T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLOREKTAL KANSERDE TANI BELİRTECİ OLARAK MİKRORNA'LARIN ROLÜ

SELÇUK GÜLMEZ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SEVGİ KALKANLI TAŞ

MOLEKÜLER ONKOLOJİ ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER ONKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
EYLÜL/2023

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza

Selçuk Gülmez

..../…./…..

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda yardımını ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Sevgi Kalkanlı Taş'a, Prof. Dr. Mustafa Turan ve Prof. Dr. Erdal Polat'a, tezime dair zorlu süreçteki samimi katkılarından dolayı Dr. Hani Alsadoni ve Prof. Dr Mustafa Duman'a teşekkür ederim.

Dr. Selçuk Gülmez

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR iv
İÇİNDEKİLER v
TABLOLAR LİSTESİ vi
ŞEKİLLER LİSTESİ vii
SİMGELER VE KISALTMALAR viii
ÖZET x
ABSTRACT xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. KOLOREKTAL KANSER 3
2.1.1. Kolorektal kanserin epidemiyolojisi 3
2.1.2. Etyoloji ve risk faktörleri 3
2.1.2.1. Yaş, Cinsiyet 4
2.1.2.2. Polipoid adenomlar ve inflamatuar displazi 4
2.1.2.3. Anatomik yerleşim yerine göre risk faktörleri 5
2.1.2.4. Genetik risk faktörleri 6
2.1.2.5. Erken başlangıçlı kolorektal kanser 6
2.1.2.6. Yaşam tarzı ve beslenme faktörleri 7
2.1.2.7. Tarama kolonoskopisi 7
2.2. MİKRORNA'LAR 8
2.2.1. miRNA'ların kanserdeki rolü 8
2.2.1.1. OnkomiR 9
2.2.1.2. Tumor supresör miRNA 9
3. GEREÇ VE YÖNTEM 11
3.1. HASTALAR VE NUMUNELER 11
3.2. DOKU VE SERUMDAN MİKRORNA İZOLASYONU 12
3.3. TAMAMLAYICI DNA (cDNA) SENTEZİ 13
4. BULGULAR 15
5. TARTIŞMA 20
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 23
KAYNAKLAR 24
EK 28

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4.1: Vakaların klinikopatolojik profili 15

Tablo 4.2: Tümör dokusu ve serum örneklerindeki 3 miRNA ekspresyon seviyesinin kontrollerle karşılaştırılması 16

Tablo 4.3: Tümör hastalarının serumunda miRNA 92a-3p, miRNA 29a-3p ve miRNA 21-5p'nin kesim noktalarına göre klinikopatolojik özellikler 17

Tablo 4.4: Tümör hastalarında miRNA'ların CEA ve CA 19-9 düzeyleri ile korelasyon analizi 17

Tablo 4.5: Tümör hastalarında miRNA'ların lokalizasyonla ilişkisi 17

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Sporadik ve kalıtsal faktörlerle ilişkili kolorektal kanser vakalarının oranı 3

Şekil 2.2: Kolorektal karsinogenezin yolları ..... **Error! Bookmark not defined.**

Şekil 2.3: KRK'de lokalizasyona göre risk faktörleri 6

Şekil 2.4: Yaşam tarzı ve beslenme faktörlerinin KRK ile ilişkisi 7

Şekil 2.5: miRNA'ların oncomiR ve tumor supresör miR fonksiyonları 10

Şekil 2.6: MiRNA'ların potansiyel klinik uygulamaları 10

Şekil 3.1: Çalışma tasarımı diyagramı 11

Şekil 4.1: Tümörlü hasta ve kontrollerin serum miRNA 92a-3p, miRNA 29a-3p ve miRNA 21-5p ekspresyon seviyeleri..... 18

Şekil 4.2: Tümör hastalarının serumunda miRNA 92a-3p, miRNA 29a-3p ve miRNA 21-5p'nin ROC eğrisi analizi..... 19

SİMGELER VE KISALTMALAR

APC : Adenomatozis polpipozis koli

AUC : Eğri altındaki alan

BCL2L11 : B hücreli lenfoma/lösemi 2 benzeri protein 11

BRAF : V-raf murine sarkom viral onkogen homolog B1

CA 19-9 : Karbonhidrat antijeni 19-9

CEA : Karsinoembriyonik antijen

CIMP : CpG adası metilatör fenotipi

CIN : Kromosomal instabilite

COX2 : Siklooksijenaz 2

CTLA 4 : Sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen 4

EMT : Epitelyal mezenkimal geçiş

FAP : Familyal adenomatöz polipozis

HNPCC : Herediter non polipozis Kolorektal kanser

IQR : Çeyrekler açıklığı

İBH : İnflamatuar barsak hastalığı

KLF-4 : Kruppel-like faktör-4

KRAS : Kirsten sıçan sarkom virüsü

KRK : Kolorektal kanser

LVI : Lenfovasküler invazyon

miRNA : mikroRNA

MLH : MutL homolog

MMP : Matriks metalloproteinaz

mRNA : Haberci RNA

MSH : MutS homolog

MSI : Mikrosatellit instabilite

MTAP : Metiltiyoadenosin fosforilaz

OnkomiR : Onkogen-miRNA

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

PD-1 : Programlanmış hücre ölümü proteini 1

PDCD4 : Programlanmış hücre ölümü 4

PMS2 : Protein mismatch repair System component 2

PNI : Perinöral invazyon

PTEN : Fosfat ve tensin homoloğu

ROC : Alıcı işletim karakteristiği

SPSS : Sosyal bilimler istatistik paket

STAT3 : Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü 3

TGF-β : Dönüştürücü büyüme faktörü-β

TSP-1 : Trombospondin-1

UTR : Çevrilmemiş bölge

KOLOREKTAL KANSERDE TANI BELİRTECİ OLARAK MİKRORNA'LARIN ROLÜ

ÖZET

Amaç: Bu çalışma, üç mikroRNA (miRNA)'nın (miRNA-92a-3p, miRNA-29a-3p ve miRNA-21-5p) kolorektal kanser (KRK)'deki tanısal ve prognostik öngörülebilirliğini değerlendirmek için, tümörlü hastalardan elde edilen doku ve serum numunelerinin kontrolleriyle karşılaştırmalı analizini amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem: Önceki çalışmalara dayanarak, KRK tanısı için en umut verici 3 miRNA (miR-92a-3p, miR-29a-3p ve miR-21-5p) seçildi. Çalışmaya yeni tanı almış kolorektal tümörlü toplam 15 hasta prospektif olarak dahil edildi. Kolonoskopi sırasında tümörden (15 tümör örneği) ve 5 cm komşu normal mukozadan (15 kontrol doku örneği) doku örnekleri toplandı. Aynı hastalardan ameliyat öncesi dönemde de kan örnekleri alındı (15 tümör serumu örneği). Kontrol serumları ise, yaş ve cinsiyet eşleştirilerek sağlıklı bireylerden elde edildi (15 kontrol serum örneği).

Bulgular: Her üç tümör doku ve serum miRNA'ları da upregüle olmuşlardır. Tümör serum miRNA 92a-3p'nin fold regülasyonu 10,79 (p=0,001), miRNA 29a-3p'nın 0,62 (p=0,003) ve miRNA 21-5p'nın ise 10,01 (p=0,001) idi. ROC (alıcı işletim karakteristiği) eğrisi ile hesaplanan tümör serum miRNA 92a-3p'nin cutoff değeri 8,10 [Area under curve (AUC)=0,885, duyarlılık %80,0 özgüllük %78,3 (p=0,002], miRNA 21-5p için cutoff değeri 6,08 (AUC=0,849, duyarlılık %76,7, özgüllük %72,4 (p=0,004), ve miRNA 21-5p için cutoff değeri 5,93 (AUC=0,822, duyarlılık %73,3, özgüllük %70,1, (p=0,001) idi. Tüm tümör serum miRNA'ları için lenfovasküler invazyon (LVI), tümör derecesi ve tümör evresi anlamlıydı ($p<0.05$). Kontrolleriyle karşılaştırıldığında tümör serum miR-92a-3p ve miR-29a-3p perinöral invazyon (PNI) için anlamlıydı (her ikisi için de p=0,044), ancak miRNA-21-5p anlamlı bir farklılık göstermedi (p =0,282).

Sonuç: Dolaşımdaki miRNA-92a-3p, miRNA-29a-3p ve miRNA-21-5p, KRK'nin tanısı ve prognozu için umut verici görünmektedir.

Anahtar Kelimeler: miRNA, Erken tanı, Biyobelirteç, Kolorektal kanser, Gen ifadesi, Gerçek Zamanlı PCR

THE ROLE OF MICRORNA'S AS DIAGNOSTIC MARKERS IN COLORECTAL CANCER

ABSTRACT

Aim: This study aims to evaluate the suitability of miR-92a-3p, miR-29a-3p, and miR-21-5p for diagnostic and prognostic predictability of colorectal cancer (CRC) by comparative analysis of tissue and serum samples with controls.

Materials and Methods: Based on previous studies, the three most promising miRNAs (miR-92a-3p, miR-29a-3p, and miR-21-5p) for CRC diagnosis were selected. A total of 15 patients with newly diagnosed colorectal tumors were included prospectively. Tissue samples were collected during colonoscopy from the tumor (15 tumor samples) and 5 cm adjacent normal mucosa (15 control tissue samples). Blood samples were taken from the same patients in the preoperative period (15 tumor serum samples). Control serums were achieved from healthy individuals by matching age and gender (15 control serum samples).

Results: All of these miRNAs were up-regulated. The fold regulation of tumor serum miRNA 92a-3p was 10.79 ($p=0.001$), for miRNA 29a-3p 7.62 ($p=0.003$), and for miRNA 21-5p 10.01 ($p=0.001$). The cutoff value of tumor serum miRNA 92a-3p calculated with ROC curve was 8.10 (AUC=0.885, sensitivity 80.0%, specificity 78.3%, ($p=0.002$), for miRNA 21-5p 6.08 (AUC=0.849, sensitivity 76.7%, specificity 72.4%, ($p=0.004$)), and for miRNA 21-5p 5.93 (AUC=0.822, sensitivity 73.3%, specificity 70.1%, ($p=0.001$). LVI, tumor grade, and tumor stage were significant for all tumor serum miRNAs ($p<0.05$). The tumor serum miR-92a-3p and miR-29a-3p were significant for PNI compared to their controls ($p=0.044$ for both), but miRNA-21-5p was not significantly different ($p=0.282$).

Conclusion: Circulating miRNA-92a-3p, miRNA-29a-3p, and miRNA-21-5p appear promising for the diagnosis and prognosis of CRC.

Key Words: miRNAs, Early diagnosis, Biomarkers, Colorectal cancer, Gene expression, Real-Time PCR

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser (KRK) dünyada ciddi bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir ve kansere bağlı ölümlerin ilk üç sebebinden biridir (1). Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapideki ilerlemelere ve hedefe yönelik tedavilerin eklenmesine rağmen, KRK'nin prognozu hala kötüdür ve nüks oranları da yüksektir (2). Bu nedenle tüm kanserlerde olduğu gibi kolorektal kanserde de temel amaç erken tanının konulmasıdır. Kanserin zamanında erken teşhis edilmesi prognozu doğrudan etkiler ve bu sayede hastalar tedavi şansı elde edebilir. Bu bilgiler ışığında erken teşhiste faydalı olabilecek ve aynı zamanda tarama testi olarak da kullanılabilecek biyobelirteçlere acil ihtiyaç duyulmaktadır (3).

İnvaziv bir yöntem olan kolonoskopi, KRK taraması için altın standart olmaya devam etmektedir ve kanser riskini %30-75 oranında azalttığı gösterilmiştir. Dışkıda gizli kan testi ise KRK ile ilişkili mortaliteyi yalnızca %24-39 azaltabilmektedir (4), duyarlılığı ve özgüllüğü de oldukça düşüktür (5). Karsinoembriyonik antijen (CEA) ve karbonhidrat antijeni 19-9 (CA 19-9) gibi araştırılan diğer tarama testleri, erken evre KRK tanısı koymada düşük duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir (6). Bu nedenle noninvaziv, ekonomik, kullanımı kolay ve güvenilir bir tanı/tarama testinin gerekliliği açıktır. Bu bağlamda mikroRNA'lar (miRNA'lar) son yıllarda önemli bir araştırma konusu olmuştur. miRNA'ların sunduğu önemli bir avantaj, kan, tümör dokusu, dışkı ve sıvı örneklerinde de kanıtlanabilir olmalarıdır.

miRNA'lar, 18-25 nükleotid uzunluğunda, protein yapıda kodlamayan küçük RNA moleküleridir ve gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde rol oynarlar. Hücresel farklılaşma, çoğalma, hayatta kalma ve tümör oluşumunda önemli rol oynarlar (7). Bazı miRNA'lar onkogenik genler, diğerleri ise tümör baskılayıcı genler olarak görev yapar. miRNA'lar kolorektal kanserin başlatılmasında, ilerlemesinde ve invazyonunda düzenleyici bir rol üstlenir (8). Giderek artan sayıda kanıt, dolaşımdaki bazı miRNA'ların kanser hücreleri tarafından üretildiğini ve salgılandığını göstermektedir (9). Sonuç olarak miRNA'lar potansiyel biyobelirteç adaylarıdır. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında KRK hastalarında dolaşımındaki miRNA'ların yüksek tespit oranı, bunların tanısal belirteçler olarak potansiyel kullanımlarını düşündürmektedir (10). KRK hastalarında miRNA düzeylerinin yüksek duyarlılığı ve özgüllüğüne rağmen, KRK'in

tanısına yönelik tek bir izole miRNA'nın tanımlanması ve oluşturulması hala eksiktir. Çeşitli çalışmalar KRK tanısı için farklı miRNA'ları aday göstermiştir (11), bunlardan özellikle miR-92a-3p, miR-29a-3p ve miR-21-5p öne çıkmaktadır (12).

Çalışmamız, farklı çalışmalarda yüksek duyarlılık ve özgüllük sunan ve KRK tanısı için erken dönemde faydalı olabilecek miR-92a-3p, miR-29a-3p ve miR-21-5p'nin tümörlü doku ve serum örneklerinin normal kontrolleriyle karşılaştırmalı analiz edilmesini amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

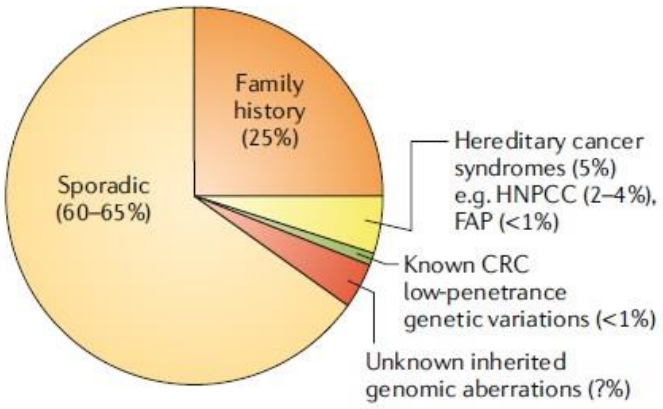
2.1. KOLOREKTAL KANSER

2.1.1. Kolorektal kanserin epidemiyolojisi

2018 GLOBAN (13) verilerine göre KRK kanser arasında sıklık sıralamasında 3. sırada karşılaşılmakla beraber kansere bağlı ölümlere bakıldığında ise 2. sırada yer almaktadır**.** Türkiye'de, her 100,000 kişide yaşa standartlaştırılmış olarak cinsiyete göre KRK insidans hızı erkeklerde 27,4, kadınlarda ise 16,0 olarak gözlenmektedir.

2.1.2. Etyoloji ve risk faktörleri

Şekil 2.1'den de görülebileceği üzere, kolorektal kanser (KRK) vakalarının yaklaşık %60-65'i, değiştirilebilir risk faktörlerinin etkisiyle oluşan somatik, genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu sporadik bir şekilde ortaya çıkar (14).

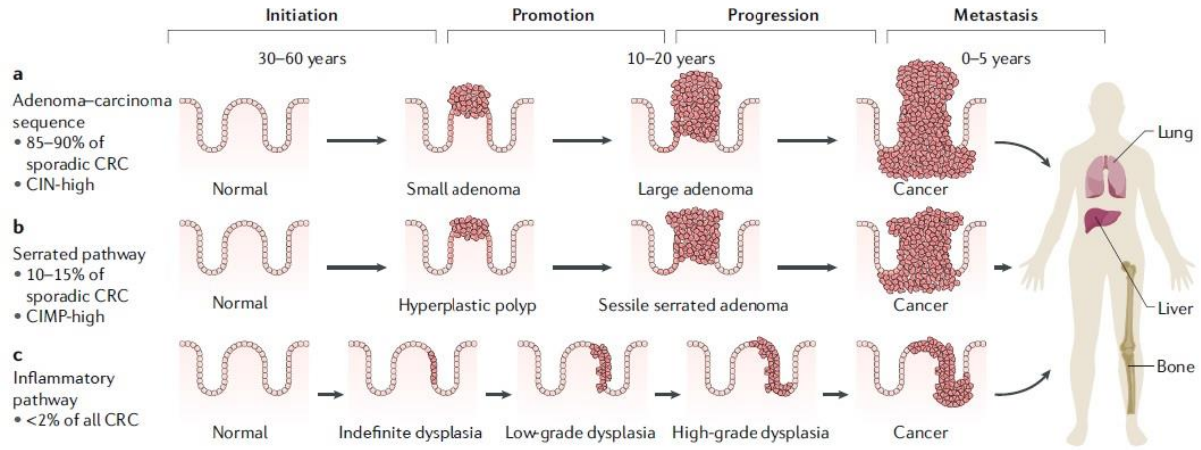


Şekil 2.1: Sporadik ve kalıtsal faktörlerle ilişkili kolorektal kanser vakalarının oranı

2.1.2.1. Yaş, Cinsiyet: Gerek KRK'in ortaya çıkışı gerek ise de ona bağlı ölüm oranları 50 yaş sonrasında belirginleşmektedir ve dünya geneline bakıldığında vakaların ve ölümlerin yaklaşık %90'ı bu yaştan sonra gözlenmektedir (15).

Yaşa göre düzenlenmiş cinsiyet analizinde ise erkekler kadınlara kıyasla 1,5 katı daha yüksek oranda KRK'e yakalanma şanssızlığına sahiptir (16).

2.1.2.2. Polipoid adenomlar ve inflamatuar displazi: Şekil 2.2'de KRK'in başlangıç aşamasından itibaren seyri özetlenmiştir ve karşımıza 4 aşamada çıkmaktadır; inisiasyon, promosyon, progresyon ve metastaz.



Şekil 2.2: Kolorektal karsinogenezin yolları

İlk başlangıç fazında irreversibl DNA hasarı sonrası hücreler neoplastik transformasyona uğrarlar. Promosyon fazında ise bu hücreler anormal proliferasyon ve büyümeye sahip olur (neoplazm). Progresyon fazında ise neoplastik hücreler genetik ve epigenetik değişiklerle benign özellikten malign dönüşüme geçiş kazanırlar. Kolorektal karsinogenez üç ana genetik ve epigenetik anormallikleri kapsar: kromozomal instabilite (CIN), CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) ve mikrosatellit instabilite (MSI) (14,17).

KRK'lar "adenom-karsinom ardışıklığı", "serrat yolak" ve "inflamatuar yolak" olmak üzere 3 ana kanser yollarını izlemektedir. Adenom-Karsinom dizisi büyük oranda KRK'in CIN-pozitif alt tipinin gelişimi ile bağlantılıdır. Bir tümör supresör gen olan APC (adenomatozis polpipozis koli) gen mutasyonu ve aynı zamanda bir onkogen olan KRAS (Kirsten sıçan sarkom virüsü) mutasyonu (KRAS diğer önemli bir tümör supresör gen olan P53 inaktivasyonu ile ilişkilidir) KRK gelişiminde tetikleyici görevler

üstlenmektedir (18). Serrat yolak sesil serrat adenomlardan kaynaklanmaktadır. Burada normal hücreler öncelikli olarak hiperplastik polipe ardından KRK'e dönüşmektedir (19). Bu süreçte 2 moleküler olay dikkati çekmektedir. İlki hiperplastik dönüşümde rol oynayan ve bir onkogen olan BRAF (V-raf murine sarkom viral onkogen homolog B1) mutasyonudur. Diğeri ise CIMP pozitifliği sesil serrat adenomlara oradan da KRK'e geçişi kolaylaştırmaktadır. CIMP pozitifliğine sesil serrat adenomların %75'inde ve serrat adenokanserlerin %90'unda rastlanılmıştır (20). Sonuncu yolak olan kronik inflamasyona bağlı KRK %2'den daha azı teşkil eder ve ağırlıklı olarak inflamatuar barsak hastalığı (İBH) temelinden gelişir (21). Burada non-displastik süreçten low grade ve high grade displasiye ilerleme, en nihayetinde KRK'e dönüşüm fazına geçiş söz konusudur. Ülseratif kolit olguları normal bireylere kıyasla 14 yıllık takip süre zarfında 2.4 kat daha fazla KRK riski altındadır (22). İBH'ı olan 31 hastalık bir seride APC gen mutasyonu % 13, P53 gen mutasyonu da % 60 olarak gözlenmiştir (23).

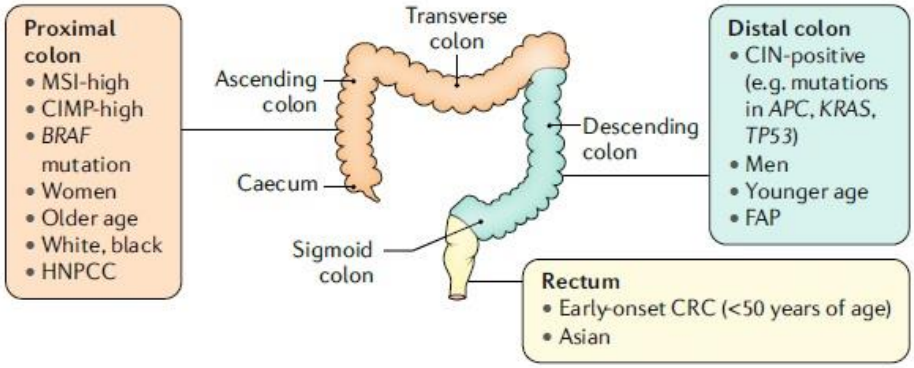
2.1.2.3. Anatomik yerleşim yerine göre risk faktörleri

KRK anatomik bölge olarak 3 kısma ayrılır:

1. proksimal kolon (çekum, çıkan kolon, hepatik fleksura ve transvers kolon),
2. distal kolon (splenik fleksura, inen kolon ve sigmoid kolon) ve
3. rektum

Lokalizasyon baz alındığındaki risk etmenleri şekil 2.3'te özetlenmiştir (14). Proksimal kolon kanseri kadınlarda erkeklere göre daha yaygındır (%34'e karşı %25, sırasıyla) ve vakaların %60'ı ≥70 yaşındadır (24).

MSI yüksek KRK, 5-florourasil bazlı adjuvan kemoterapiye iyi yanıt vermemektedir (25). Buna karşılık ise, T hücresi aktivitesini baskılayan bağışıklık kontrol noktası moleküllerini [Programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1) veya Sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen 4 (CTLA-4) gibi] hedef alan immünoterapiye uygun birer aday olabilirler (26).



Şekil 2.3: KRK'de lokalizasyona göre risk faktörleri

2.1.2.4. Genetik risk faktörleri: Birinci derece yakınlarının sadece birinde KRK kanseri olan bir bireyde KRK kansere yakalanma riski 2.2 kat, en az ikisinde varsa bu oran 3.9 kata çıkmaktadır. İlgili bireylerde KRK'e yakalanma <50 yaş ise bu risk daha da artmaktadır (27).

Herediter non polipozis Kolorektal kanser (HNPCC), batıdaki prevalansının 300 kişide 1 olan en yaygın kalıtsal KRK sendromudur (28). HNPCC'nin en belirgin belirgin karakteristiği, ağırlıklı olarak proksimal kolonda bulunan MSI yüksek KRK'in gelişmesidir (29). Kalıtsal HNPCC'de MSI yüksek KRK'e MutL homolog 1 (MLH1), MutS homolog 2 (MSH2), MSH6 ve Protein mismatch repair System component (PMS2) dahil DNA missmatch repair genlerinden herhangi birindeki germ hattı genetik mutasyonları neden olur. Sporadik MSI yüksek KRK'de ise MLH1'in epigenetik susturulması söz konusudur (30) .

Kalıtsal KRK sendromunun ikinci en yaygın şekli familyal adenomatöz polipozis (FAP)'dir ve germ hattı APC gen mutasyonu ile ilişkilidir. Temelde distal kolonu tutar ve adenomlar 40 yaşında %100 kansere döner. FAP KRK'lerin sadece <%1'den sorumludur (31).

2.1.2.5. Erken başlangıçlı kolorektal kanser: KRK'in bir bireyde 50 yaşından evvel orta çıkmasına durumudur ve rektumda kolona göre daha fazla gözlenmektedir (32). Obezinin 5-19 yaş arası çocuk ve ergenlerdeki görünümü ile erken ortaya çıkan KRK arasında yakın bir paralellik vardır (33).

2.1.2.6. Yaşam tarzı ve beslenme faktörleri: Obezite, düşük fiziksel aktivite, kötü beslenme (yüksek kırmızı ve işlenmiş et, düşük lif, düşük tam tahıl ve düşük kalsiyum gibi), sigara ve alkol KRK riskini artırır (Şekil 2.4) (34). Günlük aspirin kullanımı (75-300 mg) uzun vadede KRK gelişme riskiyle ters ilişkili bulunmuştur (35).

Aetiological factors	Level of evidence[a]	Unit increase
Obesity	↑↑	5 kg/m² in BMI
	↑↑	10 cm in WC
Total physical activity	↓↓	5 MET-hours per week
Western dietary pattern	↑↑	Highest versus lowest
Prudent dietary pattern	↓↓	Highest versus lowest
Processed meat	↑↑	50 g per day
Red meat	↑	100 g per day
Total fibre	↓	10 g per day
Whole grain	↓	90 g per day
Alcohol (as ethanol)	↑↑	10 g per day
Smoking[b]	↑	Current versus never smokers
Aspirin[b]	↑↑	75–1200 mg per day versus control
Total calcium[b]	↓	300 mg per day

Şekil 2.4: Yaşam tarzı ve beslenme faktörlerinin KRK ile ilişkisi

Aspirin antikanser etkisini tümörü teşvik eden inflamasyonu besleyen ve T hücresi aracılı antitümör bağışıklığını baskılayan bir enzim olan siklooksijenaz 2'yi (COX2) inhibe ederek gösterebilir (36).

Kalsiyum, kolorektal kanser riskini azaltmada önemli bir rol oynar. Bu mineral, kolorektal lümendeki ikincil safra asitlerini, iyonize yağ asitlerini ve hem demirini çökelterek bu maddelerin kolorektal mukozadaki kanserojen etkilerini azaltabilir (37).

2.1.2.7. Tarama kolonoskopisi: Kolonoskopi altın standart tarama yöntemidir ve KRK riskini ~ 3.2 katı azaltır (38).

2.2. MİKRORNA'LAR

mikroRNA'lar (miRNA'lar), transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu kontrol eden ve ~21 nükleotitten oluşan en kısa kodlamayan RNA'lardan biridir. miRNA'lar sitoplazmadaki haberci RNA'ya (mRNA) bağlanır, bu da mRNA'nın bozulmasına veya translasyonun geçici olarak engellenmesine neden olur (39).

Belirli bir miRNA'nın downregülasyonu, karşılık gelen hedef proteinlerin ekspresyonunun upregüle edilmesine ve bunun tersi şeklinde, bir miRNA'nın upregülasyonu, hedef protein(ler)in ekspresyonunun azalması ile sonuçlanır. miRNA'lar, translasyon baskısını indüklemek için mRNA'nın 3 ve 5 çevrilmemiş bölgelerine (UTR'ler) ve kodlama bölgelerine bağlanır. miRNA'lar ayrıca bir genin promotör bölgelerine bağlanarak gen transkripsiyonunu indüklemede de rol oynarlar (40). miRNA'lar tipik olarak hücrelerin içinde bulunur; ancak bunların bir kısmı, eksozomlar olarak bilinen lipid kaplı parçacıklar halinde dolaşıma karışır (41). Dolaşımdaki eksozomal miRNA'lar, kanda stabil oldukları ve endojen RNAse aktivitesinden korundukları için olası hastalık biyobelirteçleri olarak tanımlanmıştır (42).

miRNA'lar kanser hücresi dönüşümünde önemli bir rol oynar. miRNA'lar, tümör gelişimi ve ilerlemesi veya hücre döngüsü inhibisyonunda rol oynayan genleri hedefleyerek tümör baskılayıcı genler veya onkogenler olarak işlev görebilir. miRNA'lar ilk tanı anından itibaren kanserin tanısında, prognozunda ve tedavisinde vaad edici olmuştur. mikroRNA'ların keşfinden bu yana, kanser teşhisi, prognozu ve tedavisi için büyük umut vaat ettiler. Farklı tümör tipleri için farklı miRNA profilleri tanımlanabilir; bunlar daha sonra kanser tanısı, prognozu ve tedavisinde kullanım için fenotipik karakteristikler olarak görev üstlenebilirler (43).

2.2.1. miRNA'ların kanserdeki rolü

Şekil 2.5'te miRNA'ların kanserdeki rolü şematik olarak özetlenmişir (44). İki tür miRNA vardır; 1) Onkogen-miRNA (onkomiR) ve 2) Tumor supresör miRNA (Ts-miR)

2.2.1.1. OnkomiR: OnkomiR'ler, tümör baskılayıcı gen translasyonunu baskılar ve aşırı ekspresyon yoluyla tümör hücresi büyümesini destekler. Tümör baskılayıcı miRNA'lar, onkogenleri kodlayan mRNA'ların translasyonunu baskılayarak tümör oluşumunu ve ardından kanser gelişimini engeller (45).

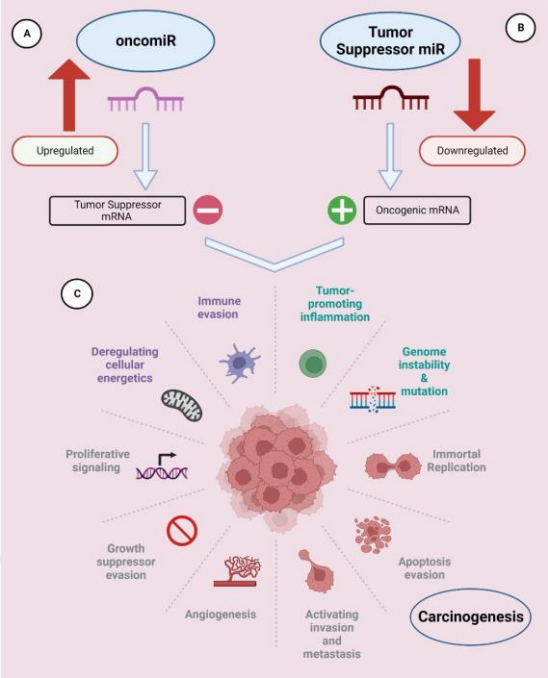
TGF-β (dönüştürücü büyüme faktörü-β), E2F, PTEN (fosfat ve tensin homoloğu) sinyal yolu, B hücreli lenfoma/lösemi 2 benzeri protein 11 (BCL2L11) ve trombospondin-1 (TSP-1) miRNA-17-92 kümesi (miRs-17, -18a, -19a, -20a, -19b ve -92a) tarafından downregüle edilirler ve tümör büyümesini tetikler (46). miR-17-92 kümesinin "küçük hücreli akciğer kanseri, kolon kanseri, hepatoselüler karsinom, tiroid kanseri, kolorektal adenom ve renal hücreli karsinom'da aşırı eksprese edildikleri gösterilmiştir. miRNA 21 meme, akciğer, over, kolon, prostat, pankreas ve mide kanseri hastalarının serum, plazma ve tümör dokularında (44), miRNA 181 prostat kanseri hastalarında (47), miRNA 146 meme kanseri hastalarının plazmasında (48), miRNA 221/222 karaciğer (49), meme (50), kolon (51) ve pankreas kanseri (52) hastalarında aşırı eksprese bulunmuşlardır.

2.2.1.2. Tumor supresör miRNA: Ts-miRNA'lar, kanserin ilerlemesini downregüle ederler. Tümör baskılayıcı miRNA'ların aşağı regülasyonu, kanser gelişiminde ve çoğalmasında çok önemli bir rol oynar. TS-miRNA'lar, kanserle ilişkili genomik bölgelerdeki veya hassas bölgelerdeki konumlarından dolayı mutasyonlara karşı daha duyarlıdır. TS-miRNA'ların aşağı regülasyonu, biyogenezlerinde rol oynayan işlevsiz proteinler veya herhangi bir genetik değişiklik nedeniyle ortaya çıkabilir (53).

Bir ts-miRNA olan -miRNA 16'nın kaybı kronik lenfositik lösemi, mide, prostat ve pankreas tümörü, Let- 7 ailesi meme ve akciğer kanseri, miRNA 29 ve miRNA 34 meme kanseri, akciğer kanseri, nöroblastoma ve glioblastoma, kolon kanseri, mide kanseri, osteoblastoma, over kanseri, mesane kanseri, rahim ağzı kanseri, kolanjiyokarsinom, melanom ve prostat kanseri ile ilişkili bulunmşlardır (44).

2.2.2. Kanser metastazında miRNA'ların rolü

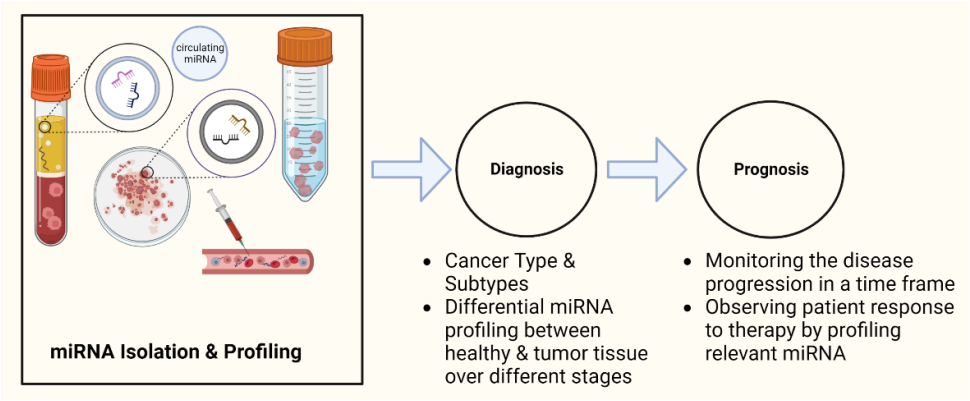
miRNA'lar aynı zamanda tümör metastazında da rol oynayabilmektedir. miRNA-10b'nin aşırı ekspresyonu meme kanserinin başlangıcı ve akciğere metastazı ile bağlantılıdır (54). miRNA-320a'nın aşırı ekspresyonu pankreas kanserinde güçlü bir şekilde katkıda bulunur (55).



Şekil 2.5: miRNA'ların onkomiR ve tumor supresör miR fonksiyonları

2.2.3. Biyobelirteç olarak miRNA'ların rolü

miRNA'ların potansiyel klinik uygulamalarına şekil 2.6'da kısaca değinilmiştir (44). Vücut sıvılarında dolaşan hassas ve spesifik biyobelirteçlerin teşhisi, kanserin zamanında teşhisi için kritik öneme sahiptir. Minimal invaziv bir tarama testiyle hastalığın erken tespit edilebilmesi tedavinin de etkinliğini önemli ölçüde belirler ve hatta maliyeti de azaltabilir. miRNA'ların kanserin gelişimi ve ilerlemesindeki rolünün mevcut anlayışı, miRNA'ları kanser biyobelirteçleri olarak güçlü bir araç haline getirmiştir (56).



Şekil 2.6: miRNA'ların potansiyel klinik uygulamaları

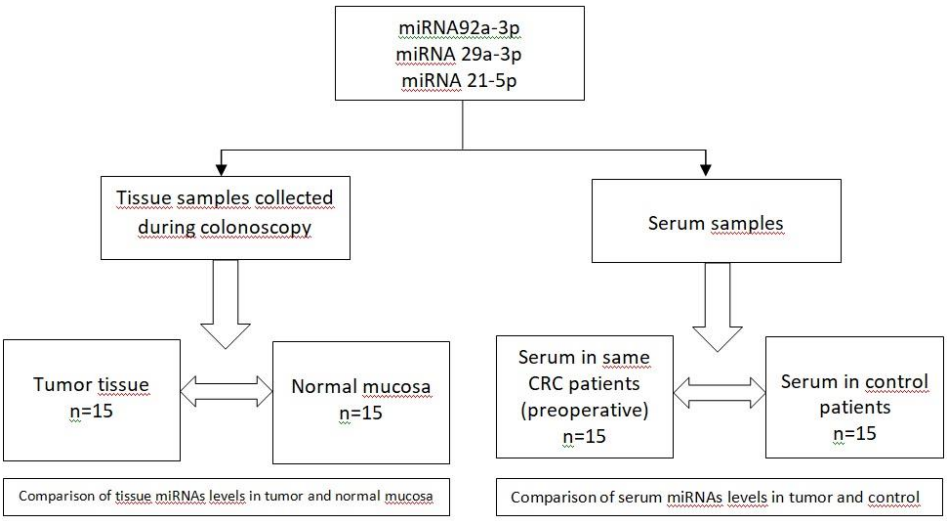
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HASTALAR VE NUMUNELER

Bu çalışmaya Haziran 2021 ile Aralık 2021 tarihleri arasında kolorektal tümörlü toplam 15 hasta prospektif olarak dahil edildi. Kolonoskopi sırasında tümör dokusundan ve komşu normal mukozanın 5 cm uzaklığından doku örnekleri toplandı. Aynı hastalardan ameliyat öncesi dönemde kan örnekleri de alındı. Hastaların yaş ve cinsiyeti ile eşleştirilerek sağlıklı bireylerden kontrol serumları elde edildi. Şekil 3.1'de çalışma tasarımı sunulmaktadır. Çalışma, Türkiye Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi (IRB no 2021/8/512) tarafından onaylandı ve Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak tüm katılımcılardan yazılı onam alındı.

Çalışmaya histopatolojik olarak doğrulanmış adenokarsinomu olan 18 yaş üstü ve elektif cerrahi geçiren hastalar dahil edildi. Acil ve tekrarlayan vakalar, neoadjuvan tedavi alan hastalar, küratif rezeksiyon yapılamayan veya palyatif cerrahi gerektiren hastalar ve peritoneal karsinomatozisi olan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Patoloji raporlarından hastaların yaşı, cinsiyeti, tümör lokasyonu, lenfovasküler invazyon (LVI), perinöral invazyon (PNI), tümör derecesi ve tümör evresi ve ayrıca ameliyat öncesi CEA ve CA 19-9 düzeyleri kaydedildi.



Şekil 3.1: Çalışma tasarımı diyagramı

3.2. DOKU VE SERUMDAN MİKRORNA İZOLASYONU

Çalışma için hastalardan ve kontrollerden 8 cc periferik kan örneği ve KRK hastalarından doku örnekleri kullanıldı. Kan örnekleri miRNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilip -80 °C'de saklandı. Toplam RNA miktarı NanoDrop R (ND)-1000 spektrofotometre (NanoDrop Technology, WILM, ABD) ile ölçüldü. Üreticinin talimatlarına göre, serumdan miRNA ekstraksiyonu miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) ile sağlandı. İzolasyon sırasında dondurulan kan örnekleri öncelikle çözüldü.

Serum miRNA tüpleri 3000-5000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatan atıldı ve tüpün dibinde kalan pellete 4 ml RNaz içermeyen su ilave edildi. Elde edilen pellet çözününceye kadar vortekslendi. Tüpler tekrar 3000-5000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatan çıkarıldı. Pelete 350 µl BM1 Tamponu eklendi ve çözünene kadar vortekslendi. Karışım 1,5 ml'lik steril bir tüpe aktarıldı, ardından 300 µl BM2 Tamponu ve 40 µl proteinaz K ilave edildi. Karışım 5 saniye boyunca vortekslendi ve 55°C'de, 400-1400 rpm'de çalkalayıcılı bir inkübatörde 10 dakika süreyle inkübe edildi. Karışım PAXgene döndürme kolonuna (mor) ilave edildi ve 3 dakika boyunca tam hızda santrifüjlendi. Nihai süpernatan, steril bir 1.5 ml Eppendorf tüpüne aktarıldı ve 700 ul %100 izopropanol, vortekslenerek ilave edildi. Karışım ikinci döndürme kolonuna (kırmızı) eklendi ve 8,000-20,000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Döndürme kolonu 2 ml'lik yeni bir Eppendorf tüpüne yerleştirildi ve üzerine 350 µl BM3 tamponu eklenerek 8,000-20,000 xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Döndürme kolonu yeni bir steril tüpe yerleştirildi ve 80 ul DNaseI ilave edildi ve 15 dakika oda sıcaklığında (20-30°C) inkübe edildi. Döndürme kolonuna 350 µl BM3 tamponu eklendi ve 8,000-20,000 xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Döndürme kolonu 2 ml'lik yeni bir Eppendorf tüpüne yerleştirildi ve üzerine 500 µl BM4 tamponu eklenerek tekrar 15 saniye 8.000-20.000 xg'de santrifüj edildi. Döndürme kolonu iki kez 500 ul BM4 tamponu ile yıkandı ve 8,000-20,000xg'de 2 dakika boyunca santrifüjlendi. Döndürme kolonu yeni bir 2 ml'lik steril tüpe yerleştirildi ve 8,000-20,000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Döndürme kolonu 1,5 ml'lik yeni bir tüpe yerleştirildi, 40 ul BR5 tamponu ilave edildi ve 8,000-20,000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Üstteki spin kolon atılarak alt kısım 1,5 ml'lik tüpte 65°C'de 5 dakika inkübe edildi ve hemen kısa süre buz üzerinde tutuldu. Son olarak örnekler -70°C'de derin dondurucuda saklandı.

3.3. TAMAMLAYICI DNA (cDNA) SENTEZİ

cDNA sentezi için miScript RT II Kiti (Qiagen, Almanya) kullanıldı ve son hacim 20 µl'ye ayarlandı. Örnek başına 4 ul Hispec tamponu, 2 ul Nucleic Mix, 2 ul Ters Transkriptaz, 10 ul RNaz içermeyen su ve her biri 50 ng RNA'ya seyreltilmiş 2 ul RNA numunesi kullanıldı. Hazırlanan örnekler 37°C'de 60 dakika inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. 95°C'de tutularak enzim inaktivasyonu sağlandı ve cDNA örnekleri bir sonraki aşamaya kadar -20°C'de saklandı.

3.4. KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GERÇEK ZAMANLI PCR)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), miScript Primer Assay ve miScript SYBR Green PCR Kitleri (Qiagen, Almanya) ile gerçekleştirildi. PCR uygulaması için her bir örnek 20ng/reaksiyona seyreltilerek işleme uygun hale getirildi. Karışım beş ayrı tüpte hazırlandı.

2 X SYBR Green Mix 10 ul, 10 X miScript Universal Primer 2 ul, RNU6_2 (kontrol geni), miR-92a-3p, miR-29a-3p ve miR-21-5p primerleri için 10 X miScript, 2 ul Primer Testi, sırasıyla 2 ul şablon cDNA ve 4 ul RNaz içermeyen su. Her bir primer karışımı, şablon RNA'lar eklenmeden 96 plakaya dağıtıldı, böylece her şablon için iki ölçüm yapıldı. Son şablon RNA karışımı plakaya eklendikten sonra uygun çevrim koşullarıyla gerçek zamanlı PCR analizi yapıldı. Hazırlanan plaklar Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR cihazına yerleştirildi ve reaksiyonlar uygun şartlarda gerçekleştirildi.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz, sosyal bilimler istatistik paket (SPSS) sürüm 22.0 yazılımı kullanılarak yapıldı (2013, IBM SPSS İstatistikleri Windows, Armonk, NY: IBM Corp.). Normal dağılım göstermeyen sayısal değişkenlerin dağılımını belirlemek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Niteliksel veriler frekans ve yüzde olarak sunuldu. Niceliksel veriler medyan (çeyrekler açıklığı=IQR) olarak verildi. Kategorik verileri karşılaştırmak için Fisher'in kesin testleri kullanıldı. Kanser hastalarında serum miRNA düzeylerini kontrol gruplarıyla karşılaştırmak için Mann-Whitney U yapıldı. Ekspresyon seviyeleri 2-ΔΔct yöntemiyle hesaplandı ve anlamlı derecede farklı ekspresyona sahip miRNA'lar Mann-Whitney U testi ile belirlendi. Kanser hastalarında miRNA'ların CEA ve CA 19-9

düzeyleri ile korelasyonu Spearman Korelasyon Katsayısı ile elde edildi. Alıcı işletim karakteristiği (ROC) eğrisi, tümör serumu miRNA 92a-3p, miRNA 29a-3p ve miRNA 21-5p'nin tanısal faydasını analiz etmek için kullanıldı. < 0,05'lik bir p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

KRK'li hastaların klinikopatolojik profili Tablo 4.1'de sunulmuştur. Hastaların sekizi 65 yaşın altında, sekizi erkekti ve sekizinde kolon tümörü vardı. Evre I-II hasta sayısı 9 (%60,0), evre III-IV hasta sayısı ise 6 (%40,0) idi.

Tablo 4.1: Vakaların klinikopatolojik profili

Özellikler		KRK n=15
Yaş, yıl	<65	8 (53.3%)
	≥65	7 (46.7%)
Cinsiyet	Erkek	8 (53.3%)
	Kadın	7 (46.7%)
Lokolizasyon	Kolon	8 (53.3%)
	Rektum	7 (46.7%)
LVI	Evet	5 (33.3%)
	Hayır	10 66.7%)
PNI	Evet	5 (33.3%)
	Hayır	10 66.7%)
Tumor derecesi	İyi (I)	6 (40.0%)
	Orta (II) ve Kötü (III)	9 (60.0%)
TNM evre	I-II	9 (60.0%)
	III-IV	6 (40.0%)

LVI: Lenfovasküler invazyon; PNI: Perinöral invazyon

Tümör dokusu ve tümörlü hastaların serum örneklerinin üç miRNA'nın tümü için kontrollerle karşılaştırılması Tablo 4.2'de verilmiştir. Tümör dokusunda miRNA 92a-3p'nin medyan (IQR) değeri 8,71 (4,15-12,48) ve normal mukozada 2,19 (1,15-3,90) idi, fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,009). Tümör dokusunda miRNA 29a-3p'nin ortanca değeri 6,88 (5,72-15,53), normal mukozada ise 3,52 (1,50-5,31) olup istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (p=0,001). Tümör dokusundaki medyan miRNA 21-5p değerinin normal mukoza ile karşılaştırılması yine anlamlıydı [sırasıyla 9,81 (3,38-16,26) ve 3,77 (2,27-6,01), p=0,004]. Tümörlü hastaların serum miRNA 92a-3p'nin ortanca değeri kontrol grubunda 9,11 (8,18-14,61) ve 6,86 (5,00-8,57) idi (p=0,001). Tümör

serumunda miRNA 29a-3p'nin medyan değeri 7,82 (5,40-9,53), kontrol serumunda ise 5,07 (3,31-6,08) idi (p=0,003). miRNA 21-5p tümör serumunun ortanca değeri 9,81 (5,77-13,98), kontrol grubunda ise 5,33 (2,27-7,08) olup aradaki fark anlamlıydı (p=0,001).

Tablo 4.2: Tümör dokusu ve serum örneklerindeki 3 miRNA ekspresyon seviyesinin kontrollerle karşılaştırılması

Değişkenler	Tümor dokusu	Normal mukoza	*p*	Tümor serum	Kontrol serum	*p*
	median (IQR)			*median (IQR)*		
miRNA 92a-3p	8.71 (4.15-12.48)	2.19 (1.15-3.90)	**0.009**	9.11 (8.18-14.61)	6.86 (5.00-8.57)	**0.001**
miRNA 29a-3p	6.88 (5.72-15.53)	3.52 (1.50-5.31)	**0.001**	7.82 (5.40-9.53)	5.07 (3.31-6.08)	**0.003**
miRNA 21-5p	9.81 (3.38-16.26)	3.77 (2.27-6.01)	**0.004**	9.81 (5.77-13.98)	5.33 (2.27-7.08)	**0.001**

Tümör hastalarının serum miRNA seviyelerinin fold düzenlemesi ve ilişkili p değerleri Şekil 4.2'de sunulmaktadır. Bu miRNA'ların tümü upregüle olarak düzenlenmiştir. miRNA 92a-3p'nin fold düzenlemesi 10,79 (p=0,001) idi, miRNA 29a-3p 7,62'lik (p=0,003) fold düzenlemesi gösterdi ve miRNA 21-5p, 10,01'lik (p=0,001) fold düzenlemesi sergiledi.

miRNA seviyelerinin kolorektal kanser için ayırt edici yeteneğini değerlendirmek amacıyla, tüm upregüle edilmiş miRNA'lar, yani miRNA 92a-3p, miRNA 29a-3p ve miRNA 21-5p için ROC eğrileri oluşturuldu (Şekil 4.2). miRNA 92a-3p'nin kesme değeri 8,10 (AUC=0,885, duyarlılık %80,0, özgüllük %78,3, (p=0,002), miRNA 21-5p için 6,08 (AUC=0,849, duyarlılık %76,7, özgüllük %72,4) (p=0,004) ve miRNA 21-5p için 5,93 (AUC=0,822, duyarlılık %73,3, özgüllük %70,1) (p=0,001) idi.

Tablo 4.3'te hastaların bu kesme değerlerine göre klinikopatolojik özellikleri gösterilmektedir. Tüm tümör serumu miRNA'ları için LVI, tümör derecesi ve tümör evresi anlamlıydı (p<0.005). PNI'nın yalnızca miRNA 21-5p için anlamlı olmadığı görüldü (p=0,282). Diğer ikisi anlamlıydı (her ikisi için de p=0,044).

Tablo 4.4 kanser hastalarında miRNA'ların CEA ve CA 19-9 düzeyleri ile korelasyon analizini göstermektedir. Hem tümör dokusundaki hem de tümör serumundaki üç miRNA'nın tümü, tümör belirteçleri ile anlamlı düzeyde korele değildi (p>0.05).

Son olarak Tablo 4.5'teki tümör dokusu ve tümör serumunun miRNA değerleri lokalizasyon açısından karşılaştırıldı ve anlamlı bir fark görülmedi (p> 0.05).

Tablo 4.3: Tümör hastalarının serumunda miRNA 92a-3p, miRNA 29a-3p ve miRNA 21-5p'nin kesim noktalarına göre klinikopatolojik özellikler

		Tümor serum miRNA 92a-3p (n=15)			Tümor serum miRNA 29a-3p (n=15)			Tümor serum miRNA 21-5 p (n=15)		
		<8.10	≥8.10	*p*	<6.08	≥6.08	p	<5.93	≥5.93	*p*
Yaş, yıl	<65	3 (37.5%)	5 (62.5%)	>0.999	3 (37.5%)	5 (62.5%)	>0.999	3 (37.5%)	5 (62.5%)	0.619
	≥65	3 (42.9%)	4 (57.1%)		3 (42.9%)	4 (57.1%)		3 (42.9%)	4 (57.1%)	
Cinsiyet	Erkek	4 (50.0%)	4 (50.0%)	0.608	4 (50.0%)	4 (50.0%)	0.608	5 (62.5%)	3 (37.5%)	0.315
	Kadın	2 (28.6%)	5 (71.4%)		2 (28.6%)	5 (71.4%)		5 (71.4%)	2 (28.6%)	
LVI	Evet	0 (0.00%)	5 (100.0%)	**0.044**	0 (0.00%)	5(100.0%)	**0.044**	0 (0.00%)	5 (100.0%)	**0.026**
	Hayır	6 (60.0%)	4 (40.0%)		6 (60.0%)	4 (40.0%)		7 (70.0%)	2 (30.0%)	
PNI	Evet	0 (0.00%)	5 (100.0%)	**0.044**	0 (0.00%)	5 (100.0%)	**0.044**	1 (20.0%)	4 (80.0%)	0.282
	Hayır	6 (60.0%)	4 (40.0%)		6 (60.0%)	4 (40.0%)		6 (60.0%)	4 (40.0%)	
Tümor derecesi	I	5 (83.3%)	1 (16.7%)	**0.011**	5 (83.3%)	1 (16.7%)	**0.011**	5 (83.3%)	1 (16.7%)	**0.041**
	II-III	1 (11.1%)	8 (88.9%)		1 (11.1%)	8 (88.9%)		2 (22.2%)	7 (77.8%)	
Tümor evresi	I-II	6 (66.7%)	3 (33.3%)	**0.028**	6 (66.7%)	3 (33.3%)	**0.028**	7 (77.2%)	2 (22.2%)	**0.007**
	III-IV	0 (0.00%)	6 (100.0%)		0 (0.00%)	6 (100.0%)		0 (0.00%)	6 (100.0%)	

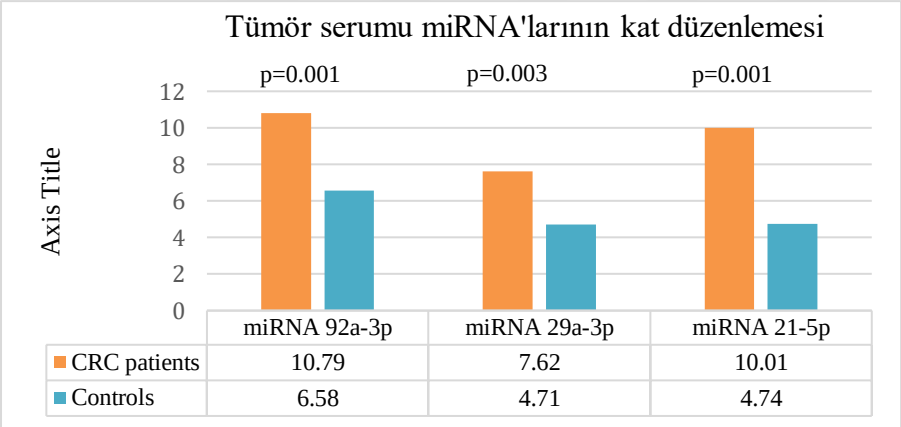
LVI: Lenfovasküler invazyon; PNI: Perinöral invazyon

Tablo 4.4: Tümör hastalarında miRNA'ların CEA ve CA 19-9 düzeyleri ile korelasyon analizi

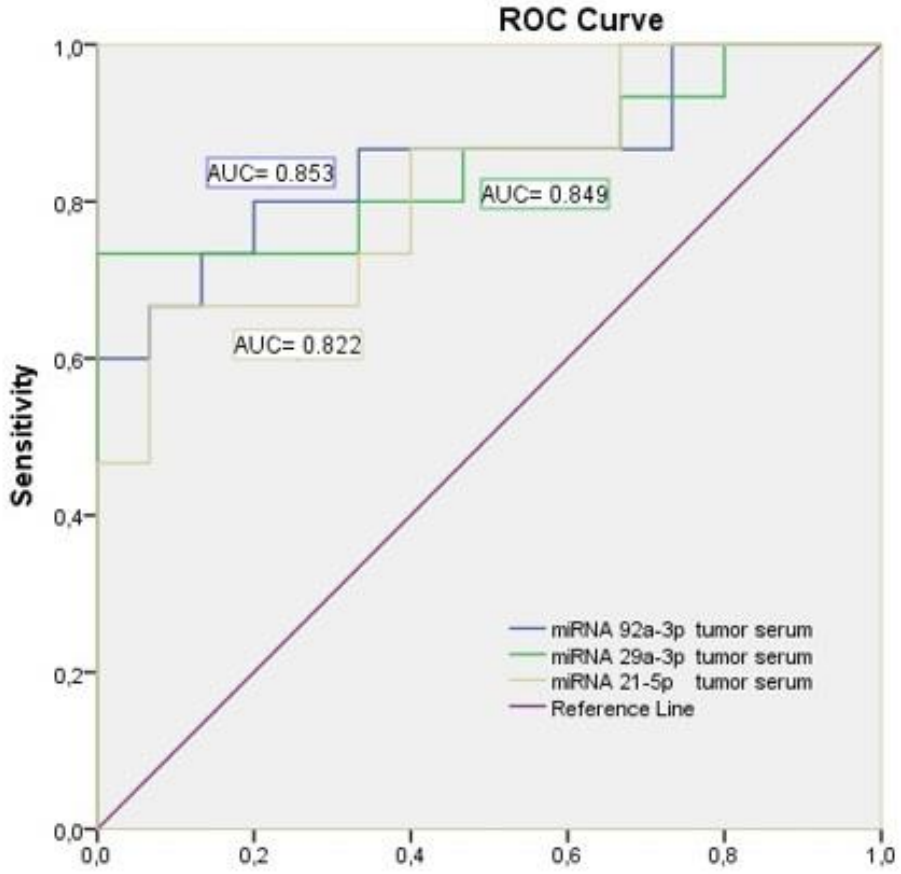
Değişkenler	CEA		CA 19-9	
	r	*p*	*r*	*p*
miRNA 92a-3p Tümor dokusu	-0.201	0.940	0.422	0.118
miRNA 29a-3p Tümor dokusu	-0.525	0.064	0.030	0.914
miRNA 21-5p Tümor dokusu	0.175	0.533	0.156	0.579
miRNA 92a-3p Tümor serum	0.247	0.476	0.052	0.854
miRNA 29a-3p Tümor serum	-0.554	0.072	-0.350	0.201
miRNA 21-5p Tümor serum	0.300	0.277	0.129	0.646

Tablo 4.5: Tümör hastalarında miRNA'ların lokalizasyonla ilişkisi

Değişkenler	Lokalizasyon	n	median (IQR)	*p*
miRNA92a-3p Tümor dokusu	Kolon	8	10.33 (7.44-12.25)	0.613
	Rektum	7	6.18 (2.80-14.07)	
miRNA29a-3p Tümor dokusu	Kolon	8	10.47 (6.72-15.59)	0.336
	Rektum	7	6.19 (4.70-13.56)	
miRNA21-5p Tümor dokusu	Kolon	8	13.11 (9.79-17.56)	0.072
	Rektum	7	3.38 (2.38-16.26)	
miRNA92a-3p Tümor serum	Kolon	8	8.75 (7.81-13.24)	0.236
	Rektum	7	9.18 (8.87-15.02)	
miRNA29a-3p Tümor serum	Kolon	8	7.66 (5.71-8.77)	0.867
	Rektum	7	7.87 (4.39-9.95)	
miRNA21-5p Tümor serum	Kolon	8	5.97 (4.63-8.53)	0.064
	Rektum	7	13.98 (9.81-16.27)	



Şekil 4.1: Tümörlü hasta ve kontrollerin serum miRNA 92a-3p, miRNA 29a-3p ve miRNA 21-5p ekspresyon seviyeleri



	AUC	95% CI	Cutoff	Sensitivity	Specificity	*p*
miRNA 92a-3p tumor serum	0.885	0.711-0.995	8.10	80.0%	78.3%	**0.002**
miRNA 29a-3p tumor serum	0.849	0.701-0.996	6.08	76.7%	72.4%	**0.004**
miRNA 21-5p tumor serum	0.822	0.672-0.972	5.93	73.3%	70.1%	**0.001**

Şekil 4.2: Tümör hastalarının serumunda miRNA 92a-3p, miRNA 29a-3p ve miRNA 21-5p'nin ROC eğrisi analizi

5. TARTIŞMA

Serum bazlı bir tanısal belirteç arayışı halen devam ettiğinden, tümör biyopsisi çoğu kanser türünün teşhisinde birincil yöntem olmaya devam etmektedir. Bu alan, kanser araştırmalarında büyük ilgi görmüştür. miRNA'lar üzerine yapılan son çalışmalar, bunların kanser süreçlerini düzenlemedeki önemli rolünü vurgulamıştır. Önceki çalışmalar esas olarak doku örneklerine veya serum/plazma örneklerine odaklanmıştır. Bu çalışmada her üç miRNA için doku ve serum örneklerinin uygun kontrol grupları ile karşılaştırılması yapılmıştır.

Mevcut çalışma, miR-92a-3p, miR-29a-3p ve miR-21-5p'nin, kontrollere kıyasla kanser hastalarının hem malign dokusunda hem de serumunda aşırı ekspresyon sergilediğini göstermektedir. Bu yukarı düzenlemeler, LVI, PNI, tümör farklılaşması ve tümör evresi dahil olmak üzere önemli prognostik göstergelerle anlamlı ilişkiler gösterdi. Ancak yalnızca miRNA 21-5p, PNI ile anlamlı bir ilişki kanıtlamadı. Ayrıca, tümör hastalarında her üç miRNA'nın ekspresyon seviyeleri ile tümör belirteçleri CEA ve CA 19-9 arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmedi. Üstelik bu üç miRNA'nın lokalizasyon analizi herhangi bir anlamlılık göstermedi.

miR-92a-3p'nin tanısal değeri, kolorektal kanser de dahil olmak üzere çeşitli tümör türlerinde kanıtlanmıştır (57). Bununla birlikte, bu çalışmalar ya tümör dokusunu normal dokuyla karşılaştırarak ya da basitçe kanser hastalarından alınan serum/plazmayı bir kontrol grubuyla karşılaştırarak sunulmuştur. Bulgularımız, kanserli doku ve kanserli hastaların serum materyallerinin normal örneklerle karşılaştırılmasına dayanarak miRNA-92a-3p'nin KRK'in tanısal bir biyolojik belirteci olabileceğini gösterdi. miRNA-92a-3p molekülünün kendisi bir onkogen görevi görür ve Wnt/ß-katenin, PTEN/Akt/FoxO ve BMP/Smads yolaklarında yer alan anahtar genleri hedefler. Sonuç olarak kolorektal kanserin ilerlemesine katkıda bulunur (58). Son yıllarda literatürde miRNA-92a-3p'nin kolorektal kanser prognozu üzerindeki etkisini vurgulayan çalışmalar yapılmaktadır (59,60), özellikle tümör derecesi ve evresi ile ilgili (61). Analizimiz sayesinde bu prognostik etkiyi sadece tümör grade ve evresi değil aynı zamanda lenfovasküler invazyon ve perinöral invazyon açısından da gözlemledik.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada diğer bir popüler belirteç olan miRNA-29a-3p'nin kolorektal kanser tanısı ve prognozu üzerindeki etkisinden bahsedilmiştir (62).

miRNA-29a-3p'nin prognostik etkisi, matriks metalloproteinaz -2 (MMP-2) geninin ve E-kadherinin Kruppel-like faktör 4 (KLF4), sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3) ve PTEN sinyal yolları aracılığıyla düzenlenmesini içerir; bu da invazyonu, metastazı ve epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) sürecini etkiler (63). Ancak miRNA-29a-3p'nin tanısal etkinliği çelişkili sonuçlar göstermektedir. Bazı çalışmalar doku ve serum/plazma örneklerinde miRNA-29a-3p seviyelerin arttığını bildirirken (64), diğerleri serum örneklerinde miRNA-29a-3p'nin tanısal rolünü desteklememektedir (65). Çalışmamız miRNA-29a-3p'nin tanısal ve prognostik rolüne ilişkin değerli kanıtlar sunmaktadır. Normal kontrollerle karşılaştırıldığında hem tümör dokusunda hem de tümörlü hastaların serumunda miRNA-29a-3p seviyelerinin arttığını gözlemledik. Yüksek miRNA-29a-3p seviyelerinin aynı zamanda lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, tümör derecesi ve tümör evresi ile de ilişkili olduğunu bulduk.

Yakın zamanda yapılan bir meta-analiz, miR 21-5p'nin KRK tanısı için uygun bir biyobelirteç olabileceğini göstermiştir (66). Bu sonuçlar bizim çalışmamıza benzerdi ve miRNA 21-5p, bitişik kanserli olmayan normal mukozaya kıyasla kanserli dokuda anlamlı bir farkın arttığını gösterdi. Ek olarak, sağlıklı olanlardan alınan örneklerle karşılaştırıldığında tümör serumunda miRNA-29a-3p'de önemli bir artış gözlemledik. Dahası, mevcut kanıtlar miRNA-21-5p'nin prognostik etkileri olabileceğini gösteriyordu (67). miRNA 21-5p, fosfataz ve tensin homologu (PTEN), programlanmış hücre ölümü 4 (PDCD4), metiltiyoadenosin fosforilaz (MTAP) ve Dönüştürücü Büyüme Faktörü-β'nın (TGF- β) düzenlenmesi yoluyla tümör oluşumunu, invazyonu ve metastazı teşvik ederek KRK'de bir onkogen görevi görür (68). Benzer şekilde, miRNA-21-5p'nin PNI dışındaki prognostik faktörler üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini öne süren sonuçlar elde ettik.

Bu çalışmanın güçlü yönlerinden biri ileriye dönük tasarımıydı. Ek olarak, KRK tanısı için öne çıkan üç miRNA'ya odaklanarak kanser dokusu ve serumun normal numunelerle karşılaştırmalı bir analizine dahil edilmektedir. Özellikle, bu çalışma aynı zamanda prognostik değerlendirmeye ilişkin bilgiler de sağlamıştır.

Çalışmamızın en büyük sınırlaması analiz için kullanılan örneklem büyüklüğünün küçük olmasıdır. Bu çalışmanın veri toplama işlemi tek merkezde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca farklı tümör evrelerinden eşit sayıda olmaması prognostik sonucu etkilemiş olabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada miRNA-92a-3p, miRNA-29a-3p ve miRNA-21-5p, kolorektal kanserli hastaların tümörlü dokusu ile buna 5 cm komşuluktaki normal dokusunda ve yine bu hastalardan ameliyat öncesinde alınmış serumu ile sağlıklı gönüllülerin serumunda kıyaslandı. Biyobelirteç düzeyini tespit etmek için tümörlü hastaların serum miRNA 92a-3p, miRNA 29a-3p ve miRNA 21-5p kesme değerleri belirlendi ve prognostik göstergeler olan LVI, PNI, tümör derecesi ve evresi açısından irdelendi. Tümörlü hastaların serumu ile normal bireylerin serumunda miRNA-92a-3p, miRNA-29a-3p ve miRNA-21-5p klasik tümör markerleri olan CEA ve CA 19-9 ile karşılaştırıldı. Her 3 tümör dokusu ve serumu miRNA'sı kolon ve rektum lokalizasyon farkı açısından da incelendi. Tüm bunların sonucunda;

1. Tümör dokusu ile normal doku arasında her 3 miRNA da anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.
2. Tümörlü hastaların serumundaki miRNA 92a-3p, miRNA 29a-3p ve miRNA 21-5p kontrol hastalarının serumuna kıyasla anlamlı yüksek bulundu.
3. Tüm tümör serumu miRNA'ları için LVI, tümör derecesi ve tümör evresi anlamlıydı ($p<0.005$). PNI'nın yalnızca miRNA 21-5p için anlamlı olmadığı görüldü ($p=0,282$).
4. Hem tümör dokusundaki hem de tümör serumundaki üç miRNA'nın tümü, CEA ve CA 19-9 tümör belirteçleri ile anlamlı düzeyde korele değildi ($p>0.05$).
5. Tümör dokusu ve tümör serumunun miRNA değerleri lokalizasyon açısından anlamlı bir fark göstermedi ($p> 0.05$).
6. Serum miRNA-92a-3p, miRNA-29a-3p ve miRNA-21-5p, KRK'nin tanısı ve prognozu için umut verici görünmektedir.
7. Sonuçların doğrulanması için geniş örneklemli çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Xi Y, Xu P. (2021). Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol*, 14, 101174.
2. Xie YH, Chen YX, Fang JY. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*, 5, 22.
3. Yang G, Zhang Y, Yang J. (2019). A Five-microRNA Signature as Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer by Bioinformatics Analysis. *Front Oncol*, 9, 1207.
4. Masuda T, Hayashi N, Kuroda Y, Ito S, Eguchi H, Mimori K. (2017). MicroRNAs as Biomarkers in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*, 9, 124.
5. Lee MW, Pourmorady JS, Laine L. (2020). Use of Fecal Occult Blood Testing as a Diagnostic Tool for Clinical Indications: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol*, 115, 662-670
6. Sekiguchi M, Matsuda T. (2020). Limited usefulness of serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 levels for gastrointestinal and whole-body cancer screening. *Sci Rep*, 10, 18202.
7. Vannini I, Fanini F, Fabbri M. (2018). Emerging roles of microRNAs in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 48, 128-133.
8. To KK, Tong CW, Wu M, Cho WC. (2018). MicroRNAs in the prognosis and therapy of colorectal cancer: From bench to bedside. *World J Gastroenterol*, 24, 2949-2973.
9. Cui M, Wang H, Yao X, et al. (2019). Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge. *Front Genet*, 10, 626.
10. Chen B, Xia Z, Deng YN, et al. (2019). Emerging microRNA biomarkers for colorectal cancer diagnosis and prognosis. *Open Biol*, 9, 180212.
11. Rapado-González Ó, Álvarez-Castro A, López-López R, Iglesias-Canle J, Suárez-Cunqueiro MM, Muinelo-Romay L. (2019). Circulating microRNAs as Promising Biomarkers in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*, 11, 898.
12. Fellizar A, Refuerzo V, Ramos JD, Albano PM. (2023). Expression of specific microRNAs in tissue and plasma in colorectal cancer. *J Pathol Transl Med*, 57, 147-157.
13. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [published correction appears in CA Cancer J Clin. 2020 Jul;70:313]. *CA Cancer J Clin*, 68, 394-424.
14. Keum N, Giovannucci E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16, 713-732.
15. Brenner H, Stock C, Hoffmeister M. (2014). Effect of screening sigmoidoscopy and screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies. *BMJ*, 348, g2467.
16. Graff RE, Möller S, Passarelli MN, et al. (2017). Familial Risk and Heritability of Colorectal Cancer in the Nordic Twin Study of Cancer. *Clin Gastroenterol Hepato*, 15, 1256-1264.
17. Bakhoum SF, Silkworth WT, Nardi IK, Nicholson JM, Compton DA, Cimini D. (2014). The mitotic origin of chromosomal instability. *Curr Biol*, 24, R148-R149.

18. Dow LE, O'Rourke KP, Simon J, et al. (2015). Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. *Cell*, 161, 1539-1552.
19. Kedrin D, Gala MK. (2015). Genetics of the serrated pathway to colorectal cancer. *Clin Transl Gastroenterol*, 6, e84.
20. O'Brien MJ, Yang S, Mack C, et al. (2006). Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol*, 30, 1491-1501.
21. Triantafillidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. (2009). Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res*, 29, 2727-2737.
22. Itzkowitz SH, Yio X. (2004). Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287, G7-G17.
23. Robles AI, Traverso G, Zhang M, et al. (2016). Whole-Exome Sequencing Analyses of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers. *Gastroenterology*, 150, 931-943.
24. Murphy N, Ward HA, Jenab M, et al. (2019). Heterogeneity of Colorectal Cancer Risk Factors by Anatomical Subsite in 10 European Countries: A Multinational Cohort Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 17, 1323-1331.e6.
25. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. (2010). Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer*, 46, 2788-2798.
26. Passardi A, Canale M, Valgiusti M, Ulivi P. (2017). Immune Checkpoints as a Target for Colorectal Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*, 18, 1324.
27. Butterworth AS, Higgins JP, Pharoah P. (2006). Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer*, 42, 216-227.
28. Win AK, Jenkins MA, Dowty JG, et al. (2017). Prevalence and Penetrance of Major Genes and Polygenes for Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 26, 404-412.
29. Lynch HT, de la Chapelle A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*, 348, 919-932.
30. Markowitz SD, Bertagnolli MM. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 361, 2449-2460.
31. Patel SG, Ahnen DJ. (2012). Familial colon cancer syndromes: an update of a rapidly evolving field. *Curr Gastroenterol Rep*, 14, 428-438.
32. Murphy CC, Singal AG. (2018). Establishing a research agenda for early-onset colorectal cancer. *PLoS Med*, 15, e1002577.
33. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*, 390, 2627-2642.
34. Clinton SK, Giovannucci EL, Hursting SD. (2020). The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. *J Nutr*, 150, 663-671.

35. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, et al. (2010). Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet*, 376, 1741-1750.
36. Zelenay S, van der Veen AG, Böttcher JP, et al. (2015). Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell*, 162, 1257-1270.
37. Gamage SMK, Dissabandara L, Lam AK, Gopalan V. (2018). The role of heme iron molecules derived from red and processed meat in the pathogenesis of colorectal carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 126, 121-128.
38. PDQ Screening and Prevention Editorial Board. Colorectal Cancer Screening (PDQ®): Health Professional Version. 2023 Jun 29. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65825/
39. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*, 79, 351-379.
40. Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. (2016). Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell*, 64, 320-333.
41. Schwarzenbach H. (2015). The clinical relevance of circulating, exosomal miRNAs as biomarkers for cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 15, 1159-1169.
42. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, 654-659.
43. Ahmad N, Haider S, Jagannathan S, Anaissie E, Driscoll JJ. (2014). MicroRNA theragnostics for the clinical management of multiple myeloma. *Leukemia*, 28, 732-738.
44. Chakrabortty A, Patton DJ, Smith BF, Agarwal P. (2023). miRNAs: Potential as Biomarkers and Therapeutic Targets for Cancer. *Genes (Basel)*, 14, 1375.
45. Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. (2016). OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res*, 76, 3666-3670.
46. Mogilyansky E, Rigoutsos I. (2013). The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ*, 20, 1603-1614.
47. Tong SJ, Liu J, Wang X, Qu LX. (2014). microRNA-181 promotes prostate cancer cell proliferation by regulating DAX-1 expression. *Exp Ther Med*, 8, 1296-1300.
48. Abrahamsson A, Dabrosin C. (2015). Tissue specific expression of extracellular microRNA in human breast cancers and normal human breast tissue in vivo. *Oncotarget*, 6, 22959-22969.
49. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, et al. (2010). miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 264-269.
50. Chen WX, Hu Q, Qiu MT, et al. (2013). miR-221/222: promising biomarkers for breast cancer. *Tumour Biol*, 34, 1361-1370.
51. Tao K, Yang J, Guo Z, et al. (2014). Prognostic value of miR-221-3p, miR-342-3p and miR-491-5p expression in colon cancer. *Am J Transl Res*, 6, 391-401.
52. Xu Q, Li P, Chen X, et al. (2015). miR-221/222 induces pancreatic cancer progression through the regulation of matrix metalloproteinases. *Oncotarget*, 6, 14153-14164.
53. Macfarlane LA, Murphy PR. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*, 11, 537-561.
54. Ma L, Reinhardt F, Pan E, et al. (2010). Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol*, 28, 341-347.
55. Wang W, Zhao L, Wei X, et al. (2016). MicroRNA-320a promotes 5-FU resistance in human pancreatic cancer cells. *Sci Rep*, 6, 27641.

56. Sioud M. (2015). RNA interference: mechanisms, technical challenges, and therapeutic opportunities. *Methods Mol Biol*, 1218, 1-15.
57. Yang X, Zeng Z, Hou Y, et al. (2014). MicroRNA-92a as a potential biomarker in diagnosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 9, e88745.
58. Chen E, Li Q, Wang H, Yang F, Min L, Yang J. (2018). MiR-92a promotes tumorigenesis of colorectal cancer, a transcriptomic and functional based study. *Biomed Pharmacother*, 106, 1370-1377.
59. Zaki A, Fawzy A, Akel SY, Gamal H, Elshimy RAA. (2022). Evaluation of microRNA 92a Expression and Its Target Protein Bim in Colorectal Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 23, 723-730.
60. Zhang N, Hu X, Du Y, Du J. (2021). The role of miRNAs in colorectal cancer progression and chemoradiotherapy. *Biomed Pharmacother*, 134, 111099.
61. Fu F, Jiang W, Zhou L, Chen Z. (2018). Circulating Exosomal miR-17-5p and miR-92a-3p Predict Pathologic Stage and Grade of Colorectal Cancer. *Transl Oncol*, 11, 221-232.
62. Mo WY, Cao SQ. (2023). MiR-29a-3p: a potential biomarker and therapeutic target in colorectal cancer. *Clin Transl Oncol*, 25, 563-577.
63. Yang F, Xuan G, Chen Y, et al. (2022). MicroRNAs Are Key Molecules Involved in the Gene Regulation Network of Colorectal Cancer. *Front Cell Dev Biol*, 10, 828128.
64. Giráldez MD, Lozano JJ, Ramírez G, et al. (2013). Circulating microRNAs as biomarkers of colorectal cancer: results from a genome-wide profiling and validation study. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 11, 681-8.e3.
65. Brunet Vega A, Pericay C, Moya I, et al. (2013). microRNA expression profile in stage III colorectal cancer: circulating miR-18a and miR-29a as promising biomarkers. *Oncol Rep*, 30, 320-326.
66. Liu T, Liu D, Guan S, Dong M. (2021). Diagnostic role of circulating MiR-21 in colorectal cancer: a update meta-analysis. *Ann Med*, 53, 87-102.
67. Jin, XH., Lu, S., Wang, AF. (2020). Expression and clinical significance of miR-4516 and miR-21-5p in serum of patients with colorectal cancer. *BMC Cancer*, 20, 241
68. Fukada M, Matsuhashi N, Takahashi T, et al. (2020). Tumor Tissue MIR92a and Plasma MIRs21 and 29a as Predictive Biomarkers Associated with Clinicopathological Features and Surgical Resection in a Prospective Study on Colorectal Cancer Patients. *J Clin Med*, 9, 2509.