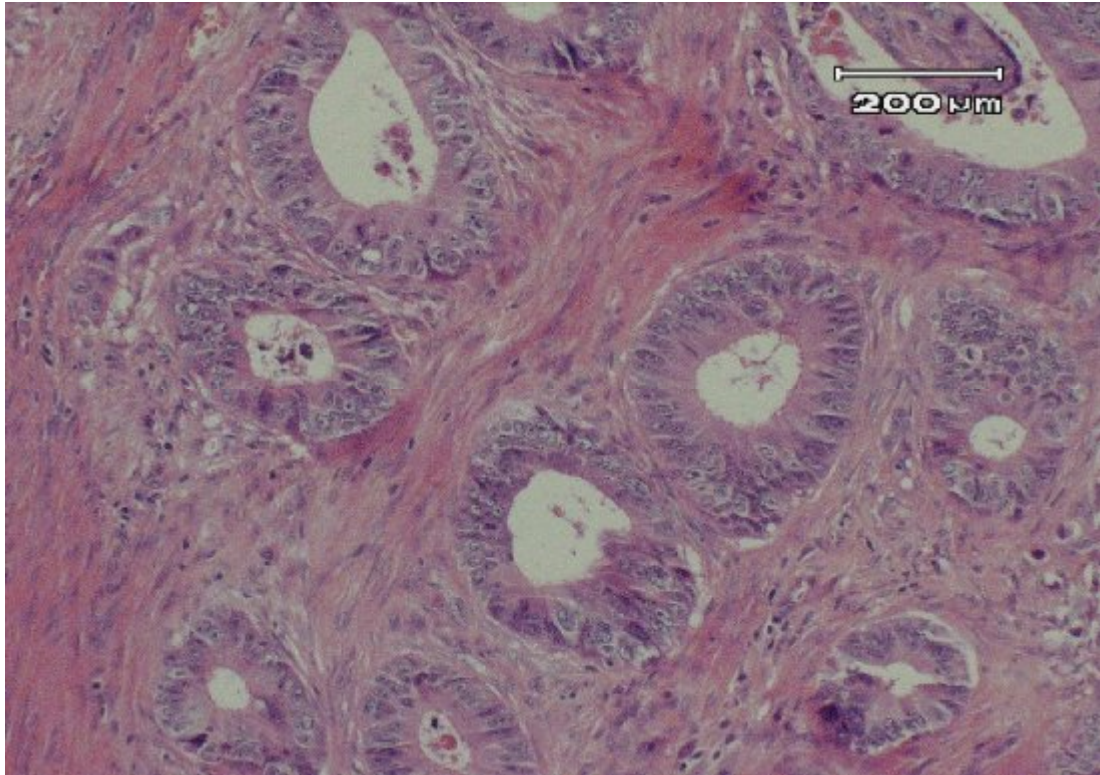
Tablo 10:Klinikopatolojik verilerin sağkalım üzerine etkisi



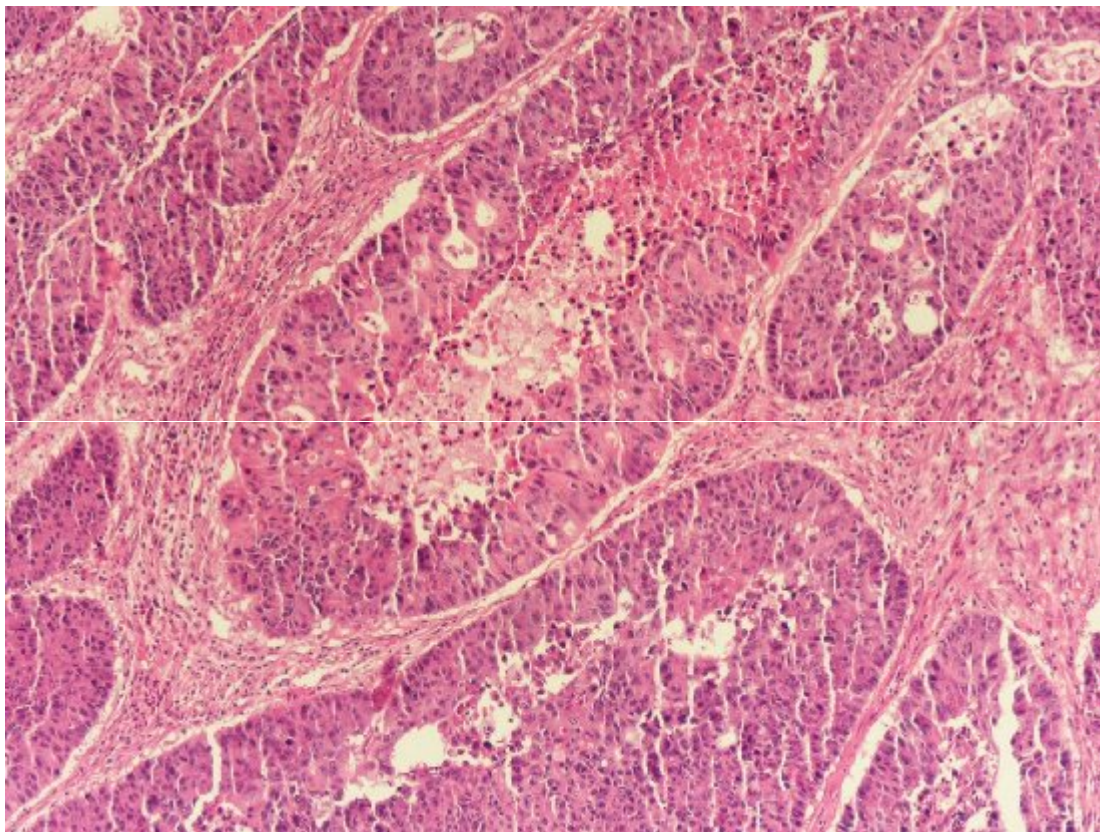
Resim 1:Adenokarsinom , kribriform yapılar oluşturmuş glandlar 40x H/E



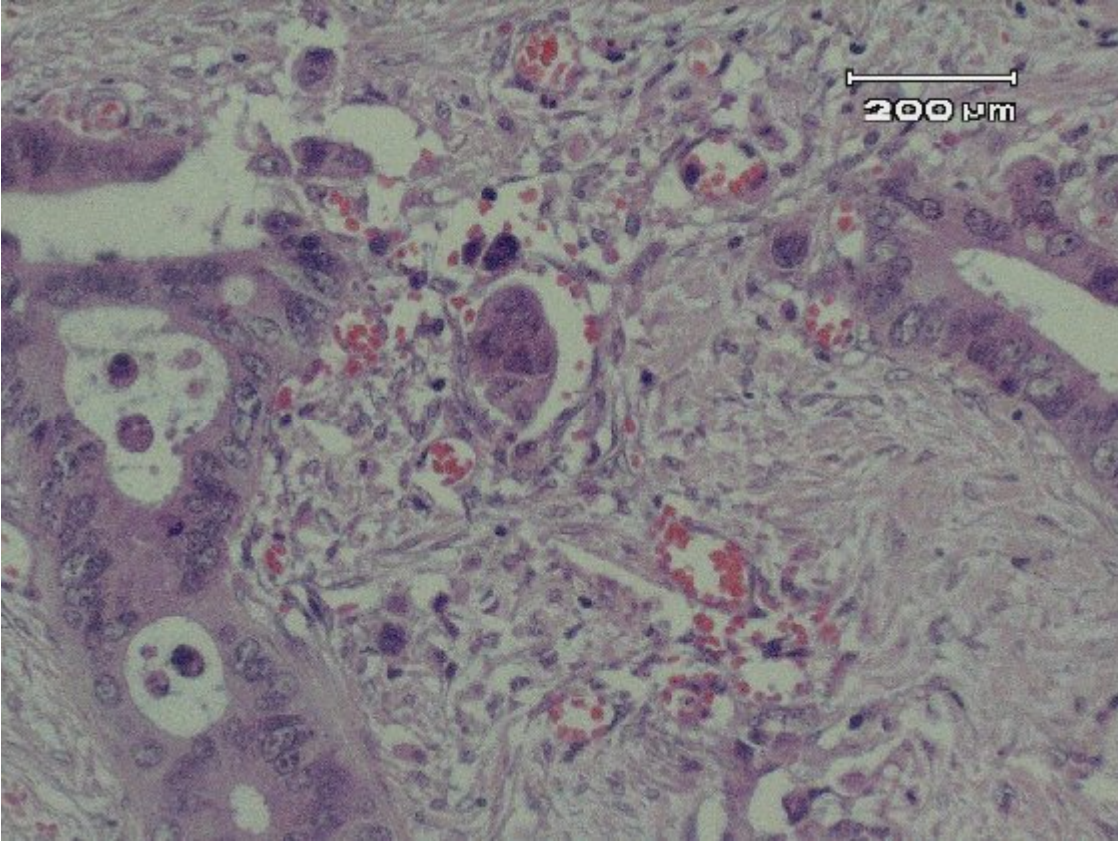
Resim 2 :Müsinöz karsinom 40x H/E



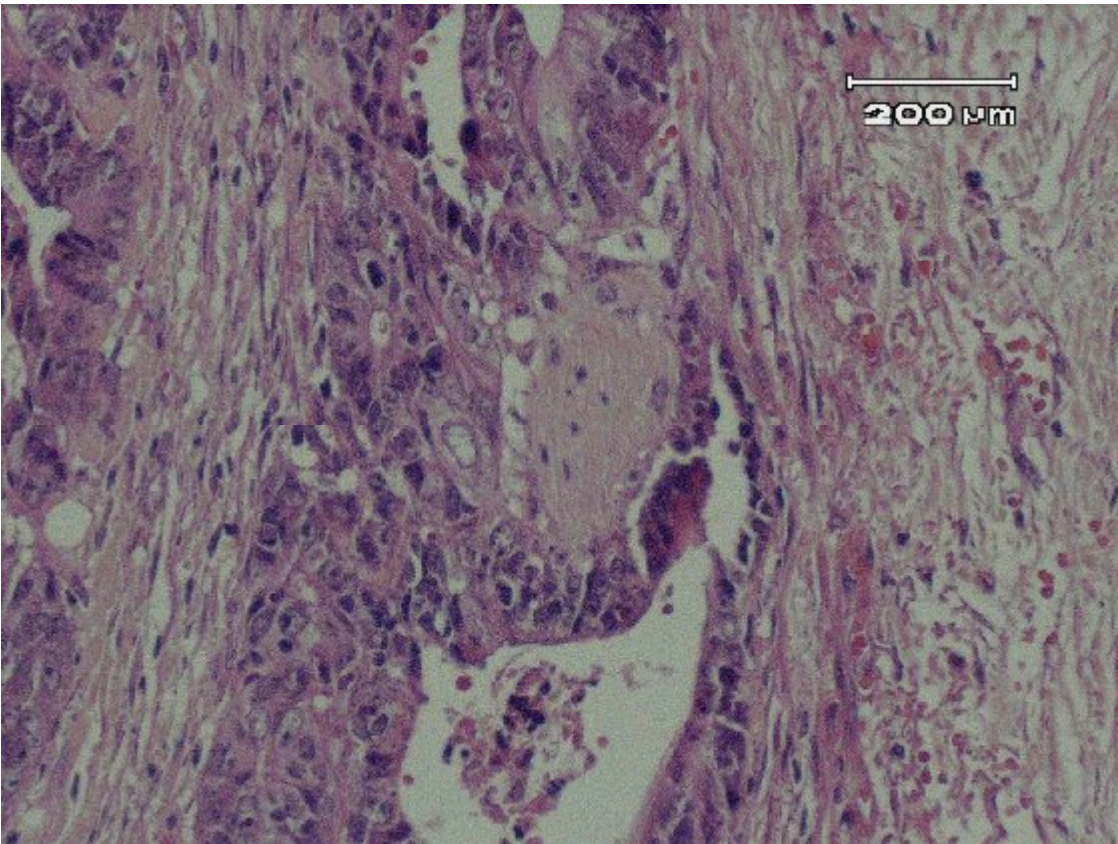
Resim 3: Low grade adenokarsinom 200x H/E



Resim 4: High grade adenokarsinom 100x H/E



Resim 5: Lenfovasküler invazyon 200x H/E



Resim 6: Perinöral invazyon 200x H/E

4.2.İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

LC3C immunohistokimyasal markırı için stoplazmik, noktasal-veziküler boyanma (dot-like) paterni pozitif olarak kabul edildi. Normal hücrelerde LC3C stoplazmada lokalize olurken otofaji yolağı aktive olduğunda otofagozom üzerinde (veziküler) lokalize olur. Tüm slaytlarda inflamatuvar hücrelerde, özellikle plazma ve eozinofillerde, LC3C immünreaktivitesi tespit edildi. Bu hücreler anti-LC3C molekülü için pozitif kontrol olarak kabul edildi.

LC3-C immünreaktivitesi pozitif boyanan hücre yüzdesi ve boyanma yoğunluğuna göre değerlendirildi. Buna göre pozitif boyanan hücre yüzdesi ; <%1'in altında boyanma "0 puan" , % 1-39 hücre pozitifliği "1 puan" , %40-69 hücre pozitifliği "2 puan" , %70-100 hücre pozitifliği "3 puan" olarak değerlendirildi. Boyanma yoğunluğu; negatif "0 puan" , zayıf "1 puan", orta "2 puan", kuvvetli "3 puan" olarak değerlendirildi. Her iki skor toplanarak "0-3 puan= düşük LC3C ekspresyonu" , "4-6 puan= yüksek LC3C ekspresyonu" olarak gruplandırıldı(Tablo 11).

VAKA	SKOR	VAKA	SKOR	VAKA	SKOR	VAKA	SKOR	VAKA	SKOR
1	5	11	0	21	5	31	0	41	2
2	0	12	5	22	3	32	0	42	4
3	0	13	0	23	4	33	0	43	0
4	4	14	5	24	6	34	6	44	0
5	0	15	4	25	5	35	0	45	0
6	6	16	4	26	0	36	5	46	6
7	0	17	6	27	0	37	0	47	0
8	6	18	4	28	4	38	6	48	4
9	2	19	6	29	0	39	6	49	6
10	0	20	0	30	6	40	0	50	5

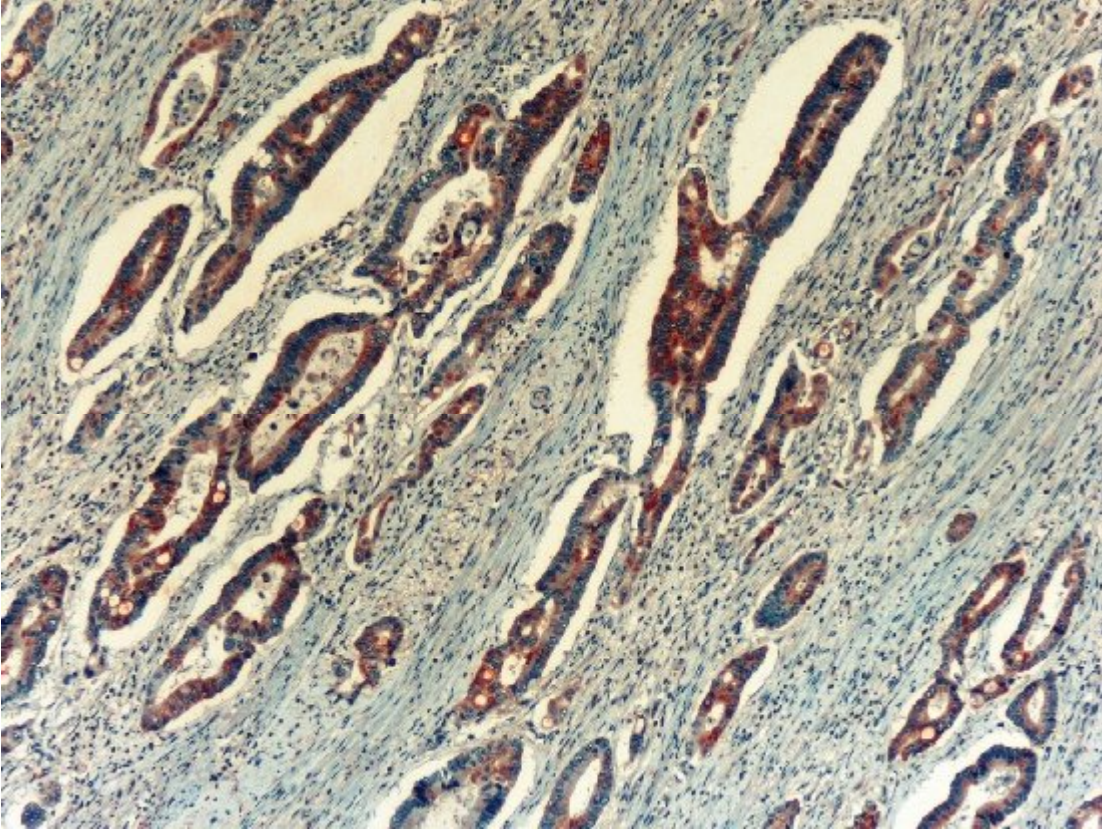
Tablo 11 : Vakaların anti-LC3C ile pozitif boyanma yüzdesi ve boyanma yoğunluğu skorları toplamları

Vakaların; 24 tanesinde (%48) negatif-düşük LC3C ekspresyonu saptanırken, 26 tanesinde (%52) kuvvetli LC3C ekspresyon saptandı.

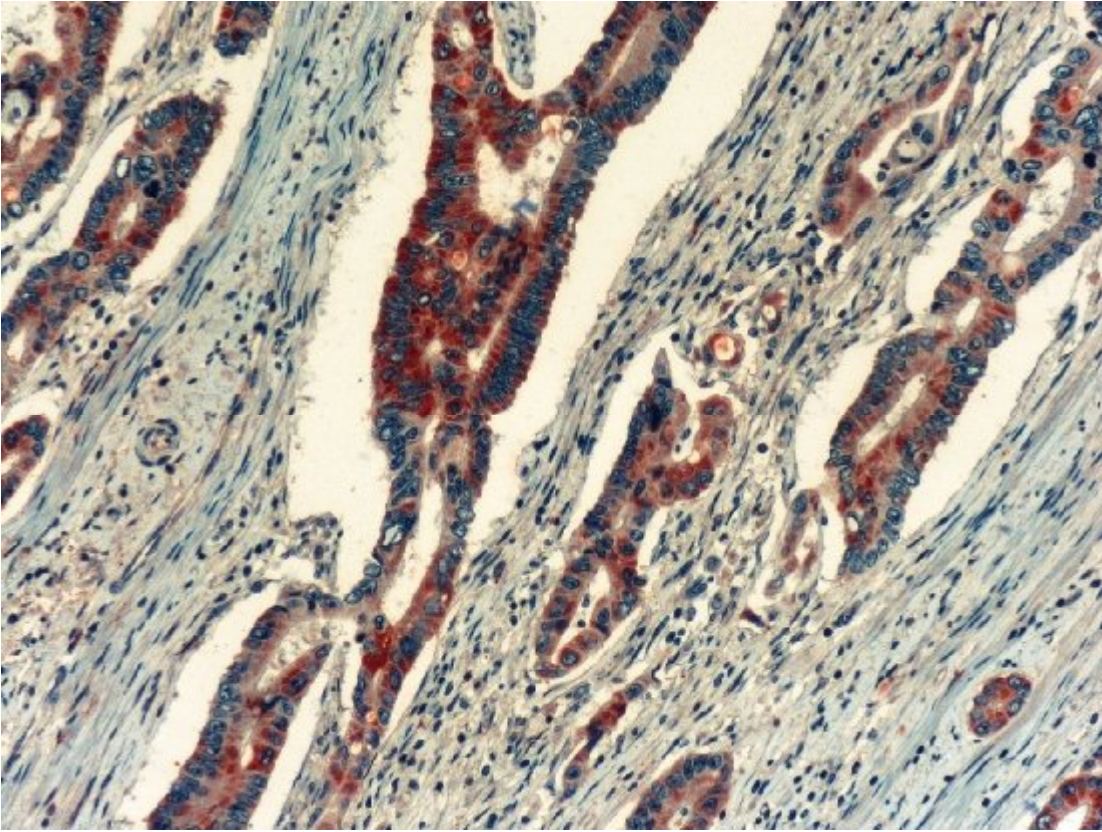
Aşağıdaki tabloda klinik-histopatolojik verilerle LC3C ekspresyonu arasındaki ilişki değerlendirilmiştir (Tablo12). LC3C ekspresyonu ile tümör çapı (≥ 4 cm, < 4 cm) arasında (p değeri=0,009), CAP histolojik gradeleme sistemi (p değeri=0,018) ve tümör yerleşim yeri (p değeri=0,029, p değeri=0,017) anlamlı ilişki bulunmuştur (Tablo12)

	LC3C EKSPRESYONU		Toplam	p Değeri	
	Düşük Ekspresyon (n=24)	Yüksek Ekspresyon (n=26)			
Cinsiyet	Kadın	10	10	20	0,817
	Erkek	14	16	30	
Yaş	≥ 65 yaş	13	14	27	0,982
	< 65 yaş	11	12	23	
Tümör çapı	≥ 4 cm	21	14	35	0,009
	< 4 cm	3	12	15	
Tümör yerleşim yeri	Çekum	7	0	7	0,029
	Sağ kolon	4	2	6	
	Transvers kolon	1	2	3	
	Sol kolon	3	5	8	
	Sigmoid kolon	4	12	16	
	Rektum	5	5	10	
Tümör yerleşim yeri	Proksimal	12	4	16	0,017
	Distal	7	17	24	
	Rektum	5	5	10	
Histolojik grade	Low-düşük grade	13	23	36	0,018
	High-yüksek grade	8	3	11	
	Müsinöz	3	0	3	
Lenf Nodu	N0	12	18	30	0,330
	N1	6	5	11	
	N2	6	3	9	
TNM	EVRE 2	11	18	29	0,208
	EVRE 3	10	7	17	
	EVRE 4	3	1	4	
L.V invazyon	+	9	5	14	0,151
	-	15	21	36	
P.N invazyon	+	4	2	6	0,329
	-	20	24	44	

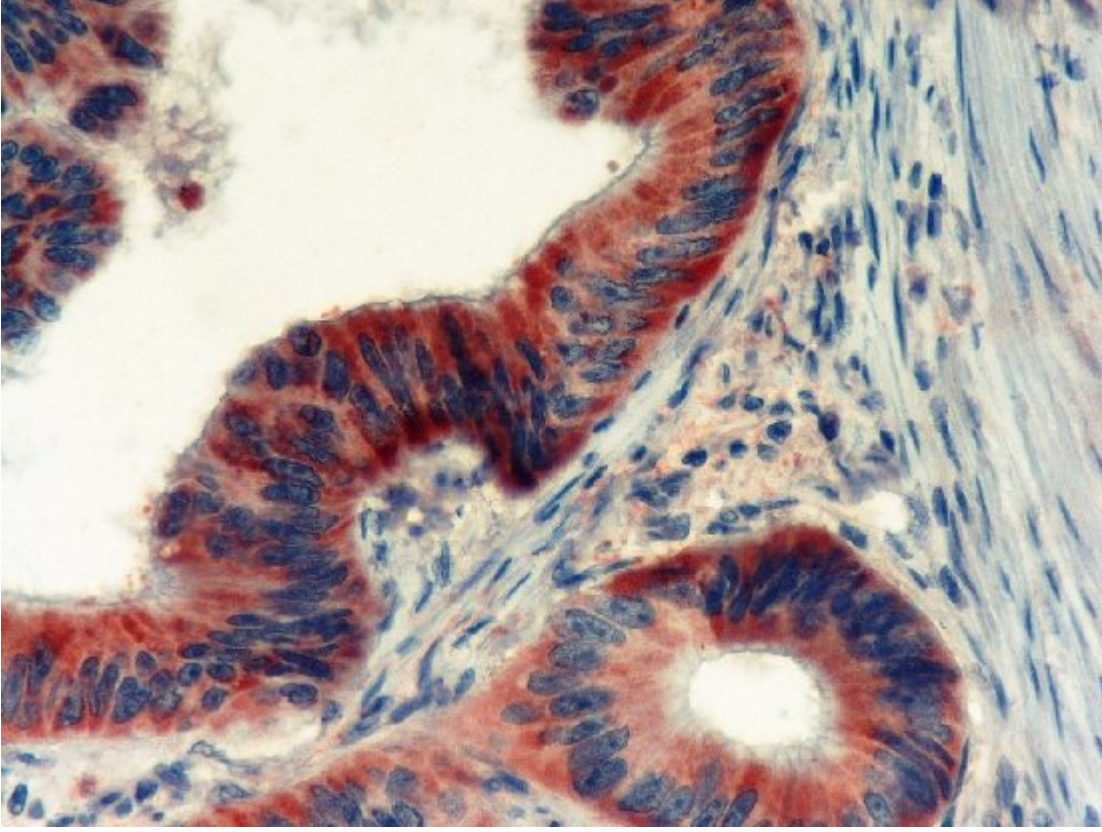
Tablo 12: LC3C ekspresyonunun klinikopatolojik verilerle karşılaştırılması



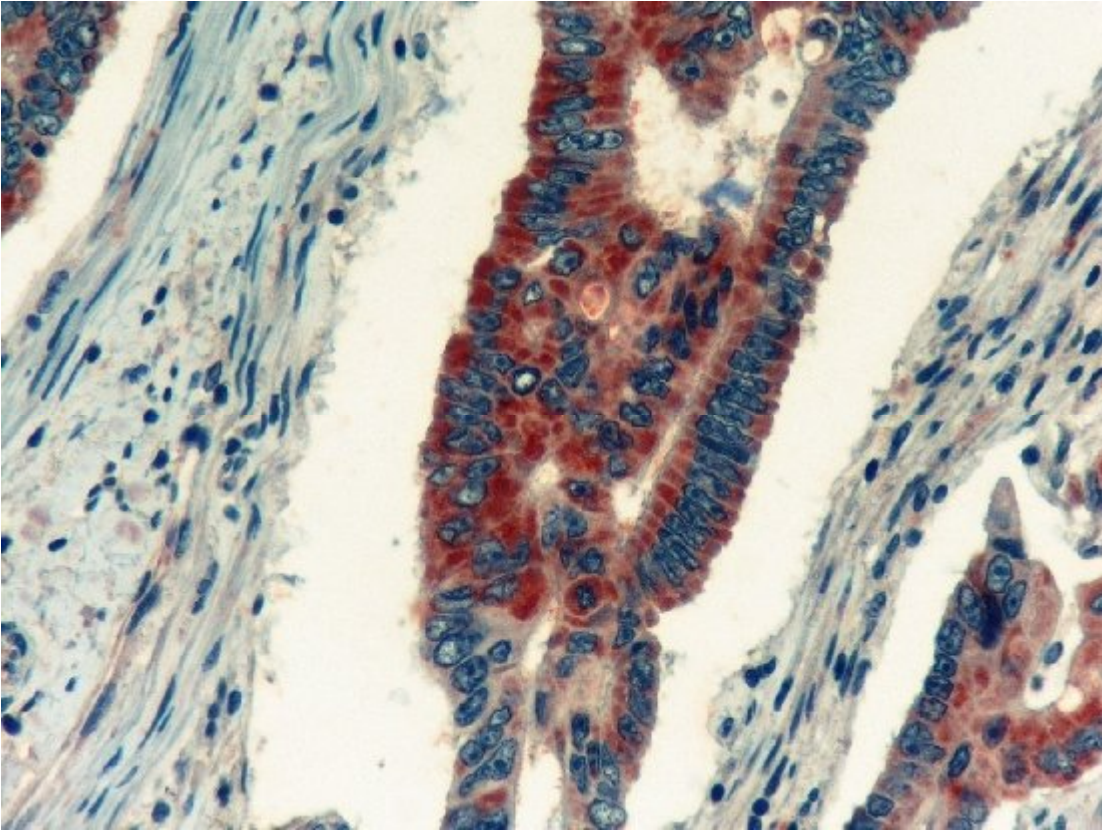
Resim 7: Yüksek LC3C ekspresyonu izlenen tümöral alanlar (100x stoplazmik boyanma paterni)



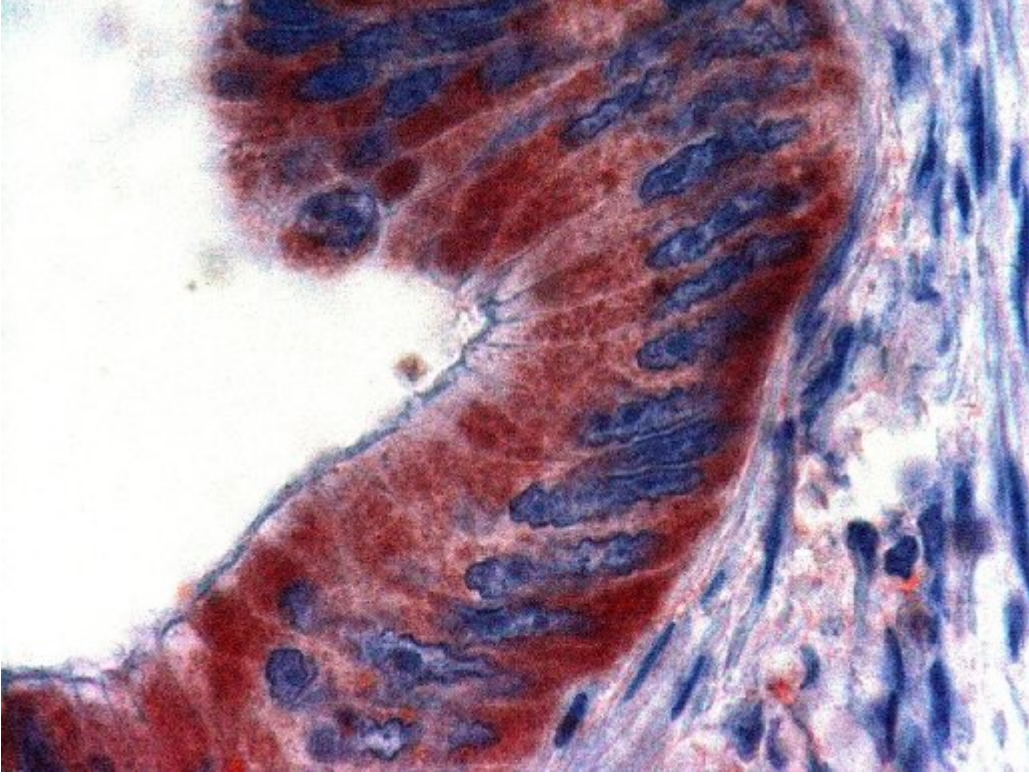
Resim 8: LC3C stoplazmik boyanma paterni (200x)



Resim 9:LC3C stoplazmik noktasal (dot-like) patern boyanma (400x)

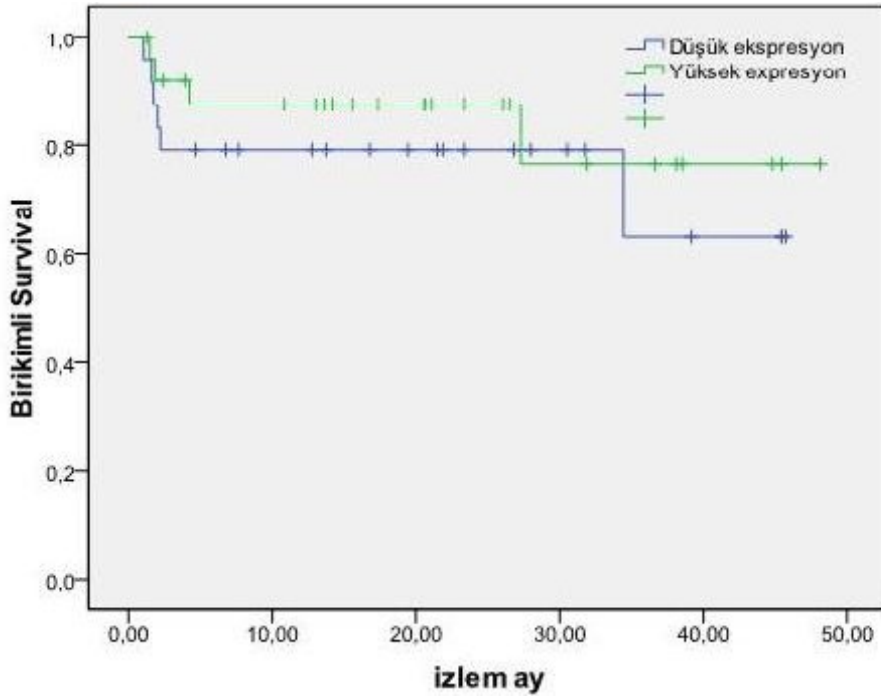


Resim 10: LC3C stoplazmik noktasal (dot-like) patern boyanma (400x)



Resim11: LC3C ile stoplazmik noktasal (dot-like) patern boyanma (1000x)

LC3C ekspresyonunun sağlalım ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunamakta beraber (Log Rank(mantel-Cox) $p=0,434$) yüksek LC3C ekspresyonu gösteren grup düşük ekspresyon gösteren gruptan daha iyi prognoza sahip görünmektedir (şekil 6)



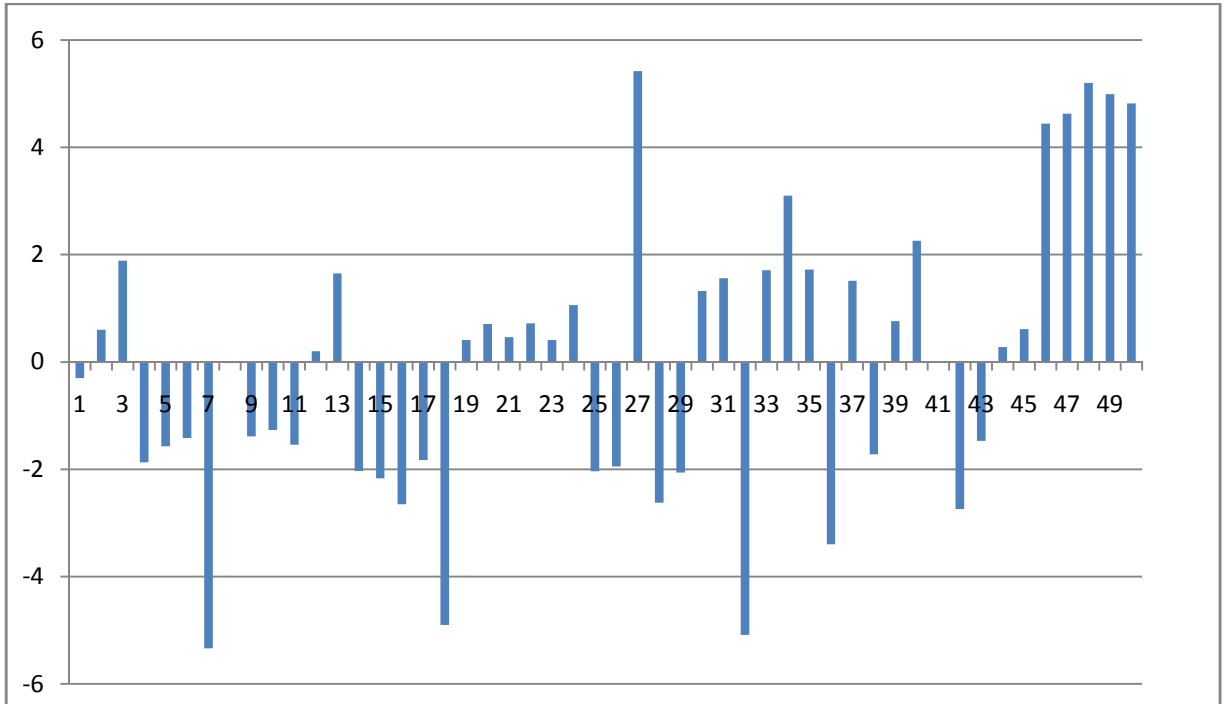
şekil 6:LC3C ekspresyonunun sağkalımla ilişkisi

4.3. miRNA BULGULARI

50 KRK'lı hastanın tümörlü ve tümörsüz kolon dokularında 6 adet miRNA (miRNA302a, miRNA302b, miRNA520a-3p, miRNA520b, miRNA520d-3p, miRNA520e) Biomark Real Time PCR ile analiz edildi. Analiz sonucunda cihazın tümörlü ve tümörsüz dokular için verdiği ct değerleri oranlanarak fold change değerleri hesaplandı. Bu oran, analiz edilen miRNA'nın hastaya ait tümörlü ve tümörsüz dokular arasındaki oransal farkını göstermektedir.

4.3.1. miR302a

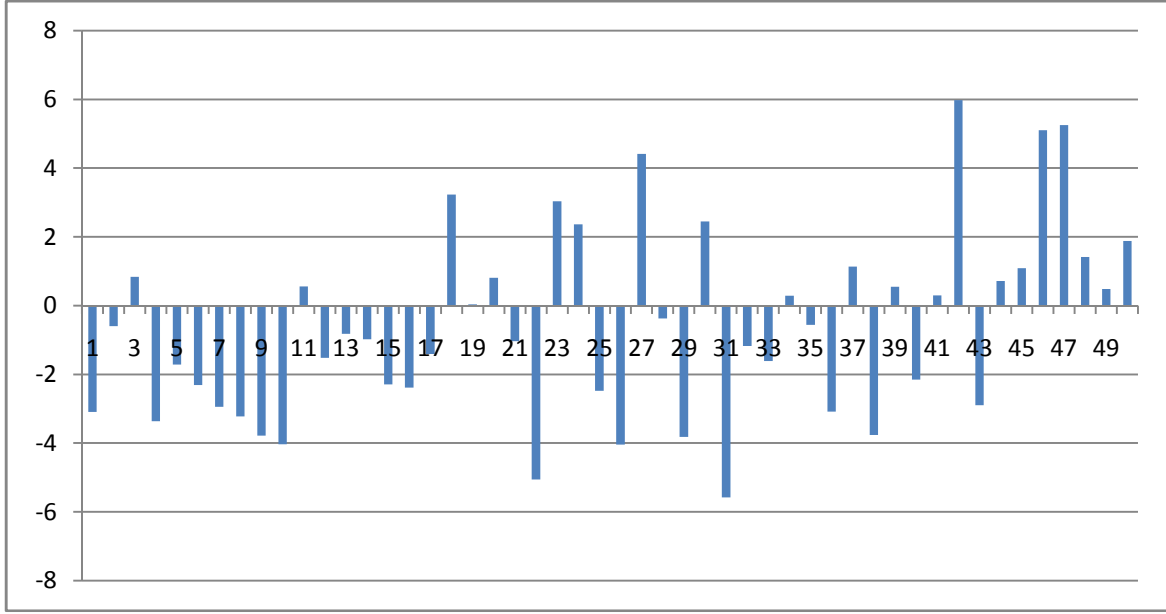
50 vakanın miRNA302a fold change değerleri 0,02 - 42,81 arasındadır. Bu değerler Log2 tabanına çevrildiğinde 24 tanesinde (%48) miRNA302a ekspresyonunun azaldığı, 26 tanesinde (%52) miRNA302a ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Tablo13).



Tablo 13: KRK'lı vakaların tümörlü ve tümörsüz dokuları arasında miRNA302a ekspresyonundaki değişimin grafiksel gösterimi (Log2fold change)

4.3.2. miR302b

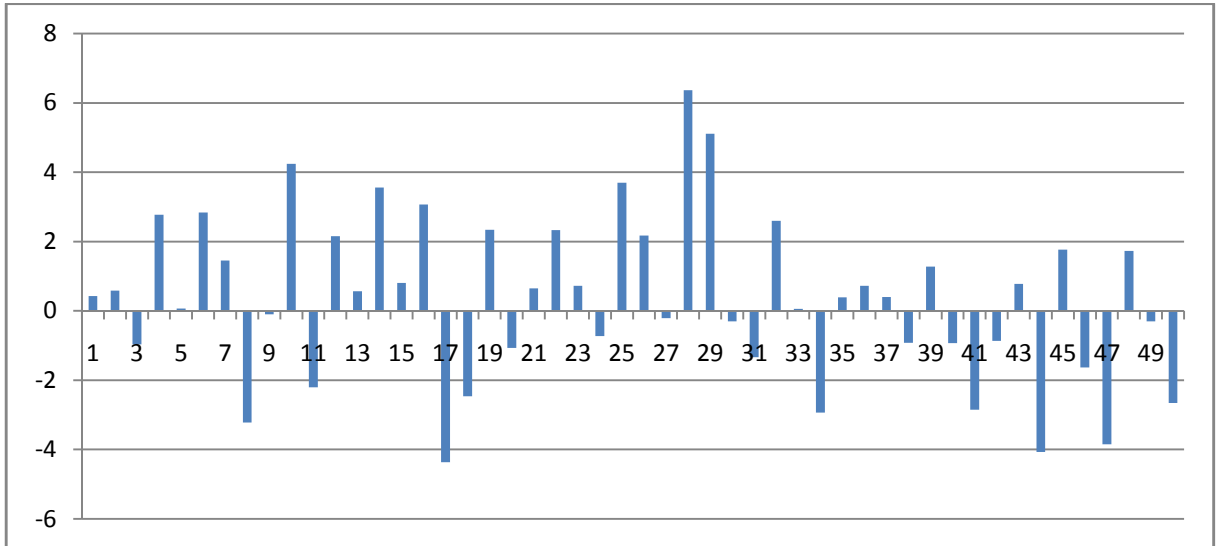
50 vakanın miRNA302b fold change değerleri 0,02 – 63,1 arasındadır. Bu değerler Log2 tabanına çevrildiğinde 23 tanesinde (%46) miRNA302a ekspresyonunun azaldığı, 27 tanesinde (%54) miRNA302a ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Tablo14).



Tablo 14: KRK'lı vakaların tümürlü ve tümörsüz dokuları arasında miRNA302b ekspresyonundaki değişimin grafiksel gösterimi (Log2fold change)

4.3.3. miR520a-3p

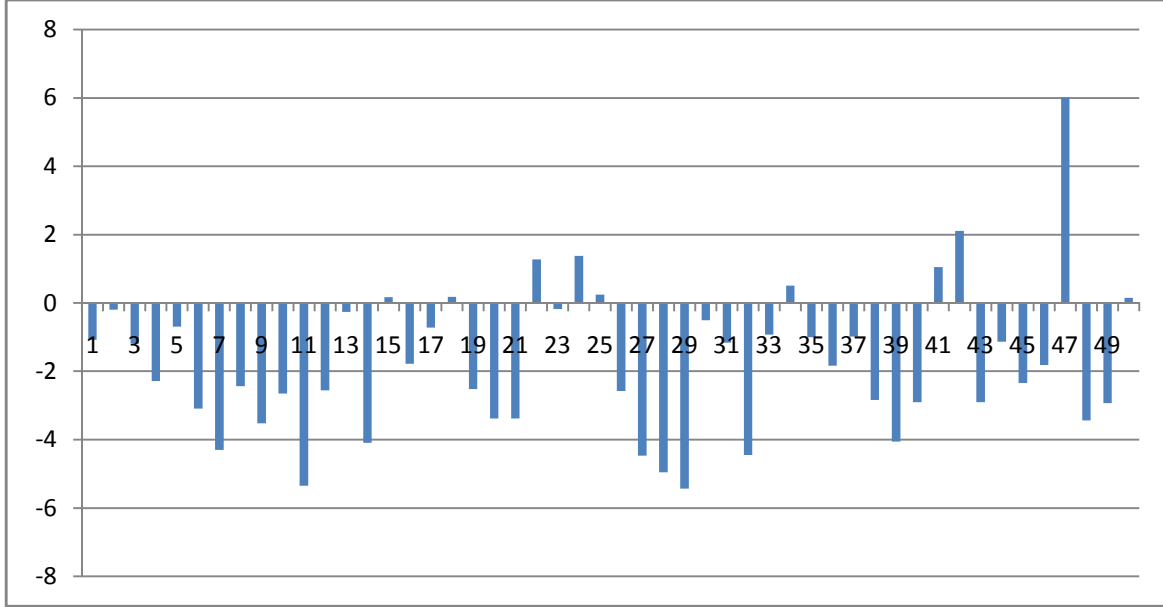
50 vakanın miRNA302b fold change değerleri 0,05 – 82.71 arasındadır. Bu değerler Log2 tabanına çevrildiğinde 21 tanesinde (%42) miRNA302a ekspresyonunun azaldığı, 29 tanesinde (%58) miRNA302a ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Tablo 15).



Tablo 15: KRK'lı vakaların tümürlü ve tümörsüz dokuları arasında miRNA520a-3p ekspresyonundaki değişimin grafiksel gösterimi (Log2fold change)

4.3.4. miR520b

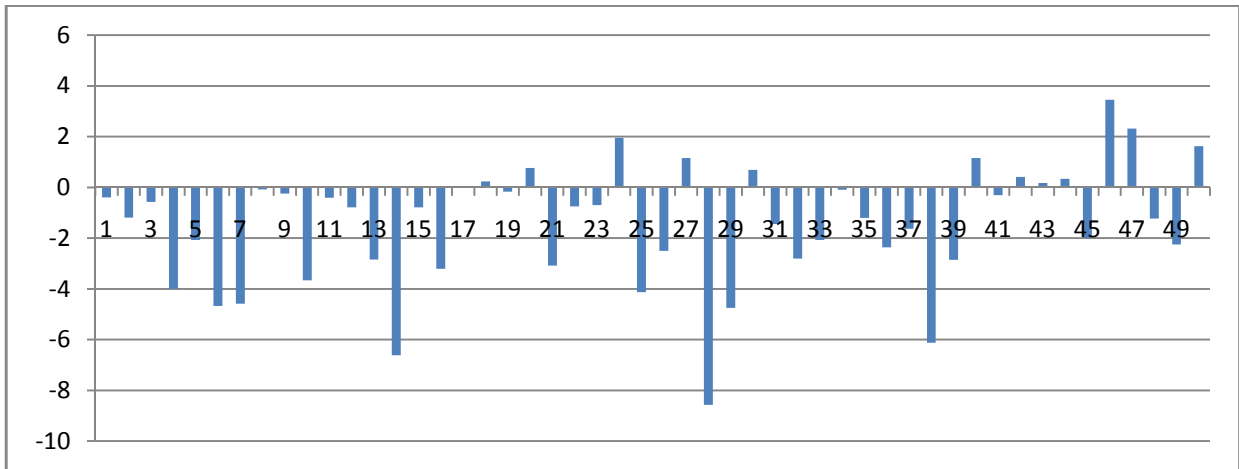
50 vakanın miRNA302b fold change değerleri 0,02 – 64,45 arasındadır. Bu değerler Log2 tabanına çevrildiğinde 40 tanesinde (%80) miRNA302a ekspresyonunun azaldığı, 10 tanesinde (%20) miRNA302a ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Tablo 16).



Tablo 16: KRK'lı vakaların tümürlü ve tümörsüz dokuları arasında miRNA520b ekspresyonundaki değişimin grafiksel gösterimi (Log2fold change)

4.3.5. miR520d-3p

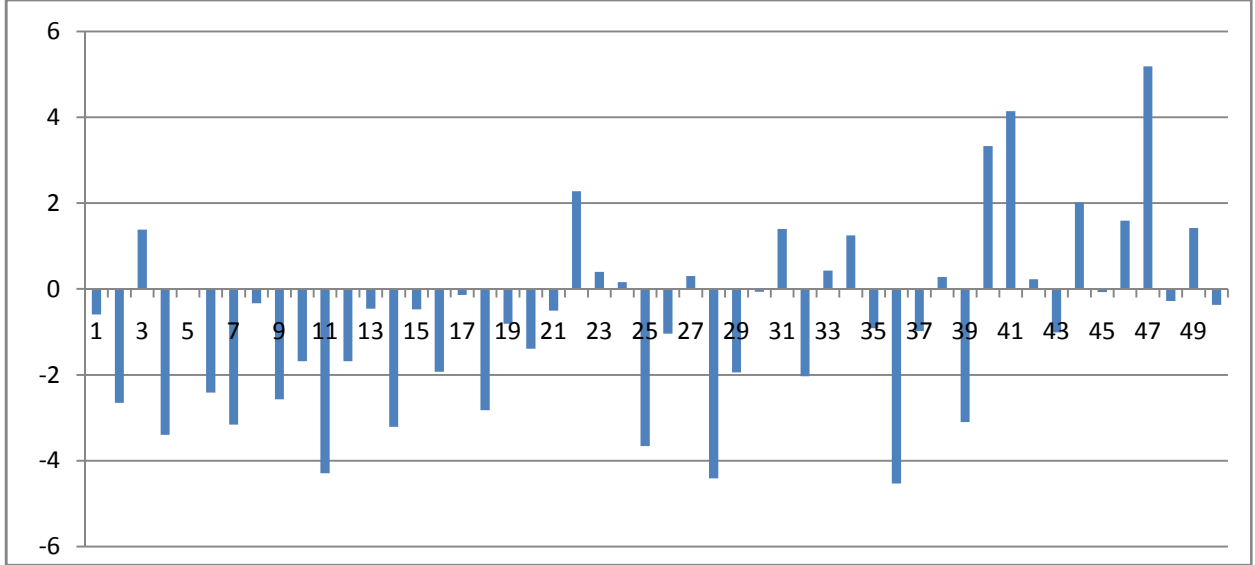
50 vakanın miRNA520d-3p fold change değerleri 0,001 – 10,93 arasındadır. Bu değerler Log2 tabanına çevrildiğinde 35 tanesinde (%70) miRNA302a ekspresyonunun azaldığı, 15 tanesinde (%30) miRNA302a ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Tablo 17).



Tablo 17: KRK'lı vakaların tümürlü ve tümörsüz dokuları arasında miRNA520d-3p ekspresyonundaki değişimin grafiksel gösterimi (Log2fold change)

4.3.6. miR520e

50 vakanın miRNA52 fold change değerleri 0,001 – 10,93 arasındadır. Bu değerler Log2 tabanına çevrildiğinde 34 tanesinde (%68) miRNA302a ekspresyonunun azaldığı, 16 tanesinde (%32) miRNA302a ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Tablo18).



Tablo 18: KRK'lı vakaların tümürlü ve tümörsüz dokuları arasında miRNA520e ekspresyonundaki değişimin grafiksel gösterimi (Log2fold change)

Log2 fold change değerleri istatistiksel olarak tek örnek T testi ile analiz edildiğinde miRNA520b (mean FC=-1,7±0,30 SEM) , miRNA520d-3p (mean FC=-1,46±0,33 SEM) ve miRNA520e (mean FC=-0,66±0,29 SEM)'de anlamlı ekspresyon kaybı izlendi (Tablo 19).

One-Sample Test

	Test Value = 0					
					95% Confidence Interval of the Difference	
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Lower	Upper
miRNA302a	,056	49	,956	,02080	-,7256	,7672
miRNA302b	-1,560	49	,125	-,60200	-1,3773	,1733
mirna520a-3p	1,054	49	,297	,35360	-,3209	1,0281
miRNA520b	-5,603	49	,000	-1,70540	-2,3171	-1,0937
miRNA520d-3p	-4,365	49	,000	-1,46000	-2,1321	-,7879
miRNA520e	-2,214	49	,031	-,66180	-1,2624	-,0612

Tablo19:Artmış ve azalmış miRNA ekspresyon ortalamalarının istatistiksel olarak karşılaştırılması

Mann-Whitney U testi ile low-düşük ve high-yüksek grade kolorektal karsinomlu hasta grupları arasında miRNA fold change dağılımında anlamlı fark bulunamadı (Tablo 20).

	miRNA302a- 3p	miRNA302b	miRNA520a- 3p	miRNA520b	miRNA520d- 3p	miRNA520e
Mann-Whitney U	186,500	123,000	152,000	137,500	188,000	187,000
Wilcoxon W	252,500	189,000	818,000	203,500	254,000	253,000
Z	-,289	-1,884	-1,156	-1,520	-,251	-,276
Asymp. Sig. (2-tailed)	,773	,060	,248	,128	,802	,782
Exact Sig. (2*(1-tailed Sig.))	,776 ^a	,061 ^a	,257 ^a	,130 ^a	,814 ^a	,795 ^a
a. Not corrected for ties.						
b. Grouping Variable: CAP HİSTOLOJİK GRADE						

Tablo 20: Histolojik grade ve miRNA fold change değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması

Mann-Whitney U testi ile TNM evre 2 ve evre 3 kolorektal karsinomlu hasta grupları arasında miRNA fold change dağılımında anlamlı fark bulunamadı (Tablo 21)

Test Statistics ^a						
	miRNA302a- 3p	miRNA302b	miRNA520a- 3p	miRNA520b	miRNA520d- 3p	miRNA520e
Mann-Whitney U	192,000	194,000	190,000	220,500	201,500	215,500
Wilcoxon W	627,000	347,000	343,000	655,500	636,500	650,500
Z	-1,240	-1,195	-1,286	-,592	-1,024	-,705
Asymp. Sig. (2-tailed)	,215	,232	,199	,554	,306	,481
a. Grouping Variable: TNM EVRE						

Tablo 21: TNM Evre ve miRNA fold change değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması

Mann-Whitney U testi ile düşük ve yüksek LC3C ekspresyonu gösteren gruplar arasında miRNA fold change dağılımında anlamlı fark bulunamadı (Tablo 22).

Test Statistics ^a						
	miRNA302a	miRNA302b	miRNA520a-3p	miRNA520b	miRNA520d-3p	miRNA520e
Mann-Whitney U	256,000	260,000	282,000	271,500	294,000	253,500
Wilcoxon W	607,000	560,000	582,000	571,500	645,000	604,500
Z	-1,087	-1,010	-,583	-,786	-,350	-1,136
Asymp. Sig. (2-tailed)	,277	,313	,560	,432	,727	,256
a. Grouping Variable: lc3 boyanma yoğunluğu						

Tablo 22: LC3C Ekspresyonu ve miRNA fold change değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması

Mann-Whitney U testi ile kolorektal karsinomlu kadın ve erkek hasta grupları arasında miRNA fold change dağılımında anlamlı fark bulunamadı (Tablo 23).

Test Statistics ^a						
	miRNA302a	miRNA302b	miRNA520a	miRNA520b	miRNA520d	miRNA520e
Mann-Whitney U	289,500	260,000	243,000	278,500	261,000	260,000
Wilcoxon W	754,500	725,000	453,000	488,500	726,000	725,000
Z	-,208	-,792	-1,129	-,426	-,772	-,792
Asymp. Sig. (2-tailed)	,835	,428	,259	,670	,440	,428

a. Grouping Variable: hasta cinsiyeti

Tablo23: Hasta cinsiyeti ve miRNA fold change değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması

Mann-Whitney U testi ile ≥ 65 yaş ve < 65 yaş hasta grupları arasında miRNA fold change dağılımında anlamlı fark bulunamadı (Tablo 24).

Test Statistics ^a						
	miRNA302a	miRNA302b	miRNA520a	miRNA520b	miRNA520d	miRNA520e
Mann-Whitney U	242,000	306,000	273,500	266,000	306,000	302,500
Wilcoxon W	518,000	582,000	651,500	542,000	684,000	578,500
Z	-1,333	-,088	-,720	-,866	-,088	-,156
Asymp. Sig. (2-tailed)	,182	,930	,471	,386	,930	,876

a. Grouping Variable: tanı yaşı

Tablo 24: Hasta yaşı ve miRNA fold change değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması

Mann-Whitney U testi ile kolorektal karsinomlu tümör boyutu ≥ 4 cm ve < 4 cm olan gruplar arasında miRNA520b fold change dağılımında anlamlı fark bulunurken diğer miRNA'ların fold change dağılımında anlamlı fark bulunamadı (Tablo 25).

Test Statistics ^a						
	miRNA302a	miRNA302b	miRNA520a	miRNA520b	miRNA520d	miRNA520e
Mann-Whitney U	224,500	238,000	225,500	149,000	241,500	239,000
Wilcoxon W	854,500	868,000	345,500	779,000	871,500	869,000
Z	-,804	-,519	-,783	-2,403	-,445	-,498
Asymp. Sig. (2-tailed)	,421	,604	,433	,016	,657	,619

a. Grouping Variable: tümör çapı

Tablo25: Tümör çapı ve miRNA fold change değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması

Mann-Whitney U testi ile lenf nodu metastazı olan ve olmayan hasta grupları arasında miRNA fold change dağılımında anlamlı fark bulunamadı (Tablo 26).

Test Statistics ^a						
	miRNA302a	miRNA302b	miRNA520a	miRNA520b	miRNA520d	miRNA520e
Mann-Whitney U	253,000	230,000	242,500	283,500	258,500	268,500
Wilcoxon W	718,000	440,000	452,500	748,500	723,500	733,500
Z	-,931	-1,386	-1,139	-,327	-,822	-,624
Asymp. Sig. (2-tailed)	,352	,166	,255	,744	,411	,533

a. Grouping Variable: lenf nodu metastazi

Tablo 26: Lenf Nodu Metastazı ve miRNA fold change değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması

Yapılan Cox regresyon testi ile miRNA Log2 fold change değerleri ile sağkalım arasında ilişki saptanamadı ($p>0,05$) (Tablo 27).

Cox Regresyon Sağkalım Analizi

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)
miRNA302a	-,154	,167	,851	1	,356	,857
miRNA302b	,349	,185	3,568	1	,059	1,418
miRNA520a	-,368	,237	2,415	1	,120	,692
miRNA520b	-,055	,187	,087	1	,768	,946
miRNA520d	-,067	,279	,057	1	,811	,935
miRNA520e	-,163	,262	,388	1	,533	,849

Tablo 27: miRNA Log2 fold change değerleri ile sağkalım arasında ilişki

5.TARTIŞMA

KRK tüm dünyada 3. en sık görülen kanserlerdir. 2008 yılı verilerine göre dünya genelinde 1.24 milyon kişi KRK tanısı almıştır ve tüm kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. KRK, kanserden ölümlerde de dünya genelinde 4. sıradadır. 2008 yılı verilerine göre dünya genelinde yaklaşık 610,000 ölümden sorumludur. Türkiye'de 2008 yılı verilerine göre kadınlarda 3. en sık (insidans 13,5/100000), erkeklerde 4. en sık (insidans 20,8/100000) görülen kanserlerdir. Erken teşhis edildiğinde sağkalım yüksektir. 5 yıllık sağkalım erken evrelerde %90'a yaklaşmaktadır. Ancak ileri evre ve metastatik olgularda prognoz hala kötüdür.

KRK erkeklerde daha fazla görülmektedir (179, 180). Asaad ve arkadaşları (181) tarafından evre II kolon kanserli 174 hasta ile yapılan bir çalışmada erkek cinsiyetin kötü prognostik faktör olduğu bildirilmiştir. Yapılan birçok çalışmada her iki cinsiyet arasında prognostik açıdan istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmamıştır (182, 183). Bizim çalışmamızda da 50 olgunun 30 tanesi erkek, 20 tanesi kadın hastadır. Cinsiyet ile sağkalım arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (p=0,037). Kadın cinsiyetin prognoza olumlu etkisi görülmüştür.

KRK'lar yaşla birlikte artmaktadır (184). Predizpozan faktörler dışında 40 yaş altında nadirdir. KRK'ların en sık görülme yaşı 60-65'tir ve ortalama tanı yaşı 62'dir (185). Çalışmamızda değerlendirilmeye alınan 50 olgunun ortalama yaşı 63'tür. En genç hasta 26, en yaşlı hasta ise 86 yaşındadır. Benzer çalışmalardaki gibi pik yaşı 60-69 yaş arasındadır. 65 yaş sınır alındığında, <65 yaş grupta 23 (%46) hasta vardır, 9 tanesi kadın, 14 tanesi ise erkektir. ≥65 yaş üstü grupta ise 27 (%54) vakanın 16 tanesi erkek, 11 tanesi kadındır.

Tümör lokalizasyonunun prognoz üzerine etkisi ile ilgili farklı yorumlar vardır. Michelassi ve arkadaşları tarafından inen kolon, sigmoid kolon ve rektumda rekürrens daha fazla olduğu iddia edilirken, başka bir çalışmada ise sigmoid kolon ve rektum yerleşimli tümörlerde sağ kalımın kötü olduğu gösterilmiştir (186, 187). Bizim çalışmamızda lokalizasyon ile sağ kalım arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Lokalizasyona göre değerlendirildiğinde, en sık tutulum sigmoid kolonda izlenmektedir. Rektum ve çekum sırasıyla bunu takip etmektedir.

Tümör çapı ile prognoz arasında belirgin bir ilişki olmadığı kabul edilmekle birlikte tümör çapı ile prognoz arasında ilişki olduğunu belirten araştırmalar da vardır (185, 188, 189). Park ve arkadaşları (182) tarafından 2230 hastada yapılan çalışmada tümör çapı prognozla ilişkisiz

bulunmuştur. Bizim serimizde vakaların %70 \geq 4 cm, %30'u <4cm'dir. Tümör çapı ile histolojik grade arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkili bulunurken (p=0,048), yaş, cinsiyet, lenfovasküler invazyon, lenf nodu metastazı, evre ve sağ kalım arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0,951, p=0,208, p=0,409, p=0,579, p=0,655, p=0,147).

KRK histolojik gradelemesinde son birkaç dekatta pek çok sistem geliştirilmiştir. Ancak bu sistemlerin birçoğu subjektif olduğundan dolayı kabul görmemiştir. Eski çalışmalar KRK'yı 4 histolojik gruba (iyi/orta/az/andiferansiye) ayırmayı önerse de, yeni pek çok prognostik değerlendirme çalışması iyi ve orta'nın (grade 1 ve 2) düşük grade, az ve andiferansiye'nin (grade 3 ve 4) yüksek grade olarak birleştirmesi gerektiğini ortaya koymuştur (190). CAP (College of American Pathologists) prognozu göstermede daha üstün olduğu ve gözlemciler arası fark daha aza indiği için ikili gradeleme sistemini önermektedir (191). Histolojik gradeleme sadece adenokarsinomlar için uygulanırken diğer kolorektal karsinom tiplerinde gradeleme yapılmamaktadır (190). Çalışmamızda 2'li gradeleme sistemini kullandık. 47 adenokarsinom olgusundan 36 olgu düşük, 11 olgu yüksek grade olarak değerlendirildi. Histolojik grade, klinikopatolojik veriler ile karşılaştırıldığında; cinsiyet (p=0,535), yaş (p=0,759), lenfovasküler invazyon (p=0,259) ve perinöral invazyon (p=0,210) ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmezken; TNM Evre (p=0,017), tümör çapı (p=0,048) ve lenf nodu metastazı (p=0,044) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmüştür.

Vasküler invazyon varlığı önemli bir prognostik faktördür (94,192). Burton ile arkadaşları (193) tarafından yapılan çalışmada damar invazyonu varlığı 5 yıllık sağ kalım için kötü prognostik faktör olarak bulunmuştur. Talbot ve arkadaşlarının (102) rezeke rektal karsinom vakalarında yaptıkları çalışmada venöz invazyon, lokal invaziv rektal karsinom ile ilişkili bulunmuştur. Enker ve arkadaşları (194) tarafından yapılan 148 vakayı içeren çalışmada da damar invazyonu varlığının lokal rekürrens için risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda 14 vakada lenfovasküler invazyon izlenirken, vasküler invazyon ile klinikopatolojik bulgular ve sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır.

Perinöral invazyon insidansı özellikle ileri evre hastalarda çok yüksektir ve azalmış sağkalım ile birlikte (94, 192). Shirouzu ve arkadaşlarının (103) yaptığı 373 vakalık çalışmada Evre 3 perinöral invazyon olan ve olmayan vakalar lokal rekürrens ve 8 yıllık sağ kalıma göre

kıyaslanmıştır ve perinöral invazyon olan vakalarda lokal rekürrens ile 8 yıllık sağ kalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur. Perinöral invazyon varlığı diğer kötü prognostik bulgularla birlikte olma eğilimindedir. Bizim çalışmamızda 6 hastada perinöral invazyon izlenmiş olup klinikopatolojik veriler ve sağkalım ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır.

Pek çok çalışmada lenf nodu metastazı kötü prognostik faktör olarak bulunmuş ve tutulan lenf nodu sayısının prognozu etkileyen önemli faktörlerden biri olduğu belirtilmiştir (93, 195). Çalışmamızda lenf nodu tutulumu açısından 11 vakanın N1, 9 vakanın N2 olduğu gözlenmiştir. Lenf nodu tutulumunun histolojik grade ($p=0,044$) ve sağkalımla ($p=0,020$) istatistiksel olarak anlamlı ilişkisi bulunmuştur.

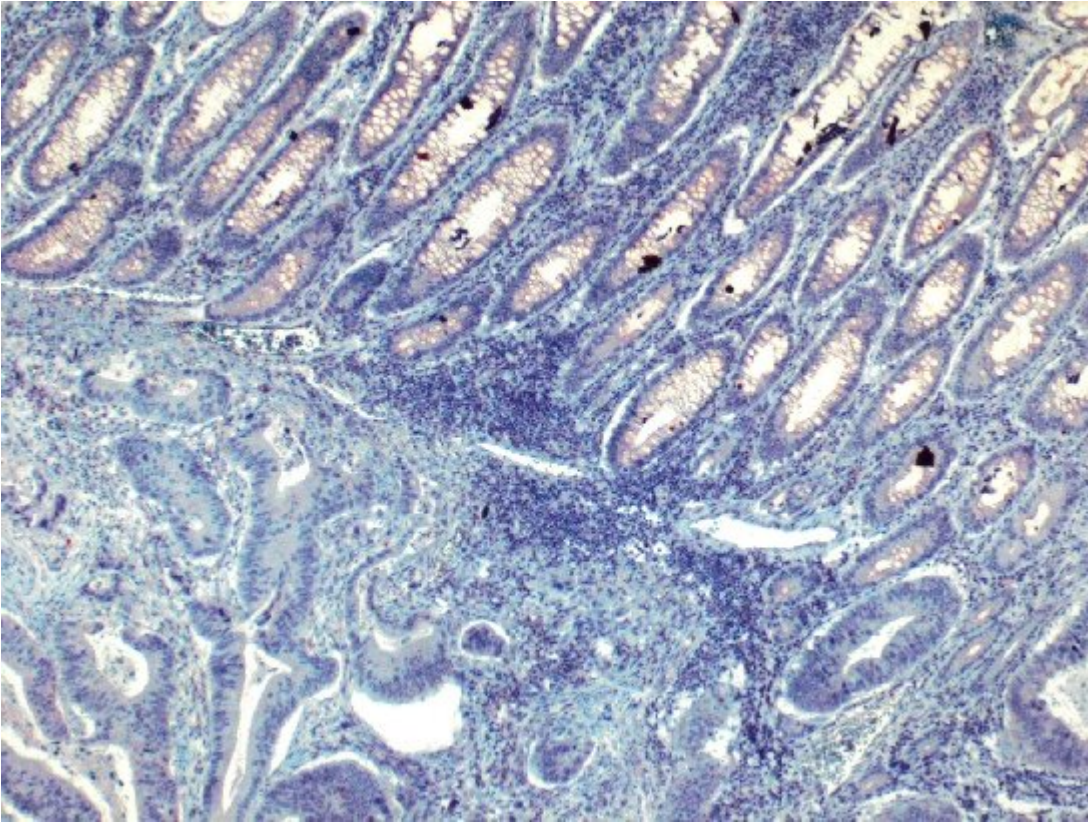
Çalışma grubumuz, lokal ileri evre olarak da tanımlanan T3/T4 (lenf nodu tutulumu olsun yada olmasın) ve Evre 2/3/4 kolorektal karsinomlu hastalardan oluşmaktadır. İster evre 2/3/4 olsun ister lokal ileri evre tümörler olsun -artan lokal rekürrens ve nüks riskinden dolayı- hastaların tedavisine (cerrahi tedavi ile birlikte) kemoterapi ve radyoterapi eklenmektedir. Bu hasta grubunda özellikle yeni kemoterapötik ajanlar ve kemoterapinin etkinliğini artıracak modeller yoğun olarak araştırılmaktadır. KRK'de otofaji inhibitörlerinin kemoterapi protokollerine eklenmesi ile ilgili in vivo ve in vitro prelinik çalışmalar yürütülmektedir. Bu çalışmalarda otofaji inhibitörü olarak antimalaryal ilaçlar (klorokin ,hidroksiklorokin) kemoteropatiklerle kombine edilmektedir. Vorinostat ile klorokin kombine tedavisinin tümör yükünü azaltıp, tümör hücrelerinde apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (196). 3-metiadenin ile otofaji inhibisyonu, 5-FU ile tümör hücrelerinde apoptozu arttırmış ve tümör küçülmesi sağlanmıştır (146). Benzer çalışmalar otofaji inhibitörlerinin kemoterapi ilaçlarının etkinliğini arttırıp, ilaç direncini azalttığını göstermiştir.

Otofaji; hücre komponentlerinin, degrade olmuş organellerin, tekrar kazanımını sağlayan hücre içi yıkım sürecidir. Böylece hücre için değerli materyaller kaybedilmemiş olur ve hayati yapı maddeleri hücredeki gereksiz veya eskimiş komponentlerden sağlanır (197). Otofaji sürecinde stoplazmik içerik otofagozom denen çift-katlı membran içerisine alınır. Otofagozom lizozomla birleşir ve içerik degrade edilir (198). Otofaji aynı zamanda bir enerji kazanım yoludur. Açlık, adaptasyon gibi stres durumlarında enerji ihtiyacını karşılamak için otofaji aktive olur ve hücreler kendi komponentlerini yıkarlar (199). Pek çok proteinin görev aldığı otofaji yolağında 'microtubule associated protein 1 light chain 3 (LC3)' anahtar öneme

sahip proteinlerden biridir. LC3-I stoplazmada bulunurken, LC3-II otofagozomlarda bulunmaktadır (200). Otofaji yoloğı aktive olduğunda LC3-I, LC3-II'ye dönüşür (164). Otofajinin kanser gelişiminde rol aldığına dair kanıtlar artmaktadır. Ama bu rolün kanser baskılayıcı etkisine mi yoksa tümörün stres faktörlere karşı direncine mi olduğu henüz netleşmemiştir (201-203).

Yoshiako ve ark. çalışmasında, normal kolon mukozasında bazal seviyede otofaji olduğu kabul edilmiş ancak bunun immünohistokimyasal olarak tesbit edilemediği belirtilmiştir (204).

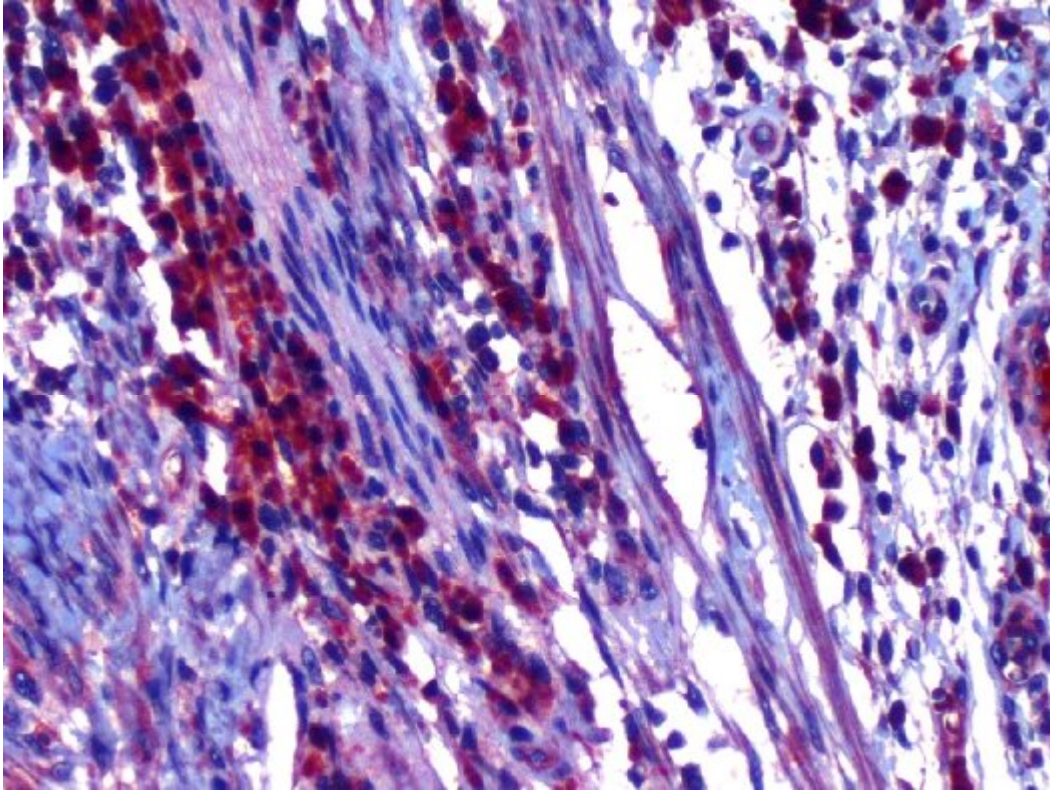
Çalışmamızda kanserli hücrelerin yanı sıra bazı vakalarda normal kolon epitelinde de LC3C ile hafif stoplazmik boyanma izlendi (Resim 12). Groulx ve ark. normal kolon mukozasında western-blot yöntemi ile LC3, SQSTM1 ve BECN1'i değerlendirmiş özellikle proliferatif ve progenitör hücrelerde otofaji aktivitesi olduğunu göstermiştir (205).



Resim 12: Olguda normal kolon mukozasında LC3C zayıf boyanma izlenirken tümör hücrelerinde boyanma izlenmedi

Tümör hücrelerinde LC3 ile immünohistokimyasal boyama için literatürde stoplazmik, granüler, vakuoler-veziküler (dot-like) boyanma paternleri tanımlanmıştır (204). Çalışmamızda da stoplazmik, noktasal-veziküler (dot-like) paternde boyanma izlendi.

Bazı çalışmalarda LC3 ile mononükleer hücrelerde güçlü pozitiflik belirtilmiştir (204) Bizde slaytlarda LC3C ile özellikle plazma hücrelerinde, güçlü stoplazmik boyanma izledik (Resim 13). Bu hücreler LC3 ile immünohistokimyasal boyama için pozitif kontrol olarak yararlı olabilir. Plazma hücrelerinin gelişimi ve biyolojik fonksiyonları için otofajinin önemi vurgulanmıştır (206, 207). KRK'larda LC3 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak değerlendirildiği çalışmalarda birbirinden farklı oranlar saptanmıştır. Örneğin Yoshiako ve ark. %63, Park ve ark. %85, Shintani ve ark.%35 oranında yüksek LC3 ekspresyonu bildirmişlerdir. (204, 208, 209). Bizim çalışmamızda kolorektal karsinomda “yüksek LC3C ekspresyonu” oranı %52'dir.



Resim 13: Plazma hücrelerinde kuvvetli LC3C ekspresyonu

Bu çalışmalarda yüksek LC3 ekspresyonu ile klinikopatolojik veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (204, 208, 209). Ama bizim çalışmamızda tümör çapı (p değeri=0,009), CAP histolojik grade (p değeri=0,018) ve tümör yerleşim yeri (p değeri=0,029) ile yüksek LC3C ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Her üç çalışmada tümör boyutu ile LC3C ilişkisinin değerlendirildiğine dair bilgi mevcut değildir. Çalışmamızda 4cm'den küçük 15 tümörün 12'sinde yüksek LC3C ekspresyonu saptanırken

4cm ve daha büyük 35 tümörün 14'ünde yüksek LC3C ekspresyonu saptanmıştır. Histolojik gradele karşılaştırıldığında 36 düşük-low grade olgunun 23'ünde yüksek LC3C ekspresyonu izlenirken, yüksek-high grade 11 tümörün 3'ünde yüksek LC3C ekspresyonu izlendi. Bu bulgulara göre düşük çaplı ve düşük gradeli tümörlerde LC3C overekspresyonu izlenmiştir. Tang ve ark. oral SCC' de yüksek LC3 ekspresyonunu kötü prognostik faktör olarak tanımlarken, Deng ve ark. renal berrak hücreli tümörde yüksek LC3 ekspresyonunu iyi prognozla ilişkilendirmiştir (210, 211). Sakurai t. ve ark. özefageal karsinomda yüksek LC3 ekspresyonunu iyi prognostik faktör olarak tanımlamaktadır (212). İlginç olarak çalışmamızda KRK yerleşim yeri ile yüksek LC3C ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Proksimal kolon yerleşimli 16 olgunun 4'ünde ve distal kolon yerleşimli 24 olgunun 17'sinde ve rektum yerleşimli 10 olgunun 5'inde yüksek LC3C ekspresyonu tesbit edilmiştir (p değeri=0,009).

Çalışmamızda sağkalım ile yüksek LC3C ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (Log Rank (mantel-Cox) $p=0,434$). Ancak yüksek LC3C ekspresyonu gösteren grup düşük ekspresyon gösteren gruptan daha iyi prognoza sahip gibi görünmektedir. Diğer kolorektal karsinomda LC3 ekspresyonu çalışmalarında da sağkalımla istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (204, 208, 209).

MiRNA'lar hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. MiRNA'lar kendi nükleotid dizilerine tamamlayıcı hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. MiRNA, RISC ile kompleks oluşturur, baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanır, sonrasında protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA'nın yıkımına neden olur (213). MiRNA'ların hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte etkili anahtar moleküller oldukları bilinmektedir. Kanser miRNA ilişkisi ilk olarak KLL hastalarında yapılan moleküler çalışmalarla ortaya çıkmıştır. KLL hastalarının yaklaşık %50'sinde 13q14 bölgesi delesyona uğramaktadır. Detaylı delesyon analizleri sonucunda bu bölgede yalnızca mir-15-a ve mir-16-1 genlerinin bulunduğu tespit edildi. Daha sonra KLL hastalarının %68'inde bu miRNAların ekspresyonlarının azaldığı ya da olmadığı ortaya konmuştur (214). Kanser ve normal doku arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi, miRNA'ların kanser patogenezindeki rollerini güçlendirmiştir.

2003 yılında Michael ve arkadaşları, ilk olarak insanlardaki solid tümörlerde (kolonik ve rektal adenom ve karsinomlar) normal dokular ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyeleri değişmiş olan miRNA'ları rapor ettiler (215).

MiRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör süpresör özellik kazanabilir. Tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olurken bazı miRNA'ların (onkojenik) ekspresyonunun artması kanser gelişimini arttırdığı görülmektedir (216). Kolon kanserinde de tümör süpresör yada onkojenik etki gösteren birçok miRNA tanımlanmıştır (176-178) Bu çalışmada; KRK'da otofaji aktivitesini değerlendirmenin yanısıra miR-302a-3p, miR-302b, miR-520a-3p, miR-520b, miR-520d-3p, miR-520e ekspresyonunun otofaji aktivitesi ile ilişkisini araştırmaktı. miR-302a-3p, miR-302b, miR-520a-3p, miR-520a-3p, miR-520b, miR-520d-3p, miR-520e'nin seçilme nedeni otofaji yolağını kontrol eden bazı genlerle (ULK-1/2, ATG-7, UVRAG) muhtemel ilişkisidir.

Olguların tümörlü ve tümörsüz kolon dokuları Real Time PCR ile karşılaştırıldı. miRNA520b (mean FC=-1,7±0,30 SEM) , miRNA520d-3p (mean FC=-1,46±0,33 SEM) ve miRNA520e (mean FC=-0,66±0,29 SEM)'de anlamlı ekspresyon kaybı izlendi. Teorik olarak miRNA ekspresyonunda azalma, otofoji ilişkili genlerin ekspresyonunda artmaya ve sonuçta otofaji aktivitesinde artışa neden olabilir. Ancak olguların miRNA ekspresyon profilleri, klinikopatolojik veriler ve LC3C ekspresyonu Mann-Whitney U testi ile analiz edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki kurulamamıştır. Çalışmamızda miR-520b ekspresyonu ile tümör çapı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (p=0,016).

Wang H. ve ark. çalışmasında fare modelinde embriyonik kök hücre farklılaşmasında, germ cell nükleer faktör (GCMF) ile miR-302a inhibisyonu üzerinden siklinD1 aktivasyonu sağlandığı gösterilmiştir (217). Bu çalışmada miR-302a ile siklinD1 ilişkisi de gösterilmiştir. Çalışmamızda KRK'da miR-302a ekspresyonu ile klinikopatolojik prognostik faktörler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki kurulamadı.

Wang L. ve ark. çalışmasında hepatoselüler karsinom hücrelerinde miR-302b'nin EGFR/AKT2/CCND1 yolağı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada kanser hücrelerinde EGFR'nin miR-302b ile susturulması sonucu AKT2, CCND1 ve CDK2 gibi proliferasyonla ilişkili proteinlerde azalma saptanmıştır (218). Wie W. ve ark. çalışmasında

farelerde karaciğer gelişiminde miR-302b ve miR-20a'nın TGFβ'yı baskıladığı gösterilmiş (219). Çalışmamızda KRK'da miR-302b ekspresyonu ile klinikopatolojik bulgular ve LC3C ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki kurulamadı. Zhang S. ve ark. çalışmasında hepatoma hücrelerinde, miR-520e ile 'NF-κB-inducing kinase' (NIK/p-ERK1/2/NF-κB yolağı) hedeflenerek büyüme baskılanmıştır (220).

Zhang W. ve ark. çalışmasında hepatoma hücrelerinde, miR-520b ile 'MEKK2 ve cyclin D1' hedeflenerek büyüme baskılanmıştır. Bu çalışmada hepatoselüler karsinom gelişiminde miR-520b'nin rolü vurgulanmıştır (221). Aynı ekibin diğer bir çalışmasında miR-520b'nin meme kanseri hücrelerinde hepatitis B X-interacting protein and interleukin-8 yi hedefleyerek migrasyonu düzenlediği gösterilmiştir (222).

Lee YH. Ve ark. sağlıklı ve periodontitli dokularda inflamatuvar miRNA ekspresyonunu kıyaslamış ve miR520d'nin periodontitli dokuda sağlıklı dokuya göre ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (223).

Çalışmamızda, ekspresyonu değişen miRNA'ların biyolojik etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için, KRK'da bu miRNA'ların hedeflediği genlerin ekspresyon profillerinin çıkarılması faydalı olacaktır. Otofaji aktivitesi bağlamında, ULK-1/2, ATG-7 ve UVRAG genleri hedef genler olabilir. Kolorektal karsinomda miR520b, miR520d ve miR520e ekspresyon profilleri ile ULK-1/2, ATG-7 ve UVRAG gen ekspresyon profilleri birlikte değerlendirildiğinde otofaji aktivitesi ve miR520b, miR520d ve miR520e ilişkisi daha iyi anlaşılabilir.

6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda KRK’da; LC3C imünohistokimyasal markırı ile otofaji aktivitesi ve miR-302a-3p, miR-302b, miR-520a-3p, miR-520b, miR-520d-3p, miR-520e ekspresyon profili ve bunların klinikopatolojik verilerle ilişkisi araştırılmıştır.

50 vakanın 26’sında (%52) yüksek LC3C ekspresyonu tanımlanmıştır. LC3C ile tümör çapı, histolojik grade ve tümör yerleşim yeri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. Cinsiyet, yaş, TNM evre, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı ve sağkalım ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Tümörlü kolon dokularında, tümörsüz kolon dokularına oranla miRNA520e, miRNA520d-3p, miRNA520b ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptanırken miR-302a-3p, miR-302b, miR-520a-3p ekspresyonlarındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir. miR-302a-3p, miR-302b, miR-520a-3p, miR-520b, miR-520d-3p, miR-520e ekspresyon profili ile LC3C ekspresyonu, cinsiyet, yaş, histolojik grade, TNM evre, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı ve sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır. miR-520b ekspresyonu ile tümör çapı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunurken miR-302a-3p, miR-302b, miR-520a-3p, miR-520d-3p, miR-520e ile tümör çapı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır.

CAP gradeleme sistemi ile tümör çapı, lenf nodu metastazı ve TNM evreleme arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanırken, cinsiyet, yaş, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ve sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Sağkalım ile cinsiyet ve lenf nodu metastazı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanırken, yaş, tümör çapı, histolojik grade, TNM evreleme, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ve LC3C ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.

KRK’da otofaji aktivitesinin daha iyi anlaşılması özellikle lokal ileri evre tümörlerde yeni kemoterapi protokollerinin oluşturulması açısından önem arz etmektedir.

KRK tanısı ve hedefe yönelik tedavi ajanlarının geliştirilmesi açısından miRNA profilinin çıkarılması önem arz etmektedir. Bu açıdan çalışmamızda miRNA520e, miRNA520d-3p, miRNA520b ekspresyonunda azalmanın gösterilmesi faydalı olabilir.

LC3C plazma hücrelerinde yüksek ekspresyon göstermektedir. Plazma hücreleri doku içerisinde LC3C için pozitif kontrol olabilir.

KRK'da otofaji aktivitesi ve miRNA520e, miRNA520d-3p, miRNA520b ekspresyonunda azalma arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılması için ULK-1/2, UVRAG, ATG-7 gen ekspresyon profilinin çıkarılması yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Dere F. Anatomi ders kitabı. Adana 1990;615-632.
2. Buğra D. Kolon, Rektum, Anal Bölge Anatomisi. Kolorektal Özel Sayısı. Türkiye Klinikleri Journal of Surgery. 2004;9:1-9.
3. Ross H.M, Reith J.E. Histology: A Text and Atlas. 1985; 414-438.
4. Kodner J, Robert DF, James WF. Colon, rectum, anus. İn: Schwartz S, Shires T, Spencer F, Husser CW (Eds.). Principles of Surgery. New York: Mc Graw Hill Co. 1999;p.1265-382.
5. Guyton AC. Fizyoloji ders kitabı. Ankara 1978;Cilt 3:93-154.
6. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. Tumors of the colon and rectum. İn: WHO Classification of Tumors of Digestive System. 4th ed. Lyon. 2010;132-182.
7. de Wijkerslooth TR, Bossuyt PM, Dekker E. Strategies in screening for colon carcinoma. Neth J Med. 2011; 69(3):112-9.
8. Karsa LV, Lignini TA, Patnick J, Lambert R, Sauvaget C. The dimensions of the CRC problem. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2010; 24(4):381-96.
9. Honda T, Kai I, Ohi G: Fat and dietary fiber intake and colon cancer mortality: A chronological comparison between Japan and the United States. Nutr Cancer 1999; 33:95-99.
10. Giovannucci E: An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001; 10:725-731.
11. Giovannucci E: Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: A review. J Nutr 2002; 132(8 Suppl):2350s-2355s.
12. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colonic cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. Cancer 2010; 116:544. .
13. Potter JD (1999). Colorectal cancer: molecules and populations. J Natl Cancer Inst 91: 916-932.
14. Dingley KH, Curtis KD, Nowell S, Felton JS, Lang NP, Turteltaub KW (1999). DNA and protein adduct formation in the colon and blood of humans after exposure to a dietary-relevant dose of 2-amino-1-methyl- 6- phenylimidazo(4,5-b)pyridine. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 8: 507-512.
15. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, Ahren C, Correa P, Hamilton SR, Morson BC, et a (1983). Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. Hum Pathol 14: 931-968.
16. Persson PG, et al (1996). Survival and cause-specific mortality in inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. Gastroenterology 110: 1339-1345.
17. Poe R, Snover DC (1988). Adenomas in glycogen storage disease type 1. Two cases with unusual histologic features. Am J Surg Pathol 12: 477-483.
18. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN (1994). Lcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. Gut 35: 1590-1592.
19. Tsunoda A, Shibusawa M, Kawamura M, Marumori T, Kusano M, Ohta H (1997). Colorectal cancer after pelvic irradiation: case reports. Anticancer Res 17/1B: 729-732.
20. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. Gastroenterology 1999; 116:1453-6.

21. Kim EC, Lance P: Colorectal polyps and their relationship to cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1997; 26:1-17.
22. Christine A. Lacubuzio D, Elizabeth M. Epithelial neoplasms of the colorectum. In: *Gastrintestinal and Liver Pathology*. Churchill Livingstone Elsevier, 2005: 367-394. .
23. Kempers MJ, Kuiper RP, Ockeloen CW, et al. Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *Lancet Oncol* 2011; 12:49. .
24. Vasen HFA, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991;34:424-5.
25. Vasen HF, Watson P, Mecklin J-P, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453-6.
26. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, DE LA Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96: 261-8. .
27. Meyskens FL, Jr, McLaren CE, Pelot D, et al. Difluoromethylornithine plus sulindac for the prevention of sporadic colorectal adenomas: a randomized placebo-controlled, double-blind trial. *Cancer Prev Res (Phila)* 2008; 1:32. 54
28. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. The gastrointestinal tract. In *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7 th. Ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Company, 2005: 857-869. .
29. Burt RW, DiSario JA, Cannon-Albright L. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med* 1995; 46: 371. .
30. Rider JA, Kirsner JB, Moeller HC, Palmer WL. Polyps Of The Colon And Rectum; Their Incidence And Relationship To Carcinoma. *Am J Med.* 1954;16:555-64.
31. Winawer SJ, O'Brien MJ, Wayne JD, Kronborg O, Bond J, Frühmorgen P, Sobin LH, Burt R, Zauber A, Morson B. Risk and surveillance of individuals with colorectal polyps. *Who Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer.* *Bull World Health Organ.* 1990;68:789-95.
32. Peters RK, Pike MC, Chang WW, Mack TM. Reproductive factors and colon cancers. *Br J Cancer.* 1990;61:741-8.
33. Davis FG, Furner SE, Persky V, Koch M. The influence of parity and exogenous female hormones on the risk of colorectal cancer. *Int J Cancer.* 1989;43:587-90.
34. Furner SE, Davis FG, Nelson RL, Haenszel W. A case-control study of large bowel cancer and hormone exposure in women. *Cancer Res.* 1989;49:4936-40. .
35. Chute CG, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Baron JA, Rosner B, Speizer FE. A prospective study of body mass, height, and smoking on the risk of colorectal cancer in women. *Cancer Causes Control.* 1991;2:117-24.
36. Calle EE, Miracle-McMahill HL, Thun MJ, Heath CW Jr. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:517-23.
37. Smith JP, Wood JG, Solomon TE. Elevated gastrin levels in patients with colon cancer or adenomatous polyps. *Dig Dis Sci.* 1989;34:171-4.
38. Nemeth J, Taylor B, Pauwels S, Varro A, Dockray GJ. Identification of progastrin derived peptides in colorectal carcinoma extracts. *Gut.* 1993;34:90-5.
39. Ciccotosto GD, McLeish A, Hardy KJ, Shulkes A. Expression, processing, and secretion of gastrin in patients with colorectal carcinoma. *Gastroenterology.* 1995;109:1142-53.

40. Finley GG, Koski RA, Melhem MF, Pipas JM, Meisler AI. Expression of the gastrin gene in the normal human colon and colorectal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1993;53:2919-26.
41. Klein I, Parveen G, Gavalier JS, Vanthiel DH. Colonic polyps in patients with acromegaly. *Ann Intern Med.* 1982;97:27-30.
42. Ezzat S, Strom C, Melmed S. Colon polyps in acromegaly. *Ann Intern Med.* 1991;114:754-5.
43. Fenoglio- Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Listrom MB, Rilke FO. Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine. In: *Gastrointestinal pathology an atlas and text.* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999: 909-1068.
44. Rafter J, Glinghammar B (1998). Interactions between the environment and genes in the colon. *Eur J Cancer Prev* 7: S69-S74.
45. Winawer SJ, Zuber AG, Ho MN, et al: Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy: The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993; 329:1977-1981.
46. Roncucci L, Pedroni M, Vaccina F, et al: Aberrant crypt foci in colorectal carcinogenesis: Cell and crypt dynamics. *Cell Prolif* 2000; 33:1-18.
47. Mueller JD, Bethke B, Stolte M: Colorectal de novo carcinoma: A review of its diagnosis, histopathology, molecular biology, and clinical relevance. *Virchows Arch* 2002; 440:453-460.
48. Kumar V, Robbins S, Cotran R (Çeviri: U. Çevikbaş). *Temel Patoloji.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2009: 862-864.
49. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87:159-70.
50. Jass JR. Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin North Am.* 2002;82:891-904.
51. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2009;4. .
52. Andreyev HJ, Norman AR, Oates J. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer. *Br J cancer* 2001; 85:692-6. .
53. Conlin A, Smith G, Carey FA. The prognostic significance of K-ras, p53 and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 2005; 54:1283-6. .
54. Marlyn JB, David Am. Polyp growth and polyp-cancer sequence. *Clinics in colon and rectal surgery.* 2002; 97-104.
55. Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *Journal of clinical oncology.* 2004; 3420-3428. .
56. Itoh F, Hinoda Y, Ohe M, et al. Decreased expression of DCC Mrna in human colorectal cancers. *Int J cancer* 1993; 53:260-263, .
57. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *Journal of Clinical Oncology.* 2005;23(30):7518–7528. .
58. Iacopetta B, Russo A, Bazan V, et al. Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Study. *Annals of Oncology.* 2006; 17(5):842–847. .
59. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature.* 1997; 386(6625):623–627. .
60. Knutsen T, Padilla-Nash HM, Wangsa D, et al. Definitive molecular cytogenetic characterization of 15 colorectal cancer cell lines. *Genes Chromosomes and Cancer.* 2010;49(3):204–223. .

61. Goto T, Mizukami H, Shirahata A, et al. Aberrant methylation of the p16 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. *Anticancer Research*. 2009; 29(1):275–277. .
62. Keyes MK, Jang H, Mason JB, et al. Older age and dietary folate are determinants of genomic and p16-specific DNA methylation in mouse colon. *Journal of Nutrition*. 2007;137(7):1713–1717. .
63. Büyükdoğan M. KRKde genetik ve etyolojik faktörler. 2005; 25:171-180. .
64. De Leon ML, Schoetz DJ Jr, Collier JA, Veidenheimer MC. Colorectal cancer: Lahey Clinic experience, 1972-1976. An analysis of prognostic indicators. *Dis Colon Rectum*. 1987;30:237-42.
65. Speights VO, Johnson MW, Stoltenberg PH, Rappaport ES, Helbert B, Riggs M. *South Med J*. Colorectal cancer: current trends in initial clinical manifestations. 1991;84:575-8.
66. Barillari P, de Angelis R, Valabrega S, Indinnimeo M, Gozzo P, Ramacciato G, Fegiz G. Relationship of symptom duration and survival in patients with colorectal carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 1989;15:441-5.
67. Goulston KJ, Cook I, Dent OF: How important is rectal bleeding in the diagnosis of bowel cancer and polyps. *Lancet* 1986;2:261-5.
68. Pickhardt PJ, Kim DH. Colorectal cancer screening with CT colonography: key concepts regarding polyp prevalence, size, histology, morphology, and natural history. *AJR Am J Roentgenol*. 2009;193:40-46.
69. Kapse N, Goh V. Functional imaging of colorectal cancer: positron emission tomography, magnetic resonance imaging, and computed tomography. *Clin Colorectal Cancer*. 2009;8:77-87.
70. Tanaka S, Oka S, Chayama K. Colorectal endoscopic submucosal dissection: present status and future perspective, including its differentiation from endoscopic mucosal resection. *J Gastroenterol*. 2008;43:641-51.
71. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Listrom MB, Rilke FO. Epithelial neoplasms of the colon. In: *Gastrointestinal pathology an atlas and text*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2008; 899-1020.
72. Qizilbash AH. Pathologic studies in colorectal cancer. A guide to the surgical pathology examination of colorectal specimens and review of features of prognostic significance. *Pathol Annu*. 1982;17:1-46.
73. Shousha S. Paneth cell-rich papillary adenocarcinoma and a mucoid adenocarcinoma occurring synchronously in colon: a light and electron microscopic study. *Histopathology*. 1979;3:489-501.
74. Shousha S. Signet-ring cell adenocarcinoma of rectum: a histological, histochemical and electron microscopic study. *Histopathology*. 1982;6:341-50.
75. Pagani A, Papotti M, Abbona GC, Bussolati G. Chromogranin gene expressions in colorectal adenocarcinomas. *Mod Pathol*. 1995;8:626-32.
76. Gibbs NM. Incidence and significance of argentaffin and paneth cells in some tumours of the large intestine. *J Clin Pathol*. 1967;20:826-31.
77. De Bruïne AP, Wiggers T, Beek C, Volovics A, von Meyenfeldt M, Arends JW, Bosman FT. Endocrine cells in colorectal adenocarcinomas: incidence, hormone profile and prognostic relevance. *Int J Cancer*. 1993;54:765-71.
78. Jass JR. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol*. 1986;39:585-589.
79. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(7):979-994.

80. Sundblad AS, Paz RA. Mucinous carcinomas of the colon and rectum and their relation to polyps. *Cancer*. 1982;50:2504-9.
81. Secco GB, Fardelli R, Campora E, Lapertosa G, Gentile R, Zoli S, Prior C. Primary mucinous adenocarcinomas and signet-ring cell carcinomas of colon and rectum. *Oncology*. 1994;51:30-4.
82. Sasaki O, Atkin WS, Jass JR. Mucinous carcinoma of the rectum. *Histopathology*. 1987;11:259-72.
83. Symonds DA, Vickery AL. Mucinous carcinoma of the colon and rectum. *Cancer*. 1976;37:1891-1900.
84. Jones EA, Morson BC. Mucinous adenocarcinoma in anorectal fistulae. *Histopathology*. 1984;8:279-92.
85. Laufman H, Saphir O. Primary Linitis Plastica Type Of Carcinoma Of The Colon. *Arch Surg*. 1951;62:79-91.
86. Crissman JD. Adenosquamous and squamous cell carcinoma of the colon. *Am J Surg Pathol*. 1978;2:47-54.
87. Boscaino A, Orabona P, Donofrio V, Mossetti G, D'Armiento FP. Adenosquamous carcinoma of the colon. Case report of an unusual type. *Tumori*. 1993;79:288-90.
88. Strate RW, Richardson JD, Bannayan GA. Basosquamous (transitional cloacogenic) carcinoma of the sigmoid colon. *Cancer*. 1977;40:1234-9.
89. Weidner N, Zekan P. Carcinosarcoma of the colon. Report of a unique case with light and immunohistochemical studies. *Cancer*. 1986;58:1126-30.
90. Lin JJ, Cogbill CL, Athota PJ, Tsung SH, Kwak YS. Superficial spreading adenocarcinoma of appendix, cecum, and terminal ileum. *Dis Colon Rectum*. 1980;23:587-9.
91. Braun EV, Ali M, Fayemi AO, Beaugard E. Primary signet-ring cell carcinoma of the urinary bladder: review of the literature and report of a case. *Cancer*. 1981;47:1430-5.
92. Minsky BD, Mies C, Rich TA, Recht A. Lymphatic vessel invasion is an independent prognostic factor for survival in colorectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989;17:311-8.
93. Berger AC, Sigurdson ER, LeVoyer T, Hanlon A, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, Haller DG. Colon cancer survival is associated with decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes. *J Clin Oncol*. 2005;23:8706-12.
94. Krasna MJ, Flancbaum L, Cody RP, Shneibaum S, Ben Ari G. Vascular and neural invasion in colorectal carcinoma. Incidence and prognostic significance. *Cancer*. 1988;61:1018-23.
95. Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, Fenoglio-Preiser CM, Napier J, Horne CH, Lopez MJ, et al. Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol*. 1986;150:195-203.
96. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum*. 2005;48:1161-8.
97. Brodsky JT, Richard GK, Cohen AM, Minsky BD. Variables correlated with the risk of lymph node metastasis in early rectal cancer. *Cancer*. 1992;69:322-6.
98. Shirouzu K, Isomoto H, Morodomi T, Kakegawa T. Carcinomatous lymphatic permeation. Prognostic significance in patients with rectal carcinoma-a long term prospective study. *Cancer*. 1995;75:4-10.
99. Cawthorn SJ, Parums DV, Gibbs NM, A'Hern RP, Caffarey SM, Broughton CI, Marks CG. Extent of mesorectal spread and involvement of lateral resection margin as prognostic factors after surgery for rectal cancer. *Lancet*. 1990;335:1055-9.

100. Kotanagi H, Fukuoka T, Shibata Y, Yoshioka T, Aizawa O, Saito Y, Tur GE, Koyama K. The size of regional lymph nodes does not correlate with the presence or absence of metastasis in lymph nodes in rectal cancer. *J Surg Oncol*. 1993;54:252-4.
101. Michelassi F, Block GE, Vannucci L, Montag A, Chappell R. A 5- to 21-year follow-up and analysis of 250 patients with rectal adenocarcinoma. *Ann Surg*. 1988;208:379-89.
102. Talbot IC, Ritchie S, Leighton M, Hughes AO, Bussey HJ, Morson BC. Invasion of veins by carcinoma of rectum: method of detection, histological features and significance. *Histopathology*. 1981;5:141-63.
103. Shirouzu K, Isomoto H, Kakegawa T. Prognostic evaluation of perineural invasion in rectal cancer. *Am J Surg*. 1993;165:233-7.
104. Kelley WE, Brown PW, Lawrence W, Terz JJ. Penetrating, obstructing, and perforating carcinomas of the colon and rectum. *Arch Surg*. 1981;116:381-4.
105. Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, Stablein DM. Prognostic indicators of colon tumors. The Gastrointestinal Tumor Study Group experience. *Cancer*. 1986;57:1866-70.
106. Harrison JC, Dean PJ, el-Zeky F, Vander Zwaag R. From Dukes through Jass: pathological prognostic indicators in rectal cancer. *Hum Pathol*. 1994;25:498-505.
107. Shepherd NA, Baxter KJ, Love SB. Influence of local peritoneal involvement on pelvic recurrence and prognosis in rectal cancer. *J Clin Pathol*. 1995;48:849-55.
108. Mulcahy HE, Patchett SE, Daly L, O'Donoghue DP. Prognosis of elderly patients with large bowel cancer. *Br J Surg*. 1994;81:736-8.
109. McDermott FT, Hughes ES, Pihl E, Milne BJ, Price AB. Comparative results of surgical management of single carcinomas of the colon and rectum: a series of 1939 patients managed by one surgeon. *Br J Surg*. 1981;68:850-5.
110. Curley SA, Evans DB, Ames FC. Resection for cure of carcinoma of the colon directly invading the duodenum or pancreatic head. *J Am Coll Surg*. 1994;179:587-92.
111. Hildebrandt U, Schüder G, Feifel G. Preoperative staging of rectal and colonic cancer. *Endoscopy*. 1994;26:810-2.
112. Taal BG, Van Tinteren H, Zoetmulder FA. Adjuvant 5FU plus levamisole in colonic or rectal cancer: improved survival in stage II and III. *Br J Cancer*. 2001;85:1437-43.
113. Sischy B, Gunderson LL. The evolving role of radiation therapy in the management of colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*. 1986;36:351-9.
114. Ng AK, Recht A, Busse PM. Sphincter preservation therapy for distal rectal carcinoma: a review. *Cancer*. 1997;79:671-83.
115. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006;10:51-64.
116. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003;112:1809-20.
117. Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* 2008;90:313-23.
118. Takeuchi H, Kondo Y, Fujiwara K, Kanzawa T, Aoki H, Mills GB, et al. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res* 2005;65:3336-46.

119. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13- FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 2009;20:1992–2003.
120. Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response Hannelore Maes, Noemi´ Rubio, Abhishek D. Garg, and Patrizia Agostinis; *Trends in Molecular Medicine* 2013; 19(7):428-46.
121. Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y, Kondo S. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene* 2005;24:980–91.
122. Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:18030–5.
123. Turcotte S, Chan DA, Sutphin PD, Hay MP, Denny WA, Giaccia AJ. A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy. *Cancer Cell* 2008;14:90–102.
124. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 2009;23:798–803.
125. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:1536–46.
126. Gewirtz DA. Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy. *Autophagy* 2009;5:1232–4.
127. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and selfkilling: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:741–52.
128. Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, et al. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* 2009;137:721–35.
129. Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 2008;4:600–6.
130. Mazure NM, Pouyss_egur J. Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:177–80.
131. Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, et al. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J Clin Invest* 2008;118:3917–29.
132. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 2007;117:326–36.
133. Ding WX, Ni HM, Gao W, Chen X, Kang JH, Stolz DB, et al. Oncogenic transformation confers a selective susceptibility to the combined suppression of the proteasome and autophagy. *Mol Cancer Ther* 2009;8:2036–45.
134. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:5308–16.
135. Katayama M, Kawaguchi T, Berger MS, Pieper RO. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 2007;14:548–58.
136. Carew JS, Nawrocki ST, Kahue CN, Zhang H, Yang C, Chung L, et al. Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. *Blood* 2007;110:313–22.
137. Zhineng J. Yang, Cheng E. Chee, Shengbing Huang, and Frank A. Sinicrope; *The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications*; *Mol Cancer Ther* 2011;10:1533-1541.

138. Maiuri MC, Malik SA, Morselli E, Kepp O, Criollo A, Mouchel PL, et al. Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin2. *Cell Cycle* 2009;8:1571–6.
139. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009;137:1062–75.
140. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 2010;20:51–6.
141. Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* 2011;25: 717–29.
142. Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 2011;25:460–70.
143. Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 2004;11:448–57.
144. Abedin MJ, Wang D, McDonnell MA, Lehmann U, Kelekar A. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ* 2007;14:500–10.
145. Mukubou H, Tsujimura T, Sasaki R, Ku Y. The role of autophagy in the treatment of pancreatic cancer with gemcitabine and ionizing radiation. *Int J Oncol* 2010;37:821–8.
146. Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Kuwano H. Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. *Eur J Cancer* 2010;46:1900–9.
147. Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 2001;61:439–44.
148. Ertmer A, Huber V, Gilch S, Yoshimori T, Erfle V, Duyster J, et al. The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia* 2007;21:936–42.
149. Li X, Fan Z. The epidermal growth factor receptor antibody cetuximab induces autophagy in cancer cells by downregulating HIF-1 α and Bcl-2 and activating the beclin 1/hVps34 complex. *Cancer Res* 2010;70:5942–52.
150. Zhu K, Dunner K Jr, McConkey DJ. Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells. *Oncogene* 2010;29:451–62.
151. Han J, Hou W, Goldstein LA, Lu C, Stolz DB, Yin XM, et al. Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective tumor cells. *J Biol Chem* 2008;283:19665–77.
152. Liu YL, Yang PM, Shun CT, Wu MS, Weng JR, Chen CC. Autophagy potentiates the anti-cancer effects of the histone deacetylase inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Autophagy* 2010;6:1057–65.
153. Gills JJ, Lopiccolo J, Dennis PA. Nelfinavir, a new anti-cancer drug with pleiotropic effects and many paths to autophagy. *Autophagy* 2008;4:107–9.
154. Huang S, Sinicrope FA. Celecoxib-induced apoptosis is enhanced by ABT-737 and by inhibition of autophagy in human colorectal cancer cells. *Autophagy* 2010;6:256–69.
155. Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Török L, Pandey S, Sikorska M, et al. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 1996;17:1595–607.
156. Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2009;27:2278–87.

157. Ben Sahra I, Laurent K, Giuliano S, Larbret F, Ponzio G, Gounon P, et al. Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:2465–75.
158. Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, LumJJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, et al. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res* 2007;67: 6745–52.
159. Shacka JJ, Klocke BJ, Roth KA. Autophagy, bafilomycin and cell death: the "a-B-cs" of plecomacrolide-induced neuroprotection. *Autophagy* 2006;2:228–30.
160. Carew JS, Medina EC, Esquivel JA 2nd, Mahalingam D, Swords R, Kelly K, et al. Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J Cell Mol Med* 2010;14:2448–59.
161. Wu Z, Chang PC, Yang JC, Chu CY, Wang LY, Chen NT, et al. Autophagy blockade sensitizes prostate cancer cells towards Src family kinase inhibitors. *Genes Cancer* 2010;1:40–9.
162. Granville CA, Warfel N, Tsurutani J, Hollander MC, Robertson M, Fox SD, et al. Identification of a highly effective rapamycin schedule that markedly reduces the size, multiplicity, and phenotypic progression of tobacco carcinogen-induced murine lung tumors. *Clin Cancer Res* 2007;13:2281–9.
163. Memmott RM, Mercado JR, Maier CR, Kawabata S, Fox SD, Dennis PA. Metformin prevents tobacco carcinogen-induced lung tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010;3:1066–76.
164. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T and Ohsumi Y: In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15: 1101-1111, 2004.
165. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432 (7014): 235-40.
166. Lund E, Guttlinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303 (5654): 95-8.
167. Lin He & Gregory J. Hannon , MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation : *Nature Reviews Genetics* ;July 2004 5, 522-531.
168. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002;297(5589):2056–60.
169. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005;3(3):e85.
170. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003;115(7):787–98.
171. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA. MicroRNAs--the micro steering Wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer* 2009;9 (4):293-302.
172. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; 5 (7): 522-31.
173. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome* 2006; 17 (3): 189-202.
174. Bandyopadhyay S, Mitra R, Maulik U, Zhang MQ. Development of the human cancer microRNA network. *Silence* 2010;1(1):6.
175. Tschan MP, Jost M, Batliner J, Fey MF. The autophagy gene ULK1 plays a role in AML differentiation and is negatively regulated by the oncogenic MicroRNA-106a. In: 52rd Annual Meeting and Exposition; 2011.
176. Manne U, Shanmugam C, Bovell L, et al.: miRNAs as biomarkers for management of patients with colorectal cancer. *Biomark Med* 2010;4:761–770.

177. Vickers MM, Bar J, Gorn-Hondermann I, et al.: Stage-dependent differential expression of microRNAs in colorectal cancer: potential role as markers of metastatic disease. *Clin Exp Metastasis* 2012;29: 123–132.
178. Drebber U, Lay M, Wedemeyer I, et al.: Altered levels of the oncomicroRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Oncol* 2011;39:409–415.
179. Boyle P, Levin B (Eds.). *World Cancer Report*. IARC: Lyon, France. 2008.
180. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin M. *Cancer incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. IARC CancerBase No.5 IARC, Lyon. 2002.
181. Asaad SM, Jubelirer SJ, Welch CA. Prognostic indicators for stage II (Dukes' stage B) adenocarcinoma of the colon. *W V Med J*. 2005; 101: 210-3.
182. Park YJ, Park KJ, Park JG, Lee KU, Choe KJ, Kim JP, et al. Prognostic factors in 2230 Korean colorectal cancer patients: analysis of consecutively operated cases. *World J Surg*. 1999; 23:721-6.
183. Nelson RL, Dollear T, Freels S, Persky V. The relation of age, race, and gender to the subsite location of colorectal carcinoma. *Cancer*. 1998; 82:1408-10.
184. Levin B , Lieberman DA , McFarland B , Andrews KS , Brooks D , Bond J et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology*. 2008;134:1570-95.
185. Gönen Ö. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi, Kolorektal Özel Sayısı. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery*. 2004;9: 57-65.
186. Michelassi F, Vannucci L, Ayala JJ, Chappel R, Goldberg R, Block GE. Local recurrence after curative resection of colorectal adenocarcinoma. *Surgery*. 1990;108:787-92.
187. Wolmark N, Wieand HS, Rockette HE, Fisher B, et al. The prognostic significance of tumor location and bowel obstruction in Dukes B and C colorectal cancer. Findings from the NSABP clinical trials. *Ann Surg*. 1983;198:743-52.
188. Küpelioglu AA. Kolorektal Kanserde Histopatoloji, Kolorektal Özel Sayısı. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery*. 2004; 9: 25-7. .
189. Bokey EL, Chapuis PH, Dent OF, Mander BJ, Bisset IP, Newland RC. Surgical technique and survival in patients having a curative resection for colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2003;46:860-6. .
190. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(7):979-994. .
191. Hermanek, P. and L. H. Sobin . Colorectal carcinoma. In: Hermanek P, Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RVP, Sobin LH, eds. *Prognostic Factors in Cancer*. New York, NY: Springer-Verlag NY Inc; 1995.
192. Sökmen S. Kolorektal Kanserde Prognoz, Kolorektal Özel Sayısı. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery* 2004;9:57-65.
193. Burton S, Norman AR, Brown G, Abulafi AM, Swift RI. Predictive poor prognostic factors in colonic carcinoma. *Surg Oncol*. 2006;5:71-8. .
194. Enker WE, Havenga K, Polyak T, Thaler H, Cranor M. Abdomino perineal resection via total mesorectal excision and autonomic nerve preservation for low rectal cancer. *World J Surg*. 1997; 21:215-20.
195. Lee HY, Kim YH, Jung GJ, Roh YH, Park SY, Kang NU, Yoon SH, Cho JH, Roh MH, Han SY, Lee SW, Baek YH, Jeong JS. Prognostic factors for gallbladder cancer in the laparoscopy era. *J Korean Surg Soc*. 2012;83:227-36.

196. Carew JS, Medina EC, Esquivel JA 2nd, Mahalingam D, Swords R, Kelly K, et al. Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J Cell Mol Med* 2010;14:2448–59.
197. Czaja MJ (2011) Functions of autophagy in hepatic and pancreatic physiology and disease. *Gastroenterology* 140: 1895-1908. doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.038. PubMed: 21530520.
198. Klionsky DJ and Emr SD: Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717-1721, 2000.
199. Munafò DB and Colombo MI: A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci* 114: 3619-3629, 2001.
200. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19: 5720-5728, 2000.
201. Jin S and White E: Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* 3: 28-31, 2007.
202. Levine B: Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* 446: 745-747, 2007.
203. Alva AS, Gultekin SH and Baehrecke EH: Autophagy in human tumors: cell survival or death? *Cell Death Differ* 11: 1046-1048, 2004.
204. Yoshioka et al: LC3 Expression In Gastrointestinal Cancers; *International Journal Of Oncology* 33: 461-468, 2008 463.
205. Jean-François Groulx, Taoufik Khalfaoui, Yannick D. Benoit, Gérald Bernatchez, Julie C. Carrier, Nuria Basora and Jean-François Beaulieu ;Autophagy is active in normal colon mucosa; *Autophagy* 8:6, 893–902; June 2012.
206. Oliva L, Cenci S;Autophagy in Plasma Cell Pathophysiology.*Front Immunol.* 2014 Mar 12;5:103. eCollection 2014.
207. Cenci S.Autophagy, a new determinant of plasma cell differentiation and antibody responses.*Mol Immunol.* 2014 Mar 10.
208. Jae Myung Park, Shengbing Huang, Tsung-Teh Wu, Nathan R. Foster and Frank A. Sinicrope;Prognostic impact of Beclin 1, p62/sequestosome 1 and LC3 protein expression in colon carcinomas from patients receiving 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy;*Cancer Biology & Therapy* 14:2, 100–107; February 2013.
209. Michiko Shintani, Akiko Sangawa, Naoki Yamao, Toshihiko Miyake, and Shingo Kamoshida;Immunohistochemical analysis of cell death pathways in gastrointestinal adenocarcinoma;*Biomedical Research* 32 (6) 379-386, 2011.
210. Tang JY, Hsi E, Huang YC, Hsu NC, Chu PY, Chai CY.High LC3 expression correlates with poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma.*Hum Pathol.* 2013 Nov;44(11):2558-62.
211. Qian Deng, Zhenlong Wang, Lei Wang, Liandong Zhang, Xiaolong Xiang, Ziming Wang, Tie Chong;Lower mRNA and Protein Expression Levels of LC3 and Beclin1, Markers of Autophagy, were Correlated with Progression of Renal Clear Cell Carcinoma;*Jpn J Clin Oncol* 2013;43(12)1261– 1268.
212. Sakurai T, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Setoyama T, Omoto I, Owaki T, Maemura K, Ishigami S, Natsugoe S.;The expression of LC-3 is related to tumor suppression through angiogenesis in esophageal cancer.*Med Oncol.* 2013 Dec;30(4):701.
213. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28:369–378.

214. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99):15524-15529.
215. Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003;1: 882–891.
216. Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS* 2007;115:1090 –1106.
217. Hongran Wang, Xiaohong Wang, Trevor K. Archer, Thomas P. Zwaka, Austin J. Cooney; GCNF-dependent activation of cyclin D1 expression via repression of Mir302a during ES cell differentiation; *Stem Cells*. 2014.
218. Wang L1, Yao J, Shi X, Hu L, Li Z, Song T, Huang C. MicroRNA-302b suppresses cell proliferation by targeting EGFR in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. *BMC Cancer*. 2013 Oct 2;13:448.
219. Wei W, Hou J, Alder O, Ye X, Lee S, Cullum R, Chu A, Zhao Y, Warner SM, Knight DA, Yang D, Jones SJ, Marra MA, Hoodless PA. Genome-wide microRNA and messenger RNA profiling in rodent liver development implicates mir302b and mir20a in repressing transforming growth factor-beta signaling. *Hepatology*. 2013;57(6):2491-501.
220. Zhang S1, Shan C, Kong G, Du Y, Ye L, Zhang X. MicroRNA-520e suppresses growth of hepatoma cells by targeting the NF-κB-inducing kinase (NIK). *Oncogene*. 2012 Aug 2;31(31):3607-20.
221. Zhang W1, Kong G, Zhang J, Wang T, Ye L, Zhang X. MicroRNA-520b inhibits growth of hepatoma cells by targeting MEKK2 and cyclin D1. *PLoS One*. 2012;7(2):e31450.
222. Hu N, Zhang J, Cui W, Kong G, Zhang S, Yue L, Bai X, Zhang Z, Zhang W, Zhang X, Ye L miR-520b regulates migration of breast cancer cells by targeting hepatitis B X-interacting protein and interleukin-8. *J Biol Chem*. 2011 Apr 15;286(15):13714-22.
223. Lee YH1, Na HS, Jeong SY, Jeong SH, Park HR, Chung J. Comparison of inflammatory microRNA expression in healthy and periodontitis tissues. *Biocell*. 2011 Aug;35(2):43-9.