

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Gastroenteroloji Bilim Dalı

ÜLSERATİF KOLİT VE KOLOREKTAL KANSER HASTALARINDA
EPIGENETİK KROMATİN HİSTON MODİFİKASYON PROFİLİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

GASTROENTEROLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ
Uzm. Dr. EMRE GERÇEKER

Tez Danışmanı
Doç. Dr. ELMAS KASAP

Manisa 2013

ÖNSÖZ

İlgi ve anlayışı ile tecrübelerini aktararak eğitimime büyük katkıda bulunan, hekimlik adına çok şey öğrendiğim değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Elmas KASAP' a;

Uzmanlık eğitimim süresince en iyi şekilde yetişebilmem için bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, her zaman hoşgörü ile sorunlarımızı çözümleyen İç Hastalıkları AD ve Gastroenteroloji BD Başkanı Prof. Dr. Hakan YÜCEYAR' a;

Tez çalışmamın yürütülmesinde her türlü desteği gösteren Uzm. Bio. Dr. Seda Örenay Boyacıoğlu, Doç. Dr. Mehmet Korkmaz ve Arş. Grv. Hatice Yıldırım' a

İyi ve kötü günlerimde yanımda olan dostum Hüseyin Salih SEMİZ' e

Eğitimim boyunca acı, tatlı birçok anı paylaştığım asistan arkadaşlarıma;

Beni her zaman sabır, sevgi ve fedakarlıkla destekleyen annem, babam ve kardeşime;

Benden hoşgörü ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen, her koşulda yanımda olan eşim Derya' ya ve varlığıyla hayatımı anlamlandıran oğlum Arda' ya;

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER LİSTESİ	I
TABLO LİSTESİ	III
GRAFİK LİSTESİ	III
ŞEKİL LİSTESİ	III
KISALTMALAR	IV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolorektal Kanser	3
2.2. Kolorektal Kanserde Etiyoloji ve Risk Faktörleri	3
2.2.1. Yaş	3
2.2.2. Diyetel Faktörler	4
2.2.3. Genetik Faktörler	4
2.2.4. Kolorektal Polipler	6
2.2.5. Ülseratif Kolit	7
2.2.6. Diğer Kolorektal Kansere Nedenleri	10
2.2.7. Koruyucu Faktörler	10
2.3. Kolorektal Kanserde Patoloji	11
2.4. Kolorektal Kanserde Yayılım ve Evreleme	12
2.5. Kolorektal Kanserde Prognoz ve Prognostik Faktörler	14
2.6. Kolorektal Kansere Patogenezi	15
2.6.1. Ülseratif Kolit İlişkili Kolorektal Kansere ve Displazi	15
2.6.2. Ülseratif Kolit Hastalarında Kolorektal Kansere Tarama	17
2.7. Kolorektal Kansere ve Genetik	18
2.7.1. Sporadik KRK Karsinogenezi ve Genetik	19
2.7.1.1. Kromozomal İnstabilite	19
2.7.1.2. Mikrosatellit İnstabilite	22
2.7.2. Ülseratif Kolit İlişkili Kolorektal Kansere ve Genetik	24
2.8. Kolorektal Kansere ve Epigenetik	27
2.8.1. Epigenetik	27
2.8.2. Epigenetik Mekanizmalar	28
2.8.3. Kolorektal Karsinogenezi Epigenetik Mekanizmalar	29
2.8.3.1. DNA Metilasyonu ve Transkripsiyonel Sessizleşme	29
2.8.3.2. miRNA ve Kolorektal Kansere Patogenezi İndeki Rolü	31
2.8.3.3. Kolorektal Kansere ve Histon Modifikasyonu	32
2.8.3.3.1. Histon Asetil Transferaz ve Histon Metil Transferaz	32
2.8.3.3.2. Histon Deasetilaz (HDAC)	34
2.8.3.3.3. P21 Aktive Edici Kinaz (PAK-1)	37
2.8.3.3.4. Aurora Kinazlar (AURKA, AURKB, AURKC)	40
2.8.3.3.5. NEK6 (NIMA (never in mitosis gene a) ilişkili kinaz 6)	41

3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Çalışma Dizaynı ve Hasta Grupları	43
3.2. Kolonoskopi ve Doku Örnekleme İşlemi	44
3.3. Moleküler Yöntem	45
3.3.1. Hazırlanan solüsyonlar	46
3.3.2. Dokulardan RNA İzolasyonu	47
3.3.3. cDNA sentezi	48
3.3.4. RT-PCR array yüklemesi	49
3.3.5. Real-Time PCR	49
3.4. Veri Analizi ve İstatistik	50
4. SONUÇLAR	51
4.1. Hasta Grupları	51
4.1.1. Kolorektal Kanserli Hastalar ve Alt Gruplar	52
4.1.2. Ülseratif Kilitli Hastalar ve Alt Gruplar	54
4.2. Histon Modifikasyon Gen Ekspresyon Analizi	56
4.2.1. Kolorektal Kanser Alt Grup Gen Ekspresyon Analizi	61
4.2.1.1. Evreye Göre Gen Ekspresyon Analizi	61
4.2.1.2. Tümör Diferansiyasyonuna Göre Gen Ekspresyon Analizi	62
4.2.1.3. CEA Düzeyine Göre Gen Ekspresyon Analizi	63
4.2.2. Ülseratif Kilit Alt Grup Gen Analizleri	64
4.2.2.1. Kolon Tutulumuna Göre Gen Ekspresyon Analizi	64
4.2.2.2. Hastalık Süresine Göre Gen Ekspresyon Analizi	65
4.2.2.3. Hastalık Şiddetine Göre Gen ekspresyon Analizi	66
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ	77
7. ÖZET	78
8. SUMMARY	79
9. KAYNAKLAR	80

TABLO LİSTESİ

Tablo 1	Kolorektal Kanserde TNM Evreleme Sistemi	13
Tablo 2	Kolorektal Kanserde TNM Evreleme Sistemi	14
Tablo 3	Araştırılacak Histon Modifikasyon Genleri	46
Tablo 4	Hasta Grupları ve Genel Parametreler	51
Tablo 5	KRK' de Histon Modifikasyon Gen Ekspresyon Analizi	56
Tablo 6	ÜK' te Histon Modifikasyon Gen Ekspresyon Analizi	58
Tablo 7	KRK ve ÜK Gruplarının Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması	60
Tablo 8	KRK' de Evreye Göre Gen Ekspresyonu Analizi	61
Tablo 9	KRK' de Tümör Diferansiyasyonuna Göre Gen Ekspresyon Analizi	62
Tablo 10	KRK' de CEA Düzeyine Göre Gen Ekspresyon Analizi	63
Tablo 11	ÜK' te Kolon Tutulumuna Göre Gen Analizi	64
Tablo 12	ÜK' te Hastalık Süresine Göre Gen Analizi	65
Tablo 13	ÜK' te Hastalık Şiddetine Göre Gen Analizi	66

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1	Ülseratif Kolit Hastalarında Displazi Takibi	18
Şekil 2	KRK' de Karsinogenez Aşamaları	26
Şekil 3	KRK' de Overeksprese Olan Genler	57
Şekil 4	KRK' de Overeksprese Olan Genler	59

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1	Kolorektal Kanserlerin Lokalizasyonu	52
Grafik 2	Kolorektal Kanser Hastalarının Evrelere Göre Dağılımı	52
Grafik 3	Kolorektal Kanser ve Tümör Diferansiyasyon Derecesi	53
Grafik 4	Kolorektal Kanser ve CEA	53
Grafik 5	Ülseratif Kolit Hastalarında Kolon Tutulumu	54
Grafik 6	Ülseratif Kolit Hastalarında Hastalık Süresi	55
Grafik 7	Ülseratif Kolit Hastalarında Tedavi	55

KISALTMALAR LİSTESİ

AURKA	: Aurora kinaz A
AURKB	: Aurora kinaz B
AURKC	: Aurora kinaz C
ALM	: Adenoma Like Mass
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli
BEAS-2B	:Bronş Epitel Hücre Kültürü
B-RAF	:V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog
C	: Sitozin
CDK	: Cyclin Dependent Kinase
CEA	: Karsinoembriyonik Antijen
CIN	:Chromozomal Instability, Kromozamal İnstabilite
CIMP	:CpG Island Metilator Phenotype
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DALM	: Displasia associated lesion or mass
DCC	: Deleted in colorectal cancer
DM	: Diabetes Mellitus
EGFR	: Epitelial Growth Factor Receptor
FAP	: Familyal Adenomatöz Polipozis
G	: Guanin
GTP	: Guanizin Trifosfat
HAT	: Histon Asetil Transferaz
HCC	: Hepatosellüler Kanser
HDAC	: Histon Deasetilaz
HGD	: High grade displasia
HNPCC	: Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser
HMT	: Histon Metil Transferaz
HP	: Hiperplastik polip
İBH	: İnflamatuvar Barsak Hastalığı
IGF-1	: İnsülin-Like Growth Faktör
K-RAS	: V-Kı-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
KRK	: Kolorektal kanser

KSA	: Klasik Serrated Adenoma
LGD	: Low grade displasia
LOH	: Loss of Heterozigot
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MEF2	: Myocyte Enhancer Factor-2
miRNA	: MikroRNA
MMR	: Mismatch Repair Genler
mRNA	: messenger RNA (Kodlayıcı RNA)
MSI	: Mikrosatellit İnstabilite
MSS	: Mikrosatellit Stabil
MTA-1	: Metastaz İlişkili Protein 1
ncRNA	: Noncoding RNA, Kodlanamayan RNA
NEK6	: NIMA (never in mitosis gene a) ilişkili kinaz 6
NSAİİ	: Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar
OD	: Otozomal Dominant
PAK1	: P21 activated kinase (P21 aktive edici kinaz)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PSK	: Primer Sklerozan Kolanjit
RNA	: Ribonükleik Asit
RT-PCR	: Real Time Polimer Zincir Reaksiyonu
shRNA	: Short hairpin RNA
SSA/P	: Sesil Serrated Polip ya da Adenoma
TCF4	: T cell faktör 4
TGF-β	:Transforming Growth Factor
TSG	: Tümör Supresör Gen
ÜK	: Ülseratif Kolit

I. GİRİŞ

Erişkin popülasyonda tüm kanserlerin % 10' unu oluşturan kolorektal kanserler (KRK),dünya genelinde tüm kanserler arasında erkeklerde 3. sırada (kansere olgularının % 10'u), kadınlarda 2. sırada (kansere olgularının % 9,4'ü) yer almaktadır. KRK önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Kansere bağlı ölümlerde 4. sırada bulunan KRK nedeni ile tüm dünyada yıllık 608000 ölüm (kansere bağlı ölümlerin % 8'i) gözlenmektedir. KRK gelişimini etkileyen muhtemel nedenler diyet ve diğer çevresel faktörler, yaş, inflamatuvar barsak hastalığı (İBH) gibi predispozan hastalıklar, aile öyküsünde kolon kanser varlığı, olgunun kendisinde adenom ve karsinom öyküsünün olmasıdır.

İBH ve özellikle ülseratif kolit(ÜK) olgularındaKRK riski normal popülasyona göre artmıştır.Bu risk hastalığın süresi, kolonik tutulumun yaygınlığı, inflamasyon şiddeti artışı ile paralel olarak daha fazla artmaktadır. ÜK' te hastalığın tutulumuna göre risk artışı değişkenlik göstermektedir. ÜK' te KRK ortalama insidansı % 0,4 ve prevalansı % 3,5' tur. ÜK tanılı hastalarda tüm ölümlerin % 15' ini KRK oluşturmaktadır. Bu neden ile ÜK' te; hastalık süresi 8-10 yıl olanlarda kolonoskopik takibe başlanması ve negatif saptananlarda her 2 yılda bir tam kolonoskopik inceleme önerilmektedir.

Hücre ve tümör gelişimindeki kısıtlı genetik bilgilerimizin ışığı altında KRK hücrelerinde bazı kesin değişiklikler saptanmıştır. KRKgenetik yatkınlık ve çevresel etkiler arasındaki etkileşim sonucu uzun sürede ortaya çıkmaktadır. Sporadik KRK, fokal displastik lezyon olan adenoma zemininde gelişir ve adenom-karsinom sekansına göre seyreder. Sporadik KRK gelişimi, klasik olarak genetik instabilite zemininde normal kolon epitelinin genetik değişiklikler ile adenomatöz polip ve sonuçta invaziv kansere dönüşümü ile oluşur. ÜK ilişkili KRK gelişimi ise sporadik KRK gelişiminden farklılık gösterir. Öncelikle ÜK ilişkili KRK; adenomdan ziyade düz zeminde gelişen, inflamasyonun gözlemlendiği fokal ya da multifokal displazi gösteren mukozadan gelişir ve inflamasyon-displazi-karsinoma sekansını takip eder.

KRK karsinogenezde kromozomal instabilite ve mikrosatellit instabilite yolları, β -catenin/Wnt ara yolağı, TGF β /SMAD ara yolağı, RAF/RAS/MAPK

ara yolağı olmak üzere tümör oluşun ve progresyonunda birçok yolak tariflenmiştir. Bu yolakların herbirinde; patogenetik mekanizmayı farklılaştıran, birden fazla mutasyonun aşamalı olarak birikimi söz konusudur. Bu yolaklarda görev alan birçok anahtar gende; K-RAS mutasyonu, B-RAF mutasyonu, 18q delesyonu, APC mutasyonu, p53 mutasyonu gibi genetik ve DNA CpG adacık hipermetilasyonu, kodlanamayan RNA (miRNA) ekspresyonları, spesifik histon modifikasyonları gibi epigenetik değişimler gözlenmektedir.

KRK gelişimi ile ilgili epigenetik mekanizmalardan biri de DNA paketlenmesinde görevli olan histonların modifikasyonlarıdır. Histonlar üzerinde yapılan bu değişiklikler, kromatinin yapısının gevşek ya da sıkı olma durumunu etkileyerek gen ifadesinde düzenleyici rol oynar. Histonlardaki modifikasyonların ve DNA metilasyonunun birlikte çalışarak gen ifadesinin durumunu belirlediği ve bu şekilde hücrenin yazgısının belirlenmesinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir. Histonlardaki spesifik modifikasyonlar, transkripsiyonel olarak aktif ve inaktif kromatinin belirlenmesinde bir çeşit marker olarak kullanılabilir. DNA metilasyonu, histon modifikasyonu gibi epigenetik değişikliklerin inflamasyonun bulunduğu dokularda kanser gelişiminde önemli roller üstlendiği düşünmekte ve bu patogenezin aydınlatılması için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Epigenetik kromatin histon modifikasyonlarının kanser hastalarında son prediktörler olarak görev aldığı düşünülmektedir. KRK'de epigenetik kromatin histon modifikasyonlarının bazıları çalışılmış olmakla beraber, modifikasyon paternlerinin tümünün prognostik önemi rapor edilmemiştir. Literatürde K 'li hastalarda epigenetik kromatin histon modifikasyon paternlerini gösteren ve K ile KRK 'in epigenetik kromatin histon modifikasyon paternlerini karşılaştıran çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla, alışmamızda KRK' de son prediktör olarak epigenetik global histon modifikasyonlarının rolü araştırılacak ve epigenetik global histon modifikasyonları yönünden K olgularıyla karşılaştırılması yapılacaktır. Ayrıca K' te KRK gelişim riski yönünden hasta takibinde epigenetik kromatin histon modifikasyonlarının bir marker olarak değeri araştırılacaktır.

II.GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser

Erişkin popülasyonda tüm kanserlerin % 10'unu oluşturan kolorektal kanser (KRK); özellikle Kuzey Amerika, Avrupa gibi modern yaşam tarzına sahip diğer bölgelerde, kanser ilişkili mortalite ve morbiditenin ana nedenlerinden biridir. 1960'tan 2000 yılına kadar olan süreçte KRK sıklığında nüfus artışına paralel olarak artış gözlenmiştir ancak son 10 yılda ise erken tarama programları ve polipektomiler sayesinde sıklığında azalma gözlenmektedir. KRK dünya genelinde tüm kanserler arasında erkeklerde 3. sırada (kansere olgularının % 10'u), kadınlarda 2. sırada (kansere olgularının % 9,4'ü) ve kansere bağlı ölümlerde 4. Sırada yer almaktadır [1].Ülkemizde 2006 yılında açıklanan Sağlık Bakanlığı verilerine göre erkeklerde akciğer, prostat ve mesane kanserinden sonra dördüncü; kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci en sık görülen kanserdir.

KRK' den tüm dünyada yıllık 608000 ölüm (kansere bağlı ölümlerin % 8' i) beklenirken birlikte rutin tarama testlerine bağlı artan erken tanı oranları ve gelişen tedavi olanakları sayesinde son 30 yıllık süreçte kolon kanserine bağlı mortalite ve morbidite de belirgin azalma gözlenmektedir. Hastalığın erken evrede yakalanması; minimal morbidite ve mortalitesi olan uygun cerrahi girişime olanak vermekte ve bu sayede de maligniteye daha yüksek oranlarda küratif yanıt alınabilmektedir [2].

2.2. Kolorektal Kanserde Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Kolorektal kanser gelişimini etkileyen muhtemel nedenler diyet ve diğer çevresel faktörler, yaş, inflamatuvar barsak hastalığı gibi predispozan hastalıklar, aile KRK hikayesi varlığı, kişinin kendisinde adenom ve karsinom öyküsünün olmasıdır [3-5]

2.2.1. Yaş

Yaş sporadik KRK gelişimi için en önemli risk faktörüdür. Yaş ilerlemesi ile birlikte; genetik anormalliklerin sıklığının artması ve çevresel faktörlerin daha uzun süreli etkisi ile özellikle 50 yaş üzerinde KRK gelişimi riski belirgin olarak artmaktadır. Ortalama KRK görülme yaşı 60-65'tir. 40

yaşından sonra her dekada bir KRK riski ikiye katlanarak artış gösterir ve 75 yaşında en yüksek orana çıkar[3, 5].

2.2.2. DiyetSEL Faktörler

Çevresel faktörler arasında en etkili olanlardan bir tanesi diyetSEL faktörlerdir. Yüksek yağ içerikli diyet tüketimi ile birlikte KRK gelişimi riski de artış göstermektedir. Hayvansal yağların alınması sonucu intestinal alana daha yoğun safra geçişi ve barsak mikroflorasında anaerob flora artışı izlenmektedir. Daha düşük yağ oranı içeren deniz mahsülleri ve bitkisel diyet ile KRK riskinde görece azalma izlenmektedir. Lifli gıdalar fekal transit süresini ve gaita hacmini artırarak karsinojen ajanları dilue eder; bu sayede kolon mukozasının karsinojenik ajanlara temas süresi azalır ve KRK riskinde azalma gözlenir [6, 7]. Anti oksidan ve barsak mukozasının karsinojen ajanlara karşı koruyucu etkileri sayesinde selenyum, E ve C vitaminleride KRK gelişim riskini azaltmaktadır [8]. Özellikle sık ve düzenli alkol alımı (>45 gr/gün) anormal DNA metilasyonundan dolayı KRK ve adenom sıklığını arttırmaktadır[9, 10]. Sigara içimi KRK ve kolon adenom sıklığında artışa yol açmaktadır. Risk sigaraya başlama yaşının azalması ve günlük tüketilensigara sayısının artması ile doğru orantılıdır[11].

2.2.2. Genetik Faktörler

KRK, ailesel sendromlar yerine sıklıkla sporadik olarak meydana gelmektedir. Hrediter nonpolipozis kolon kanseri (HNPCC) ve Familiyal adenomatöz polipozis koli (FAP) en yaygın ailevi kolon kanser sendromları olmasına rağmen tüm KRK olgularının sadece % 5'ini oluşturmaktadır [12, 13].

Familiyal Adenomatöz Polipozis Koli (FAP): Kromozom 5 (5q21) üzerinde lokalize adenomatöz polipozis genindeki (APC geni) germline mutasyonlar sonucu oluşan FAP otozomal dominant (OD) olarak kalıtılır. Tüm kolonda çok sayıda adenomatöz polip gelişimiyle karakterize bir sendromdur. FAP demek için en az 100 polip olmalıdır. Genellikle hayatın ikinci on yılında görülür ve ortama 16 yaşında semptomlar ortaya çıkar. Birçok KRK'in üçüncü on yılda başlaması nedeni ile profilaktik kolektomi en geç 20-25 yaşlarında yapılmalıdır. Profilaktik kolektomi yapılmaz ise;

hastaların % 90'ından fazlasında, kolonda bir ya da daha çok odakta, 40 yaş üzerinde KRK gelişimi izlenir. FAP tüm KRK'in % 0,5'inden sorumludur[5, 14-16].

Herediter Nonpolipozis Kolon Kanseri (HNPCC) Sendromu:

HNPCC iki sendromdan (Lynch I ve Lynch II) oluşur.

Lynch I Sendromu:Daha erken başlangıçlıdır. Sıklıkla sağ tarafta lokalize ya da birden fazla lokalizasyonda kolon kanserinin görüldüğü alt tiptir.

Lynch II Sendromu:Lynch I sendromuna ek olarak endometrium, meme, mide, over diğer kanserlerle de birliktelik ve risk artışı bulunur.

HNPCC' de sporadik kanserlerden farklı olarak kanser daha erken yaşta ortaya çıkmakta, özellikle sağ kolona yerleşmektedir. Müsinöz ve kötü diferansiye tipkanserler daha sıklıkla izlenmektedir. Senkron ve metakron kanser gelişme riski de yüksektir.

Tanı için *Amsterdam kriterleri'* nden yararlanır;

- 1) Üç veya daha fazla akrabada histolojik olarak doğrulanmış KRK varlığı ve bu akrabaların biri diğer ikisinin 1.derece akrabası olmalıdır.
- 2) En az 2 nesli etkileyen ailesel KRK varlığı olmalıdır.
- 3) 50 yaşından önce tanı konan 2 veya daha fazla ailesel KRK kolorektal kanser olgusu olmalıdır [5, 16].

Gardner Sendromu: Yüksek KRK gelişme riskinin bulunduğu polipozis koli sendromlarının bir alt grubudur. OD geçiş gösterir. Yumuşak doku tümörleri, mezenterik desmoid tümörler, periampüller bölge kanserleri, kemik tümörleri (kafatası ve mandibulada osteomlar), keratinöz deri kistleri ve retina pigment epitelinin konjenital hipertrofinin varlığına ilaveten kolonik polipler ile karakterize bir sendromdur[5, 16].

Turcot Sendrom: Santral sinir sistemi malign tümörleri (Glioblastom) ile birlikte kolon poliplerinin gözlendiği OD geçişli bir sendromdur. Puberteden önce kolonda polip nadir izlenir, sıklıkla ortalama 25 yaş civarında semptomatik hale gelir [5, 16].

Peutz-Jeghers Sendromu:Ağır derecede atipi gösteren adenomatöz poliplerin bir kısmından KRK gelişme riski bulunan, OD geçişli, LKB1 gen

mutasyonun gözleendiği polipozis sendromdur. Beraberinde pankreas, meme, akciğer, over ve uterus gibi KRK dışı kanser gelişim riski de artmıştır[5, 16].

Muir-Torre Sendromu:OD geçiş gösterir. Erken yaşta KRK gelişim riski mevcuttur. Ancak prognozu sporadik kolon kanserinden daha iyi seyirlidir [5, 16].

Cowden Sendromu:Fasyal trisilemmoma, akral keratoz ve oral mukozal papillom gibi mukokutanöz lezyonlar, kolorektal polipler ve değişik bölgelerde artmış malignite riski ile karakterizedir. Kromozom 10'da lokalize PTEN geninde mutasyonun gözleendiği OD geçişli bir hastalıktır[5, 16].

Cronkhite-Canada Sendromu:Mide, ince barsak ve kolon boyunca tüm gastrointestinal sistemde yaygın juvenil tipte poliplerin izlendiği polipozis sendromudur. İzlemde bu poliplerde adenomatöz değişimler ve KRK gelişme potansiyeli mevcuttur. Ciltte hiperpigmentasyon, saç dökülmesi, tırnaklarda distrofi, diyare, gastrointestinal sistemde kanama, kilo kaybı bulguları ek olarak gözlenir [5, 16].

MUTY Homolog (MYH) İlişkili Polipozis: MYH ilişkili polipozis otozomal resesif kalıtlı çok sayıda kolorektal adenom ve kanserlerden oluşan bir sendromdur. MYH oksidatif DNA hasarını düzelteren baz eksikliği tamir genidir. Onlarca-yüzlerce polip mevcuttur. Bu hastalarda proksimal kolon tümörüne eğilim vardır. MYH-AP, APC mutasyonu bulunmayan FAP fenotipli ailelerin %7-8' ini oluşturabilir. Çok sayıda adenomalı ya da APC mutasyonu olmayan FAP fenotipli kişiler ile aile hikayesi otozomal resesif kalıtımla uyumlu olan hastalar MYH-AP için test edilmelidirler[5, 16].

2.2.4. Kolorektal Polipler

Kolon polipleri kolonun muköz membranından uzanım gösteren anormal doku büyümesi olarak tanımlanmaktadır. Polipler neoplastik veya non-neoplastik olmak üzere 2 alt gruba ayrılmaktadırlar. Hamartomlar, metaplastik polipler (hiperplastik ya da inflamatuvar) neoplastik olmayan poliplerdir. Adenomatöz polipler ve serrated polipler ise neoplastik poliplerdir.

Adenomatöz polipler; kolumnar hücrelerin ya da glandüler dokunun benign tümörüdür. Erkeklerde daha sık görülmekte olup, 60-70 yaş civarı pik

yapar. Adenomatöz polipler; çoğunlukla kalıtsal değildir, sporadik olarak meydana gelmektedir ve KRK gelişiminin habercisi olabilirler. Adenomatöz polipler genetik değişikliklerin progresif olarak birikmesine bağlı olarak displazi derecelerinin artması ile kansere ilerleme eğilimi taşır [5, 16]. Adenomatöz polipler içerdikleri glandüler paternin histolojik yapısına göre tubüler adenom, tubülo-villöz adenom, villöz adenom olmak üzere 3 sınıfa ayrılır. Bütün kolorektal adenomlar displaziktir. Adenomlarda yüksek malignite risk kriterleri; ileri yaş, adenom sayısı, adenomun büyüklüğü (>1cm), villöz komponent, nükleer atipi sıklığı veya displazi derecesi, sesil olması, aile öyküsü, erkek cinsiyettir. 1cm'nin üzerindeki adenomların, villöz komponentlilerin ya da ciddi displazi için yıllık kansere dönüşme oranı %3, %17 ve %37 olarak bildirilmiştir ve yıllık dönüşüm oranının yaşla beraber arttığı gösterilmiştir. Adenomatöz poliplerdeki malignite gelişimi için risk faktörlerinin daha iyi anlaşılması ve bu faktörlerin klinik pratiğe entegre edilmesi; morbidite ve mortalitede ciddi azalmalar sağlamıştır [5, 16, 17].

Serrated polipler, testere görünümünde epitele sahip poliplerdir. Morfolojik olarak 3 alt tipi tanımlanmıştır. Hiperplastik polip (HP), Sesil serrated polip ya da adenoma (SSA/P) ve klasik serrated adenoma (KSA) olmak üzere üç tipi mevcuttur. Üç tipinde neoplastik potansiyelleri değişkendir. HP, malignite potansiyeli en az olan serrated polip tipidir. HP serrated poliplerin çoğunluğunu oluşturur (% 80-90). KSA'nın morfolojik yapısal özellikleri hiperplastik poliplere benzer, fakat sitolojik özellikleri adenomatöz poliplere benzemektedir. Sesil ya da saplı olabilir. Adenomatöz polipler ile benzer malignite potansiyeline sahiptir. SSA/P malignite potansiyeli en yüksek olan serrated adenomdur. Klasik tipte adenomatöz displazi yerine serrated displazi izlenir. SSA/P tipik histolojik bulguları; kript bazalinde aşırı serrasyon, yüzeyde villöz papiller yapıda artış, kript dallanmasında artış, horizontal kript yerleşimi, kript dilatasyonu, epitel/stroma oranında artış (% 50), kript proksimalinde mitoz varlığı, müsin yapımında artış ve sitolojik atipidir [18].

2.2.5. Ülseratif Kolit

Ülseratif kolit (ÜK); etiyojisi tam olarak anlaşılammış, histopatolojik olarak bazal plazmasitozis, kript harabiyeti, kript düzensizliği, kript apsesi bulgularının görüldüğü, relaps ve remisyon dönemleri ile seyreden kalın barsağın kronik inflamatuvar hastalığıdır. Olguların neredeyse tümünde rektum tutulumu görülür ve inflamasyon buradan proksimale doğru yayılım gösterir. Proktit, rektosigmoidit ve/veya splenik fleksuranın distalinin tutulduğu sol kolit, splenik fleksuranın proksimalinde tutulum gösterdiği ekstensif kolit, tüm kolonun tutulum gösterdiği pankolit olmak üzere 4 tip tutulum paterni mevcuttur. Tipik olarak terminal ileum tutulumu gözlenmemektedir. Nadiren tüm kalınbarsağın tutulduğu olgularda ise 'backwash ileitis' bulguları gözlenebilmektedir. Ayrıca klinik, endoskopik, histopatolojik ve labaratuvar bulgularına göre remisyon, hafif, orta ve şiddetli olmak üzere dört farklı aktivite paterni ve ilk ataktan sonra asemptomatik seyreden, zamanla giderek aktivitesi şiddetlenen, kronik sürekli semptomlu ve kronik tekrarlayan semptomları olan olmak üzere 4 farklı hastalık seyri paterni mevcuttur [19].

ÜK'te remisyon indüksiyon tedavisinde hafif şiddetli olgularda oral ve topikal 5-ASA, şiddetli olgularda oral-topikal-intravenöz steroid, steroid tedavisine yanıtssız olgularda ise siklosporin ya da anti-TNF kullanılmaktadır. Remisyon idame tedavisinde ise 5-ASA, azotiopürin, Anti-TNF tedaviler tercih edilmektedir. Hastalığın seyri ve yaygınlığı bireysel olarak farklılık göstermesi nedeni ile bireysel tedavi yaklaşımları uygulanmalıdır [19].

ÜK tanılı hastalarda uzun süreçte artmış KRK riski mevcuttur ABD'de ortalama insidans 4/1000'dir ve herhangi bir ÜK hastasında KRK prevalansı % 3,5'tur [3, 19, 20]. Literatüre bakıldığında İBH'na bağlı KRK genel popülasyondaki KRK vakalarının %1-2'sini oluşturduğu görülmektedir. Ayrıca İBH olan hastaların yaklaşık %10-15'i kansere bağlı kaybedilmektedir [21]. Bazı otörler riskin 40 yıldan sonra %60'a kadar arttığını belirtmişlerdir [22].

KRK insidansı ile paralel olarak inflamatuvar barsak hastalığı mortalite ve morbiditesinde de artış gözlenmektedir [20]. Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve Herediter nonpolipozis kolorektal kanser'den (HNPCC) sonra KRK

gelişimi için 3. sıklıkla görülen risk faktörüdür. KRK gelişimi için birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Hastalığın süresi, kolonik tutulumun yaygınlığı, erken yaşta ortaya çıkması, primer sklerozan kolanjit (PSK) varlığı, inflamasyonun şiddeti de riski artıran faktörlerdir[3, 20, 21]. Risk artışında en önemli faktör hastalık süresidir. FAP, HNPCC ve sporadik KRK'den farklı olarak KRK gelişimi kronik inflamasyon süresi ile ilişkilidir [23]. KRK riski özellikle hastalık başlangıcından 8-10 yıl sonrasında artmaktadır. ÜK hastalarında hastalık başlangıcından sonra ortalama KRK gelişim süresi 17 yıl, tanı yaşı da erkeklerde 51, kadınlarda 54 olarak saptanmıştır [3]. Eaden ve arkadaşlarının 116 ayrı çalışmayı değerlendikleri metaanalizde ÜK hastalarında kümülatif KRK riski 10. yılda %2, 20 yılda % 8, 30. yılda % 18 olduğu belirtilmiştir [3].

Hastalığın yaygınlığı ise diğer önemli bir risk faktörüdür. Proktitte göreceli risk 1.7 iken, sol taraf kolitinde 2.8, yaygın kolitte 14.8 kat arttığı belirtilmektedir. 30 yılı aşan pankolitli hastalarda KRK riski % 35'e çıkmaktadır [3, 20] Yine hastalığın erken yaşta ortaya çıkması hastalık süresinden bağımsız risk faktörüdür. ÜK hastalarında, hastalığın 25 yaşından daha erken başlaması bu riski daha da artırmaktadır. 15 yaşından önce tanı alanlarda 15-29 yaş arasında tanı alanlara göre risk 4 kat artmaktadır[20, 24].

Ailede KRK öyküsü varlığı ÜK hastalarında KRK gelişimi için bağımsız risk faktörüdür ve normal KRK gelişim riskinde 2 kat artış olduğu bildirmektedir [3].

ÜK ile sık birliktelik gösteren primer sklerozan kolanjit (PSK) ise KRK gelişimi için ayrıca risk faktörüdür. Eş zamanlı PSK varlığında KRK kanser riskinde 4 kat artış mevcuttur. PSK ve ÜK birlikteliği varlığında KRK sağ kolonda (%67' e karşı %36) daha sık yerleşim göstermektedir. KRK bağlı mortalitede farklılık olamamakla birlikte ÜK+PSK birlikteliğinde prognoz daha kötü seyretmektedir ve 5 yıllık sağ kalımları PSK olmayanlara göre daha azdır (%40' a karşı %75)[25]. PSK-ÜK birlikteliğinde sağ kolonda görece daha fazla KRK olması PSK tanısı olan hastalarda KRK patogenezinin farklı olabileceğini düşündürmektedir [25]. PSK' da Ursodeoksikolik asit (UDCA) ile tedavinin KRK gelişme riskini azaltabileceği ve bunun da safra asidi

kompozisyonunu deęiřtirerek patogeneizde rol alabileceęi dūřunūlmektedir [26].

ÜK'te kolon mukozasındaki inflamasyonun şiddeti de KRK gelişimi için bağımsız diğer bir risk faktörüdür[27]. Artmış histolojik aktivite şiddeti KRK gelişimi riskini artırmaktadır. İnflamasyonun şiddetini azaltan 5 ASA gibi ilaçlar KRK riskini ise azaltmaktadır [24, 28].

2.2.6. Diğer Kolorektal Kanser Nedenleri

Diabetes mellitusta (DM), KRK riskinde artış mevcuttur. İnsülin, IGF-1 (İnsülin benzeri büyüme faktörü) kolon epiteli üzerinde büyüme ve proliferasyonu artırıcı etkileri bulunmaktadır. Özellikle tip II DM'de; obezite ile birlikte hastalığın erken safhalarında var olan bozulmuş glukoz toleransı ve insülin direncine bağlı artmış insülin düzeyleri ile kolon epitel hücrelerinde stimülasyon izlenmektedir. Artmış insülin, C-peptid, IGF-1 düzeyleri ve KRK kanser riski arasında ilişki mevcuttur[5].

Kolesistektominin KRK riskini arttırdığı dūřunūlmektedir. Kolesistektomi sonrası safra içeriğinde değişim gözlenmektedir. Sekonder safra asidlerinde primer safra asidlerine göre görece artış izlenmektedir. Sekonder safra asitlerinin özellikle saę kolonda daha yoğun olmak üzere kolon epitelinde proliferasyonu artırıcı etkileri mevcuttur. Saę kolon tümörleri ve kolesistektomi arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir[5, 29].

Akromegalide KRK ve kolorektal polip riskinde artış mevcuttur. Akromegalili hastalarda daha erken yaşta ve normal popülasyona göre daha fazla KRK gelişimi bildirilmiştir[5].

2.2.7. Koruyucu Faktörler

Folik asit, D vitamini, kalsiyum, E vitamini, C vitamini, A vitamini, seleniyum ve fiber içerikli gıda tüketiminin KRK'den koruyucu olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Aspirin, NSAİİ (Non-steroid anti inflamatuvar ilaçlar), östrojen ve progesteron hormon replasman tedavisinde KRK riskini azalttığı bildirilmektedir. Bunun dışında fiziksel aktivitenin insülin rezistansını azaltarak insülin ve IGF- 1 (insülin benzeri büyüme faktörü 1) düzeylerini azalttığı ve sonuç olarak kolorektal epitelde proliferasyonu azaltarak KRK riskini azalttığı gösterilmiştir [5].

2.3. Kolorektal Kanserde Patoloji

KRK; genetik predispozisyon ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimi sonucu bir dizi moleküler olay sonrası normal mukozadan tek bir kript epitelindeki neoplastik değişiklikler ile ortaya çıkar. Kolorektal kanserlerin % 95'ini adenokarsinomlar oluşturur. Müsinöz tip, taşlı yüzük hücreli tip, kribriform komedo tip, mikropapiller tip ve serrated tip olmak üzere adenokarsinom subtipleri mevcuttur. Adenokarsinom dışı diğer suptipler olan adenosquamöz karsinom, iğsi hücreli karsinom, squamöz hücreli karsinom ve başkalaşım göstermeyen karsinomlar ise daha az sıklıkta görülür.

Adenokarsinomlar, gland oluşturma yeteneklerine göre mikroskopik olarak; Grade I (iyi diferansiye), Grade II (orta derecede diferansiye), Grade III (kötü diferansiye) adenokarsinomlar şeklinde sınıflandırılır [5].

Makroskopik görünüme göre kolorektal adenokarsinomlar; polipoid, annüler, ülseratif ve linitis plastika olmak üzere 4 tiptir.

Polipoid tip; Çoğunlukla çekum ve rektumda izlenen, lümen içine doğru büyüyen vejetan yapıdadır. Çoğu iyi diferansiye yapıda olan polipoid tip KRK' ler lümenini annüller tarzda sarmaz ve obstrüksiyon bulguları yapmaz, çoğunlukla kanamaya sebep olurlar.

Annüler tip; Çoğunlukla inen kolon ve sigmoid kolonda yerleşim gösterir, barsak duvarını çepeçevre sarması nedeni ile intestinal obstrüksiyon bu tipte görece daha sık gözlenmektedir. Yavaş progresyon göstermesi ve geç bulgu vermesi nedeni metastaz eğilimleri yüksektir.

Ülseratif tip; Çoğunlukla çekumda lokalize, nekrotik bir taban ve etrafında kabarık bir kenardan oluşan tipik malign ülser görünümlü lezyonlardır.

Linitis plastika; Kolonda geniş duvar kalınlaşması oluşturan, sıklıkla lümen daralmasına sebep olan, agresif seyir gösteren lezyonlardır[5].

2.4. Kolorektal Kanserde Yayılım ve Evreleme

KRK en sık olarak % 45 oranında rekto-sigmoid bölgede gözlenmektedir (Sigmoid kolon % 25, rektum % 20). Çekum ve çıkan kolonda % 25-30, transvers kolonda % 10-15, sol kolonda % 15 oranında izlenmektedir [5]. Rekto-sigmoidoskopinin tam kolonoskopiye göre daha çok uygulanması ve polipektominin yaygınlaşmasına bağlı olarak görece rekto-sigmoid bölge tümörlerinde azalma ve KRK lokalizasyonda sağa kayma izlenmektedir [30].

KRK' ler; direkt, lenfatik, hematojen yayılım yolu ya da intramural, transperitoneal implantasyon yolu ile çevre doku ve/veya uzak organlara yayılım gösterirler. Direkt yayılım ile tümör intestinal duvara ve daha da progrese olarak komşu organlara invazyon gösterebilir. Makroskopik olarak tümör sınırının bittiği yerden itibaren proksimalde 8 cm, distalde ise 5 cm'e kadar tümör submukozal yayılım gösterebilir. Yapılan çalışmalarda yayılım sınırının distalde mikroskopik yayılımın daha az olması nedeni ile 2-2.5 cm'lik distal rezeksiyonun yeterli olacağı bildirilmektedir. Lenfatik yayılım KRK'de en sık izlenen yayılım şeklidir. Barsak duvarına tama yakın invazyon gösteren karsinomların yaklaşık olarak % 50'sinde lenfatik yayılım saptanmaktadır. Rektal bölge kanserlerinde lenfatik yayılım yukarı doğrudur. Ancak linea dentayı geçen alt rektal bölge kanserlerinde ise inguinal lenf nodu tutulumu gözlenebilir. Hematojen yolla en çok yayılım vena porta yolu ile karaciğere olmak üzere daha az olarak akciğer, kemik, periton ve beyin metastazları görülür. Alt rektum tümörlerinde ise; inferior rektal venler ve inferior vena kava ile drenajı olması nedeni ile karaciğerden önce ilk olarak akciğere metastaz gözlenebilmektedir. Tümör hücrelerinin kolon serozasını aşarak batın içine desquamasyonu ile peritoneal metastazlar gelişmektedir [5].

KRK evrelemesinde Duke's sınıflaması, Astler Coller sınıflaması, TNM sınıflaması kullanılabilir. Günümüzde ise Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) tarafından 1987'de geliştirilen ve Uluslar arası Kanser Birliği (UICC) tarafından onaylanan, 2010 yılında tekrar düzenlenen TNM evrelemesi kullanılmaktadır[5]. (Tablo 1 ve Tablo 2)

Tablo 1: Kolorektal Kanserde TNM Evreleme Sistemi

Primer tümör (T)	
Tis	Karsinoma in situ; intraepitelyal veya lamina propia invazyonu
T1	Tümör submukozayı invaze etmiş
T2	Tümör muskularis propriayı invaze etmiş
T3	Tümör muskularis propriayı geçerek serozaya kadar ulaşmış
T4a	Tümör visseral peritonu invaze etmiş
T4b	Tümör diğer organları/yapıları invaze etmiş.
Lenf Nodu Metastazı (N)	
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	1-3 bölgesel lenf nodu metastazı mevcut
N1a	1 bölgesel lenf nodu metastazı mevcut
N1b	2-3 bölgesel lenf nodu metastazı mevcut
N1c	Subserozal, mezenterik ya da peri kolik dokuda tümör deposit varlığı
N2	4 veya daha fazla lenf nodu metastazı mevcut
N2a	4-6 lenf nodu metastazı mevcut
N2b	7 ve daha fazla lenf nodu metastazı mevcut
Uzak Organ Metastazı (M)	
M0	Uzak metastaz yok
M1a	Sadece bir organda metastaz varlığı
M1b	Birden çok organda ya da periton metastazı varlığı

Tablo 2: KRK TNM Evreleme Sistemi (AJCC 2010)

Evre	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Tx	Nx	M1a
IVB	Tx	Nx	M1b

2.5.Kolorektal Kanserde Prognoz ve Prognostik Faktörler

KRK'de en önemli prognostik faktör hastalığın evresidir. 5 yıllık sağkalım oranı erken evrelerde % 90' lara ulaşırken (ortalama %50-65) geç evrede saptanan olgularda ise bu oran %40'ın altına inmektedir [31]. Yaygın metastazların olduğu ileri hastalıkta ise 5 yıllık sağkalım oranları ancak %5-8'dir [32].

Uzak organ metastazı, serozal invazyon (pT4) ve bölgesel lenf nodlarının tutulumunun varlığı kötü prognoz göstergesidir. Ayrıca patolojik değerlendirmede lenfovasküler ve perinöral invazyon varlığı, rezidü tümör göstergesi olan cerrahi sınırdaki tümör tutulumunun varlığı (çevresel rezeksiyon sınırının <1 mm olması), tümör diferansiyasyonunun kötü olması (% 50'den az gland formasyonu), satellit tümör depozitlerinin varlığı kötü prognoz göstergeleridir. CEA (karsino embriyonejik antijen) düzeyi yüksek (> 5 ng/dl) olan hastalarda da sağ kalım oranları daha düşüktür[5].

2.6. Kolorektal Kanser Patogenezi

Hücre ve tümör gelişimindeki kısıtlı genetik bilgilerimizin ışığı altında KRK hücrelerinde bazı kesin değişiklikler saptanmıştır. KRK moleküler ve biyolojik özellikleri hakkındaki bilgilerin hızla artması patogeneze ışık tutmaktadır. Çünkü bu kanserler genetik yatkınlık ve çevresel etkiler arasındaki etkileşim sonucu uzun sürede ortaya çıkmaktadır. Karsinogenez birçok basamaktan oluşan aşamalı bir süreçtir. Sporadik KRK gelişimi, klasik olarak genetik instabilite zemininde normal kolon epitelinin genetik değişiklikler ile adenomatöz polip ve sonuçta invaziv kansere dönüşümü ile oluşur [5, 33]. ÜK ilişkili KRK gelişimi ise sporadik KRK gelişiminden farklılık gösterir. Öncelikle ÜK ilişkili KRK; adenomdan ziyade düz zeminde gelişen, inflamasyonun gözlemlendiği fokal ya da multifokal displazi gösteren mukozadan gelişir ve inflamasyon-displazi-karsinoma sekansını takip eder [5, 34-36]. Kolit zemininde gelişen karsinogenezde inflamasyonun olduğu ancak displazinin olmadığı kolon mukozasında önce düşük dereceli displazi gelişmektedir. Zaman içinde bu displazinin şiddeti artarak yüksek derecede displazi oluşmakta ve bu displazi odaklarından kolorektal karsinom gelişmektedir. Sporadik KRK, fokal displastik lezyon olan adenoma zemininde gelişir ve adenom-karsinom sekansına göre seyreder. Bu süreç ortalama 10 yıl sürmektedir. Sporadik KRK kolorektal kanser ile kolit zemininde gelişen kolorektal kanser kliniği arasında belirgin farklılıklar mevcuttur. HNPCC ile benzer şekilde ÜK ilişkili KRK de daha genç hastalarda gözlenir, sıklık ile müsinözdür, çok odaklıdır ve çoğunluk ile sol kolonda gözlenir, ancak sağ kolona daha sık yerleşim gösterdiğini bildiren çalışmalarda mevcuttur [5, 19, 37]. Olguların çoğunluğu 8 yıldan daha uzun süreli ÜK tanılı hastalarda gözlenir, sadece % 18'i 8 yıldan daha kısa süreli ÜK tanılı hastalarda gözlenmektedir [37].

2.6.1. Ülseratif Kolit İlişkili Kolorektal Kanser ve Displazi

ÜK hastalarında malignite çoğunlukla displazi-karsinoma sekansını takip ederek oluşmaktadır. KRK displastik mukozanın bulunduğu alandan lokalize prekürsör (öncü) hücrelerden köken alır [34, 36]. KRK gelişimindeki takip, erken teşhis ve tedavide öncelikli hedef inflamasyon-displazi-karsinom

sekansdaki premalign lezyon olan displazi safhasında hastalara müdahale etmektedir. Displazi sıklıkla uzun süreli ÜK'te gelişir. Displazi safhasında kolonik epitelde neoplastik değişiklikler mevcuttur, ancak bu değişiklikler lamina propriyaya invazyon göstermemektedir. Displazi fokal olabilir ancak çoğunlukla ile multifokaldir ve displazinin multifokal olması kanser gelişimi riskini artırmaktadır[36].

Displastik lezyonlar makroskopik olarak; kolitik mukozada endoskopik olarak görülemeyen flat lezyon, plak benzeri, lokalize kabarıklık ya da multifokal lezyonlar şeklinde görülebilir. DALM (dysplasia associated lesion or mass) ise endoskopik olarak görülebilen ancak endoskopik olarak çıkarılmayan kabarıklık lezyonlardır. Bu lezyonlar yüksek olasılıkla malignensi ile birliktelik göstermektedir [38]. Kolit zemininde sporadik adenomlara benzeyen polipoid lezyonlara ALM (adenoma-like lesion or mass) adı verilir [39]. Adenoma benzeri DALM ve ALM ayrımı çoğu zaman mümkün olmamaktadır. Adenoma benzeri DALM, yamasal displazi alanları içeren flat mukozaya ile çevrilerek sınırlandırılmış lezyonlardır. Plak benzeri ve sesil olabilir; ancak daha küçük olan pediküllü veya sesil adenomlardan (ALM) farklı olarak daha geniş ve büyüktür. DALM ve sporadik adenomlarda; polipteki mononükleer inflamasyon miktarındaki artış dışında patolojik, immunohistokimyasal ve moleküler çalışma bulguları benzerdir. Adenoma benzeri DALM lezyonlar daha çok uzun süreli hastalık süresine sahip, genç yaşta hastalık başlangıcı olan ve daha ekstensif hastalık yayılımına sahip ÜK hastalarında meydana gelir. Özellikle 40 yaşının üzerindeki olgularda, DALM ile adenom ayırımında, lezyon çevresi mukozada displazi varlığının bulunması yardımcıdır [40-42].

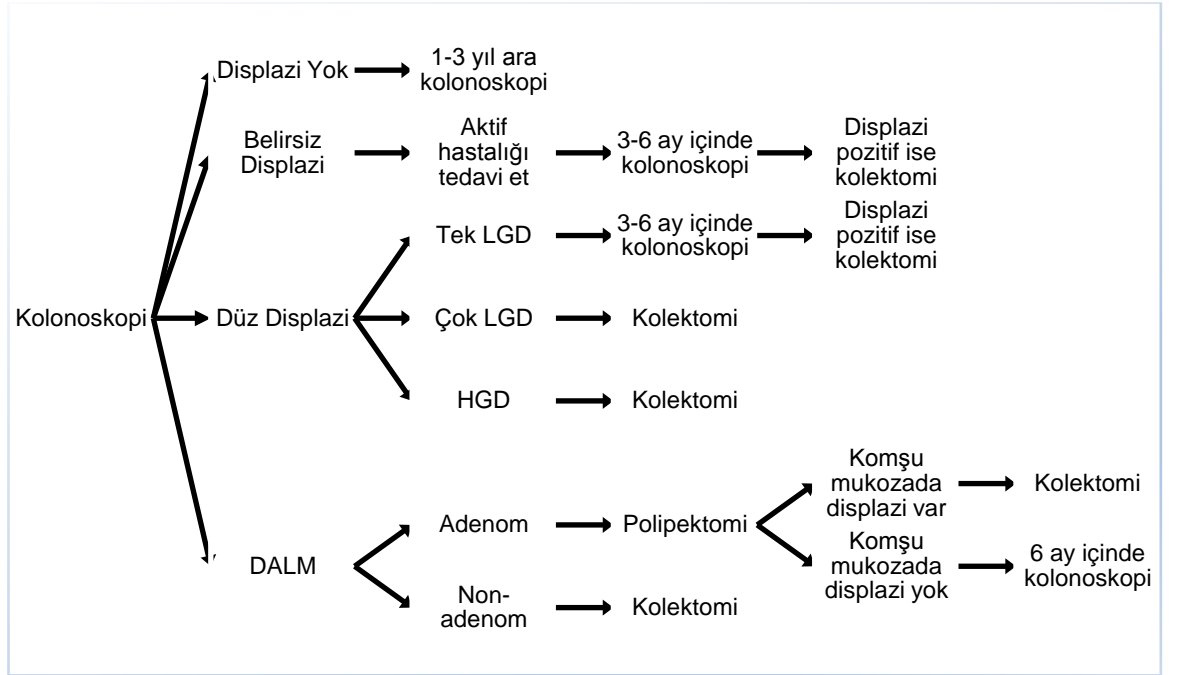
Displazi şiddeti için Riddel ve ark [36] tarafından 1983'te oluşturulan; tanımlanamayan displazi, düşük derece displazi (LGD; low grade displasia), yüksek derece displazi (HGD; high grade displasia) ve kanser olmak üzere standart sınıflandırma kullanılır. LGD hastaların kolektomi sonrası kolon patolojik değerlendirmesinde eş zamanlı adenokarsinom saptanma oranı %20 saptanmıştır. Ayrıca LGD saptanan olgularda HGD ya da KRK ilerleme olasılığı ise %39'dur. HGD'de ise %43 eş zamanlı malignite riski vardır[43-

45]. KRK'li olgularda; kanser dışındaki alanlarda % 60-73'ünde displazi saptanırken, % 13-40 arasında değişen oranlarda ise herhangi bir displazi odağı saptanmamaktadır[46, 47]. Displazilerinin farklı derecelerinin prevalansı; ÜK hastalarının kolonoskopi taramalarında alınan biyopsi sayılarının farklılığına ve mikroskopik değerlendirmede patoloğların displazi şiddetinin farklı yorumlamalarına bağlı olarak değişmektedir. LGD'in doğal seyri tartışmalıdır, 5 yıllık hastalarda progresyon oranı % 50'ye kadar çıktığını bildiren çalışmalar mevcuttur. LGD'nin bildirilmiş spontan kaybolma oranı tanı anındaki yanlış pozitifliğe, takipteki yanlış negatif saptanmaya ya da gerçekten de doğru olarak lezyonun spontan regresyonuna bağlı olarak değişmektedir [48-51]. HGD % 25-45 arasında kansere progrese olduğu bilinmektedir [44, 50].

2.6.2. Ülseratif Kolit Hastalarında Kolorektal Kansere Tarama

KRK gelişimindeki takip, erken teşhis ve tedavide öncelikli hedef inflamasyon-displazi-karsinom sekansındaki premalign lezyon olan displazi safhasında hastalara müdahale etmektir. Uzun süreli hastalık varlığı, hastalığın yaygınlığı, PSK (primer sklerozan kolanjit) varlığı, ailede kolon kanseri öyküsü, inflamatuvar aktivitenin şiddetli olması, hastalığın genç yaşta başlaması; ÜK'li hastalarda displazi gelişimi ve KRK riskini arttıran faktörlerdir. Standart olarak pankolit tutulumu olan hastalar 8. yıldan, sol kolitli hastalar ise 15. yıldan itibaren, risk faktörleride göz önünde bulundurularak kolonoskopi ile taramalıdır. Kolonoskopi ile tüm kolon değerlendirilmeli ve her 10 cm'de 4 kadrandan biyopsi alınarak takip ve taramalarının yapılması gereklidir. Takip kolonoskopilerinin sıklığı ilk kolonoskopideki displazi varlığına bağlıdır. Eğer ilk kolonoskopide displazi saptanmadı ise 1-2 yılda bir takip yeterlidir. Eğer 2 kolonoskopi sürecinde displazi saptanmadı ise takip aralıkları 3 yıla çıkartılabilir. ÜK hastalarında displazi yönetimi ise displazi şiddetine ve lezyonun tipine göre belirlenmektedir[52]. (Şekil1)

Şekil 1 Ülseratif Kolit Hastalarında Displazi Takibi[53]



2.7. Kolorektal Kanser ve Genetik

KRK'ler genetik yatkınlık ve çevresel etkiler arasındaki etkileşim sonucu uzun sürede ortaya çıkmaktadır. Karsinogenez birçok basamaktan oluşan aşamalı bir süreçtir. KRK karsinogenezde patogenetik mekanizmayı farklılaştıran, birden fazla genetik ve epigenetik değişimin aşamalı olarak birikimi söz konusudur. Aslında genetik ve epigenetik değişimler kompleks olan KRK karsinogenezini birlikte düzenlemektedirler.

Tümör gelişiminde en önemli faktörlerden biri tümör hücrelerinin kendilerinin büyüme faktörü üretmeleridir. Bu üretim; kendi ürettikleri biyolojik aktivasyona sahip bu faktör ile OTOKRİN LOOP adı verilen bir siklus sonucu proliferasyondur. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR-epidermal growth factor reseptor) tümör gelişiminden sorumlu bir diğer faktördür. Karsinogenez sürecinde meydana gelen genetik ve epigenetik değişimler; EGFR'ünü değiştirerek hücrel değişiklikler yaptıkları kanıtlanmıştır. Kolorektal kanser gelişiminde de EGFR ve benzeri birçok büyüme faktörlerinin etkisi vardır.

2.7.1. Sporadik KRK Karsinogenez ve Genetik

KRK karsinogenezde, kromozomal instabilite, mikrosatellit instabilite olmak üzere iki ana yolak bulunmaktadır. Bu yolakların herbirinde; patogenetik mekanizmayı farklılaştıran, birden fazla mutasyonun aşamalı olarak birikimi söz konusudur. Bu yolaklarda görev alan genler ve oluşan mutasyonların birikim mekanizmaları da birbirinden farklılık göstermektedir. KRK'lerin %75'i kromozomal instabilite (supresör) ara yolu, % 15'i ise mikrosatellit instabilite (mutatör) yolağı üzerinden gelişirken; geri kalan % 10'u ise aslında bir epigenetik değişiklik olan CpG ada metilasyon fenotipi (metilatör) yolağı üzerinden gelişir [35, 54].

2.7.1.1. Kromozomal İstabilite

Kromozomal instabilite yolağında çeşitli tümör supresör genlerde ya da onkogenlerde ardı ardına oluşan mutasyonların kümülatif etkisi söz konusudur. Delesyon, duplikasyon, kromozomal rearanjman gibi aneuploidi ile sonuçlanan genetik değişiklikler içermektedir. Anormal kromozom ayrımı ve anormal DNA içeriği (Aneuploidi) oluşumu kromozomal materyal kaybı ile sonuçlanır (allel kaybı ya da heterozigot kaybı) [35]. Bu yolakta kromozomun tümünde ya da büyük kısmında kayıp ya da kazanma söz konusudur. Ayrıca vahşi tip olarak adlandırılan somatik mutasyon ile oluşan LOH (loss of heterozigot; heterozigot kaybı) ise her iki genin sadece bir kısmının kaybı olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir allelin mutasyonu ile ilişkili bir allelin kaybı sporadik KRK'de inisiasyon ve progresyonuna neden olan anahtar tümör supresör genin (TSG) fonksiyon kaybına yol açar. Büyüme engelleyici genlerin etkilenmesi ve epitelin sürekli olarak mutasyonlara maruziyeti ile apoptozis engellenmiş olur [55, 56].

Bu modele adenom-karsinoma sekansı adı verilmektedir. KRK oluşum mekanizmasında % 80 rol almaktadır. Kolon epitelindeki basit bir kript lezyonundan adenom gelişir, sonrasında da adenomdan displazinin progresyonu ile KRK gelişimi gözlenir. Basit adenomdan KRK gelişimi ortalama olarak 10 yıl sürer. Bu süreçte; adenom gelişiminde, erken dönemde, APC tümör supresör gen mutasyonları gözlenirken, daha ileri evrede KRAS mutasyonları ve maligniteye geçişte ise 18q delesyonu ve p53

mutasyonu gelişir. APC (Adenomatöz polipozis koli) geni, MCC (Mutated in colon cancer) geni, DCC (deleted in colon cancer) geni, 18 q delesyonu (18. Kromozom uzun kolu) ve p53 (17. Kromozomun kısa kolu) geni, adenoma-karsinom sekansında somatik mutasyonlar ile kromozomal instabilite yolağında rol alan KRK supresör tümör-genezis fenotipindeki TSG'lerdir [57]. Supresör yolak aracılığı ile oluşan tümörlerde mikrosatellit yolak stabildir (MSS). Kromozomal instabilite yolağında WNT, p53, RAS-MAPK ve TGF- β /SMAD olmak üzere 4 ayrı alt sinyal iletim yolağı vardır[58].

APC Gen: APC geni kapı koruyucu genidir. Kolon epitelinde APC gen fonksiyon kaybı KRK tümörögenезisinde erken aşamalarda meydana gelmektedir ve adenom-karsinom sekansında ilk oluşan mutasyondur. Fonksiyon kaybını gendeki mutasyon başlatır [59]. WNT sinyal iletiminde önemli görevler üstlenen APC TSG'dir. Normal APC geni Beta-catenin seviyesini düşürür ve sonuç olarak β -catenin/T hücre faktörü ilişkili transkripsiyon baskılanmış olur. Bu baskılanma gerçekleşmez ise MYC gibi transkripsiyon ilişkili büyüme genleri aktive olur. APC geninde somatik mutasyonlar sporadik KRK ve adenomların %60-80'inde ortaya çıkmaktadır. Bu genin inaktivasyonu kesintisiz hücresel proliferasyon ve kolonda neoplazinin başlangıcı için gereklidir [5].

RAS Onkogen: Hücrede, Çeşitli hormonlar, büyüme ve diferansiyasyon faktörleri tarafından RAS-MAPK sinyal ara yolu kullanılmaktadır. Bu yolağın aktif hale geçebilmesi için RAS proteininin aktivasyonu gereklidir. K-RAS geni hücre membranında mitojenik sinyal değişimini sağlayan proteini kodlar. RAS proteininin aktif hale geçmesi için posttranslasyonel modifikasyondan sonra membrana yerleşmesi gerekir. K-RAS aktivasyonu ile hücre membranında GDP den GTP oluşumu sağlanır ve spesifik transkripsiyon faktörlerinin kaskadı başlar. Aktive olan RAS sırası ile RAF, MEK ve ERK proteinleri aracılığıyla bir kinaz kaskadı oluşur. Hücreye büyüme sinyali geldiğinde, RAS-GTP haline dönüşür. Aktif olan RAS, RAF proteinini harekete geçirerek mitogenez sürecini başlatır. RAS proteini, normal dokuda proliferasyon ve diferansiyasyon sinyallerinde önemli bir role sahipken, mutant genin oluşturduğu RAS proteini, birçok kanser tipinde etkili

potansiyel onkojenik bir proteindir. RAS onkogeni, neoplastik sürecin progresyonu sırasında; adenoma-karsinoma sekansının orta aşamalarında görev alan onkogendir. Sporadik KRK'lerin yaklaşık %40-65'inde RAS geninde, çoğunlukla da K-RAS'da, nokta mutasyonları vardır [5, 60]. Mutasyonların % 85'i kodon 12 ve 13 üzerinde lokalizedir. RAS gen mutasyonlarının, kanserlerin %47'sinde, 1 cm'den büyük adenomların %58'inde ve 1 cm'den küçük adenomların %10'unda bulunması neoplazi oluşumuna erken evredeki olayların zemin hazırladığı fikrini desteklemektedir. Fakat RAS aktivasyonu tek başına kansere progresyon için yeterli değildir [5, 60].

B-RAF Onkogen:2000'li yıllarda tümör biyolojisi üzerinde yapılan çalışmalarda bir proto-onkogen olan B-RAF geninde meydana gelen mutasyonun çeşitli kanser türlerinde var olduğu tespit edilmiştir. Tüm insan tümörlerinin %8'inde, kolorektal tümörlerinse %5-12'sinde B-RAF mutasyonu rapor edilmiştir. B-RAF proteini, RAS proteini tarafından stimüle edilen ve RAS-MAPK sinyal ara yolunda görev almaktadır.B-RAF geni tarafından kodlanan B-RAF proteini, MAP kinaz sinyal yolunda düzenleyici görevi görmektedir. Onkogenik B-RAF mutasyonları, B-RAF'ın yapısal olarak aktif formda olmasına ve RAF-MEK-ERK yolağında aşırı aktivasyona yol açmaktadır. Bu yolağın aşırı aktivasyonu ise hücre büyümesi ve proliferasyonunu stimüle etmekte ve hücre ömrünü uzatmaktadır.KRK'lerin %40'ında meydana gelen B-RAF mutasyonu, hücre tamiri mekanizmasını bozar. B-RAF mutasyonları daha çok sağ kolon yerleşimli tümörlerde görülür, genellikle peritoneal metastaz yaparlar. B-RAF mutasyonu olan vakalarda prognoz kötüdür[61, 62].

Kromozom 18q (DCC; Deleted in colorectal cancer); Karaciğer metastazı olan KRK olguların neredeyse tümünde saptanan 18. kromozomunun uzun kolu üzerindeki heterozigod kaybı (LOH) durumudur. Adenomdan kanser gelişmesinde APC ve K-RAS mutasyonundan sonra orta ve geç evrede ortaya çıkar. 18q bölgesinin kaybının DCC (deleted colon cancer) tümör supresör geninin inaktivasyonuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir. RAC1 proteini sinyalini down regülasyonunu sağlar.

Caspas-9 ile apoptozisi tetikler. Bu mutasyon varlığı kötü prognoz göstergesidir[63].

P53 Gen; Kromozom 17p üzerindeki TSG olan p53 hücre proliferasyonunda rol oynar. Normal fonksiyon gördüğünde hücre büyümesini baskılamaktadır. G1 safhasında hücre siklusu ve apoptoziste kontrol noktası olarak rol üstlenir. P53 393 aminoasitli hücre bölünmesinde çeşitli aşamalarda kontrol noktalarına bağlanarak hücre büyüme inhibisyonunu sağlar ve transkripsiyonu aktive eder. DNA tamir edilinceye kadar genetik olarak hasarlı hücrenin hücre bölünme siklusunda G1 ve G2 safhasında kalmasını sağlayarak S fazına girişini geciktirir [35]. P53 geni en iyi tanımlanmış olan p21 ekspresyonu olmak üzere apoptoziste görev alan 20 farklı gen ile ilişkilidir. p53'ün mutasyonu KRK oluşumundaki adenoma–karsinoma sekansında geç bir fenomen olarak görülür. Bu mutasyon kanserli vakaların yaklaşık %75'inde bulunur. p53 tümör supresör geni çoğunlukla rektum orijinli olmak üzere KRK kanserde yaygın olarak mutasyona uğrar. Mutasyon varlığı kötü prognoz ile ilişkilidir. Özellikle proksimal tümörlerde lenfatik invazyon ve distal KRK' de de düşük sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [5, 63].

2.7.1.2. Mikrosatellit İnstabilite

Hücre bölünürken replikasyon esnasında tekrar dizilerinin olduğu kısımlarda spontan olarak ya da çevresel faktörlerin etkisi ile DNA polimeraz hata yapmasına bağlı olarak DNA hasarı oluşmaktadır. Bu durum replikasyon hatası ("replication error, RER") olarak adlandırılır. Hata, bir tekrarın atlanması, yanlış baz eklenmesi ya da fazla sayıda tekrar dizisi eklenmesi şeklinde olabilir. Replikasyon sırasında oluşan bu DNA hasarları DNA polimeraz 3'-5' eksonükleaz enzimi aktivasyonu ile hemen düzeltilir. Bu onarım mekanizmasında kaçırılan ve onarılamayan DNA hataları ise MMR (mismatch repair) sistemi ile onarılır. Mikrosatellitler insan genomunda aralara serpiştirilmiş kısa tekrarlı nükleotid sekanslarıdır. Mikrosatellitler normal DNA replikasyon sürecinde oluşan DNA baz çifti uyumsuzluklarının tamirinde görev alır[64-66].

Mutatör ara yol olarak da bilinen mikrosatellit instabilite ara yolu (MSI), DNA yanlış eşleşme tamir ("mismatch repair system, MMR") genlerindeki mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. DNA MMR genlerinin kaybı ile tekrarlayan DNA dizileri olan mikrosatellitler DNA replikasyonu sırasında dengesizleşir. Bu durumun tekrarlayan DNA dizilerinde de devamı ile mikrosatellit dengesizliği oluşur. MSI tümörögenезin erken aşamalarında erken prekanseröz lezyonlarda meydana gelir. Missmatch tamir genlerinin kaybı KRK karsinogenезinin % 15-20 oranında mekanizmasında rol almaktadır. Mikrosatellit instabilite (MSI) KRK' de mutator fenotip gelişimine yol açar. Normalde mikrosatellit dizilerinin çoğunluğu; genlerin kodlayıcı bölgelerinin üzerinde bulunması nedeni ile bu genlerde meydana gelen mutasyonlarda sessiz kalmaktadır. Ancak hücre büyümesi ile ilişkili genlerin bulunduğu lokalizasyonlarda oluşan mutasyonlar ise tekrarlayan ünitelerde baz çifti insersiyonuna ya da kaybolmasına yol açabilir. MSI olarak adlandırılan DNA tamir genlerindeki mutasyonlar genomik lokasyondaki genetik hata ile karakterize kanser ile sonuçlanır. Bu hatalar transforming growth factor TGF- β RII, IGF2R ve BAX gibi tercih edilen hedef genleri etkiler. Sonuçlanan MSI normal kolon doku homeostazisini elverişsiz hale getirir[35, 64, 65, 67]. TGF B sinyalizasyonu kolonik epitel hücrelerinin büyümesini inhibe etmektedir. TGF-B1 bazı mezoderm hücrelerinin farklılaşmasını inhibe eder, epiteliyel hücrelerin proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe eder. TGF-b1' e yanıtı azalan hücreler kontrolsüz büyüme gösteririr tümörojenik hale gelir. TGF-b1'in büyüme baskılayıcı etkisi TGF-b1 tip 2 reseptör (TGF-b1RII) tarafından düzenlenir. Tümör ile ilişkili tüm TGFb1RII mutasyonları MSI ile karakterizedir [64, 65, 67].

MMR genleri hMLH1, hMSH2, hMSH6, PM1S, hPMS2'dir. HNPCC'de ve bazı proksimal sporadik KRK'lerde hMSH2 ya da kromozom 2p lokasyonundaki insan muS geni homoloğu ya da kromozom 3p lokasyonundaki hMLH1 geni gibi DNA tamir genlerinde mutasyonlar meydana gelir. MSI diploidi sonucu; az diferansiye, müsinöz lenfositik infiltrason gösteren proksimal kolon yerleşimli tümör gelişir[64, 65, 67].

2.7.2. Ülseratif Kolit İlişkili Kolorektal Kanser

ÜK ilişkili KRK meydana gelişi ve ortaya çıkışı; hücre bölünmesi ve hücre ölümü ile karakterize bozuklukların izlendiği karmaşık bir süreçtir. Bu karmaşık süreçte; negatif displazi, tanımsız displazi, displazi ve kanser olmak üzere aşamalı histolojik progresyon meydana gelir[36]. Proliferasyon ve apoptozis oranı inflamasyonun histolojik aktivitesine göre belirlenmektedir [68]. Displazi alanları; kanser dokusu etrafında daha az şiddette displazi içeren alan, bu alanın etrafında da daha geniş normal mukozal alanın olduğu geniş alanlar kümesidir. ÜK'li hastalardaki kolon mukozası histolojik olarak olan mukozada kümelenmiş şekilde yüksek seviyede kromozomal anormallikler gösterir. Genomik dengesizlikler preinvaziv neoplazilerin önemli habercisidir. Daha yaygın olan ve daha kolaylıkla tespit edilebilen, histolojik displazi alanı içindeki genetik olarak daha aberran olan preneoplastik klonun klonal çoğalması ile ÜK ilişkili KRK oluşur. Aneuploidi uzun zamandan beri var olan non-displastik ÜK'li kolonik epitelde saptanabilmektedir [28, 69-71]. Aneuploidi anormal histolojinin gözleendiği aynı kolon lokalizasyonunda ancak daha geniş bir alana yayılmış bir şekilde gözlenmektedir [71]. K-RAS onkogenindeki nokta mutasyonları (% 0-15) ve displazi (% 0-24) ÜK ilişkili KRK'de sporadik KRK (% 75) ve adenoma göre daha az sıklıkla görülmektedir. K-RAS mutasyonu displazide, villöz dejenerasyonda ve aktif ÜK'te saptanmaktadır [72]. Src protoonkogen aktivasyonu ÜK ilişkili KRK karsinogenezinin erken döneminde meydana gelmektedir[73]. Hücrel Src sitoplazmik protein tirozin kinazları kodlar. Hücrel Src aktivitesi KRK'de, inflame, displazik, malign ÜK neoplazilerinde artmıştır [73]. Src aktivitesi non-displastik ÜK epiteline göre orta derecede displazi saptanan ÜK epitelinde 6-10 kat daha yüksektir. En yüksek Src aktivitesi ise malign ve ciddi derecede displazi bulunan ÜK epitelinde en yüksek oradadır[73]. APC genindeki değişiklikler sporadik KRK'e göre ÜK ilişkili KRK'de daha az sıklıkla gözlenmektedir [71]. 8p'de allel kaybı non invaziv düşük dereceli displazi ve yüksek dereceli displazi de gözlenmektedir [71, 74]. 18q'a bağlı allel kaybı displastik ve non-displastik epitelde saptanır [71]. Mutasyon ve LOH'a bağlı p53 inaktivasyonu ÜK'li mukozada malign transformasyon

gelişimi için ana mekanizmadır. Sporadik KRK karsinogenezinden farklı olarak p53 inaktivasyonu daha erken aşamalarda, non-invaziv evrede gözlenir [75, 76]. ÜK'te; p53'teki single base miss-sense mutasyonlar aminoasit değişikliğine ve bunun yanı sıra 287-288 kodonlarındaki 5-base mikrodelenasyonları da kodon akışında erken duraklama ve çerçeve kaymasına yol açar [76]. Kodon 248 gibi diğer spesifik mutasyonlar sadece kanser/displazi'de gözlenmez, ayrıca histolojik olarak non-displastik ve tanımsız displazi bulunan epitelde de gözlenebilmektedir [72]. ÜK ilişkili KRK'li hastalarda p53'e mutasyon sporadik KRK'li hastalara göre daha yüksek oranda gözlenmektedir [75]. P53' teki mutasyon ve allel kaybı histolojik anormalliklerin derecesi ile orantılıdır. LOH; HGD ve kanserli dokuda, negatif ve tanımlanmamış displazili dokuya göre daha dominant olarak meydana gelmektedir. P53 mutasyon alanları LOH alanlarına göre değildir; ancak normal ve diploid dokuda da bulunabilmektedir [75, 77]. ÜK ilişkili KRK gelişiminde LOH, p53 mutasyonundan daha önce meydana gelen görece erken genetik olaydır. Sporadik KRK'de ÜK ilişkili kolite göre daha geç dönemde meydana gelen LOH başlangıçta sağkalım avantajı oluşturur [75]. Primer tümörden lenf nodu metastazlarına kadar p53 mutasyonlarının var olması bu mutasyonun malign fenotipi sağladığını göstermektedir [76]. Sporadik KRK karsinogenezini ile karşılaştırıldığında ÜK ilişkili KRK karsinogenezinde MSI rolü net olarak tanımlanamamıştır [76]. Defektli tamir genleri hem erken hem de ilerlemiş ÜK ilişkili KRK'de saptanmaktadır [66]. TGF- β 1RII poly-A mikrosatellit yolağının mutasyonel aktivasyonu instabil ÜK neoplazmalar alt grubunda ve sık olarak sporadik KRK'de KRK karsinogenezinin erken döneminde oluşmaktadır [67]. MSI-pozitif ÜK ilişkili KRK'li hastaların ortalama 1/5'inde bahsedilen bu mutasyon izlenmektedir [67]. Metilasyon'un ÜK ilişkili KRK'de genetik değişiklik oluşmasında rol üstlendiği varsayılmaktadır [35]. Çeşitli genlerdeki CpG adalarının metilasyonu displazi gelişiminden önce meydana gelmektedir ve mukozada geniş bir şekilde dağılmaktadır. MSI gözlenen örneklerin % 50'sinden fazlasında hMLH1 metilasyonu mevcuttur [35]. Non-displastik

mukozada ve bundan daha fazla oranda neoplastik dokuda da var olan hücre siklus inhibitörleri (p16 ve p14) sıklıkla hipermetilasyona uğramışlardır [35].

Şekil 2: KRK' de Karsinogenez Aşamaları



ÜK ilişkili KRK ve sporadik KRK karsinogenezi karşılaştırılmıştır. Her iki kanser tipinde de tümör supresör genler ve onkogenlerdeki mutasyonların izlendiği aşamalı gelişim gözlenmektedir. Her iki yolaktaki ana fark mutasyonların görülme zamanıdır[78].

2.8. Kolorektal Kanser ve Epigenetik

2.8.1. Epigenetik

Epigenetik, DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan, ama aynı zamanda kalıtsal olan, gen ifadesi değişikliklerini inceleyen bir alandır. Bu alan, kalıtımsal olup genetik olmayan fenotipik varyasyonları incelemektedir. Bu değişiklikler hücreyi doğrudan etkilemektedir ancak, DNA dizisinde hiçbir değişiklik gerçekleşmemektedir [79].

Kromatin; Bölünme sürecine geçmekte olan hücrede, ışık mikroskopi altında yapılan incelemede, çekirdeğin içinde ince ipçiklerden oluşmuş, yumak biçimindeki bir ağ yapısına kromatin adı verilir. Elektron mikroskop ile yapılan incelemelerde, kromatide ökromatin ve heterokromatin olarak adlandırılan, birbirinden farklı iki yapısal bölüm saptanmıştır. Çekirdeğin metolizma bakımından çok aktif olan bölümüne ökromatin, koyu renkli izlenen ve metabolik bakımdan daha az aktif olan bölüme heterokromatin adı verilmektedir [79].

Histon; DNA ve proteinler çok yakın ilişkili içersindedir. Proteinler DNA' nın sentezinde ve çekirdek içinde düzenlenmesinde görev alırlar.Kromatin yapısında;DNA ve DNA haricinde DNA'nın iki katı kadar protein bulunur. Hücre çekirdeğindeki bu proteinler, asidik özellikte "histon olmayan" ve bazik özellikte "histon" tipi proteinlerdir. Bir fareninkaraciğer hücresinde yapılan araştırmada hücre çekirdeğindeki proteinlerin %11'i histon, %19'u histon olmayan proteinlerden oluşmaktadır. Ökaryotik hücrede bulunan küçük moleküler ağırlığa sahip bu proteinler lizin ve arjinin içeriklerine göre adlandırılır. H1 (H5 olarakta adlandırılır), H2A, H2B, H3, H4 ve arkeal histonlar olmak üzere 6 alt tipi mevcuttur. Bu proteinler, DNA'nın farklı bölgelerine bağlanmak sureti ile yakınında bulunan genlerin aktivasyonu ve inaktivasyonunda görev alırlar. Histonları kodlayan genlerin mutasyonu ya da kontrolsüz ifade edilmesi kanser dahil olmak üzere birçok hastalıkta önemli görevler üstlenmektedirler [79].

Nükleozom; DNA ipliğinin histonlar üzerine sarılması sonucu oluşan, 100 A⁰ uzunluğunda aralıklarla yerleşmiş, 4'lü formda bulunan, kromatin üzerindeki nükleoproteinlerdir. Histon proteinlerinden oluşan nükleozomlar,

birbirlerinden linker ya da spacer DNA ile ayrılırlar. Herbir nükleozomda; H₂A, H₂B, H₃ ve H₄ histonlarından ikişer adet bulunmaktadır. Herbirinden 2 adet bulunan 4 nükleozomal proteini, H1 histonu tarafından sarılılır. Tüm bu proteinleri sararak ve bağlanarak bir arada tutan linker DNA ile de nükleozom meydana gelir. Nükleozomlar üst üste kıvrılması ve katlanması ile nükleozom paketleri oluşur. Kıvrımların daha da artması sonucunda kromatin ipliğindeyoğunlaşma gerçekleşir [79].

2.8.2. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar: (1) Doğrudan gen ifadesini kontrol eden veya etkileyen mekanizmalar ve (2) Dolaylı yoldan gen ifadesini kontrol eden veya etkileyen mekanizmalar olmak üzere ikiye ayrılır[79].

Dolaylı yoldan gen ifadesine etkileyen mekanizmalar post-transkripsiyonel mekanizmaları (transkripsiyon sonrası, yani ana DNA molekülünden RNA molekülü elde edildikten sonra) ve özellikle de nonkoding RNA'nın (RNAi vb.) kodlayıcı RNA (mRNA) üzerine etki yaparak protein sentezini engellemesini içerir. Doğrudan etkileyen mekanizmalar da (1) DNA düzeyindeki modifikasyonlar ve kromatin düzeyindeki modifikasyonlar olmak üzere ikiye ayrılır.

DNA düzeyindeki modifikasyonlar; (1) Kovalent DNA modifikasyonu (DNA metilasyonu) (2) Non kovalent DNA modifikasyonu (3) Transkripsiyon faktörleri tarafından kovalent ya da non-kovalent feed-forward oto regülasyon olmak üzere üçe ayrılır. DNA düzeyindeki modifikasyonlar arasından bilinen en işlevsel olanı DNA metilasyonudur.

Kromatin düzeyindeki modifikasyonlar hem kovalent hem de non-kovalent olabilirler. Bu modifikasyonlara bağlı genlerde sessizleşme olabilir. Bu sessizleşme geni inaktive eden mutasyon ya da delesyon mekanizması ile eşdeğerdir.

Kromatin düzeyindeki kovalent modifikasyonlar histon modifikasyonlarıdır. Bu kovalent histon modifikasyonları (1) Asetilasyon, (2) Metilasyon, (3) Fosforilasyon, (4) Ubikitinasyon, (5) Sümoilasyon 'dur.

Non-kovalent kromatin modifikasyonları ise; (1) Histon takasları, (2) Histon katımları, (3) Kromatin onarımı, (4) Non-koding DNA ile etkileşim, (5)

Diğer ajanlarla etkileşim (virüsler, farklı protein grupları), Uzun-mesafe kromozom etkileşimleridir. (Hem kromozom içi hem de kromozomlar arası)[79]

2.8.3. Kolorektal Karsinogeneziste Epigenetik Mekanizmalar

Son yıllarda özellikle gen aktivasyonlarının epigenetik kontrol alanı olmak üzere bu alan gittikçe ilgi çekici olmaya başlamış ve araştırılmıştır. Epigenetik değişimler, primer olarak DNA sekansında değişiklik olmaksızın genomdaki kalıtsal modifikasyonlar olarak tanımlanır. Gen ekspresyonu düzenlenmesinde temel rol üstlenen epigenetik değişiklikler DNA metilasyonu, spesifik histon modifikasyonlarını ve kodlanamayan RNA (özellikle sessiz RNA ve mikroRNA (miRNA)) aralıklarını içerir[80].

2.8.3.1. DNA Metilasyonu ve Transkripsiyonel Sessizleşme

En iyi tanımlanmış epigenetik modifikasyon; CpG dinükleotidlerinin oluşumuna yol açan sitozine kovalen metil grubunun (CH₃) eklendiği metilasyondur. Bu değişiklik sitozin-guanin eşleşme zenginliği (CpG) ada metilatör fenotipi olarakta adlandırılır (cytosine guanine pairing rich (CpG) island methylator phenotype CIMP). “CpG” adaları, yüksek oranda guanin-sitozin dinükleotidleri içeren genom bölgeleridir. Tüm genomun % 1’ ini oluşturan CpG adaları, genlerin promotor bölgelerinde, 5’ uçlarında görülür ve birçoğu transkripsiyon bağlanma bölgesi içerir. İnsan promotorlarının % 60’ ından fazlasında “CpG” adasının yer aldığı saptanmıştır. Promotor bölgelerde görülen “CpG” adaları, normal koşullarda aktif olan bir gende metillenmemiştir. Bu bölgelerdeki sitozin bazlarının DNA metiltransferazlar tarafından metillenmesi sonucu ilgili gen susturulur ve protein ekspresyonu gerçekleşemez[35].

CpG ada hipermetilasyonu sıklıkla normal mukozada yaşlanmaya bağlı olarak başlar ve kanserde belirgin olarak artış gösterir. Hipermetilasyonda gen sessizleşmesi klonaldır ve somatik hücrelerde fizyolojik olarak geri dönüşümsüz olduğu düşünülmektedir. Sitozin nükleotidine metil grubunun bağlanması “G-C” baz eşleşmesini etkilememektedir. Ancak metil gruplarının dışarı doğru çıkıntı yapması, transkripsiyon için gerekli DNA-protein etkileşimini engellediği için gen ifade

edilemez ve böylece gen susturulmuş olur. Bu durumun mitoz bölünmeler ile yeni hücrelere de aktarılır. CpG adacıklarının metilasyonunun, DNA sekansı ile bağlantı göstermemesi nedeni ile epigenetik bir durum olduğu düşünülmektedir[81].

CpG zengin alanlar (CpG adaları) housekeeping genlerin promotor regülatör alanlarının tümü ile olduğu kadar doku spesifik genlerin promotor regülatör alanlarının yarısı ile de ilişkilidir. Promotor hipermetilasyonu azalmış gen transkripsiyonu ile ilişkili bulunmuştur. DNA metilasyonundaki global değişiklikler kanserdeki genomik instabilite ve çeşitli farklı gen ekspresyonları ile bağlantılıdır. Tümör supresör gen (TSG) promoterlerinin CpG adalarındaki metile sitozin artmış yoğunluğu transkripsiyonda tam duraklamaya yol açar. Birçok kanser türü bu mekanizmayı TSG'leri inaktive etmek için kullanır. Neoplastik hücreler, birçok gende epigenetik sessizleşme ile birliktelik gösteren aberan promotor bölge metilasyonu sergiler. Bu genler hücre siklusu, DNA tamiri ve anjiogenezis kontrolü gibi birçok önemli göreve sahiptir[80, 82].

KRK'lerde %20 oranında CpG hipermetilasyonu, %20 oranında da düşük düzeyde CpG metilasyonu gözlenmekte iken % 60 oranında ise CpG metilasyonu gözlenmemektedir. Tümör manifestasyonunda CIMP ve MSI fenotipleri arasında sıklıkla çakışma söz konusudur. KRK'de CIMP durumu, genellikle MSI durumu, K-RAS ve B-RAF mutasyonları ile ilişkilidir. MSI ve BRAF mutasyonu gösterenler, CIMP1 grubu, MSS ve K-RAS mutasyonu olanlar ise CIMP2 grubu olarak değerlendirilmektedirler. CIMP negatif olanlar ise genellikle MSS kanserlerdir [35, 54, 64, 65].

KRK' de metile olan CpG adaları iki gruba ayrılır. Bunlardan birincisi (tip C); kanser sınırlayıcı metilasyondur. İkincisi (tip A); normal epitel hücre yaşlanması başlangıcındaki metilasyondur. Hücre siklus kontrolü, hücre adezyonu ve DNA tamiri ile ilgili birçok gen sporadik KRK'de metilasyona uğrayabilir. Tip C metilasyon hMH1, MGMT, p16 ve p14 gibi genlerin patolojik susturulmasıdır. Metilasyonun hücre ve doku yaşlanma fizyolojisini değişikliğe uğratması nedeni ile yaşlanma ilişkili tip A metilasyonun sonradan kazanılmış kanser yatkınlığına neden olduğu ileri sürülmektedir

[81]. Yaşlanma bağımlı metilasyonun yüksek düzeyleri KRK gelişimine yüksek yatkınlık ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu hipotezin özellikle inflamatuvar barsak hastalığı gibi erken yaşlanmaya neden olan hızlı hücre turnoverı izlenen durumlarda meydana geldiği düşünülmektedir. Metilasyon ÜK ilişkili KRK yolağında erken meydana gelen değişimlerdenidir. Tümör supresör genlerin aberan metilasyonu ÜK ilişkili KRK karsinogenezindeki erken oluşumdur. [81].

Issa ve arkadaşlarının; ÜK hastaları ile kontrol grubunun ER, MYOD1, CSPG2 ve p16 olmak üzere 4 gendeki metilasyon durumunu karşılaştırdıkları araştırmada budurum irdelenmiştir. Tüm bu 4 gen, kolit ilişkili HGD ve kansere sahip hastaların displastik dokusunda yüksek oranda metilasyona uğradığı saptanmıştır. Buna ek olarak bu genlerden üçündeki (ER, MYOD ve p16) yüksek metilasyon düzeyleri kolit ilişkili HGD ve kansere sahip hastaların normal görünümlü dokusunda da yüksek oranda saptanmıştır. Bu durum yaşlanma ile artan metilasyonun displazi gelişiminden daha önce olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar; yaşlanma bağımlı metilasyonun bulunduğu defektli alanda kazanılmış KRK gelişme yatkınlığının arttığı hipotezi ile tutarlıdır. Yakın zamanda Kukitsu ve arkadaşları; ÜK'teki aberan kript odaklarında hipermetilasyonu ve sonrasında azalmış p16 gen ekspresyonunu tanımlamışlardır [83].

2.8.3.2. miRNA ve Kolorektal Kanser Patogenezindeki Rolü

Kodlanamayan RNA (ncRNA'lar) birçok biyolojik olayın regülasyonu ile ilgili bulunmuştur. Kodlanamayan RNA'lar arasında en geniş olarak araştırılan sınıf mikroRNA'lardır (miRNA). miRNA'lar hücre içi proteinlerin sentezinde görevli mRNA'ların translasyonunun kontrolü ile ilgili post translasyonel gen ekspresyonu susturmasında önemlidir. Bu ncRNA'ları kodlayan genlerdeki genetik yada epigenetik değişiklikler ncRNA ekspresyon profilinde modifikasyonlara yol açar; bu sayede de regüle ettikleri mekanizmalarda değişime yol açarlar[80].Wnt/ β -catenin, fosfotidilinositol-3 kinaz yolağı, KRAS, p53 gibi KRK karsinonezinde görevli birçok onkogenik ve tümör supresör protein miRNA'lar düzenlemektedir; ayrıca miRNA'ların tanısıl ve prognostik marker olarak kullanılabilecekleri belirtilmiştir[84].

2.8.3.3. Kolorektal Kanser ve Histon Modifikasyonu

KRK gelişimi ile ilgili epigenetik mekanizmalardan biri de histon modifikasyonlarıdır. Ayrıca inflamasyonun tetiklediği KRK karsinogenezinde rol alan potansiyel nedenlerden biri de sonrasında uygunsuz gen ekspresyonuna neden olan epigenetik değişikliklerdir. KRK patogenezindeki etkileri ile ilgili olanları daha da az olmak üzere kanserdeki histon modifikasyon değişiklikleri ile ilgili literatürde çok az mevcuttur. DNA'nın paketlenmesinde görevli olan histon proteinlerinin bazik amino-terminal uçları nükleozomdan çıkıntılar yapar ve bir takım posttranslasyonel modifikasyonlara uğrayabilir. Histonlar DNA paketleme proteinleri oluşumunu sağlamak dışında; posttranslasyonel N-terminal kuyruklarının, aminoasit spesifik asetilasyon, metilasyon veya fosforilasyon gibi kompleks modifikasyonu aracılığı ile belirli DNA zincirlerinin regüle ederler. Metilasyon ile birlikte olan kromatin yeniden yapılanması; histon preoteinlerinin kuyruklarında sınırlanmış lizin rezidülerinin modifikasyonunu kapsar. Gen ekspresyon kontrolünün açık olarak bilinen ve net tanımlanan epigenetik mekanizması histon modifikasyonu aracılıklı kromatin yeniden yapılandırılmasıdır. Metilasyon ile birlikte olan ve bahsedilen kromatin yeniden yapılanması gen regülasyonundaki anahtar mekanizmadır. Histonlar üzerinde yapılan bu değişiklikler, kromatinin yapısının gevşek ya da sıkı olma durumunu etkileyerek gen ifadesinde regülatör rol oynar. Örnek olarak, asetil grupları histonlardaki (+) yükü nötralize ederek histonlar ve DNA arasındaki elektrostatik etkileşimleri zayıflatır[79, 80].

Belirli bazı spesifik histon modifikasyonları öökromatinin ve heterokromatinin transkripsiyonel aktif ya da inaktif markırları olarak kullanılabilirler. Histonlardaki modifikasyonların ve DNA metilasyonunun birlikte çalışarak gen ifadesinin durumunu belirlediği ve bu şekilde hücrenin yazgısının belirlenmesinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir[79].

2.8.3.3.1. Histon Asetil Transferaz ve Histon Metil Transferaz

Epigenetik modifikasyonlar arasında; HAT' lar (histon asetil transferaz) tarafından asetillenme ve HMT' lar (histon metil transferaz) tarafından metillenme yer almaktadır. H3 ve H4 histonlarının lizin rezidularından

asetillenmesinin aktif kromatinle korelasyon gösterdiği, deasetilasyonun ise kromatinin daha sıkı bir şekilde paketlenerek genlerin inaktif duruma geçmesiyle sonuçlandığı bilinmektedir. Histonların amino termallerindeki lizin rezidülerinden HDAC aracılı asetil grup uzaklaştırılması kromatin yoğunlaşması, kümelenmesine ve ilgili DNA'da transkripsiyonel inaktivasyona yol açar [80, 85, 86]. Bu transkripsiyonel inaktivasyon tümör supresör gen ekspresyonunun supresyonuna yol açabilir ve tümörögenezi ilerletir. Histon lizin metilasyonu ise, asetilasyonun tersine, hangi bölgede olduğuna göre aktivasyon ya da inaktivasyonla sonuçlanabilir. Lizin asetilasyonu histon'un DNA ile olan ilişkisini zayıflatır, transkripsiyon faktörünün bağlanmasını sağlar ve transkripsiyonu başlatır. Lizin metilasyonu hem aktif hemde regrese DNA bölgeleri ile ilişkili olabilir. Transkripsiyonel sessiz gen prometerleri olarak görünen H3K9 ve H3K27'in metilasyonu yerine Histon H3 lizin 4'ün trimetilasyonu transkripsiyonu aktive eder [79, 80, 87]. Tek başına hipometilasyon sessiz genleri açmaz iken; lokalize hipometilasyon ile birlikte artmış Histon H3 asetilasyonu epigenetik sessiz genlerin eski haline dönmelerine yol açar. Bir çalışma göstermiştir ki;5-aza-dC tedavisinden 10 gün sonra da gen ekspresyonunun devam ettiği gözlenmiştir. Gerçekte bunlarda transkripsiyonun başladığı tarafta lokalize hipometilasyon mevcuttur ve Histon H3 asetilasyonunda artış mevcuttur [80, 88].

Çeşitli kanser ilişkili genlerin transkripsiyonel modifikasyonunda rol alan asetil grup eklenmesi ve çıkarılması 2 farklı sınıf enzimin kontrolü aracılığı ile yapılmaktadır (HDAC (Histon deasetilaz) ve HAT (Histon asetil transferaz)). Histonların N terminalindeki lizin kalıntılarının HAT tarafından asetilasyonu gen transkripsiyonunu aktive ederken, histon kuyruğundaki lizin kalıntılarından HDAC tarafından asetil grubunun uzaklaştırılması transkripsiyonun baskılanması ile sonuçlanır. HDAC ve HAT genellikle transkripsiyonel ko-repressör olarak etki eder. Kronik inflamatuvar yanıt ve karsinogenezde HDAC ve HAT'ların aktivasyonu/inaktivasyonu olaya karışır[79, 80, 85, 86].

Kromatin yeniden yapılanmasında rol alan enzimler histonun kovalent modifikasyonu ya da ATP hidrolizinden elde edilen enerji ile kromatin yapısını değiştirirler. ATP bağımlı kromatin yeniden yapılandırıcı enzim ailesinden olan kromatin zincir helikaz DNA bağlayıcı protein (CHD) ailesi insanlarda 9 farklı protein olan (CHD1-9) içerir. Kansere ilişkili olanı CHD5 proliferasyon ve apoptozisi kontrol eder. İnsanlarda; CHD5 sadece delesyon ile değil aynı zamanda hipermetilasyon ile birlikte inaktive olmaktadır. Bu değişiklikler CHD bağımlı kromatin yeniden yapılandırılmasının deregülasyonu ile kanser patogeneziye katkıda bulunur [89]. Tümör supresör, DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu/deasetilasyonunda görev alan SOCSs ve SHP1 genleri KRK hücrelerinin transkripsiyonel regülasyonunu kontrol ederler. Xiong ve arkadaşları [90] histon deasetilaz inhibitörü (HDACi) olan trikostatın A (TSA) SOCS1 ve SOCS3 genlerinin mRNA düzeylerini arttırdığını göstermişlerdir. KRK'de TSA tarafından SOCS1 ve SOCS2 gen ekspresyonunun indüklenmesi H3 ve H4 histon proteinlerinin asetilasyonunun artması nedeniyle kendilerinin prometer bölgeleri ile ilişkilidir. Her nasılsa SHP1 prometer bölgelerinin histon asetilasyonunda anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. İki ayrı çalışmada; normal doku ve adenomlara göre adenokarsinomda, H4K12ac ve H3K18ac global seviyelerinde artış bildirilmiştir. Ayrıca H3K9me2 ekspresyonunun adenom'dan adenokarsinoma progresyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [80, 91].

2.8.3.3.2. Histon Deasetilaz (HDAC)

Histon deasetilazlar 18 geni içeren, Sınıf I-IV olmak üzere 4 gruba ayrılan bir ailedir. Sınıf I HDAC'lar HDAC1, HDAC2, HDAC3 ve HDAC8; Sınıf II HDAC'lar HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 ve HDAC10; Sınıf IV HDAC HDAC11'den oluşur. Sınıf I,II, IV HDAC'lar klasik HDAC'lar ve Sınıf III HDAC'lar sirtuinler olarak adlandırılır.

HDAC1'in esas fonksiyonu hücre proliferasyonu kontrolünde p21 ve p27 CDK inhibitör (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü) baskılanmasıdır [92]. Birçok çalışmada benzer şekilde HDAC1'in kanser hücrelerinde de hücre çoğalması kontrolünde önemli rol üstlendiği gösterilmiştir. HDAC1 ve HDAC3'ün baskılanması ile hücre proliferasyonu baskılanmaktadır. HDAC4 ve

HDAC7'in baskılanması ise hücre sayısında azalmaya yol açmamaktadır [93]. HDAC1'in baskılanması hücre bölünme sürecinde G1 fazında ya da G2'den M fazına geçişte duraksama ile sonuçlanır. Bu durum mitotik hücrelerin kaybı, hücre büyümesinin durması ve kanser hücrelerinde artmış apoptoz oranına neden olur [94]. Buna karşın HDAC2 baskılanması ise hücrelerde aynı etkiye yol açmaz. HDAC1'in blokajı embriyonik kök hücrelerin proliferasyonunda defektte bağlı olarak 9.5'inde günde embriyonik ölüm ile sonuçlanır. Siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü p21 ve p27 ekspresyonu up-regülasyona uğrar ve global olarak histon deasetilaz aktivitesi down-regülasyona uğrar. HDAC1 fonksiyon kaybı HDAC2 ve HDAC3 up-regülasyonu ile kompanze edilemez [92, 95].

Normal doku ile karşılaştırıldığında gastrik kanserli 25 olgunun 17'sinde (% 60) HDAC1 ekspresyonunun up-regüle olduğu saptanmıştır [96]. Bu bulgular HDAC1, HDAC2, HDAC3'ün prognostik öneminin araştırıldığı, 293 gastrik kanser örneğinin değerlendirildiği ayrı bir büyük çalışmada da doğrulanmıştır [97]. Bu çalışmada artmış sınıf I HDAC ekspresyonu nodal yayılım ile ilişkili bulunmuş, ayrıca gastrik kanserli hastaların sağkalımı göstergesi olan bir prognostik faktör olduğu belirtilmiştir [97].39 pankreas kanserli olgunun değerlendirildiği bir çalışmada; HIF1a ile birlikte yüksek HDAC1 ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur [98]. Benzer bulgular 192 pankreas kanser doku örneğinin değerlendirildiği bir çalışmada da elde edilmiştir. Bu çalışmada yüksek HDAC1, HDAC2, HDAC3 ekspresyonu dediferansiyasyon ve pankreas kanser hücrelerinin artmış proliferasyonu ile ilişkili bulunmuştur [99].

14 olgunun değerlendirildiği başka bir çalışmada prostat kanser dokusu örneklerinde HDAC1 ekspresyonu değerlendirilmiş ve HDAC1 protein ekspresyonu, hormon dirençli ve yüksek grade kanserde; düşük derece kanser ve prostat hiperplazisine göre daha yüksek oranda eksprese olduğu gözlenmiştir[100]. İndiferansiye prostat kanser hücre kültüründe HDAC1 over ekspresyonu artmış hücre çoğalmasına neden olur [100]. Ek olarak hücre bölünmesinin ve apoptozisin kontrolünde HDAC1 çoklu ilaç direncine neden olabilir. HDAC1'in kemoterapi direnci olan nöroblastom hücrelerinde invitro

over eksprese olduğu gözlenmiştir [101]. Non selektif HDAC inhibitörleri olan butirat, TSA ve sciraptaid tarafından ya da RNA tarafından HDAC1'in baskılanması nöroblastom hücrelerinde ürokinaz plazminojen aktivatörünü eksprese eder ve invazyonu azaltır [102]. HDAC inhibitörleri MYCN tarafından güçlendirilen nöroblastoma hücrelerinde migrasyon ve invazyonu azaltır [103].

Hepatosellüler karsinoma' lı (47 olgu) olgularda yapılan bir çalışmada, yüksek HDAC1 ekspresyonu portal vene kanser hücre invazyonu, kötü histolojik diferansiyasyon, daha ileri tümör TNM evresi ve düşük sağkalım oranları ile ilişkili bulunmuştur [104].

Meme, renal ve mesane kanserinin aksine KRK'de HDAC5 ve HDAC7 ile birlikte artmış HDAC1 ekspresyonu gözlenmektedir [105]. RNA bazlı HDAC1 ve HDAC2 baskılanması, KRK hücrelerinin in vitro baskılanmasına yol açmaktadır, ancak HDAC3'ün baskılanması ise KRK hücrelerinde aynı etkiyigöstermemektedir[106]. Yakın zamanda 140 KRK örneğinin incelendiği bir seride, artmış HDAC1, HDAC2, HDAC3 ekspresyon düzeylerinin azalmış hasta sağkalımı ile birlikte olduğu belirtilmiş ve özellikle de HDAC2 ekspresyonunun bağımsız bir faktör olduğu belirtilmiştir [106]. HDAC1 ve metastaz ilişkili protein 1 (MTA-1) nükleozomun yeniden şekillenmesini sağlar ve Histon deasetilasyon kompleksi (NuRD) kanser gelişiminde önemli rol alır. Tümör invazyon derinliği kanser evresi HDAC1 ekspresyonu ile korele olduğu gözlenmiştir. Higashijima ve arkadaşlarının KRK'li hastalar ile yaptığı çalışmada yaş, tümör invazyon derinliği ve vasküler invazyon varlığı MTA-1 ile korele olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada HDAC1 pozitif grupta HDAC1 negatif gruba göre 5 yıllık sağkalım oranları daha kötü saptanmıştır (% 55,1' e karşı % 86,5). 5 yıllık sağkalım oranı MTA-1 pozitif grupta MTA-1 negatif gruba göre daha kötü izlenmiştir (%73,1'e karşı % 50,5). HDAC1 pozitif grupta evre II-IV sağkalım oranı HDAC1 negatif gruba göre daha kötü saptanmıştır. Tedavi yanıtı sonrası HDAC1 pozitif grupta hastaliksız sağkalım oranı yine daha kötü olduğu görülmüştür. Higashijima ve arkadaşları HDAC1 ve MTA-1 ekspresyon düzeylerinin KRK'de potansiyel bir prognostik faktör olduğunu belirtmişlerdir[107]. Gastrointestinal

tümörlerde sıklıkla HDAC1 overekspresyonu ortaya çıkmaktadır. HDAC1 overekspresyonu de-diferansiyasyon, artmış proliferasyon, artmış invazyon, ilerlemiş hastalık ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur[108]

Farelerde deneysel olarak HDAC7 geninin bozulması ile endotelial hücre adezyonunun bozulması, bunun sonucunda dilatasyon ve kan damarlarında rüptür nedeni ile embriyonik ölüm gözlenir. Özellikle embriyogenezin erken döneminde HDAC7 ekspresyonu gözlenir. HDAC7 ekspresyonu ve MEF2 (myocyte enhancer factor-2) ile birlikteliği ile matriks metalloproteinaz10 ekspresyonunun baskılanması sağlanır ve vasküler bütünlük korunur [109]. Endotelial hücrelerde HDAC7'in susturulması morfolojilerini değiştirir. Migrasyon yeteneklerini azaltır, invitro kapiller tüp yapıları oluşturma kapasitelerini azaltır. Hücre adhezyonu, proliferasyonu ya da apoptozisi ise düşünüldüğü gibi kanserde bir anti-anjiogenetik hedef olarak değiştirilemez de [110], KRK'de HDAC7'nin HDAC1 ile birlikte over eksprese olduğu belirtilmektedir [105].

HDAC ailesinin inflamatuvar mukozada karsinom gelişim sürecinde rol aldığını düşündüren çalışmalar mevcuttur. Cao ve arkadaşlarının çalışmasında; dizel egzoz partikülleri maruz kalan bronş epitel hücrelerinde (BEAS-2B) HDAC1 degradasyonuna bağlı histon-4 tetikleyici asetilasyonu sonucu pro-inflamatuvar siklooksijenaz-2 geninde (COX-2) transkripsiyonel aktivasyonun arttığı saptanmıştır[111]. Benzer olarak H₂O₂'e bağlı insan alveoler hücrelerinde (A549) NF- κ B aktivasyonu, IL-8 ve IL-6 ekspresyonu ve salınımı; artmış histon-4 asetilasyonu ve azaltılması, HDAC2 ekspresyonu ve aktivitesi ile ilişkilidir. İnflamasyonun indüklediği histon modifikasyonu ve buna bağlı olarak sonrasında gelişen COX-2 ve NF- κ B'in upregülasyonu; kanser hücrelerinde genetik instabiliteye neden olmaktadır.[111].

2.8.3.3.3. P21 Aktive Edici Kinaz (PAK-1)

KRK karsinogenezinde etkin olduğu gösterilmiş histon modifikasyon genlerinden biri PAK1 (p-21 active edici kinaz) genidir. PAK1 normal olarak hücre büyümesi, motilitesi ve transformasyonunda önemli roller üstlenmektedir. PAK1; küçük GTP'azlardaki akışı etkileyerek, KRK

karsinogenez başlatılmasında ve progresyonunda RAS/RAF/MAPK ve Wnt/ β -catenin sinyalizasyonunu koordine etmektedir[112].

PAK1 WNT sinyalizasyon yolağının merkez molekülü olan β -cateninekspresyonunu düzenler. PAK1 inhibisyonu ile β -catenin ekspresyonunu ve nükleer birikimi azalmaktadır. WNT sinyalizasyon bileşenlerindeki mutasyonlar KRK karsinogenezin başlatılmasında ve progresyonunda anahtar rol üstlenmektedir. Wnt yolağının merkez molekülü olan β -catenin aşırı aktivasyonu; hücre çoğalmasını, hücrenin yaşam süresini arttırır ve KRK tümörogenezinin tetiklenmesini sağlar [113, 114]. Nükleer β -catenin birikimi ve transkripsiyon faktörü olan T cell faktör 4' ün (TCF4) birlikte aktif kompleks [115, 116] oluşturması; c-Myc gibi hedef genlerin up-regülasyonuna bağlı hücre büyümesi tetiklenir ve tümör progresyonu yönlendirilir [113, 117]. β -catenin sinyalizasyonu KRK karsinogenezinin sadece başlatılmasında değil, progresyonunda önemli roller üstlenmektedir. β -catenin nükleer translokasyonu, KRK'in metastaz geliştirmesi ve prognozu ile bağlantılıdır[118].

KRK gelişimi ve progresyonunda; β -catenin ve RAS mutasyonunun sinerjistik etkisi vardır [119-122]. PAK1 RAS ile PI3K bağımlı ve bağımsız yollar tarafından aktive edilir ve KRK hücre proliferasyonu, migrasyonu ve sağkalımı için gereklidir [123]. K-RAS Onkogeni intestinal tümörlerde sinerjik olarak Wnt/ β -catenin sinyalizasyonu arttırır. K-RAS mutasyonu KRK'lerin % 40'ında saptanır ve adenom-karsinom sekansının erken dönemlerinde oluşur[56, 124, 125]. Senkron K-RAS aktivasyonu ve Wnt sinyal yolağının aktivasyon göstergesi olan nükleer β -catenin birikimi; KRK hastalarında kötü prognoz ve KT direnç göstergesidir [119]. APC ve K-RAS gen mutasyonları bulunan fare modellerinde, Wnt/ β -catenin sinyalizasyonu artışının beraberinde tümör gelişimine ve malignitenin progresyonuna katkı sağladığı gözlenmiştir [120]. Bazı Wnt yolağı hedef genlerinin artmış ekspresyonunun K-RAS ve APC gen mutantları ile birlikte sinerjistik etki yaptığı gözlenmiştir. β -catenin ve K-RAS'ın birlikte inhibe edilmesi; KRK hücre çoğalmasını azalttığı ve hücreleri apoptozise yönlendirdiği saptanmıştır [120, 121].

Ras, Rac ve Cdc42 tarafından indüklenen malign transformasyon için PAK1 gereklidir. PAK1 GTPaz tarafından indüklenen transformasyonda görev alır [126-128]. Aktive PAK1 RAF'ı fosforiller ve bunun sonucunda RAS/RAF/MAPK sinyalizasyonu artar [124, 129, 130]. PAK1 β -catenin ile ilişkili olduğu ve mide hücrelerinde β -catenin/TCF4 aktivasyonunu arttırdığı bilinmektedir [131]. PAK1 tarafından β -catenin fosforilasyonu KRK hücrelerinde β -catenin transkripsiyonel aktivitesini ve stabilitesini arttırmaktadır [132].

Kanser hücrelerinde PAK1 ekspresyon ve aktivasyonunda değişiklikler olduğu saptanmıştır. PAK1 ekspresyonunda artış; adenoma-karsinoma sekansı sürecinde, özellikle de dramatik olarak invaziv ve metastatik KRK'lerde saptanmıştır[133]. PAK1'in yüksek düzeyde ekspresyonu ve aşırı aktivasyonu ayrıca KRK kanser hastalarının azalmış sağkalım süreleri ile ilişkili bulunmuştur [134]. PAK1 KRK hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu ve sağkalımı için gereklidir [123].

RAS ile aktive olan PAK1; KRK büyümesi, progresyonu ve metastaz gelişimini ilerletir. Short hairpin RNA (shRNA) kullanılarak PAK1'in susturulması ile; KRK hücrelerinde proliferasyon, migrasyon azalmaktadır. PAK1'in baskılanması; apoptozisin indüklenmesi yolu ile KRK büyümesini, ilerlemesini ve metastaz geliştirmesini azaltmaktadır[112, 123]. İn vivo ya da in vitro APC ve B-catenin mutasyonu olan KRK hücrelerinde büyüme siRNA aracılı B-catenin sinyalizasyon inhibisyonu ile durdurulabilmektedir [115, 135-137]. Buna karşın B-cateninin tek başına inhibisyonu KRK hücrelerinde anlamlı oranda apoptoza neden olmamaktadır[121]. Bu durum PAK1'in β -cateninden bağımsız olarak apoptoza etki ettiğini göstermektedir. PAK1 in inhibisyonuna bağlı tümör metastaz gelişiminin engellenmesi metastatik marker olan azalmış ZEB1 ve vimentin ekspresyonu ile ilişkilidir. Bu azalma β -catenin aracılığı ile olmaktadır. B-catenin aktivasyonu E-cadherin transkripsiyonel represörü olan snail1'in up-regülasyonunu sağlamaktadır. Bu sonuçlar PAK1'in önemli bir prognostik marker olduğunu ve PAK1' in kanser tedavisinde hedef olarak kullanılabileceğini göstermektedir[138].

2.8.3.3.4. Aurora Kinazlar (AURKA, AURKB, AURKC)

Aurora kinaz ailesi mitozda anahtar düzenleyici olarak görev alan serin/treonin kinazlardır. Aurora kinaz ailesi Aurora kinaz A, B, C olmak üzere 3 adet enzimden oluşmaktadır. Aurorakinazlar, hücre içindeki farklı kinazlar tarafından otofosforilasyon yolu ile aktive edilirler [139]. Aurora kinaz A (AURKA) sentrozom ilişkili proteindir. AURKA sentrozom fonksiyonlarının düzenlenmesi, kromatin iğlerinin montajı (birleştirilmesi), kromozom ayrılması ve sitokinez de görev almaktadır [140, 141]. AURKA protein düzeyleri ve kinaz aktivitesi G1/S fazında düşük seviyededir. AURKA hücre bölünme siklusunun G2/M fazını düzenler. G2/M fazında artarak birikir ve mitoz sonrası hızlı bir şekilde tekrar azalır [140, 142, 143].

Aurora kinaz ailesi enzimleri AURKA geni tarafından kodlanır ve DNA kapısının kritik bölgesini kaplar. Bu gen 20q13.2 kromozomunda lokalizedir ve malignitelerde bu lokalizasyonun a bölgesi güçlenmiştir [144, 145]. Deneysel yöntemler ile AURKA'nın aktivasyonu bir onkogen gibi davranarak; sentrozom ampfikasyonunu ve kromozomal instabiliteyi indükler, sonuç olarak malign fenotip ortaya çıkarır [146]. AURKA mRNA'sının ampfikasyonu KRK'de dahil olmak üzere birçok kanserde bulunmaktadır [140, 147, 148]. AURKA gen overekspresyonu birçok kanserde sentrozom ampfikasyonuna, kromozomal instabiliteye ve anöploidiye yol açar [143, 149]. AURKA overekspresyonu midekansı, memekansı, kolorektalkansı, mesane kanseri, pankreas kanseri, over kanseri, prostat kanseri ve özofagus skuamöz hücreli karsinom, özofageal adenokarsinom gibi birçok tümör hücrelerinde ve Barrett's özofagusta saptanmıştır [150, 151]. Alfat ve arkadaşları 130 tümörün histokimyasal analizi ile üst gastrointestinal adenokarsinomlarda mitotik kinaz kodlayıcı gen overekspresyonunu göstermiştir. Yine bu çalışmada in vitro modelde ilaç ile apoptozu indüklemiş ve AURKA ekspresyonunun gastrointestinal kanser hücrelerinde anti-apoptotik etkisi gösterilmiştir [150]. Rugge ve arkadaşları AURKA immunoboyanmasının Özofagus adenokarsinom'da prekanseröz lezyon olan Barrett's mukozasından önemli ölçüde artış gösterdiğini bulmuştur [142]. Kliniğimizde özofagus adenokarsinomları, özofajit ve kontrol grubunu içeren

60 olgunun histon modifikasyon gen ekspresyonlarının değerlendirildiği çalışmada AURKA ve AURKB genlerinin özofagus adenokarsinomlarında overeksprese olduğu saptanmıştır. AURKA ve AURKC genlerinin özofajitli dokularda da over-eksprese olduğu saptanmıştır[152]. Yine bu çalışmada özofajit şiddeti artıkça paralel olarak AURKA geninin overekspresyonunda paralel olarak arttığı saptanmıştır[152]. 386 KKK olgusunun değerlendirildiği bir çalışmada; düşük p21, yüksek p53, düşük siklin-D1 ve yüksek AURKA ekspresyonun artmış rekürrens ve relaps sıklığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. P21 ve AURKA'nın birbirinden bağımsız olarak rekürrens sıklığını arttırdığı gözlenmiştir. P21, p53, siklin-D1 ve AURKA prognostik marker olarak kullanılabileceği belirtilmiştir[153].

2.8.3.3.5. NEK6(NIMA (never in mitosis gene a) ilişkili kinaz 6)

NEK (NIMA (never in mitosis gene a) ilişkili kinazlar) ailesine bağlı mitoz bölünme kontrolünde görev alan bir serin/treonin kinazdır [154]. NEK6 kromozom 9q33–34 bölgesine lokalizedir. Yin ve arkadaşları daha öncesinde insan NEK6'nın hücre siklus progresyonu sırasında metafaz-anafaz geçişinde gerekli olduğunu göstermiştir [155]. NEK6 disfonksiyonu ile mitoz bölünmede duraksama ve apoptozda tetiklenme gözlenilir[156, 157]. NEK6'nın negatif mutant formu kromatin iç defektlerine, anormal kromozom ayırımına, mitotik duraksamaya yol açar ve apoptozu indükler [158]. Hepatosellüler karsinomda (HCC) NEK6 overekspresyonunun antiapoptotik etkisi bulunmaktadır[158]. HCC' de NEK6 overekspresyonu ile histolojik grade, alfa fetoprotein düzeyi ve kötü prognoz arasında ilişki olduğu bilinmektedir. NEK6'nın insan kanser hücre dönüşümüne aracılık ettiğini gösteren ve kanser tedavi marker'ı olarak önerildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur [159]. Takeno ve arkadaşları NEK6'nın, gastrik kanserlerde evresine bakılmaksızın patansiyel bir marker olduğunu belirtmişlerdir. Konvansiyonel yöntemler ile tümör evrelemesinin prognozu belirlemede tek başına yetersiz olduğundan beri, tümör dokusunun genetik analizi hastalık gidişatı ve tedavi yanıtıyla ilgili her koşulda daha sağlıklı bilgiler vermektedir [160]. Nassirpourve arkadaşları;NEK6'nın kinaz aktivitesinin meme, uterus, kolon, mide, over, akciğer, böbrek, rektum, tiroid, serviks, prostat, pankreas, ince

bağırsakkanseri gibi çeşitli malign insan kanser hücrelerinde yüksek olduğunu göstermiştir ve NEK6'ın baskılanması ile tümörün gerilediği fare xenograft modelinde gösterilmiştir. NEK6 inhibisyonun spesifik olarak tümör hücrelerinin hücre ölümüne yol açtığını ve normal dokularda hasar yaratmadığına işaret etmektedir. Bu nedenle NEK6 inhibitörlerinin sitotoksik anti-tümör maddelerine göre daha düşük yan etki ile daha iyi bir tedavi seçeneği olduğu düşünülmüştür [159]. Kliniğimizde özofagus adenokarsinomları, özofajit ve kontrol grubunu içeren 60 olgunun histon modifikasyon gen ekspresyonlarının değerlendirildiği çalışmada NEK6 genin özofagus adenokarsinomlarında ve özofajitli dokularda overekspresyon olduğu saptanmıştır. Yine bu çalışmada özofajit şiddeti arttıkça paralel olarak NEK6 genlerinin overekspresyonunda paralel olarak artış saptanmıştır [152].

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Temmuz 2012 ve Kasım 2013 tarihleri arasında Manisa Celal Bayar Üniversitesi Gastroenteroloji Bilim Dalı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya Celal Bayar Üniversitesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'na başvuran hastalar dahil edilmiştir. Bu çalışma ile ilgili etik kurul onayı, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığının 26.06.2012 tarih ve 200 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışma Dizaynı ve Hastalar

Temmuz 2012ve Kasım 2013 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'namüracaat eden toplam 60 hasta çalışmaya dahil edildi. Olgular kolorektal kanser grubu, ülseratif kolit grubu ve kontrol grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Kolonoskopisi yapılan ve biyopsi alınan 20 Kolorektal kanser'li olgu, 20 Ülseratif kolit'li olgu ve alt gastrointestinal sistem yakınması olan, kronik ishal ya da demir eksikliği anemisi nedeni ile rutinde kolon biyopsisi yapılan; biyopsi-kolonoskopi sonucu normal olan 20 olgu kontrol grubu olmak üzere, aşağıda bahsedilen çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterlerine göre çalışmaya dahil edildi.

Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri:

1. Kolorektal kanser tanısı olan, kemoterapi ya da radyoterapi tedavisi almamış yeni tanılı 18 yaş üzeri erişkin hastalar
2. Ülseratif kolit tanısı olan, 18 yaş üzeri erişkin hastalar
3. Alt gastrointestinal sistem yakınması olan, kronik ishal ya da demir eksikliği anemisi nedeni ile rutinde kolon biyopsisi yapılan ve biyopsi, kolonoskopi sonucu normal olan 18 yaş üzeri erişkin hastalar

Araştırmadan Dışlama Kriterleri:

1. Kolorektal kanser tanısı ya da başka bir malignite nedeni ile herhangi bir zamanda kemoterapi ya da radyoterapi almak
2. Kolorektal kanser dışında başka bir malignite tanısı almış olmak
3. Kolonoskopi sırasında biyopsiyi kabul etmeyen olgular
4. Ülseratif Kolit tanısı nedeni ile kolektomi yapılan olgular

Tüm olguların yaş, cinsiyet, özgeçmiş/soygeçmiş hastalıkları sorgulanarak kaydedildi.

Ülseratif kolit hastalarında kolonoskopide, rutin değerlendirme ve tetkiklerinde saptanan; hastalığın kolon tutulum yaygınlığı, süresi, aktivasyon şiddeti, ekstra intestinal tutulum bulguları, ÜK tedavisi için kullandığı ilaçlar veri olarak kaydedildi. Ülseratif kolit hasta grubunda geçmişte kolon malignite ve displazi araştırılması amaçlı yapılan kolonoskopik taramalarındaki tüm patoloji değerlendirme bulguları displazi varlığı açısından retrospektif olarak araştırıldı ve kaydedildi. Yine çalışmaya dahil edildiğinde yapılan kolonoskopi taramasında alınan patoloji değerlendirmesi için alınan biyopsi materyalinde displazi kontrolü yapıldı ve veriler kaydedildi.

Kolorektal kanser tanısı alan hastaların hepsinde evreleme amaçlı BT ya da PET/BT çekildi. Opere olmayan hastalar da BT ya da PET/BT, opere olan hastalarda da BT, PET/BT ve operasyon sonrası patolojik değerlendirmesi yapılarak AJCC'nın TNM sınıflamasına göre hastalık evrelemesi yapıldı. Kolorektal kanserli olguların tümünden serum CEA düzeyleri gönderildi ve sonuçları kaydedildi. Kolorektal kanserli hastaların biyopsi örnekleri ve opere oldu ise kolon rezeksiyon materyallerinde tümör diferansiyasyonu, tümör tipi değerlendirildi ve sonuçları kaydedildi.

3.2. Kolonoskopi ve Doku Örnekleme İşlemi

Tüm hastaların kolonoskopi tetkikleri Celal Bayar Üniversitesi Gastroenteroloji Bölümünde çalışmayıda gerçekleştiren beş gastroenterolog tarafından (EK, HY, EE, EG, AB) tarafından yapıldı. Kolonoskopi işlemi Olympus LuxeraCFQ260AL marka cihaz ile gerçekleştirildi. Kontrol grubu ve ülseratif kolit tanısı olan hastaların hepsinde terminal ileumda dahil olmak üzere tam kolonoskopik değerlendirme yapıldı. Kolorektal kanserli olgularda ise tümör proksimaline geçilebildi ise terminal ileumda dahil tüm kolon değerlendirmesi yapıldı. Tümör proksimaline geçilemeyen kolorektal kanserli olgularda ise tümör proksimali abdominal BT ile değerlendirildi. Kolorektal hasta grubunda tümör dokusundan, ülseratif kolitli hasta grubunda aktif inflamasyonun izlendiği rektum mukozasından ve kontrol grubunda rutin tarama amaçlı rektum, çekum ve terminal ileum mukozalarından patolojik

değerlendirme amaçlı mukozal biyopsi örneği olympus biyopsi forsepsi kullanılarak mukozal biyopsi örnekleri alındı. Tüm biyopsi örneklerinin patoloji değerlendirmeleri Celal Bayar Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı ve sonuçlarındaki verileri kaydedildi.

Kolorektal kanserli olgularda tümör dokusundan, ülseratif kolitli olgularda aktif inflamasyonda izlendiği rektum dokusundan, kontrol hasta grubunda da normal görünümlü mukozadan histon modifikasyon gen analizi için ayrıca ikişer mukozal biyopsi örneği olympus biyopsi forsepsi kullanılarak alındı. Bu örnekler hemen kuru buz (kurubuz bloğu-78,5 derece C yüzey sıcaklığına sahip) ile donduruldu ve -80 ° C'de RNA ekstraksiyonuna kadar saklandı.

3.3. Moleküler Yöntem

Tüm 60 olgunun kolon mukoza biyopsi materyallerinden RNA izolasyonu yapıldı. Olgulardan elde edilen RNA'dan cDNA sentez kiti kullanılarak 60 olguya ait cDNA'lar elde edildi. İlk aşamada rastgele seçilen 3 ülseratif kolit tanılı, 3 kolorektal kanser tanılı olan ve 3 kontrol olgusuna ait cDNA'lar RT-PCR-array platelerine yerleştirilerek 84 adet histon modifikasyon geni (araştırılacak 84 gen aşağıda tablo 3'te belirtilmiştir) ve 5 housekeeping gen çalışıldı. İlk aşamada rastgele seçilen bu 9 olguda 84 adet histon modifikasyon geninin ekspresyonları değerlendirildi. Bahsedilen 9 olguda değerlendirilen 84 gen içinde özellikle eksprese olan ve literatür taraması yapılarak Kolorektal kanser dokusunda overeksprese olması beklenen 8 gen belirlendi. Bu değerlendirme sonucunda AURKA, AURKB, NEK 6, PAK1, HDAC1, HDAC7, KDM4C, SETD8 histon modifikasyon genlerinin ve housekeeping gen olarak HPRT1 geni, geriye kalan 17 KRK' li, 17 ÜK' li ve 17 kontrol olgu olmak üzere toplam 51 bireyde çalışıldı. Bu aşamaların hepsi Celal Bayar Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Tablo 3: Araştırılacak Histon Modifikasyon Genleri

DNA Metil Transferaz: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B

Histon Asetil Transferaz: ATF2, CDYL, CIITA, CSRP2BP, ESCO1, ESCO2, HAT1, KAT2A (GCN5L2), KAT2B (PCAF), KAT5 (HTATIP), MYST1, MYST2, MYST3, MYST4, NCOA1, NCOA3, NCOA6

Histon Metil Transferaz: CARM1 (PRMT4), DOT1L, EHMT2, MLL1, MLL3, PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT5, PRMT6, PRMT7, PRMT8, SETDB2, SMYD3, SUV39H1

SET Domain Proteinler (Histon Metiltransferaz Aktivitesi): ASH1L, MLL3, MLL5, NSD1, SETD1A, SETD1B, SETD2, SETD3, SETD4, SETD5, SETD6, SETD7, SETD8, SETDB1, SUV39H1, SUV420H1, WHSC1

Histon Fosforilasyonu: AURKA, AURKB, AURKC, NEK6, PAK1, RPS6KA3, RPS6KA5

Histone Ubiquinasyon: DZIP3, MYSM1, RNF2, RNF20, UBE2A, UBE2B, USP16, USP21, USP22

DNA / Histon Demetilaz: AOF2, JARID1B, JARID1C, JMJD2A, JMJD2C, JMJD3, MBD2

Histone Deasetilaz: HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11

3.3.1. Hazırlanan Solüsyonlar

RTL Solüsyonu: 1ml RTL solüsyonuna 10 µl β merkaptotanol eklenerek hazırlandı.

Buffer RPE: RNA izolasyon kitinin konsantre olarak sağladığı RPE solüsyonuna 4 volüm etanol eklenerek hazırlandı.

%70'lik Etanol: 70 ml Etanol distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Dnase I Solüsyonu: Liyofilize DNase I' i 550 µl RNase-free suda çözüldü. Şişeyi alt üst ederek yavaşça karıştırıldı. Vortekslenmedi.

DNase I İnkübasyon Miksi: 70 µl Buffer RDD 'ye 10 µl DNase I stok solüsyonundan eklendi. Yavaşça tübü alt üst edilerek karıştırıldı. Tübün yanlarında kalan sıvıları toplamak için kısa bir santrifüj edildi.

3.3.2. Dokulardan RNA İzolasyonu

Dokudan RNA izolasyonu ticari olarak sağlanan RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak yapıldı.

- 1) Doku örnekleri depolandıkları -80 derin dondurucudan çıkarıldı. Dokunun büyüklüğü tartılarak tanımlandı. 30 mg dan daha fazla doku kullanılmadı.
- 2) Her bir hasta dokusu ependorf tüpün içine alındı. Tüpün içine 20-30 mg doku için 600 µl Buffer RLT ve mekanik parçalamayı sağlayıcı 7mm çapında metal bilyeler eklendi.
- 3) Ependorf tüpler TissueLyser homojenizatörüne yüklendi. 25.000 hertz' de 5 dakika homojenizatörde homojenize edildi.
- 4) Oluşan lizat 3 dk full hızda santrifüj edildi. Dikkatlice süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve onu yeni bir ependorf tüpüne transfer edildi.
- 5) Temizlenmiş lizata 1 hacim %70' lik etanol eklenerek, pipetle hemen karıştırıldı. Santrifüj yapılmadı.
- 6) 2 ml'lik toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş bir RNeasy spin kolonuna 700 µl örnek transfer edildi. Kapak nazikçe kapatılarak ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) de 15 saniye santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı. Sonraki adım için yeni bir toplama tüpü yerleştirildi.
- 7) Eğer örnek hacmi 700 µl yi aşarsa aynı RNeasy spin kolonunda birbirini izleyen alikvatları santrifüj edildi. Her santrifüjden sonra altta toplanan sıvı atıldı.
- 8) DNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak için bu adımdan sonra kolonda DNA kesimi yapıldı.
- 9) RNeasy spin kolonuna 350 µl Buffer RW1 eklendi. Kapağı nazikçe kapatılarak kolon zarını yıkamak için ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) de 15 saniye santrifüj edildi. Altta toplanan sıvıyı atılarak yerine yeni toplama tüpü yerleştirildi.
- 10) DNase I inkübasyon miksinin (80 µl) direkt olarak RNeasy spin kolon zarına eklenerek 15 dakika (20-30°C) inkübe edildi.

- 11) 350 µL Buffer RW1 'i RNeasy spin kolona eklendi. Kapağı nazikçe kapatıldı. Kolon zarını yıkamak için ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) de 15 saniye santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı. Toplama tüpü yeniden yerleştirildi.
- 12) 350 µL Buffer RW1 'i RNeasy spin kolona eklendi. Kapak nazikçe kapatılarak kolon zarını yıkamak için ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) de 15 saniye santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı. Toplama tüpü yeniden yerleştirildi.
- 13) 500 µL Buffer RPE 'i RNeasy spin kolona eklendi. Kapak nazikçe kapatılarak kolon zarını yıkamak için ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) de 15 saniye santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı. Toplama tüpü yeniden yerleştirildi.
- 14) 500 µL Buffer RPE 'i RNeasy spin kolona eklendi. Kapak nazikçe kapatılarak kolon zarını yıkamak için ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) de 2 dakika santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı. Toplama tüpü yeniden yerleştirildi.
- 15) Yeni bir 2 ml toplama tüpünü RNeasyspin kolonyerleştirildi ve altta kala sıvıyı içeren eski toplama tüpü atıldı. Kapağı nazikçe kapatıldı ve full hızda 1 dk santrifüj edildi.
- 16) RNeasyspin kolonu yeni bir 1,5 ml 'lik toplama tüpüne yerleştirildi. 30-50 µl RNase free suyu direkt olarak spin kolon zarına eklendi. Kapağı nazikçe kapatılarak RNA 'yı dilue etmek için ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) de 1 dakika santrifüj edildi.

3.3.3. cDNA Sentezi

- 1) cDNA sentez için RT First Strand Kit(C-03) kiti kullanıldı. Bir PCR tüpüne 8µl RNA örneği, 2µl GE (5XgDNA Elimination buffer) konularak PCR cihazına yüklendi.
- 2) 42 °C da 5 dk. inkübe edildi.
- 3) Başka bir PCR tüpünde 4µl BC3(5XRT Buffer 3), 1 µl P2(Primer X External Control mix), 2 µl RE3(RT Enzyme Mix 3), 3µl H₂O den oluşan PCR kokteyli hazırlandı.
- 4) PCR kokteyli ısı döngü cihazından çıkan PCR tüpüne eklendi ve PCR tüpü tekrar cihaza yüklendi.
- 5) 42 °C da 15 dak, 95 °C da 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri dilue edildi.

3.3.4. RT-PCR Array Yükleme

- 1) RT- PCR array yükleme için toplam hacim 2300µl olacak şekilde ; 102 µl dilue cDNA , 1150 µl 2X RT² SYBR Green ROX FAST Master mixi , 1048 µl H₂O den oluşan array kokteyli hazırlandı.
- 2) Array kokteyli her bir kuyucuğa 20 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu *Human Epigenetic Chromatin Modification Enzymes RT² Profiler™ PCR Array*ne yüklendi.
- 3) Arraylar *Rotor-Gene* RG-3000 (Corbett Research, Qiagen) cihazına konuldu. Aktivasyon için 95 °C 10 dak, 40 döngü olacak şekilde 95 °C 15 sn ve 60°C 30 sn da inkübe edildi.
- 4) <http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php> web sitesindeki yazılım kullanılarak array data analizleri yapıldı.
- 5) Array data analizleri sonucu over ve undereksprese olan genlerden 8 gen Real-Time PCR çalışması için seçildi.

3.3.5. Real-Time PCR

- 1) Array data analizleri sonucu over ve undereksprese olan genlerden 8 gen için (AURKB, AURKA, SETD8, PAK1, NEK6, KDM4C, HDAC1, HDAC7 genleri + housekeeping gen HPRT1 geni) c-DNA örnekleri Real-Time PCR çalışmasına alındı.
- 2) 8 gene ait primer ve SYBR Green Master Mix ticari olarak karşılandı.
- 3) Bunun için her bir örnek başına SYBR green Master Mix'den 12,5 µl, Primer (10 pmol)'den 1 µl alındı ve 2,2 µl cDNA eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışıma toplam volüm 25 µl'ye tamamlanacak şekilde dH₂O eklendi. Tüm karışım hazırlama işlemleri buz üzerinde gerçekleştirildi. Her bir örnek için hazırlanan bu PCR karışımları amplifikasyon için *Rotor-Gene* RG-3000 (Corbett Research, Qiagen) cihazının platine yüklenerek amplifikasyon programı başlatıldı. Amplifikasyon programı 95°C'de 5 dakika, 94°C'de 1 dakika, 61°C'de 40 saniye, 72°C'de 1 dakika ve son üç sikusun 40 kere tekrarlanması ve son uzama 2°C'de 2 dakika olarak uygulandı. PCR şartları çalışmaya göre optimize edildi. Reaksiyonda HPRT1 geni endojen kontrol ve RNase free su negatif kontrol olarak kullanıldı.

- 4) Real-Time PCR reaksiyonu sonunda elde edilen CT değerleri REST 2009 (Relative Expression Software Tool V. 2.0.13) programında standart mod'da referans gen (HPRT1) normalizasyonu ile değerlendirildi ve sonuçlar bir excel dosyasında toplandı.
- 5) Tüm çalışılan genlerdeki CT değerlerinin data analizleri online <http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php> web sitesindeki yazılım kullanılarak yapıldı.

3.4. Veri Analizi ve İstatistik

KRK, ÜK ve kontrol gruplarının gen ekspresyonları karşılaştırıldı. KRK hastalarında prognostik belirteçler olan hastalık evresi, tümör difensiyasyonu, CEA düzeyine göre alt gruplara ayrılarak gen ekspresyon analizi yapıldı. ÜK hastalarında KRK gelişimi için risk faktörü olan hastalık yaygınlığı, süresi ve inflamasyon şiddetine göre alt gruplara ayrılarak gen ekspresyon analizi yapıldı.

Histon modifikasyon gen verilerinin analizi RT2 Profiler PCR array data analizi ile <http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php> sitesinde online ve ücretsiz olarak yapıldı. Bu analizde her bir PCR verisi için Excell formatında tablo oluşturuldu. Bu veriler bahsedilen online sisteme yüklendi. Bu veriler ışığında her PCR reaksiyonu için ortalama Ct değerleri ve T test ile bir P değeri hesaplandı. Ct>33 olanlar hesaplamaaya dahil edildi. Fold-change and fold-regulation değerleri 2 ve üzeri olan genler up regüle genler, Fold- change değeri 0.5'in altında ve Fold-regulation değeri -2'nin altında olan genler down regüle genler olarak değerlendirildi. P değeri otomatik olarak Student T Test kullanılarak hesaplanıp $p<0.05$ olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

IV. SONUÇLAR

4.1. Hasta Grupları

Kolonoskopi bulguları ve biyopsi sonucu patolojik olarak kolorektal kanser teşhisi konmuş 20 hasta, yine kolonoskopi bulguları ve patoloji sonucu ülseratif kolit tanısı almış 20 hasta ve herhangi bir kanser, inflamatuvar barsak hastalığı öyküsü olmayan, kolonoskopi ve kolon biyopsi patolojik değerlendirme sonucu normal saptanan 20 birey kontrol grubu olmak üzere toplam 60 kişi çalışmaya alındı.

Çalışma grubundaki hastaların yaş ortalaması 57.80 ± 12.3 olarak saptandı. Kolorektal kanser hasta grubunun yaş ortalaması 59.12 ± 12.1 , ülseratif kolit hasta grubunun yaş ortalaması 56.85 ± 12.6 ve kontrol grubunun yaş ortalaması 57.45 ± 11.5 olarak saptandı. Bu üç grup yaş olarak birbirleri ile karşılaştırıldığı zaman ise anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0,284$). (Tablo 4)

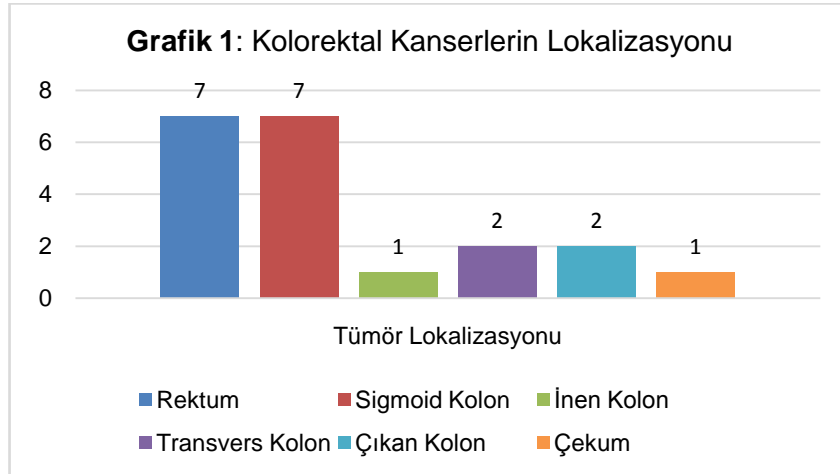
Çalışma grubundaki toplam 60 olgu içinde erkek cinsiyet oranı % 51.7 ($n=31$) olarak saptandı. Kolorektal kanser, ülseratif kolit ve kontrol grupları cinsiyet açısından birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (KRK E/K: 9/11; ÜK E/K:11/9, Kontrol E/K: 9/11 ve $p: 0,339$). (Tablo 4).

Tablo 4: Hasta Grupları ve Genel Parametreler

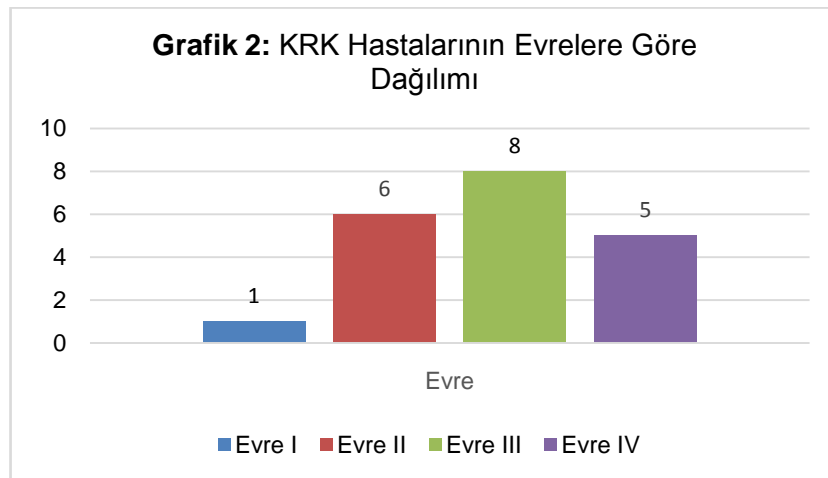
		KRK (n=20)	ÜK (n=20)	Kontrol(n=20)	P
Yaş		$59,12 \pm 12.1$	$56,85 \pm 12.6$	$57,45 \pm 11.5$	0.284
Cinsiyet	Erkek	% 45 (n=9)	% 55 (n=11)	% 55 (n=11)	0.339
	Kadın	% 55 (n=11)	% 45 (n=9)	% 45 (n=9)	

4.1.1. Kolorektal Kanserli Hastalar ve Alt Gruplar

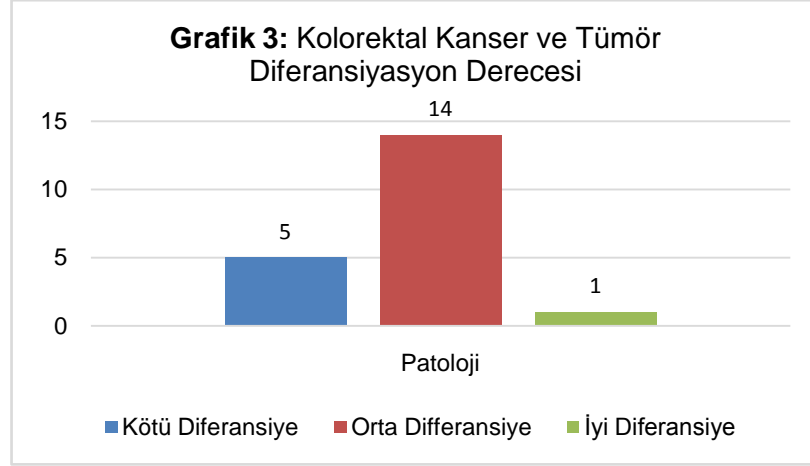
Kolorektal kanserlerin lokalizasyonuna bakıldığında tümörlerin ağırlıklı olarak distal kolonda lokalize olduğu izlendi. Lokalizasyonuna göre KRK' li hasta oranları Rektum: % 35 (n=7), Sigmoid kolon: % 35 (n=7), İnen kolon: % 5 (n=1), Transvers kolon: % 10 (n=2), Çıkan kolon: % 10 (n=2) ve Çekum: % 5 (n=1) saptandı (Grafik 1).



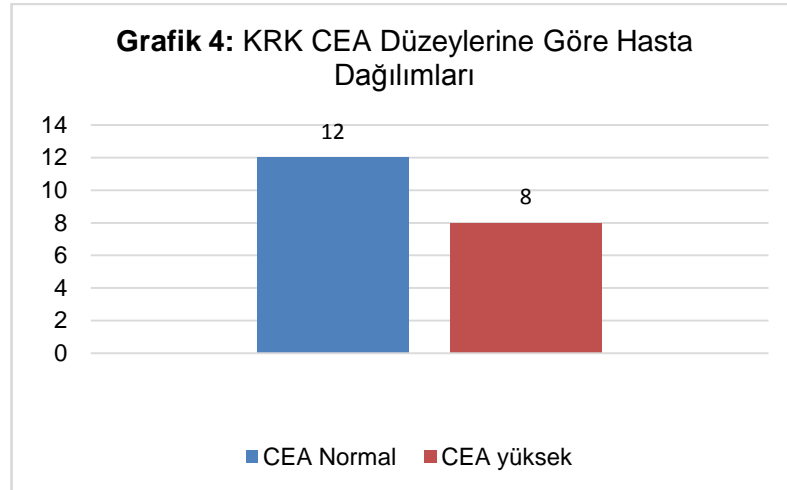
Opere olmayan KRK'li hastalarda sadece BT ve/veya PET/BT'ye göre, opere olan KRK'li hastalarda ise BT, PET/BT ve cerrahi sonrası patolojik değerlendirmelerine göre TNM sınıflaması ile evreleme yapıldı. Evre I hasta oranı % 5 (n=1), evre II hasta oranı % 30 (n=6), evre III hasta oranı % 40 (n=8) ve evre IV hasta oranı % 25 (n=5) olarak saptandı (Grafik 2).



KRK hastalarının tümünün patolojik değerlendirmesi adenokarsinom olarak saptandı. Hastaların % 25'i (n=5) kötü diferansiye, % 70'i (n=14) orta diferansiye ve sadece % 5'i (n=1) iyi diferansiye tümör olarak değerlendirildi (Grafik 3).



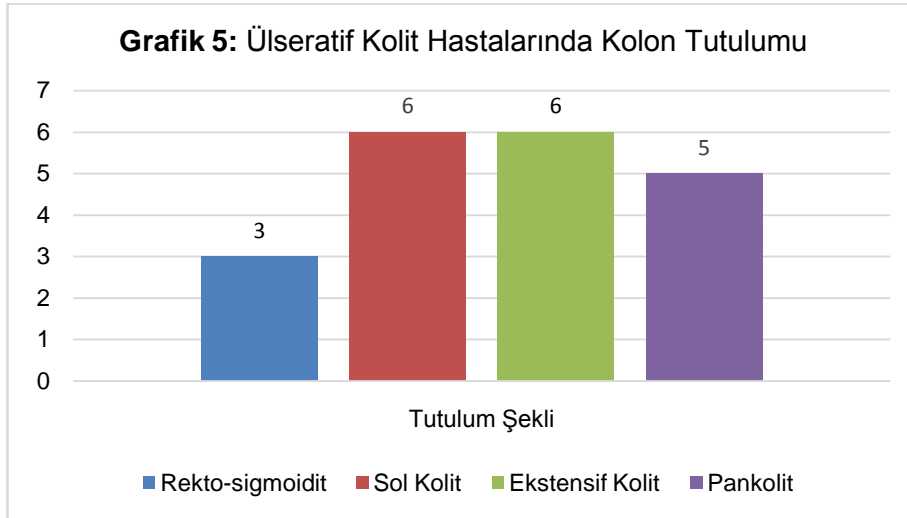
KRK'li hastaların % 40'ının (n=8) CEA düzeyi normal değerden (>5 ng/dl) yüksek, % 60'ının (n=12) ise normal sınırlar arasında (0-5 ng/dl) saptandı (Grafik 4).



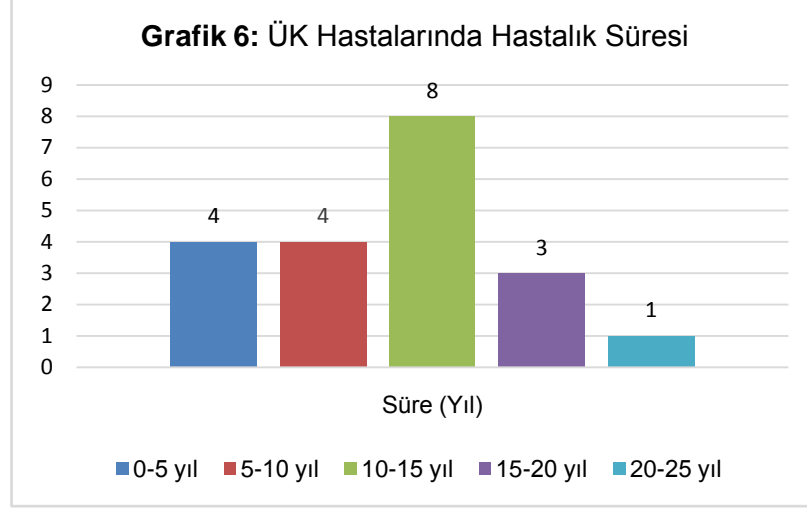
4.1.2. Ülseratif Kolitli Hastalar ve Alt Gruplar

Ülseratif kolit hastalarının çalışma sırasında alınan kolon mukoza biyopsi örneklerinde de hastalıkları nedeni ile yapılan kolonoskopi taramalarında alınan mukozal biyopsi örneklerinin patolojik incelemesinde displazi saptanmadı. Ülseratif kolit hastalarının kolonoskopilerinde DALM, ALM ve benzeri premaling lezyon izlenmemiştir. ÜK hastalarının tümünde kolonoskopi ve patoloji bulgularında aktif inflamasyon mevcuttu.

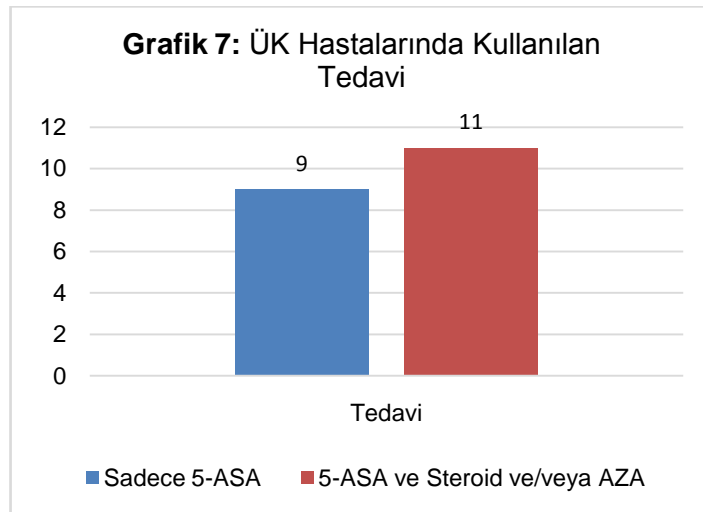
Ülseratif kolit hastalarının % 15'inde (n=3) rekto-sigmoid kolon tutulumu, % 30'unda (n=6) sol kolontutulumu, % 30'unda(n=6) ekstensif kolit tutulumu ve % 25'inde (n=5) ise pankolit tutulumu mevcuttu (Grafik 5).



ÜK hastalarında en uzun hastalık süresi 25 yıl, en kısa hastalık süresi ise 1 yıl olarak saptandı. Ortalama hastalık süresi 10,45 yıl olarak saptandı. ÜK hastalarının %20'si (n=4) 0-5 yıl, % 20'si (n=4) 5-10 yıl, % 40'ı (n=8) 10-15 yıl, % 20'si ise 15 yıl ve üzeri hastalık süresine sahipti (Grafik 6).



ÜK hastalarının hiçbirinde anti TNF, siklosporin vb kalsinörin inhibitörü, Mikofenolat mofetil vb immunmodülatör ilaç kullanma öyküsü yoktu. ÜK hastalarının tümü oral ya da lavman 5-ASA tedavisi almaktaydı. Hastaların % 55'i (n=11) ise hastalık süreçleri boyunca remisyona indüksiyonu için steroid ya da remisyona idamesi için azotiopürin tedavisi kullanmış ya da halen kullanmaktaydı (Grafik 7).



4.2. Histon Modifikasyon Gen Ekspresyon Analizi

İlk aşamada rastgele seçilen bu 9 olguda 84 adet histon modifikasyon geninin ekspresyonları değerlendirildi. Bahsedilen 9 olguda değerlendirilen 84 gen içinde özellikle eksprese olan ve literatür taraması yapılarak KRK dokusunda overeksprese olması beklenen 8 gen belirlendi. Bu değerlendirme sonucunda AURKA, AURKB, NEK 6, PAK1, HDAC1, HDAC7, KDM4C, SETD8 histon modifikasyon genlerinin ve housekeeping gen olarak HPRT1 geni, geriye kalan 17 KRK' li, 17 ÜK' li ve 17 kontrol olgu olmak üzere toplam 51 bireyde çalışıldı. KRK (n=20), ÜK (n=20) ve kontrol grubu (n=20) olmak üzere toplam 60 hastada belirlenen bu 8 genin ve 1 kontrol geninin analizleri yapıldı.

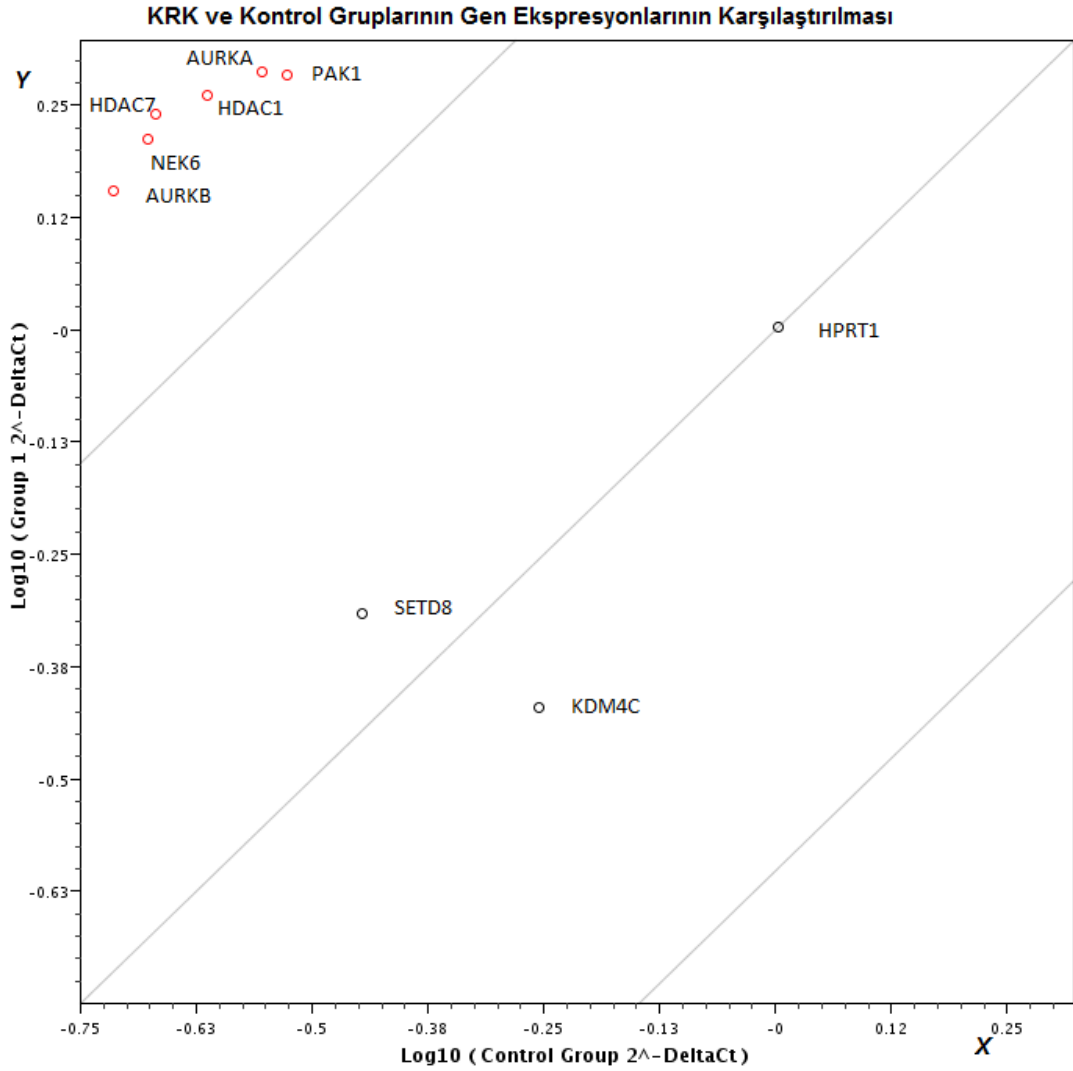
KRK hastalarında (n=20); AURKA, AURKB, HDAC1, HDAC7, NEK6 ve PAK1 genlerinin overeksprese (fold değişikliği >2) olduğu izlenmiştir (Şekil 3).KRK hastalarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; AURKA, AURKB, HDAC1, HDAC7, NEK6 ve PAK1 genlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla overeksprese olduğu saptandı. KRK vekontrol grubu karşılaştırıldığında; SETD8, KDM4C genlerininve kontrol geni olan HPRT1 (Housekeeping gen) geninin ekspresyonunda (fold değişikliği <2, p>0.05) istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi (Tablo 5).

Tablo 5: KRK'de Histon Modifikasyon Gen Ekspresyon Analizi

Histon Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
AURKB	7,3871	(1.54, 13.23)	0,00125
AURKA	6,9307	(1.48, 12.38)	0,00271
SETD8	1,3491	(0.33, 2.37)	0,43853
PAK1	6,4733	(1.01, 11.94)	0,00152
NEK6	7,7355	(1.19, 14.28)	0,00090
KDM4C	0,6849	(0.17, 1.20)	0,11222
HDAC1	7,4876	(1.33, 13.65)	0,00313
HDAC7	8,0948	(1.39, 14.80)	0,00293
HPRT1	0,9211	(0.69, 1.16)	0,58991

Not:KRKgrubu, kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Şekil 3: KRK' de Overeksprese Olan Genleri



Kontrol gurubu ve KRK'de her bir genin hibridizasyon yoğunluğu, log 10 tabanlı dağınık plato şekilde görülmektedir. X-ekseni kontrol kontrol grubunu, Y-ekseni KRK grubunu temsil etmektedir

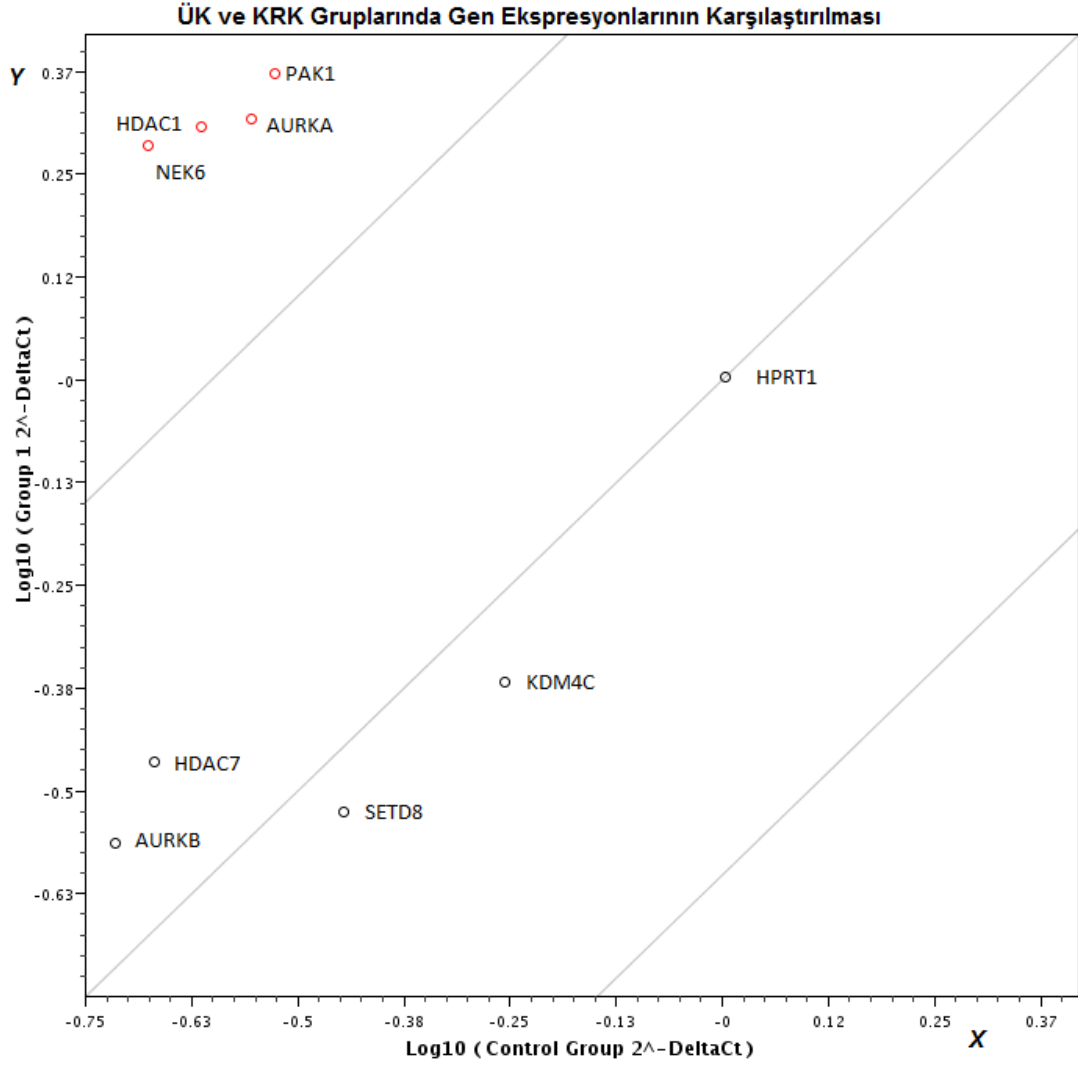
ÜK (n=20) hastalarında AURKA, HDAC1, NEK6 ve PAK1 genlerinin overeksprese (Fold değışikliği >2) olduğu izlendi (Şekil 4). ÜK hastalarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AURKA, HDAC1, NEK6, PAK1 genlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla over eksprese olduğu saptandı. ÜK, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, AURKB, HDAC7, SETD8, KDM4C genlerinin ve kontrol geni olan HPRT1 geninin (Housekeeping gen) ekspresyonunda (fold değışikliği <2, p>0.05) istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi (Tablo 6).

Tablo 6: ÜK'te Histon Modifikasyon Gen Ekspresyon Analizi

Histon Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
AURKB	1,4162	(0.36, 2.47)	0,16986
AURKA	7,4384	(1.02, 13.85)	0,00486
SETD8	0,8322	(0.00, 1.66)	0,48752
PAK1	7,953	(1.02, 14.89)	0,00542
NEK6	9,161	(1.83, 16.49)	0,00107
KDM4C	0,7711	(0.00, 1.54)	0,26249
HDAC1	8,3195	(1.19, 15.45)	0,00549
HDAC7	1,5988	(0.36, 2.84)	0,20862
HPRT1	0,9727	(0.72, 1.23)	0,96950

Not: ÜK grubu, kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Şekil 3: KRK' de Overeksprese Olan Genler



Kontrol grubu ve ÜK' te her bir genin hibridizasyon yoğunluğu, log 10 tabanlı dağılık plato şeklinde görülmektedir. X-ekseni kontrol kontrol grubunu, Y-ekseni ÜK grubunu temsil etmektedir

Kolorektal kanser hastaları ve Ülseratif kolit hastaları ile karşılaştırıldığında kolorektal kanser grubunda AURKB ve HDAC7 genlerinin istatistiksel olarak daha fazla overeksprese olduğu saptandı ($p < 0.05$). Ülseratif kolit ve kolorektal kanser hasta grupları arasında AURKA, NEK6, PAK1 ve HDAC1 gen overekspresyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık ise izlenmedi (Tablo 7).

TABLO 7: KRK ve ÜKGruplarının Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması

Histon Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
AURKB	5,2162	(0.46, 9.97)	0,00796
AURKA	0,9317	(0.00001, 1.89)	0,40211
SETD8	1,6211	(0.22, 3.02)	0,26484
PAK1	0,8139	(0.04, 1.59)	0,34676
NEK6	0,8444	(0.02, 1.67)	0,79039
KDM4C	0,8882	(0.07, 1.71)	0,17068
HDAC1	0,9	(0.06, 1.74)	0,46234
HDAC7	5,063	(0.40, 9.72)	0,01954
HPRT1	0,947	(0.69, 1.21)	0,64247

Not: KRK hasta grubu, ÜK hasta grubu ile karşılaştırılmıştır.

4.2.1 Kolorektal Kanser Alt Grup Gen Ekspresyon Analizi

4.2.1.1 Evreye Göre Gen Ekspresyon Analizi

TNM evreleme sistemine göre; evre III ya da evre IV olan KRK'li hastalar (% 65, n=13) ve evre I ya da evre II KRK'li hastalar (% 35, n=7) olmak üzere 2 alt gruba ayrıldılar. İleri evre KRK (evre III-IV) olgularının bulunduğu alt grupta, evre I-II KRK olgularının bulunduğu alt gruba göre AURKA, AURKB, PAK1, NEK6, SETD8, HDAC1, HDAC7 genlerinin overekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (Tablo 8).

TABLO 8: KRK'de Evreye Göre Gen Ekspresyon Analizi

Histon Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
AURKB	16,5983	(6.70, 26.50)	0,00558
AURKA	15,0484	(2.80, 27.30)	0,01685
SETD8	2,9858	(0.88, 5.09)	0,02669
PAK1	15,0564	(6.29, 23.83)	0,00521
NEK6	16,7852	(3.50, 30.07)	0,00475
KDM4C	1,7809	(0.00001, 3.75)	0,71962
HDAC1	14,3368	(6.23, 22.45)	0,01196
HDAC7	17,8603	(7.70, 28.02)	0,01285
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	-

Not: Evre III-IV KRK alt grubu, Evre I-II KRK alt grubu ile karşılaştırılmıştır.

4.2.1.2 Tümör Diferansiyasyonuna Göre Gen Ekspresyon Analizi

KRK olguları tümör diferansiyasyon derecelerine göre; kötü diferansiyasyon alt grup (% 25, n=5) ve orta ya da iyi diferansiyasyon KRK'li olguları (% 75, n=15) içeren alt grup olmak üzere alt gruplara ayrıldı. Kötü diferansiyasyon tümörleri içeren hasta alt grubunda, iyi ya da orta diferansiyasyon tümörleri içeren hasta alt grubuna göre AURKB, HDAC1 ve HDAC7 genleri istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla over ekspresyona ulaştığı saptandı (Tablo 9, p<0.05).

TABLO 9: KRK'de Tümör Diferansiyasyonuna Göre Gen Ekspresyon Analizi

Histon Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
AURKB	6,6931	(0.54, 12.85)	0,00940
AURKA	4,6439	(0.00001, 9.84)	0,09350
SETD8	2,0458	(0.38, 3.71)	0,17649
PAK1	3,4027	(0.00001, 7.57)	0,12335
NEK6	3,8996	(0.00001, 8.94)	0,11125
KDM4C	2,0763	(0.71, 3.44)	0,71692
HDAC1	6,0266	(0.54, 11.51)	0,01446
HDAC7	6,3967	(0.00001, 12.95)	0,01390
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	-

Not: Kötü diferansiyasyon tümör alt grubu, orta ya da iyi diferansiyasyon tümör alt grubu ile karşılaştırılmıştır.

4.2.1.3. CEA Düzeyine Göre Gen Ekspresyon Analizi

KRK olguları kendi içlerinde CEA düzeyi normal değerden yüksek (% 40, n=8)ve CEA düzeyi normal değerler arasında olan (% 60, n=12) KRK'li olgular olmak üzere 2 alt gruba ayrıldı. CEA düzeyi yüksek KRK'li alt grup ile CEA düzeyi normal KRK'li alt grup arasında gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 10, p>0.05)

TABLO 10: KRK'deCEA Düzeyine Göre Gen EkspresyonAnalizi

Histon Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
AURKB	0,8036	(0.00001, 1.99)	0,76255
AURKA	0,9091	(0.00001, 2.24)	0,85699
SETD8	1,2487	(0.23, 2.27)	0,73208
PAK1	0,8526	(0.00001, 2.11)	0,66459
NEK6	0,8683	(0.00001, 2.27)	0,64504
KDM4C	0,7412	(0.10, 1.38)	0,22484
HDAC1	0,7837	(0.00001, 1.88)	0,74462
HDAC7	0,8937	(0.00001, 2.22)	0,67167
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	-

Not: CEA düzeyi yüksek KRK alt grubu, CEA düzeyi normal KRK alt grubu ile karşılaştırılmıştır.

4.2.2. Ülseratif Kolit Alt Grup Gen Ekspresyon Analizi

4.2.2.1 Kolon Tutulumuna Göre Gen Ekspresyon Analizi

ÜK'li hastalar (n=20), kolonik tutulumlarına göre; ekstensif ya da pankolit olmak üzere splenik fleksuradandaha proksimalde de tutulumu olan hastalar (% 55, n=11), rekto-sigmoid kolon ve/veya sol kolon tutulumu olan hastalar (% 45, n=9) olmak üzere kendi içlerinde iki ayrı alt gruba ayrıldı. Pankolit ya da ekstensif kolit olmak üzere splenik fleksuradan daha proksimalde tutulumu olan ÜK'li hasta alt grubunda, sol kolit ya da rektosigmoidit olmak üzere distal kolon tutulumu olan hastalarda AURKA ve NEK6 genlerinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazla overeksprese olduğu saptandı (Tablo 11)

TABLO 11: ÜK'te Kolon Tutulumuna Göre Gen Ekspresyon Analizi

Histon Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
AURKB	1,3494	(0.00001, 2.95)	0,24876
AURKA	5,3678	(0.00001, 12.55)	0,02699
SETD8	0,7484	(0.00001, 1.88)	0,31268
PAK1	2,2402	(0.00001, 5.16)	0,06460
NEK6	6,7131	(0.00001, 13.96)	0,01489
KDM4C	1,1199	(0.00001, 2.85)	0,21034
HDAC1	3,1064	(0.00001, 7.06)	0,14044
HDAC7	2,0928	(0.00001, 4.59)	0,26969
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	-

Not: *Splenik fleksuradan daha proksimalde tutulumu olan (Pankolit-ekstensif kolit) hastalar ile splenik fleksuradan daha distalde tutulumu olan (Sol kolit-rektosigmoidit) hastalar karşılaştırılmıştır.*

4.2.2.2 Hastalık Süresine Göre Gen Ekspresyon Analizi

ÜK tanılı hastalar; hastalık süresine göre 10 yıldan daha uzun süreli ÜK tanısına sahip olgular (% 60, n=12) ve 10 yıldan daha kısa süredir ÜK tanısına sahip olgular (% 40, n=8) olmak üzere iki ayrı alt gruba ayrıldı. 10 yıldan daha uzun süredir hastalık süresine sahip olgularda, 10 yıldan daha kısa süreli hastalık süresine sahip olgulara göre AURKA, PAK1, NEK-6 ve HDAC1 genlerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede overekspresyon izlendi (Tablo 12).

TABLO 12: ÜK' te Hastalık Süresine Göre Gen Ekspresyon Analizi

Histon Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
AURKB	5,8903	(0.01, 11.77)	0,165124
AURKA	14,1641	(0.43, 27.90)	0,012857
SETD8	2,2211	(0.00001, 5.51)	0,284641
PAK1	10,1085	(1.15, 19.06)	0,015182
NEK6	3,388	(0.00001, 7.06)	0,013988
KDM4C	3,1032	(0.00001, 7.46)	0,223753
HDAC1	8,959	(1.39, 16.53)	0,013921
HDAC7	4,2673	(0.00001, 8.67)	0,231647
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	-

NOT: 10 yıldan daha uzun süreli ÜK olguları, 10 yıldan daha kısa süreli ÜK olguları ile karşılaştırılmıştır.

4.2.2.3 Hastalık Şiddetine Göre Gen Ekspresyon Analizi

Ülseratif kolit hastaları daha önceki hastalıklarının şiddetinin göstergesi olarak hastalık başından beri alevlenme ya da remisyon dönemlerinde kullandıkları ilaçlara göre alt gruplara ayrıldı. Remisyon indüksiyonu için steroid ve remisyon idamesi için azotiopürin kullanan hastalar (% 55, n=11) ve sadece 5-ASA kullanan hastalar (% 45 n=9) olmak üzere iki alt gruba ayrıldı. Her iki alt grup gen ekspresyonları açısından birbirleri ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 13).

TABLO 13: ÜK'te Hastalık Şiddetine Göre GenEkspresyon Analizi

Histon Geni	Fold Değişikliği	95% CI	P Değeri
AURKB	0,4597	(0.00001, 1.01)	0,24561
AURKA	0,3842	(0.00001, 0.97)	0,23059
SETD8	0,2455	(0.00001, 0.58)	0,14288
PAK1	0,2564	(0.00001, 0.58)	0,06694
NEK6	0,698	(0.00001, 1.67)	0,73757
KDM4C	0,3124	(0.00001, 0.77)	0,17477
HDAC1	0,4711	(0.00001, 1.12)	0,42449
HDAC7	0,5182	(0.00001, 1.12)	0,23014
HPRT1	1	(1.00, 1.00)	-

Not: AZA + Steroid + ASA kullanan ÜK olguları sadece ASA kullanan ÜK olguları ile karşılaştırılmıştır.

V. TARTIŞMA

Hücre ve tümör gelişimindeki kısıtlı genetik bilgilerimizin ışığı altında KRK hücresinde bazı kesin değişiklikler saptanmıştır. KRK moleküler ve biyolojik özellikleri hakkındaki bilgilerin hızla artması patogeneze ışık tutmaktadır. Çünkü bu kanserler genetik yatkınlık ve çevresel etkiler arasındaki etkileşim sonucu uzun sürede ortaya çıkmaktadır. KRK karsinogenezinde kromozomal instabilite ve mikrosatellit instabilite yolları, β -catenin/Wnt ara yolağı, TGF- β /SMAD ara yolağı, RAF-RAS-MAPK ara yolağı olmak üzere tümör oluşum ve progresyonunda birçok yolak tariflenmiştir. Bu yolların her birinde; patogenetik mekanizmayı farklılaştıran, birden fazla mutasyonun aşamalı olarak birikimi söz konusudur. Bu yollarda görev alan birçok anahtar gende; K-RAS mutasyonu, B-RAF mutasyonu, 18 q delesyonu, APC mutasyonu, p53 mutasyonu gibi genetik ve DNA CpG adacık hipermetilasyonu, kodlanamayan RNA (miRNA) ekspresyonları ve spesifik histon modifikasyonları gibi epigenetik değişimler rol almaktadır[78, 80, 161-166]. Aslında bu genetik ve epigenetik değişiklikler kompleks olan kanser karsinogenez basamaklarını birlikte regüle etmektedir[78, 80, 161].

Kolorektal kanser gelişimi ile ilgili epigenetik mekanizmalardan biri de DNA paketlenmesinde görevli olan histonların modifikasyonlarıdır. Histon modifikasyonları gibi sonrasında uygunsuz gen ekspresyonuna yol açan epigenetik değişiklikler; inflamasyonun tetiklediği KRK karsinogenezde de anahtar roller üstlenmektedir. Epigenetik kromatin histon modifikasyonlarının kolorektal karsinogenezde kanser hastalarında son prediktörler olarak görev aldığı düşünülmektedir. Birçok çalışmada PAK1, AURKA, NEK6, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC5, HDAC7 gibi histon modifikasyon genlerinin kolorektal kanser karsinogenezinde anahtar roller üstlendiğini, ayrıca bu genlerin önemli birer prognostik ve tanısal marker olduğu belirtilmiştir[107, 108, 112, 153, 159, 167-170].

Çalışmamızda kolorektal kanser için biyopsi alınan hastalarda son prediktör olarak epigenetik global histon modifikasyonlarının rolü araştırılmış

ve epigenetik global histon modifikasyonları yönünden ülseratif kolitli hastalarla karşılaştırılması yapılmıştır. Ayrıca ülseratif kolitli hastalarda kolorektal kanser gelişim riski yönünden hasta takibinde epigenetik kromatin histon modifikasyonlarının bir marker olarak değeride sorgulanmıştır.

KRK karsinogenezinde etkin olduğu gösterilmiş histon modifikasyon genlerinden biri PAK1 (p-21 activated kinaz) genidir. PAK1, Ras Onkogen ve Wnt/B-cateninsinyalizasyonu arasındaki bağlantı bilinmektedir [113, 114].PAK1; küçük GTP'azlardaki akışı etkileyerek; KRK karsinogenez başlatılmasında ve progresyonunda, RAS/RAF/MAPK ve Wnt/ β -catenin sinyalizasyonunu koordine etmektedir. K-RAS onkogeni ayrıca intestinal tümörlerde sinerjik olarak Wnt/ β -catenin sinyalizasyonu artırır [56, 124, 125]. Senkron K-RAS aktivasyonu ve Wnt sinyal yolağının aktivasyon göstergesi olan nükleer β -catenin birikimi; KRK hastalarında kötü prognoz ve KT direnç göstergesidir [119]. APC ve K-ras gen mutasyonları bulunan fare modellerinde, Wnt/ β -catenin sinyalizasyonu artışının beraberinde tümör gelişimine ve malignitenin progresyonuna katkı sağladığı gözlenmiştir [120]. K-RAS ve APC gen mutantları ile birlikte sinerjistik etki yaptığı bilinmektedir. B-catenin ve K-RAS'ın birlikte inhibe edilmesi; KRK hücre çoğalmasını azalttığı ve hücreleri apoptozise yönlendirdiği saptanmıştır [120, 121].Kanser hücrelerinde PAK1 ekspresyon ve aktivasyonunda değişiklikler olduğu saptanmıştır. PAK1 ekspresyonunda artış; adenoma-karsinoma sekansı sürecinde, özellikle de dramatik olarak invaziv ve metastatik KRK'lerde saptanmıştır [133]. PAK1'in yüksek düzeyde ekspresyonu ve aşırı aktivasyonu ayrıca KRK kanser hastalarının azalmış sağkalım süreleri ile ilişkili bulunmuştur [134].

Çalışmamızda KRK hastalarında; PAK1 geni kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha fazla overeksprese olduğu saptanmıştır. Ayrıca alt grup analizlerinde ileri evre kolorektal kanserli (evre II ve evre IV) olgularda hem kontrol grubuna göre hem de daha düşük evreli (evre I ve evre II) KRK'li hasta alt grubuna göre PAK1 overekspresyonu anlamlı derecede daha yüksek saptanmıştır. Örnek sayımızın az olması nedeni ile tümör diferansiyasyonun kötüleşmesi ve kötü prognoz belirteci olan serum CEA

düzeyi yüksekliği ile PAK1 overekspresyonu arasındaki ilişki gösterilememiştir. KRK karsinogenezinde anahtar rolesahip PAK1'in; bu bulgular ve literatürdeki yayınlar ışığında KRK karsinogenezinde rol aldığı, KRK için tanısal ve prognostik marker olduğunu düşünmekteyiz.

ÜK KRK için önemli bir risk faktörüdür. Pankolitli hastalarda 8. yıldan sonra, sol kolitli hastalarda da 12. yıldan sonra KRK riskinormal popülasyona göre artmaktadır. Hastalık süresi, hastalık şiddeti, erken başlama yaşı, kolonik tutulumun yaygınlığı, ailede KRK öyküsü ÜK hastalarında KRK riskini artırmaktadır[3-5, 19-22]. Sporadik KRK karsinogenezinden farklı olarak p53 inaktivasyonu daha erken aşamalarda, non-invaziv evrede gözlenir. K-RAS nokta mutasyonu ve APC genindeki değişiklikler ise sporadik KRK'e göre daha az oranda olmak ile beraber ÜK ilişkili KRK karsinogenezinde displazinin görülmeye başladığı daha ileri aşamalarda izlenmektedir[78, 80, 164, 166]. PAK1, KRK karsinogenezindeki iki önemli yol olan RAS Onkogen ve Wnt/B-cateninsinyalizasyonu arasındaki bağlantı bilinmektedir[112, 124, 129, 130]. Çalışmaya dahil olan ÜK'li hastaların hiçbirinde takiplerinde kolon mukozasında displazi saptanmamış olmasına rağmen; ÜK'li hasta grubunda kontrol grubuna göre PAK1 geninin overekspresyonu olduğu ve özellikle 10 yıldan daha uzun süreli ÜK tanısı olan alt grupta bu overekspresyonun daha belirgin olduğu saptanmıştır. PAK1 overekspresyonu ile hastalık şiddeti ve kolonik tutulum yaygınlığı arasında ilişki gösterilememiştir. Hastalık şiddeti ve kolonik tutulum yaygınlığı arasında bir ilişki bulunamaması; PAK1 overekspresyonunun inflamasyon şiddetinden ve hastalığın kolonik yayılımından bağımsız olabileceği gibi olgu sayısının azlığına bağlıda olabilir. Hong He ve arkadaşlarının yaptığı deneysel modelde; 5-ASA'nın adezyon molekülleri olan E-cadherin ve B-catenin'in, KRK karsinogenezindeki artmış membranöz ekspresyonunu normale getirdiğini göstermişlerdir. Ayrıca 5-ASA'nın PAK1 ekspresyonunu ve KRK karsinogenezinde neoplastik progresyonu baskılandığını belirtmişlerdir [170]. Bu bulgular ışığında PAK1'in ÜK ilişkili KRK karsinogenezinde görev aldığı ve PAK1 uzun süreli ÜK hastalarında KRK taramasında marker olarak kullanılabileceği düşünmekteyiz. Bu nedenle ÜK ilişkili KRK karsinogenezindeki rolünün

değerlendirilmesi ve ÜK'li hastalarda KRK taramasında tanısal marker olarak değerinin belirlenebilmesi için daha ileri ve büyük çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Aurora kinaz ailesi (AURKA, AURKB, AURKC) mitozda anahtar düzenleyici olarak görev alan serin/treonin kinazlardır. AURKA sentrozom fonksiyonlarının düzenlenmesi, iğlerin montajı (birleştirilmesi), kromozom ayrılması ve sitokinez de görev alarak hücre bölünme siklusunun G2/M fazını düzenler. AURKA mRNA'sının ampfikasyonu KRK'de dahil olmak üzere birçok kanserde bulunmaktadır [140, 147, 148]. Alfat ve arkadaşları 130 tümörün histokimyasal analizi ile üst gastrointestinal adenokarsinomlarda mitotik kinaz kodlayıcı gen overekspresyonunu göstermiştir. Aynı zamanda in vitro modelde ilaç ile apoptozu indüklemiş ve AURKA ekspresyonunun gastrointestinal kanser hücrelerinde anti-apoptotik etkisini göstermiştir [150]. Kliniğimizde özofagus adenokarsinomları, özofajit ve kontrol grubunu içeren 60 olgunun histon modifikasyon gen ekspresyonlarının değerlendirildiği çalışmada AURKA ve AURKB genlerinin özofagus adenokarsinomlarında overeksprese olduğu saptanmıştır [152]. 386 KRK olgusunun değerlendirildiği bir çalışmada düşük p21, yüksek p53, düşük siklin-D1 ve yüksek AURKA ekspresyonun artmış rekürrens ve relaps sıklığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. P21 ve AURKA birbirinden bağımsız olarak rekürrens sıklığını arttırdığı gözlenmiştir. P21, p53, siklin-D1 ve AURKA prognostik marker olarak kullanılabileceği belirtilmiştir[153].

Çalışmamızda; KRK'li olgularda kontrol grubuna göre AURKA ve AURKB genlerinin anlamlı düzeyde daha fazla overeksprese olduğu saptandı. İleri evre KRK'li hasta alt grubunda (evre II ve evre IV), hem kontrol grubuna göre hem de daha düşük evreli (evre I ve evre II) KRK'li hasta alt grubuna göre AURKA ve AURKB'nin overekspresyonu anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Tümör diferansiyasyonun kötüleşmesi ile birlikte AURKB'nin özellikle kötü diferansiye adenokarsinomlu KRK'li olgularda orantılı olarak anlamlı derecede daha fazla overeksprese olduğu gözlendi. Örnek sayımızın az olması nedeni ile kötü prognoz göstergeleri olan tümör diferansiyasyonun kötüleşmesi ve serum CEA düzeyi yüksekliği ile AURKA

overekspresyonu; serum CEA yüksekliği ile AURKA ve AURKB arasındaki ilişki ise gösterilemedi. Bu bulgular ve literatürdeki yayınlar ışığında AURKA ve AURKB'nin KRK patogenezinde rol aldığını, KRK için önemli bir tanısal ve prognostik marker olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda ÜK'li hastalarda kontrol grubuna göre AURKA geninin over eksprese olduğu saptandı. Özellikle ÜK ilişkili KRK riskinin arttığı 10 yıldan daha uzun süreli ÜK tanısı olan alt grupta ve pankolit ya da ekstensif kolitli yaygın kolon tutulumuna sahip hastalarda AURKA geninin over ekspresyonunun daha belirgin olduğu saptanmıştır. Olgu sayısının azlığına bağlı olarak AURKA overekspresyonunun hastalık şiddeti ile ilişkisi gösterilememiştir. Ruge ve arkadaşları AURKA immunoboyanmasının özofagus adenokarsinom'da prekanseröz lezyon olan Barrett's mukozasında önemli ölçüde artış gösterdiğini bulmuştur [142]. Kliniğimizde özofagus adenokarsinomları, özofajit ve kontrol grubunu içeren 60 olgunun histon modifikasyon gen ekspresyonlarının değerlendirildiği çalışmada AURKA ve AURKB genlerinin özofagus adenokarsinomlarında overeksprese olduğu saptanmıştır. AURKA ve AURKC genlerinde özofajitli dokularda overeksprese olduğu saptanmıştır [152]. Yine bu çalışmada özofajit şiddeti artıkça paralel olarak AURKA geninin overekspresyonunda paralel olarak arttığı saptanmıştır [152]. Aurora kinaz ailesinin özofagus adenokarsinomunda prekanseröz lezyonlar olan inflamasyonun izlendiği özofajitli dokuda ve kronik irritasyon-inflamasyona sekonder gelişen Barrett's özofagusunda overeksprese olması inflamasyon ilişkili karsinogenezde rol üstlendiğini düşündürmektedir. Bu bulgular ışığında özellikle AURKA'nın ÜK ilişkili KRK karsinogenezde görev aldığı ve uzun süreli ÜK hastalarında KRK taramasında marker olarak kullanılabileceği düşünülebilir. Bu nedenle ÜK ilişkili KRK karsinogenezindeki rolünün değerlendirilmesi ve ÜK'li hastalarda KRK taramasında tanısal marker olarak değerinin belirlenebilmesi için daha ileri ve büyük çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

NEK6 (NIMA (never in mitosis gene a)-ilişkili kinaz 6) ailesine bağlı mitoz bölünme kontrolünde görev alan bir serin/treonin kinazdır [154]. NEK6'nın hücre siklus progresyonu sırasında metafaz-anafaz geçişinde gereklidir

[155]. NEK6'ın disfonksiyonu ile mitoz bölünmede duraklama, kromatin iç defektleri, anormal kromozom ayrımı gözlenir ve apoptoz tetiklenir [156-158]. NEK6 overekspresyonu ile Hepatosellüler kanserde (HCC) antiapoptotik etki arasında ilişki olduğu bilinmektedir[158]. HCC'de NEK6 overekspresyonu ile histolojik grade, alfa fetoprotein düzeyi ve kötü prognoz arasında ilişkili olarak gösterilmiştir. Takeno ve arkadaşları NEK6'ın gastrik kanserlerde evresine bakılmaksızın potansiyel bir marker olduğunu belirtmişler. Nassirpour ve arkadaşları; NEK6'ın kinaz aktivitesinin meme, uterus, kolon, mide, over, akciğer, böbrek, rektum, tiroid, serviks, prostat, pankreas, ince bağırsak kanseri gibi çeşitli malign insan kanserli hücrelerinde yüksek olduğunu göstermiştir ve NEK6'ın baskılanması ile tümörün gerilediği fare xenograft modelinde gösterilmiştir [159]. Bunlar NEK6 inhibisyonunun spesifik olarak tümör hücrelerinin hücre ölümüne yol açtığını ve normal dokularda hasar yaratmadığına işaret etmektedir. Bu nedenle NEK6 inhibitörlerinin sitotoksik anti-tümör maddelerine göre daha düşük yan etki ile daha iyi bir tedavi seçeneği olduğu düşünülmüştür. Kliniğimizde özofagus adenokarsinomları, özofajit ve kontrol grubunu içeren 60 olgunun histon modifikasyon gen ekspresyonlarının değerlendirildiği çalışmada NEK6 genin özofagus adenokarsinomlarında ve özofajit'li dokularda over ekspresyonu olduğu saptanmıştır [152].

Çalışmamızda KRK'li olgularda kontrol grubuna göre NEK6 overekspresyonunun anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Örnek sayımızın az olması nedeni ile tümör diferansiyasyonun kötüleşmesi ve kötü prognoz belirteci olan serum CEA düzeyi yüksekliği ile NEK6 overekspresyonu arasındaki ilişki gösterilememiştir. Ancak; ileri evre KRK'li (evre III ve evre IV) hastaların bulunduğu alt grupta, hem kontrol grubuna göre hem de daha düşük evreli (evre I ve evre II) KRK'li hasta alt grubuna göre NEK6 overekspresyonu anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Bu bulgular ve literatürdeki yayınlar ışığında NEK6'ın KRK patogenezinde rol aldığı, KRK için önemli bir tanısal ve prognostik marker olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda ÜK'li hastalarda kontrol grubuna göre NEK6 geninin over ekspresyonu olduğu saptandı. Özellikle ÜK ilişkili KRK riskinin

arttığı 10 yıldan daha uzun süreli ÜK tanısı olan alt grupta ve Pankolit-ekstensif kolitli yaygın kolon tutulumunasa sahip hastalarda NEK6 geninin overekspresyonun daha belirgin olduğu saptanmıştır. Olgu sayısının azlığına bağlı olarak NEK6 overekspresyonun hastalık şiddeti ile ilişkisi gösterilememiştir. Kliniğimizde yapılan özofagus adenokarsinomları, özofajit ve kontrol grubunu içeren 60 olgunun histon modifikasyon gen ekspresyonlarının değerlendirildiği çalışmada; NEK-6 genin özofagus adenokarsinomlarında olduğu kadar benzer şekilde özofajit'li dokularda da overeksprese olduğu saptanmıştır. Yine bu çalışmada özofajit şiddeti artıkça NEK6 genlerinin overekspresyonunda paralel olarak arttığı saptanmıştır [152]. NEK6'nın özofagus adenokarsinomunda prekanseröz lezyon olan özofajitli dokuda overeksprese olması inflamasyon ilişkili karsinogenezde rol üstlendiğini düşündürmektedir. Bu bulgular ışığında özellikle NEK6'nın ÜK ilişkili KRK karsinogenezde görev aldığı ve uzun süreli ÜK hastalarında KRK taramasında marker olarak kullanılabileceği düşünülebilir. Bu nedenle ÜK ilişkili KRK karsinogenezindeki rolünün değerlendirilmesi ve ÜK'li hastalarda KRK taramasında tanısal marker olarak değerinin belirlenebilmesi için daha ileri ve büyük çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

HDAC1'in esas fonksiyonu hücre proliferasyonu kontrolünde p21 ve p27 CDK (siklin bağımlı kinaz) inhibitör baskılanmasıdır [92]. Birçok çalışmada benzer şekilde HDAC1'in kanser hücrelerinde de hücre çoğalması kontrolünde önemli rol üstlendiği gösterilmiştir. HDAC1 ve HDAC3'ün baskılanması hücre proliferasyonu baskılanmaktadır. HDAC4 ve HDAC7'in baskılanması ise hücre sayısında azalmaya yol açmamaktadır [93]. HDAC1'in baskılanması hücre bölünme sürecinde G1 fazında ya da G2'den M fazına geçişte duraksama ile sonuçlanır. Bu durum mitotik hücrelerin kaybı, hücre büyümesinin durması ve kanser hücrelerinde artmış apoptoz oranına neden olur [94]. Buna karşın HDAC2 baskılanması ise hücrelerde aynı etkiye yol açmaz. Gastrik kanserlerde HDAC1 ekspresyonu olduğu bilinmektedir. HDAC1 mide kanserleri için önemli bir prognostik faktördür. Sağkalım ve hastalık evresi ile ilişkilidir [96, 97]. HDAC1 pankreas kanserlerinde de overeksprese olur, mide kanserleri ile benzer şekilde

pankreas kanserlerinde de önemli bir prognostik göstergedir. Sağkalım, evre ve tümör diferansiyasyon derecesi ile ilişkili bulunmuştur [98, 99]. KRK'de artmış HDAC1, HDAC2, HDAC3 ekspresyonu düzeylerinin azalmış hasta sağkalımı ile birlikte olduğu belirtilmiş ve özellikle de HDAC2 ekspresyonunun bağımsız bir faktör olduğu belirtilmiştir [106]. Hepatosellüler karsinomada yüksek HDAC1 ekspresyonu portal vene kanser hücre invazyonu, kötü histolojik diferansiyasyon, daha ileri tümör TNM evresi ve düşük sağkalım oranları ile ilişkili bulunmuştur [104]. HDAC1 overekspresyonu de-diferansiyasyon, artmış proliferasyon, artmış invazyon, ilerlemiş hastalık ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur[108].KRK'de HDAC1 ve metastaz ilişkili protein 1 (MTA-1) nükleozomun yeniden şekillenmesini sağlar ve oluşan histon deasetilasyon kompleksi (NuRD) kanser gelişiminde önemli rol alır. Higashima ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, HDAC1 ekspresyonu ve MTA-1'in KRK'de prognostik önemi değerlendirilmiştir[107]. Bu çalışmada tümör invazyon derinliği ve kanser evresinin HDAC1 ekspresyonu ile kolere olduğu gözlenmiştir. Yaş, tümör invazyon derinliği ve vasküler invazyon varlığı MTA-1 ile korele olduğu saptanmıştır. HDAC1 pozitif grupta HDAC1 negatif gruba göre 5 yıllık sağkalım oranları daha kötü saptanmıştır (% 55,1 e karşı % 86,5). 5 yıllık sağkalım oranı MTA-1 pozitif grupta MTA-1 negatif gruba göre daha kötü saptanmıştır (%73.1'e karşı % 50.5). Tedavi yanıtı sonrası HDAC1 pozitif grupta hastaliksız sağkalım oranı daha kötü olduğu saptanmıştır.Bu sonuçlar ile HDAC1 ve MTA-1 ekspresyon düzeylerinin KRK'de potansiyel bir prognostik faktör olduğu belirtilmiştir. [107].

Çalışmamızda KRK'li olgularda kontrol grubuna göre HDAC1 overekspresyonunun anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. İleri evre KRK olgularının (evre III ve evre IV) bulunduğu alt grupta, hem kontrol grubuna göre hem de daha düşük evreye sahip (evre I ve evre II) KRK hasta alt grubuna göre HDAC1 overekspresyonu anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Ayrıca kötü prognostik gösterge olan kötü tümör diferansiyasyon derecesi ile HDAC1 over ekspresyonu ilişkili saptanmıştır. Örnek sayımızın az olması nedeni ile tümör kötü prognoz göstergesi olan

serum CEA düzey yüksekliği ile HDAC1 overekspresyonu arasındaki ilişki gösterilememiştir. Bu bulgular ve literatürdeki yayınlar ışığında HDAC1'in KRK patogenezinde rol aldığı, KRK için önemli bir tanısal ve prognostik marker olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda ÜK'li hastalarda kontrol grubuna göre HDAC1 geninin overekspresyonu olduğu saptandı. Özellikle ÜK ilişkili KRK riskinin arttığı 10 yıldan daha uzun süreli ÜK tanısı olan alt grupta HDAC1 geninin overekspresyonunun daha belirgin olduğu saptanmıştır. HDAC1 overekspresyonu ile hastalık şiddeti ve kolonik tutulum yaygınlığı arasında ilişki gösterilememiştir. Hastalık şiddeti, kolonik tutulum yaygınlığı ile HDAC1 over ekspresyonu arasında bir ilişki bulunamaması; HDAC1 overekspresyonunun inflamasyon şiddetinden ve hastalığın kolonik yayılımından bağımsız olabileceği gibi olgu sayısının azlığına bağlı olabilir. HDAC ailesinin inflamatuvar mukozada karsinom gelişim sürecinde rol aldığını düşündüren çalışmalar mevcuttur. Cao ve arkadaşlarının çalışmasında; dizel egzoz partiküllerine maruz kalan bronş epitel hücrelerinde (BEAS-2B) HDAC1 degradasyonuna bağlı histon-4 tetikleyici asetilasyonu sonucu pro-inflamatuvar siklooksijenaz-2 gen'inde (COX-2) transkripsiyonel aktivasyonun arttığı saptanmıştır [111]. Benzer olarak H₂O₂'e bağlı insan alveoler hücrelerinde (A549) NF- κ B aktivasyonu, IL-8 ve IL-6 ekspresyonu ve salınımı; artmış histon-4 asetilasyonu, HDAC gen ekspresyonları ve aktivitesi ile ilişkilidir [111]. Tüm bu bahsedilen bulgular; histon modifikasyonu ve buna bağlı olarak sonrasında gelişen COX-2 ve NF- κ B'in upregülasyonu gibi inflamasyonun indüklediği sellüler epigenetik aparatlardaki modifikasyon kanser hücrelerinde genetik instabiliteye neden olmaktadır. Turgeon ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada HDAC1 ve HDAC2'nin inflamatuvar yanıtta intestinal ve kolonik epitelin proliferasyon ve diferansiyasyonunu düzenlediği gösterilmiştir [171]. HDAC inhibitörlerinin *invivo* ve *invitro* antiproliferatif özellikleri bulunmaktadır. Deneysel kolit ve inflamasyonun indüklediği tümörögenез modellerinde inflamasyon ve tümör gelişimi HDAC inhibitörleri ile baskılanmaktadır [169]. Bu bulgular ışığında özellikle HDAC1'in ÜK ilişkili KRK karsinogenezinde görev aldığı ve HDAC1'in uzun süreli ÜK hastalarında KRK taramasında

marker olarak kullanılabilceđi dűşűnűlebilir. Bu nedenle K iliřkili KRK karsinogenezindeki rolűnűn deđerlendirilmesi ve K'li hastalarda KRK taramasında marker olarak kullanılabilmesi için daha ileri ve bűyűk çaplı çalıřmalara ihtiyaç vardır.

Endotelial hűcrelerde HDAC7'in susturulması morfolojilerini deđeristir. Migrasyon yeteneklerini azaltır, invitro kapiller tűp yapıları oluřturma kapasitelerini azaltır. Fakat hűcre adezyonu, proliferasyonu ya da apopitozisi ise dűřűnűldűđű gibi kanserde bir anti-anjiogenetik hedef olarak deđeritirmez [110]. Farelerde deneysel olarak HDAC7 geninin bozulması ile endotelial hűcre adezyonun bozulması, bunun sonucunda dilatasyon ve kan damarlarında rűptűr nedeni ile embriyonik lűm gűzlenir. Özellikle embriyogenezisin erken dűneminde HDAC7 ekspresyonu gűzlenir. HDAC7 ekspresyonu ve MEF2 (myocyte enhancer factor-2) ile birlikteliđi ile matriks metalloproteinaz10 ekspresyonunun baskılanması sađlanır ve vaskűler bűtűnlűk korunur [109]. Çalıřmamızda HDAC7 KRK'li olgularda kontrol grubuna gűre anlamlı derecede daha fazla overeksprese olduđu saptanmıřtır. Özellikle İleri evre KRK'li ve tűműr diferansiyasyon derecesi kűtű olan alt gruplarda daha fazla overeksprese olduđu gűzlenmiřtir. K hasta grubunda ve K'li hasta alt gruplarında ise HDAC7'nin ekspresyonu izlenmemiřtir. HDAC7'nin özellikle metastatik olmak űzere ileri evre kanserde ve kűtű diferansiye tűműrlerde ortaya çıkması KRK'de son ařamalarda; özellikle anjiogenez ve metastaz geliřiminde etkin bir rol oynadıđını dűřűndűrmektedir. Bu bulgular altında KRK için kűtű prognostik bir marker olduđu dűřűnűlebilir.

VI. SONUÇ

Çalışmamızda KKR hastalarında, son prediktör olarak epigenetik global histon modifikasyonlarının rolü araştırılmış ve ÜK tanılı hastalar ile karşılaştırılması yapılmıştır. Ayrıca ülseratif kolitli hastalarda KKR gelişim riski yönünden hasta takibinde epigenetik kromatin histon modifikasyonlarının bir marker olarak değeride sorgulanmıştır.

KKR'li olgularda HDAC1, HDAC7, PAK1, NEK6, AURKA ve AURKB genlerinin overeksprese olduğu saptanmıştır. İleri evre KKR'de HDAC1, HDAC7, PAK1, NEK6, AURKA ve AURKB genlerinin; kötü diferansiyasyon gösteren tümörlerde HDAC1, HDAC7 ve AURKB genlerinin prognostik önemini gösterir şekilde anlamlı olarak daha fazla overeksprese olduğu saptanmıştır. Kötü prognoz göstergesi olan serum CEA düzeyi ile HDAC1, HDAC7, PAK1, NEK6, AURKA ve AURKB gen overekspresyonu arasında ilişki ise olgu sayısının azlığına bağlı saptanamamıştır. Çalışmamızda elde edilen bu sonuçlar; HDAC1, HDAC7, PAK1, NEK6, AURKA ve AURKB histon modifikasyon genlerinin KKR patogenezinde rol aldığını, KKR için önemli bir tanısal ve prognostik marker' lar olduğunu düşündürmektedir.

ÜK tanılı hastalarda HDAC1, PAK1, NEK6, AURKA genlerinin overeksprese olduğu ve hastalık süresinin artışı ile HDAC1, PAK1, NEK6, AURKA genlerinin anlamlı olarak daha fazla overeksprese olduğu saptanmıştır. AURKA ve NEK6 genlerinin kolon tutulumu yaygın olan ÜK hastalarında daha fazla overeksprese olduğu, PAK1 ve HDAC1 overekspresyonunun ise hastalık tutulum yaygınlığına bağlı değişmediği saptanmıştır. ÜK'te overeksprese olan HDAC1, AURKA, NEK6, PAK1'in hastalık şiddeti ile ilişkisi gösterilememiştir. Çalışmamızda elde edilen bu bulgular ışığında HDAC1, AURKA, NEK6 ve PAK1'in ÜK ilişkili KKR karsinogenezinde görev aldığı ve uzun süreli ÜK hastalarında KKR taramasında marker olarak kullanılabilceği düşünmekteyiz. Bu nedenle bu genlerin ÜK ilişkili KKR karsinogenezindeki rolünün değerlendirilmesi ve ÜK'li hastalarda KKR taramasında marker olarak kullanılabilmesi için daha ileri ve büyük çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

VII-ÖZET

Ülseratif Kolit ve Kolorektal Kanserde Epigenetik Kromatin Histon Modifikasyon Profilinin Değerlendirilmesi

Giriş ve Amaç: Ülseratif kolit (ÜK), kolorektal kanser (KRK) gelişmesi için önemli bir risk faktörüdür. Epigenetik histon modifikasyonları KRK karsinogenezinde önemli görevler üstlenmektedir. Çalışmamızda ÜK ve KRK hastalarında epigenetik histon modifikasyonlarının tanısal ve prognostik marker olarak değerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: 20 ÜK' li, 20 KRK' li ve 20 kontrol olgu olmak üzere toplam 60 kişi çalışmaya dahil edildi. KRK, ÜK ve kontrol gruplarının RT-PCR array yöntemi ile histon modifikasyon enzim anahtar gen ekspresyonları değerlendirildi ve karşılaştırıldı. KRK hastalarında prognostik belirteçler olan hastalık evresi, tümör difensiyasyonu, CEA düzeyine göre alt gruplara ayrılarak gen ekspresyon analizi yapıldı. ÜK hastalarında KRK gelişimi için risk faktörü olan hastalık yaygınlığı, süresi ve inflamasyon şiddetine göre alt gruplara ayrılarak gen ekspresyon analizi yapıldı.

Bulgular: KRK' de HDAC1, HDAC7, PAK1, NEK6, AURKA ve AURKB' nin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla overeksprese olduğu saptandı. İleri evre KRK' de HDAC1, HDAC7, PAK1, NEK6, AURKA ve AURKB; kötü diferansiye tümörlerde HDAC1, HDAC7 ve AURKB' nin anlamlı olarak daha fazla overeksprese olduğu saptandı. Serum CEA düzeyi ile herhangi bir gen ekspresyonu arasında ilişki gösterilemedi. ÜK tanılı hastalarda HDAC1, PAK1, NEK6, AURKA' nin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla overeksprese olduğu ve hastalık süresinin artışı ile HDAC1, PAK1, NEK6, AURKA'nın anlamlı olarak daha fazla overeksprese olduğu saptandı. AURKA ve NEK6 genlerinin kolon tutulumu yaygın olan ÜK hastalarında anlamlı daha fazla overeksprese olduğu, PAK1 ve HDAC1 overekspresyonunun ise hastalık tutulum yaygınlığına bağlı değişmediği saptandı. ÜK' te overeksprese olan HDAC1, AURKA, NEK6, PAK1' in hastalık şiddeti ile ilişkisi gösterilemedi.

Sonuç: HDAC1, HDAC7, PAK1, NEK6, AURKA ve AURKB KRK karsinogenezinde görev alan önemli tanısal ve prognostik marker'lardır. HDAC1, AURKA, NEK6 ve PAK1'in ÜK hastalarında KRK taramasında marker olarak kullanılabileceğini ve bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, Ülseratif kolit, HDAC1, HDAC7, NEK6, PAK1, AURKA, AURKB

III- SUMMARY

Evaluation Of Epigenetic Chromatin Histone Modification Profile In Ulcerative Colitis and Colorectal Cancer

Background and Aims: Ulcerative colitis (UC) is a risk factor for colorectal cancer (CRC). Epigenetic histone modification play important role in CRC carcinogenesis. In this study, we aim to investigate diagnostic and prognostic value of histone modifications as a marker in UC and CRC patients.

Method: 20 persons as a control group, 20 patients with UC and 20 patients with CRC were included in this prospective study. The Human Histone Modification Enzyme RT-PCR array will be used to detect the expression of 84 key genes encoding enzymes in the colon mucosa and the data was compared between CRC, UC and control groups. CRC patients were divided into subgroups according to prognostic sign such as disease stage, tumor differentiation or serum CEA levels. UC patients were divided into subgroups according to risk factors for CRC such as colon involvement, disease activity, and disease duration. The gene expression were analyzed in UC and CRC patient subgroups.

Result: HDAC1, HDAC7, PAK1, NEK6, AURKA and AURKB were overexpressed at significantly higher levels in the CRC, than the control group. In the progressive stage; HDAC1, HDAC7, PAK1, NEK6, AURKA, AURKB and in the poor-differentiated tumours; HDAC1, HDAC7, AURKB were overexpressed at significantly higher levels. There was no significant correlation between serum CEA levels and gene expression. HDAC1, PAK1, NEK6, AURKA were overexpressed at significantly higher levels in the UC, than the control group. AURKA, NEK6 were overexpressed at significantly higher levels in UC, who has wide disease involvement of colon and there was no significant correlation between expression of PAK1, HDAC1 and disease involvement of colon. There was no significant correlation between expression of HDAC1, AURKA, NEK6, PAK1 and disease activity in UC.

Conclusion: HDAC1, HDAC7, PAK1, NEK6, AURKA and AURKB are diagnostic and prognostic markers in CRC, who play important role in CRC carcinogenesis. HDAC1, AURKA, NEK6, PAK1 can use as a marker in CRC surveillance in UC patients and further studies are needed in this topic.

Key Words: Colon cancer, ulcerative colitis, HDAC1, HDAC7, NEK6, PAK1, AURKA, AURKB

IX. KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010, 127(12):2893-2917.
2. Compton CC: Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular feature. *Mod Pathol* 2003 2003, 16(4):376-388.
3. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF: The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001, 48(4):526-535.
4. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, et al: Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: results of a population-based study. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12(3):205-211.
5. Robert S Brasieler: Malignant neoplasms of the large intestine. In: Mark Feldman, Lawrence S Fieldman, Lawrence J Brant, eds. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 9th ed. Saunders Elsevier, 2010:Vol 2, Chapter 123, 2191-2238.
6. Slattery ML, Boucher KM, Caan BJ, et al: Eating patterns and risk of colon cancer. *Am J Epidemiol* 1998, 148(1):4-16.
7. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, et al: Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93(7):525-533.
8. Strohle A, Maike W, Hahn A: [Nutrition and colorectal cancer]. *Med Monatsschr Pharm* 2007, 30(1):25-32.
9. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, et al: Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med* 2004, 140(8):603-613.
10. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, et al: Alcohol, low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87(4):265-273.
11. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, et al: Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 2008, 300(23):2765-2778.
12. Burt RW, DiSario JA, Cannon-Albright L: Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med* 1995, 46:371-379.
13. 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(6):1453-1456.
14. 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(1):32-38.
15. Spirio L, Olschwang S, Groden J, et al: Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993, 75(5):951-957.

16. Steven Hltzkowitz, Jonathan Potack: Gastrointestinal Polyps and polyposis Syndromes. In: Mark Feldman, Lawrence S Fieldman, Lawrence J Brant, eds. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*, 9th ed. Saunders Elsevier, 2010: Vol 2, Chapter 122, 2155-2191.
17. Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H, *et al*: Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1996, 334(2):82-87.
18. Higuchi T, Sugihara K, Jass JR: Demographic and pathological characteristics of serrated polyps of colorectum. *Histopathology* 2005, 47(1):32-40.
19. Osterman MT, Lichtenstein GR: Ulcerative Colitis. In: Mark Feldman, Lawrence S Fieldman, Lawrence J Brant, eds. *Sleisenger and Fordrand's Gastrointestinal and Liver Disease* 9thed. 2010: Vol 2, Chapter 112, 1975-2015.
20. Ekbohm A, Helmick C, Zack M, *et al*: Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990, 323(18):1228-1233.
21. Ouaisi M, Maggiori L, Alves A, *et al*: Colorectal cancer complicating inflammatory bowel disease: a comparative study of Crohn's disease vs ulcerative colitis in 34 patients. *Colorectal Dis* 2011, 13(6):684-688.
22. Winther KV, Jess T, Langholz E, *et al*: Long-term risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study from Copenhagen County. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004, 2(12):1088-1095.
23. Rhodes JM, Campbell BJ: Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared. *Trends Mol Med* 2002, 8(1):10-16.
24. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, *et al*: Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 1994, 35(11):1590-1592.
25. Claessen MM, Lutgens MW, van Buuren HR, *et al*: More right-sided IBD-associated colorectal cancer in patients with primary sclerosing cholangitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009, 15(9):1331-1336.
26. Tung BY, Emond MJ, Haggitt RC, *et al*: Ursodiol use is associated with lower prevalence of colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Ann Intern Med* 2001, 134(2):89-95.
27. Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, *et al*: Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2004, 126(2):451-459.
28. Markowitz J, McKinley M, Kahn E, *et al*: Endoscopic screening for dysplasia and mucosal aneuploidy in adolescents and young adults with childhood onset colitis. *Am J Gastroenterol* 1997, 92(11):2001-2006.

29. Reid FD, Mercer PM, Harrison M, *et al*: Cholecystectomy as a risk factor for colorectal cancer: a meta-analysis. *Scand J Gastroenterol* 1996, 31(2):160-169.
30. Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, *et al*: Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J Natl Cancer Inst* 2003, 95(17):1276-1299.
31. Ries LA, Wingo PA, Miller DS, *et al*: The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer* 2000, 88(10):2398-2424.
32. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY: Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96(19):1420-1425.
33. Gryfe R, Swallow C, Bapat B, *et al*: Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1997, 21(5):233-300.
34. Geboes K, Rutgeerts P: Dysplasia in inflammatory bowel diseases: definition and clinical impact. *Can J Gastroenterol* 1999, 13(8):671-678.
35. Itzkowitz SH, Yio X: Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, 287(1):G7-17.
36. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, *et al*: Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* 1983, 14(11):931-968.
37. Mayer R, Wong WD, Rothenberger DA, *et al*: Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: a continuing problem. *Dis Colon Rectum* 1999, 42(3):343-347.
38. Blackstone MO, Riddell RH, Rogers BH, *et al*: Dysplasia-associated lesion or mass (DALM) detected by colonoscopy in long-standing ulcerative colitis: an indication for colectomy. *Gastroenterology* 1981, 80(2):366-374.
39. Rubin PH, Friedman S, Harpaz N, *et al*: Colonoscopic polypectomy in chronic colitis: conservative management after endoscopic resection of dysplastic polyps. *Gastroenterology* 1999, 117(6):1295-1300.
40. Engelsgjerd M, Farraye FA, Odze RD: Polypectomy may be adequate treatment for adenoma-like dysplastic lesions in chronic ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999, 117(6):1288-1294; discussion 1488-1291.
41. Ransohoff DF, Riddell RH, Levin B: Ulcerative colitis and colonic cancer. Problems in assessing the diagnostic usefulness of mucosal dysplasia. *Dis Colon Rectum* 1985, 28(6):383-388.
42. Suzuki K, Muto T, Shinozaki M, *et al*: Differential diagnosis of dysplasia-associated lesion or mass and coincidental adenoma in ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum* 1998, 41(3):322-327.

43. Askling J, Dickman PW, Karlen P, *et al*: Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2001, 120(6):1356-1362.
44. Bernstein CN, Shanahan F, Weinstein WM: Are we telling patients the truth about surveillance colonoscopy in ulcerative colitis? *Lancet* 1994, 343(8889):71-74.
45. Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, *et al*: Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2006, 130(4):1030-1038.
46. Gorfine SR, Bauer JJ, Harris MT, *et al*: Dysplasia complicating chronic ulcerative colitis: is immediate colectomy warranted? *Dis Colon Rectum* 2000, 43(11):1575-1581.
47. Taylor BA, Pemberton JH, Carpenter HA, *et al*: Dysplasia in chronic ulcerative colitis: implications for colonoscopic surveillance. *Dis Colon Rectum* 1992, 35(10):950-956.
48. Connell WR, Lennard-Jones JE, Williams CB, *et al*: Factors affecting the outcome of endoscopic surveillance for cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994, 107(4):934-944.
49. Lindberg B, Persson B, Veress B, *et al*: Twenty years' colonoscopic surveillance of patients with ulcerative colitis. Detection of dysplastic and malignant transformation. *Scand J Gastroenterol* 1996, 31(12):1195-1204.
50. Ullman T, Croog V, Harpaz N, *et al*: Progression of flat low-grade dysplasia to advanced neoplasia in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003, 125(5):1311-1319.
51. Ullman TA, Loftus EV, Jr., Kakar S, *et al*: The fate of low grade dysplasia in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2002, 97(4):922-927.
52. Van Assche G, Dignass A, Bokemeyer B, *et al*: Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 3: special situations. *J Crohns Colitis* 2013, 7(1):1-33.
53. Ahmet Bektaş: İnflamatuvar Barsak Hastalıkları ve Kanser. Ömer Şentürk, ed; İnflamatuvar Barsak Hastalıkları; Epimat Ofset, 2012:285-292.
54. Jass JR: Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007, 50(1):113-130.
55. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, *et al*: Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989, 244(4901):207-211.
56. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, *et al*: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988, 319(9):525-532.
57. Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Science* 1991, 254:1138-1146.
58. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, *et al*: Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2012, 27(9):1423-1431.

59. Jass JR, Whitehall VL, Young J, *et al*: Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2002, 123(3):862-876.
60. Pollock CB, Shirasawa S, Sasazuki T, *et al*: Oncogenic K-RAS is required to maintain changes in cytoskeletal organization, adhesion, and motility in colon cancer cells. *Cancer Res* 2005, 65(4):1244-1250.
61. Garnett MJ, Marais R: Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004, 6(4):313-319.
62. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, *et al*: Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004, 116(6):855-867.
63. Terry MB, Neugut AI, Mansukhani M, *et al*: Tobacco, alcohol, and p53 overexpression in early colorectal neoplasia. *BMC Cancer* 2003, 3:29.
64. Knutsen T, Padilla-Nash HM, Wangsa D, *et al*: Definitive molecular cytogenetic characterization of 15 colorectal cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 2010, 49(3):204-223.
65. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997, 386(6625):623-627.
66. Suzuki H, Harpaz N, Tarmin L, *et al*: Microsatellite instability in ulcerative colitis-associated colorectal dysplasias and cancers. *Cancer Res* 1994, 54(18):4841-4844.
67. Souza RF, Lei J, Yin J, *et al*: A transforming growth factor beta 1 receptor type II mutation in ulcerative colitis-associated neoplasms. *Gastroenterology* 1997, 112(1):40-45.
68. Sipos F, Molnar B, Zagoni T, *et al*: Growth in epithelial cell proliferation and apoptosis correlates specifically to the inflammation activity of inflammatory bowel diseases: ulcerative colitis shows specific p53- and EGFR expression alterations. *Dis Colon Rectum* 2005, 48(4):775-786.
69. Befrits R, Hammarberg C, Rubio C, *et al*: DNA aneuploidy and histologic dysplasia in long-standing ulcerative colitis. A 10-year follow-up study. *Dis Colon Rectum* 1994, 37(4):313-319; discussion 319-320.
70. Lofberg R, Brostrom O, Karlen P, Ost A, *et al*: DNA aneuploidy in ulcerative colitis: reproducibility, topographic distribution, and relation to dysplasia. *Gastroenterology* 1992, 102(4 Pt 1):1149-1154.
71. Willenbacher RF, Zelman SJ, Ferrell LD, *et al*: Chromosomal alterations in ulcerative colitis-related neoplastic progression. *Gastroenterology* 1997, 113(3):791-801.
72. Chaubert P, Benhattar J, Saraga E, *et al*: K-ras mutations and p53 alterations in neoplastic and nonneoplastic lesions associated with longstanding ulcerative colitis. *Am J Pathol* 1994, 144(4):767-775.
73. Cartwright CA, Coad CA, Egbert BM: Elevated c-Src tyrosine kinase activity in premalignant epithelia of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 1994, 93(2):509-515.
74. Chang M, Tsuchiya K, Batchelor RH, *et al*: Deletion mapping of chromosome 8p in colorectal carcinoma and dysplasia arising in

- ulcerative colitis, prostatic carcinoma, and malignant fibrous histiocytomas. *Am J Pathol* 1994, 144(1):1-6.
75. Brentnall TA, Crispin DA, Rabinovitch PS, *et al*: Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994, 107(2):369-378.
 76. Yin J, Harpaz N, Tong Y, *et al*: p53 point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions. *Gastroenterology* 1993, 104(6):1633-1639.
 77. Kim HJ, Chang SK: p53 mutation in patients with ulcerative colitis in rectal biopsy. *Korean J Intern Med* 1998, 13(2):110-116.
 78. Jawad N, Direkze N, Leedham SJ: Inflammatory bowel disease and colon cancer. *Recent Results Cancer Res* 2011, 185:99-115.
 79. Martin C, Zhang Y: Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol* 2007, 19(3):266-272.
 80. Migheli F, Migliore L: Epigenetics of colorectal cancer. *Clin Genet* 2012, 81(4):312-318.
 81. Issa JP, Ahuja N, Toyota M, *et al*: Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res* 2001, 61(9):3573-3577.
 82. Esteller M: Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biol Rep* 2011, 3:9.
 83. Kukitsu T, Takayama T, Miyanishi K, *et al*: Aberrant crypt foci as precursors of the dysplasia-carcinoma sequence in patients with ulcerative colitis. *Clin Cancer Res* 2008, 14(1):48-54.
 84. Faber C, Kirchner T, Hlubek F: The impact of microRNAs on colorectal cancer. *Virchows Arch* 2009, 454(4):359-367.
 85. Ropero S, Esteller M: The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol* 2007, 1(1):19-25.
 86. Yang XJ, Seto E: HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 2007, 26(37):5310-5318.
 87. Jones PA, Baylin SB: The epigenomics of cancer. *Cell* 2007, 128(4):683-692.
 88. Mossman D, Scott RJ: Long term transcriptional reactivation of epigenetically silenced genes in colorectal cancer cells requires DNA hypomethylation and histone acetylation. *PLoS One* 2011, 6(8):e23127.
 89. Kim MS, Chung NG, Kang MR, *et al*: Genetic and expressional alterations of CHD genes in gastric and colorectal cancers. *Histopathology* 2011, 58(5):660-668.
 90. Xiong H, Du W, Zhang YJ, *et al*: Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses JAK2/STAT3 signaling via inducing the promoter-associated histone acetylation of SOCS1 and SOCS3 in human colorectal cancer cells. *Mol Carcinog* 2012, 51(2):174-184.
 91. Ashktorab H, Belgrave K, Hosseinkhah F, *et al*: Global histone H4 acetylation and HDAC2 expression in colon adenoma and carcinoma. *Dig Dis Sci* 2009, 54(10):2109-2117.

92. Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, *et al*: Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J* 2002, 21(11):2672-2681.
93. Glaser KB, Li J, Staver MJ, *et al*: Role of class I and class II histone deacetylases in carcinoma cells using siRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 310(2):529-536.
94. Senese S, Zaragoza K, Minardi S, *et al*: Role for histone deacetylase 1 in human tumor cell proliferation. *Mol Cell Biol* 2007, 27(13):4784-4795.
95. Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, *et al*: Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev* 2007, 21(14):1790-1802.
96. Choi JH, Kwon HJ, Yoon BI, *et al*: Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Jpn J Cancer Res* 2001, 92(12):1300-1304.
97. Weichert W, Roske A, Gekeler V, *et al*: Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2008, 9(2):139-148.
98. Miyake K, Yoshizumi T, Imura S, *et al*: Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, histone deacetylase 1, and metastasis-associated protein 1 in pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation. *Pancreas* 2008, 36(3):e1-9.
99. Weichert W, Roske A, Gekeler V, *et al*: Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *Br J Cancer* 2008, 98(3):604-610.
100. Halkidou K, Gaughan L, Cook S, *et al*: Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 2004, 59(2):177-189.
101. Keshelava N, Davicioni E, Wan Z, *et al*: Histone deacetylase 1 gene expression and sensitization of multidrug-resistant neuroblastoma cell lines to cytotoxic agents by depsipeptide. *J Natl Cancer Inst* 2007, 99(14):1107-1119.
102. Pulukuri SM, Gorantla B, Rao JS: Inhibition of histone deacetylase activity promotes invasion of human cancer cells through activation of urokinase plasminogen activator. *J Biol Chem* 2007, 282(49):35594-35603.
103. Deubzer HE, Ehemann V, Westermann F, *et al*: Histone deacetylase inhibitor Helminthosporium carbonum (HC)-toxin suppresses the malignant phenotype of neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 2008, 122(8):1891-1900.
104. Rikimaru T, Taketomi A, Yamashita Y, *et al*: Clinical significance of histone deacetylase 1 expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2007, 72(1-2):69-74.

105. Ozdag H, Teschendorff AE, Ahmed AA, *et al*: Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. *BMC Genomics* 2006, 7:90.
106. Weichert W, Roske A, Niesporek S, *et al*: Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2008, 14(6):1669-1677.
107. Higashijima J, Kurita N, Miyatani T, *et al*: Expression of histone deacetylase 1 and metastasis-associated protein 1 as prognostic factors in colon cancer. *Oncol Rep* 2011, 26(2):343-348.
108. Witt O, Deubzer HE, Milde T, *et al*: HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* 2009, 277(1):8-21.
109. Chang S, Young BD, Li S, *et al*: Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell* 2006, 126(2):321-334.
110. Mottet D, Bellahcene A, Pirotte S, *et al*: Histone deacetylase 7 silencing alters endothelial cell migration, a key step in angiogenesis. *Circ Res* 2007, 101(12):1237-1246.
111. Cao D, Bromberg PA, Samet JM: COX-2 expression induced by diesel particles involves chromatin modification and degradation of HDAC1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007, 37(2):232-239.
112. He H, Huynh N, Liu KH, *et al*: P-21 activated kinase 1 knockdown inhibits beta-catenin signalling and blocks colorectal cancer growth. *Cancer Lett* 2012, 317(1):65-71.
113. He TC, Sparks AB, Rago C, *et al*: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998, 281(5382):1509-1512.
114. Polakis P: The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007, 17(1):45-51.
115. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, *et al*: Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997, 275(5307):1787-1790.
116. Korinek V, Barker N, Morin PJ, *et al*: Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 1997, 275(5307):1784-1787.
117. Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, *et al*: The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002, 111(2):241-250.
118. Wong SC, Lo ES, Lee KC, *et al*: Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10(4):1401-1408.
119. Zhang B, Ougolkov A, Yamashita K, *et al*: beta-Catenin and ras oncogenes detect most human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003, 9(8):3073-3079.

120. Janssen KP, Alberici P, Fsihi H, *et al*: APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology* 2006, 131(4):1096-1109.
121. Mologni L, Dekhil H, Ceccon M, *et al*: Colorectal tumors are effectively eradicated by combined inhibition of {beta}-catenin, KRAS, and the oncogenic transcription factor ITF2. *Cancer Res* 2010, 70(18):7253-7263.
122. Luo F, Brooks DG, Ye H, *et al*: Mutated K-ras(Asp12) promotes tumorigenesis in Apc(Min) mice more in the large than the small intestines, with synergistic effects between K-ras and Wnt pathways. *Int J Exp Pathol* 2009, 90(5):558-574.
123. Huynh N, Liu KH, Baldwin GS, *et al*: P21-activated kinase 1 stimulates colon cancer cell growth and migration/invasion via ERK- and AKT-dependent pathways. *Biochim Biophys Acta* 2010, 1803(9):1106-1113.
124. Yuen ST, Davies H, Chan TL, Ho JW, *et al*: Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res* 2002, 62(22):6451-6455.
125. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, *et al et al*: Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 2001, 85(5):692-696.
126. Kumar R, Gururaj AE, Barnes CJ: p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006, 6(6):459-471.
127. Tang YY, Shi J, Zhang L, *et al*: Energetic and functional contribution of residues in the core binding factor beta (CBFbeta) subunit to heterodimerization with CBFalpha. *J Biol Chem* 2000, 275(50):39579-39588.
128. He H, Hirokawa Y, Gazit A, *et al*: The Tyr-kinase inhibitor AG879, that blocks the ETK-PAK1 interaction, suppresses the RAS-induced PAK1 activation and malignant transformation. *Cancer Biol Ther* 2004, 3(1):96-101.
129. Bokoch GM: Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* 2003, 72:743-781.
130. Davies H, Bignell GR, Cox C, *et al*: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002, 417(6892):949-954.
131. He H, Shulkes A, Baldwin GS: PAK1 interacts with beta-catenin and is required for the regulation of the beta-catenin signalling pathway by gastrins. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1783(10):1943-1954.
132. Zhu G, Wang Y, Huang B, *et al*: A Rac1/PAK1 cascade controls beta-catenin activation in colon cancer cells. *Oncogene* 2012, 31(8):1001-1012.
133. Carter JH, Douglass LE, Deddens JA, *et al*: Pak-1 expression increases with progression of colorectal carcinomas to metastasis. *Clin Cancer Res* 2004, 10(10):3448-3456.

134. Li LH, Zheng MH, Luo Q, *et al*: P21-activated protein kinase 1 induces colorectal cancer metastasis involving ERK activation and phosphorylation of FAK at Ser-910. *Int J Oncol* 2010, 37(4):951-962.
135. Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan A, *et al*: Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(19):10330-10334.
136. Munemitsu S, Albert I, Souza B, *et al*: Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92(7):3046-3050.
137. Verma UN, Surabhi RM, Schmaltieg A, *et al*: Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003, 9(4):1291-1300.
138. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T: E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009, 28(1-2):151-166.
139. Fu J, Bian M, Jiang Q, *et al*: Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 2007, 5(1):1-10.
140. Marumoto T, Zhang D, Saya H: Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer* 2005, 5(1):42-50.
141. Katayama H, Brinkley WR, Sen S: The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2003, 22(4):451-464.
142. Rugge M, Fassan M, Zaninotto G, *et al*: Aurora kinase A in Barrett's carcinogenesis. *Hum Pathol* 2010, 41(10):1380-1386.
143. Lo Iacono M, Monica V, Saviozzi S, *et al*: Aurora Kinase A expression is associated with lung cancer histological-subtypes and with tumor de-differentiation. *J Transl Med* 2011, 9:100.
144. Sen S, Zhou H, White RA: A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 1997, 14(18):2195-2200.
145. Reiter R, Gais P, Jutting U, *et al*: Aurora kinase A messenger RNA overexpression is correlated with tumor progression and shortened survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006, 12(17):5136-5141.
146. Zhou H, Kuang J, Zhong L, *et al*: Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 1998, 20(2):189-193.
147. Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, *et al*: A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 1998, 17(11):3052-3065.
148. Carvalho B, Postma C, Mongera S, *et al*: Multiple putative oncogenes at the chromosome 20q amplicon contribute to colorectal adenoma to carcinoma progression. *Gut* 2009, 58(1):79-89.

149. Sillars-Hardebol AH, Carvalho B, de Wit M, *et al*: Identification of key genes for carcinogenic pathways associated with colorectal adenoma-to-carcinoma progression. *Tumour Biol* 2010, 31(2):89-96.
150. Dar AA, Zaika A, Piazuolo MB, *et al*: Frequent overexpression of Aurora Kinase A in upper gastrointestinal adenocarcinomas correlates with potent antiapoptotic functions. *Cancer* 2008, 112(8):1688-1698.
151. El-Rifai W, Powell SM: Molecular and biologic basis of upper gastrointestinal malignancy. Gastric carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2002, 11(2):273-291, viii.
152. Kasap E, Boyacioglu SO, Korkmaz M, *et al*: Aurora kinase A (AURKA) and never in mitosis gene A-related kinase 6 (NEK6) genes are upregulated in erosive esophagitis and esophageal adenocarcinoma. *Exp Ther Med* 2012, 4(1):33-42.
153. Belt EJ, Brosens RP, Delis-van Diemen PM, *et al*: Cell cycle proteins predict recurrence in stage II and III colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2012, 19 Suppl 3:S682-692.
154. Jee HJ, Kim AJ, Song N, *et al*: Nek6 overexpression antagonizes p53-induced senescence in human cancer cells. *Cell Cycle* 2010, 9(23):4703-4710.
155. Yin MJ, Shao L, Voehringer D, *et al*: The serine/threonine kinase Nek6 is required for cell cycle progression through mitosis. *J Biol Chem* 2003, 278(52):52454-52460.
156. Belham C, Roig J, Caldwell JA, *et al*: A mitotic cascade of NIMA family kinases. Nercc1/Nek9 activates the Nek6 and Nek7 kinases. *J Biol Chem* 2003, 278(37):34897-34909.
157. O'Regan L, Fry AM: The Nek6 and Nek7 protein kinases are required for robust mitotic spindle formation and cytokinesis. *Mol Cell Biol* 2009, 29(14):3975-3990.
158. Cao X, Xia Y, Yang J, *et al*: Clinical and biological significance of never in mitosis gene A-related kinase 6 (NEK6) expression in hepatic cell cancer. *Pathol Oncol Res* 2012, 18(2):201-207.
159. Nassirpour R, Shao L, Flanagan P, *et al*: Nek6 mediates human cancer cell transformation and is a potential cancer therapeutic target. *Mol Cancer Res* 2010, 8(5):717-728.
160. Takeno A, Takemasa I, Doki Y, *et al*: Integrative approach for differentially overexpressed genes in gastric cancer by combining large-scale gene expression profiling and network analysis. *Br J Cancer* 2008, 99(8):1307-1315.
161. Enroth S, Rada-Iglesias A, Andersson R, *et al*: Cancer associated epigenetic transitions identified by genome-wide histone methylation binding profiles in human colorectal cancer samples and paired normal mucosa. *BMC Cancer* 2011, 11:450.
162. Rapozo DC, Grinmann AB, Carvalho AT, *et al*: Analysis of mutations in TP53, APC, K-ras, and DCC genes in the non-dysplastic mucosa of

- patients with inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2009, 24(10):1141-1148.
163. Yantiss RK, Goodarzi M, Zhou XK, *et al*: Clinical, pathologic, and molecular features of early-onset colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2009, 33(4):572-582.
 164. Kulaylat MN, Dayton MT: Ulcerative colitis and cancer. *J Surg Oncol* 2010, 101(8):706-712.
 165. Malcomson RD, McGregor AH: Molecular screening for colon cancer in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002, 14(10):1045-1047.
 166. Habermann JK, Upender MB, Roblick UJ, *et al*: Pronounced chromosomal instability and multiple gene amplifications characterize ulcerative colitis-associated colorectal carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2003, 147(1):9-17.
 167. Stypula-Cyrus Y, Damania D, Kunte DP, *et al*: HDAC up-regulation in early colon field carcinogenesis is involved in cell tumorigenicity through regulation of chromatin structure. *PLoS One* 2013, 8(5):e64600.
 168. Wilson AJ, Byun DS, Popova N, *et al*: Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem* 2006, 281(19):13548-13558.
 169. Glauben R, Sonnenberg E, Zeitz M, *et al*: HDAC inhibitors in models of inflammation-related tumorigenesis. *Cancer Lett* 2009, 280(2):154-159.
 170. Khare V, Lyakhovich A, Dammann K, *et al*: Mesalamine modulates intercellular adhesion through inhibition of p-21 activated kinase-1. *Biochem Pharmacol* 2013, 85(2):234-244.
 171. Turgeon N, Blais M, Gagne JM, *et al*: HDAC1 and HDAC2 restrain the intestinal inflammatory response by regulating intestinal epithelial cell differentiation. *PLoS One* 2013, 8(9):e73785.