

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOLOREKTAL KANSER VE ÖNCÜ LEZYONLARINDA KRAS VE
BRAF MUTASYON ANALİZLERİ YOLUYLA TANISAL YAKLAŞIM VE
HEDEFE YÖNELİK TEDAVİ SEÇİMİ**

ÖZNUR ERDOĞAN

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Arzu ENSARİ

ANKARA

2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	2
2.1. KANSER	2
2.2. KARSİNOGENEZ	3
2.3. KOLOREKTAL KANSER	4
2.4. KOLOREKTAL KANSER ETYOLOJİSİ ve EPİDEMİYOLOJİSİ	5
2.5. KOLOREKTAL KARSİNOGENEZ	8
2.5.1. KOLOREKTAL KARSİNOGENEZDE MOLEKÜLER ARA YOLLAR	9
2.5.1.1. Kromozomal İnstabilite Ara Yolu (CIN)	9
2.5.1.2. Mikrosatellit İnstabilite Ara Yolu (MSI)	13
2.5.1.3. CPG Adası Metilator Fenotipi Ara Yolu (CIMP)	14
2.5.2. KOLOREKTAL KARSİNOGENEZDE MORFOLOJİK SPEKTRUM	15
2.5.2.1. Adenoma-Karsinoma Sekansı	15
2.5.2.2. Serrated Neoplazi Sekansı	19
2.6. KOLOREKTAL KANSERİN HİSTOPATOLOJİK KLASİFİKASYONU	22
2.6.1. Konvansiyonel Adenokarsinom	23
2.6.2. Müsinöz Adenokarsinom	23
2.6.3. Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom	23
2.6.4. Kolorektal Karsinomlarda Histolojik “Grade”	24
2.6.7. Kolorektal Karsinomlarda Evreleme	24
2.7. HEDEFE YÖNELİK TEDAVİ YAKLAŞIMI	25
2.7.1. Anti-EGFR Tedavi	26
2.7.2. Kolorektal Kanserde Anti-EGFR Tedavisi	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. MATERYAL	30
3.2. YÖNTEM	31
3.2.1. HİSTOPATOLOJİK YÖNTEM	31

3.2.1.1. Histopatolojik Değerlendirme	31
3.2.1.2. Mikrodiseksiyon	32
3.2.2. MOLEKÜLER YÖNTEM	33
3.2.2.1. DNA İzolasyonu	33
3.2.2.2. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi ve Miktar Tayini	34
3.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi	34
3.2.2.4. KRAS Mutasyon Analizi	35
3.2.2.5. BRAF Mutasyon Analizi	39
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	45
4.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	45
4.2. DEMOGRAFİK BULGULAR	46
4.2.1. Yaş	46
4.2.2. Cinsiyet	47
4.3. KLİNİKOPATOLOJİK BULGULAR	48
4.3.1. Lokalizasyon	48
4.3.2. Lezyon Çapı	49
4.3.3. "Grade" ve Evre	50
4.4. MOLEKÜLER BULGULAR	52
4.4.1. DNA İzolasyonu ve Spektrofotometrik Analiz	52
4.4.2. Mutasyon Analiz Sonuçları	54
4.4.2.1. KRAS Geni Mutasyon Analiz Sonuçları	54
4.4.2.2. BRAF Geni Mutasyon Analiz Sonuçları	62
4.4.2.3. KRAS ve BRAF Mutasyon İlişkisi	68
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	81
5.1. Öncü Lezyonlarda KRAS ve BRAF Mutasyonlarının Değerlendirilmesi	82
5.2. Karsinomlarda KRAS ve BRAF Mutasyonlarının Değerlendirilmesi	89
5.3. Yöntemin Değerlendirilmesi	92
5.4. Hedefe Yönelik Tedavi Yaklaşımı	94
6. REFERANSLAR	96

Kolorektal Kanser ve Öncü Lezyonlarında KRAS ve BRAF Mutasyon Analizleri Yoluyla Tanısal Yaklaşım ve Hedefe Yönelik Tedavi Seçimi

ÖZET

Kolorektal karsinomalar (KRK), Batı'da, akciğer ve meme karsinomalarından sonra en sık ölüme neden olan malignite grubunu oluşturmakta ve insidansı son yıllarda artış göstermektedir. KRK tedavisinde, olguların birbirinden ayrımı, öncü lezyonların belirlenmesi ve tedavi seçimini belirleyecek moleküler belirleyicilerin (KRAS ve BRAF onkogenleri gibi) saptanması son derece önemlidir.

Bu tez çalışmasında, farklı morfolojik karaktere sahip 87 öncü lezyon ve 40 KRK'da KRAS ve BRAF onkogenlerinin mutasyon analizlerinin yapılması ve elde edilecek moleküler bulgularla morfolojik karakterlerin ilişkilendirilmesi ve KRAS ile BRAF gen mutasyonlarını saptamada kullanılan yöntemlerin güvenilirliğinin test edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla histopatolojik değerlendirmesi yapılan olguların lezyonlu alanlarından DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. KRAS geni için real time PCR ve pirosekanslama, BRAF geni için real time PCR ve direkt sekanslama teknikleri kullanılarak mutasyon analizi gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında, kolorektal karsinomalar ve öncü lezyonlarda, KRAS ve BRAF gen mutasyonları, geniş bir olgu serisinde, klinikopatolojik parametrelerle ilişkilendirilerek değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonuçları, literatür eşliğinde, KRAS ile birlikte, BRAF'ın da kolorektal neoplastik süreçte etkin rol oynayan bir onkogen olduğunu ve özellikle serrated neoplazi spektrumunda yer alan lezyonların gelişiminde önemli bir faktör olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, BRAF'ın yakın gelecekte KRAS ile birlikte, özellikle KRAS mutasyonu göstermeyen olgularda, anti EGFR tedavisinin etkinliğinin öngörülmesinde yararlı bir moleküler test olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Kolorektal karsinoma, polip, KRAS, BRAF, hedefe yönelik tedavi

KRAS and BRAF Mutation Analysis in Colorectal Carcinoma and its Precursor Lesions: Diagnostic and Targeted Therapeutic Approach

Abstract

Colorectal carcinoma is one of the leading causes of cancer death in the Western world and its incidence has been increasing in our country. In order to have a successful therapeutic approach to colorectal carcinoma, both the precursor lesions and also the molecular background of neoplastic progression need to be evaluated. In recent years, it was shown that colorectal carcinomas showing activating mutations in the KRAS gene (30-40% of the cases) are unresponsive to anti-EGFR therapy and that KRAS mutation analysis could predict patients for appropriate targeted therapy.

In the present thesis, different precursor lesions of colorectal carcinoma (87 cases) together with the carcinoma cases (40 cases) were evaluated for KRAS and BRAF mutations in an attempt to correlate the morphologic findings with molecular results. Morphologic classification was performed on the H&E sections where the lesion was marked with a marker pen to identify the area for DNA extraction. Following manual microdissection of these areas, DNA was isolated. KRAS mutation was assessed for exon 2 codon 12 and 13, exon 3 codon 61 using pyrosequencing while BRAF mutations were evaluated using allele specific PCR and confirmed with DNA sequencing.

Our results showed that, BRAF, together with KRAS, seem to play a significant role in colorectal neoplastic progression and in the development of serrated precursors of colorectal carcinoma, in particular. These findings suggest that BRAF may be used as a predictor in the targeted therapeutic approach to colorectal cancer patients.

Key words: Colorectal carcinoma, polyp, KRAS, BRAF, targeted therapy

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Mesleğimin ayrıntılarını öğrenmek için başladığım master eğitimimin sonuna gelmiş bulunmaktayım. Hayata ve bilime bakış açımı değiştiren bu süreçte, çok şey öğrendim ve tabiri caizse büyüdüm. Zaman zaman motivasyonum eksilere doğru kaysa da yaptığım işten her daim büyük keyif aldım. Bu tezle bilime katkım, belki binlik puzzle'ın tek bir parçasının bir zerresi bile değilse de hayatımın en doğru işini yaptığımı hissetme nedenimdir.

Tez çalışmam boyunca bilgisi ve tecrübesi ile bana yol gösteren, danışmanlığın çok ötesinde içten ve samimi yaklaşımıyla manevi desteğini üzerimden eksik etmeyen çok değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Arzu ENSARİ'ye,

Laboratuvar bilgisi ve tecrübesiyle her daim yardımına koşan, sorunlarımı sabırla dinleyip bana yol gösteren ve tezimin düzeltmelerinde büyük emeği geçen değerli hocam Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım, her zaman manevi desteği ve abla sıcaklığı ile patolojideki tecrübesini aktarırken gösterdiği hoşgörü ve sabrından dolayı, ayrıca tezimin düzeltmelerindeki emeğinden dolayı sayın hocam Doç. Dr. Berna SAVAŞ'a,

Hazırlamış olduğu doku arrayleri sayesinde tez vakalarımın önemli bir kısmını temin etmemde yardımcı olan, her daim güler yüzünü ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Sibel PERÇİNEL'e,

DNA izolasyonu ve PCR çalışmalarında büyük bir içtenlikle yardımına koşan, bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren değerli arkadaşlarım Uzm. Bio. Nevin BELDER ve Uzm. Bio. Hülya SÜMER'e,

DNA dizi analizi çalışmalarında yardımlarından dolayı Uzm. Bio. Nilgün TEKİN'e,

Doku kesitlerinin hazırlanmasında emeği geçen Pat. Tekn. Zeki KARABULUT'a,

İstatistik çalışmalarımı büyük bir sabırla gerçekleştiren İstatistikçi Nazmiye KURŞUN'a

Tez çalışmalarım sırasında katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji ABD çalışanlarına,

Tez çalışmalarım sırasında manevi destekleri ile her daim yanımda olan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Genombilim ve KVC ekip arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarımın pirosekanslama deneylerinde laboratuvarlarını açıp yardımlarını esirgemedikleri için ATQ Biyoteknoloji ve çalışanlarına, özellikle Uzm. Bio. Elif Sakallı'ya,

Master eğitimim boyunca maddi desteklerinden dolayı Merck Serono ve Roche Diagnostics'e,

Yaşamım boyunca her zaman ve her konuda beni destekleyen ve hep yanımda olan çok değerli aileme ve özellikle annem Arzu ERDOĞAN'a,

TEŞEKKÜRÜ BİR BORÇ BİLİRİM.

Bu tezin yazarı olarak master eğitimim boyunca edindiğim bilgi ve birikimi, algılarım dâhilinde sizlere aktarmaya çalıştım. Bu birikimle bu sayfadan aşağı doğru uzayıp giden binlerce satır bulacaksınız. O satırların hepsi binlerce insanın binlerce yıllık çalışmaları sonucunda bir araya toplandı ve sizlere sunuldu. Binlerce yıl sonra da en azından binlerce yıl önce yaşayanların bildikleri olarak burada kalacaklar...

Öznur Erdoğan

Haziran 2011

Ankara

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Normal hücreden kanser hücresine dönüşüm aşamaları	2
Şekil 2.2: Kolorektal Karsinogeneze Etyolojik Yaklaşım	7
Şekil 2.3: Kadınlarda Yerleşim Yerlerine Göre En Sık Görülen Kanserler	7
Şekil 2.4: Erkeklerde Yerleşim Yerlerine Göre En Sık Görülen Kanserler	7
Şekil 2.5: Fearon ve Vogelstein'in Tanımladığı Kolorektal Karsinogenez Modeli	8
Şekil 2.6: Kolorektal Karsinogenezde Multistep Moleküler Gelişim Modeli	9
Şekil 2.7: Wnt Ara Yolunda APC β -katenin İlişkisi	10
Şekil 2.8: p53 Ara Yolu	11
Şekil 2.9: RAS-MAPK Sinyal Ara Yolu	12
Şekil 2.10: TGF- β /SMAD Ara Yolu	12
Şekil 2.11: Adenoma-Karsinoma Sekansı	16
Şekil 2.12: Aberan Kript Odağı	17
Şekil 2.13: Adenomatöz Poliplerde Displazi	18
Şekil 2.14: Adenomatöz Polip Tipleri	19
Şekil 2.15: "Serrated" Neoplazi Sekansında Öncü Lezyon Histopatolojisi	21
Şekil 2.16: "Serrated" Poliplerde Displazi	22
Şekil 2.17: Kolorektal Kanser Klasifikasyonu	22
Şekil 2.18: Kolorektal Kanser Histopatolojisi	23
Şekil 2.19: Ras-Mapk Sinyal Ara Yolunda Büyüme Sinyali	27
Şekil 3.1: Olgu Gruplarının Gösterimi	30
Şekil 3.2: Kullanılan Yöntemlerin Özeti	31
Şekil 3.3: Manuel Mikrodiseksiyon	33
Şekil 3.4: KRAS Mutasyon Analizi için Kullanılan Teknikler	35
Şekil 3.5: BRAF Mutasyon Analizi için Kullanılan Teknikler	39

Şekil 4.1: Tüm Olguların Dağılımı	45
Şekil 4.2: Polip ve Karsinomlarda Alt Grupların Dağılımı	45
Şekil 4.3: Tüm Olguların Yaşa Göre Dağılımları	47
Şekil 4.4: Tüm Olguların Cinsiyete Göre Dağılımları	47
Şekil 4.5: Tüm Olguların Lokalizasyona Göre Dağılımları	49
Şekil 4.6: Tüm Olguların Ortalama Lezyon Çapına Göre Dağılımları	50
Şekil 4.7: Karsinomların “Grade” ve Evre’ye Göre Dağılımı	51
Şekil 4.8: İzole edilen DNA Örneklerine Ait Temsili Agaroz Jel Fotoğrafları	53
Şekil 4.9: Tüm Olguların KRAS ve BRAF Mutasyon Dağılımları	54
Şekil 4.10: Tüm olgulara ait KRAS Mutasyon Tiplerinin Dağılımı	55
Şekil 4.11: Öncü lezyonlara ait KRAS geni, ekzon 2’de Gly12Asp mutasyonu	56
Şekil 4.12: Öncü lezyonlara ait KRAS geni, ekzon 2’de Gly12Cys mutasyonu	56
Şekil 4.13: Öncü lezyonlara ait KRAS geni, ekzon 2’de Gly13Asp mutasyonu	56
Şekil 4.14: Karsinomlara ait KRAS geni, ekzon 2’de Gly12Asp mutasyonu	58
Şekil 4.15: Karsinomlara ait KRAS geni, ekzon 3’de Gly61His mutasyonu	59
Şekil 4.16: Pozitif kontrollere ait amplifikasyon eğrileri	59
Şekil 4.17: KRAS mutasyonu taşıyan bir karsinoma ait amplifikasyon eğrisi	59
Şekil 4.18: KRAS yabanıl tip bir karsinoma ait amplifikasyon eğrisi	60
Şekil 4.19: BRAF V600E (Val600Glu) mutasyon analizi yapılan örneklerden bazılarının ait melting curve eğrileri	63
Şekil 4.20: BRAF mutasyon analizi yapılan örneklerden bazılarının melting pikleri	63
Şekil 4.21: Pozitif ve Negatif (Non-template) kontrolleri gösteren melting grafiği	65
Şekil 4.22: BRAF geni V600E mutasyonu taşıyan karsinoma ait melting eğrisi	65
Şekil 4.23: BRAF ekzon 15 primerleri için gradient PCR jel görüntüsü	67
Şekil 4.24: Bazı örneklerin BRAF ekzon 15 PCR jel görüntüleri	67

Şekil 4.25: BRAF V600E mutasyonu taşıyan bir örneğe ait DNA dizi analizi, forward	67
Şekil 4.26: BRAF V600E mutasyonu taşıyan bir örneğe ait DNA dizi analizi, reverse	68
Şekil 4.27: Tüm olgularda KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı	68
Şekil 4.28: Polip-Karsinom Eşleştirmelerinde KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı	69
Şekil 4.29: Öncü Lezyonların Subtiplerinde KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı	69
Şekil 4.30: Öncü Lezyonların Tüm Subtiplerinde KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı	70
Şekil 4.31: Karsinom Subtiplerinde KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı	70
Şekil 4.32: Polipler ve Subtiplerinde Yaşa Göre KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı	72
Şekil 4.33: Polipler ve Subtiplerinde Cinsiyete Göre KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı	74
Şekil 4.34: Polipler ve Subtiplerinde Lokalizasyona Göre KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı	76
Şekil 4.35: Karsinomlarda ve Subtiplerinde Yaşa Göre KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı	77
Şekil 4.36: Karsinomlarda ve Subtiplerinde Cinsiyete Göre KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı	78
Şekil 4.37: Karsinomlarda ve Subtiplerinde Lokalizasyona Göre KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı	79

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1: Kalite Kontrol PCR protokolü	36
Tablo 3.2: TheraScreen KRAS real time PCR programı	36
Tablo 3.3: TheraScreen KRAS real time PCR protokolü	37
Tablo 3.4: Therascreen KRAS Mutation Kit'in saptayabildiği mutasyonlar	37
Tablo 3.5: BRAF real time PCR protokolü	40
Tablo 3.6: BRAF real time PCR programı	40
Tablo 3.7: BRAF ekzon 15 primer dizileri	41
Tablo 3.8: BRAF ekzon 15 primerleri için uygulanan gradient PCR programı	41
Tablo 3.9: Direk sekanslama için uygulanan sekans PCR programı	43
Tablo 4.1: Poliplere ait demografik veriler	48
Tablo 4.2: Karsinomlara ait demografik veriler	48
Tablo 4.3: Poliplere ait Klinikopatolojik Veriler	51
Tablo 4.4: Karsinomlara ait Klinikopatolojik Veriler	52
Tablo 4.5: İzole edilen DNA'lara ait temsili spektrofotometri sonuçları	53
Tablo 4.6: Poliplerde KRAS mutasyonlarının gruplara göre dağılımı	55
Tablo 4.7: Karsinomlarda KRAS mutasyonlarının gruplara göre dağılımı	58
Tablo 4.8: Poliplere ait BRAF mutasyonlarının gruplara göre dağılımı	62
Tablo 4.9: Karsinomlara ait BRAF mutasyonlarının gruplara göre dağılımı	64
Tablo 4.10: DNA dizi analizi ile mutasyon doğrulaması yapılan örnekler	66
Tablo 4.11: Aynı hastaya ait farklı polip olgularında KRAS-BRAF Genotipleri	80
Tablo 4.12: AP4 kodlu olguya ait KRAS ekzon 2 genotipi	80
Tablo 5.1: Literatürde Poliplere ait KRAS-BRAF mutasyon Sıklık Tablosu	84

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
AKO	Aberan Kript Odağı
AP	Adenomatöz Polip
APC	“Adenomatosis Poliposis Coli”
ARA	HP-SSA/P arası tanı güçlüğü yaşanan grup
BRAF	“V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog”
C	Sitozin
CIMP	“CpG Island Metilator Phenotype”
CIN	“Chromozomal Instability”
CDK	“Cyclin Dependent Kinase”
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit
EGFR	“Epitelial Growth Factor Receptor”
G	Guanin
FAP	“Familial Adenomatous Poliposis”
HP	Hiperplastik Polip
HNPCC	Hereditör Non-Poliposis Colorectal Cancer
KRAS	“V-K1-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog”
KonCA	Konvansiyonel Adenokarsinom
KRK	Kolorektal Karsinom
MAPK	“Mitogen-Activated Protein Kinase”
MüsCA	Müsinöz Adenokarsinom ve Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom
MSI	“Microsatellite Instability”
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
pRB	Retinoblastoma geni
SSA/P	Sesil “Serrated” Adenoma/Polip
T	Timin
TGF-β	“Transforming Growth Factor”
KSA	Klasik “Serrated” Adenoma

1. GİRİŞ

Kanser, insidansı ve mortalitesi çok yüksek olması nedeniyle tüm dünyada günümüzün en önemli halk sağlığı sorunlarından birisidir. Ülkemizde 1970'li yıllarda nedeni bilinen ölümler arasında dördüncü sıradayken, son yıllarda kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırayı almıştır.

Erişkin kadın ve erkeklerde kansere bağlı ölümlerin çok önemli bir kısmını oluşturan kolorektal kanser, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de oldukça sık görülmektedir. Ancak olguların çoğu, ileri evrede hekime ve hastaneye başvurmakta ve erken tedavi şansları azalmaktadır. Bu nedenle kolorektal karsinomların erken tanı ve tedavisinde ilk adım, öncü lezyonların tanımlanması ve bunlardan karsinoma geçişte etkin olan moleküler mekanizmaların ortaya konması olmalıdır. İkinci adım ise farklı moleküler mekanizmalarla oluşan öncü lezyonların ve bunlardan gelişecek tümörlerin hedefe yönelik tedavi protokolü içinde ele alınarak doğru tedavi yaklaşımı için hasta gruplarının belirlenmesi olacaktır. Böylece, erken tanı ve bireyselleştirilmiş tedavi ile, prognozda önemli gelişmeler sağlanabilecektir.

Bu tez kapsamında, geniş bir olgu serisinde, kolorektal karsinomun öncü lezyonları ve kolorektal karsinom olguları, en son klasifikasyon kriterlerine göre morfolojik olarak sınıflandırılmış ve böylece doğru olarak oluşturulan tanı gruplarında KRAS ekzon 2, kodon 12 ve 13, ekzon 3 kodon 61, BRAF ekzon 15 V600E mutasyon analizi yapılmıştır. Tanı gruplarının doğruluğunun sağlanması ile olgulardan elde edilen moleküler bulguların güvenilirlik düzeyinin de yükseltilmesi mümkün olabilmektedir. Moleküler bulgular ile demografik ve klinikopatolojik veriler ilişkilendirilerek, sonuçlar literatür eşliğinde değerlendirilmiştir. Kolorektal karsinom grubunda elde edilen moleküler veriler ışığında, hedefe yönelik tedavi kavramı, özellikle, anti-EGFR tedavisi literatür eşliğinde tartışılmıştır. Ayrıca, KRAS ve BRAF mutasyonlarının tespitinde kullanılan farklı moleküler tekniklerin güvenilirliklerinin karşılaştırılması yapılarak, daha sonraki uygulamalar için yararlı olabilecek bilgilere ulaşılması amaçlanmıştır.

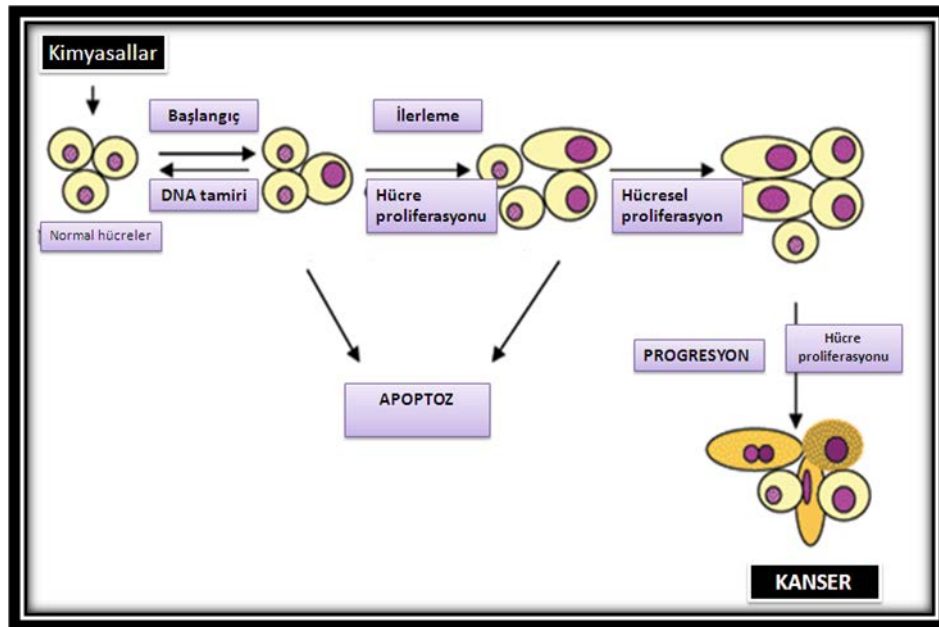
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KANSER

Hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve ölümünü regüle eden genlerde bozukluk sonucu oluşan kanser, dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme neden olan hastalık grubunu oluşturmaktadır (Olah 2005).

Kanser, hem çevresel hem de kalıtsal etkenlerden kaynaklı, çok genli, çok faktörlü ve çok basamaklı (Şekil 2.1) gelişim gösteren bir hastalıktır (Lichtenstein, Holm et al. 2000; Olah 2005).

Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümü için genomun hasara uğraması gerekmektedir. Genomdaki hasar, DNA replikasyonunda meydana gelen hataların sonucu olabileceği gibi, metabolizma sırasında meydana gelen serbest radikallerin bazı DNA bazları üzerinden hasar oluşturması gibi nedenlerden de kaynaklanabilir. DNA hasarı, iyonize radyasyon, UV ve kimyasal karsinojen gibi ajanların etkileşimi ile de gerçekleşebilmektedir (Bertram 2000). Hücrede DNA hasar tamir etme mekanizmaları bulunmaktadır. Ancak bazı nedenlerle hasar onarılamazsa, mutasyon adı verilen, genomda kalıcı olan değişiklikler meydana gelir.



Şekil 2.1: Normal hücreden kanser hücreğine dönüşüm aşamaları

Kanser hücrelerini karakterize eden altı özellik tanımlanmıştır. Bunlar, büyüme sinyalleri oluşturabilme, büyümeyi durdurabilecek sinyallere duyarsızlaşma, programlanmış hücre

ölümünden (apoptoz) kaçabilme, sınırsız bölünme, çoğalma potansiyeline sahip olma, angiogenezi sürekli destekleyebilme, invazyon ve metastaz yapabilme özellikleridir (Olah 2005).

Son yıllarda, ileri teknoloji ile geliştirilen moleküler biyolojik tekniklerle, kanserin genetik temelini aydınlatılması, kalıtsal ve somatik mutasyonların tanımlanması amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda tüm kanserlerin yaklaşık %10-15'inin kalıtsal, %85-90'ının ise sporadik olarak ortaya çıktığı saptanmıştır (Jesse d. Martinez 2003).

2.2. KARSİNOGENEZ

Karsinogenezin kökeninde ölümcül olmayan genetik hasar yatar. “Genetik kanser hipotezi” olarak ifade edilen bu görüşte, bir tümörün mutasyona uğrayan tek bir öncül hücrenin büyümesi ve çoğalması ile oluştuğu, dolayısıyla tümörün monoklonal olduğu ileri sürülmektedir. Söz konusu genetik hasar, hücrenin büyümesini stimüle eden proto-onkogenler, hücrenin büyümesini inhibe eden tümör baskılayıcı genler, programlı hücre ölümünü regüle eden genler ve DNA yanlış eşleşme tamir genlerinde gerçekleşmektedir (Jesse d. Martinez 2003; Olah 2005). Bu gen grupları aşağıda sırasıyla tanımlanmaktadır.

Proto-onkogenler, normal hücrelerde proliferasyon ve diferensiyasyonu kontrol ederler. Hücre bölünmesi, normal hücrede fizyolojik gereksinimlere göre ve kontrollü olarak yürütülmektedir. Proto-onkogenler, yalnızca hücre bölünmesi sırasında görev alan bir dizi proteini kodlamaktadır. Bir proto-onkogen, mutasyona uğradığında aktivasyon kazanırsa hücrenin sürekli olarak bölünmesine neden olur (Alberts B 2002).

Tümör süpresör genler ise, hücre siklusunun çeşitli basamaklarında görev yapan ve hücre bölünmesini baskılayıcı özelliği olan proteinleri kodlar. Bu genlerin her iki alelinde de mutasyon olması, hücre bölünmesinin baskılanamaması ile kontrolsüz hücre bölünmesi şeklinde sonuçlanır (Alberts B 2002).

Apoptoz ya da programlı hücre ölümü, tamiri olanaksız DNA hasarı oluşmuş hücreleri ortadan kaldıran bir mekanizmadır. Programlı hücre ölümünün temel amacı, bir tür için gerekli kromozom sayısının uygun miktarda devam ettirilmesi ve anöploidinin önlenmesidir. Böylece, yalnızca DNA'sını doğru bir şekilde ve tam olarak replike etmiş

hücrelerin mitozaya girmesi sağlanır. Bu mekanizmayı kontrol eden ve apoptoz regülasyonundan sorumlu olan genlerde işlev kaybına neden olacak mutasyonlar, DNA hasarı taşıyan hücrelerin bölünmesine neden olur (Alberts B 2002).

Genomik DNA üzerinde tekrarlayan baz dizilerinden oluşan mikrosatellitler vardır. Normal şartlarda, DNA polimerazın 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi ile yanlış eşleşmeler düzeltilirken, tekrarların olduğu bu bölgeler gözden kaçabilmektedir. Onarımdan kaçan bu alanlar, DNA yanlış eşleşme tamir sistemi tarafından tamir edilir. DNA yanlış eşleşme tamir genleri, replikasyon sırasında DNA polimerazın hatalı baz eklemesi sırasında devreye giren ve hatalı bazı düzelten genlerdir. Bu genlerde mutasyon olması durumunda, onarım yapılamayacağından, mikrosatellit instabilitesi olarak bilinen durum ortaya çıkmaktadır (Jesse d. Martinez 2003).

Ayrıca, kanser hücrelerinin, hücre yaşlanmasından (senesens) kaçtığı düşünülmektedir. Potansiyel bir anti-kanser mekanizma olan hücre yaşlanması, p53 ve pRB gibi tümör baskılayıcı genler tarafından kontrol edilir ve hücrenin proliferasyon yeteneğinin geri dönüşümsüz olarak kaybı ile karakterizedir. Bu mekanizma, DNA hasarı, onkogenik uyarılar ve mitojenik sinyaller ile indüklenebilmektedir (Campisi 2007).

Karsinogenez, birçok mutasyonun birikimi sonucu fenotipik ve genotipik düzeyde çok basamaklı olarak ilerleyen bir süreçtir. Farklı hücrelerde birbirinden bağımsız olarak biriken mutasyonlar, tümörü oluşturan hücrelerin heterojenitesine yol açar. Böylece, tümörlerin çoğu monoklonal orjinli olmalarına rağmen, genellikle farklı karakterde subklonlar içerirler (Loeb and Christians 1996; Kumar 2010).

2.3. KOLOREKTAL KANSER

Kolorektal kanser, Batı'da akciğer ve meme kanserinden sonra en çok ölüme neden olan malignite grubunu oluşturmaktadır. Yıllar içinde, birçok ülkede insidansında artış gözlenmiştir (Ponz De Leon 2002).

Kolorektal kanser, bir dizi moleküler olay sonrası ortaya çıkan ve normal mukozadan tek bir kript epitelindeki değişikliklere, küçük iyi huylu tümörlerden (adenomatöz polipler) adenokarsinomlara kadar uzanan bir dizi morfolojik değişimle karakterize bir olgudur (Michor, Iwasa et al. 2005).

2.4. KOLOREKTAL KANSER ETYOLOJİSİ ve EPİDEMİYOLOJİSİ

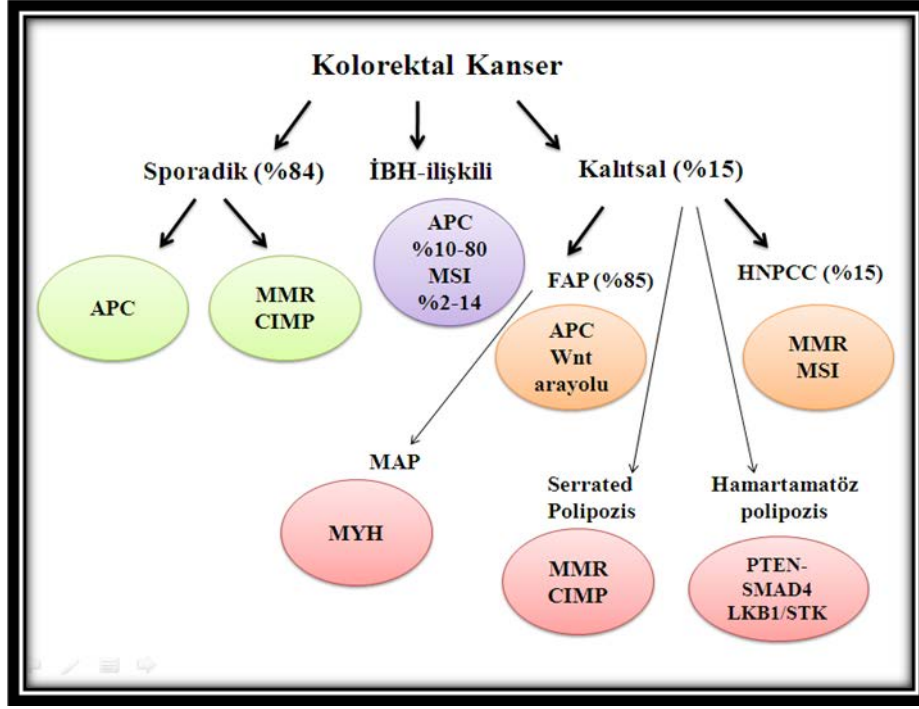
Kolorektal kanser gelişiminde hem çevresel, hem de genetik faktörler rol oynamaktadır. Genetik yatkınlık, kanser gelişme riskini belirgin olarak artırmakla birlikte kolorektal karsinomların yaklaşık % 85'i sporadik tümörler olup, yalnızca % 15'i kalıtsal özellik (Şekil 2.2) göstermektedir (Michor, Iwasa et al. 2005; Hamilton 2010).

Kalıtsal kolorektal kansere yol açan durumlar arasında en iyi tanımlanmış olanları Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser (HNPCC – Lynch Sendromu) ve Familial Adenomatöz Polipozis (FAP) sendromlarıdır. Ayrıca, FAP varyantları olan Gardner ve Turcot sendromları ile Hamartamatöz Polipozis sendromları (Peutz Jeghers sendromu, PTEN-Hamartoma sendromu, Cronkhite-Canada sendromu, Cowden sendromu), Juvenil Polipozis sendromu ve MYH-ilişkili Adenomatöz Polipozis sendromu (MAP) da daha nadir görülmekle birlikte kalıtsal gastrointestinal kanser sendromları arasında yer almaktadır (Jasperson, Tuohy et al. 2010; Hamilton 2010).

Sporadik kolorektal kanserler ise, çoğunlukla poliplerden köken alan ve kalıtsal olmayan nedenler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Sporadik kolorektal kanserli bireylerin birinci derece akrabalarında kolorektal kanser hikâyesi yoktur. Sporadik kolorektal kanserlerde en önemli risk faktörü yaştır (Kumar 2010; Hamilton 2010).

Kolorektal karsinom insidansı yaşla artmakta ve 60'lı yaşlardan itibaren en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Hastaların ancak %20'sinden azı, 50 yaşın altındadır. Kolorektal kanser tanısı konan genç hastalarda, çoğunlukla inflamatuvar barsak hastalığı ya da polipozis sendromu söz konusudur. HNPCC'de görülen kolorektal kanser de genellikle genç yaşta ortaya çıkmaktadır (Kumar 2010; Hamilton 2010).

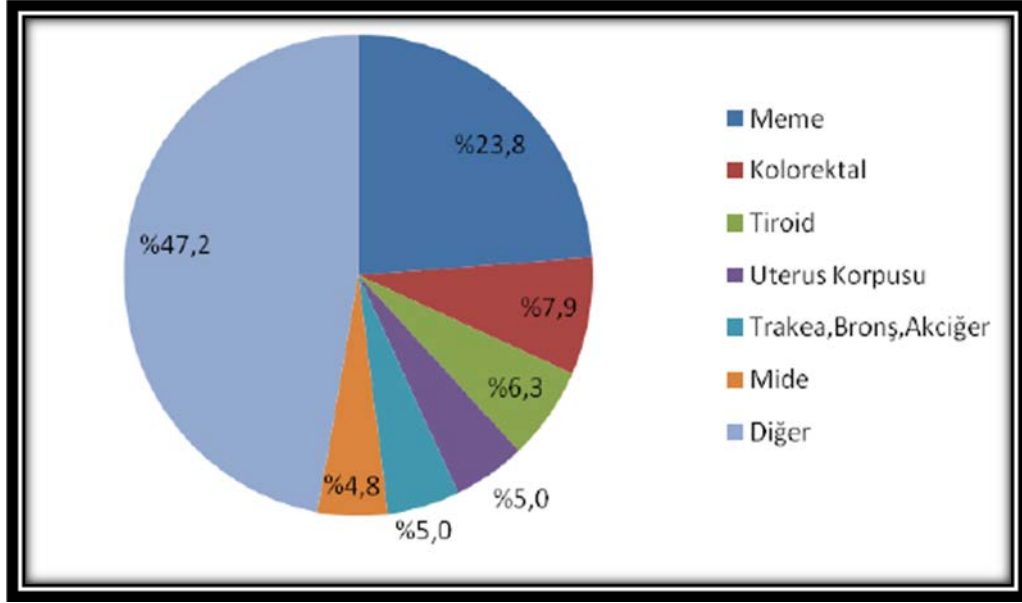
Kalıtsal ve sporadik kolorektal kanserlere ek olarak inflamatuvar barsak hastalıklarıyla ilişkili olarak da kolorektal kanser gelişebilir. Uzun süreli ve kolonu yaygın şekilde tutan ülseratif kolit, kolorektal kansere yatkınlığını arttırmaktadır. Bu hastalıkta, kript epitelinde zaman içinde displastik değişikliklerin geliştiği ve kolorektal kanserin bu alanlarda ortaya çıktığı bilinmektedir. Crohn hastalığı da daha ender olmakla birlikte, kolorektal kanser gelişimi için risk oluşturmaktadır (Winawer, Fletcher et al. 1997; Kumar 2010).



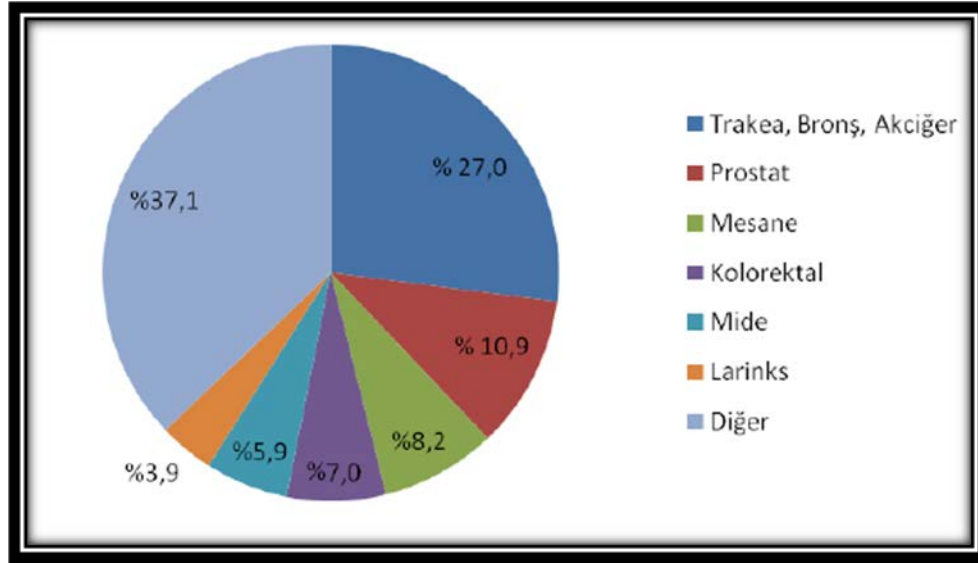
Şekil 2.2: Kolorektal Karsinogeneze Etyolojik Yaklaşım

T.C. Sağlık Bakanlığının Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığının verilerine göre ülkemizde kanser sıklığı giderek artmaktadır. 2004-2006 yılları için, 41438 erkek, 27709 kadın olmak üzere, toplam 69147 olgu değerlendirilmiştir. Kadınlarda kanserin görülme sıklığının, özellikle 40-45 yaşından sonra, erkeklerde ise 55-60 yaşlarında arttığı belirlenmiştir (TC Sağlık Bakanlığı 2006).

Ülkemizde kadınlarda kolorektal kanser, 2004, 2005 ve 2006 yıllarında elde edilen verilere göre (Şekil 2.3) meme kanserinden sonra ikinci en sık görülen kanserdir. Erkeklerde ise akciğer prostat ve mesane kanserinden sonra dördüncü (Şekil 2.4) en sık görülen kanserdir (TC Sağlık Bakanlığı 2006).



Şekil 2.3: Kadınlarda Yerleşim Yerlerine Göre En Sık Görülen Kanseler, Türkiye 2004-2006



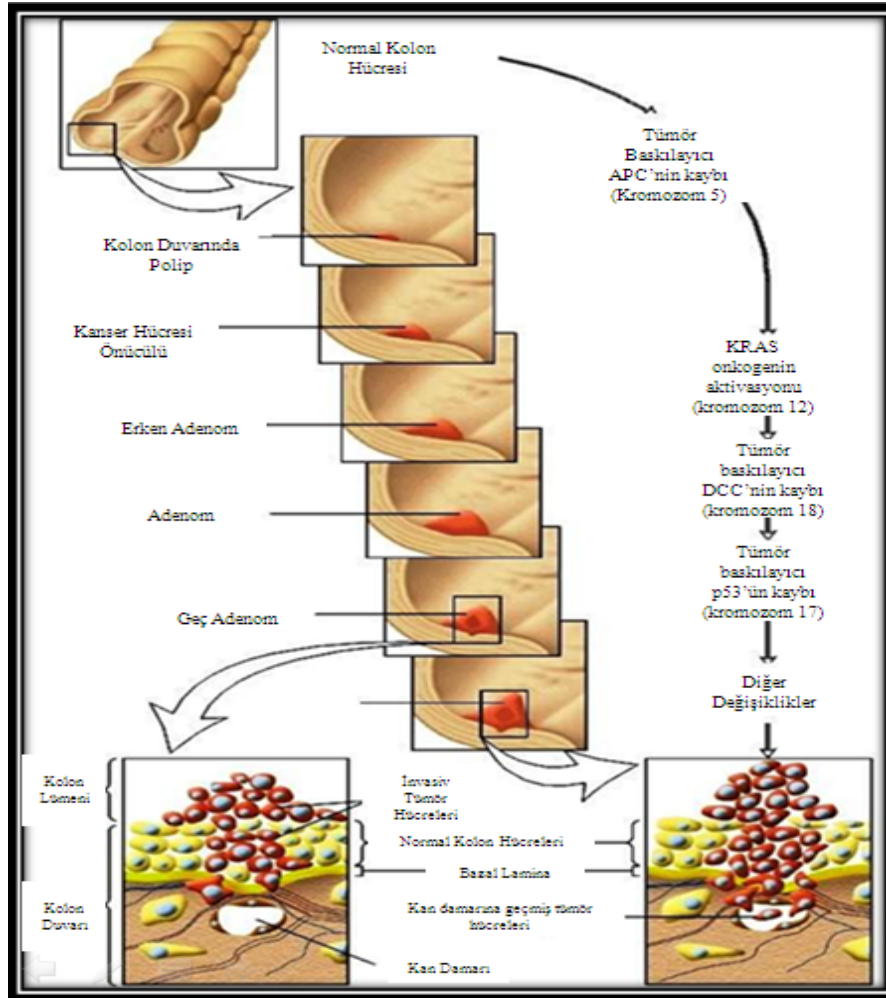
Şekil 2.4: Erkeklerde Yerleşim Yerlerine Göre En Sık Görülen Kanseler, Türkiye 2004-2006

Kolorektal karsinomlar, Birleşik Devletler ve Kanada, Avustralya, Yeni Zelanda, Danimarka, İsveç ve diğer gelişmiş ülkelerde yüksek görülme oranına sahipken, Hindistan, Güney Amerika ve Afrika'da, bu ülkelerden 30 kez daha düşük insidansa sahiptir. Coğrafyaya ve gelişmişliğe bağlı olarak değişen insidans farkından, çevresel faktörler, özellikle de farklı yemek alışkanlıkları sorumludur. Emilemeyen bitkisel liflerden fakir, zengin işlenmiş karbonhidrat ve yüksek (özellikle doymuş ve hayvansal) yağ içeriği olan

diyet, A, C ve E vitaminleri gibi koruyucu özelliğe sahip vitaminlerin az tüketimi gibi etkenlerin kolorektal karsinom gelişimini tetiklediği düşünülmektedir (Kumar 2010; Hamilton 2010).

2.5. KOLOREKTAL KARSİNOGENEZ

Kolorektal karsinogenez, normal hücrenin malign hücreye dönüşümünde genetik ve epigenetik değişikliklerin rol aldığı çok basamaklı bir süreçtir (Şekil 2.5). Bu süreçte her basamakta farklı lezyonlar gelişmekte ve böylece moleküler değişimlere farklı morfolojik lezyonlar eşlik etmektedir (Lynch and Hoops 2002; Garcea, Sharma et al. 2003; Worthley, Whitehall et al. 2007).



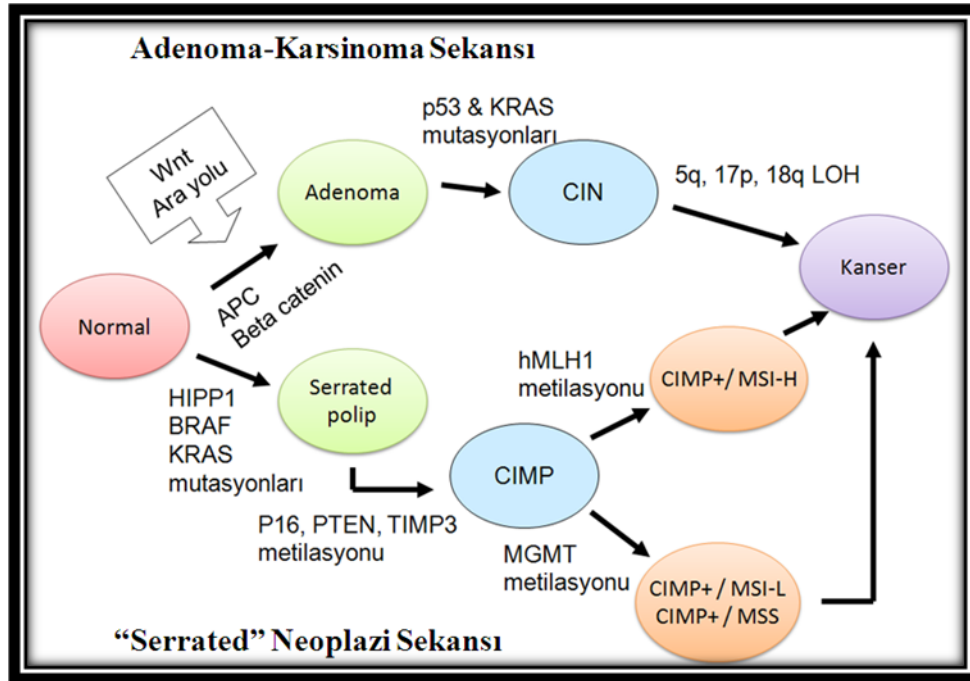
Şekil 2.5: Fearon ve Vogelstein'in Tanımladığı Kolorektal Karsinogenez Modeli

(Alberts B 2002)

2.5.1. KOLOREKTAL KARSİNOGENEZDE MOLEKÜLER ARA YOLLAR

Kolorektal karsinogenezde, patogenetik olarak birbirinden farklı üç ara yol yer almakla birlikte, bu ara yolların her birinde, birden fazla mutasyonun aşamalı olarak birikimi söz konusudur (Şekil 2.6). Ayrıca, bu ara yollarda yer alan genler ve oluşan mutasyonların birikim mekanizmaları birbirinden oldukça farklıdır (Hamilton 2010).

Güncel çalışmalar, kolorektal karsinomlarının %75'inin, Fearon ve Vogelstein'in tanımladığı kromozomal instabilite ara yolu, % 15'inin mikrosatellit instabilite ara yolu üzerinden geliştiğini, diğerlerinin ise, iki arayolla da ilişkili olmayıp, CpG ada metilasyon fenotipi arayolu üzerinden gelişebileceğini göstermektedir (Jass 2007; Snover 2011).



Şekil 2.6: Kolorektal Karsinogenezde Multistep Moleküler Gelişim Modeli

2.5.1.1. KROMOZOMAL İNSTABİLİTE ("Chromozomal Instability: CIN")

ARA YOLU

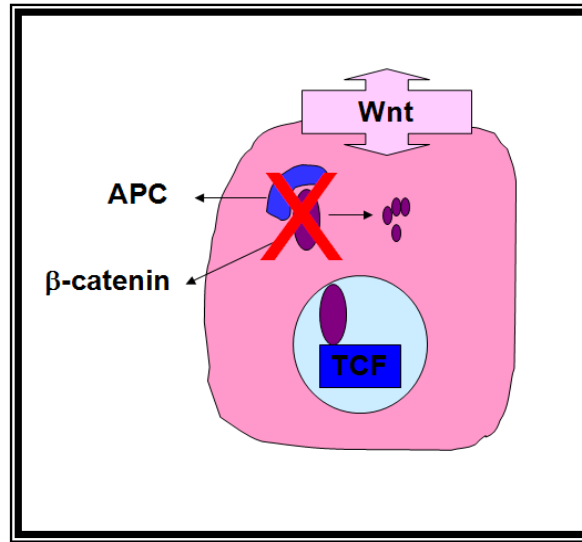
Supresör yolak olarak da bilinen bu ara yol, çeşitli onkogen ve supresör genlerde görülen seri mutasyonların birikimi sonucu oluşmaktadır. Delesyon, duplikasyon, kromozomal rearanjman gibi anöploid ile sonuçlanan genetik değişiklikler içermektedir (Worthley, Whitehall et al. 2007). Kolon kanserinde genomik instabilitenin en yaygın tipi olan CIN,

kolorektal tümörlerin %75'inde görülmektedir (Jass 2007; Snover 2011). Bu arayolun morfolojik karşılığı ise adenoma-karsinoma sekansıdır.

Fearon ve Vogelstein'in tanımladığı adenoma-karsinoma modeline göre, adenom gelişiminde, erken dönemde, APC tümör supresör gen mutasyonları gözlenirken, daha ileri evrede KRAS mutasyonları ve maligneteye geçişte ise p53 mutasyonu ile 18q delesyonu söz konusudur (Vogelstein, Fearon et al. 1988).

Bu ara yolda 4 önemli sinyal iletim yolağı vardır: WNT, p53, RAS-MAPK ve TGF- β /SMAD.

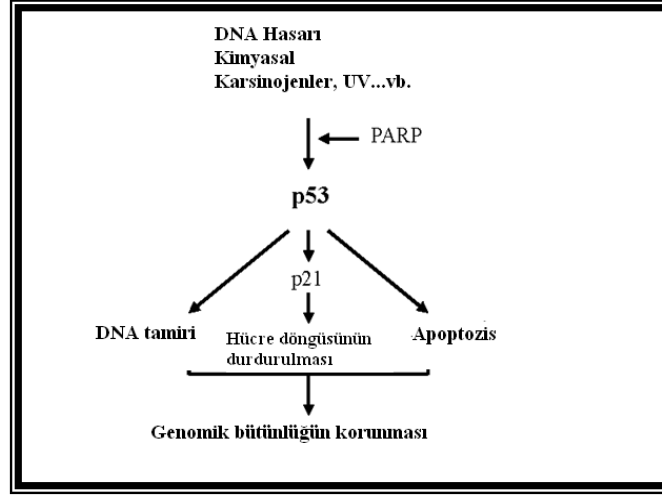
WNT sinyalleri, normal olarak büyümenin regülasyonunda, apoptozda, intestinal kök hücrelerin farklılaşmasında ve kısmen embriyogenezde etkilidir (Fodde 2002). WNT sinyal ara yolunda yer alan APC (adenomatöz polipozis koli) proteini, β -katenini parçalayarak sitoplazmadaki miktarını azaltır ve nükleusa geçini engelleyerek büyüme sinyalini durdurur (Şekil 2.7). APC genindeki “germline” mutasyonlar sonucu FAP sendromu ortaya çıkmaktadır. Sporadik kolorektal kanserlerin %80'inden fazlasında ise somatik hücrelerde APC gen mutasyonu saptanmıştır (Takayama, Miyanishi et al. 2006; Cheah 2009).



Şekil 2.7: Wnt Ara Yolunda APC β -katenin İlişkisi

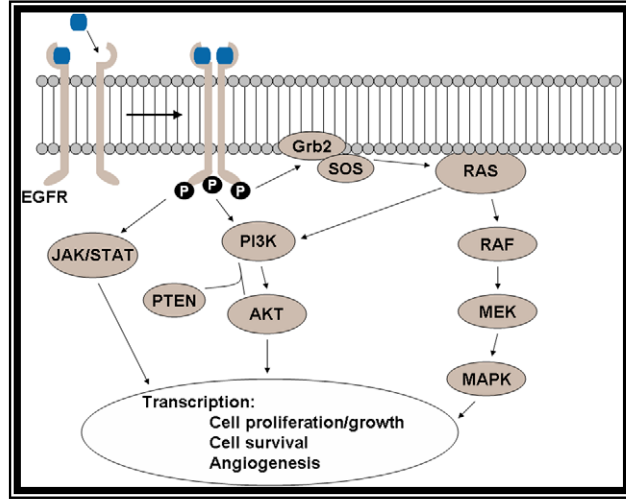
p53 mutasyonu, insan tümörlerinin yaklaşık %50'sinde görülmekle birlikte, p53'de heterozigotluk kaybı hemen her kanser tipinde ortaya çıkmaktadır (Kumar 2010). p53 proteini normal hücre siklusunu kontrol etmez, ancak, DNA zedelenmesi durumunda ekspresyonu artar ve DNA'ya bağlanarak pek çok genin transkripsiyonunu stimüle eder.

Hücre siklusu durunca p53 DNA onarımına yardımcı proteinlerin ekspresyonunu artırır ya da hasar onarılamadıysa hasarlı hücreyi apoptoz ile (Şekil 2.8) ortadan kaldırır (Hickman, Moroni et al. 2002).



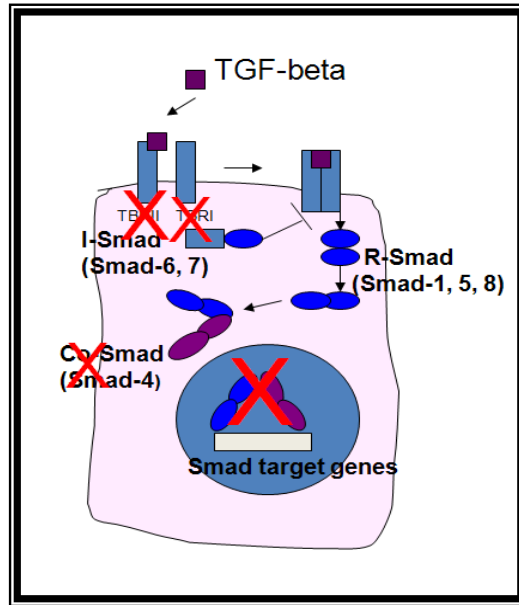
Şekil 2.8: p53 Ara Yolu

RAS-MAPK sinyal ara yolu, hücrede çeşitli hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiyasyon faktörleri tarafından kullanılır. Bu sinyal ara yolu, RAS proteininin aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla RAF, MEK ve ERK proteinleri aracılığıyla bir kinaz kaskadı oluşur. Ras proteininin aktif hale geçmesi için posttranslasyonel modifikasyondan sonra membrana yerleşmesi gerekir. Hücreye büyüme sinyali geldiğinde, Ras-GTP haline dönüşür. Aktif olan RAS, RAF proteinini harekete geçirerek mitogenez sürecini başlatır (Şekil 2.9). RAS proteini, normal dokuda proliferasyon, diferansiyasyon ve senesens sinyallerinde önemli bir role sahipken, mutant genin oluşturduğu RAS proteini, birçok kanser tipinde etkili potansiyel onkojenik bir proteindir (Castagnola and Giaretti 2005). Tüm insan tümörlerinin %17-25'inde, kolorektal tümörlerinse %30-40'ında aktive edici KRAS mutasyonu tanımlanmıştır (Andreyev, Norman et al. 2001; Neumann, Zeindl-Eberhart et al. 2009). BRAF proteini, RAS proteini tarafından stimüle edilen ve RAS-MAPK sinyal ara yolunda görev alan bir diğer moleküldür. Tüm insan tümörlerinin %8'inde, kolorektal tümörlerinse %5-12'sinde BRAF mutasyonu rapor edilmiştir (Davies, Bignell et al. 2002; Vakiani and Solit 2011). Ayrıca yanlış eşleşme tamir sistemi defektli olan kolorektal kanserlerde, defekti olmayanlara göre çok önemli ölçüde BRAF mutasyonu görülmektedir. Bu nedenle BRAF mutasyonu ile mikrosatellit instabilitesi arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir (Rajagopalan, Bardelli et al. 2002; Vakiani and Solit 2011)



Şekil 2.9: RAS-MAPK Sinyal Ara yolu

TGF- β , epitelyal hücreler için proliferasyon inhibitörü olarak işlev görmektedir (Şekil 2.10). Hücrede TGF- β 'nin büyüme inhibitör etkisine karşı oluşan duyarsızlık sonucu tümör gelişimi gözlenir (Woodford-Richens, Rowan et al. 2001). TGF- β sinyal ara yolunda yer alan ve bir tümör süpressör gen olan SMAD geni, hem büyümenin regülasyonu hem de apoptozda etkilidir (Woodford-Richens, Rowan et al. 2001; Worthley, Whitehall et al. 2007). Apoptozda SMAD geni gibi etkili olan bir diğer gen DCC ("deleted in colon cancer") genidir. DCC geninin mutasyona uğraması durumunda hücrenin apoptoz mekanizmasında aksaklıklar yaşanır (Worthley, Whitehall et al. 2007).



Şekil 2.10: TGF- β /SMAD Ara Yolu

2.5.1.2. MİKROSATELLİT İNSTABİLİTE (MSI) ARA YOLU

Mutator ara yol olarak da bilinen mikrosatellit instabilite ara yolu (MSI), DNA yanlış eşleşme tamir (“mismatch repair system, MMR”) genlerindeki mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Mikrosatellitler, genom boyunca yer alan kısa nükleotit tekrarlarıdır. Hücre bölünmesinde replikasyon sırasında bu tekrar dizilerinin olduğu kısımlarda DNA polimeraz hata yapabilir. 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. Normal şartlarda, DNA polimeraz 3’-5’ ekzonükleaz aktivitesi ile yanlış eşleşmeler düzeltilirken, onarımdan kaçabilen bu alanlar, yanlış eşleşme tamir sistemi aracılığıyla onarılır ve böylece DNA MMR genleri sayesinde replikasyon sürecinde genomik stabilizasyon sağlanır. Ancak MMR genlerinde bir mutasyon olması durumunda MSI olarak bilinen durum ortaya çıkar (Klug W 2008; Iacopetta, Grieco et al. 2010).

Kolorektal tümörler, mikrosatellit instabilitesi açısından 3 grupta değerlendirilmektedir: Mikrosatellit-stabil (MSS), Yüksek mikrosatellit instabil (MSI-H) ve Düşük mikrosatellit instabil (MSI-L). MSS tümörlerin genetik profili, MSI-L ile çok benzerdir, ancak, MSI-H tümörler oldukça farklı bir profil sergilerler. MSI-L tümörler, sol kolon yerleşimli ve en az MSS tümörler kadar agresif bir gelişim paternine sahiptir. Bu grupta en sık görülen genetik değişiklikler, KRAS ve p53 mutasyonları ile 5q, 17p ve 18q lokasyonlarında heterozigotluk kaybı olmakla birlikte, en karakteristik özellikleri bazı DNA MMR genlerinin kısmi metilasyonu ile genin susturulması ve O(6)metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) geninin metillenmesi sonucunda protein ekspresyon kaybıdır (Hamilton 2010).

Lynch Sendromu olarak da bilinen Herediter Non-Polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC) Sendromu seyirinde ortaya çıkan tümörlerin %90’ı, sporadik kolorektal tümörlerin ise %15-20’si MSI-H olarak tanımlanmıştır. Böylece, mikrosatellit instabilitesi için, HNPCC’de görülen MSI-H ve sporadik olarak görülen MSI-H kolorektal kanserler olmak üzere 2 farklı mutasyon gelişim modeli tanımlanmıştır (Houlston 2001; Jacob and Praz 2002; Lynch and Hoops 2002).

Tüm kolorektal kanserlerin % 5’ini oluşturan HNPCC Sendromu, otozomal dominant kalıtım göstermekle birlikte, “germline” mutasyon ya da yabancıl tip olan alelin

inaktivasyonu ile tümör gelişimi gözlenmektedir. “Germline” mutasyon durumunda, DNA yanlış eşleşme tamir genleri MSH2, MLH1, MSH6, MSH3, PMS2, PMS1, MLH3’de delesyon ya da nokta mutasyonu şeklinde genetik değişiklikler mevcuttur. Yüksek penetransa sahip olan bu genlerde mutasyon taşınması, kolorektal kansere yakalanma riskini %80 artırmaktadır (Jacob and Praz 2002). Yabanıl tip alelin inaktivasyonu durumunda ise, MMR genlerinden biri mevcut “germline” mutasyon ile heterozigot durumdadır. Knudson’un iki hit hipotezindeki fenotipik etkiye göre, MMR genleri tümör süpresör gen gibi davrandığından otozomal dominant kalıtım göstermektedir. Diğer alelin (yabanıl tip alelin) inaktive edilmesi ile heterozigotluk kaybı (“loss of heterozigoty”, LOH) olarak tanımlanan durum ortaya çıkmakta ve böylece, mikrosatellit instabilitesi oluşmaktadır (Knudson 1971; Michor, Iwasa et al. 2005).

MSI-H sporadik kolorektal kanserlerin %90’ında MMR geninin promotor bölgesinde bialelik metilasyon ya da tek alelde hipermetilasyon ile tümör gelişimi gerçekleşmektedir. Genin promotor bölgesinde bialelik metilasyon olması durumunda yabanıl tip olan her iki alelin metilasyonu ile gen tamamen susturular ve protein ekspresyonu olmaz. Tek alelde hipermetilasyon olması durumunda ise, yabanıl tip olan her iki alelden birinin metile edilmesi ile gen ekspresyonu baskılanarak azaltılır.

MSI arayolundan gelişen kolorektal kanserlere, genellikle serrated poliplerin öncülük ettiği düşünülmekle birlikte, Lynch sendromunda adenom öncülüğünde ya da “de novo” kanserleşme olabileceği görüşü kabul edilmektedir (Iacopetta, Grien et al. 2010).

2.5.1.3. “CPG” ADA METİLATOR FENOTİPİ (“CIMP”) ARA YOLU

“CpG” adaları, yüksek oranda guanin-sitozin (“guanine-cytosine: GC”) dinukleotidleri içeren ve çoğunlukla genin promotor kısmında yer alan genom bölgeleridir. Tüm genomun %1’ini oluştururlar. “CpG” adaları, genlerin promotor bölgelerinde, 5’ uçlarında görülür ve birçoğu transkripsiyon bağlanma bölgesi içerir (Kulis and Esteller 2010; Venkatachalam, Ligtenberg et al.2010). İnsan promotorlarının %60’ından fazlasında “CpG” adasının yer aldığı saptanmıştır. Promotor bölgelerde görülen “CpG” adaları, normal koşullarda aktif olan bir gende metillenmemiştir. Bu bölgelerin metillenmesi sonucu ilgili gen susturular ve protein ekspresyonu gerçekleşemez (Chuang and Jones 2007). DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilen enzimatik bir modifikasyondur. Sitozin nükleotidine metil grubunun bağlanması “G-C” baz eşleşmesini etkilemez. Ancak metil

gruplarının dışarı doğru çıkıntı yapması, transkripsiyon için gerekli DNA-protein etkileşimini engellediği için gen ifade edilemez ve böylece gen susturulmuş olur. Bu durum, mitoz bölünmeler ile yeni hücrelere de aktarılır. Bu nedenle, CpG adacıklarının metilasyonunun, epigenetik (gen ifadesindeki değişikliklerin, DNA sekansı ile bağlantı göstermeksizin, hücre bölünmesi boyunca bir nesilden diğerine aktarılması) bir durum olduğu düşünülmektedir (Sulewska, Niklinska et al. 2007; Sulewska, Niklinska et al. 2007).

“CIMP” arayoluyla gelişen kolorektal tümörler mikrosatellit instabil ya da stabil olabilir. Bu tümörlerin çoğu, serrated neoplazi sekansında, serrated poliplerden gelişmektedir (Snover 2011). Kolorektal karsinomların %20’sinin “CpG” hipermetilasyonu, %20’sinin düşük düzeyde “CpG” metilasyonu gösterdiği %60’ının ise “CpG” metilasyonu göstermediği izlenmiştir (Jass 2007; Snover 2011). Kolorektal karsinomların CIMP durumu, genellikle MSI durumu ile ve KRAS ve BRAF mutasyonları ile ilişkilidir. Buna göre, MSI-H ve BRAF mutasyonu gösterenler, CIMP1 grubu, MSS ve KRAS mutasyonu olanlar ise CIMP2 grubu olarak değerlendirilmektedirler. CIMP (-) olanlar ise genellikle MSS kanserlerdir (Hamilton 2010).

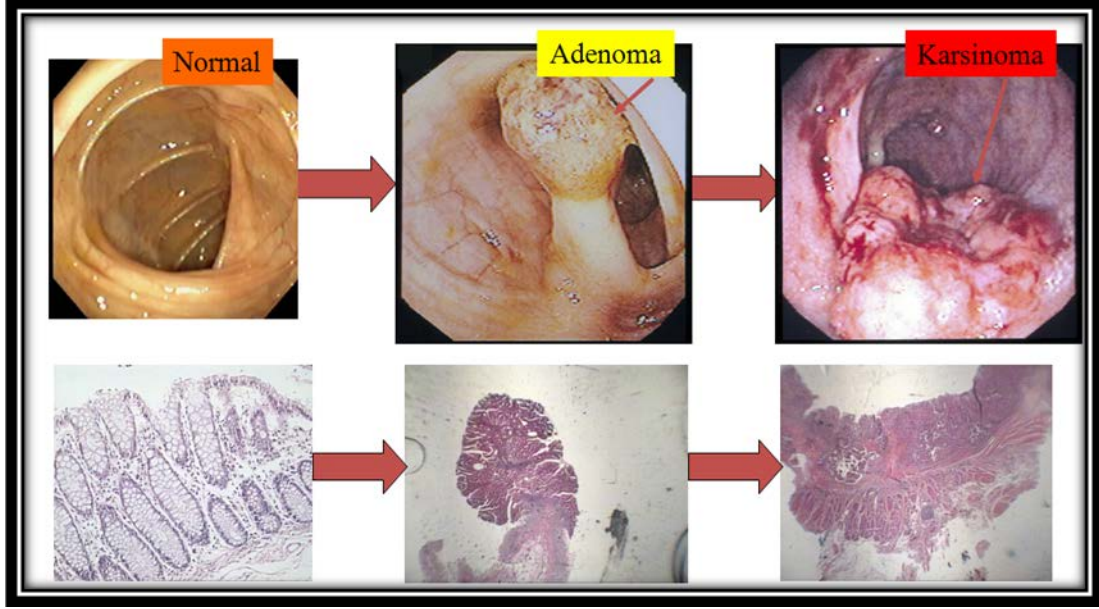
2.5.2. KOLOREKTAL KARSİNOGENEZDE MORFOLOJİK SPEKTRUM

Kolorektal karsinogeneizde yukarıda özetlenen moleküler ara yolların gelişim aşamalarında morfolojik olarak farklı lezyonlar ortaya çıkabilmektedir. Bunlardan bazıları bir moleküler ara yola spesifik olarak gelişirken, bazıları ise farklı moleküler ara yolları kullanabilmektedir. Sporadik kolorektal karsinom, kromozomal instabilite arayolu olarak bilinen moleküler yolakta adenomatöz poliplerden, mikrosatellit instabilite ve “CpG” adası metilatör arayolunda ise çoğunlukla serrated poliplerden gelişmektedir (Hamilton 2010; Ensari, Bosman 2010).

2.5.2.1. ADENOMA-KARSİNOMA SEKANSI

Yapılan histolojik incelemelerde, kolorektal kanser olgularının çoğunda mukozada normal epitelin önce adenomatöz epitele daha sonra da displaziye doğru ilerleyerek adenoma-karsinoma sekansı olarak adlandırılan bir morfolojik değişim gösterdiği gözlemlenmiştir (Vogelstein, Fearon et al. 1988; Chung 2000; Houlston 2001). Adenoma-karsinoma sekansında, tek bir kript epitelinden başlayan adenomatöz değişiklik olarak tanımlanan aberan kript odağı (AKO), tübüler adenom (TA), tübülovillöz adenom (TVA) ve villöz

adenom(VA)'dan oluşan adenomatöz polipler ve konvansiyonel adenokarsinoma (KonCA) (Şekil 2.11) yer almaktadır (Kumar 2010). Aşağıda bu lezyonlar ayrıntılı olarak ele alınmaktadır.



Şekil 2.11: Adenoma-Karsinoma Sekansı

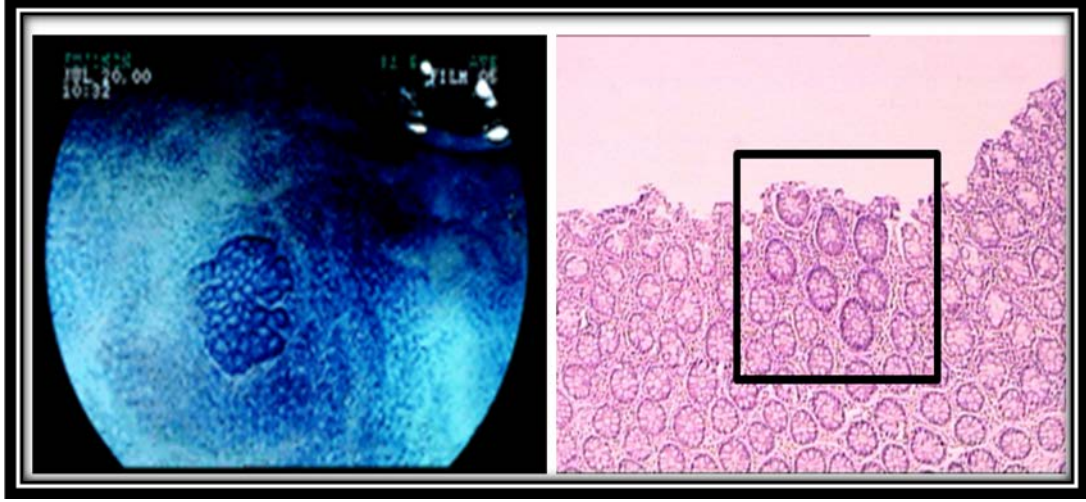
Adenoma-karsinoma Sekansında Öncü Lezyonlar:

Aberan Kript Odağı (AKO)

Adenoma-karsinoma sekansında, normal kolon mukozasından adenokarsinomaya dönüşümde ortaya çıkan en erken lezyon olarak kabul edilen aberan kript odağı (AKO), kolorektumda epitelyal neoplazinin morfolojik prekürsörüdür (Nucci, Robinson et al. 1997; Shpitz, Bomstein et al. 1998; Roncucci, Pedroni et al. 2000; Raju 2008). AKO'nun adenomatöz (displastik) ve hiperplastik olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Kolorektal adenomların adenomatöz tip AKO'dan geliştikleri, serrated poliplere ise hiperplastik AKO'nun öncülük ettiği düşünülmektedir (Ensari, Bosman et al. 2010).

Aberan kript odağının kolorektal karsinogenez basamakları arasında yer aldığı görüşü, bazılarında displazinin, birtakım genetik ve epigenetik değişikliklerin (APC, KRAS mutasyonları, mikrosatellit instabilite, p16 geni ve CIM gibi) saptanması ile desteklenmektedir (Roncucci, Pedroni et al. 2000). AKO, ilk kez azoksimetan verilmiş sıçanlarda metilen mavisi ile boyalı mukozal tabakanın mikroskopik olarak incelenmesi sonucu ya da büyütmeli endoskopi ya da kromoendoskopi ile azalmış müsin içeriği

nedeniyle normale göre daha çok genişlemiş, düzensizleşmiş ve daha koyu boyanmış kriptler (Şekil 2.12) şeklinde tespit edilmiştir (Roncucci, Pedroni et al. 2000), (Jen, Powell et al. 1994; Otori, Sugiyama et al. 1995; Di Gregorio, Losi et al. 1997; Nucci, Robinson et al. 1997; Otori, Konishi et al. 1998; Shpitz, Bomstein et al. 1998).



Şekil 2.12: Aberan Kript Odağı

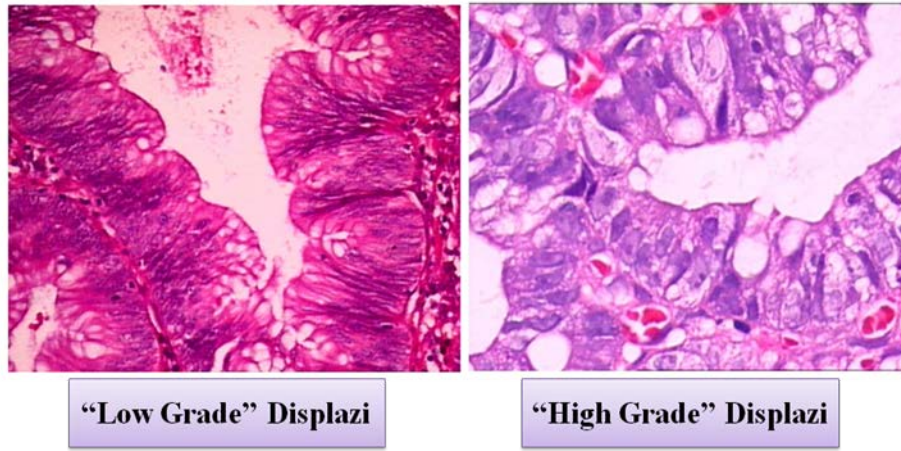
Adenomatöz Polip (Adenom)

Adenomatöz polipler, gerçek neoplastik lezyonlar olup, karsinoma öncüsüdür. Adenomlu bir hastada kolorektal karsinom gelişme riski, normal bir insana göre 4 kat daha fazladır (Kumar 2010). Adenomatöz polipler, epitelyal proliferasyon ve proliferate epitelde displazi ile karakterizedir (Burgart 2002; Percinel, Savas et al. 2007; Savas B 2007; Kumar 2010). Adenomatöz poliplerdeki epitelyal displazi, yapısal ve sitolojik özelliklere göre düşük dereceli (“low-grade”) ve yüksek dereceli (“high-grade”) olarak (Şekil 2.13) sınıflandırılır (Kumar 2010; Hamilton 2010).

“Low-grade” displazi (LGD): Teorik olarak, tüm adenomatöz poliplerin “low grade” displazi gösterdiği kabul edilir. Buna göre, LGD, psödostratifikasyon gösteren, uzun, oval hiperkromatik nükleuslu epitelyal hücrelerin döşediği epitel olarak tanımlanır (Hamilton 2010).

“High-grade” displazi (HGD): LGD’ e göre gerek yapısal olarak, gerekse sitolojik olarak daha belirgin atipinin olduğu epitelyal değişikliklerdir. Hücresel olarak, nükleus büyüklüğü, nükleol belirginliği, vezikülasyon, polarite kaybı, sık ve atipik mitoz varlığı,

yapısal olarak kribriform patern, tomurcuklanma, sırt sırta verme gibi bulgular HGD’de izlenen değişikliklerdir (Hamilton 2010).



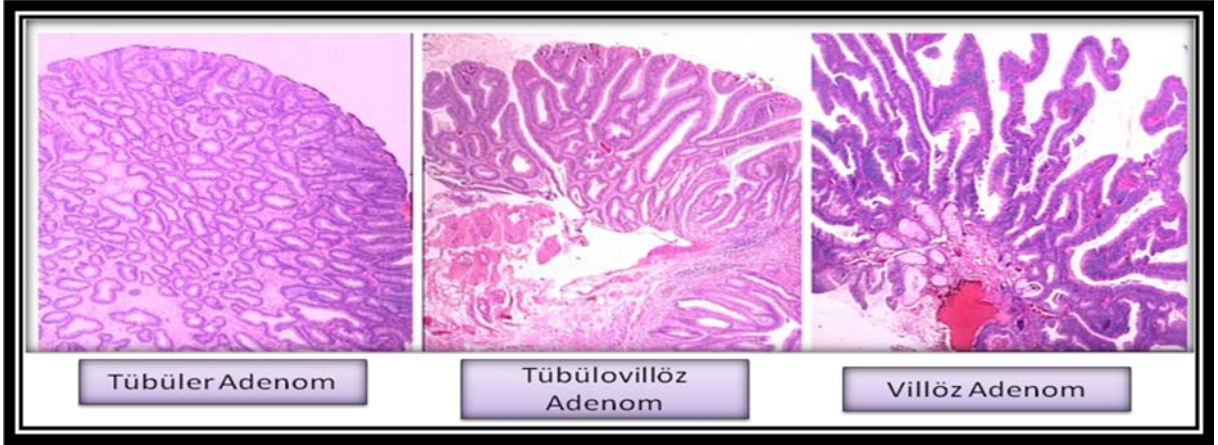
Şekil 2.13: Adenomatöz Poliplerde Displazi

Adenomatöz polipler, morfolojik özelliklerine göre 3 alt tipe (Şekil 2.14) ayrılmaktadır:

Tübüler Adenom: Yaklaşık yarısı rektosigmoidde yer alan tübüler adenomlar, kolonun herhangi bir yerinde bulunabilir. Çoğunlukla saplı, düzgün yüzeyle 0.5-1cm çaplı lezyonlardır. Sap kısmı normal kolon mukozası, baş kısmı hiperkromatik nükleuslu, yer yer düzensiz, azalmış müsin sekresyonu gösteren yüksek kolumnar, çok sıralı hücrelerle döşeli, dallanan glandlar meydana getiren neoplastik epitelden oluşan bir histopatolojiye sahiptir (Kumar 2010; Hamilton 2010).

Villöz Adenom: Tübüler adenomlardan daha büyük (çoğu >2cm), çoğunlukla sesil poliplerdir. Kadifemsi ya da karnıbahar benzeri bir yüzeye sahip ve lümene doğru villus benzeri çıkıntılar oluşturan kitleler şeklindedir. Villöz adenomların %30-40’ında invaziv karsinom gözlenmektedir (Kumar 2010; Hamilton 2010).

Tübülovillöz Adenom: Tübüler ve villöz komponentlerin karışımı şeklindedir. İnvaziv karsinom taşıma riski, displazi derecesi ve boyutları açısından, tübüler ve villöz adenomların arasında yer alır (Kumar 2010; Hamilton 2010).



Şekil 2.14: Adenomatöz Polip Tipleri

2.5.2.2. “SERRATED” NEOPLAZİ SEKANSI

Testere dişi (“serrated”) epitel örtüsü ile karakterize olan “serrated” polipler karsinomaya doğru ilerleyerek “serrated” neoplazi olarak adlandırılan spektrumu oluşturmaktadır (Longacre and Fenoglio-Preiser 1990; Snover 2005; Ensari, Bosman et al. 2010). Bu lezyonlara adını veren serrated epitelin nedeni, apoptoz inhibisyonu sonucu hücrelerin epitelde birikerek epitele karakteristik kıvrıntılı görünümü kazandırmasıdır (Hamilton 2010). “Serrated neoplazi” sekansı da, adenom-karsinom sekansına benzer şekilde, bir kript epitelinde ortaya çıkan hiperplastik değişiklikler, çoğunlukla hiperplastik fenotip gösteren AKO’dan başlayarak gelişen “serrated” polipleri ve müsinöz ya da “serrated” karsinomları kapsamaktadır. Bu sekansta yer alan “serrated” polipler hiperplastik polip(HP), sesil “serrated” adenom/polip(SSA/P) ve klasik “serrated” adenom (KSA)’dan (Şekil 2.11) oluşmaktadır (Hamilton 2010).

“Serrated” Neoplazi Sekansında Öncü Lezyonlar:

Hiperplastik Aberan Kript Odağı

“Serrated” neoplazi sekansında yer alan en erken morfolojik lezyondur. Adenoma-karsinoma sekansında yer alan AKO’lardan farklı olarak, hiperplastik epitel ile döşeli bir ya da birkaç kriptden oluşmaktadır (Kumar 2010).

“Serrated” polipler, epitelyumunda testere dişi görünümüne sahip poliplerdir. Bunların neoplastik potansiyelleri değişkendir. Morfolojik olarak üç alt tipi (Şekil 2.15) tanımlanmıştır: HP, SSA/P ve KSA.

Hiperplastik Polip (HP)

Genellikle neoplastik olarak kabul edilmeyen benign epitelyal proliferasyonlardır. Serrated poliplerin %80-90'ını oluşturan HP'ler en yaygın subtıptir. İnsidansı 40 yaşın üstünde artış göstermektedir. Morfolojik olarak, normal kolon mukozasına benzeyen, yüzeyde dilate, derine doğru daralan, goblet hücreleri ve absorptif epitel ile döşeli dar bir lamina propria ile ayrılan, birbirine paralel kriptler içerir. Çoğunlukla rektum yerleşimli olup, sigmoid kolonda da yer alabilirler (Ensari, Bosman et al. 2010; Kumar 2010). HP'lerin 3 subtıpti vardır: Klasik mikrovessiküler HP (MVHP), goblet hücreli HP ("Goblet cell HP: GCHP") ve müsin-fakir HP ("mucin poor HP: MPHP"). Bu subtıptler arasında demografik ve moleküler düzeyde farklılıklar mevcuttur. MVHP'ler, mikrovessiküler müsin sekresyonu gösteren epitel hücreleri, GCHP'ler yoğun goblet hücresi ile daha az epitelyal serrasyon ve MPHP'ler müsin içermeyen, reaktif görünümlü nükleer atipi ile karakterize subtıptlerdir. MVHP, en yaygın, MPHP ise en nadir görülen tipidir (Torlakovic, Skovlund et al. 2003; WHO 2010). HP'lerin yaygın olarak KRAS ya da BRAF mutasyonlarından birini taşıdığı gözlenmekle birlikte, GCHP'lerde KRAS mutasyonu yaygınken, MVHP'lerde BRAF mutasyonu daha sıktır. Ayrıca HP'lerde MLH1 ya da MGMT promotor metilasyonu da gözlenmekte ve bu durumda MSI'de gelişebilmektedir (Ensari, Bosman et al. 2010; Hamilton 2010).

Sesil "Serrated" Adenom/Polip (SSA/P)

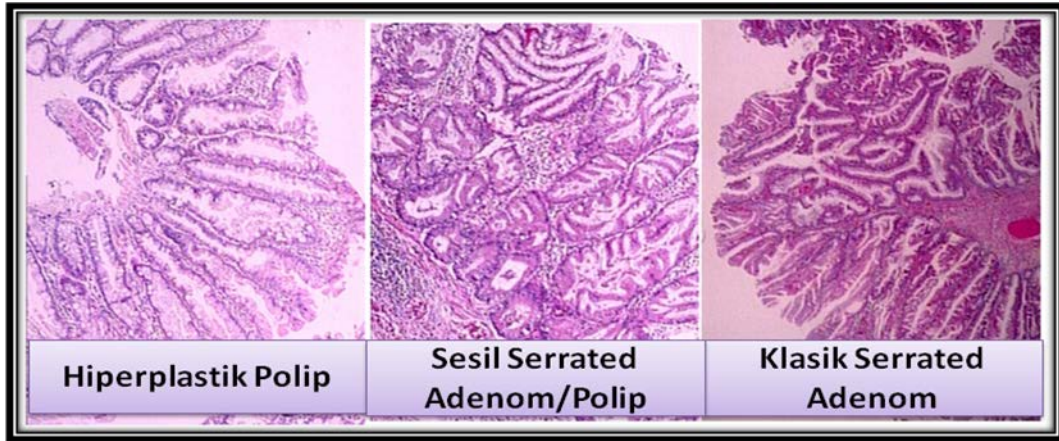
SSA/P'ler HP'lerden daha büyük olup, çoğu 5-10 mm çapa sahiptir. Tüm "serrated" poliplerin %18'ini oluşturan SSA/P'ler, daha çok sağ kolon yerleşimlidir. "Serrated" poliplerin bu subtıpti, büyük çaplı, aşırı serrasyon gösteren, bazal kript dilatasyonu, horizontal kript, "T" ya da "L" şeklinde kript varlığı gibi arkitektürel değişikliklerle karakterize poliplerdir. SSA/P'lerde proliferatif zon asimetriktir ve çoğunlukla kriptin tabanında lokalize değildir (Ensari, Bosman et al. 2010; Kumar 2010; Snover 2011; Hamilton 2010).

SSA/P'lerde MUC5AC ve MUC6 ekspresyonu ile karakterize gastrik tip müsin varlığı gözlenmektedir. SSA/P'ler, CIMP, MSI ya da MSS sporadik kolorektal kanserlerin öncülü olarak kabul edilmektedir. SSA/P'lerin büyük çoğunluğu BRAF mutasyonu taşımaktadır. Ayrıca, bu poliplerde promotor hipermetilasyonu ya da β -katenin'in nükleer

translokasyonu nedeniyle MLH1 ekspresyon kaybı gözlenmektedir (O'Brien, Yang et al. 2006; Wu, Montgomery et al. 2008; Ensari, Bosman et al. 2010; Hamilton 2010).

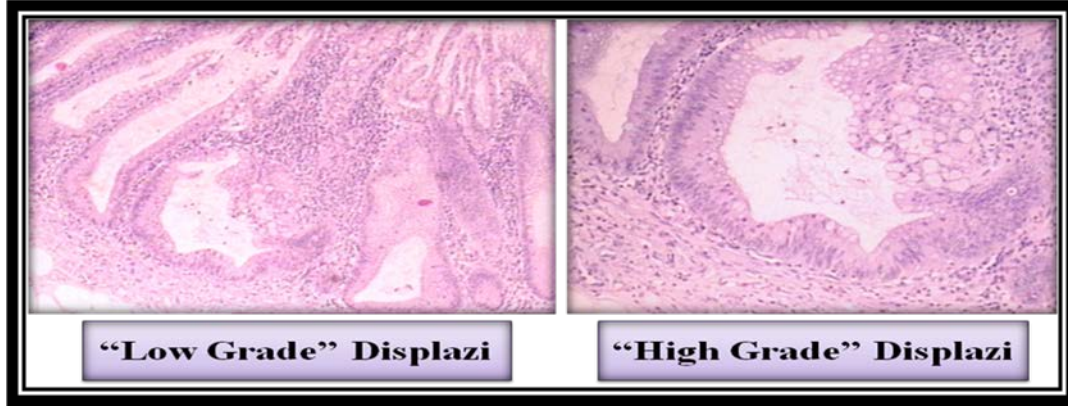
Klasik “Serrated” Adenom

KSA’lar HP ve SSA’a göre daha nadir görülen bir subtip olmakla beraber, daha çok sol kolon yerleşimlidirler. Morfolojik olarak “serrated” poliplere, sitolojik özellikleri ile de konvansiyonel adenomlara benzemektedir (Jass 2001; Higuchi, Sugihara et al. 2005). KSA’lar, protuberan gelişim paternine sahip, kompleks viliform konfigürasyon, “ektopik kript” olarak adlandırılan yeni oluşan ve horizontal oryantasyon gösteren kriptler ve bunları döşeyen eozinofilik sitoplazma, midzonal nükleuslu psödostratifiye kolumnar epitel ile karakterizedir. KSA’ların moleküler özellikleri henüz iyi anlaşılmış değildir. Ancak MGMT ve EphB2 genlerinin promotor bölgesinde hipermetilasyon ve KRAS mutasyonlarını taşıdığı bilinmektedir (Ensari, Bosman et al. 2010; Snover 2011; Hamilton 2010).



Şekil 2.15: Serrated Neoplazi Sekansında Öncü Lezyon Histopatolojisi

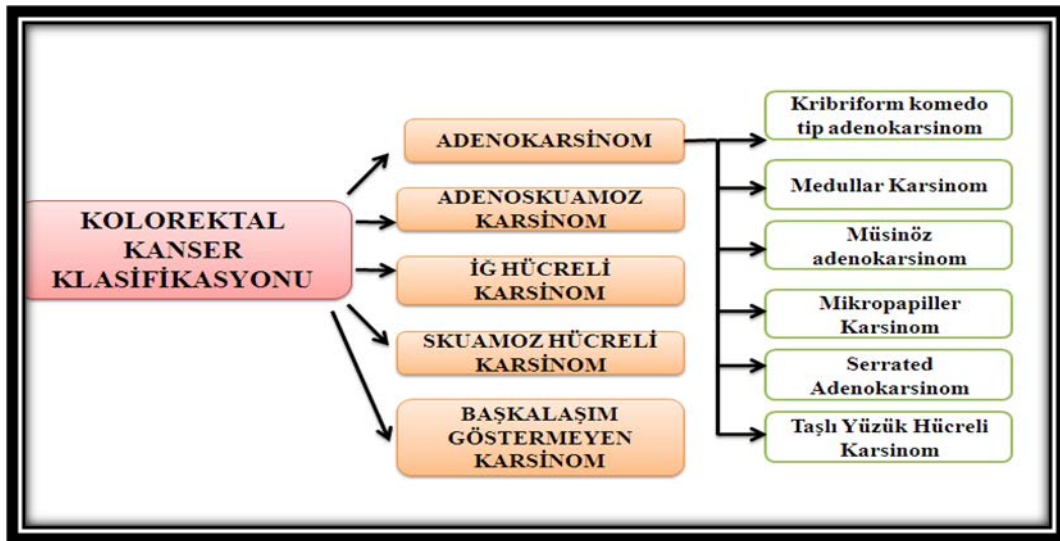
“Serrated” Poliplerde Displazi: “Serrated” poliplerde, klasik adenomatöz tipte displazi değil, daha çok “serrated” tip displazinin gelişebileceği bildirilmektedir (Şekil 2.16). “Serrated” tip displazi, yuvarlak veziküler nükleus, kaba kromatinli, belirgin nükleol ile karakterize olup daha çok sitolojik özellikler ile değerlendirilmektedir. Daha önceleri bu alanlar, bir “serrated” polip içinde görüldüğünde “mixed SP-adenom” olarak adlandırılmaktayken, WHO (Dünya Sağlık Örgütü)’nun 2010 klasifikasyonundan mikst polip grubu çıkarılmıştır. Literatürde, “serrated” adenomlarda da %7-15 oranında in situ karsinomaya eşdeğer ağır displastik odaklara rastlanabileceği bildirilmektedir (Ensari, Bosman et al. 2010; Snover 2011; Hamilton 2010).



Şekil 2.16: “Serrated” Poliplerde Displazi

2.6. KOLOREKTAL KANSERİN HİSTOPATOLOJİK KLASİFİKASYONU

Kolorektal karsinomların %90'dan çoğu adenokarsinomdur. Adenokarsinomlar gland oluşturma yeteneği gösteren neoplastik epitelyal hücrelerden oluşurlar. Bu tümörler gland oluşturma yeteneklerine göre differansiyasyon derecelendirilmesine tabi tutulurlar. KonCA'lardan başka varyantlar da mevcuttur; müsinöz adenokarsinoma, taşlı yüzük hücreli karsinoma, medüller karsinoma, “serrated” adenokarsinoma, kribriform-komodo tip adenokarsinoma, mikropapiller adenokarsinoma, adenoskuamöz karsinoma, iğsi hücreli karsinoma ve andifferansiye karsinomadır (Hamilton 2010). Aşağıda, bu çalışmaya dahil edilen subtiplerin tanımları ve mikroskopik görünümleri (Şekil 2.17 ve Şekil 2.18) sunulmuştur.



Şekil 2.17: Kolorektal Kanser Klasifikasyonu (Hamilton 2010)

2.6.1. Konvansiyonel Adenokarsinom (KonCA)

Klasik olarak gland oluşturan ya da kribriform patern gösteren adenokarsinomlardır. Glandları döşeyen epitel çok sıralı, adenomatöz karakterli atipik epitelyal hücrelerden oluşur ve tüm adenokarsinomların % 85 kadarını oluşturmaktadır (Kumar 2010).

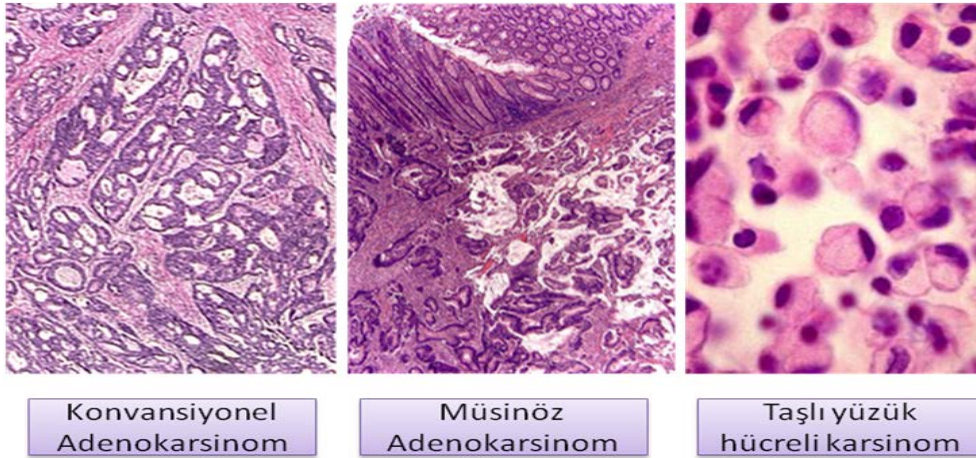
2.6.2. Müsinöz Adenokarsinom

Kolorektal tümörlerin bu tipi, geniş ekstraselüler müsin sekresyonu gösteren tümör hücreleri ile karakterizedir. Ekstraselüler müsin alanları tümörün en az % 50'sini oluşturmaktadır. Bazı olgularda hem ekstraselüler hem de intraselüler müsin sekresyonu gözlenebilmektedir. Bu durum taşlı yüzük hücre görünümüne neden olmaktadır (Kumar 2010; Hamilton 2010).

Müsinöz adenokarsinomlar, kolorektal karsinomların %15'ini oluşturmakta ve KonCA'lara göre daha kötü prognoz göstermektedir. Müsinöz adenokarsinomların bir grubu MSI-H olup, HNPCC ile ilişkilidir (Hamilton 2010).

2.6.3. Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom

Taşlı yüzük hücreli karsinom, tümör hücrelerinin % 50'sinden fazlasında belirgin intrasitoplazmik müsin varlığı ile karakterizedir. Bu subtipde tümör, diffüz yayılma göstermekte ve çoğunlukla glandlar oluşturmamaktadır. İntraselüler müsin birikimi, nükleusun kenara itilerek taşlı yüzük görünümü almasına neden olmaktadır. Taşlı yüzük hücreli karsinomların bazıları MSI-H ve "low grade"dir, ancak MSI-H olmayan tümörler genellikle çok agresiftir (Hamilton 2010).



Şekil 2.18: Kolorektal Kanser Histopatolojisi

2.6.4. Kolorektal Karsinomlarda Histolojik “Grade”

Adenokarsinomlar glandüler yapının niteliğine göre iyi, orta ve az diferansiye olmak üzere gruplandırılmaktadır. Buna göre, “grade” 1 tümörlerin (iyi diferansiye) %95’den fazlasında, “grade” 2 tümörlerin (orta derecede diferansiye) %50-95’inde, “grade” 3 tümörlerin (kötü diferansiye) %0-49’unda glandüler yapılanma mevcuttur. “Grade” 4 tümörler (indiferansiye) ise glandüler yapı göstermemekte ve “farklılaşma göstermeyen karsinom” grubunda yer almaktadır. Müsinöz adenokarsinomlar ve taşlı yüzük hücreli karsinomların tamamı “grade” 3 olarak kabul edilmektedir (Hamilton 2010).

2.6.7. Kolorektal Karsinomlarda Evreleme

Kolorektal karsinom evrelendirmesi için 3 farklı yöntem kullanılmaktadır: Dukes, Astra-Coller ve TNM sistemleri (Kumar 2010; Hamilton 2010).

Dukes sisteminde;

Evre A: Tümör kolon duvarında sınırlı, muskularis propriayı aşmamış.

Evre B: Tümör tüm kolon duvarını tutup muskularis propriayı aşmış, kolonda serozayı, rektumda perirektal dokuyu invaze etmiştir. Lenf bezi tutulumu yok.

Evre C1: Bölgesel lenf bezlerinde metastaz yok.

Evre C2: Mezenterik kan damarları etrafındaki lenf bezlerinde metastaz mevcut.

Astra-coller sisteminde;

Evre A: Tümör mukozada sınırlı.

Evre B: Tümör submukozaya sınırlı, lenf bezi invazyonu yok.

Evre B2: Tümör kas tabakasına sınırlı, lenf bezi invazyonu yok.

Evre C1: Tümör barsak duvarını aşmadığı halde lenf bezi metastazı mevcut.

Evre C2: Tümör barsak duvarını aşmış ve lenf bezi metastazı mevcut.

TNM sisteminde;

Evre 0: Tis N0 M0

Evre 1: T1,T2 N0 M0

Evre 2: T3,T4 N0 M0

Evre 3A: T1,T2 N1 M0

Evre 3B: T3,T4 N1 M0

Evre 3C: Herhangi bir T N2 M0

Evre 4: Herhangi bir T Herhangi bir N M1

T= Primer tümör TX: Primer tümörü bilinmeyen, T0: Primer tümör yok, Tis: Karsinoma insitu, T1: Tümör submukozaya invaze, T2: Tümör muskularis propriaya invaze, T3: Tümör subseroza ya da nonperitonealize perikolik/perirektal dokuya invaze, T4: Tümör komşu organ ya da yapılara invazyon göstermekte ve/veya visseral peritonu perfor etmektedir

N= Bölgesel lenf bezleri NX: Bölgesel lenf bezleri değerlendirilememekte, N0: Lenf bezi metastazı yok, N1: 1-3 lenf bezi tutulumu mevcut, N2: 4 veya daha fazla lenf bezi tutulumu mevcut

M=Uzak metastaz MX: Uzak metastaz değerlendirilememekte, M0: Uzak metastaz yok, M1: Uzak metastaz mevcut

2.7. HEDEFE YÖNELİK TEDAVİ YAKLAŞIMI

Hastalarda tedavi yanıtı ve ilaç toksisitesi farklılıkları kanser tedavisinin en önemli problemlerindendir. Günümüzdeki onkolojik uygulamalar, kişisel dozların hastanın ağırlığı ve vücut alanına göre ayarlanması temeline dayanmaktadır. Ancak, bu uygulama tümör cevabı veya toksisite açısından tedavinin sonuçlarının öngörülebilmesinde yeterli olmamaktadır. Bireye ve tümöre bağlı faktörlerin tedaviye yanıtta değişikliklere yol açabileceği düşünüldüğünde, bu durum şaşırtıcı değildir. Bu nedenle, son yıllarda bu sorunu aşabilmek için hedefe yönelik tedavi protokolü içerisinde tümörün moleküler temeline ve bireyin genetik yapısına dayanan bireysel tedaviler geliştirilmektedir.

Hedeflenmiş tedavide, özgül moleküler defekti olan tümör hücrelerine yönelerek kanser hücrelerini hedef hücre aracılığıyla öldürürken, normal hücrelerin sağlıklı bir ortamda devamına imkân tanınmaktadır. Bu nedenle, hedeflenmiş tedavilerin en önemli üstünlüğü terapötik indekslerinin yüksek olmasıdır. Hedefe yönelik tedavide, hedeflenecek hücresel komponentler, hücre membran reseptörleri, sinyal iletim yolları, hücre siklus ajanları, anjiyogenez inhibitörleri, hücre-matriks veya protein reseptörleridir. Kolorektal kanser tedavisinde son yıllarda kullanılmaya başlanan anti-EGFR (“epitelial growth factor receptor”) tedavisi de hedefe yönelik ve bireysel temelli bir tedavi örneğidir. Bu tedavinin prensipleri ile ilgili bilgiler aşağıda sunulmaktadır.

2.7.1. Anti-EGFR tedavi

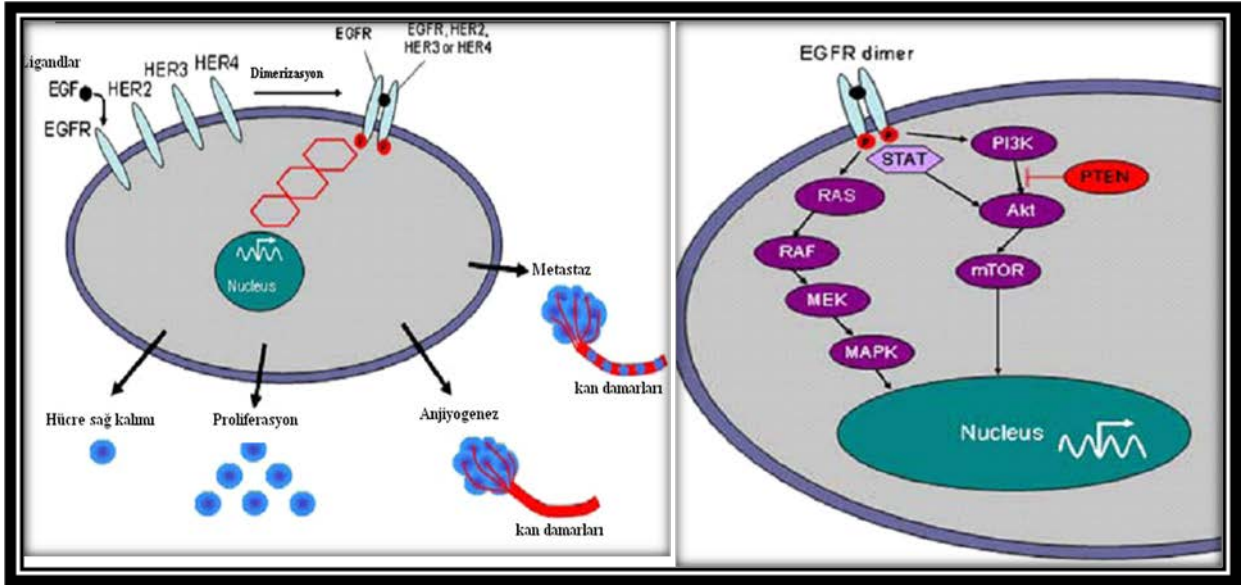
EGFR'nin tümör oluşumu ve kanserin ilerleyişindeki rolü anlaşıldığından beri bu reseptöre özgü geliştirilen antikorlarla, EGFR, yeni ve umut verici bir hedef haline gelmiştir. İn vitro ve in vivo çalışmalar göstermiştir ki, EGFR blokajı ile “downstream” sinyalin kesilmesi, tümör hücrelerinde büyümenin inhibisyonuna neden olabilmekte ve böylece kanserli hastalarda potansiyel iyileşme sağlanabilmektedir (van Krieken, Jung et al. 2008; Neumann 2009).

EGFR sinyal sistemi aktivasyonu için genellikle 3 adım gereklidir. İlk olarak, spesifik ligandlar konformasyonel bir değişiklik ile EGFR'nin ekstraselüler domainine bağlanır. Daha sonra, bu yapısal değişiklik EGFR ilişkili HER reseptörlerinden biri ile (heterodimer) ya da bir başka ligand bağımlı EGFR ile (homodimer) bir dimer formu oluşturmasına izin verir. Reseptör dimerizasyonu, sinyal iletim yollarının aktivasyonunu başlatan reseptörlerin intraselüler domaini ile birlikte tirozin kinaz rezidülerinin otoposforilasyonuna neden olur. EGFR tirozin fosforilasyonu RAS-MAPK, PI3K-Akt ve STAT ara yollarını içeren birkaç sinyal kaskadını başlatır. EGFR'nin indüklediği bu sinyal yolları, gen transkripsiyonu, hücre siklus devamlılığı, hücre proliferasyonu, hayatta kalma, adezyon, anjiogenez, migrasyon ve invazyonu (Şekil 2.19) kontrol etmektedir (van Krieken, Jung et al. 2008; Di Fiore 2010).

EGFR gibi hücre yüzey reseptörlerinde, bağlanma ya da modülasyon olmaksızın “downstream“ yolların aktivasyonu, kontrolsüz hücre büyümesi, proliferasyon, apoptozun baskılanması, anjiogenezin uyarılması ve metastatik yayılım gibi sonuçlar doğurabilir. Bu nedenle EGFR ve EGFR'nin “downstream” yollarında yer alan diğer moleküller (RAS ve RAF proteinleri gibi) de malign transformasyonun regülasyonunda temel rol oynamaktadır (van Krieken, Jung et al. 2008).

Günümüzde uygulanan anti-EGFR ilaçlarının 2 tipi mevcuttur; ilki, anti-EGFR monoklonal antikorlarıdır. Bunlar, EGFR'nin ekstraselüler domainine bağlanır ve reseptöre bağlanan doğal ligandı EGF (“Epitelial Growth Factor”) ile rekabet eder. Böylece, EGFR aktivasyonunu sağlayan ligand bloke olur. İkincisi ise, EGFR tirozin kinazlarının küçük molekül inhibitörleridir. Bunlar da, EGFR tirozin kinazların intraselüler katalitik domainine bağlanmak için ATP ile rekabet eder ve EGFR tirozin fosforilasyonunu

durdururlar. Böylece, “downstream” sinyal yolları baskılanır (Di Fiore, Sesboue et al. 2010).



Şekil 2.19: Ras-Mapk Sinyal Ara Yolunda Büyüme Sinyali (van Krieken, Jung et al. 2008)

İki anti-EGFR antikorunu (Cetuximab ve Panitumumab) ve iki küçük molekül EGFR tirozin kinaz inhibitörü (Gefitinib ve Erlotinib), kolorektal kanser, metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu ve pankreatik kanser gibi tümörlerin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (van Krieken, Jung et al. 2008).

2.7.2. Kolorektal Kanserde Anti-EGFR Tedavisi

Kolorektal kanserde EGFR hedefli ilaçlar daha önce bahsedilen reseptörün fonksiyonel domainlerini engelleyecek şekilde geliştirilmiştir. Bugün için, iki anti-EGFR antikorunu kolorektal kanserin tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır. İnsan fare kimerik IgG1 monoklonal antikorunu olan Cetuximab, kolorektal kanser tedavisi için onaylanan ilk EGFR hedefli ajandır. İnsan IgG2k monoklonal antikorunu olan Panitumumab ise, metastatik kolorektal kanser tedavisi için onaylanmış ikinci ilaçtır. Anti-EGFR tedavi ile metastatik kolorektal kanserlerde yaşam süresinin 23.5 aya dek uzatılabildiği gösterilmiştir. Ancak, Cetuximab ve Panitumumab tedavileri son derece pahalı ve bazı yan etkileri olan tedavi yöntemleridir (Asghar, Hawkes et al. 2010). Bu nedenle, hedefe yönelik tedavide, uygun hastaları belirleyebilmek için tümöre özgü bazı moleküler belirteçler kullanılmaktadır. Hedefe yönelik tedavinin meme kanseri, akciğer kanseri gibi önemli

morbidite ve mortalitesi olan tümör gruplarında tümör tedavisinde ve prognostik değerlendirmelerde giderek yaygınlaştığı düşünüldüğünde, kolorektal karsinomlarda da tedavi seçimini yönlendirecek moleküler belirteçlerin kullanımı ve olguların buna göre sınıflandırılması son derece önemli ve gereklidir. Kolorektal kanserde, EGFR ilişkili sinyal ara yolları için potansiyel belirteçler KRAS, BRAF ve PIK3CA gen mutasyonları ile PTEN gen ekspresyonu olarak kabul edilmektedir.

EGFR ile uyarılan hücre sinyal iletiminin “downstream” fonksiyonu olan ve RAS- MAPK sinyal ara yolunun en önemli moleküllerinden biri olan RAS proteini, aktif guanozin trifosfata bağlı durum ile inaktif guanozin difosfata bağlı durum arasında değişim gösteren bir sinyal iletim molekülüdür. RAS proteininin aktif duruma geçmesi için EGFR dimerinin oluşması gerekir. RAS protein ailesine ait olan G proteini, birkaç sinyal kaskadı aracılığıyla hücre yüzey reseptörlerinden hücre içi hedeflere doğru sinyal iletim bağlantısını sağlar. Hücre bölünmesi gerçekleştikten sonra, EGF ligandı EGFR’den ayrılır ve RAS proteini inaktif hale geçer. Böylece sinyal iletimi de durdurulmuş olur. Ancak KRAS geninde mutasyon olması durumunda, RAS proteini aktif halde kalır ve hücre yüzeyinden gelen sinyalleri hücre çekirdeğine iletmeye devam eder .(Castagnola and Giaretti 2005; Kranenburg 2005; Mitin, Rossman et al. 2005). Bu durum, EGFR aracılığı ile başlatılan sinyalden bağımsız olarak gerçekleşmektedir.

Hücrel RAS proteini normal dokuda proliferasyon, diferensiyasyon ve senesens sinyallerinde önemli bir role sahipken, mutant genin oluşturduğu RAS proteini ise birçok kanser tipinde etkili potansiyel onkojenik bir proteindir (Castagnola and Giaretti 2005).

Tüm insan tümörlerinin %17-25’inde aktive edici KRAS mutasyonu tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar “missense” mutasyonu şeklinde olup, çoğunlukla mutasyonlar 2. ekzonda kodon 12 ve 13 ile 3. ekzonda kodon 59, 61 ve 63’de yoğunlaşmaktadır (Grimmond, Raghavan et al. 1992). Kodon 12 mutasyonları, tüm KRAS gen mutasyonlarının %82’sini, kodon 13 mutasyonları ise %17’sini oluşturmaktadır.

KRAS mutasyon durumu, kolorektal kanser hastaları için tedaviye ilişkin kararlarda dikkate değer bir role sahiptir. EGFR hedefli ajanların moleküler temeli dikkate alındığında, KRAS mutasyonlu ve aktif RAS proteinli tümörlerde, reseptör seviyesinde EGFR blokajı, “downstream” sinyal aktivasyonunu durduramaz. Çünkü aktif RAS proteini EGFR’den bağımsız olarak sinyal aktivasyonunu sağlar. Bu nedenle hastaya anti-EGFR

tedavi uygulanmadan önce KRAS mutasyon analizi yapılmakta ve KRAS geni yabancıl tip olan (mutasyon taşımayan) tümörler, tedaviye uygun aday olgular olarak kabul edilmektedir. Ancak, KRAS yabancıl tip olan olguların yalnızca 1/3'ü EGFR inhibisyon tedavisine yanıt vermektedir. Özellikle, düşük yanıt oranları ve yüksek tedavi maliyeti RAS-MAPK ve PTEN-AKT sinyal arayollarındaki diğer biomarkerların araştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır (Vakiani and Solit 2011).

RAF gen ailesi içinde yer alan BRAF proteini, RAS proteini tarafından stimüle edilen, serin/treonin kinazı kodlayan ve RAS-MAPK sinyal ara yolunda hücre içi sinyal iletiminde görev alan bir moleküldür (Davies, Bignell et al. 2002).

BRAF onkogeninde, glisince zengin kinaz domainini etkileyen ekzon 11 mutasyonları ile aktivasyon segmentini etkileyen ekzon 15 mutasyonları olmak üzere, iki bölgede nokta mutasyonu tanımlanmıştır (Vakiani and Solit 2011).

Son yıllarda, melanomalarda, tiroid kanserlerinde, kolorektal kanserlerde ve diğer kanser tiplerinde BRAF geninde çeşitli mutasyonlar tespit edilmiştir (Davies, Bignell et al. 2002). Ayrıca, yanlış eşleşme tamir sistemi defektli olan kolorektal kanserlerde (mikrosatellit instabil), defekti olmayanlara göre çok önemli ölçüde BRAF mutasyonu görülmektedir. Bu nedenle, BRAF mutasyonlarının yanlış eşleşme tamir sistemiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Rajagopalan, Bardelli et al. 2002). Kolorektal karsinomların yaklaşık %10'unda BRAF mutasyonu olduğu saptanmıştır. Ayrıca, karsinoma öncüsü olarak kabul edilen bazı poliplerde de değişen oranlarda BRAF mutasyonu saptanmıştır. Mutasyon sıklığı MLH1 promotor hipermetilasyonundan dolayı mikrosatellit instabilitesi gösteren kolorektal kanserlerde %70'e çıkmaktadır (Hamilton 2010).

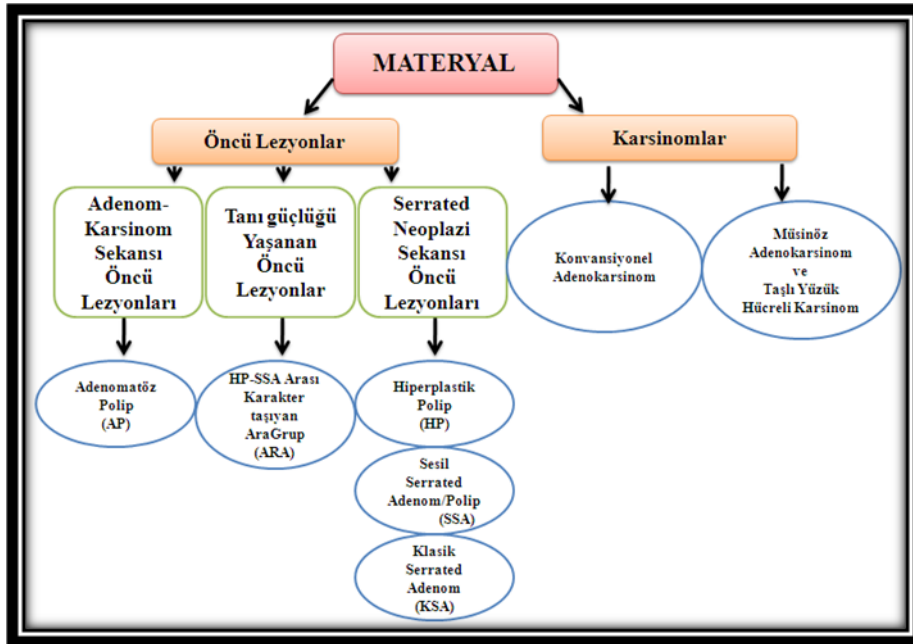
Mikrosatellit instabil kolorektal kanserlerde BRAF mutasyonu, KRAS mutasyonundan bağımsız olarak gerçekleşir ve birkaç sinyal yolunun aktivasyonu ile proliferasyon ve hayatta kalma sinyallerini başlatır. RAS/RAF mutasyonlu hücre hatları normal hücrelerle kıyaslandığında in vitro olarak Cetuximaba karşı yüksek direnç gösterirler. Az sayıda çalışmada BRAF mutasyonlarının anti-EGFR ajanlarına yanıtızlılıkla ilişkili olabileceği öne sürülmekle birlikte (Liou, Wu et al. 2011), klinik yanıtı öngörmeye muhtemel rolünü bildiren kesin veri henüz mevcut değildir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Bu tez çalışmasına retrospektif (geriye dönük) olarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı parafin doku arşivinden kolorektal karsinom öncü lezyonlarına ait endoskopik eksizezyon/polipektomi ve kolorektal karsinoma ait rezeksiyon materyalleri dahil edilmiştir.

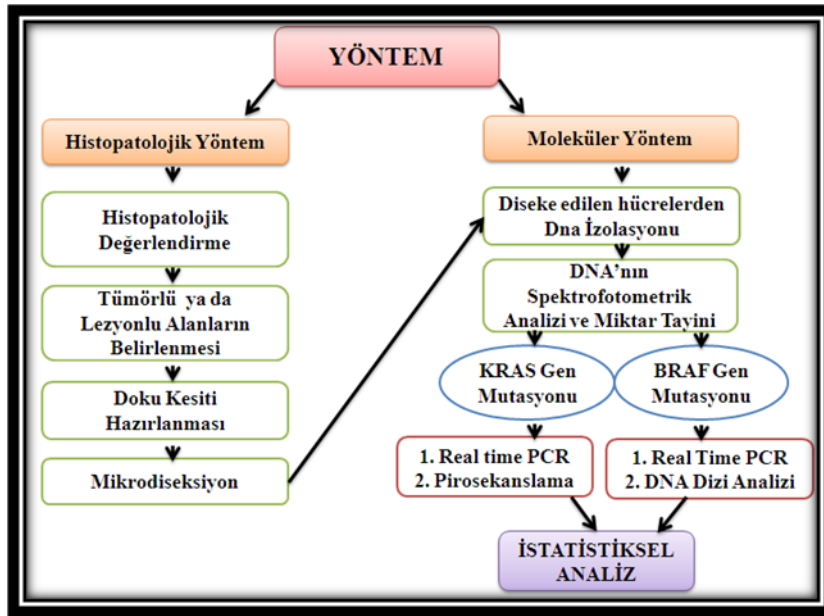
Öncü lezyon grubunda adenomatöz polip (AP), hiperplastik polip (HP), sesil serrated adenoma/ polip (SSA/P), klasik “serrated” adenoma (KSA) ve HP-SSA arasında tanı güçlüğü yaşanan ara grup polipler (ARA) olmak üzere beş gruptan oluşan 87 polip yer alırken, karsinom grubunda konvansiyonel adenokarsinom (KonCA) ile müsinöz ve taşlı yüzük hücreli adenokarsinomlardan (MüsCA) oluşan toplam 40 kolorektal karsinom çalışmaya katılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Olgu Gruplarının Gösterimi

3.2. YÖNTEM

Bu tez çalışmasında olgulara ait hematoksilin-eozin (H&E) boyalı patoloji arşiv preparatları yeniden değerlendirilerek gruplandırılmıştır. Histopatolojik değerlendirme sonrasında seçilen H&E boyalı lamlar üzerinde lezyonun ya da tümörün bulunduğu alanlar seçilerek DNA izolasyonu için diseke edilecek alanlar işaretlenmiştir. Bunu izleyerek olguya ait parafin bloklardan 6 µm boyasız kesitler hazırlanmış ve manuel mikrodiseksiyon yöntemiyle doku diseksiyonu yapılmıştır. Diseke edilen dokudan DNA izolasyonu ve izole edilen DNA üzerinde moleküler analiz gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Kullanılan yöntemlerin özeti

3.2.1. HİSTOPATOLOJİK YÖNTEM

3.2.1.1. Histopatolojik Değerlendirme

Gruplarda yer alacak olgulara ait arşiv materyali (H&E kesitler ve parafin bloklar) arşivden çıkarılarak, olguların H&E boyalı kesitleri üzerinde histopatolojik değerlendirme yapılmıştır. Önceden belirlenmiş olan olgu gruplarına dahil edilemeyecek, tanı değişikliği olan ve bu nedenle çalışma kapsamına girmeyen olgular yerine yeni olgular yine arşiv materyalleri arasından seçilerek çalışmaya dahil edilmiştir. Bu seçim gerek öncü lezyonlar gerekse kolorektal karsinomlarda WHO'nun 2010 klasifikasyonu ve kriterleri temel alınarak gerçekleştirilmiştir (Hamilton 2010).

Öncü lezyon grubuna adenomatöz polipler (TA, TVA ya da VA) ile serrated polipler (HP, SSA/P, ve KSA) seçilmiştir. Buna göre subtiplendirme yapılmaksızın toplam 20 adenomatöz polip ve 18 HP, 17 SSA, 19 KSA ve 13 ARA'dan oluşan toplam 67 serrated polip çalışmaya dahil edilmiştir.

Kolorektal karsinom grubuna 20 KonCA ve 12 müsinöz adenokarsinom, 8 taşlı yüzük hücreli karsinom (MüsCA) seçilmiştir. Bu olgulara ait demografik ve klinikopatolojik bilgiler patoloji raporlarından elde edilmiştir.

Tüm gruplar için demonstratif özelliğe sahip olanlar “referans preparat” olarak seçilerek mikroskopik fotoğraflama için ayrılmış ve daha sonra fotoğrafları çekilerek tez dökümanında ve sunumda kullanılmıştır.

3.2.1.2. Mikrodiseksiyon

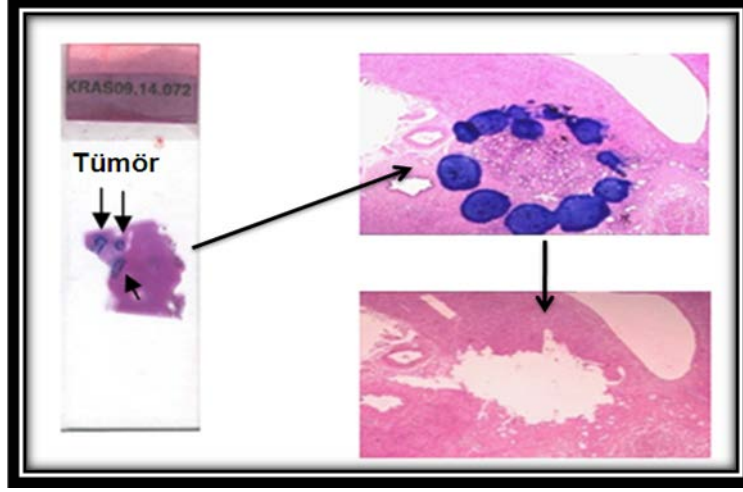
H&E boyalı lamalar üzerinde lezyonun bulunduğu alanlar ışık mikroskopi altında seçilerek marker kalem ile işaretlenerek diseksiyon alanı belirlenmiştir. Buna göre, geniş lezyon ya da tümör alanları içeren olgular için H&E boyalı preparatlar üzerinde marker kalem ile işaretlenmiştir. Öncü lezyonlarda ışık mikroskopi ile yapılan değerlendirme sonucunda kesitin tümü polibe ait ise işaretleme yapılmaksızın kesitin tamamı diseke edilmiştir.

İşaretle preparatlara ait parafin bloklar arşivden çıkarılarak mikrodiseksiyon için boyasız kesit hazırlanmıştır.

Parafin doku kesiti ve mikrodiseksiyon için aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

- Arşivden çıkarılan parafin bloklar -20°C 'de bir süre bekletilip soğutulularak mikrotom cihazına (Shandon) yerleştirilir.
- Bloktan 6 μm kalınlığında kesitler alınarak 45°C sıcaklığındaki su banyosuna atılır. Böylece kesim işlemi esnasında kıvrılan dokunun düzgün bir şekilde yayılması sağlanmış olur.
- Su banyosundan doku lam üzerine alınarak 5 dk kurumaya bırakılır.
- Deparafinizasyon işlemi için lamalar ksilende 5 dk ve absolut etanolde 10 dk bekletilerek 5dk kurumaya bırakılır.

- Marker kalem ile işaretlenmiş olan H&E boyalı preparatlar ile deparafinize edilmiş boyasız kesitler üst üste çakıştırılmak suretiyle ilgili alan bistüri ile kazınır ve 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Manuel Mikrodiseksiyon

3.2.2. MOLEKÜLER YÖNTEM

Bu aşamada öncelikle DNA izolasyonu gerçekleştirilip DNA'nın kalite ve miktar analizi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra KRAS ve BRAF gen mutasyonlarını saptamak için real time PCR, direkt sekanslama ve pirosekanslama teknikleri kullanılarak moleküler analiz gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen örnekler Qiagen, QiaAmp DNA Micro Kit (Katolog No: 56304 Almanya) kullanılarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu için aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

- 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınan mikrodiseksiyon örneğinin üzerine 15 µl Buffer ATL, 10 µl Proteinaz K eklenir ve 15 sn vortexlenir.
- Tüp ısı bloğuna yerleştirilir ve 56⁰C'de 16 saat inkübe edilir.
- 25 µl Buffer ATL, 50 µl Buffer AL eklenir ve 15 sn vortexlenir.
- 50 µl soğuk absolut etanol eklenir. Dikkatlice karıştırılıp 15 sn vortexlenir.
- 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilir. Spin yapılır.
- Lizat, membrana değmeden "QIAamp minElute Coloumn"a aktarılır. 8000rpm (6000g)'de 1 dk santrifüj edilir. Kolon temiz toplama tüpüne aktarılır.

- Membrana değmeden 500 µl Buffer AW1 eklenir. 8000 rpm (6000g)'de 1 dk santrifüj edilir. Kolon temiz toplama tüpüne aktarılır.
- Membrana değmeden 500 µl Buffer AW2 eklenir. 8000 rpm (6000g)'de 1 dk santrifüj edilir. Toplama tüpünün içindeki sıvı dökülür ve tekrar kolona yerleştirilir.
- Membranın tamamen kuruması için 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilir. Kolon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
- Membrana değmeden tam merkezine 20-30 µl Buffer AE veya distile su eklenir. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir ve 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir. Kolonlar atılıp tüplerin kapağı kapatılır.

3.2.2.2. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi ve Miktar Tayini

Spektrofotometrik olarak DNA'nın saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre (NanoDrop ND 1000) kullanılarak ölçüm yapılmıştır. DNA 260 nm dalga boyunda, protein 280 nm dalga boyunda, fenol ve diğer bileşikler ise 230 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Buna göre DNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/280 ve A230/280 oranları dikkate alınmaktadır. Bu çalışmada da bu prensiplere uyularak DNA saflık ve miktar analizi yapılmıştır.

3.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

- İzole edilen DNAların bütünlüğünü kontrol etmek amacıyla Agaroz jel elektrofrezinde yürütölüp görüntülenmiştir. Görüntüleme için Vilber Lourmat Doc Print Görüntüleme Sistemi kullanılmıştır.
- Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan solüsyonların hazırlanışında aşağdaki protokol izlenmiştir:
 - Etidyum bromür son konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde sulandırılır.
 - 100 ul DNA ladder'ın üzerine 240 µl 6X loading dye ve 660 µl ddH₂O (duble distile su) eklenerek DNA ladder hazırlanır.
 - 5xTBE (Tris-HCl, Borik Asit, EDTA) hazırlanması için 54 g Tris Base, 27.5 g Borik asit ve 20 ml 0.5 M EDTA deiyonize su ile karıştırılarak çözünmesi sağlanır. Hacmi 1000 ml'ye tamamlanır.
 - 5xTBE'nin deiyonize su ile 1/5 oranında sulandırılması suretiyle 1xTBE (Tris-HCl, Borik Asit, EDTA) hazırlanır.

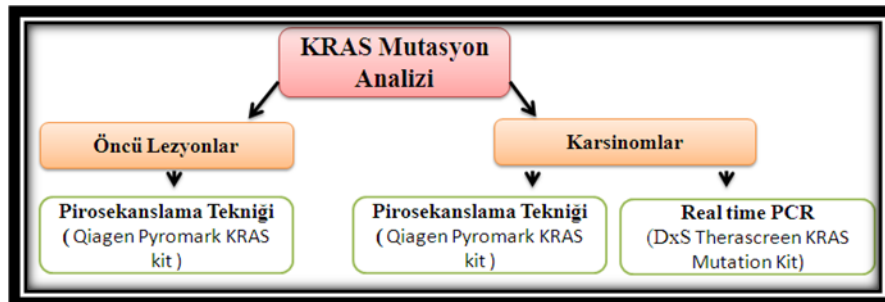
- Agaroz; %1'lik jel için 1g/100ml, %2'lik jel için 2g/100ml olacak şekilde hassas terazide tartılır. Üzerine 100 ml 1XTBE eklenip mikrodalgada kaynatılarak agarozun çözünmesi sağlanır. Sıcaklığı 60-70 °C'ye düştükten sonra 5 µl etidyum bromür eklenir ve iyice karıştırıldıktan sonra jel trayine dökülüp katılaşması için 30 dk beklenir.
- % 1'lik agaroz jel, elektroforez tankına yerleştirilir. 3 µl DNA ve 3 µl 6x Loading Dye ile karıştırılarak jelin kuyucuklarına yüklenir. Örnekler, 120 voltta 30 dakika yürütülür. Jel, UV görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğraflarır.
- Genomik DNA örneklerinin yürütülmesi için %1'lik agaroz jel kullanılırken PCR örneklerinin yürütülmesi için %2'lik jel kullanılır.

3.2.2.4. KRAS Mutasyon Analizi

KRAS geni ekzon 2, kodon 12, 13 ve ekzon 3 kodon 61 mutasyonlarını saptamak için real time PCR ve pirosekanslama tekniklerini esas alan iki ayrı diagnostik kit kullanılmıştır (Şekil 3.4).

Kolon kansinomları için hem real time PCR hem de pirosekanslama tekniği kullanılarak analiz yapılmış ve her iki sisteme ait sonuçlar karşılaştırılarak uyumlulukları değerlendirilmiştir.

Öncü lezyonlarda, çok küçük biopsi örneklerinden DNA elde edildiği için çok az miktarda DNA ile çalışmak zorunluluğu ortaya çıkmıştır. Real time PCR platformunda analiz yapabilmek için kullanılan “DxS Therascreen KRAS Mutation Kit”inde, her olguda yaklaşık 100ng/µl konsantrasyonda 50 µl DNA ‘ya gerek duyulduğundan öncü lezyonlarda yalnızca pirosekanslama yöntemi ile mutasyon analizi yapılmıştır.



Şekil 3.4: KRAS Mutasyon Analizi için Kullanılan Teknikler

- **Real Time PCR ile KRAS mutasyon analizi için aşağıdaki protokol takip edilmiştir:**

DNA miktar ve kalitesinin deney için uygun olup olmadığını anlayabilmek için standart “sample assessment” protokolü uygulanmıştır (Tablo 3.1). Çalışılacak örnek sayısı kadar hazırlanan mix, örnek başına 10’ar µl olacak şekilde plate dağıtılmıştır. Mixin hazırlanışı aşağıdaki gibidir:

Tablo 3.1: Kalite Kontrol PCR protokolü

<i>Assay</i>	<i>Reaksiyon mixi</i>	<i>Taq DNA polimeraz</i>
Kontrol assay mix	19.8 µl	0.2 µl
Toplam		20 µl

Üzerlerine 5’er µl genomik DNA eklendikten sonra “sealing foil” ile plate’in üzeri kapatılmış ve LightCycler 480 II platformunda aşağıdaki PCR programı (Tablo 3.2) uygulanmıştır.

Tablo 3.2: TheraScreen KRAS real time PCR programı

<i>Parametreler</i>	<i>Denatürasyon</i>	<i>Döngü(Cycling)</i>	
Analiz Modu	Yok	Kantifikasyon	
Döngü Sayısı	1	45	
Segment	1	1	2
Sıcaklık	95	95	60
Süre	30	30	60
Ramp Oranı	4.4	4.4	2.2
Acquisition modu	Yok	Yok	Tek

Kontrol assay ile yapılan real time PCR sonuçlarına göre gerekli olduğu durumlarda DNA’lar belli oranlarda sulandırılmış ve mutasyon assayleri için real time PCR mixleri hazırlanmıştır. real time PCR mix protokolü Tablo 3.3’de gösterilmiştir.

Tablo 3.3: TheraScreen KRAS real time PCR protokolü

<i>Assay</i>	<i>Reaksiyon mixi</i>	<i>Taq DNA polimeraz</i>
Kontrol assay mix	19.8 µl	0.2 µl
Mutasyon assayleri	19.8 µl	0.2 µl

- KRAS geni ekzon 2 mutasyonlarını saptamak için kullanılan “Therascreen KRAS Mutation Kit” (Katalog No: KR-21-05366216190, İngiltere) , Scorpion teknolojisini temel alan Real time PCR assayinde mutasyon analizini gerçekleştirmektedir.
- Söz konusu mutasyon kiti ARMS ve Scorpions denen iki teknolojiyi kombine ederek deteksiyon yapmaktadır.
- ARMS alel ya da mutasyon spesifik amplifikasyon ile PCR primerinin dizinin 3’ ucuna bağlanıp bağlanmamasına dayanan bir tekniktir. Mutasyon varsa primer diziyile tamamen eşleşir ve amplifikasyon çok etkin bir şekilde gerçekleşmektedir. Mutasyon yoksa primerin 3’ ucu diziyile tam olarak eşleşmez ve amplifikasyon çok düşük düzeyde gerçekleşir ya da hiç gerçekleşmez.
- Scorpion ise ARMS PCR ile gerçekleşen amplifikasyonu detekt eden sistemdir. Scorpionlar bir proba bağlı bir PCR primeri içeren bifonksiyonel moleküllerdir.
- Kit 1 kontrol, 7 mutasyon assayinden oluşmaktadır. Kontrol assay, örnekteki toplam DNA kalitesinin tespitinde kullanılan hiçbir mutasyon ya da polimorfizm içermeyen KRAS geni ekzon 4 bölgesini amplifiye eder. Mutasyon assayleri ise scorpion prob ve ARMS primerleri ile yabancıl ve mutant tip DNAları ayırt etmeyi sağlar. “Therascreen KRAS Mutation Kit”in saptayabildiği mutasyonlar Tablo 3.4’de gösterilmektedir.

Tablo 3.4: Therascreen KRAS Mutation Kit”in saptayabildiği mutasyonlar

<i>Lokalizasyon</i>	<i>Mutasyon tipi</i>
Ekzon 2, kodon 12	Gly12Ala
Ekzon 2, kodon 12	Gly12Asp
Ekzon 2, kodon 12	Gly12Arg
Ekzon 2, kodon 12	Gly12Cys
Ekzon 2, kodon 12	Gly12Ser
Ekzon 2, kodon 12	Gly12Val
Ekzon 2, kodon 13	Gly13Asp

- **Pirosekanslama ile KRAS mutasyon analizi için aşağıdaki protokol takip edilmiştir:**

Pyromark PCR master mix kullanılarak ekzon 2 ve 3 için 2 ayrı PCR reaksiyonu hazırlanmıştır.

Çalışılacak örnek sayısı kadar hazırlanan mix 0.2 µl'lik tüplere dağıtılmıştır. Genomik DNAlar tüplere eklendikten sonra aşağıdaki PCR programı uygulanmıştır.

- 95 °C'de 15 dk
 - 95 °C'de 20 sn
 - 53 °C'de 30 sn
 - 72 °C'de 20 sn
 - 72 °C'de 10 dk
- } 38 döngü

PCR ürünlerinin immobilizasyonu için öncelikle örnekler 24'lük PCR plate'ine aktarılarak üzerlerine streptavidin boncukları içeren bir solüsyon eklenmiş ve çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmiştir. 1400 rpm ve 15-25°C sıcaklıkta 5-10 dk inkübasyona bırakılmıştır.

Plate "PyroMark Q24 Vacuum WorkStation" cihaza yerleştirilmiştir.

Cihazın vakumu çalıştırılarak Workstation kolu plate'e batırıldıktan sonra ve streptavidin boncukları ile karıştırılmış olan PCR ürünlerinin Workstation koluna tutulması sağlanır.

1 nolu kuyudaki %70 etanolde 5 sn, 2 nolu kuyudaki denatürasyon solüsyonunda 5 sn, 3 nolu kuyudaki wash bufferda 10 sn bekletilmiştir. Ardından Workstation kolu 90° dik tutularak 5 sn havada kuruması sağlanmıştır. Vakumlama sonlandırılmıştır.

Kodon 12, 13 ve kodon 61 için hazırlanmış olan stok primerler son konsantrasyonu 0.3 µM olacak şekilde annealing buffer ile dilüye edilmiştir. Temiz bir plate'e her bir örnek için 25 µl sekans primeri içeren annealing buffer dağıtılmıştır.

Workstation kolu sekans primeri içeren annealing buffera batırılmış ve kolun magnetik ucunda tutunmuş ve vakum sayesinde pürifiye hale gelmiş olan PCR ürünlerinin buffer içine çözünerek geçmesi sağlanmıştır.

Plate 80 °C'de 2 dk inkübe edilmiş, ardından oda sıcaklığında (15-25 °C'de) en az 5 dk. inkübe edilmiştir.

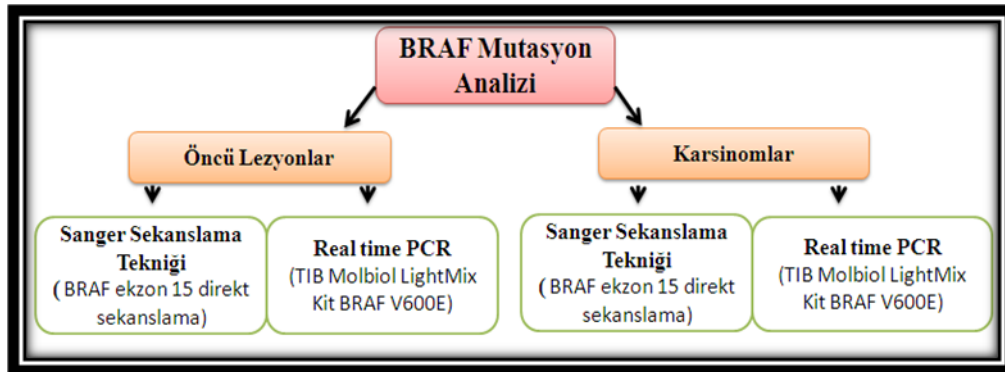
PyroMark Q24 kartuşuna enzim, substrat ve deoksiribonükleik asitler (dNTPler) kartuşta işaretlenmiş kuyulara eklenmiş ve kartuş plate ile birlikte PyroMark Q24 cihazına yerleştirilmiştir.

Cihaz çalıştırılıp, sonuçlar PyroMark Q24 Software’i kullanılarak analiz edilmiştir.

- KRAS geni ekzon 2 kodon 12 ve 13 mutasyonları ve ekzon 3 kodon 61 mutasyonları için dizayn edilmiş olan “Qiagen Pyromark KRAS kit” (Katalog No: 970452, Almanya) kullanılarak pirosekanslama tekniği ile mutasyon analizi gerçekleştirilmektedir.
- Pirosekanslama, Sanger’in zincir sonlanma reaksiyonu ile gerçekleştirilen DNA dizi analizinden farklı ve yeni nesil sekanslama teknolojisi olarak bilinen bir tekniktir.

3.2.2.5. BRAF Mutasyon Analizi

BRAF geni ekzon 15, V600E mutasyonunu saptamak için real time PCR (melting curve analizi)’ı esas alan bir kit kullanılmıştır. Ayrıca Sanger’in geliştirdiği DNA zincir sonlanması reaksiyonunu esas alan direkt sekanslama ile ekzon 15 dizi analizi yapılmıştır. Hem karsinomlar hem de öncü lezyonlar için öncelikle real time PCR tekniği ile mutasyonlar saptanmış, daha sonra içlerinden rastgele seçilen 20 örnek sekanslanmış ve çıkan sonuçlar karşılaştırılmıştır (Şekil 3.5). Tüm örneklerde sekanslamanın uygulanmama nedeni maliyet nedeniyle yeteri kadar sekans kitinin bulunmayışıdır.



Şekil 3.5: BRAF Mutasyon Analizi için Kullanılan Teknikler

- **Real Time PCR ile BRAF mutasyon analizi için aşağıdaki protokol takip edilmiştir:**

96 reaksiyonluk spesifik primer ve prob içeren liyofilize mix, 100 µl PCR-grade su ile sulandırılır.

Çalışılan örnek sayısınca aşağıdaki protokol takip edilerek (Tablo 3.5) reaksiyon mixi hazırlanır.

Tablo 3.5: BRAF real time PCR protokolü

<i>Malzeme</i>	<i>1 örnek için miktar</i>
PCR-grade su	10.4 µl
25 mM Mg+	1.6 µl
BRAF primer karışımı	1 µl
Roche Master Mix	2 µl
Toplam hacim	15 µl

Hazırlanan mix vortexlenir ve spin yapılır. 96 well plate'e her bir kuyuya 15 µl olacak şekilde dağıtılır. 5 µl DNA eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlanır.

Plate LightCycler 480-II cihazına yüklenerek aşağıdaki PCR programı (Tablo 3.6) uygulanır.

Sonuçlar, Red 640 kanalında analiz edilerek erime eğrilerine göre genotipler belirlenir.

Tablo 3.6: BRAF real time PCR programı

Parametreler	Denatürasyon	Döngü(Cycling)				Erime (melting)				Soğuma(Cooling)
Analiz modu	None	Kantifikasyon				Melting Curves				None
Döngü sayısı	1	50				1				1
Segment	1	1	2	3	4	1	2	3	4	1
Sıcaklık (°C)	95	95	58	58	72	95	58	40	85	40
Süre (sn)	10	10	5	10	10	20	20	20	00	30
Ramp oranı (°C/s)	20	20	20	20	20	20	20	20	0.2	20
Acquisition modu	None	none	single	none	none	none	none	none	Contin.	None

- “LightMix® Kit BRAF V600E” ile BRAF geni, ekzon 15, V600E mutasyonu için tasarlanmış spesifik primerler kullanılarak 212 baz çifti uzunluğunda fragmentlerin amplifikasyonu gerçekleştirilir.
- Hibridizasyon problemleriyle işaretlenen fragmentler Red 640 kanalında melting curve analizine tabi tutulur ve genotipler belirlenir.

- Yabancı tip ampliconlar 55⁰C de erime eğrisi oluştururken mutant tip ampliconlar 59⁰C’de erime eğrisi oluşturmaktadır.
- **Direk Sekanslama ile BRAF mutasyon analizi için aşağıdaki protokol takip edilmiştir:**

Primerler, primer.exe programı kullanılarak dizayn edilir. Blast veri tabanı kullanılarak spesifitesi kontrol edilir.

BRAF geni ekzon 15’e uygun primerler Tablo 3.7’de verilmiştir:

Tablo 3.7: BRAF ekzon 15 primer dizileri

<i>Gen</i>	<i>Primerler</i>	<i>Amplikon Uzunluğu</i>
BRAF ekzon 15	Forward (F) primer: 5'-TCTTCATAATGCTTGCTCTG-3' Reverse (R) primer: 5'-TAGCCTCAATTCTTACCATC-3'	201 baz çifti

Liyofilize halde sentezlenen primerler, son konsantrasyonları 100 pmol/μl olacak şekilde deiyonize su ile sulandırılır. Stok primerin 1/10 sulandırılması suretiyle 10 pmol/μl primer hazırlanır.

dATP, dTTP, dGTP ve dCTP stoklarının her birinden 5 μl alınır ve deiyonize su ile son hacim 50 μl’ye tamamlanır.

Dizayn edilen primer çiftlerinin en uygun bağlanma ısılarının bulunması için 50-60 °C arası bağlanma ısılarında farklı MgCl₂ konsantrasyonları ile gradient PCR yapılır (Tablo 3.8).

Tablo 3.8: BRAF ekzon 15 primerleri için uygulanan gradient PCR programı

<i>Reaktif</i>	<i>1M MgCl₂</i>	<i>1.5 M MgCl₂</i>	<i>2M MgCl₂</i>
10x enzim tamponu (NH₄)₂SO₄	2.5 μl	2.5 μl	2.5 μl
MgCl₂(25 mM)	1 μl	1.5 μl	2 μl
dNTP (10 mM)	0.5 μl	0.5 μl	0.5 μl
F primer (10 pmol/ μl)	0.5 μl	0.5 μl	0.5 μl
R primer (10 pmol/ μl)	0.5 μl	0.5 μl	0.5 μl
Taq DNA polimeraz	0.2 μl	0.2 μl	0.2 μl
Deiyonize Su	17.8 μl	17.3 μl	16.8 μl
DNA (50 ng/ μl)	2 μl	2 μl	2 μl
Son Hacim	25 μl	25 μl	25 μl

Gradient PCR için aşağıdaki PCR programı uygulanır.

- 94 °C'de 2 dk
 - 94 °C'de 20 sn
 - 50-55-60 °C'de 20 sn
 - 72 °C'de 20 sn
 - 72 °C'de 3 dk
 - 20 °C'de 1 sn
 - 10 °C'de bekletilir.
- } 40 döngü

Hazırlanan %2'lik jelde PCR ürünleri yürütülerek UV görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. Bant profilleri değerlendirilerek her bir gen için uygun bağlanma ısısı ve MgCl₂ konsantrasyonu belirlenmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonundan sonra elde edilen PCR ürününü diğer PCR komponentlerinden (dNTP, primer, enzim..vb) arındırmak için saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Bunun için Qiaçen QIAquick PCR Pürifikasyon Kiti (Katolog No: 28104, Almanya) kullanılmıştır.

Pürifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde 120 voltta 30 dk. yürütülmüştür. UV görüntüleme sisteminde görüntülendi ve bant profilleri değerlendirilmiştir.

Sekans reaksiyonu için 0.5 M EDTA'nın ¼ sulandırılması suretiyle 125 mM EDTA çözeltisi hazırlanır.

82.5 g Na Asetat (MA=136.08) tartılıp hacmi 50 ml'ye tamamlanır. Asetik asit ile pH'sı 5.2'ye ayarlanır. 0.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alıkuatlanır.

700 µl absolut (%100) etanole 300 µl deiyonize su ilave edilmesi suretiyle hazırlanır.

Pürifiye edilmiş PCR ürünleri ile aşağıdaki protokol takip edilerek sekans reaksiyonu kurulur (Tablo 3.9).

Tablo 3.9: Direk sekanslama için uygulanan sekans PCR programı

<i>Reaktif</i>	<i>Miktar</i>
GenomeLab DTCS Quick Start Kit	4 µl
Primer (1.6 pmol/ µl)	1 µl
Betain (5M)	2 µl
DNA	2 µl
Deiyonize Su	1 µl
Son Hacim	10 µl

Sekans reaksiyonu için aşağıdaki PCR programı uygulanır.

- 96 °C'de 20 sn
 - 50 °C'de 20 sn
 - 60 °C'de 4 dk
- } 30 döngü

1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine örnek isimleri yazılır. Her birine 1 µl 125 mM EDTA (pH=8) ve 10 µl olan ürünler eklenir.

Üzerine 1 µl 3 M sodyum asetat (pH=5.2) eklenir. Karışım vortexlenir. Üzerine buz içinde duran, %100 lük soğuk etanolden 35 µl eklenir.

Karışım vortexlenir ve oda ısısında 15 dk bekletilir.

14.000 rpm ve 4°C'de 20 dk. santrifüj edilir. Etanol uzaklaştırılır.

Üzerlerine 130 µl %70'lik soğuk etanol eklenir. 14.000 rpm ve 4°C'de 10 dk. santrifüj edilir. Etanol uzaklaştırılır.

Tekrar üzerlerine 130 µl %70 lik etanolden eklenir. Tüpler bir kez alt üst edilir.

14.000 rpm ve 4°C'de 10 dk. santrifüj edilir. Etanol uzaklaştırılır.

14.000 rpm ve 4°C'de 45 sn daha santrifüj edilir.

Kağıt havluya ters çevrilerek 10 dk. kurutulur. 5 dk. vakumlu santrifüjde kurutulup presipite olması sağlanır.

Presipite edilen sekans ürünü 20 µl formamid ile çözülerek Beckmann Coulter Sample Plate'ye yüklenir. Buharlaşmasını engellemek için üzerine 1 damla mineral yağ damlatılarak sekans cihazına (Beckmann Coulter CEQ8000 Genetic Analysis System) yerleştirilir ve kapillerde yürütülür.

Sekans cihazında yürütülen örneklerin ham verileri CEQ8000 Genetic Analysis programında analiz edilerek DNA dizisi okunur. Ayrıca Sequencher ve Chromas Lite programları kullanılarak analiz edilen veriler referans dizi ile kıyaslanır ve olası mutasyonlar tespit edilir.

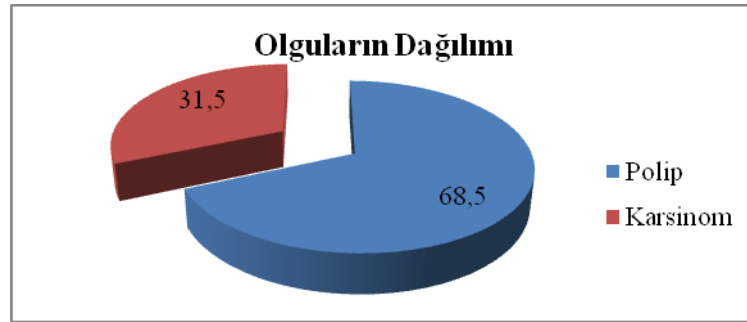
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmadaki farklı parametrelere ait verilerin istatistiksel değerlendirilmesi için, SPSS paket programı kullanılmıştır. Değerlendirmelerde “Ki-kare Testi” ve “Fisher Exact” test yöntemleri kullanılırken; lezyon çapı ile ilgili değerlendirmelerde “Mann Whitney U testi” ve “Kruskal Wallis” analizi yapılmış, parametreler arasındaki ilişkilerde “phi” katsayısı kullanılmış ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

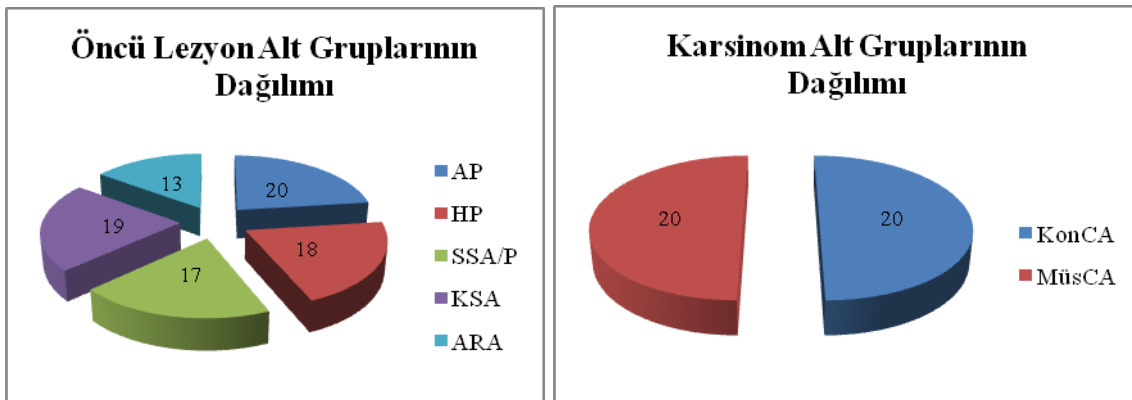
4.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Tez çalışmasına katılan olguların %68.5'i (n=87) poliplerden (öncü lezyonlardan), %31.5'u (n=40) karsinomlardan oluşmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Tüm Olguların Dağılımı

Olgular 2010 WHO sınıflamasına göre klasifiye edildiğinde, öncü lezyonların % 22.98'inin (n=20) AP, %20.69'unun (n=18) HP, %19.54'ünün (n=17) SSA/P, %21.84'ünün (n=19) KSA ve %14.95'inin (n=13) ARA gruplarından oluştuğu, karsinomların % 50'sinin KonCA, % 30'unun müsinöz adenokarsinom ve %20'sinin taşlı yüzük hücreli adenokarsinomdan meydana geldiği görülmektedir (Şekil 4.2). İstatistiksel değerlendirmeye olanak vermek amacıyla, müsinöz karsinom ile taşlı yüzük hücreli karsinom grupları birleştirilerek tek grup (MüsCA) oluşturulmuştur. Karsinomların %2.5'i (n=3) "grade"1, %37.5'i (n=15) "grade" 2 ve %55'i (n=22) "grade" 3 iken %60'ı (n=24) evre 3 ve %40'ı (n=16) evre 4 olgulardan oluşmaktadır (Hamilton 2010).



Şekil 4.2: Polip ve Karsinomlarda Alt Grupların Dağılımı

4.2. DEMOGRAFİK BULGULAR

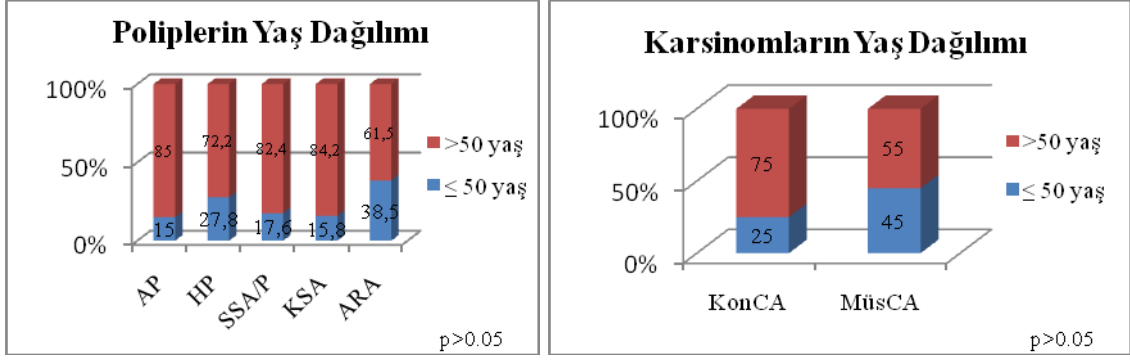
4.2.1. Yaş

Olguların yaş dağılımı 19-79 arasında olup, ortalama yaş 56.7'dir. İstatistiksel değerlendirmeye olanak verebilmek için kolorektal kanser ve öncü lezyonların görülme yaşı da göz önünde bulundurularak, olgular ≤ 50 yaş ve >50 yaş olarak 2 gruba ayrılmıştır. Buna göre olguların % 26'sı (n=33) ≤ 50 yaş olup, % 74'ü (n=74) >50 yaşır (Şekil 4.3).

Polip olgularının yaş dağılımı 30-77 arasında değişmekte olup, yaş ortalamaları 57.6'dır. Tüm poliplerin %21.8'i ≤ 50 yaş iken, %78.2'si >50 yaşır. Polip tipleri incelendiğinde, ≤ 50 yaş ve >50 yaş olguların oranları, sırasıyla AP için %15 (n=3) ve %85 (n=17); SPler için % 23.9 (n=16) ve % 76.1 (n=51) olarak saptanırken, SP subtipleri incelendiğinde, HP için %27.8 (n=5) %72.2 (n=13); SSA/P için % 17.6 (n=3), %82.4 (n=14); KSA için %15.8 (n= 3), %84.2 (n=14); ARA için ise %38.5 (n=5), % 61.5 olarak saptanmıştır. Yaş açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Karsinom olgularının yaş dağılımı 19-79 arasında olup, yaş ortalamaları 54.85'dir. Tüm karsinomların %35'i (n=14) ≤ 50 yaş iken % 65'i >50 yaşır. Tümör tipleri incelendiğinde ≤ 50 ve >50 yaş olguların oranları sırasıyla, KonCA'lar için %25'i (n=5), %75 (n=15); MüsCA'lar için %45 (n=9), %55 (n=11) olarak değerlendirilmiş, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p>0.05$) bulunmamakla birlikte müsinöz grupta ≤ 50 yaş olguların diğer gruba göre daha yüksek olduğu ve dolayısıyla, müsinöz fenotipin daha genç yaşta görüldüğü dikkati çekmiştir.

Polip ve karsinomların yaş dağılımı açısından benzer özellik gösterdikleri ve daha çok ileri yaşta görüldükleri, AP'lerin SP'lere göre daha yüksek oranda 50 yaş üzerinde geliştiği dikkati çekmiştir. SP subtiplerinde de bu dağılım özelliği gözlenmiştir. KonCA'larda benzer yaş dağılımı gösterirken, MüsCA'larda daha yüksek oranda 50 yaş altı olguların yer aldığı dikkati çekmiştir.



Şekil 4.3: Tüm Olguların Yaşa Göre Dağılımları

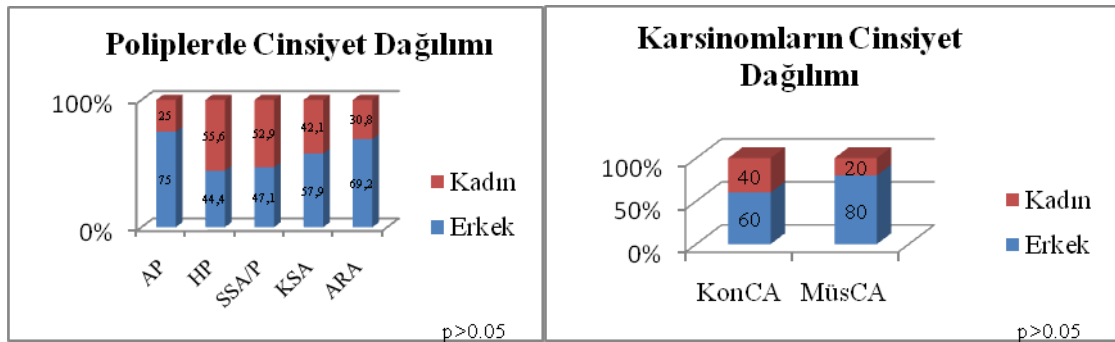
4.2.2. Cinsiyet

Olguların %37.8'i (n=48) kadın, %62.2'si (n=79) erkektir.

Tüm poliplerin % 41.4'ü (n=36) kadın, %58.6'sı (n=51) erkek olup, polip tipleri arasında kadın-erkek dağılımı açısından anlamlı bir fark saptanmamakla birlikte (p>0.05), AP'lerde erkek predominansı görülürken (% 75 erkek, % 25 kadın), serrated poliplerin erkek ve kadın dağılımının birbirine yakın olduğu (% 53.7 erkek, % 46.3 kadın) dikkati çekmiştir.

SP subtipleri değerlendirildiğinde, HP ve SSA/P'lerin kadınlarda daha sık görüldüğü (% 55.6 kadın, % 44.4 erkek ve % 52.9 kadın, % 47.1 erkek), buna karşın, KSA'ların ve ARA grubun hafif bir erkek predominansı (% 57.9 erkek, % 42.1 kadın ve % 69.2 erkek, % 30.8 kadın) gösterdikleri belirlenmiştir.

Tüm karsinomların % 30'u (n=12) kadın, %70'i (n=28) erkek olup tümör tipleri arasında kadın-erkek dağılımı açısından anlamlı bir fark saptanmamakla birlikte (p>0.05), MüsCA'larda (% 80), KonCA'lardan (% 60) daha belirgin olmak üzere erkek predominansı dikkati çekmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Tüm Olguların Cinsiyete Göre Dağılımları

Tüm olguların demografik verileri Tablo 4.1 ve Tablo 4.2 gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Poliplere ait Demografik Veriler

	<i>AP</i>		<i>HP</i>		<i>SSA</i>		<i>KSA</i>		<i>ARA</i>		<i>Tüm polipler</i>	
	n	%	n	%	n	n	%	%	n	%	n	%
Kadın	5	25	10	55.6	9	36	41.4	52.9	8	42.1	4	30.8
Erkek	15	75	8	44.4	8	51	58.6	47.1	11	57.9	9	69.2
Yaş ≤50	3	15	5	27.8	3	19	21.8	17.6	3	15.8	5	38.5
Yaş >50	17	85	13	72.2	14	68	78.2	82.4	14	84.2	8	61.5
Yaş Ortalaması	58		56		57		59		58		57.6	
Yaş Aralığı	30-77		40-76		45-74		42-73		42-70		30-76	

Tablo 4.2: Karsinomlara ait Demografik Veriler

	<i>KonCA</i>		<i>Müs Ca</i>		<i>Tüm Karsinomlar</i>	
	n	%	N	%	N	%
Kadın	8	40	12	30	4	20
Erkek	12	60	28	70	16	80
≤50	5	25	14	35	9	45
>50	15	75	26	65	11	55
Yaş Ortalaması	51.6		58.1		54.8	
Yaş Aralığı	19-70		31-79		19-79	

4.3. KLİNİKOPATOLOJİK BULGULAR

4.3.1. Lokalizasyon

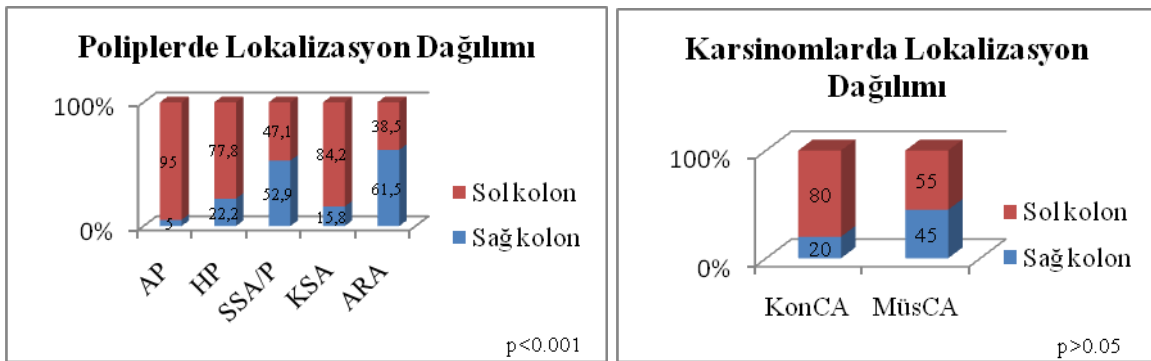
Tüm olguların %29.9'u (n=38) sağ kolon yerleşimli, %70.1'i (n=89) ise sol kolon yerleşimlidir.

Polipler lezyon lokalizasyonu açısından değerlendirildiğinde, % 28.7'sinin (n=25) sağ, %71.3'ünün (n=62) sol kolon yerleşimli olduğu saptanmıştır. Polip tipleri sağ ve sol kolon dağılımı açısından incelendiğinde, AP'lerin %5 (n=1), %95 (n=19); SPlerin %35.8 (n=24), % 64.2 (n=43) sağ ve sol kolonda lokalize oldukları, SP subtipleri incelendiğinde ise HP'lerin %22.2 (n=4), %77.8 (n=14) ; SSA/P'lerin %52.9 (n=9), %47.1 (n=8); KSA'ların %15.8 (n=3), %84.2 (n=16); ARA'ların ise 61.5 (n=8), %38.5 (n=5) sağ ve sol kolon yerleşimli olduğu ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğu gözlenmiştir (p<0.001). Buna göre, AP'lerin büyük oranda sol kolonda yerleştiği, bu grubu

sırasıyla, KSA'ların ve HP'lerin izlediği, ARA ve SSA/P'lerin ise daha çok sağ kolon lokalizasyonu gösterdikleri gözlenmiştir. Polip tipleri incelendiğinde, AP-SSA/P ($p<0.001$), AP-ARA ($p<0.001$), KSA-SSA/P ($p<0.05$), KSA-ARA ($p<0.05$) ve HP-ARA ($p<0.05$) grupları arasında lokalizasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu anlaşılmıştır.

Karsinomlar tümör lokalizasyonu açısından değerlendirildiğinde, tümörlerin %32.5'inin ($n=13$) sağ kolon, % 67.5'inin ($n=27$) sol kolon yerleşimli olduğu saptanmıştır. KonCA'ların %20'sinin ($n=4$) sağ, %80'inin sol; MüsCA'ların ise %45'inin ($n=9$) sağ, %55'inin sol kolon yerleşimli olduğu görülmüş, ikinci grupta sağ kolon yerleşimi belirgin olarak 1. gruptan yüksek olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

AP grubu ile KonCA'lar lokalizasyon açısından değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ($p>0.05$), AP'lerde daha baskın olacak şekilde (%95; % 80), herikisinin de sol kolonda daha sık görüldüğü anlaşılmıştır. Buna karşın, sağ ve sol kolon dağılımı benzer sıklıkta olan MüsCA'larla (%45 sağ, % 55 sol) AP'ler arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p<0.05$) dikkati çekmiştir. Benzer ilişki SP'ler ile KonCA'lar ve MüsCA'lar arasında izlenmektedir; KonCA'larla tüm SP subtiplerinin lokalizasyonları arasında anlamlı fark izlenirken ($p<0.001$), MüsCA'larla yalnızca KSA'lar arasında fark bulunmuş ($p<0.05$), diğerlerinin lokalizasyonu MüsCA'lara benzer özellik göstererek daha çok sağ kolon yerleşimli oldukları dikkati çekmiştir (Şekil 4.5).



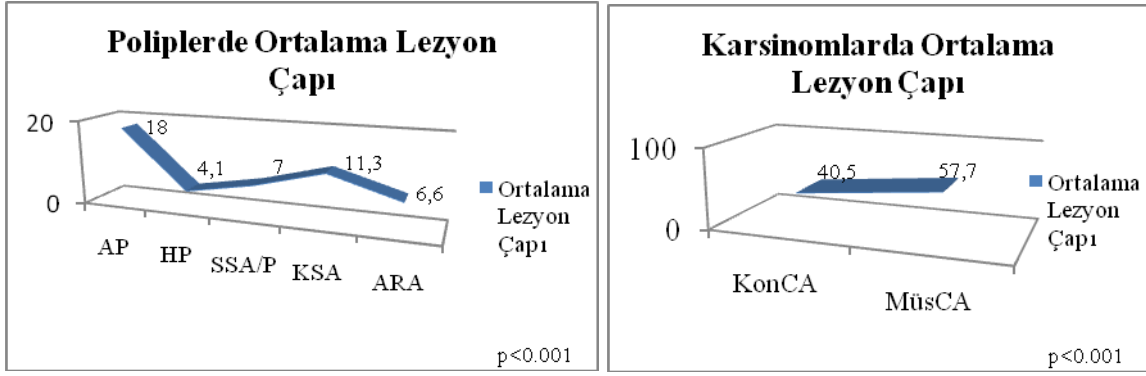
Şekil 4.5: Tüm Olguların Lokalizasyona Göre Dağılımları

4.3.2. Lezyon Çapı

Tüm polipler lezyon çapı açısından değerlendirildiğinde, poliplerin çap ortalamasının 9.81mm, çap aralığının 2-70mm olduğu saptanmıştır. Polip tipleri incelendiğinde çap

ortalamasının AP'lerde 18mm ve SP'lerde 7.37mm olduğu ve AP'lerin istatistiksel olarak anlamlı derecede büyük çapa sahip oldukları anlaşılmıştır ($p<0.001$). SP subtiplerine bakıldığında, en büyük çapın KSA'larda görüldüğü (11.3mm), bu grubu 7mm ile SSA/P, 6.6mm ile ARA grup ve 4.1mm ile HP'lerin izlediği dikkati çekmiştir. Buna göre, HP-SSA/P ($p<0.01$), HP-ARA ($p<0.05$), KSA-HP ($p<0.001$), KSA-SSA/P ($p<0.05$) ve KSA-ARA ($p<0.05$) gruplarının ortalama çapları birbirlerinden anlamlı olarak farklı bulunmuştur.

Tüm karsinomlar lezyon çapı açısından değerlendirildiğinde, tümörlerin çap ortalamasının 49.07mm ve çap aralığının 20-80mm olduğu saptanmıştır. Karsinom subtipleri incelendiğinde, KonCA'nın 40.5mm, MüsCA'nın ise 57.7mm ortalama çapa sahip olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Tüm Olguların Ortalama Lezyon Çapına Göre Dağılımları

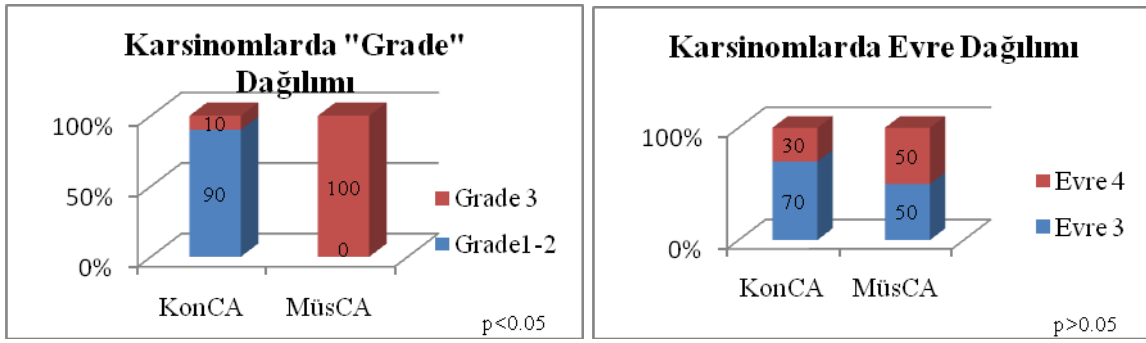
4.3.3. “Grade” ve Evre

Karsinomların % 45'i (n=18) grade 1-2 (2 olgu grade 1; 16 olgu grade 2), % 55'i (n=22) grade 3 olarak değerlendirilmiş, %60'ı (n=24) evre 3, %40 (n=16) evre 4 olarak prezente olmuştur.

Grade 1-2 tümörlerin % 61'i (n=11) erkek, % 39'u (n=7) kadın, %72'si (n=13) >50 yaş ve %28'i (n= 5) ≤ 50 yaş, %83'ü (n=15) sol kolon ve %17'si (n=3) sağ kolon yerleşimli oldukları, ortalama çapın 41.3 mm olduğu saptanmıştır. Buna karşın grade 3 tümörlerin %77'si (n=17) erkek, %23'ü (n=5) kadın, %59 'u (n=13) > 50 yaş, %41'i (n=9) ≤ 50 yaş, %54.5'i (n=12) sol kolon, %45.5'i (n=10) sağ kolon yerleşimli ve ortalama çapın 55.4 mm olduğu gözlenmiştir.

Evre 3 tümörlerin %62.5'i (n=15) erkek, %37.5'i (n=9) kadın, %62.5'i (n=15) >50 yaş, %37.5'i (n=9)) ≤ 50 yaş, %70.8'i (n=17) sol kolon, %29.2'si (n=7) sağ kolon yerleşimli ortalama çapın 50.75 mm olduğu saptanmıştır. Buna karşın evre 4 tümörlerin %81'i (n=13) erkek, %19'u (n=3) kadın, %68.7'si (n=11) >50 yaş, %31.3'ü (n=5) ≤ 50 yaş, %62.5'i (n=10) sol kolon, %37.5'i (n=6) sağ kolon yerleşimli ve ortalama çapın 46.5 mm olduğu saptanmıştır

Evre 3 tümörlerin %54.2'si (n= 13) grade 1-2, %45.8'i (n=11) grade 3 ve evre 4 tümörlerin %31.25'i (n=5) grade 1-2, %68.75'i (n=11) grade 3 olarak değerlendirilmiştir. Karsinomların grade ve evreye göre dağılımları ve diğer klinikopatolojik bulgular açısından istatistiksel olarak anlamlı fark göstermedikleri anlaşılmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Karsinomların “Grade” ve Evre’ye Göre Dağılımı

Tüm olgulara ait klinikopatolojik veriler Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Poliplere ait Klinikopatolojik Veriler

	<i>AP</i>		<i>HP</i>		<i>SSA</i>		<i>KSA</i>		<i>ARA</i>		<i>Tüm polipler</i>	
	n	%	n	%	n	n	%	%	n	%	n	%
Sağ kolon	1	5	4	22.2	9	25	28.7	52.9	3	15.8	8	61.5
Sol kolon	19	95	14	77.8	8	62	71.3	47.1	16	84.2	5	38.5
Lezyon Çapı Ort./Med (mm)	18/17		4.1/4		7/7		11.3/10		6.6/6		9.8/10	

Tablo 4.4: Karsinomlara ait Klinikopatolojik Veriler

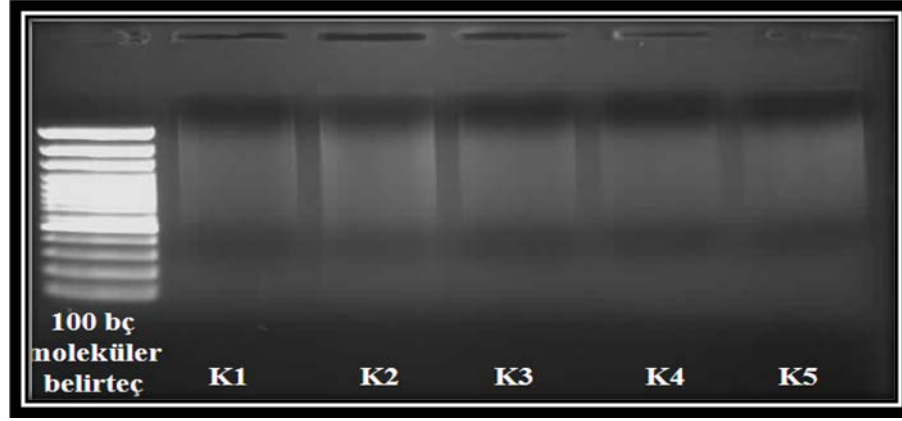
	<i>KonCA</i>		<i>MüsCa</i>		<i>Tüm Karsinomlar</i>	
	n	%	N	%	N	%
Sağ kolon	4	20	9	45	13	27.5
Sol kolon	16	80	11	55	27	67.5
Grade 1 ve 2	18	90	0	0	18	45
Grade 3	2	10	20	100	22	55
Evre 3	14	70	10	50	24	60
Evre 4	6	30	10	50	16	40
Lezyon Çapı Ort./Med (mm)	40.5/39.5		57.7/55		49.1/47.25	

4.4. MOLEKÜLER BULGULAR

4.4.1. DNA İzolasyonu ve Spektrofotometrik Analiz

Tüm olgulardan metodolojide özetlendiği şekilde izole edilen DNA'nın kalitesi agaroz jel elektroforezi, miktarı ise spektrofotometrik analiz ile değerlendirilmiş ve tüm örnekler için DNA'nın mutasyon analizine uygun kalite ve miktarda olduğu anlaşılmıştır.

Agaroz jel elektroforezi sonucunda genomik DNA'nın intakt olduğunu anlayabilmek için jelde tek bant izlenmesi gerekmektedir. Ancak formalinde fikse edilmiş parafine gömülü dokulardan elde edilen DNA, degrade olduğundan tek bant izlemek mümkün olamamaktadır. Bu nedenle parafin dokulardan yapılan izolasyonlarda degregasyonun derecesi dikkate alınarak, tüm olgularda izole edilen DNA'larda 100 baz çiftlik merdiven ("ladder) moleküler marker olarak kullanılmış ve degrade DNA'nın hangi aralıkta DNA fragmanları içerdiği belirlenmiştir. Bu şekilde değerlendirilen izole edilmiş DNA'lara ait temsili agaroz jel görüntüsü Şekil 4.8 'de sunulmuştur.



Şekil 4.8: İzole edilen DNA Örneklerine Ait Temsili Agaroz Jel Fotoğrafları

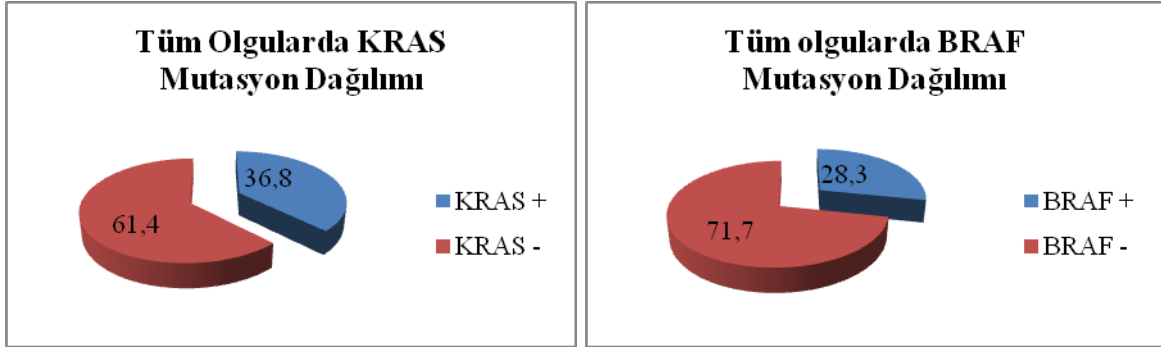
Nanodrop sonuçlarına göre karsinomlar ile poliplerin DNA konsantrasyonları karşılaştırıldığında, poliplerin DNA konsantrasyonlarının çok daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durumun nedeni, poliplerde DNA'nın çok küçük biopsi materyallerinden izole edilmiş olmasıdır. DNA saflığı açısından değerlendirildiğinde örneklerin 260/280 oranlarının istenen aralıklarda olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: İzole edilen DNA'lara ait temsili spektrofotometre sonuçları

Örnek no	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
K1	419.76	8.395	6.802	1.23	0.55
K2	330.08	6.602	5.578	1.18	0.47
K3	484.80	9.694	7.719	1.26	0.61
K4	669.52	13.390	9.550	1.40	0.53
K5	193.37	3.867	2.070	1.87	2.16
M10	148.69	2.974	1.736	1.71	1.52
M12	163.80	3.276	1.768	1.85	2.29
M15	304.43	6.089	3.212	1.90	2.32
SSA1	78.63	1.573	0.767	2.05	1.44
SSA2	67.21	1.344	0.647	2.08	1.26
SSA3	32.02	0.640	0.288	2.22	0.89
SSA4	20.19	0.404	0.202	2.00	0.58
HP7	22.00	0.440	0.216	2.04	0.83
AP11	59.98	1.200	0.562	2.14	1.22

4.4.2. Mutasyon Analizi Sonuçları

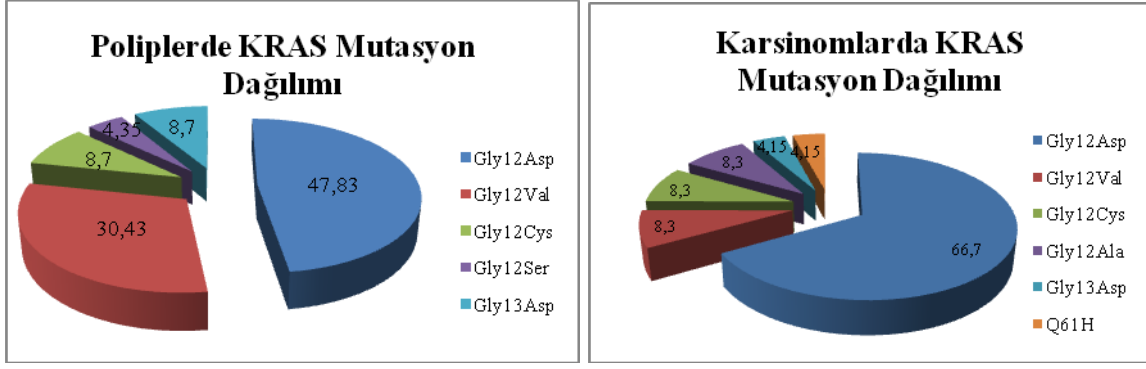
Tüm olguların % 38.6'sinin (n=49) KRAS mutasyonu taşıdığı, % 61.4'ünün (n=78) yabanıl tip olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde, olguların % 28.3'ü (n=36) BRAF mutasyonu taşıırken, % 71.7'sinin (n=91) yabanıl tip olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Tüm Olguların KRAS ve BRAF Mutasyon Dağılımları

4.4.2.1. KRAS Mutasyon Analiz Sonuçları

Tüm polipler KRAS mutasyonu açısından değerlendirildiğinde, % 25.3'ünde (n=22) KRAS mutasyonu izlenirken, %74.7'sinde (n=65) KRAS mutasyonu saptanmamıştır. Pirosekanslama ile KRAS mutasyon analizi yapılan 87 öncü lezyonun %26.44'ünde (n=23) KRAS ekzon 2 mutasyonu saptanmış olup, bu mutasyonların dağılımına bakıldığında %91.3'ünün (n=21) kodon 12 üzerinde olduğu ve Glisin ile Aspartat (Gly12Asp: %47.83, n=11), Glisin ile Valin (Gly12Val: %30.43, n=7), Glisin ile Sistein (Gly12Cys: %8.7, n=2) ve Glisin ile Serin (Gly12Ser: %4.35, n=1) arasında yer değiştirme şeklinde nokta mutasyonu olduğu, %8.7'sinin (n=2) kodon 13 üzerinde ve Glisin ile Aspartat arasında yer değiştirme (Gly13Asp: %100, n=2) şeklinde nokta mutasyonu olduğu gözlenmiştir. Ancak öncü lezyonların hiçbirinde KRAS ekzon 3 kodon 61 mutasyonu saptanmamıştır (Şekil 4.10). Poliplerin iki alt grubu olan AP ve SP'ler KRAS mutasyonu açısından karşılaştırıldığında, AP'lerin %55'inin (n=11), SP'lerin %16.4'ünün (n=11) KRAS mutasyonu taşıdığı ve KRAS mutasyonunun AP'lerde anlamlı olarak daha yüksek oranda görüldüğü anlaşılmıştır (p<0.001).



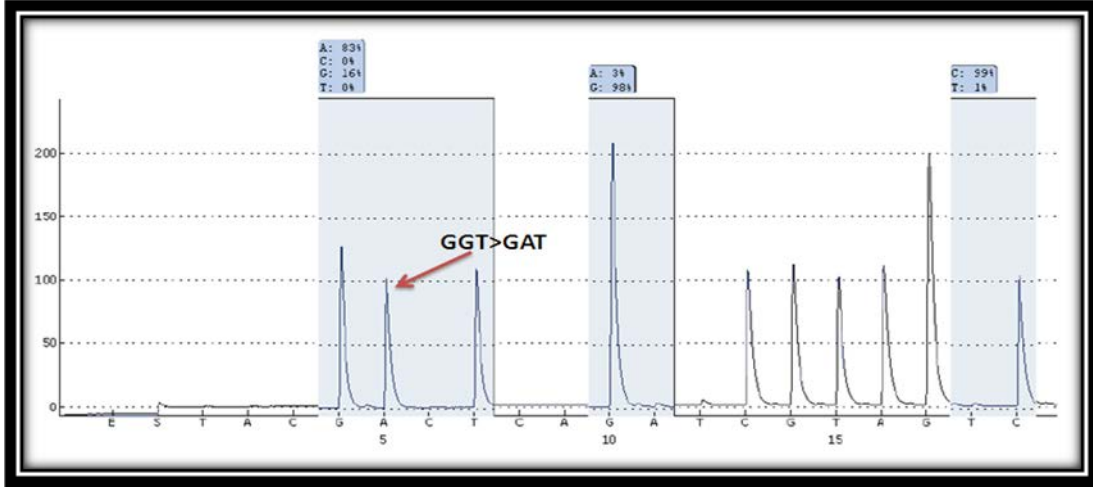
Şekil 4.10: Tüm olgulara ait KRAS Mutasyon Tiplerinin Dağılımı

SP'lerin subtipleri değerlendirildiğinde, SSA/P'lerin %17.6'sında (n=3), KSA'ların %36.8'inde (n=7), ARA'ların %7.7'sinde (n=1) KRAS mutasyonu saptanmış, HP'lerin hiçbirinde mutasyon izlenmemiş ve gruplar arasındaki KRAS mutasyon sonuçları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p < 0.001$). Polip subtipleri incelendiğinde, AP-SSA/P ($p < 0.05$), AP-ARA ($p < 0.05$) ve KSA-HP ($p < 0.001$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu anlaşılmıştır. KRAS mutasyonunun en yüksek oranda AP'lerde, dah sonra sırasıyla KSA, SSA/P ve ARA gruplarında görüldüğü, ilginç olarak HP grubunda mutasyon bulunmadığı anlaşılmıştır.

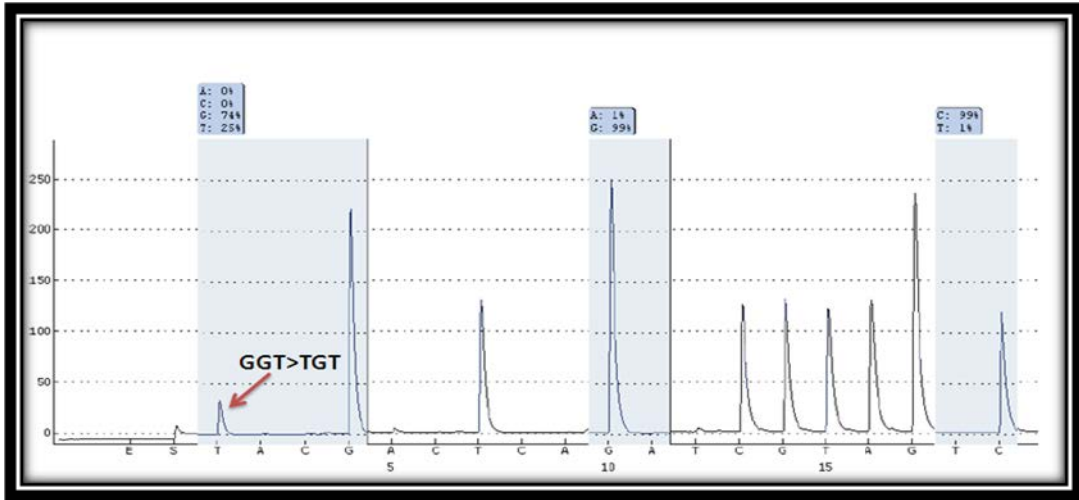
Öncü lezyonlarda kodon 12,13 ve 61 mutasyonlarının dağılımı Tablo 4.6'da ve bazılarına ait pirosekanslama sonuçları Şekil 4.11-12-13'de gösterilmiştir.

Tablo 4.6: Poliplerde KRAS mutasyonlarının gruplara göre dağılımı

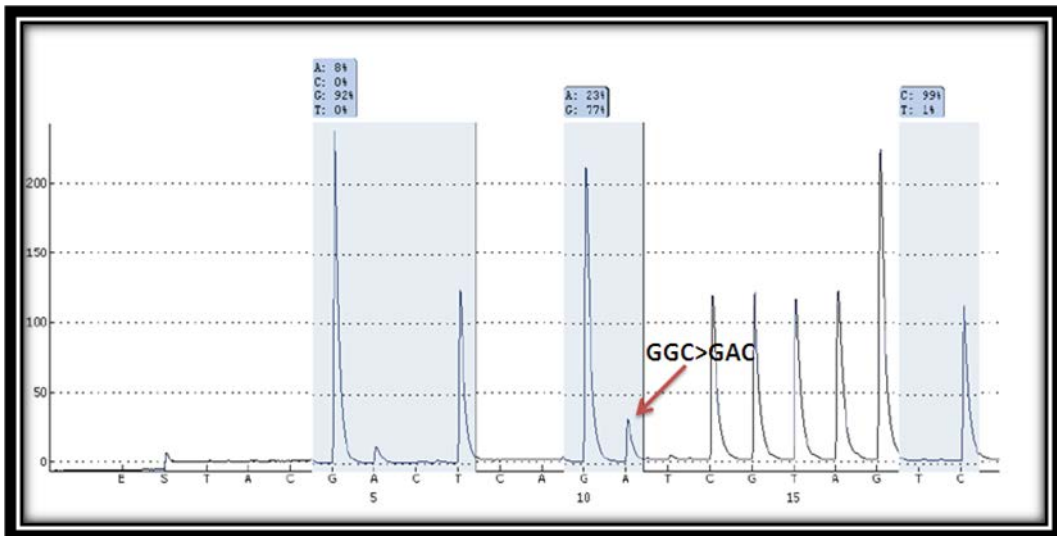
Gruplar	Ekzon 2, kodon 12 ve 13(n)					Ekzon 3, kodon 61(n)		
	Gly12Asp	Gly12Val	Gly12Cys	Gly12Ser	Gly13Asp	Yabani	Q61H	Yabani
AP (n=20)	3	4	2	1	2	9	-	20
HP (n=18)	-	-	-	-	-	18	-	18
SSA/P (n=17)	2	1	-	-	-	14	-	17
KSA (n=19)	5	2	-	-	-	12	-	19
ARA (n=13)	1	-	-	-	-	12	-	13
Tüm polipler (n=87)	11	7	2	1	1	65	-	87



Şekil 4.11: Öncü lezyonlara ait KRAS geni, ekzon 2’de Gly12Asp mutasyonu



Şekil 4.12: Öncü lezyonlara ait KRAS geni, ekzon 2’de Gly12Cys mutasyonu



Şekil 4.13: Öncü lezyonlara ait KRAS geni, ekzon 2’de Gly13Asp mutasyonu

Tüm öncü lezyonlar yaş ve KRAS mutasyon dağılımı açısından değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ($p>0.05$), KRAS mutasyonu >50 yaş olgularda (%29.4; $n=20$), ≤ 50 yaş olgulara göre (%10.5; $n=2$) daha yüksek oranda izlenmiştir.

Tüm polipler cinsiyet ve KRAS mutasyon dağılımı açısından değerlendirildiğinde, KRAS mutasyonu gösteren poliplerin %27.5'inin erkek ($n=14$), %22.2'sinin kadın ($n=8$) hastalara ait olduğu ve olgular arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

Polipler lokalizasyon ve KRAS mutasyon dağılımı açısından değerlendirildiğinde, KRAS mutasyonu gösteren poliplerin %12'sinin ($n=3$) sağ kolon, %30.6'sının ($n=19$) sol kolon yerleşimli olduğu görülmüş, ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tüm polipler lezyon çapı ve KRAS mutasyon dağılımı açısından değerlendirildiğinde, KRAS mutasyonu gösteren poliplerin ($n=22$), yabancı tip olan poliplere göre daha büyük çaplı oldukları (12.81mm; 8.8mm) ve iki grup arasındaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlaşılmıştır ($p<0.001$).

KRAS mutasyonu gösteren 11 AP'in %90.9'unun >50 yaş olduğu, %72.7'sinin erkek hasta olduğu, %81.8'inin sol kolonda lokalize olduğu ve ortalama çaplarının 15.1mm olduğu gözlenmiştir. KRAS mutasyonu olan 7 KSA'nın %85.7'sinin >50 yaş, %57.3'ünün kadın, %71.4'ünün sol kolonda lokalize olduğu ve ortalama çaplarının 8.86mm olduğu belirlenmiştir. SSA/P'lerin 3'ünün KRAS mutasyonu gösterdiği, bunların tümünün 50 yaş üstü, %66.7'sinin erkek, %66.7'sinin sol kolonda lokalize olduğu, ortalama çapın 6.3mm olduğu gözlenmiştir. ARA grubunda KRAS mutasyonu gösteren 1 olgunun erkek, 50 yaş üstü olduğu ve polibin solda lokalize, 2mm çaplı olduğu görülmüştür.

Karsinomlar pirosekanslama ve real time PCR ile KRAS mutasyonu açısından değerlendirildiğinde, tümörlerin %67.5'inde ($n=27$) KRAS mutasyonu izlenirken %32.5'inde ($n=13$) KRAS mutasyonu saptanmamıştır. Her iki yöntemle yapılan incelemede hemen tümüyle KRAS ekzon 2, kodon 12 ya da 13 mutasyonları saptanırken, yalnızca 1 olguda (%2.5) KRAS ekzon 3 kodon 61 mutasyonu saptanmıştır. Ancak bu mutasyon yalnız pirosekanslama ile ortaya konabilmiş, real time PCR ile saptanamamıştır.

Bu mutasyonların dağılımına bakıldığında, %96'sının ($n=24$) kodon 12 ve 13 üzerinde olduğu, %4'ünün ($n=1$) ekzon 3 kodon 61'de yer aldığı görülmüştür. Bunların, Glisin ile

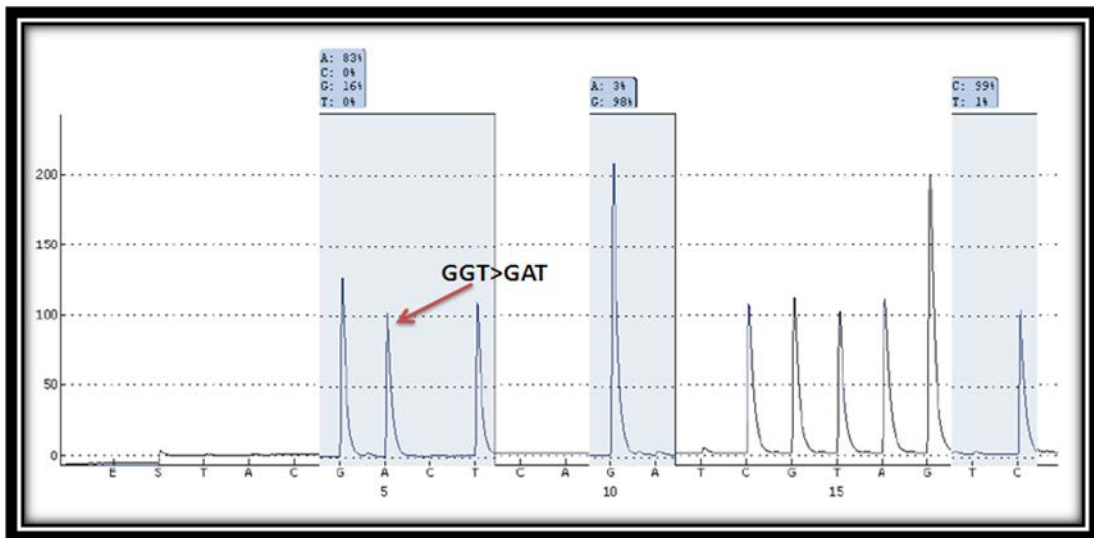
Aspartat (Gly12Asp: %66.7, n=16), Glisin ile Valin (Gly12Val: %8.3, n=2), Glisin ile Sistein (Gly12Cys: %8.3, n=2) ve Glisin ile Alanin (Gly12Ala: %8.3, n=2) arasında yer değiştirme şeklinde nokta mutasyonu olduğu, %4.15'inin (n=1) kodon 13 üzerinde ve Glisin ile Aspartat arasında yer değiştirme (Gly13Asp) şeklinde nokta mutasyonu olduğu gözlenmiş, %4.15'inin (n=1) kodon 61 de yer aldığı ve Glutamin ile Histidin arasında yer değiştirme (Gln61His: Q61H) şeklinde olduğu saptanmıştır (şekil 4.10). KRAS mutasyonu, KonCA'larda (%85; n=17), MüsCA'lara göre (%50; n=10) anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (p<0.05).

Karsinom olgularına ait KRAS geni, kodon 12,13 ve 61 mutasyonlarının dağılımı Tablo 4.7'de ve bazılarına ait pirosekanslama ve real time PCR sonuçları şekil 4.14-15-16-17-18'de gösterilmiştir.

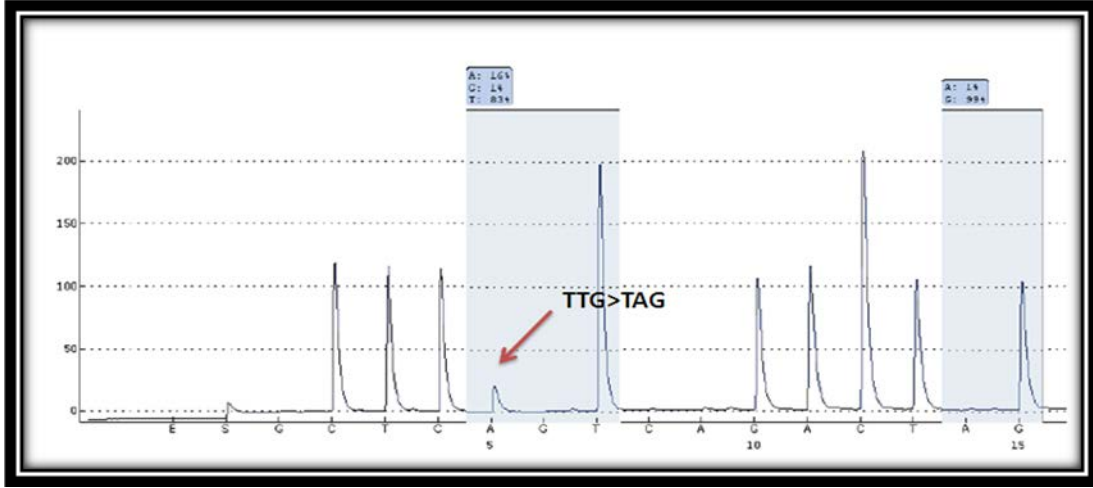
Tablo 4.7: Karsinomlarda KRAS mutasyonlarının gruplara göre dağılımı

<i>Gruplar</i>	<i>Ekzon 2, kodon 12 ve 13 (n)</i>						<i>Ekzon 3, kodon 61(n)</i>	
	Gly12Asp	Gly12Val	Gly12Cys	Gly12Ala	Gly13Asp	Yabanił	Q61H	Yabanił
<i>KonCA (n=20)</i>	9	2	1	2	1	5	0	20
<i>MüsCA (n=20)</i>	7	-	1	1	-	11	1*	19
<i>Tüm Karsinomlar (n=40)</i>	16	2	2	3	1	16	1	39

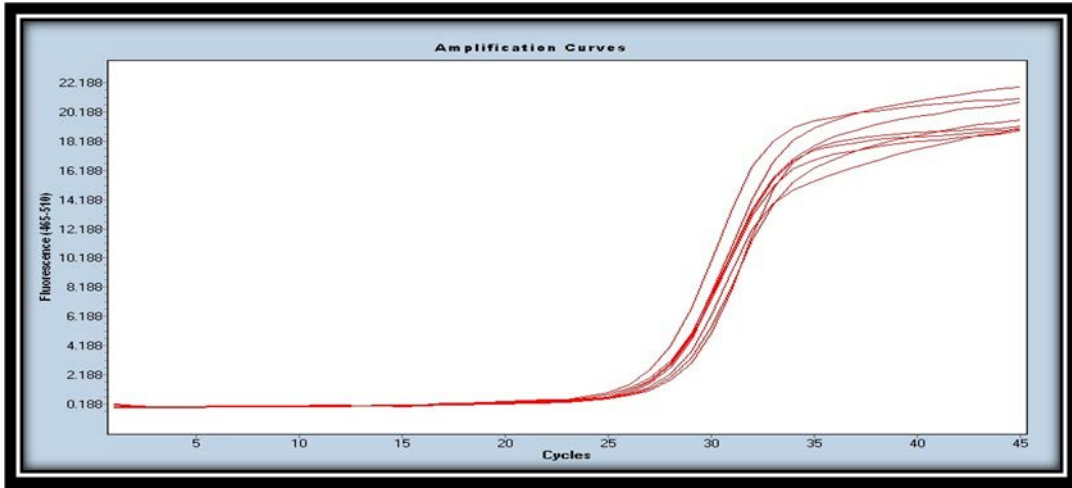
* Real time PCR ile saptanamayan mutasyon



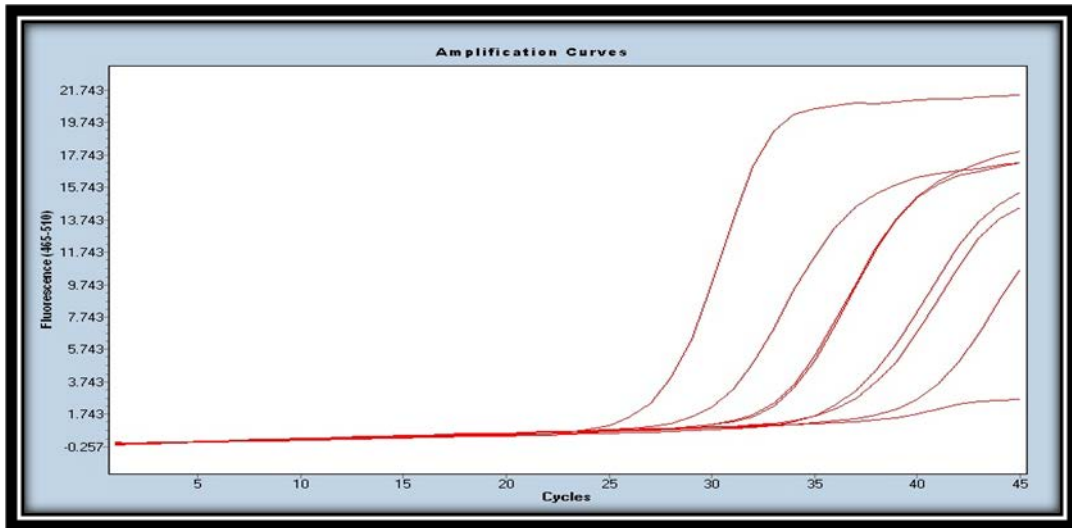
şekil 4.14: Karsinomlara ait KRAS geni, ekzon 2'de Gly12Asp mutasyonu



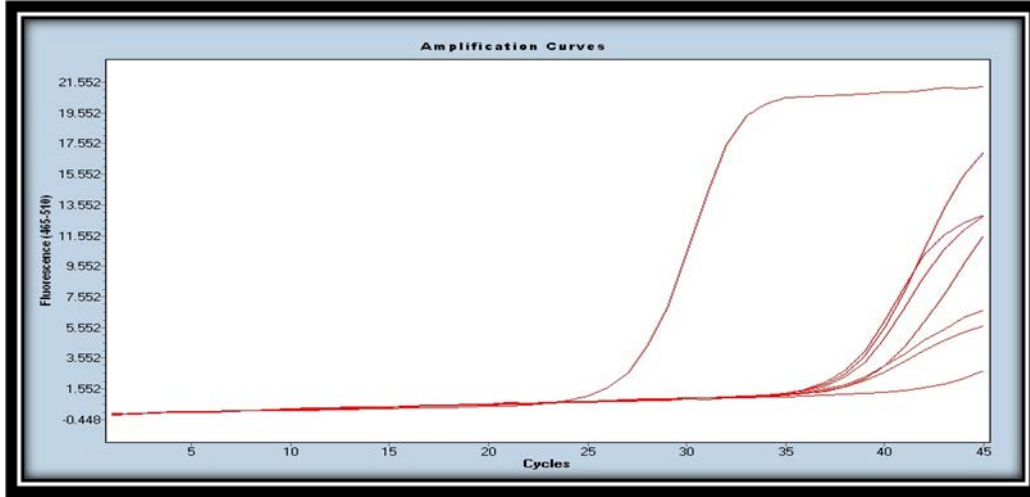
Şekil 4.15: Karsinomlara ait KRAS geni, ekzon 3'de Q61H (Gln61His) mutasyonu



Şekil 4.16: Pozitif kontrollere ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.17: KRAS mutasyonu taşıyan bir karsinoma ait amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.18: KRAS yabanıl tip bir karsinoma ait amplifikasyon eğrisi

KRAS mutasyonu gösteren 27 karsinom olgusunun %70.4'ünün erkek, % 63'ünün >50 yaş, % 63'ünün KonCA, % 55.6'sının grade1/2, % 55.6 sının evre 3 olduğu belirlenmiştir.

Karsinomlar yaş ve KRAS mutasyon dağılımı açısından değerlendirildiğinde, ≤50 yaş olguların %71.4'ünde (n=10), >50 yaş olguların %65.4'ünde (n=17) KRAS mutasyonu izlenmiş, yaş grupları arasında KRAS mutasyon dağılımı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05).

Karsinom olguları cinsiyet ve KRAS mutasyon dağılımı açısından değerlendirildiğinde, erkek olguların %67.9'unda (n=19), kadın olguların %66.7'sinde (n=8) KRAS mutasyonu izlenmiş ve gruplar arasında benzer KRAS mutasyon dağılımı bulunduğu anlaşılmıştır.

Tüm karsinomlar lokalizasyon ve KRAS mutasyon dağılımı açısından değerlendirildiğinde, sağ kolon yerleşimli olanlarda (%53.8; n=7), sol kolon yerleşimli olanlara göre (%74.1; n=20) istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha düşük oranda KRAS mutasyonu izlenmiştir (p>0.05).

Tüm karsinomlar tümör çapı ve KRAS mutasyon dağılımı açısından değerlendirildiğinde, mutasyon taşıyan olguların (n=27), ortalama çapıyla (49mm), yabanıl tip olguların (n=13) ortalama çapının (49.23mm) benzer olduğu ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı anlaşılmıştır (p>0.05).

Karsinomların grade'ine göre KRAS mutasyon dağılımı değerlendirildiğinde, “grade” 1 ve 2 tümörlerin %72.3'ünde, “grade” 3 tümörlerinse %63.7'sinde KRAS mutasyonu izlenmiş olup, “grade” açısından KRAS mutasyon dağılımında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Tüm karsinomlar evre ve KRAS mutasyon dağılımı açısından değerlendirildiğinde evre 3 tümörlerin %70.8'inde ($n=17$), evre 4 tümörlerin %62.5'inde ($n=10$) KRAS mutasyonu izlenmiş olup, evre açısından KRAS mutasyon dağılımında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Tüm polipler ve karsinomlar KRAS mutasyonu açısından karşılaştırıldığında, poliplerin %25.3'ünün ($n=22$), karsinomların ise %67.5'inin ($n=27$) KRAS mutasyonu taşıdığı ve iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlaşılmıştır ($p<0.001$). Tümör tipleri ile polipler karşılaştırıldığında, KonCA'ların %85'inin ($n=17$), MüsCA'ların %50'sinin ($n=10$) KRAS mutasyonu taşıdığı ve her iki tümör grubunun da poliplerden (%25.3; $n=22$) istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek mutasyon gösterdikleri ($p<0.001$ ve $p<0.05$, sırasıyla) dikkati çekmiştir.

Öncü lezyonlar içinde AP'lerin %55'inin ($n=11$), SP'lerin ise %16.4'ünün ($n=11$), KRAS mutasyonu taşıdığı izlenmiş ve bu değerlerin karsinomlardaki (%67.5; $n=27$) mutasyon oranından düşük olduğu, ancak bu farkın AP'ler için istatistiksel anlamı olmadığı ($p>0.05$), buna karşın SP'ler için anlamlı fark bulunduğu gözlenmiştir ($p<0.001$).

SP subtipleri incelendiğinde, HP'lerin hiçbirinde KRAS mutasyonu saptanmamış, buna karşın, SSA/P'lerin %17.6'sının ($n=3$), KSA'ların %36.8'inin ($n=7$), ARA'ların %7.7'sinin ($n=1$) KRAS mutasyonu gösterdiği ve bu oranların karsinomlara göre istatistiksel olarak anlamlı düşük düzeylerde olduğu (HP için $p<0.001$; SSA/P için $p<0.001$; KSA için $p<0.05$; ARA için $p<0.001$) anlaşılmıştır.

KRAS mutasyonu karsinom subtiplerinde tüm polip subtiplerine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). KRAS mutasyonu AP'lerde % 55, KonCA'larda % 85 oranında görülürken, SP'lerin % 16.4'ü, MüsCA'ların % 50'si mutant bulunmuştur. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermiştir ($p<0.05$ ve $p<0.001$). Gruplar tek tek karşılaştırıldığında, AP-KonCA ($p<0.05$), KSA-KonCA ($p<0.05$), HP-KonCA ($p<0.001$), HP-MüsCA ($p<0.001$), SSA/P-KonCA ($p<0.001$), SSA/P- MüsCA

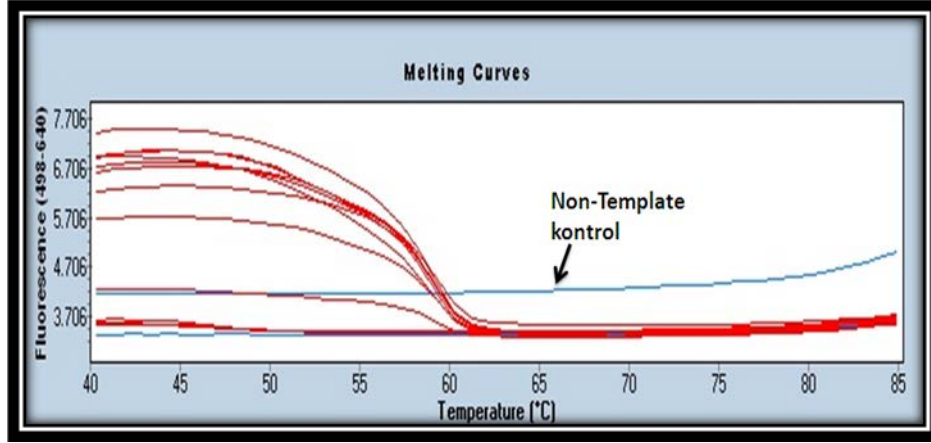
($p < 0.05$), ARA-KonCA ($p < 0.001$), ARA-MüsCA ($p < 0.05$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu anlaşılmıştır.

4.4.2.2. BRAF Mutasyon Analiz Sonuçları

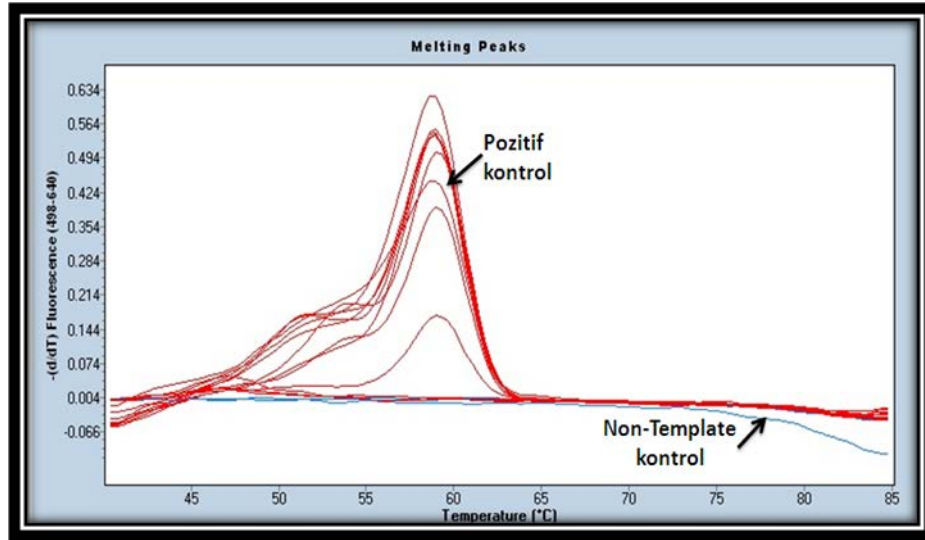
Tüm polipler BRAF mutasyonu açısından değerlendirildiğinde, % 40.2'sinde ($n=35$) BRAF ekzon 15, V600E mutasyonu izlenirken, %59.8'inde ($n=52$) BRAF mutasyonu saptanmamıştır. Poliplerin iki alt grubu olan AP ve SP, BRAF mutasyonu açısından karşılaştırıldığında, SP'lerin %52.2'sinin ($n=35$) BRAF mutasyonu taşıdığı, AP'lerin ise hiçbirinin BRAF mutasyonu taşımadığı izlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Bu mutasyonların SP subtipleri arasındaki dağılımına bakıldığında, SSA/P'lerin %64.7 ($n=11$) ile ilk sırada yer aldığı, bu grubu %61.5 ($n=8$) ile ARA, %61.1 ($n=11$) ile HP'lerin ve %26.3 ile ($n=5$) KSA'ların izlediği ve gruplar arasında BRAF mutasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu anlaşılmıştır ($p < 0.001$). BRAF mutasyonu açısından polip tipleri arasındaki ilişkiye bakıldığında, AP-KSA ($p < 0.05$), AP-HP ($p < 0.05$), AP-SSA/P ($p < 0.001$), AP-ARA ($p < 0.001$), KSA-HP ($p < 0.05$), KSA-SSA/P ($p < 0.05$) ve KSA-ARA ($p < 0.05$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu dikkati çekmiştir. Poliplere ait mutasyon dağılımı Tablo 4.8'de ve real time PCR sonuçlarına ilişkin melting grafikleri Şekil 4.19-20'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8: Poliplere ait BRAF mutasyonlarının gruplara göre dağılımı

<i>Gruplar</i>	<i>Ekzon 15, kodon 600</i>	
	<i>V600E</i>	<i>Yabani</i>
<i>AP (n=20)</i>	0	20
<i>HP (n=18)</i>	11	7
<i>SSA/P (n=17)</i>	11	6
<i>KSA (n=19)</i>	5	14
<i>ARA (n=13)</i>	8	5
<i>Tüm Polipler (n=87)</i>	35	52



Şekil 4.19: BRAF V600E (Val600Glu) mutasyon analizi yapılan örneklerden bazılarına ait melting curve eğrileri



Şekil 4.20: BRAF mutasyon analizi yapılan örneklerden bazılarının melting pikleri

BRAF mutasyonu gösteren 5 KSA'un %60'ı erkek, % 80'i 50 yaş üstü, tümü sol kolonda lokalize olup, ortalama çap 14.4mm olarak saptanmıştır. BRAF mutant olan 11 HP'nin % 54.5'i erkek, 54.5'i >50yaş, %72.7'si kolonda lokalize olup, ortalama çap 4.8mm olarak bulunmuştur. SSA/P grubunda ise % 45.4 olgunun erkek, % 81.8'inin >50 yaş, % 54.5'inin sol kolonda lokalize olduğu ve ortalama çapın 8mm olarak ölçüldüğü gözlenmiştir. ARA grupta BRAF mutasyonu olan 8 olgunun, % 62.5'u erkek, % 62.5'u >50yaş olup, sağ ve sol kolon lokalizasyonu eşit oranda gözlenmiş, ortalama çapın 6.25mm olduğu belirlenmiştir.

Polipler yaş ve BRAF mutasyon dağılımı açısından değerlendirildiğinde, ≤50 yaş olguların %57.9'unda (n=11), >50 yaş olguların %35.3'ünde (n=24) BRAF mutasyonu izlenmiş,

genç hastalarda daha yüksek oranda BRAF mutasyonu saptanmasına karşın, yaş grupları arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tüm polipler cinsiyet ve BRAF mutasyon dağılımı açısından değerlendirildiğinde, erkeklerin %37.3'ünde ($n=19$), kadınların %44.4'ünde ($n=16$) BRAF mutasyonu izlenmiş olup, cinsiyete göre BRAF mutasyon dağılımı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Polipler lokalizasyon ve BRAF mutasyon dağılımı açısından değerlendirildiğinde, sağ kolon yerleşimli olanların %48'inde ($n=12$), sol kolon yerleşimli olanların %37.1'inde ($n=23$) BRAF mutasyonu izlenmiş ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

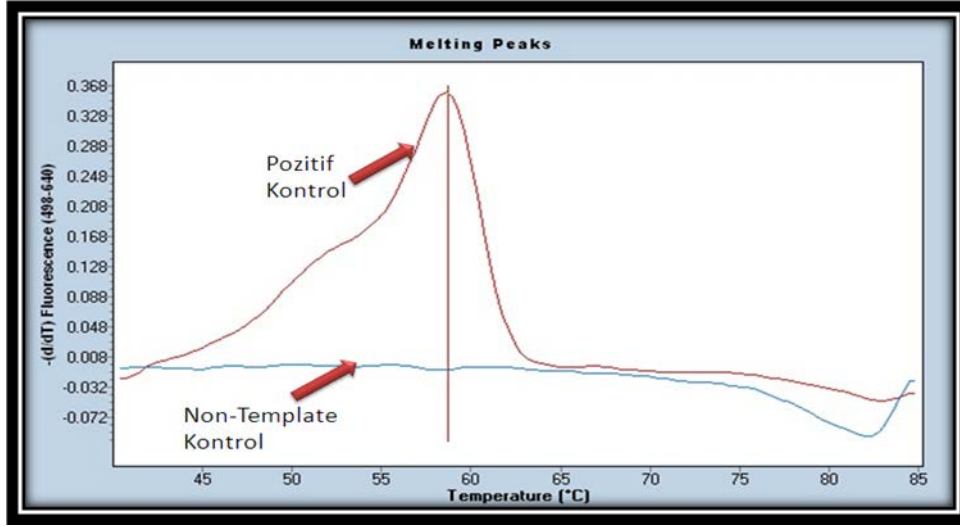
Polipler lezyon çapı ve BRAF mutasyon dağılımı açısından değerlendirildiğinde, mutasyon taşıyan olguların ortalama çapının 7.11 mm ($n=35$), yabanıl tip olguların ortalama çapının 11.63 mm ($n=52$) olduğu ve daha küçük çaplı poliplerde BRAF mutasyonun sıklığının büyük çaplı poliplerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu anlaşılmıştır ($p<0.05$).

Karsinomların yalnızca birinde (%2.5) BRAF mutasyonu izlenmiş, % 97.5'inde ($n=39$) BRAF mutasyonu saptanmamıştır. BRAF mutasyon analizi yapılan 40 kolorektal karsinom olgusundan mutasyon saptanan 1 olguda real time PCR ile BRAF ekzon 15, V600E mutasyonu bulunduğu gösterilmiştir. Mutasyon taşıyan bu olgu, MüsCA grubunda yer almaktadır. KonCA'ların hiçbirinde BRAF mutasyonu saptanmamış ve bir grupta hiç örnek olmaması nedeniyle gruplar arasında sağlıklı istatistiksel analiz yapılamamıştır.

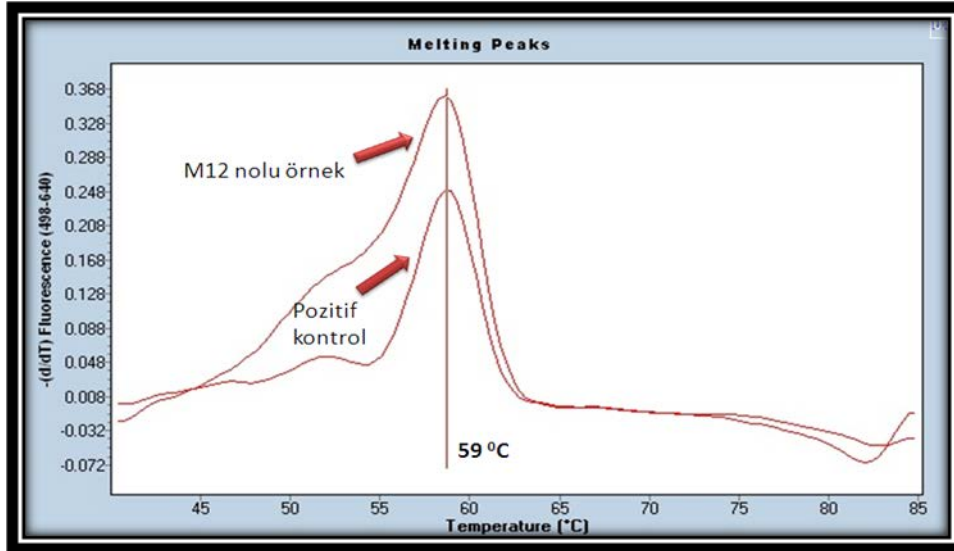
Karsinomlara ait BRAF V600E mutasyon dağılımı Tablo 4.9'da ve Real time PCR analizinin pozitif ve negatif kontrolünü gösteren temsili melting grafiği Şekil 4.21-22'de gösterilmiştir.

Tablo 4.9: Karsinomlara ait BRAF mutasyonlarının gruplara göre dağılımı

<i>Gruplar</i>	<i>Ekzon 15, V600E</i>	
	V600E	Yabanıl
<i>KonCA (n=20)</i>	0	20
<i>MüsCA (n=20)</i>	1	19
<i>Tüm Karsinomlar (n=40)</i>	1	39



Şekil 4.21: Pozitif ve Negatif (Non-template) kontrolleri gösteren melting grafiği



Şekil 4.22: BRAF geni V600E mutasyonu taşıyan M12 nolu karsinoma ait melting eğrisi

BRAF mutasyonu gösteren bir karsinom olgusunun >50 yaş, erkek hasta olduğu gözlenmiş, tümörün sağ kolonda lokalize, 50mm çapa sahip olduğu anlaşılmıştır. BRAF mutasyonu gösteren bu olgu, grade 3, evre 4 bir müsinöz adenokarsinomdur.

Tüm polipler ve karsinomlar BRAF mutasyonu açısından karşılaştırıldığında, poliplerin %40.2'sinin (n=35), karsinomların %2.5'inin (n=1) BRAF mutasyonu taşıdığı izlenmiş ve iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

BRAF mutasyonu AP'lerde ve KonCA'larda saptanmazken, SP'lerin % 52.2'si, MüsCA'ların % 5'i mutant bulunmuştur. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermiştir ($p<0.001$).

SP'lerin subtipleri ile karsinomlar ele alındığında HP'lerin %61.1'inin ($n=11$), SSA/P'lerin %64.7'sinin ($n=11$), KSA'ların %26.3'ünün ($n=5$), ARA'ların %61.5'inin ($n=8$) BRAF mutasyonu gösterdiği ve bu oranların karsinomlara göre istatistiksel olarak belirgin yüksek düzeylerde olduğu (HP için ($p<0.001$), SSA/P için $p<0.001$, KSA için $p<0.05$, ve ARA için $p<0.001$) anlaşılmıştır.

Polip tipleri ile karsinom tipleri BRAF mutasyonu açısından karşılaştırıldığında her iki gruba ait alt tipler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). BRAF mutasyonu açısından polip tipleri ile karsinom tipleri arasındaki dağılıma bakıldığında, KonCA ile KSA ($p<0.05$), HP ($p<0.001$), SSA/P ($p<0.001$), ARA ($p<0.001$) arasında ve MüsCA ile HP ($p<0.001$), SSA/P ($p<0.001$), ARA ($p<0.001$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu anlaşılmıştır.

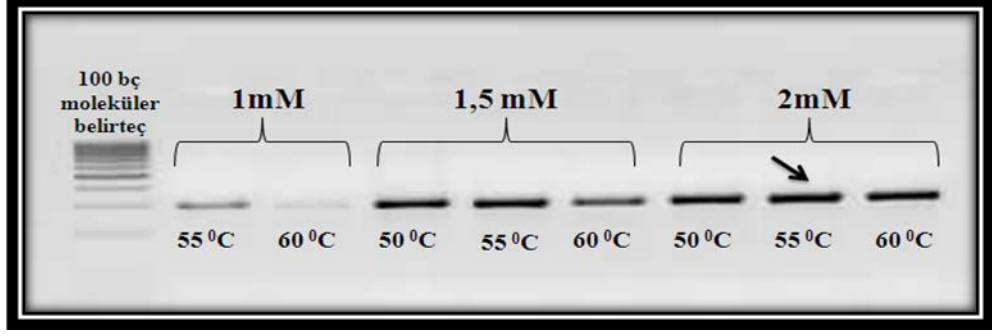
Direkt sekanslama ile BRAF ekzon 15 dizi analizi yapılan 15 öncü lezyon ve 5 kolorektal karsinomun mutasyon analiz sonuçları, real time PCR sonuçları ile %100 uyumlu bulunmuştur. Sekans doğrulaması yapılan örneklerin mutasyon dağılımları ve real time PCR ile uyum oranları Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10: DNA dizi analizi ile mutasyon doğrulaması yapılan örnekler

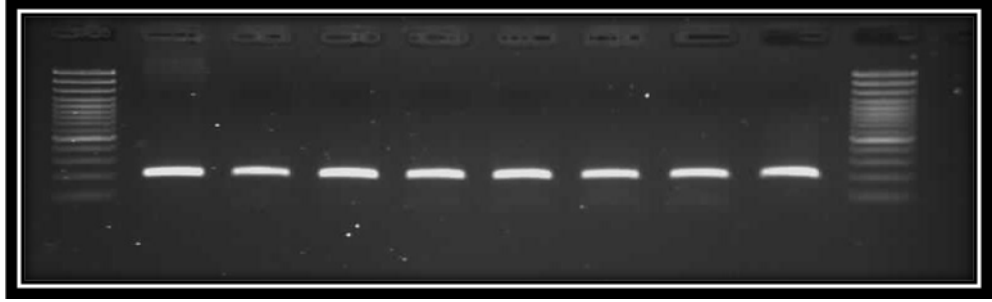
<i>Gruplar</i>	<i>Olgu Sayısı ve Mutasyon durumu</i>	<i>Real time PCR ile Uyum Oranı</i>
AP	3 yabancı tip	% 100
HP	1 yabancı, 2 mutant tip	% 100
SSA/P	1 yabancı, 2 mutant tip	% 100
KSA	1 yabancı, 2 mutant tip	% 100
ARA	1 yabancı, 2 mutant tip	% 100
KonCA	2 yabancı tip	% 100
MüsCA	2 yabancı, 1 mutant tip	% 100

BRAF V600E mutasyonu tespit edilen örneklerden bazıları için DNA dizi analizi yapılmış ve mutasyonların doğrulaması gerçekleştirilmiştir. Gradient PCR'in sonuçları

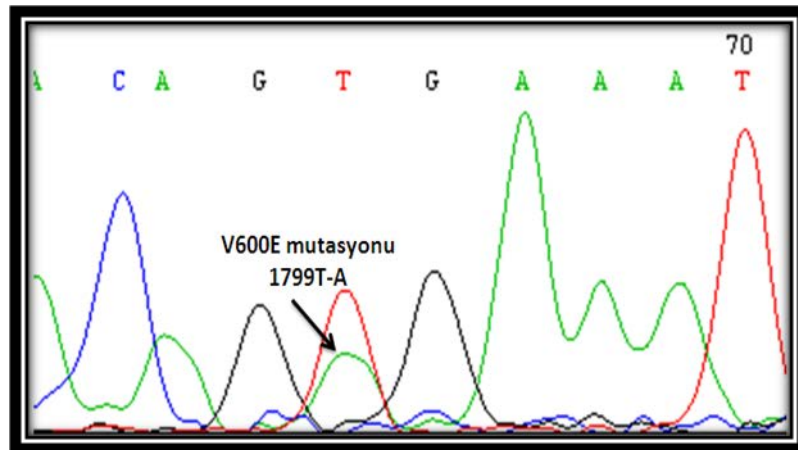
incelendiğinde BRAF geni ekzon 15 bölgesi için dizayn edilen primerlerin 55 °C ve 2 mM MgCl₂ konsantrasyonunda optimal çalıştığı anlaşılmıştır (Şekil 4.23). Sekans için seçilen örneklerden bazılarının BRAF genine ait PCR jel görüntüleri Şekil 4.24’de gösterilmiştir. PCRLarı yapılan örneklere ait temsili elektroforegram görüntüsü Şekil 4.25-26’da gösterilmiştir.



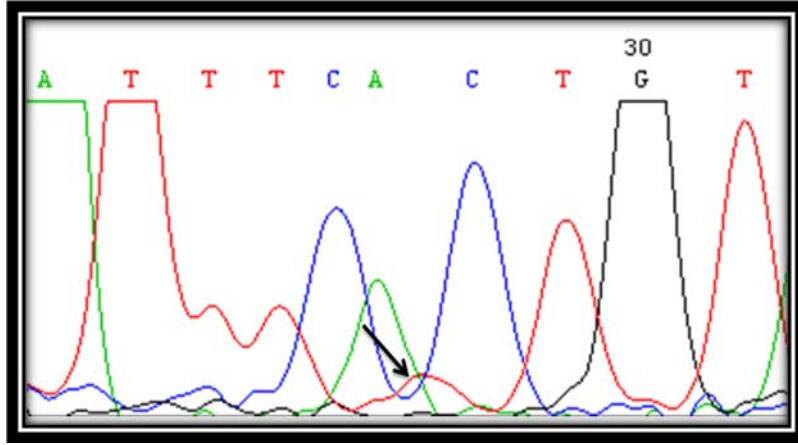
Şekil 4.23: BRAF ekzon 15 primerleri için gradient PCR jel görüntüsü



Şekil 4.24: Bazı örneklerin BRAF ekzon 15 PCR jel görüntüleri



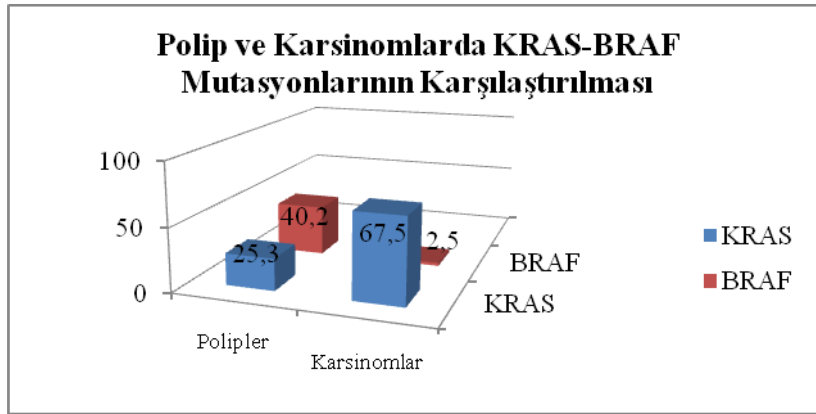
Şekil 4.25: BRAF V600E mutasyonu taşıyan bir örneğe ait DNA dizi analizi, forward dizisi



Şekil 4.26: BRAF V600E mutasyonu taşıyan bir örneğe ait DNA dizi analizi, reverse dizisi

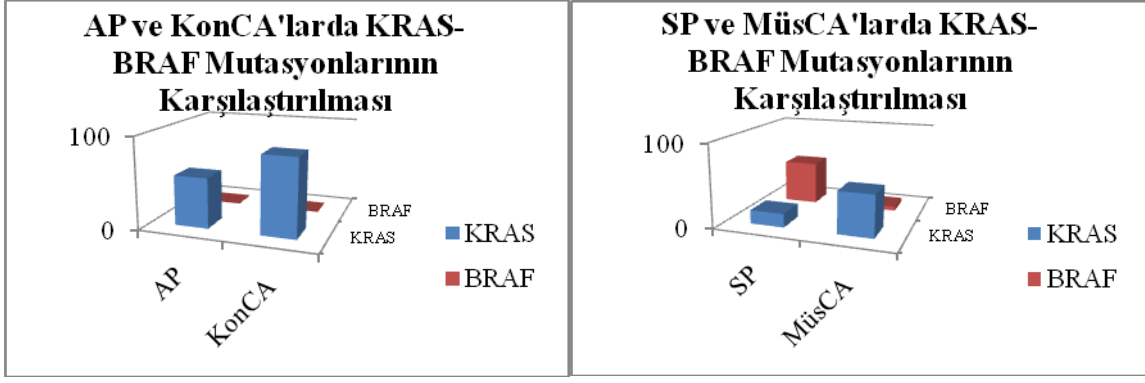
4.4.2.3. KRAS ve BRAF Mutasyon İlişkisi

Tüm olgularda KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon ilişkisi incelendiğinde, mutasyonlar arasında negatif korelasyon olduğu ($\Phi = -0.463$; $p < 0.001$), poliplerde de KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığı arasında negatif korelasyon olduğu ($\Phi = -0.423$; $p < 0.001$), karsinomlarda negatif korelasyon olmakla birlikte ($\Phi = -0.231$; $p = 0.144$) bunun anlamlı düzeyde olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.27).



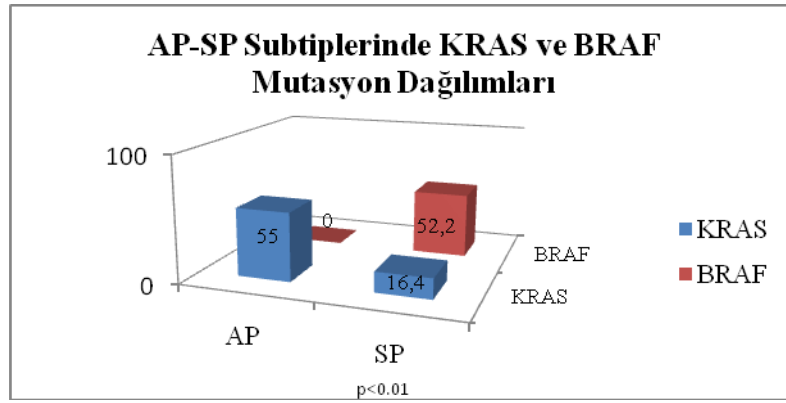
Şekil 4.27: Tüm olgularda KRAS-BRAF Mutasyonlarının Dağılımları

KRAS mutasyonu AP'lerde % 55, KonCA'larda % 85 oranında görülürken, SP'lerin % 16.4'ü, MüsCA'ların % 50'si mutant bulunmuştur. Buna karşın, BRAF mutasyonu AP'lerde ve KonCA'larda saptanmazken, SP'lerin % 52.2'si, MüsCA'ların % 5'i mutant bulunmuştur ($p < 0.001$) (Şekil 4.28).



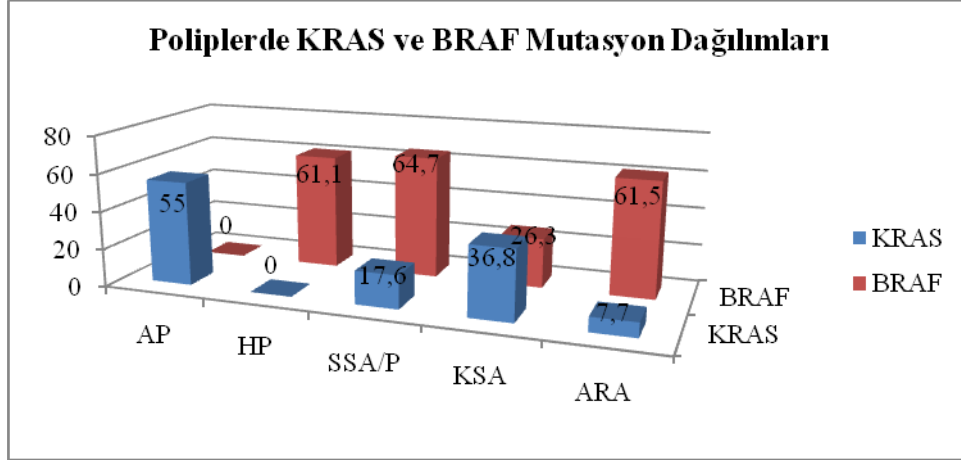
Şekil 4.28: Polip-Karsinom Eşleştirmelerinde KRAS-BRAF Mutasyonlarının Dağılımları

SP'lerde de KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığı arasında negatif korelasyon olduğu saptanmış ($\phi = -0.383$; $p < 0.01$), ancak AP grubunda BRAF mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından değerlendirme yapılamamıştır (Şekil 4.29).



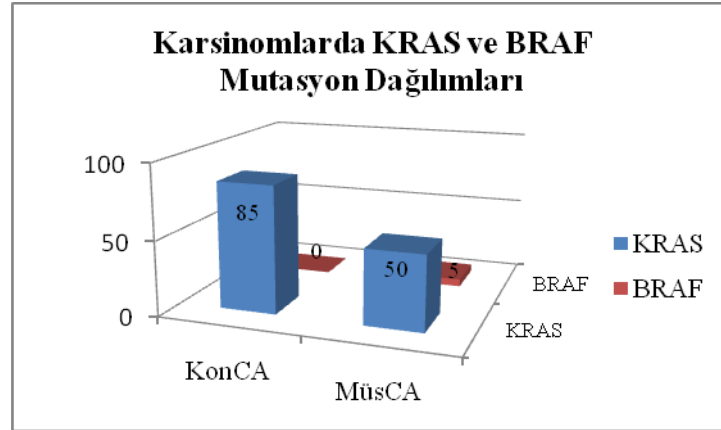
Şekil 4.29: Öncü Lezyonların Subtiplerinde KRAS-BRAF Mutasyonlarının Dağılımları

Poliplerin alt gruplarından AP'lerde KRAS-BRAF tanısı açısından korelasyon bakılamazken (BRAF mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından) SP'lerde KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyonu varlığı arasında negatif korelasyon olduğu ($\Phi = -0.383$; $p < 0.01$) ve bu ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlaşılmıştır. SP'lerin subtipleri incelendiğinde; HP'lerde KRAS-BRAF tanısı açısından korelasyon bakılamazken (KRAS mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından), SSA/P, KSA ve ARA'larda KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyonu varlığı arasında negatif korelasyon olduğu (SSA/P için $\Phi = -0.304$; $p > 0.05$, KSA'lar için $\Phi = -0.456$; $p < 0.05$, ARA'larda $\Phi = -0.365$; $p > 0.05$) ve bu ilişkinin yalnızca KSA'lar için anlamlı olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.30).



Şekil 4.30: Öncü Lezyonların Tüm Subtiplerinde KRAS-BRAF Mutasyonlarının Dağılımları

Karsinomlarda KRAS-BRAF tanısı açısından korelasyon açısından incelendiğinde KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyonu varlığı arasında negatif korelasyon olduğu ($\Phi = -0.231$; $p > 0.05$) ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Karsinomların subtipleri incelendiğinde; KonCa'larda KRAS-BRAF tanısı açısından korelasyon bakılmazken (BRAF mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından) MüsCA'larda KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyonu varlığı arasında negatif korelasyon olduğu ($\Phi = -0.229$; $p > 0.05$) anlaşılmıştır (Şekil 4.31).



Şekil 4.31: Karsinom Subtiplerinde KRAS-BRAF Mutasyonlarının Dağılımları

Poliplerde KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının yaş ile ilişkisine bakıldığında, yaş gruplarında KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (≤ 50 yaş için $\Phi = -0.402$; $p > 0.05$, > 50 yaş için $\Phi = -0.409$; $p < 0.01$) ve > 50 yaş polip olgularında bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir.

Poliplerin birinci grubu olan AP'lerde BRAF mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından bu grup için KRAS ve BRAF mutasyon varlığı ile korelasyon analizi yapılamamıştır.

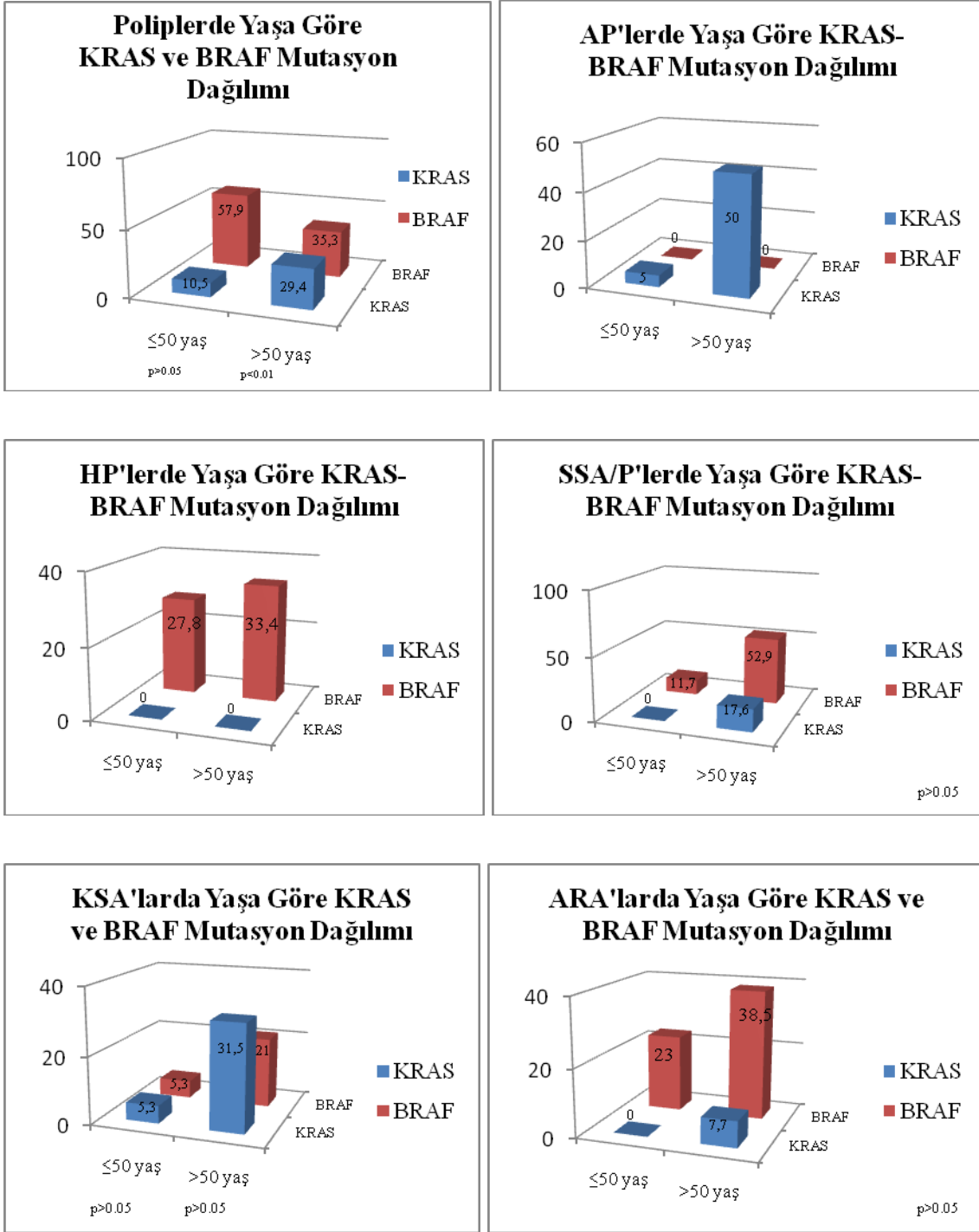
İkinci büyük grup olan SP'lerde KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının yaş ile ilişkisine bakıldığında, yaş gruplarında KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (≤ 50 yaş için $\Phi = -0.383$; $p > 0.05$, > 50 yaş için $\Phi = -0.367$; $p < 0.01$) ve > 50 yaş polip olgularında bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir.

SP subtiplerinde yapılan analizde; HP'lerde KRAS mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından bu grup için KRAS ve BRAF mutasyon varlığı ile korelasyon analizi yapılamamıştır.

SSA/P'lerde KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının yaş ile ilişkisine bakıldığında, yaş grupları için KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (> 50 yaş için $\Phi = -0.367$; $p < 0.01$) ve > 50 yaş polip olgularında bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiş, ancak ≤ 50 yaş olgularda BRAF mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından analiz yapılamamıştır.

KSA'larda KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının yaş ile ilişkisine bakıldığında, yaş için KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (≤ 50 yaş için $\Phi = -0.500$; $p > 0.05$, > 50 yaş için $\Phi = -0.447$; $p > 0.05$) ve hem ≤ 50 yaş hem de > 50 yaş polip olgularında bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir.

ARA'larda KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının yaş ile ilişkisine bakıldığında, yaşa göre KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (> 50 yaş için $\Phi = -0.488$; $p > 0.05$) ve > 50 yaş olgular için bu değer anlamlı olmamakla birlikte ≤ 50 yaş olgularda BRAF mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından analiz yapılamamıştır (Şekil 4.32).



Şekil 4.32: Polipler ve Subtiplerinde Yaşa Göre KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı

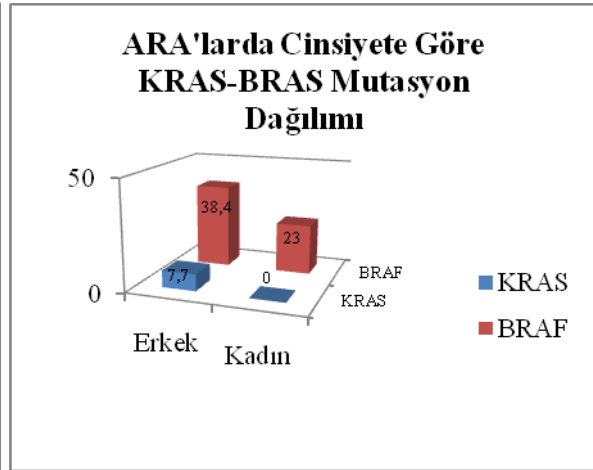
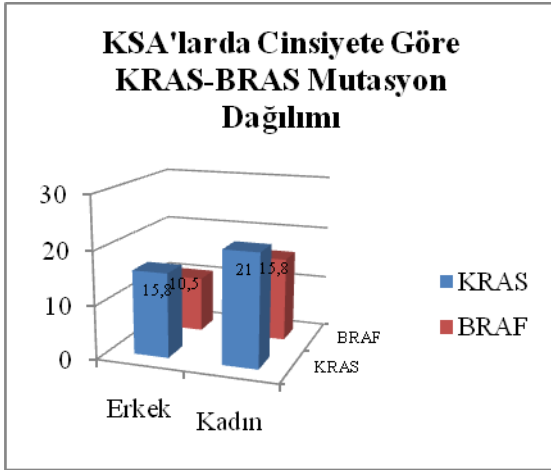
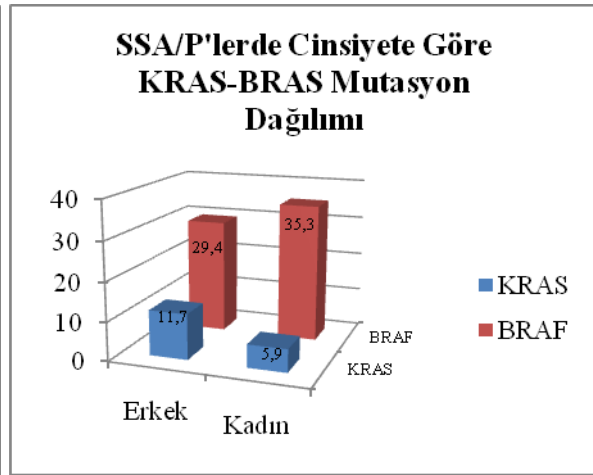
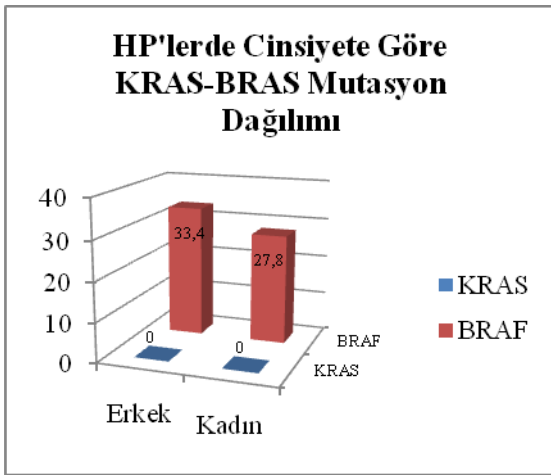
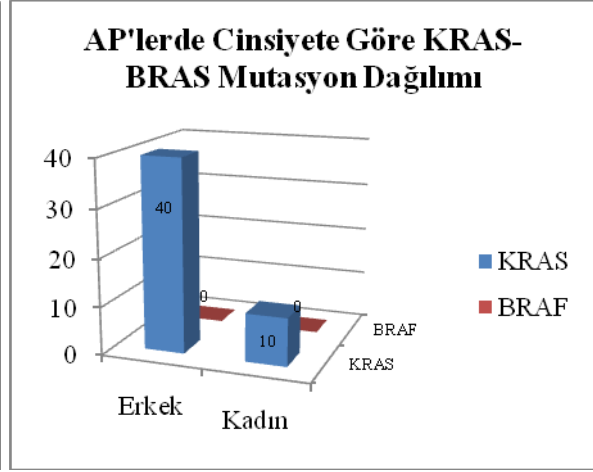
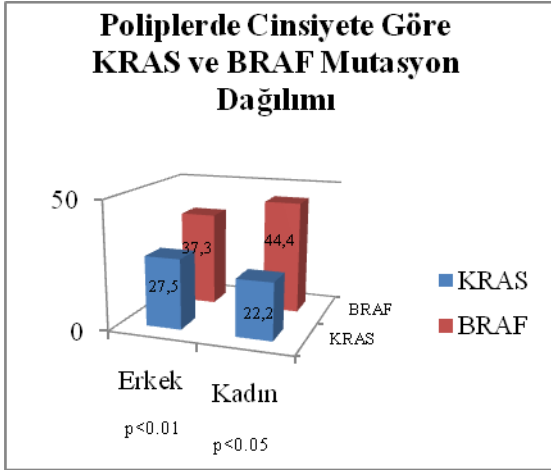
Poliplerde KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının cinsiyet ile ilişkisine bakıldığında, cinsiyete göre KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (kadınlar için $\Phi = -0.344$; $p < 0.05$, erkekler için $\Phi = -0.474$; $p < 0.01$) ve hem kadın hem de erkek olgular için bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir.

SP'lerde KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının cinsiyet ile ilişkisine bakıldığında, cinsiyet için KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (kadınlar için $\Phi = -0.277$; $p < 0.05$, erkekler için $\Phi = -0.473$; $p < 0.01$) ve hem kadın hem de erkek olgular için bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir.

SSA/P'lerde KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının cinsiyet ile ilişkisine bakıldığında, cinsiyete göre KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (kadınlar için $\Phi = -0.250$; $p > 0.05$, erkekler için $\Phi = -0.745$; $p < 0.05$) ve kadın olgular için bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir.

KSA'larda KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının cinsiyet ile ilişkisine bakıldığında, cinsiyet için KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (kadınlar için $\Phi = -0.577$; $p < 0.05$, erkekler için $\Phi = -0.375$; $p > 0.05$) ve hem kadın hem de erkek olgular için bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir.

ARA'larda KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının cinsiyet ile ilişkisine bakıldığında, cinsiyet için KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (erkekler için $\Phi = -0.395$; $p > 0.05$) ve erkek olgular için bu değer anlamlı olmamakla birlikte kadın olgularda BRAF mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından analiz yapılamamıştır (Şekil 4.33).



Şekil 4.33: Polipler ve Subtiplerinde Cinsiyete Göre KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı

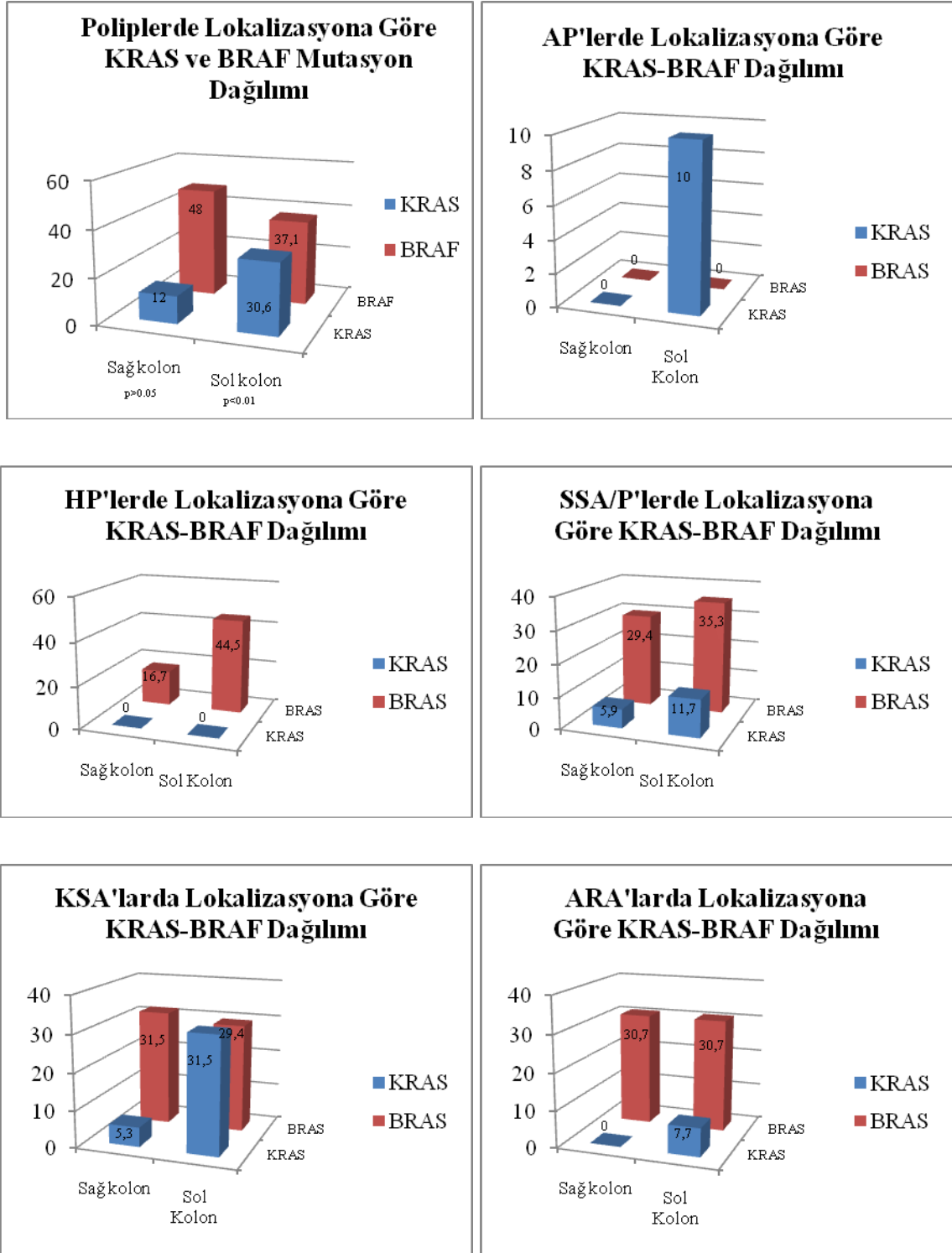
Poliplerde KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının lokalizasyon ile ilişkisine bakıldığında, lokalizasyon açısından KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (sağ kolon için $\Phi = -0.355$; $p > 0.05$, sol kolon için $\Phi = -0.438$; $p < 0.01$) ve sol kolon olgular için bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir.

SP'lerde KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının lokalizasyon ile ilişkisine bakıldığında, lokalizasyon açısından KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (sağ kolon için $\Phi = -0.302$; $p > 0.05$, sol kolon için $\Phi = -0.437$; $p < 0.01$) ve sol kolon olgular için bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir.

SSA/P'lerde KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının lokalizasyon ile ilişkisine bakıldığında, lokalizasyon için KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (sağ kolon için $\Phi = -0.395$; $p > 0.05$, sol kolon için $\Phi = -0.333$; $p > 0.05$) ve sol kolon olgular için bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir.

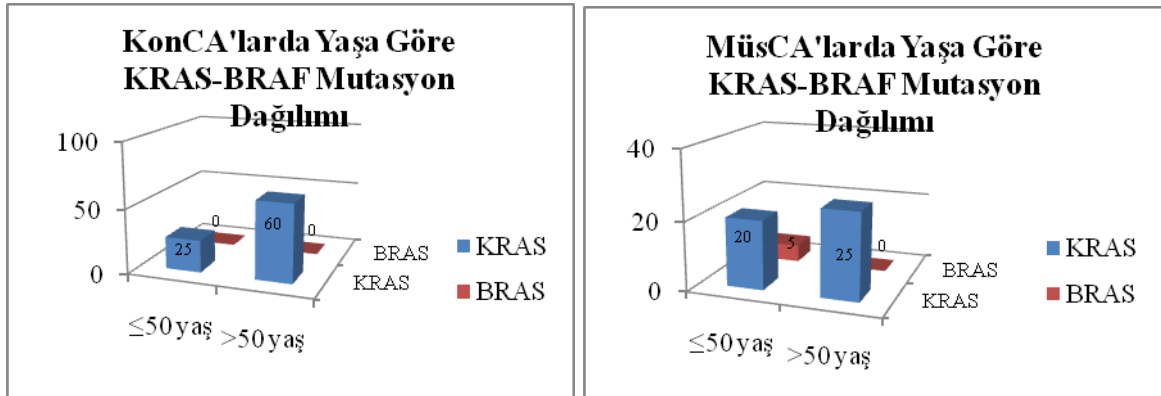
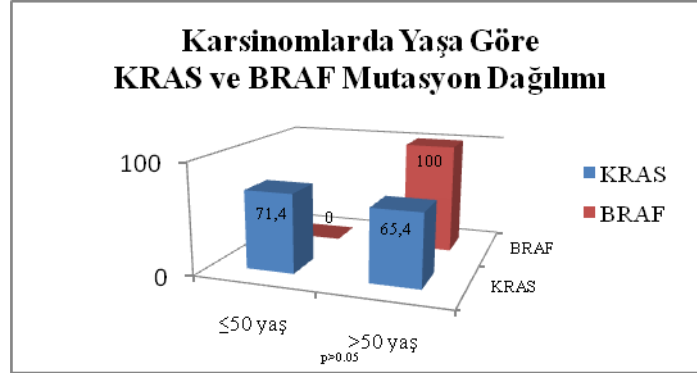
KSA'larda KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının lokalizasyon ile ilişkisine bakıldığında, lokalizasyon açısından KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (sol kolon için $\Phi = -0.522$; $p < 0.05$) anlaşılmıştır. Sol kolon yerleşimli olgular için bu değer istatistiksel olarak anlamlı olmakla birlikte sağ kolon yerleşimli olanlarda BRAF mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından değerlendirme yapılamamıştır.

ARA'larda KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının lokalizasyon ile ilişkisine bakıldığında, lokalizasyona göre KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (sol kolon için $\Phi = -0.1000$; $p < 0.05$) anlaşılmıştır. Sol kolon yerleşimli olgular için bu değer istatistiksel olarak anlamlı olmakla birlikte sağ kolon yerleşimli olanlarda BRAF mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından değerlendirme yapılamamıştır (Şekil 4.34).



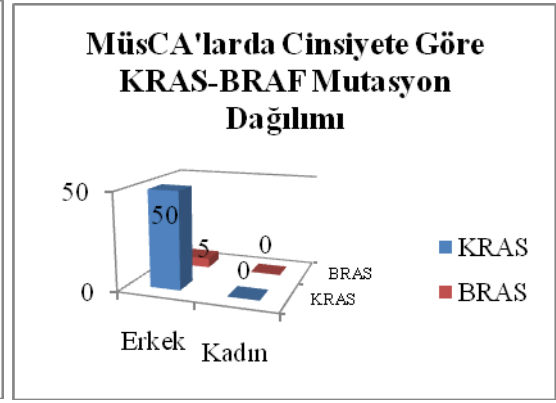
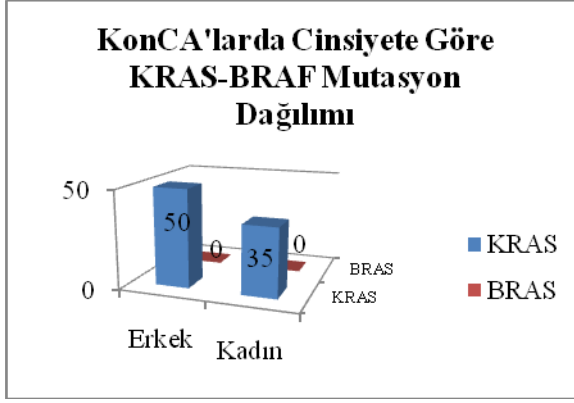
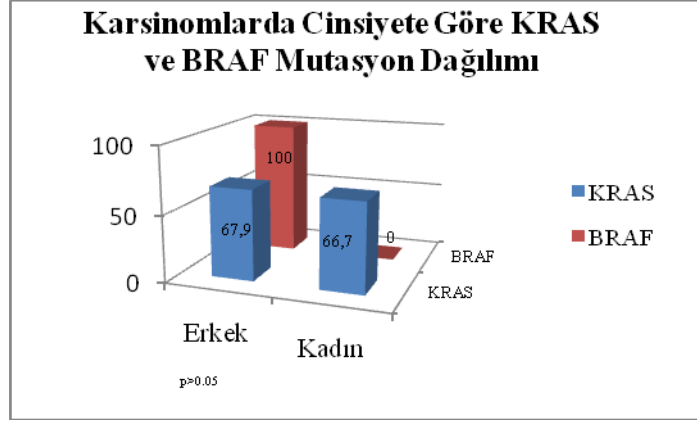
Şekil 4.34: Polip Subtiplerinde Lokalizasyona Göre KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı

Karsinomların KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının yaş ile ilişkisine bakıldığında, yaş için KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (>50 yaş için $\Phi = -0.275$; $p > 0.05$) anlaşılmış, >50 yaş olgular için bu değer istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (MüsCA'larda >50 yaş için $\Phi = -0.289$; $p > 0.05$) gözlenmiştir. Bununla birlikte ≤ 50 yaş karsinomlarda ve subtiplerinde BRAF mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından değerlendirme yapılamamıştır (Şekil 4.35).



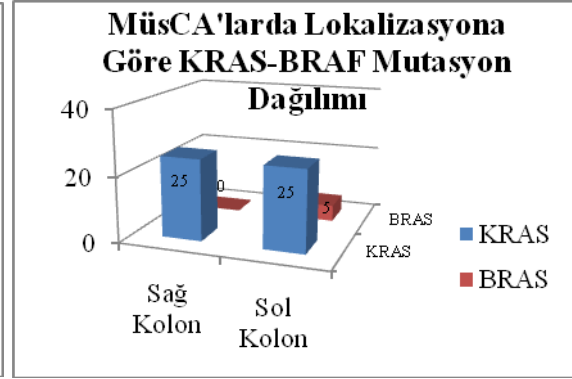
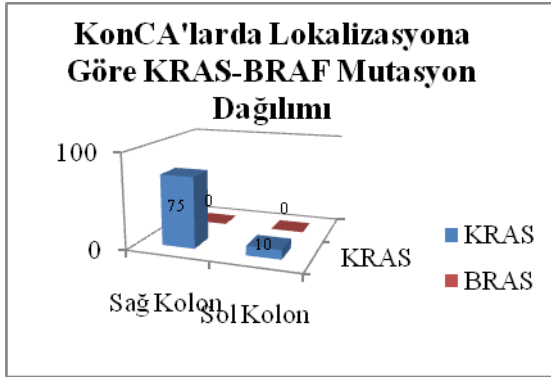
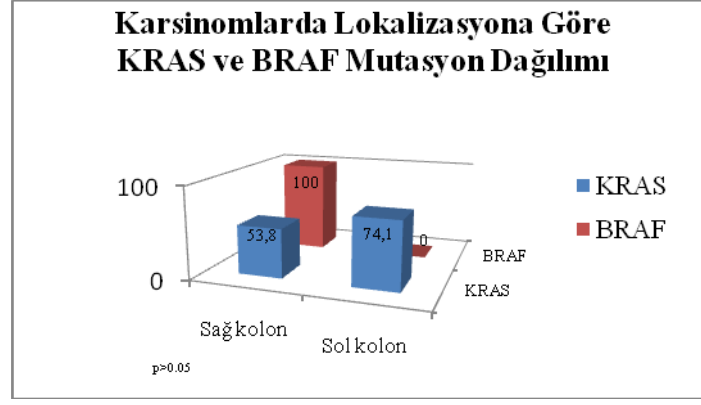
Şekil 4.35: Karsinomlarda ve Subtiplerinde Yaşa Göre KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı

Karsinomların KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının cinsiyet ile ilişkisine bakıldığında, cinsiyet açısından KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (erkekler için $\Phi = -0.280$; $p > 0.05$) anlaşılmıştır. Erkek olgular için bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış (KonCA'larda erkekler için $\Phi = -0.280$; $p > 0.05$, MüsCA'larda erkekler için $\Phi = -0.293$; $p > 0.05$), kadınlarda BRAF mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından kadın olgular için değerlendirme yapılamamıştır (Şekil 4.36).



Şekil 4.36: Karsinomlarda ve Subtiplerinde Cinsiyete Göre KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı

Karsinomların KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının lokalizasyon ile ilişkisine bakıldığında, lokalizasyona göre KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (sağ kolon için $\Phi = -0.312$; $p > 0.05$) anlaşılmıştır. Sağ kolon yerleşimli olgular için bu değer istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte (MüsCA'larda sağ kolon için $\Phi = -0.395$; $p > 0.05$) sol kolon yerleşimli olanlarda BRAF mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından değerlendirme yapılamamıştır (Şekil 4.37).



Şekil 4.37: Karsinomlarda ve Subtiplerinde Lokalizasyona Göre KRAS-BRAF Mutasyon Dağılımı

Karsinomların KRAS mutasyonu ile BRAF mutasyon varlığının “grade” ile ilişkisine bakıldığında, “grade” için KRAS-BRAF tanısı arasında negatif korelasyon olduğu (grade 3 için $\Phi = -0.239$; $p > 0.05$) anlaşılmıştır. “Grade” 3 olgular için bu değer istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte (MüsCA’larda için $\Phi = -0.229$; $p > 0.05$) “grade” 1 olgularda BRAF mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından değerlendirme yapılamamıştır. Ayrıca KonCA grubunda da BRAF mutasyonu taşıyan olgu yer almadığından değerlendirme yapılamamıştır.

Çalışmada kullanılan olgulardan bir kısmı, aynı hastadan aynı zamanda alınan ve morfolojik olarak birbirinden farklı karakter gösteren poliplerden oluşmaktadır. Örneğin ARA3 kodlu olgu ile HP13 kodlu olgu aynı hastaya ait poliplerdir. Bu olgular ve gözlenen mutasyonlar Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.11: Aynı hastaya ait farklı polip olgularında KRAS- BRAF Genotipleri

	<i>Örnek Kodları</i>	<i>BRAF</i>	<i>KRAS</i>
1. olgu	ARA3 HP13	V600E Yabanıl	Yabanıl Yabanıl
2. olgu	SSA1 KSA7	V600E Yabanıl	Gly12Asp Gly12Asp
3. olgu	SSA5 HP14	V600E Yabanıl	Yabanıl Yabanıl

Adenomatöz polip grubunda yer alan **AP4** kodlu olguda KRAS geni ekzon 2 mutasyon analizinde hem kodon 12 hem de kodon 13'te mutasyon saptanmıştır (Tablo 4.12).

Tablo 4.12: AP4 kodlu olguya ait KRAS ekzon 2 genotipi

<i>Mutasyon Lokasyonu</i>	<i>Mutasyon Tipi</i>
Ekzon 2, Kodon 12	Glu12Asp
Ekzon 2, Kodon 13	Glu13Asp

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Erişkin kadın ve erkeklerde kansere bağlı ölümlerin çok önemli bir kısmını oluşturan kolorektal kanser, ülkemizde de oldukça sık görülmektedir. Ancak olguların çoğu ileri evrede hekime başvurmakta ve erken tedavi şansları azalmaktadır. Bu nedenle kolorektal karsinomların erken tanı ve tedavisinde ilk adım, öncü lezyonların ve bunların karsinoma dönüşümlerinde etkin olan moleküler mekanizmaların ortaya konması olmalıdır. Böylece farklı moleküler mekanizmalarla ortaya çıkan öncü lezyonların ve bu lezyonlardan gelişen tümörlerin hedefe yönelik tedavi kavramı içinde ele alınmaları ve doğru tedavi yaklaşımı için hasta gruplarının belirlenmesi sağlanabilecektir.

Son yıllarda, kolorektal karsinogenezde daha önce tanımlanmış olan kromozomal ve mikrosatellit instabilite arayollarından farklı, “serrated neoplazi” sekansında etkin olduğu düşünülen diğer bir arayolun bulunduğu ve bu yolakta erken olaylardan biri MAPK sinyal iletim yolağının aktivasyonu ve BRAF mutasyonları iken, diğerinin bazı genlerin, özellikle DNA tamir genlerinin, metilasyon ile sessizleşmesi olduğu ileri sürülmüştür (Hamilton 2010). Bu görüşle uyumlu olacak şekilde, bazı kolorektal kanserlerin serrated neoplazi sekansının öncü lezyonları olan “serrated” poliplerden geliştiği kabul edilmektedir (Sandmeier, Benhattar et al. 2009).

Ras-MAPK ara yolu, aktive olmuş hücre yüzey reseptörlerinden hücre nükleusundaki transkripsiyon faktörlerine doğru akan intraselüler sinyal iletiminin önemli bir kaskadıdır. RAS ve RAF proteinleri kaskada katılan önemli moleküllerdir ve mutasyonları birbirini dışlayarak kesintisiz MAPK sinyal iletimine neden olmakta ve hücrenin apoptotik hücre ölümünden kaçarak sürekli proliferasyonuna yol açmaktadır (Davies, Bignell et al. 2002).

Literatür incelendiğinde, kolorektal karsinomların adenomalardan gelişen formunda, gerek öncü lezyonlarda gerekse tümörlerde KRAS mutasyonları izlenirken, “serrated” poliplerde ve bunlardan gelişen tümörlerde, ki bir kısmının müsinöz fenotip gösterdiği bildirilmektedir, BRAF mutasyonlarının daha sık olduğu gözlenmektedir (Hamilton 2010, Ensari, Bosman 2010). Ancak literatürde yer alan çalışmalarda bu genlere ilişkin farklı mutasyon oranları bildirildiği dikkati çekmektedir (Lee 2005; Fujita, Yamamoto 2011).

Kolorektal karsinomların ancak küçük bir bölümünde BRAF mutasyonu gösterilmiştir (Rajagopalan 2002). Literatürde BRAF mutasyonunun, MSI-H tümörlerde daha sık

olduğu bildirilmekle birlikte (Vakiani and Solit 2011) aksini ileri süren çalışmalar da mevcuttur. Bu durumda, genetik instabiliteden bağımsız olarak, RAS-MAPK arayolunun aktivasyonunun KRAS ya da BRAF mutasyonlarıyla başlatıldığı ve “serrated” poliplerin bir kısmının patogenezinde bu arayolun rol oynadığı düşünülebilir.

Bu tez çalışmasında 87 kolorektal polip ve 40 kolorektal kanser olgusunda KRAS geni ekzon 2 kodon 12 ve 13 mutasyonları, ekzon 3 kodon 61 mutasyonları ve BRAF geni ekzon 15 V600E mutasyon analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen moleküler verilerle klinikopatolojik bulgular arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

5.1. Öncü Lezyonlarda KRAS ve BRAF Mutasyonlarının Değerlendirilmesi

Bu çalışmada incelenen poliplerin % 25.3’ünde KRAS mutasyonu, % 40.2’sinde BRAF mutasyonu saptanmıştır. KRAS mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde AP’lerde daha yüksek oranda saptandığı, BRAF mutasyonu saptanan poliplerin tümünün SP grubunda olduğu, ve AP olgularının hiçbirinde BRAF mutasyonu bulunmadığı dikkati çekmiştir. Literatürde de, adenomlarda BRAF mutasyon oranlarının % 0-%5.1 arasında değiştiği bildirilmektedir (O’Brien 2006). Bu durumda, AP’lerin oluşum mekanizmasında BRAF gen mutasyonlarının bir önemi olmadığı ve dolayısıyla adenokarsinomların AP’lerden gelişen formunda BRAF gen mutasyonlarının bir rolünün olmadığı düşünülebilir. Ancak bu konuda daha net bir yorum yapabilmek için AP’den karsinomaya geçişteki tüm kanserleşme aşamalarını BRAF mutasyonları açısından ayrıntılı bir biçimde değerlendirmek gerekmektedir. Literatür bu açıdan incelendiğinde, displastik adenomlar, AP subtipleri ve kanserleşme gösteren “malign” adenomlar üzerinde yapılmış bir çalışmanın bulunmadığı görülmektedir.

SP’lerin subtipleri değerlendirildiğinde, en yüksek KRAS mutasyon oranının KSA’larda olduğu ve bu grubu sırasıyla SSA/P’lerin ve ARA grubunun izlediği, ilginç olarak HP’lerin hiçbirinde KRAS mutasyonunun bulunmadığı dikkati çekmiştir. Buna karşın, SP subtiplerinde BRAF mutasyonlarının sıklığının oldukça yüksek olduğu gözlenmektedir. BRAF mutasyon oranları HP’ler ve SSA/P’lerde en yüksek oranda olup, bu grupları HP-SSA arası karakter taşıyan ARA grup ile KSA’lar izlemektedir. Görüldüğü gibi HP ve SSA/P’lerin BRAF mutasyon oranları eşittir ve bu da bu iki SP subtipinin bir spektrum içinde ele alınması gerektiğini ortaya koymaktadır. KSA’larda ise BRAF mutasyonunun değerlendirildiği az sayıda çalışma mevcut olup KSA’ların BRAF mutasyonu içermediğine

dair sonuç bildiren çalışmalar da mevcuttur. Ancak, sonuçlarımıza göre KSA'lar, HP ve SSA/P'lere göre daha düşük olmakla birlikte BRAF V600E mutasyonu taşıyabilmektedir.

KRAS ve BRAF mutasyonları birbirini dışlayarak kolorektal polip ve kanserlerde görülmekte ve kolorektal karsinogenezde erken ve birbirine paralel gelişen olaylar olarak ortaya çıkmaktadır.

Aberan kript odağı, kolorektal AP ve SP'lerin en erken öncü lezyonu olarak kabul edilmektedir. Ancak aberan kript odağı ile ilgili yapılmış çok az sayıda moleküler çalışma mevcuttur. "Laser capture" mikroskop ile DNA ekstraksiyonu yapılan aberan kript odağında Rosenberg ve ark. BRAF ve KRAS mutasyonlarını incelemiş ve serrated morfoloji gösterenlerde BRAF mutasyonunu, non-serrated morfolojili olanlarda ise KRAS mutasyonunu daha yüksek oranda saptamışlardır (Rosenberg, Yang et al. 2007).

HP'ler kolorektumda sık görülen ve özellikle distal kolona yerleşen benign poliplerdir. Ancak bazı çalışmalar, HP'lerin neoplastik potansiyelleri olabileceğini, KRAS, BRAF mutasyonları ve MSI gösterebileceklerini ortaya koymuştur (Iino 1999).

Adenom-karsinom sekansının uzun yıllar önce tanımlanmış olması, bu sekansta yer alan öncü lezyonların da kesin kriterlerle tanınmasını sağlamıştır. Oysa 1990'larda tanımlanmış olan serrated poliplerin alt tiplerine yönelik kesin kriterlerin ortaya konması henüz çok yeni olarak gerçekleşmiştir (Hamilton 2010). Bu nedenle, özellikle serrated polipleri kapsayan çalışmalar ve sundukları moleküler veriler değerlendirilirken son derece dikkatli olunması gerekmektedir. Buna paralel olarak, moleküler tekniklerdeki gelişmeler ve kullanılan yöntemlerin çeşitliliğinin de, çalışma sonuçları üzerinde, benzer şekilde, titiz değerlendirmeyi gerektirecek etkileri olabilecektir.

SSA/P'lerin sağlıklı olarak tanımlanmasından önce, literatürde, serrated poliplerdeki KRAS mutasyon sıklığı ile ilgili çelişkili bilgiler mevcut olup, HP'lerde %4-37, SSA/P'lerde %0-10 arasında değişen KRAS mutasyon oranları bildirilmiştir (Sandmeier, Benhattar et al. 2009).

Bu bölümde, literatürde konu ile ilgili araştırmalar kronolojik olarak ele alınarak, sonuçlarımızla karşılaştırmalı şekilde tartışılmıştır. Bu konudaki literatür özeti Tablo 5.1’de sunulmuştur.

Tablo 5.1: Literatürde Poliplere ait KRAS-BRAF mutasyon sıklık tablosu

<i>Referanslar</i>	<i>AP (%)</i>		<i>SP (%) (SSA/P+KSA)</i>		<i>HP (%)</i>		<i>SSA/P (%)</i>		<i>KSA (%)</i>	
	KRAS	BRAF	KRAS	BRAF	KRAS	BRAF	KRAS	BRAF	KRAS	BRAF
Otori 1997	56		-	-	47	-	-	-	-	-
Yuen 2002	31	5.1	-	-	0	33	-	-	-	-
Chan 2003	-	-	0	100	18	36	-	-	-	-
Konishi 2004	15	2.8	15	36	13	0	-	-	-	-
Yang 2004	-	-	28	60	16.5	69.6	-	-	-	-
O’Brien 2006	-	-	-	-	43	76	7	83	24	62
Jass 2006	26.5	4.8	-	-	4	67	3	81	-	-
Spring 2006	60	0.4	-	-	50	70	8	78	-	-
Wagner 2008	44	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Velho 2008			35	29						
Kim 2010									29	55
Fujita 2011					4.2	45.8	4.4	60.9		
Erdoğan Ö	55	0	16.4	52.2	0	61.1	17.6	64.7	36.8	26.3

Yuen ve ark.nın 2002 yılındaki araştırmasında, BRAF mutasyonu, AP’lerin % 5.1’inde, HP’lerin ise %33’ünde görülürken, KRAS mutasyonu AP’lerin % 31’inde saptanmış, ancak HP’lerde, çalışmamızda olduğu gibi, mutasyona rastlanmamıştır (Yuen, Davies et al. 2002).

Chan ve ark.’nın 2003 yılında yaptıkları çalışmada BRAF mutasyonu HP’lerde %36, serrated adenomlarda ise % 100 oranında saptanmış, KRAS mutasyonu ise HP’lerin %18’inde izlenirken serrated adenomların hiçbirinde mutasyona rastlanmamıştır (Chan,

Zhao et al. 2003). Ancak bu çalışmadaki serrated adenomların bugünkü tanımlamalar ışığında KSA ve SSA/P'leri bir arada içerdiği ve bu nedenle çalışmanın sonuçlarının dikkatli yorumlanması gerektiği anlaşılmaktadır.

Benzer şekilde, Konishi ve ark. 47 kolorektal kanserin öncü lezyonlarında KRAS ve BRAF mutasyonlarını araştırmışlardır. Bu çalışmada kullanılan "serrated adenoma" terimi bu antitenin ilk tanımlandığı dönemin literatür bilgilerine dayanmaktadır (Longacre and Fenoglio-Preiser 1990). Ancak, günümüzde "serrated adenoma" terimi "sesil" ya da "klasik" tanımlamaları olmaksızın kullanılmamaktadır (Hamilton 2010). Bu nedenle dikkatle ele alınması gereken bu çalışmanın sonuçlarına göre, serrated adenomlarda KRAS mutasyonu %15 iken, BRAF mutasyonu % 36 olarak bulunmuş, aynı çalışmada AP'lerin % 15inde, HP'lerin ise %13'ünde KRAS mutasyonu, AP'lerin % 2.8'inde BRAF mutasyonu saptanmıştır (Konishi, Yamochi et al. 2004). Görüldüğü gibi, bu çalışmada da, araştırmamızla uyumlu olacak şekilde, BRAF mutasyonunun adenomlarda "serrated" poliplere göre daha düşük oranda saptandığı dikkati çekmiştir.

Diğer bir çalışmada, BRAF mutasyonu serrated poliplerde çok yüksek oranlarda izlenmiş ve özellikle SSA/P'lerde HP'lerden daha sık olduğu gözlenmiştir. KRAS mutasyonu ise serrated poliplerde çok düşük oranda saptanmış, HP'de SSA/P'lerden daha az oranda olduğu görülmüştür (Yang, Farraye et al. 2004).

Spring'in çalışmasında KRAS mutasyonu AP'lerin %60'ında saptanırken, HP'lerde %50 ve SSA/P'lerde % 8 oranında izlenmiş, KSA'larda ise hiç gözlenmemiştir. BRAF mutasyonu ise, AP'lerde %0.4, HP'lerde %70, SSA/P'lerde %78, KSA'larda %66 olarak bulunmuştur (Spring, Zhao et al. 2006). Otori ve ark. benzer şekilde HP'lerin %47'sinde, AP'lerin % 56'sında KRAS mutasyonu göstermişlerdir (Otori, Oda et al. 1997). Bu iki çalışmada HP'lerde izlenen KRAS mutasyonları beklenen değerlerden çok yüksek olmasıyla dikkat çekmektedir.

Buna karşın, O'Brien ve ark. en yüksek KRAS mutasyonunu AP'lerde, daha sonra sırasıyla KSA, HP ve SSA/P'lerde gözlemişler, BRAF mutasyonunun ise en sık SSA/P'lerde, izlendiğini ve bunu sırasıyla HP ve KSA gruplarının izlediğini ortaya koymuşlardır (O'Brien, Yang et al. 2006). Buna paralel bir başka çalışmada, KRAS mutasyonu AP'lerde % 26.5, HP'lerde % 4, SSA/P'lerde %3 olarak saptanmış, BRAF ise AP'lerde % 4.8, HP'lerde % 67, SSA/P'de % 81 oranında bulunmuştur (Jass, Baker et al.

2006). Son iki çalışma AP ve SP'ler ile subtiplerinde bizim çalışmamızla da uyum gösteren ve literatürdeki geniş serilerle uyumlu sonuçlara sahip olmaları bakımından önemlidir.

Kim ve ark. BRAF mutasyonunun tüm SP subtiplerinde yüksek oranda görüldüğünü, ancak AP'lerde BRAF mutasyonuna rastlanmadığını bildirmişlerdir (Kim, Lee et al. 2010).

Benzer olarak, Wagner ve ark. konvansiyonel ampuller ve duodenal adenomlarda hiç BRAF mutasyonu saptamamış, ancak KRAS mutasyonunun sırasıyla, % 44 ve % 18 olduğunu göstermişlerdir (Wagner, Chen et al. 2008).

Ishii'nin çalışmasında ise, BRAF mutasyonları TA'larda son derece enderken, az sayıda TVA'da mutasyon izlenmiştir. Bu çalışmada AP'lerde villözite oranı arttıkça KRAS mutasyon oranında da belirgin bir artış gözlenmiştir. Aynı çalışmada BRAF mutasyonu çok az sayıda adenom olgusunda saptanmış, bunların daha çok nonvillöz karakterde ve küçük çaplı oldukları gözlenmiştir (Ishii, Notohara et al. 2011). Çalışmamızda istatistiksel analize imkan vermek amacıyla, adenom subtiplerinde çok farklı bulguların beklenmemesi nedeniyle, AP subtiplendirmesi yapılmamıştır. Literatür bilgileri ışığında, çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde, KRAS, adenomların gelişiminde BRAF'a göre daha kesin bir role sahipken, BRAF subtiplere göre farklılıklar göstermekle birlikte, serrated poliplerin gelişiminde önemli bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Bu yıl yapılan bir çalışmada, HP'lerin % 45.8'inde, SSA/P'lerin % 60.9'unda BRAF mutasyonu saptanmış, KRAS ise HP'lerin % 4.2'sinde, SSA/P'lerin % 4.4'ünde mutant bulunmuştur. PIK3CA'da mutasyona rastlanmamıştır. Bu sonuçlarla, araştırmacılar SSA/P'lerin patogenezinde BRAF mutasyonun rolü olabileceği görüşünü desteklemişlerdir (Fujita, Yamamoto et al. 2011). Bu sonuçlar, tümüyle, çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu görünümde olup, güncel olması nedeniyle "serrated" polip tanım ve klasifikasyonunda da çalışmamıza paralel şekilde, bu konudaki en son bilgilere dayandırıldıkları anlaşılmaktadır.

Velho ve ark. ise, serrated adenom olarak tanımladıkları serrated poliplerde BRAF ve KRAS'ın birbirini dışlamak üzere % 30 oranında mutasyon gösterdiklerini ve BRAF mutasyonu ile MSI ve CIMP'in korele olduğunu ortaya koymuşlardır. Ancak çalışmanın zayıf noktası SP subtiplendirmesinin yapılmamış olmasıdır ki bu durum çalışmanın moleküler verilerinin yorumlanmasında güçlük yaratmaktadır (Velho, Moutinho et al. 2008). Bu çalışmada, 17 serrated polip olgusunun % 29 BRAF, % 35 KRAS mutasyonu gösterdiği, KRAS mutasyonu HP'lerde ve displastik alanlarda sık iken, BRAF'ın tümüyle

SA'larda görüldüğü bildirilmiştir. KRAS'ın sporadik kolorektal kanserde ve adenoma-karsinoma sekansında rolü olduğu bilinmektedir. BRAF ise poliplerde kanserden daha yüksek mutasyon göstermektedir. Bu nedenle, BRAF'ın KRAS'a göre daha minor onkojenik etkisinin olabileceği düşünülebilir. Bir diğer deyişle, bazı poliplerin kanserleşmesi için BRAF ile birlikte iş gören ya da BRAF dışı başka faktörlerin (epigenetik) etkili olabileceği akla gelmektedir.

AP'ler daha çok sol kolonda ve distal rektosigmoid bölgede görülürken, serrated polipler grubunda yer alan HP'ler de benzer şekilde distalde daha sık ortaya çıkmaktadır. Buna karşın SSA/P'lerin proksimal kolonda daha sık görüldüğü, KSA'ların ise kolonun her yerinde ortaya çıkabilmekle birlikte, solda daha sık oldukları bilinmektedir. Lokalizasyonlarındaki bu seçicilik kolorektal kanserde öncü lezyonların moleküler temellerinin de lokalizasyona göre farklı olabileceği düşüncesini doğurmaktadır. Gerçekten de, lokalizasyonun, gerek poliplerin gelişiminde rol oynayan, gerekse bu poliplerden gelişen neoplazilerin ortaya çıkmasında önemli olan moleküler mekanizmaları belirleyebilecek bir faktör olduğunu öne süren çalışmalar mevcuttur (Hamilton 2010).

Bu çalışmada, KRAS mutasyonu, sol kolon poliplerinde ve tümörlerinde, sağda lokalize olanlara göre belirgin olarak yüksek olmakla birlikte, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Buna karşın, BRAF mutasyonu sağ kolon yerleşimli poliplerde daha sık oranda mutant bulunmuş, kanserlerden yalnızca birinde BRAF mutasyonu gözlenmiş ve bu tümörün sağ kolonda lokalize olduğu dikkati çekmiştir.

Huang, lokalizasyon ile MSI durumu ilişkisini incelediği araştırmasında, proksimal kolon lokalizasyonlu HP'lerin BRAF mutasyonu gösterdiğini ve SA'ya ilerleyerek MSI kanserlere dönüştüğünü, distal kolonda ise aynı öncü lezyonun KRAS ya da BRAF mutasyonu gösterdiğini ve SA'lara dönüşerek MSS kanserlere geliştiğini ileri sürmektedir (Huang 2004).

O'Brien ve ark. ise, distal HP'lerde %32.5 oranında, proksimallerde % 5.1 oranında KRAS mutasyonu saptamışlardır. Bu araştırmacılara göre, KRAS mutasyon durumunu histolojik subtip ve kolorektumdaki lokalizasyon belirlemektedir (O'Brien, Yang et al. 2006).

Çalışmamızdaki ARA lezyonlara benzeyen SSA/P ve HP arasında kalan poliplerin değerlendirildiği tek moleküler çalışma olan Chung ve ark.'nın araştırmalarında, HP-

SSA/P arasında kalan poliplerde % 87, SSA/P'lerde ise % 100 BRAF mutasyonu saptamışlar, HP'lerin ise % 46'sında mutasyon gözlemişlerdir. ARA lezyonların SSA/P'lere daha yakın moleküler bulgular içermesine karşın, araştırmacılar, distalde lokalize olduğunda, bu poliplerin HP olarak ele alınmasını, proksimalde ve >1cm olan poliplerin ise SSA/P olarak değerlendirilmesini önermişlerdir (Chung, Chen et al. 2008). Bizim çalışmamızda da ARA grubun KRAS mutasyon oranı çok düşük olarak saptanmış, BRAF mutasyonunun ise, bu grupta, HP ve SSA/P gruplarına çok benzer şekilde yüksek olduğu dikkati çekmiştir. Yine benzer şekilde, KRAS mutasyonu gösteren ARA olguların solda lokalize ve 2 mm çaplı olduğu, BRAF mutasyonu gösteren ARA olguların ise, sağ-sol kolon lokalizasyonlarının benzer dağılım gösterdiği ve ortalama çapın 6 mm olduğu dikkati çekmiştir. Bu durumda, bu tip olguların lokalizasyon ve çapa göre değerlendirilerek klasifiye edilmesini öneren diğer çalışmalar (Snover 2005) ışığında, bizim olgularımız içinde KRAS mutant olan HP, BRAF mutant olan olguların ise sağ kolonda lokalize ve >5mm çaplı olanların SSA/P olarak izlenmesi uygun olacaktır. Bununla uyumlu olacak şekilde, diğer bir çalışmada, KSA'larda % 29 oranında KRAS, % 55 oranında BRAF mutasyonu gözlenmiş, KRAS mutasyonunun sol kolon lokalizasyonunda daha sık olduğu ve özellikle polibin displastik odaklarında daha sık mutasyon görüldüğü bildirilmiştir (Kim 2010).

Lee ve ark. KSA'larda yaptıkları çalışmada, BRAF mutasyonunu olguların % 77.1'inde, KRAS mutasyonunu ise yalnızca % 8.9'unda saptamışlar ve BRAF'ın daha çok sağ kolonda, KRAS'ın ise sol kolondaki "serrated" neoplazi gelişiminde rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir (Lee, Choi et al. 2005).

Kim ve ark.'nın yaptığı çalışmada, KSA'larda KRAS % 29, BRAF %55 oranında mutant olarak saptanmıştır. Displazi ve kanserli KSA'larda KRAS mutasyonunun daha sık olduğu BRAF'ın ise "low grade" displazililerde daha düşük oranda görüldüğü anlaşılmıştır (Kim, Lee et al. 2010). Sol kolonda daha sık KRAS mutasyonlu KSA izlenmiştir. KSA'ların HP ya da SSA/P odağı içerenlerinde BRAF mutasyonu % 77.1 iken KRAS mutasyonu % 14.3 bulunmuş ve bu sonucun prekürsör lezyonu olmayanlardan farklı olduğu gözlenmiştir. Buna göre özellikle sağ kolonda gelişen KSA'lar için HP ve SSA/P'lerin prekürsör lezyon olabileceği ileri sürülmüştür. BRAF, KSA'nın gelişiminde önemli iken, displazi ve kanser gelişim aşamalarında KRAS'ın rol oynadığı öne sürülmüştür. Ancak, morfolojik olarak KSA tanımında eksiklik olduğu mikroskopik resimlerden de anlaşılan çalışmada,

sonuçların sağlıklı olarak yorumlanması güçtür. Olasılıkla bu çalışmada KSA olarak tanımlanan ancak displazi gösteren SSA/P'ler çoğunluktadır. Bizim çalışmamızda ise KSA'da BRAF % 26, KRAS %36.8 olarak saptanmış ve her iki KSA grubunda predominant olarak sol kolon lokalizasyonu izlenmiştir. Gerçekten de, son bilgilere göre KSA'ların diğer SP'lerden çok, AP'lere benzer klinikopatolojik özellik gösterebilecekleri düşünülmektedir (Hamilton 2010; Ensari, Bosmann 2010).

Çalışma kapsamındaki olgulardan bir kısmı aynı hastadan aynı zamanda alınan ve morfolojik olarak birbirinden farklı karakter gösteren poliplerden oluşmuştur. Bu hastaların farklı morfolojik karaktere sahip poliplerinde farklı moleküler değişimler gözlenmiştir. Bu durumun gözlendiği üç olgudan birinde, saptanan iki polipten biri olan HP'de hiçbir mutasyon saptanmazken, ARA olgu olan diğerinde, BRAF mutasyonu gözlenmiştir. Özellikle ARA olguda saptanan BRAF mutasyonu tanısal açıdan yaşanan sorunun çözümünde çok önemli bir katkı sağlamıştır. HP-SSA/P arasında kesin morfolojik ayrımın yapılamadığı bu olguda BRAF mutasyonunun varlığı, literatür eşliğinde değerlendirildiğinde daha çok SSA/P tanısına yaklaştırmaktadır. İkinci ve üçüncü olgularda saptanan SSA/P tipindeki poliplerin her ikisinde de BRAF mutasyonu bulunmuştur. İkinci olgunun diğer polibi olan KSA'da KRAS mutasyonu gözlenmiş, üçüncü olguda izlenen HP tipindeki ikinci polipte ise herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır.

5.2. Karsinomlarda KRAS ve BRAF Mutasyonlarının Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen 40 kolorektal karsinom olgusunun sonuçları değerlendirildiğinde, KRAS ve BRAF mutasyonlarının bir arada görülmediği dikkati çekmiştir. Sonuçlar literatürle uyumlu olup, bu iki gene ait mutasyonların bir arada gözlenmediği ve aynı ara yol üzerinde görev alan bu genlerin her ikisi de “onkogen” özelliği taşıdığı için herhangi birinde gözlenecek heterozigot bir mutasyonun RAS-MAPK sinyal arayolunun aktifleşmesi için yeterli olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle bu iki onkogenin herhangi birinde mutasyon olması durumunda diğerinin yabancı tip olması beklenmektedir.

Çalışmamızda, karsinomların % 67.5'inde KRAS mutasyonu, %2.5'inde BRAF mutasyonu saptanmıştır. KRAS mutasyonu, KonCA'larda MüsCA'lara göre anlamlı olarak daha

yüksek bulunmuştur. KRAS mutasyonu gösteren 27 karsinom olgusunun %70.4'ünün erkek, % 63'ünün >50 yaş, % 74.1'inin sol kolonda lokalize, % 63'ünün KonCA, % 55.6'sının "grade" 1/2, % 55.6 sının evre 3 olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, BRAF mutasyonu gösteren bir karsinom olgusunun >50 yaş, erkek hasta olduğu gözlenmiş, tümörün sağ kolonda lokalize, 50 mm çapa sahip olduğu anlaşılmıştır. BRAF mutasyonu gösteren bu olgu, "grade" 3, evre 4 bir müsinöz adenokarsinomdur.

Literatür kolorektal karsinomlardaki KRAS ve BRAF mutasyonları açısından değerlendirildiğinde, Miyaki ve ark. sporadik kolorektal akrsinomda % 4 BRAF, % 34 KRAS mutasyonu saptamışlar, HNPCC'de oranların çok düşük olduğunu, FAP-assosiyel kolorektal kanserde ise sporadik tümörlere yakın oranlarda mutasyon bulunduğunu göstermişlerdir (Miyaki, Iijima et al. 2004).

Bir başka araştırmada, KRAS mutasyonu olguların % 20.7'sinde bulunmuş, BRAF ise % 3.8 olarak saptanmıştır. Her iki mutasyonun da, proksimal lokalizasyonlu kanserlerde daha sık olduğu gözlenmiştir (Liou, Wu et al. 2011).

Diğer bir çalışmada, BRAF'ın sağ kolon tümörlerinde, KRAS'ın ise sol kolon ve rektum tümörlerinde daha sık mutasyon gösterdikleri ve KRAS mutasyonu olan tümörlerin rekürrens oranlarının daha yüksek olduğu saptanmıştır (Hutchins, Southward et al. 2011).

Park ve ark. ise kolorektal kanserde, KRAS mutasyonunu % 27.5, BRAF'ı % 7 olarak belirlemişlerdir. KRAS yabanıl tip tümörlerde BRAF mutasyonunun kötü prognozu belirlediğini ortaya koymuşlardır (Park, Han et al. 2011).

Vaughn ve ark. KRAS mutasyonunu olguların % 42.4'ünde saptamışlar, yabanıl tip olanların % 27.3'ünde diğer bir KRAS kodonunda (kodon 61, ya da 146) ya da NRAS'ta mutasyon olduğunu göstermişlerdir (Vaughn, Zobel et al. 2011).

Fas'tan yapılan bir çalışmada olguların % 29'unda KRAS, yalnızca % 1.6'sında ise BRAF mutasyonu bulunduğu, KRAS mutasyonlarının kadınlarda ve <60 yaş olgularda daha sık olduğu gözlenmiştir (Bennani, Gilles et al. 2010). Çalışmamızda ise, KRAS mutasyonu gösteren karsinomların anlamlı olarak yüksek oranda solda lokalize ve erkeklerde ortaya çıktıkları görülmüştür.

Benzer bir çalışmada, BRAF mutasyonunun % 5.1, KRAS mutasyonunun ise % 34 oranında olduğu gösterilmiştir. Bu araştırmacılar, bazı tümörlerde KRAS ve BRAF mutasyonlarının bir arada olabileceğini ve dolayısıyla RAS-MAPK arayolunun birçok komponentin mutasyonu ile aktive olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Yuen, Davies et al. 2002). Bu görüş, bizim sonuçlarımız ve literatürdeki diğer birçok çalışma ile çelişmektedir; BRAF ve KRAS mutasyonları birbirini dışlamakta, birinin mutant olduğu durumda diğeri yabanıl kalmaktadır. Gerçekten de, çalışmamızda KRAS gen mutasyonu ile BRAF gen mutasyonu arasındaki negatif ilişkinin, tüm olgu gruplarında (polip, karsinom ve alt tipleri), yaş, cinsiyet, lokalizasyon, tümör grade ve evresi gibi parametrelere göre değerlendirildiğinde anlamlı olarak ortaya çıktığı görülmüştür.

O'Brien ve ark. çalışmalarında, KonCA'larda KRAS mutasyonunu %37.9 oranında saptarken, hiç BRAF mutasyonuna rastlamamış ve BRAF'ın adenom-karsinom sekasında KRAS gibi bir rolü olmadığını ileri sürmüşlerdir (O'Brien, Yang et al. 2006). Sonuçlarımıza göre, KRAS mutasyonu AP'lerde ve KonCA'larda, SP ve MüsCA'lardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuş, BRAF mutasyonu AP ve KonCA'larda hiç saptanmamış, buna karşın SP'lerde yüksek oranda BRAF mutasyonu gözlenmiş ve bir müsinoz karsinomun da BRAF mutant olduğu dikkati çekmiştir. Bu sonuçlar da, literatürdeki birçok çalışma ile korele şekilde, KRAS'ın adenoma-karsinoma sekansında ve neoplastik geçişte önemli rolü olduğunu, BRAF'ın ise bu yolakta değil, "serrated" neoplazi sekansında, özellikle SP'lerin gelişimi aşamasında, erken evrede, etkili olduğunu ortaya koymaları açısından son derece değerlidir.

Çalışmamızla paralel şekilde, Grimminger ve ark. kolorektal kanserlerde % 47 oranında KRAS mutasyonu saptamışlar, ancak hiçbirinde BRAF mutasyonu izlememişlerdir (Grimminger, Danenberg et al.2011).

Li ve ark. ise, % 26'sı kodon 12'de, %5'i kodon 13'te olmak üzere toplam % 31.5 olguda KRAS, % 7 olguda da BRAF mutasyonu bulmuşlar, bir olguda kodon 12 ve 13 mutasyonlarını birlikte gözlemişlerdir. Bu çalışmada, BRAF mutasyonu evre, histolojik tip, yaş ve cinsiyetle ilişkili değilken, KRAS ile ileri evre ve uzak metastaz ilişkili bulunmuştur (Li 2011). Çalışmamızda da, ilginç olarak, bir olguda (AP4) KRAS mutasyonu hem kodon 12, hem de 13'te saptanmıştır. Normal koşullarda, yan yana iki kodonda mutasyon görülmesi biyokimyasal nedenlerle beklenen bir durum değildir. Ancak

Literatürde buna benzer sonuçlara ender olmakla birlikte rastlanabildiği bildirilmektedir (Takahashi 2007).

Andreyev ve ark.'nın çalışmasında, kodon 12'de Gly12Val KRAS mutasyonunun agresif davranış ve ileri evre ile korele olabileceği sonucu gösterilmiştir (Andreyev 2001).

Bir başka çalışmada, primer tümör ve metastazlar, ayrı ayrı KRAS mutasyonu açısından değerlendirilmiş ve tüm analiz edilen tümörlerin % 39.3'ünde kodon 12 ve 13 mutasyonları saptanmıştır. En sık görülen mutasyonlar; kodon 12'de Gly12Asp, Gly12Val ve kodon 13'te Gly13Asp olarak saptanmıştır. Bu bulgular, neoplastik gelişim sırasında KRAS geninin mutasyonel durumunun kararlılığını ortaya koymuştur. Böylece bu üç bölgede izlenen ve primer ya da metastazda %40 oranında saptanan KRAS mutasyonu, kolorektal karsinomlarda anti-EGFR tedavisi için belirleyici olmuş ve rutin KRAS mutasyon analizinin dayanağını oluşturmuştur (Neumann, Zeindl-Eberhart et al. 2009).

5.3. Yöntemin Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında, kolorektal karsinom ve öncü lezyonlarının morfolojik ve moleküler profillerinin ilişkilendirilmesi yanı sıra, KRAS ve BRAF mutasyonlarının tespitinde kullanılan moleküler tekniklerin karşılaştırılması da yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, KRAS mutasyonları için, real time PCR ve pirosekanslama tekniklerini temel alan 2 ayrı tanı kiti kullanılırken, BRAF V600E mutasyonu için ise real time PCR'ı temel alan bir tanı kiti ve direkt sekanslama ile DNA dizi analizi yapılarak, sonuçlar karşılaştırılmıştır.

KRAS mutasyonlarında tanı kitleri arasındaki uyum son derece yüksek olmakla birlikte, yalnızca bir olguda mutasyon sonucu farklı bulunmuştur. Ancak, burada mutasyon durumundaki farklılık kitlerin güvenilirliğini azaltacak bir veri olmaktan çok, kitin tespit edebildiği mutasyon sayısının sınırlı olması ile ilgili bir durumdur. Real time PCR kiti ile kodon 12'de yer alan 6 mutasyon ve kodon 13'de yer alan bir mutasyon tespit edilebilmektedir. Dolayısıyla, bu kit belirtilen 7 mutasyon dışında hiçbir mutasyonu saptayamamaktadır. Oysa kolorektal karsinomlarda bu 7 mutasyona ek olarak ekzon 2, kodon 13'de 5 farklı mutasyon ve ekzon 3, kodon 59,61, 63 ve 144 mutasyonları da, daha nadir olmakla birlikte, görülebilen mutasyonlardır.

KRAS mutasyonlarını tespit etmek için kullanılan pirosekanslama kiti ise mutasyona spesifik değil, lokalizasyona spesifik bir analiz gerçekleştirdiğinden ekzon 2, kodon 12 ve 13'de yer alan tüm mutasyonları saptayabilmektedir. Ayrıca, bu sistemde ekzon 3 kodon 61 için ayrı bir reaksiyon yapıldığından kodon 61 mutasyonu da saptanabilmektedir.

Literatür incelendiğinde, kolorektal karsinom olgularında, KRAS genindeki mutasyonların çok büyük bir kısmının yukarıda sözü edilen 7 mutasyonu içerdiği bilinmektedir (van Krieken, Jung 2008; WHO 2010). Bu nedenle real time PCR yöntemi ve bu yöntemde kullanılan mutasyon kiti, rutin analiz için yeterli olarak değerlendirilebilecek özelliktedir. Çünkü anti-EGFR tedavileri için hasta seçiminde yalnızca kodon 12 ve 13 mutasyonlarının tedaviye olumsuz yanıt ile ilişkili olduğu bilinmektedir (van Krieken, Jung 2008) .

BRAF V600E mutasyonları öncelikle, Tıbbi Molbiol BRAF V600E kiti kullanılarak tespit edilmiştir. Daha sonra içlerinden rastgele seçilen bazı olgular DNA dizi analizine tabi tutulmuş ve sonuçlar arasındaki uyum değerlendirilmiştir. “clamping assay” teknolojisi ile real time PCR platformunda melting curve analizi yapılarak elde edilen sonuçların, DNA dizi analizi ile % 100 uyum gösterdiği gözlenmiştir.

DNA dizi analizi oldukça uzun, zahmetli ve pahalı bir yöntemdir. Bu nedenle tanı amaçlı olarak rutinde uygulanması zordur. Bu tez çalışmasının sonuçları “clamping assay” teknolojisi ile BRAF V600E mutasyonunun tespitini yüksek doğrulukla göstermiştir. Böylece, bu yöntemin rutin amaçlı kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

5.4. Hedefe Yönelik Tedavi Yaklaşımı

Günümüzde hedefe yönelik tedavinin, tümör tedavisi ve prognoz üzerindeki rolüne bakıldığında, kolorektal karsinomların ve karsinom öncülü olarak kabul edilen kolorektal poliplerin tiplendirmesi ve bu olguların moleküler belirteçler esas alınarak klasifikasyonu son derece önemli ve gereklidir. Yapılan çalışmalarda, kolorektal poliplerde farklı genetik aberasyonların bulunması, patogeneze farklı moleküler mekanizmaların rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Histopatolojik klasifikasyona paralel olarak moleküler farklılıklar yoluyla öncü lezyonların birbirinden ayrımı, hem tedaviyi hem de prognozu etkileyebilecek önemli parametrelerin saptanmasını sağlayacaktır.

Son yıllarda, metastatik kolorektal kanserlerde EGFR'ı hedefleyen monoklonal antikorların klinik etkinliği kesin olarak gösterilmiştir. Bu biyolojik ajanların konvansiyonel kemoterapi ile kombinasyonu, tedaviye olumlu yanıt oranında, progresyonsuz yaşam süresi üzerinde belirgin etkili olmuştur. Ancak, yine de, hasta yanıtındaki değişkenlik, yeni klinik ya da moleküler prediktif belirteçlerin hedefe yönelik tedavideki gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu kapsamda, kolorektal karsinomlarda KRAS mutasyonlarının varlığı anti-EGFR tedavisine rezistansı predikte etmesi açısından önemli bir gelişme olarak ortaya konmuştur. Çeşitli çalışmalarda, EGFR amplifikasyonu, EGFR ligandlarının overekspresyonu ve TP53'ün inaktivasyonunun, anti-EGFR monoklonal antikorlarına sensitivite ile ilişkili olduğunu, buna karşın, BRAF, PIK3CA ve PTEN ekspresyon kaybının rezistansla assosiyе olduğu gösterilmiştir. Ancak, bu markerlar henüz tam olarak valide edilmemiş olduğundan, yalnızca KRAS genotiplendirmesi anti-EGFR monoklonal antikor tedavisi kullanımında tek belirleyici olarak kullanılmaktadır (Di Fiore 2010).

RAS gibi, MAPK arayolunun önemli bir molekülü olan RAF geni, RAS'a bağlanarak regüle edilen sitoplazmik serin/treonin kinazları kodlamaktadır. BRAF mutasyonu olan kanser hücre dizilerinde RAS fonksiyonuna gerek olmaksızın kanser büyümesi sağlanabilmektedir. Mutant BRAF'ta artmış kinaz aktivitesi bulunması, bu duruma neden olmaktadır. Bu özelliği nedeniyle RAF geninin yeni tedavi hedefleri arasında yer alabilecek potansiyele sahip olduğu ileri sürülmektedir (Davies 2002).

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında, kolorektal karsinomlar ve öncü lezyonlarda, KRAS ve BRAF gen mutasyonları, geniş bir olgu serisinde, klinikopatolojik parametrelerle ilişkilendirilerek değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonuçları, literatür eşliğinde, KRAS ile birlikte, BRAF'ın da kolorektal neoplastik süreçte etkin rol oynayan bir onkogen olduğunu ve özellikle serrated neoplazi spektrumunda yer alan lezyonların gelişiminde önemli bir faktör olduğunu ortaya koymuştur. Ancak BRAF, kolorektal karsinomlarda çok düşük mutasyon oranına sahip olduğu için, henüz KRAS gibi hedefe yönelik tedavi seçiminde kullanılabilir gibi görünmemektedir.

Literatürde, bu iki gen mutasyonunun değerlendirildiği çok sayıda araştırma bulunmasına karşın, bu çalışmanın üstünlüğü, özellikle tanım ve klasifikasyonu yıllardır tartışmalı olan serrated neoplazi sekansında yer alan lezyonları, en son bilgiler eşliğinde ele alarak, moleküler verilerin güvenilirliğini sağlamış olmasıdır.

6. REFERANSLAR

Alberts B, J. A., Lewis J, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter (2002). Molecular Biology of the Cell. 4th Edition, Chapter 23, New York.

Andreyev, H. J., A. R. Norman, et al. (2001). "Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study." Br J Cancer **85**(5): 692-6.

Asghar, U., E. Hawkes, et al. (2010). "Predictive and prognostic biomarkers for targeted therapy in metastatic colorectal cancer." Clin Colorectal Cancer **9**(5): 274-81.

Bennani, B., S. Gilles, et al. (2010). "Mutation analysis of BRAF exon 15 and KRAS codons 12 and 13 in Moroccan patients with colorectal cancer." Int J Biol Markers **25**(4): 179-84.

Bertram, J. S. (2000). "The molecular biology of cancer." Mol Aspects Med **21**(6): 167-223.

Burgart L.J. Colorectal polyps and other precursor lesions. Need for an expanded view. Gastroenterol Clin North Am. 2002 Dec;31(4):959-70.

Campisi, J. (2007). "Aging and cancer cell biology, 2007." Aging Cell **6**(3): 261-3.

Castagnola, P. and W. Giaretti (2005). "Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer." Biochim Biophys Acta **1756**(2): 115-25.

Chan, T. L., W. Zhao, et al. (2003). "BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas." Cancer Res **63**(16): 4878-81.

Cheah, P. Y. (2009). "Recent advances in colorectal cancer genetics and diagnostics." Crit Rev Oncol Hematol **69**(1): 45-55.

Chuang, J. C. and P. A. Jones (2007). "Epigenetics and microRNAs." Pediatr Res **61**(5 Pt 2): 24R-29R.

Chung, D. C. (2000). "The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis." Gastroenterology **119**(3): 854-65.

Davies, H., G. R. Bignell, et al. (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." Nature **417**(6892): 949-54.

Di Fiore, F., R. Sesboue, et al. (2010). "Molecular determinants of anti-EGFR sensitivity and resistance in metastatic colorectal cancer." Br J Cancer **103**(12): 1765-72.

Di Gregorio, C., L. Losi, et al. (1997). "Histology of aberrant crypt foci in the human colon." Histopathology **30**(4): 328-34.

may represent sequential steps in the development of human colorectal tumours.

- Ensari, A., F. T. Bosman, et al. (2010). "The serrated polyp: getting it right!" J Clin Pathol **63**(8): 665-8.
- Fodde, R. (2002). "The APC gene in colorectal cancer." Eur J Cancer **38**(7): 867-71.
- Fujita, K., H. Yamamoto, et al. (2011). "Sessile serrated adenoma with early neoplastic progression: a clinicopathologic and molecular study." Am J Surg Pathol **35**(2): 295-304.
- Garcea, G., R. A. Sharma, et al. (2003). "Molecular biomarkers of colorectal carcinogenesis and their role in surveillance and early intervention." Eur J Cancer **39**(8): 1041-52.
- Grimminger, P. P., P. Danenberg, et al. (2011). "Biomarkers for Cetuximab-Based Neoadjuvant Radiochemotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer." Clin Cancer Res **17**(10): 3469-3477.
- Grimmond, S. M., D. Raghavan, et al. (1992). "Detection of a rare point mutation in Ki-ras of a human bladder cancer xenograft by polymerase chain reaction and direct sequencing." Urol Res **20**(2): 121-6.
- Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P et al. Carcinoma of The Colon Rectum. (2010). WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th edition, pages 132-173.
- Hickman, E. S., M. C. Moroni, et al. (2002). "The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer." Curr Opin Genet Dev **12**(1): 60-6.
- Higuchi, T., K. Sugihara, et al. (2005). "Demographic and pathological characteristics of serrated polyps of colorectum." Histopathology **47**(1): 32-40.
- Houlston, R. S. (2001). "What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer." Mol Pathol **54**(4): 206-14.
- Huang CS, O'brien MJ, Yang S, Farraye FA. (2004) Hyperplastic polyps, serrated adenomas, and the serrated polyp neoplasia pathway. Am J Gastroenterol. 2004 Nov;99(11):2242-55.
- Hutchins, G., K. Southward, et al. (2011). "Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer." J Clin Oncol **29**(10): 1261-70.
- Iacopetta, B., F. Grieco, et al. (2010). "Microsatellite instability in colorectal cancer." Asia Pac J Clin Oncol **6**(4): 260-9.
- Iino H, Jass JR, Simms LA, Young J, Leggett B, Ajioka Y, Watanabe H. (1999) DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer? J Clin Pathol. 1999 Jan;52(1):5-9
- Ishii, T., K. Notohara, et al. (2011). "Tubular adenomas with minor villous changes show molecular features characteristic of tubulovillous adenomas." Am J Surg Pathol **35**(2): 212-20.

- Jacob, S. and F. Praz (2002). "DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis." Biochimie **84**(1): 27-47.
- Jasperson, K. W., T. M. Tuohy, et al. (2010). "Hereditary and familial colon cancer." Gastroenterology **138**(6): 2044-58.
- Jass, J. R. (2001). "Serrated route to colorectal cancer: back street or super highway?" J Pathol **193**(3): 283-5.
- Jass, J. R., K. Baker, et al. (2006). "Advanced colorectal polyps with the molecular and morphological features of serrated polyps and adenomas: concept of a 'fusion' pathway to colorectal cancer." Histopathology **49**(2): 121-31.
- Jass, J. R. (2007). "Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features." Histopathology **50**(1): 113-30.
- Jen, J., S. M. Powell, et al. (1994). "Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions." Cancer Res **54**(21): 5523-6.
- Jesse d. Martinez, M. T. P., Kimberly E. Fultz, Natalia A. Ignatenko, Eugene w. Gerner (2003). Molecular Biology of Cancer, Chapter 1, pages 1-32.
- Kim, K. M., E. J. Lee, et al. (2010). "KRAS mutations in traditional serrated adenomas from Korea herald an aggressive phenotype." Am J Surg Pathol **34**(5): 667-75.
- Klug W, C. M., Charlotte A. Spencer , Michael A. Palladino (2008). 8th edition chapter 18, Concepts of Genetics.pages 435-455.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-3.
- Konishi, K., T. Yamochi, et al. (2004). "Molecular differences between sporadic serrated and conventional colorectal adenomas." Clin Cancer Res **10**(9): 3082-90.
- Kranenburg, O. (2005). "The KRAS oncogene: past, present, and future." Biochim Biophys Acta **1756**(2): 81-2.
- Kulis, M. and M. Esteller (2010) "DNA methylation and cancer." Adv Genet **70**: 27-56.
- Kumar, A., Fausto, Michell (2010). Robbins Pathologic Basis of Disease. 8th edition , chapter 17 pages 817-825.
- Lee, E. J., C. Choi, et al. (2005). "Tracing origin of serrated adenomas with BRAF and KRAS mutations." Virchows Arch **447**(3): 597-602.
- Lichtenstein, P., N. V. Holm, et al. (2000). "Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland." N Engl J Med **343**(2): 78-85.

- Liou, J. M., M. S. Wu, et al. (2011). "Mutations in BRAF correlate with poor survival of colorectal cancers in Chinese population." Int J Colorectal Dis. May 7. [Epub ahead of print]
- Loeb, L. A. and F. C. Christians (1996). "Multiple mutations in human cancers." Mutat Res **350**(1): 279-86.
- Longacre, T. A. and C. M. Fenoglio-Preiser (1990). "Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia." Am J Surg Pathol **14**(6): 524-37.
- Lynch, J. P. and T. C. Hoops (2002). "The genetic pathogenesis of colorectal cancer." Hematol Oncol Clin North Am **16**(4): 775-810.
- Michor, F., Y. Iwasa, et al. (2005). "Dynamics of colorectal cancer." Semin Cancer Biol **15**(6): 484-93.
- Mitin, N., K. L. Rossman, et al. (2005). "Signaling interplay in Ras superfamily function." Curr Biol **15**(14): R563-74.
- Miyaki, M., T. Iijima, et al. (2004). "Both BRAF and KRAS mutations are rare in colorectal carcinomas from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer." Cancer Lett **211**(1): 105-9.
- Neumann, J., E. Zeindl-Eberhart, et al. (2009). "Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer." Pathol Res Pract **205**(12): 858-62.
- Nucci, M. R., C. R. Robinson, et al. (1997). "Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa." Hum Pathol **28**(12): 1396-407.
- O'Brien, M. J., S. Yang, 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**(12): 1491-501.
- Olah, E. (2005). "Basic Concepts Of Cancer:Genomic Determination." JIFCC **16**(2).
- Otori, K., K. Sugiyama, et al. (1995). "Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation." Cancer Res **55**(21): 4743-6.
- Otori, K., Y. Oda, et al. (1997). "High frequency of K-ras mutations in human colorectal hyperplastic polyps." Gut **40**(5): 660-3.
- Otori, K., M. Konishi, et al. (1998). "Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue." Cancer **83**(5): 896-900.
- Park, J. H., S. W. Han, et al. (2011). "Analysis of KRAS, BRAF, PTEN, IGF1R, EGFR intron 1 CA status in both primary tumors and paired metastases in determining benefit

from cetuximab therapy in colon cancer." Cancer Chemother Pharmacol. Feb 22. [Epub ahead of print]

Perçinel S, Savaş B, Ensari A, Kuzu I, Kuzu MA, Bektaş M, Cetinkaya H, Kurşun N.(2007) Mucins in the colorectal neoplastic spectrum with reference to conventional and serrated adenomas. Turk J Gastroenterol. 2007 Dec;18(4):230-8.

Ponz De Leon M and D. G. C. (2002). "Pathology of colorectal cancer." Digest Liver Dis **33**: 372-88.

Rajagopalan, H., A. Bardelli, et al. (2002). "Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status." Nature **418**(6901): 934.

Raju, J. (2008). "Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: relevance in studying chemoprevention of colon cancer." World J Gastroenterol **14**(43): 6632-5.

Roncucci, L., M. Pedroni, et al. (2000). "Aberrant crypt foci in colorectal carcinogenesis. Cell and crypt dynamics." Cell Prolif **33**(1): 1-18.

Rosenberg, D. W., S. Yang, et al. (2007). "Mutations in BRAF and KRAS differentially distinguish serrated versus non-serrated hyperplastic aberrant crypt foci in humans." Cancer Res **67**(8): 3551-4.

Sandmeier, D., J. Benhattar, et al. (2009). "Serrated polyps of the large intestine: a molecular study comparing sessile serrated adenomas and hyperplastic polyps." Histopathology **55**(2): 206-13.

Savas B, Ensari A, Percinel S, Kuzu I, Kuzu MA, Bektas M, Cetinkaya H, Kursun N. The significance of beta-catenin, E-cadherin, and P-cadherin expressions in neoplastic progression of colorectal mucosa: an immunohistochemical study. Acta Gastroenterol Belg. 2007 Oct-Dec;70(4):339-44.

Shpitz, B., Y. Bomstein, et al. (1998). "Aberrant crypt foci in human colons: distribution and histomorphologic characteristics." Hum Pathol **29**(5): 469-75.

Snover D. C. (2005) Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. Am J Clin Pathol. 2005 Sep;124(3):380-91

Snover, D. C. (2005). "Serrated polyps of the large intestine." Semin Diagn Pathol **22**(4): 301-8.

Snover, D. C. (2011). "Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma." Hum Pathol. Jan;42(1):1-10. Epub 2010 Sep 24.

Spring, K. J., Z. Z. Zhao, et al. (2006). "High prevalence of sessile serrated adenomas with BRAF mutations: a prospective study of patients undergoing colonoscopy." Gastroenterology **131**(5): 1400-7.

- Sulewska, A., W. Niklinska, et al. (2007). "DNA methylation in states of cell physiology and pathology." Folia Histochem Cytobiol **45**(3): 149-58.
- Sulewska, A., W. Niklinska, et al. (2007). "Detection of DNA methylation in eucaryotic cells." Folia Histochem Cytobiol **45**(4): 315-24.
- Takayama, T., K. Miyanishi, et al. (2006). "Colorectal cancer: genetics of development and metastasis." J Gastroenterol **41**(3): 185-92.
- TC Sağlık Bakanlığı, (2006) Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı. 2004-2006 Yılları Türkiye Kanser İnsidansı. <http://www.kanser.gov.tr/folders/file/8iL-2006-SON.pdf>
- Torlakovic, E., E. Skovlund, et al. (2003). "Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps." Am J Surg Pathol **27**(1): 65-81.
- Vakiani, E. and D. B. Solit (2011). "KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers." J Pathol **223**(2): 219-29.
- van Krieken, J. H., A. Jung, et al. (2008). "KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program." Virchows Arch **453**(5): 417-31.
- Vaughn, C. P., S. D. Zobell, et al. (2011). "Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer." Genes Chromosomes Cancer **50**(5): 307-12.
- Velho, S., C. Moutinho, et al. (2008). "BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis?" BMC Cancer **8**: 255.
- Venkatachalam, R., M. J. Ligtenberg, et al. (2010) "The epigenetics of (hereditary) colorectal cancer." Cancer Genet Cytogenet **203**(1): 1-6.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, et al. (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." N Engl J Med **319**(9): 525-32.
- Wagner, P. L., Y. T. Chen, et al. (2008). "Immunohistochemical and molecular features of sporadic and FAP-associated duodenal adenomas of the ampullary and nonampullary mucosa." Am J Surg Pathol **32**(9): 1388-95.
- Winawer, S. J., R. H. Fletcher, et al. (1997). "Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale." Gastroenterology **112**(2): 594-642.
- Woodford-Richens, K. L., A. J. Rowan, et al. (2001). "SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9719-23.
- Worthley, D. L., V. L. Whitehall, et al. (2007). "Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer." World J Gastroenterol **13**(28): 3784-91.

Wu, J. M., E. A. Montgomery, et al. (2008). "Frequent beta-catenin nuclear labeling in sessile serrated polyps of the colorectum with neoplastic potential." Am J Clin Pathol **129**(3): 416-23.

Yang, S., F. A. Farraye, et al. (2004). "BRAF and KRAS Mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status." Am J Surg Pathol **28**(11): 1452-9.

Yuen, S. T., H. Davies, et al. (2002). "Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia." Cancer Res **62**(22): 6451-5.