



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA KRAS VE BRAF GEN
MUTASYONLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. Orhan GÖRÜKMEZ

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2012



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA KRAS VE BRAF GEN
MUTASYONLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Orhan GÖRÜKMEZ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Tahsin YAKUT

BURSA -2012

İÇİNDEKİLER

Türkçe Özet	ii
İngilizce Özet	iii
Giriş	1
Gereç ve Yöntem	28
Bulgular	37
Tartışma ve Sonuç	47
Kaynaklar	56
Teşekkür	65
Özgeçmiş	66

ÖZET

Güncel bulgular KRK'li hastalarda K-ras ve BRAF gen değişikliklerinin potansiyel prognostik ve prediktif değerlerini göstermektedir. Bizim çalışmamızın amacı kolorektal kanserli hasta gurubunda K-ras ve BRAF genlerindeki mutasyonları tanımlamak ve çeşitli klinopatolojik parametrelerle ilişkisini değerlendirmektir.

Bu çalışmada, kolorektal kanser ve onların normal çevre dokularının alındığı 50 hastanın parafine gömülü doku blokları kullanılarak K-ras onkogeni kodon 12, 13, 61 ve BRAF onkogeni kodon 600 nokta mutasyonları ile tümörün klinikopatolojik karakteristiği araştırılmıştır. BRAF geni ve K-ras genindeki mutasyonlar doğrudan dizi analizi ile incelendi. İstatistiksel analizde $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

50 KRK'li hasta içinde %30 (n=15) K-ras mutasyonu saptadık. Kodon 12, kodon 13 ve kodon 61'deki mutasyon sıklıkları sırasıyla %22 (11/50), %6 (3/50) ve %2 (1/50) idi. BRAF mutasyonları nadirdi ve sadece bir hasta kodon 600 mutasyon taşıyıcısıydı.

Sonuçlarımız tümör lokalizasyonunun K-ras gen mutasyonu ile anlamlı ilişki gösteren tek faktör olduğunu gösterdi. Yaş, cinsiyet, tümör diferansiyasyonu, tümör morfolojisi ve evre gibi diğer klinopatolojik özellikler K-ras gen mutasyonları ile pozitif ilişki göstermedi.

Anahtar kelimeler: Kolorektal kanser, K-ras, BRAF, DNA dizi analizi

SUMMARY

Investigation of K-ras and BRAF Gene Mutations by Molecular Genetic Methods in Colorectal Cancer Patients

Recent evidence highlights the potential prognostic and predictive value of BRAF and K-RAS gene alterations in patients with colorectal cancer. The objective of our study was to identify and assess mutations in the K-ras and BRAF genes in a cohort of patients with colorectal cancer for their association with various clinicopathological parameters.

We investigated the clinicopathological characteristics and point mutations of K-ras oncogene codons 12, 13, 61 and BRAF oncogene codon 600 using paraffinembedded materials from cancerous and the surrounding normal tissues of 50 colorectal cancer cases. Mutations in the BRAF gene and the K-ras gene were examined by direct sequence analysis. In statistical analysis, the level of significance was set at $p < 0.05$.

Among the 50 colorectal cancer patients, we detected %30 (n=15) mutations in the K-ras gene. Mutation frequencies at codon 12, codon 13 and codon 61 were %22 (11/50), %6 (3/50) and (%2, 1/50) respectively. BRAF mutations were rare, and only one patient (%2) harbored a detectable mutation at codon 600.

Our results showed that tumor location was the only factor that showed an obvious relationship with K-ras gene mutation. Other clinicopathological features, such as age, gender, tumor differentiation, tumor morphology, and stage, showed no positive relationship with K-ras gene mutations

Key Words: Colorectal cancer, K-ras, BRAF, DNA sequencing analysis

GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK) tüm dünyada en önemli sağlık sorunlarından biridir (1). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2008 yılı verilerine göre her yıl yaklaşık olarak 7,6 milyon insan kanser nedeniyle ölmektedir. Bu sayı dünyadaki tüm ölümlerin yaklaşık olarak %13' ünü oluşturmaktadır. KRK nedeniyle her yıl yaklaşık olarak 610.000 insan ölmektedir ve kanserle ilişkili ölümler arasında dördüncü sırada yer almaktadır (2).

T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Daire Başkanlığı'nın (TCKSDB) 2004-2006 yılları arasında yaptığı istatistiklere göre KRK, yaşa standardize insidans hızı bakımından akciğer kanseri ve meme kanserini takiben üçüncü sırada yer almıştır. Yerleşim yerine göre ise erkeklerde KRK sırasıyla akciğer, prostat ve mesane kanserlerini takiben dördüncü sırada yer alırken, kadınlarda meme kanserini takiben ikinci sırada yer almıştır (3).

KRK'lerin prevalansı her iki cinsiyette birbirine eşittir. Hastaların büyük bölümü 60 yaş üstündedir ve genellikle aile öyküsü yoktur. Sporadik hastalarda ileri yaş ve diyet önemli risk faktörleridir. Herediter KRK'ler tüm olguların %5'ini oluşturmaktadır. KRK'lerin tamamına yakını adenomalardan kaynaklanmaktadır (1).

KRK onkogenlerin aktivasyonu (Ras v.b), tümör süpresör genlerin inaktivasyonu (APC, Tp53, DCC v.b) ve DNA tamir genlerinin bozulması sebebiyle oluşmaktadır (4). KRK'lerin patogenezinde genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin etkileşimi söz konusudur. Genetik yatkınlığı olanlarda çevresel faktörlerin etkisiyle kanser gelişme riskinin arttığı ortaya konmuştur (5).

Etiyolojide çok sayıda faktörün rol oynadığı düşünülmekle birlikte, kesin neden bilinmemektedir. Buna karşılık hastaların çok az bir kısmında kalıtsal geçiş sorumludur. K-ras geni, KRK gelişiminde genetik yollardan biri olan tümör baskılayıcı yolda yer alan bir protoonkogendir (6). KRK'lerin yaklaşık %20-50'sinde K-ras mutasyonu bulunmaktadır. KRK'de gözlenen en yaygın mutasyonlar K-ras geninin 12. ve 13. kodonları üzerindedir (7). Kodon

12, 13 veya 61'deki mutasyonlar ras protoonkogenlerinin onkogenlere dönüşmesine neden olur. Sonuç olarak otonom hücre büyümesi ve çoğalması meydana gelir. Ras gen mutasyonlarının KRK oluşumunda başlatıcı olay olduğu düşünülmüş, ras gen mutasyonlu adenomların ras gen mutasyonsuz adenomlardan daha hızlı ilerleyerek tümöre yol açtığı saptanmıştır (6).

BRAF onkogeni serin protein kinaz ailesinden RAF'a ait proteini kodlar. Bu protein hücre bölünmesi, diferansiyasyonu ve sekresyonunda önemli olan 'Mitojen Akive Protein Kinaz' (MAPK)/Erk sinyal yolağının düzenlenmesinde önemli role sahiptir. KRK'lerin yaklaşık %9-11'inde BRAF mutasyonu bulunmaktadır. BRAF geninde en sık saptanan mutasyonlar kodon 600 üzerindedir (7).

Metastatik KRK'lerin tedavisinde son yıllarda 'Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü' (EGFR) sinyal iletisini engelleyen ajanlar klinikte kullanılmaya başlanılmıştır. EGFR'yi hedef alan yeni monoklonal antikor ajanlar tedavide kullanılmaktadır. Bu ajanlar setuksimab ve panitumumab olarak bilinmektedir (8,9). K-ras mutasyonu setuksimab ve panitumumab ile tedaviye yanıt vermeyen hastaların %30-40'ında saptanmıştır (10-12). Ayrıca BRAF V600E mutasyonu saptanmış olan hastaların anti-EGFR ile tedaviye yanıtızsız oldukları bulunmuştur (13,14).

Kolorektal Kanser (KRK)

Epidemiyoloji

Tüm dünyada her yıl 1 milyondan fazla insan KRK tanısı almaktadır. Gelişmiş ülkelerde hastalığa özgü mortalite yaklaşık olarak %33 oranındadır (15). Avrupa'da gastrointestinal sistem kanserleri en sık kanserlerdir; bunların yarısından fazlası kolondan kaynaklanır ve yaklaşık olarak her yıl 250.000 yeni KRK tanısı konmaktadır. Bu da tüm malignitelerin %9'unu oluşturmaktadır (16). KRK'ler, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) akciğer kanserlerinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (17). Gelişmiş ülkelere oranla daha yüksek insidans oranları

gözlenmektedir. KRK vakalarının üçte birinden azı gelişmekte olan ülkelerde ortaya çıkmaktadır. İnsidans oranları Afrika'da ve Japonya dışındaki Asya ülkelerinde göreceli olarak daha düşüktür. Japonya, Avrupa ile benzer insidansa sahiptir. İnsidanstaki bu coğrafik farklılıklar temel olarak genetik yatkınlık üzerine eklenen diyet ve çevresel faktörlere bağlanmaktadır (18).

TCKSDB'nin 2004-2006 yılları arasında yaptığı istatistiklere göre KRK'in insidans hızı erkeklerde 100.000'de 17, kadınlarda ise 100.000'de 11,7 olarak saptanmıştır. KRK'ler yerleşim yerine göre erkeklerde %7 oranla dördüncü sırada, kadınlarda ise %7,9 oranla üçüncü sırada görülmektedir (3).

Etiyoloji

KRK'in gelişmesinde hem çevresel faktörler hem de genetik faktörler rol oynarlar. KRK'i, çevresel faktörlerin çok önemli katkı sağladığı genetik bir hastalık olarak tanımlamak mümkündür (19-21).

Çevresel Faktörler

Günümüzde KRK için tanımlanan en önemli risk faktörü beslenme alışkanlığı ve fiziksel aktivitedir (22). Diyet ve yaşam tarzı değişikliklerine uyum gösterilmesi halinde KRK sıklığının %50 oranında azaltılabileceği tahmin edilmektedir. Diyet içeriği ne olursa olsun, toplam enerji tüketimi KRK gelişimi ile pozitif yönde bağlantılıdır. Sigara kullanımı ile başta bira olmak üzere alkol tüketimi KRK riskini artırmaktadır (23). Ağır alkol alanlarda KRK riski hafif içicilere kıyasla 60 kat artmıştır. Sigara içenlerde KRK riskinin hiç içmeyenlere göre 16 kat arttığı belirlenmiştir (24). 'Batı Tipi' yani kırmızı etten zengin, dolayısıyla yağ oranı yüksek, lif oranı düşük beslenmenin KRK oluşumunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Ancak son veriler düşük yağlı diyetlerin sağladıkları diğer sağlık avantajlarına rağmen KRK oluşumuna etkilerinin olmadığını göstermiştir. Diyetteki lif oranının rolü tartışmalıdır. Meyve ve sebze ağırlıklı beslenmenin KRK gelişimini engelleyip engellemediği hakkındaki araştırmalar devam etmektedir (23). Aşağıda KRK etiyojisinde etkili olan çevresel faktörler özetlenmiştir (Tablo-1).

Tablo-1: KRK sıklığını arttıran ve azalan faktörler (25).

SIKLIĞI ARTTIRANLAR	SIKLIĞI AZALTANLAR
Fazla doymuş yağ ve kırmızı et tüketimi Sigara kullanımı Erkek cinsiyet Alkol kullanımı Sedanter yaşam VKİ artışı ve Abdominal Obezite	Folat ağırlıklı vitamin ve fiberden zengin diyet Kolonoskopi ile adenomatöz poliplerin alınması Postmenopozal hormon replasmanı NSAİ ilaç kullanımı

VKİ; Vücut kitle indeksi, **NSAİ;** Non steroid anti inflamatuvar

Genetik Faktörler

KRK'ler çoğunlukla sporadik olarak gözlenirken, %25'lik kısmında aile öyküsü mevcuttur. Vakaların %5-6'lık kısmı ise major genlerdeki kalıtsal mutasyonlar sonucunda oluşmaktadır (26).

Major KRK Genleri ve Sendromlar

Familyal Adenomatöz Polipozis (FAP)

Genellikle yaşamın ilk dekatından sonra kolon ve rektumda oluşan poliplerle (sayısı yüzlerce-binlerce olan) karakterize, otozomal dominant (O.D) kalıtım tipine sahip ve diğer faktörlerden bağımsız olarak 40'lı yaşlarda KRK gelişimine neden olan bir sendromdur. Tüm KRK olgularının %1'inden daha azını oluşturur. Avupa'daki sıklığı 1/11300-1/37600 arasında değişmektedir. FAP, osteoma, diş problemleri, konjenital retinal pigment epitel hipertrofisi ve kolon dışı tümörler (desmoid tümörler, mide tümörleri, düodenum/ince barsak tümörleri, troid kanserleri, pankreas tümörleri, hepatoblastom ve santral sinir sistemi tümörleri) gibi bulgularla birliktelik gösterebilir.

Attenüe Familyal Adenomatöz Polipozis Sendromu (AFAP), FAP sendromunun daha selim formudur. Sayısı 10 ile 100 arasında değişen daha az sayıdaki kolorektal adenomatöz poliplerle karakterizedir. Poliplerin oluşumundan sonra tüm yaşam boyunca yaklaşık olarak %69 oranında KRK

gelişme riski vardır. Duodenum/periampüller bölge tümörleri ve troid kanserleri gibi bazı kolon dışı tümörler AFAP sendromuna eşlik edebilir (26, 27).

Gardner Sendromu, FAP sendromunun bir varyantıdır. Gastrointestinal polip, osteoma, diş problemleri, desmoid tümörler ve epidermoid kistler gibi çok sayıda bulgunun eşlik ettiği bir sendromdur (28).

Turcot sendromunda kolorektal polipozis ile birlikte merkezi sinir sistemi (MSS) maligniteleri mevcuttur. Olguların 2/3'ünde APC (Adenomatöz Polipozis Koli) geninde mutasyon vardır. Diğerlerinde ise Herediter Non Polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC) olgularında olduğu gibi DNA (Deoksiribonükleik Asit) tamir genlerinde (MMR; Mismatch Repair Gen) mutasyon söz konusudur. MSS bulguları arasında medulloblastoma, glioblastoma ve ependimoma sayılabilir (23).

FAP, AFAP, Gardner ve Turcot sendromları kromozom 5q21 bölgesinde yerleşimli, tümör süpressör bir gen olan APC genindeki germline mutasyonlar sonucunda oluşmaktadır (29). Ailesel sendroma sahip hastalar APC geninin mutant bir kopyasını geçirirler; diğer APC alelinde işlev kaybına neden olan bir mutasyon geliştiğinde mukoza epitel hücrelerinin büyümesi normal olarak kontrol edilemez ve polip gelişir (23).

Hastalığın şiddeti ve kolon dışı tutulum özellikleri APC genindeki mutasyonun lokalizasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Kodon 1250 ve 1464 arasındaki mutasyonlarda çok sayıda polip (1000 ve üzeri) saptanmıştır. Kodon 157'den önceki ve kodon 1595'ten sonraki mutasyonlar ile ekzon 9'daki alternatif bağlantı bölgelerinin mutasyonları AFAP ile ilişkili bulunmuştur. APC geninin tekrar bölgelerindeki mutasyonlar ara bir fenotip oluşturur (100 ile 1000 arasında adenomun olduğu). Kodon 311 ve 1444 arasındaki mutasyonlar, retinal pigment epitel hipertrofisi ve desmoid tümörler ile ilişkili bulunmuştur (30).

MUTYH (MutY homolog gen) İlişkili Polipozis Sendromu

KRK gelişme riski yüksek olan ve kolorektumda çok sayıda adenomatöz polipin varlığı ile karakterize otozomal resesif (O.R) kalıtılan bir sendromdur. Önemli gastroenterolojik bulguları FAP ile ortaktır. MUTYH

ilişkili polipozis sendromunun kolonik özellikleri AFAP'ı taklit eder ve adenomların sayısı 100'e kadar değişmektedir. Duodenal ve ekstraintestinal kanser oluşumu gözlenebilir (26, 31).

MutY homolog geni kromozom 1p yerleşimli olup DNA tamir mekanizmasından sorumlu proteinleri kodlamaktadır. Hastalığın gelişmesinde MUTYH genindeki iki mutasyon; Tyr165Cys (kodon 165'te trozinin sisteine dönüşmesi) ve Gly382Asp (kodon 382'de glisinin aspartata dönüşmesi) mutasyonları yaygın olarak gözlenmektedir (32).

Lynch Sendromu (Hereditör Non-Polipozis Kolorektal Kanser Sendromu)

O.D olarak kalıtılan ve MMR (mismatch repair genes; hata onarım genleri) genlerindeki mutasyonlar sonucunda oluşan bir sendromdur. En sık gözlenen hereditör KRK sendromudur. KRK sendromlarının yaklaşık olarak %3'ünü oluşturmaktadır. Polipozis nadirdir. Lynch sendromu (LS) ile ilişkili genlerde mutasyon taşıyıcısı olan bireylerin tüm yaşamları boyunca KRK'e yakalanma riskleri %80'dir.

LS'de gelişen kolon kanserleri genellikle sağ tarafta lokalizedir. Sıklıkla müsinöz veya taşlı yüzük hücre morfolojisi gösterirler. Tümör çevresinde lenfoid agregatlar ve lenfosit infiltrasyonu karakteristik olup artmış mikrosatellit instabilitesi gösterirler (33).

HNPCC için 1990 yılında uluslararası katılımın olduğu bir toplantı ile Amsterdam'da tanı kriterleri oluşturulmuştur; Amsterdam kriterleri olarak bilinmektedir (Tablo-2). Bu kriterler LS'lu ailelerin belirlenmesi amacıyla genel bir yaklaşım sağlamıştır. Ancak bu kriterleri taşımayan fakat bir takım germline MMR gen mutasyonları taşıyan aileler bildirilmiştir. Bu nedenle kapsamlı olarak sayılmamış ve 1999 yılında bu sorunları çözmek ve klinik olarak LS tanısını geliştirmek için kriterler geliştirilerek revize edilmiştir; Amsterdam kriterleri II olarak bilinir (Tablo-2).

Tablo-2: Amsterdam ve Amterdam II Kriterleri (34).

Amsterdam Kriterleri	Amsterdam Kriterleri II
<ul style="list-style-type: none">- 50 yaşından önce KRK tanısı almış aile bireyi- Etkilenmiş iki nesil- Etkilenmiş üç akraba; bunlardan biri diğer ikisinden biriyle birinci derece akrabalığı olmalı- FAP ekarte edilmeli-Tümörlerin patolojik inceleme ile doğrulanması gereklidir.	<ul style="list-style-type: none">-LS ilişkili kanser (KRK veya endometrium, ince barsak, üreter veya renal pelvis kanseri) tanısı almış en az üç akraba.-Bireylerden biri diğer ikisinin birinci derece akrabası olmalı-En az ardışık iki nesilde etkilenme-En az bir birey 50 yaşından önce tanı almalı-KRK tanılı bireylerde FAP ekarte edilmeli-Tümörlerin patolojik inceleme ile doğrulanması gereklidir.

KRK; kolorektal kanser, **FAP**; familial adenomatöz polipozis, **LS**; lynch sendomu

Amsterdam kriterlerinin dışında LS'li bireyleri saptamak için daha katı kuralları olan Bethesda kriterleri de kullanılmaktadır (Tablo-3) (34-36).

Tablo-3: Bethesda Kriterleri (36).

Bethesda Kriterleri
<ul style="list-style-type: none">- 50 yaşından daha genç birisinde tanısı konmuş KRK- Senkron, metakron kolorektal ya da diğer LS ilişkili tümörlerin varlığı- 60 yaşından daha genç bir bireyde MSI-H özelliği gösteren KRK varlığı; tümör infiltrasyonu gösteren lenfosit varlığı, Crohn benzeri lenfositik reaksiyon, müsinöz/taşlı yüzük morfolojisi veya medüller büyüme paterni.- 50 yaşından daha genç birinci derece akrabasında tanısı konmuş KRK veya LS ilişkili tümör varlığı- Herhangi bir yaşta birinci veya ikinci derece iki akrabasında tanısı konmuş KRK veya LS ilişkili tümör varlığı

KRK; kolorektal kanser, **LS**; lynch sendomu, **MSI-H**; Yüksek derece mikrosatellit instabilite

HNPCC iki alt gruba (Lynch family I ve Lynch family II) ayrılmaktadır. Lynch I sendromu; O.D kalıtılan, erken başlangıç gösteren, baslıca sağ tarafta lokalize ve sıklıkla birden çok kolon kanserinden oluşma özelliği gösteren bir sendromdur. Lynch II sendromu; Lynch I sendromuna ek olarak endometriyum, meme, over ve mide kanserleri gibi kolon dışı kanserlere eğilim gösterir. (37, 38)

LS ile ilişkili genler; MSH2 (mutS homolog2) kromozom 2p16 bölgesinde, MLH1 (mutL homolog1) kromozom 3p21 bölgesinde, MSH6 (mutS homolog6) kromozom 2p16 bölgesinde ve PMS2 (Postmeiotic segregation2) kromozom 7p22 bölgesinde yerleşimlidir (Tablo-4). MSH2 ve MLH1 genlerindeki mutasyonlar daha sık görülmektedir. Bu genler DNA replikasyonu sırasında oluşan küçük insersiyon, delesyon ve yanlış baz eşleşmelerinin tamirinden sorumlu olan MMR proteinlerini kodlarlar. Bu genlerdeki mutasyonlar tümör hücrelerindeki mikrosatellit instabilite (MSI) açısından önemlidir (33). Mikrosatellit dengesizliklerin bulunduğu tümör hücrelerinin küçük nükleotid tekrarları içeren genlerindeki mutasyon oranları yüksektir. HNPCC olgularında MSI fenotipine bağlı olarak en sık mutasyona uğrayan gen 'Transforming Growth Faktör-β' tip II resptörüdür (TGFR). Bu resptör normal epitel hücresi büyüme ve farklılaşmasını düzenleyen en önemli bileşenlerdendir (23).

Muir-Torre sendromunun (MTS) LS'nin bir varyantı olduğu düşünülmektedir. O.D kalıtım tipi gösterir. Sıklıkla MSH2 ve MLH1 genlerindeki germline mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Sporadik olgular da bildirilmiştir. Nadir bir sendrom olup, en az bir yağ bezi neoplazmı ve en az bir visseral malignite eşlik etmektedir. Sebaceöz adenomlar, karsinomlar ve epitelyomalar MTS'nin karakteristik galandüler tümörleridir. MTS ile ilişkili en yaygın visseral maligniteler kolorektal bölgeden ve genitoüriner bölgeden kaynaklanmaktadır. Bu visseral maligniteler sanıldığı kadar aksine daha iyi prognozludur (39).

Hamartomatöz Polipozis Sendromları (Peutz-Jeghers Sendromu, Juvenil Polipozis Sendromu, Miks Polipozis Sendromu ve Diğerleri)

Peutz-Jeghers sendromu özellikle çocukluk çağında görülen, gastrointestinal kanalda gelişen hamartomatöz polipler, dudak mukozası, yanak mukozası ve ağız çevresinde gelişen pigmente mukokutanöz lezyonlarla karakterize O.D kalıtılan bir sendromdur. Prevalansı 1/8300 ile 1/280000 arasındadır. Farklı kanser türlerine (gastrointestinal, pankreatik, akciğer, meme, uterus, over ve testis) yatkınlık oluşturur (40, 41). Klinik olarak tanı alan hastaların büyük kısmında, kromozom 19p13.3 üzerinde yer

alan ve serin treonin kinaz (STK) proteinini kodlayan tümör süpresör STK11 geninde mutasyonlar tespit edilmiştir (42).

Juvenil poliposis sendromu (JPS) erken başlangıçlı, nadir görülen ve gastrointestinal kanal boyunca hamartomatöz polip oluşumuyla karakterize bir sendromdur . Yaşam boyunca KRK gelişme riski %39'dur . O.D kalıtılmaktadır. Hastaların %15 ile %20'sinde kromozom 18q21.1'de yerleşimli olan SMAD/DPC4 (deleted in pancreatic cancer lokus 4) geninde mutasyonlar tespit edilmiştir. SMAD/DPC4 geni TGF-beta sinyal yolağında kritik stoplazmik mediyatörlerin sentezinden sorumludur. Hastaların %25 ile %40'ında kromozom 10q22-23 yerleşimli BMPR1A (bone morphogenetic protein receptor 1A) geninde mutasyonlar saptanmıştır. Sporadik olgular da bildirilmiştir (25).

Cowden sendromu nadir görülen, O.D geçiş gösteren, cilt ve müköz membranlarda çok sayıda hamartomatöz poliple karakterize bir sendromdur. Gastrointestinal polipler, yüzde trikolemmomalar, ağızda papillomalar, el ve ayaklarda keratoz görülmektedir (23). Polipler sıklıkla rektosigmoid bölgede yerleşmiştir. Nadiren KRK gelişir. Bununla birlikte hastaların yaklaşık %10' unda tiroid tümörleri ve yaklaşık %50'sinde meme tümörleri gelişir. Germline PTEN (phosphatase ve tensin homolog) mutasyonları bildirilmiştir (4).

Tablo-4: Major kolorektal kanser genleri ve ilişkili sendromlar (25).

GEN veya GENLER	İLİŞKİLİ SENDROM	KALITIM ŞEKLİ	KRK GELİŞME SIKLIĞI
<i>APC</i>	FAP	O.D	%100
<i>APC</i>	AFAP	O.D	%69
<i>MUTYH</i>	MAP	O.R	%80
<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, TACSTD1 (EpCAM)</i>	LS	O.D	%80
<i>STK11</i>	PJS	O.D	%39
<i>SMAD4 (DPC4), BMPR1A</i>	JPS	O.D	%39
<i>PTEN</i>	CS	O.D	NADİR

Adenomlar

Polip, mukozal yüzeyden barsak lümenine doğru çıkan gözle görülebilir büyüklükte, stromal hücre kitlesi olarak tanımlanır (23). Polipler patolojik olarak nonneoplastik hamartom (juvenil polip), hiperplastik mukozal proliferasyon (hiperplastik polip) ve adenomatöz polip olarak sınıflandırılır. Daha çok adenomların premalign olduğu düşünülmektedir. Toplum taramaları ve otopsi incelemeleri orta yaş ve yaşlıların %30'undan fazlasında adenomatöz polip bulunabildiğini göstermiştir; ancak bu poliplerin %1'inden azı maligndir (17). Adenomlar histolojik açıdan üç ana gruba ayrılır. Bunlar; tübüler adenomalar, villöz adenomalar ve tübülövillöz adenomalardır. En sık rastlanılan ve kolonoskopilerde çıkartılan adenomaların %70-85'i tübüler, %5'inden azını villöz adenomalar, %10-25'ini tübülövillöz adenomalar oluşturur. Adenomlarda malignite riski histolojik yapı, boyut ve epitel displazisinin derecesine bağlıdır (37). Villöz adenomlarda kanser bulunma riski %40 iken; tübülövillöz adenomlarda %22, tübüler adenomlarda ise %5'dir (43). Çapı > 2cm ise karsinoma riski %40 düzeyindedir. Yüksek dereceli displazide karsinoma dönüşme oranı %27'dir (23).

İnflamatuvar Barsak Hastalıkları

Ülseratif kolit zemininde displazinin saptanması erken kanser gelişiminin en önemli belirtecidir (23). Ülseratif kolitli hastalarda hastalığın süresi ile ilişkili olarak KRK riskinin ilk 10 yılda yaklaşık %3, 10-20 yılda %20, 30 yıldan sonra ise %30'dan daha fazla arttığı hesaplanmaktadır (44-46). Crohn hastalığında da ülseratif kolitten daha az olmakla birlikte kanser riski artmıştır (47).

Ailesel Kolorektal Kanser

KRK'ler çoğunlukla sporadik olarak gözlenirken, %25'lik kısmında aile öyküsü mevcuttur (48). Ailevi KRK vakalarında risk ailede kanser olgusunun görülme yaşı ve etkilenen birinci derece akraba sayısı ile ilişkilidir (49). Birinci derece iki akrabasında KRK varsa risk 5-6 kat artar (23). 45 yaşından önce birinci derece akrabada kanser öyküsü olan kişilerde KRK riski 5.37 kat artmaktadır (50).

Klinik Bulgular ve Tanı

Kolorektal adenokarsinomlar yıllarca klinik olarak sessiz kalabilir. Belirtiler aylar, hatta yıllar boyunca yavaş yavaş ortaya çıkmaktadır (23). KRK'lerde semptom ve bulgular tümörün lokalizasyonu, makroskopik yapısı, tümörün yayılım derecesi ile kanama, perforasyon ve tıkanma gibi komplikasyonların oluşumuna göre değişir (51).

Genellikle görülen klinik bulgular şunlardır; dışkılama alışkanlığında değişiklik, anüsten kanama, rektal akıntı şeklinde veya dışkıyla karışık mukus sekresyonu, dışkının özelliklerinde ve çapında değişiklik, tenezm, karın ağrısı ve anorektal ağrı, distansiyon, obstrüksiyon, tümör perforasyonu, abse, fistül, kilo kaybı, halsizlik, iştahsızlık ve anemi görülmektedir (52).

Gayta ileoçekal valvden sağ kolona nispeten daha sıvı halde geçtiğinden çıkan kolon ve çekum kaynaklı kanserler herhangi bir obstrüktif semptom veya barsak alışkanlığında fark edilebilir değişikliğe yol açmadan daha büyük boyutlara ulaşabilir. Sağ kolon lezyonları genellikle ülser olup gaytanın görünümünde değişiklik yapmaksızın kronik, sinsi kan kaybına yol açar. Sonuç olarak çıkan kolon tümörlü hastalarda sıklıkla halsizlik, çarpıntı ve hatta anjina pektoris gibi semptomlar bulunur ve bu hastalarda demir eksikliğini işaret eden hipokrom mikrositer anemi saptanır. Kanser, aralıklı olarak kanama yaptığından rastgele yapılan gayta gizli kan testi negatif olabilir. Sonuç olarak herhangi bir erişkinde açıklanamayan demir eksikliği anemisinin varlığı (premenapozal multipar kadınlar istisna) kolonun tümünün endoskopik ve/veya radyografik olarak incelenmesini zorunlu kılar .

Gayta transvers kolon ve inen kolondan geçerken daha konsantre hale geldiğinden buradan kaynaklanan tümörler pasaja engel olur, abdominal kramp gelişimi, ara sıra obrtrüksiyon ve hatta perforasyona neden olurlar. Batın radyografileri sıklıkla karakteristik anüler ve daralmış lezyonları gösterir.

Rektosigmoid bölgeye yerleşmiş kanserler sıklıkla hematokezya, tenesmus ve gayta çapında incelleme ile beraberdir. Anemi nadir bir bulgudur. Bu semptomlar hastalar ve doktorları hemoroid şüphesine götürebilirken,

rektal kanama ve/veya barsak alışkanlığında değişiklik gelişmesi acil dijital rektal muayene ve prokto-sigmoidoskopiye mecbur kılar (17).

KRK'lerin tanısında öykü, fizik muayene, laboratuvar ve radyolojik tetkiklerin akılcı kullanımı önem taşır. Öyküde daha önceden KRK, adenomatöz polip, inflamatuvar barsak hastalığı, kalıtsal KRK sendromları ve birinci derece akrabalarda KRK bulunup bulunmadığının soruşturulması gerekmektedir (23).

Rektal muayene anal kanaldan itibaren 7 cm mesafede bulunan lezyonların saptanmasında oldukça yararlıdır. Tüm KRK'lerin yaklaşık %20'si bu bölgede yerleştüğinden rektal muayene fizik muayenenin bir parçası olarak mutlaka yapılmalıdır (53). Fizik muayene ile ele gelen kitle, rektumda taze kan bulaşığı (genellikle sol kolon kanserlerini) veya melena (sağ kolon kanserlerinde) ve gizli kanama bulgusu olarak gaitada gizli kan saptanabilir. Adenopati, hepatomegali, sarılık ve pulmoner bulgular metastaza bağlı olarak saptanabilir (5).

KRK'li hastaların rutin kan sayımında anemi varlığı tespit edilebilir (54). KRK'li hastaların tanısında dışkıda gizli kan saptanması neoplazi varlığına dair kuşkuyu artırır ancak testin negatif olması lezyon bulunmadığı anlamına gelmez ve ileri araştırmalar sonlandırılmaz. Kolonik mukozanın en sağlıklı araştırılması ve şüpheli lezyondan biyopsi alınması kolonoskopi sayesinde olur. Hastaların %95'inde çekuma kadar tam bir inceleme yapılabilir (55). Kolonoskopi KRK'lerin tanısında altın standarttır. Çift kontrast baryumlu kolon grafisi kolonun primer ve senkron tümörlerinin tespitinde kullanılmaktadır (54). Çift kontrast kolon grafisi kolonoskopiye seçenek bir tetkik yöntemi olsa da küçük lezyonları kaçırabilir. Ancak kolonoskopi uygulaması mümkün değilse, teknik olarak güçlük arz ediyorsa ya da hasta reddediyorsa bu tetkik halen büyük adenomları ve kanserleri saptamada oldukça doğru bir yöntemdir. Kolonoskopun geçemediği darlıkların proksimalini de araştırmak mümkündür (55). Serum CEA düzeyleri kolorektal kanserler için spesifik olmamakla birlikte cerrahi öncesi bazal değeri ile birlikte değerlendirildiğinde cerrahi sonrası tümör rekürrensi veya metastaz varlığı açısından takipte kullanılmaktadır. Endorektal ultrasonografi veya

endorektal coil ile yapılan manyetik rezonans görüntüleme (MR) ile tümörün barsak duvarındaki invazyon derinliği ve lenf nodu tutulumu tespit edilebilir. Bilgisayarlı tomografi (BT) uzak metastazların tespiti, kitlenin komşu organlarla ilişkisi ve lenf nodu tutulumu ile ilgili bilgi verir. Pozitron emisyon tomografisi (PET), pahalı bir yöntem olup BT ve MR'de rekürrens ya da skar dokusu ayırımı yapılamayan hastalarda kullanılmaktadır (56).

Tarama

KRK erken tanı konulduğu takdirde tedavi edilebilir olduğu için tarama testleri çok ilgi uyandırmıştır. Geniş asemptomatik nüfusun araştırılması amacıyla yapılan tarama testleri dışkıda gizli kan testi ve sigmoidoskopi üzerine yoğunlaşmıştır. 50 yaşın üzerindeki kişilerde dışkıda gizli kan testinin rutin olarak yapılması birçok dernek tarafından önerilmektedir (55). Rijid rektoskop ile KRK'lerin taramasında önemli yer tutar. Rijid rektoskopi ile görülen yaklaşık 25 cm'lik bölümde KRK'lerin %35 ile 45'i tespit edilebilmektedir (54). Fleksibl sigmoidoskopi ile daha uzun bir mesafe (60 cm) ve mukoza alanı daha iyi görülür. Güncel öneri 50 yaşın üzerindeki her asemptomatik bireye 5 yılda bir tarama amaçlı fleksibl sigmoidoskopi uygulanmasıdır. Adenomatöz polipleri ve KRK'leri saptamada en etkili tarama yöntemi kolonoskopidir ancak prospektif randomize klinik çalışmalarda toplanan yeterli veri bulunmamaktadır (55).

Evreleme

1930'lu yıllarda temel olarak rektal kanser klasifikasyon şemaları üzerinde çalışan Cuthbert Dukes isimli İskoçyalı bir patolog kendi adı ile anılan bir klasifikasyon sistemi geliştirdi. Bu sınıflandırma ameliyat materyalinin patolojik değerlendirilmesine bağlı bir sınıflandırmaydı. Bu sınıflandırma (Tablo 5) A, B, C olmak üzere 3 grup içermekte idi .

Tablo-5: Dukes sınıflandırması (57).

DUKES Sınıflandırması
A Barsak duvarına sınırlı, barsak duvarını aşmayan tümör
B Barsak duvarına infiltrate tümör
C Lokorejyonel lenf nodlarına yayılım
D Uzak metastaz varlığı (sonradan eklenmiştir)

Astler ve Coller tarafından 1954 yılında tekrar modifiye edilmiş ve lenf nodu pozitifliği dikkate alınmıştır. Astler Coller sınıflandırması Tablo 6'da gösterilmiştir (57).

Tablo-6: Astler-Coller Sınıflandırması (57).

ASTLER-COLLER Sınıflandırması
A Mukozada sınırlı tümör
B1 Lenf nodu metastazı olmadan muskularis propriyaya kadar tutulum
B2 Lenf nodu metastazı olmadan barsak duvarını aşan tümör tutulumu
C1 Barsak duvarını aşmamış tümör ile beraber lenf nodu metastazı
C2 Barsak duvarını aşmış tümör ile beraber lenf nodu metastazı
D Uzak metastaz varlığı

KRK evrelendirilmesinde günümüzde standart olarak kullanılan American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union Internationale Centrale Cancer (UICC) tarafından değerlendirilen tümör-nod-metastaz (TNM) klasifikasyonudur (58). Günümüzde KRK'de TNM evrelemesinin AJCC tarafından yapılan 6. basımı (Tablo-7) kullanılmaktadır (57, 59).

Tablo-7: Kolorektal kanserde tümör-nod-metastaz (TNM) evrelemesi (59).

KOLOREKTAL KARSİNOM TNM EVRELEMESİ					
Primer Tümör (T)					
TX Primer tümör saptanmamış					
T0 Saptanan tümör yok					
Tis Karsinoma insitu					
T1 Tümör submukozayı tutmuş					
T2 Tümör muskularis propriayı tutmuş					
T3 Tümör muskularis propiadan subserozaya yayılmış veya nonperitoneal perikolik veya perirektal tutulum					
T4 Tümörün direk organ veya yapılara ve/veya visseral peritoneumu perforer ederse					
Rejyonel Lenf Nodu (N)					
NX Rejyonel lenf nodu değerlendirilmemiş					
N0 Lenf nodu metastazı yok					
N1 1-3 rejyonel lenf nodu metastazı					
N2 4 veya daha fazla lenf nodu metastazı					
Uzak Metastaz (M)					
MX Uzak metastaz değerlendirilmemiş.					
M0 Uzak metastaz yok					
M1 Uzak metastaz var					
Evre	T	N	M	Dukes	Modifiye Astler Coller
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-2	N1	M0	C	C1
IIIB	T3-4	N1	M0	C	C2/C3
IIIC	Herhangi T	N2	M0	C	C1/C2/C3
IV	Herhangi T	Herhangi N	M1	-	D

Tedavi

KRK standart tedavisi primer tümörle birlikte, bölgesel lenf nodlarının ilgili lenfovasküler pedikülün cerrahi olarak çıkarılmasıdır. Küratif rezeksiyon için cerrahi sınırların da negatif olması gereklidir. Prognoz açısından barsak duvarı tutulumu ve komşu organlara yayılım önemlidir.

Evre 0 kolon kanserlerinin tamamı yüzeysel olup, lamina propria invazyonu dışında mukozada sınırlıdır. Yüzeysel olmasından dolayı, cerrahi tedavi yöntemi olarak lokal eksizyon ya da basit polipektomi, cerrahi sınır negatif olmak şartıyla yapılabilir. Lokal eksizyonla çıkarılması mümkün olmayan büyük lezyonlarda segmenter kolon rezeksiyonu önerilmektedir (60).

Evre I-II kolon kanserlerinde, cerrahi tedavi başarısının yüksek olması açısından geniş cerrahi rezeksiyon ve uç uca anastomoz önerilmektedir. Cerrahi sonrası kontrollere çağrılarak sistemik ya da rejyonel kemoterapi, radyoterapi ya da biyolojik tedavinin gerekliliği açısından hasta değerlendirilmelidir. Çoğu hastada adjuvan tedavi endikasyonu yoktur. Tek başına cerrahi uygulananlarla, cerrahi ve adjuvan 5-FU kemoterapisi alan hastalar arasında genel sağkalım açısından fark bulunmamıştır. (61)

Evre III kolon kanserlerinde önerilen strateji, geniş cerrahi rezeksiyon ve anastomozu takiben adjuvan kemoterapi uygulanmasıdır.

Evre IV kolon kanserleri, uzak metastazların var olduğu hastalık olarak kabul edilir. Karaciğer metastazlarının tedavisinde lokal bölgesel yaklaşım, hepatik rezeksiyonu ve intraarteriyel implante edilen port ya da pompalarla kemoterapi uygulanmasını içerir. Karaciğerde sınırlı 3 ya da daha az sayıda metastazın varlığında hepatik rezeksiyon yapılması, 5 yıllık sağkalım oranını %20-30 artırabilmektedir. (60, 62)

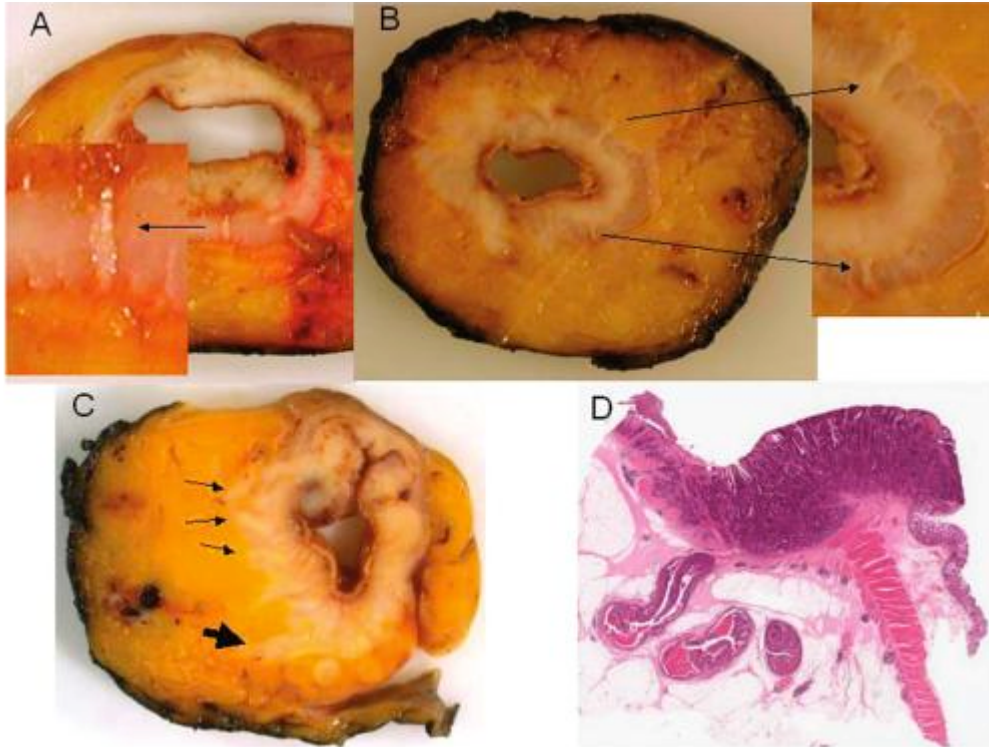
EGF (Epidermal büyüme faktörü), VEGF (Vasküler endotel kökenli büyüme faktörü) ve/veya onların reseptörlerinin KRK hücrelerinin otokrin/parakrin proliferasyonunda veya anjiogenez ve metastaz gelişiminde rol oynadıkları gösterilmiştir. İki monoklonal antikor Anti-VEGF (bevasizumab) ve Anti-EGFR (setuksimab) halen metastatik KRK tedavisinde kullanılmaktadır (63).

İnsanda birçok karsinom türünde EGFR ekspresyonu görülmektedir. KRK'li vakaların da yaklaşık %25-77'sinde EGFR ekspresyonu saptanmıştır. Metastatik KRK'lerde primer ve metastatik odakla uyumlu olarak olguların %20-50'sinde aktifleyici K-ras mutasyonları saptanmaktadır (64). Bu K-ras mutasyonları EGFR hedefli ajanlara karşı dirençlilikle ilişkilidir (65).

Patoloji

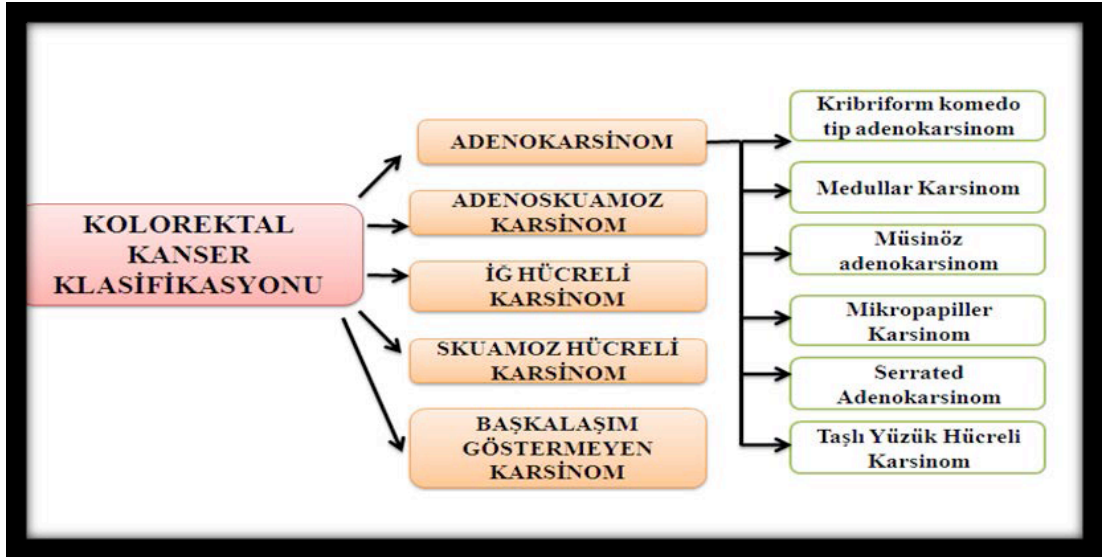
Kolon ve rektumdaki kanserlerin dağılımı şöyledir; %22 çekum/çıkan kolon, %11 transvers kolon, %6 inen kolon, %55 rektosigmoid, %6 diğer bölgeler.

Makroskopik olarak proksimal kolondaki tümörler polipoid, eksofitik kitleler halinde gelişme eğilimi gösterirler. Distal kolondaki karsinomlar tespit edildiklerinde anüler, barsağı halka biçinde saran lezyonlar şeklinde görülürler ve peçete halkası denen kontraksiyonlar (Şekil-1) oluştururlar (66).



Şekil-1: Kolorektal adenokarsinomun patolojik kesitleri. A) erken evre adenokarsinom B) vasküler invazyon C) yaygın vaküler tutulum D) vasküler tutulumun histopatolojik görünümü. Lezyonlar ilerleyerek barsak lümeninde kontraksiyonlar oluşturmuş (67).

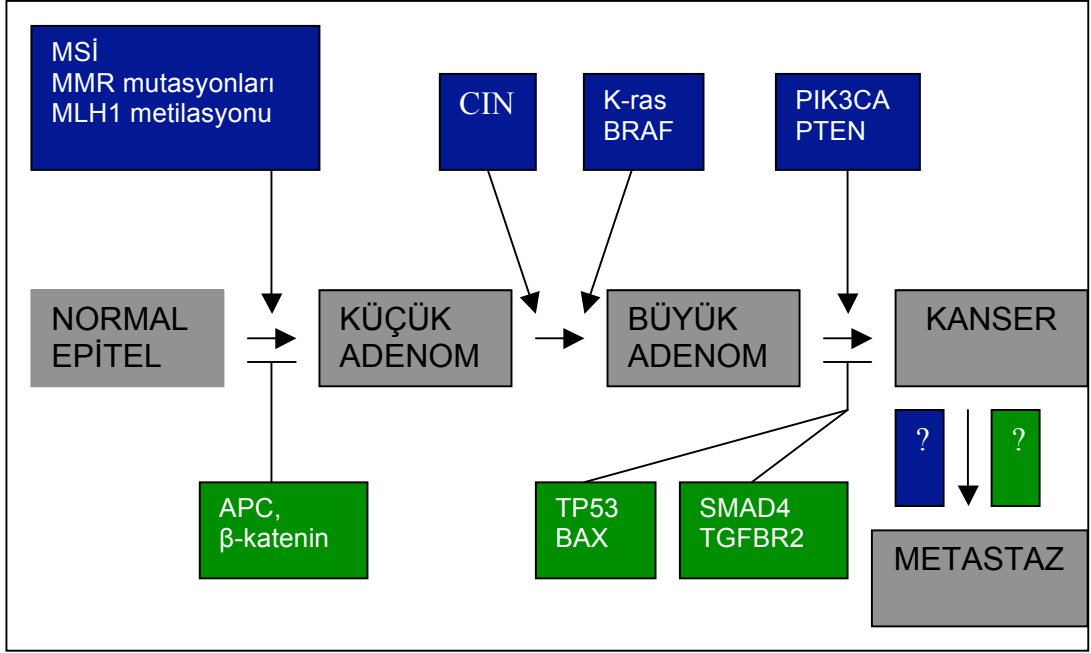
KRK'lerin %90'dan fazlası adenokarsinomdur. Adenokarsinomlar gland oluşturma yeteneği gösteren neoplastik epitelyal hücrelerden oluşurlar. Bu tümörler gland oluşturma yeteneklerine göre differansiasyon derecelendirilmesine tabi tutulurlar. Konvansiyonel adenokarsinomlardan başka varyantlar da mevcuttur; müsinöz adenokarsinoma, taşlı yüzük hücreli karsinoma, medüller karsinoma, serrated adenokarsinoma, kribriform-komodo tip adenokarsinoma, mikropapiller adenokarsinoma, adenoskuamöz karsinoma, işsi hücreli karsinoma ve andifferansiye karsinomadır (68). KRK'lerin histopatolojik sınıflandırması şekil-2'de gösterilmiştir.



Şekil-2: Kolektal kanser sınıflandırması (68)

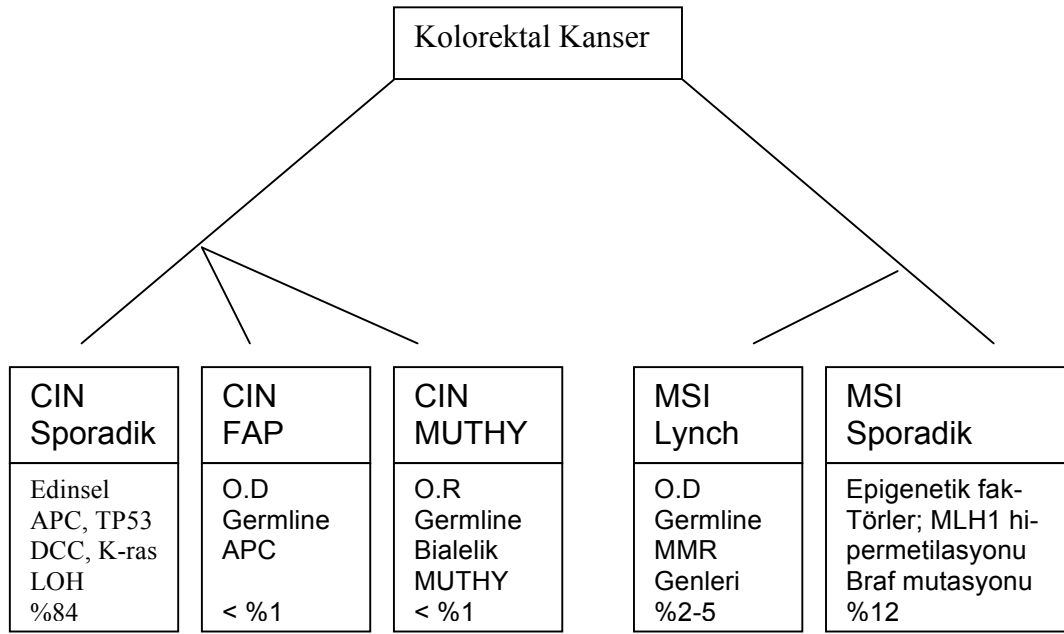
Karsinogenez

İyi tanımlanmış olan ailyal sendromların dışında KRK'lerin çoğu sporadik olarak meydana gelir (66). KRK'ler hücre migrasyonu, diferansiyasyonu, apoptozisi ve proliferasyonunun moleküler kontrol yollarında disregülasyonla sonuçlanan bir dizi genetik bozukluk (Şekil-3) sonucunda oluşmaktadır (69). Fearon ve Vogelstein'in önerdikleri model, KRK gelişiminde bir prototipik sekans örneği olarak herkes tarafından kabul edilmiştir. Bu modelin patolojik temeli adenom-karsinom sekansı olarak adlandırılmaktadır (66).



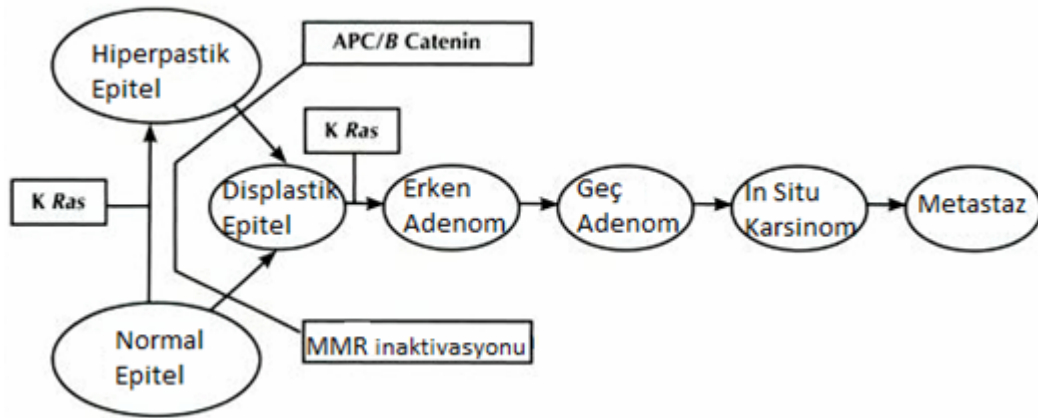
Şekil-3: Kolorektal kanser progresyonuna neden olan genetik bozukluklar. Mavi ile boyalı genlerin aktivasyonu, yeşil ile boyalı genlerin inhibisyonu kanser oluşumuna neden olmaktadır. Metastaza neden olan mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamıştır (70).

Kolorektal karsinogenezde genetik instabilitenin tipine bağlı olarak iki farklı moleküler gelişim modeli tanımlanmıştır (71). Bunlar; kromozomal instabilite arayolu ve DNA mikrosatellit instabilite arayoludur. (Şekil-3). Her iki yolakta da birbirini takip eden basamaklar halinde çok sayıda mutasyonun birikimi görülür. Rol oynayan genler ve mutasyonların birikim mekanizmaları farklıdır (66).



Şekil-4: Kolorektal kanser oluşumuna neden olan yollar ve ilişkili genler. Kromozomal instabilite yolağı (CIN) daha çok sporadik vakalarda gözlenirken, mikrosatellit instabilite yolağı (MSI) ise lynch sendromunda karşımıza çıkmakta (72).

Kromozomal instabilite (CIN) yolağı KRK'de meydana gelen en yaygın genetik bozukluktur ve tüm vakaların hemen hemen %85'inde tanımlanmıştır (73). APC/ β -katenin yolağı (Şekil-5) olarak da bilinen kromozomal instabilite yolağı bir seri onkogen ve tümör baskılayıcı gende adım adım basamaklı mutasyon birikimi ile karakterizedir (66).



Şekil-5: APC/ β -catenin yolağının kanser oluşumundaki rolü (74).

APC geni 5q21'de haritalanmıştır (66). APC genindeki kalıtsal mutasyonların gastrointestinal kanalda çok sayıda adenomatoz polipin gelişimiyle karakterize O.D bir bozukluk olarak bilinen FAP sendromu ile sonuçlandığı bilinmektedir. APC tümör süpresör bir gendir ve sporadik KRK lerin çoğunda ve ayrıca çok erken dönemlerde adenomların gelişiminde mutant formları tespit edilmiştir (75). Bu genin mutasyonu 1970'lerde Knudson tarafından geliştirilen 'ilk darbe' kavramını oluşturmaktadır (66). APC geni 2843 aminoasitten oluşan 312 kDa'lık mikrotübül demetlerini bağlayan ve hücre göçü ile adezyonunu kontrol eden büyük bir proteini kodlar (76). APC aynı zamanda Wnt/ β -katenin sinyal yolağında önemli bir mediyatör olan β -katenin düzeyini kontrol eden bir bekçi ('gate-keeper') protein olarak rol oynar. Bu sinyal yolağı normal barsak epitelinin gelişmesinde kritik bir rol oynar. Ayrıca KRK'lerin gelişmesinde de etkilidir. KRK'lerin %80'den fazlasında inaktif APC, APC mutasyonunun olmadığı kanserlerin de %50'sinde β -katenin mutasyonları vardır. β -katenin kaderin temelli hücre adezyon kompleksinin bir üyesi olup, bir transkripsiyon faktörü olarak da rol oynar. E-kaderin'e bağlanmadığı zaman hücre-hücre adezyonuna katılır. E-kaderin'e bağlı olmadığı ve hücre-hücre adezyonunda rol aldığı stoplazmik bir degradasyon kompleksi (APC, Aksin, GSK-3 β ve β -katenin'den oluşur) β -katenin'in fosforilasyonuna ve degradasyonuna yol açar. APC mutasyonu olduğu zaman (normal fonksiyonu kayb olduğunda) sitoplazmada β -katenin birikir ve nükleusa geçerek T-hücre faktörü veya lenfosit çoğaltıcı faktör (TCF veya LEF) proteinleri olarak bilinen bir transkripsiyon faktörü ailesine bağlanır. TCF, DNA bağlayan bölgeye, β -katenin bir transaktivasyon bölgesine katılır. β -katenin-TCF kompleksi ile aktive edilen genlerin c-myc ve siklin D1 gibi hücre proliferasyonunu ve apoptozu düzenleyen genler olduğu düşünülmektedir. Normal APC fonksiyonu hücre adezyonunu yönlendirir ve hücre proliferasyonunu düzenler. APC fonksiyonunun olmayışı hücre adezyonunu azaltır ve hücre proliferasyonunu artırır. APC geninde tanımlanan mutasyonlar 'missense' mutasyonlar ve delesyonlar olup, kısalmış (budanmış) APC proteininin üretilmesi ile sonuçlanır. Mutant β -katenin, normal hücrelerde

β -katenin'i fosforile eden ve degrade eden bir kinaz olan GSK-3 β 'ya bağlanma afinitesini kaybeder (66).

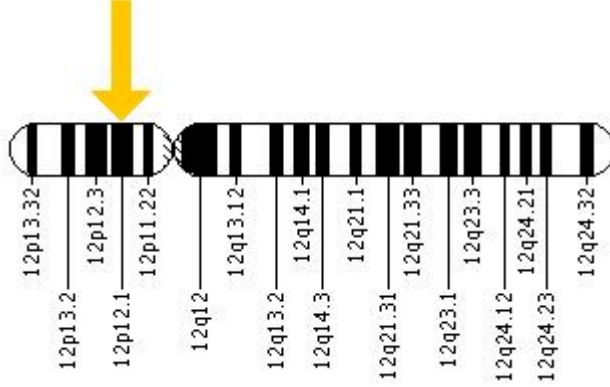
Ras genlerinin kodon 12, 13 ve 61'deki mutasyonları bu genleri aktif onkogenlere dönüştürmektedir. Ras genlerindeki aktivasyona yol açan mutasyonlar insanlarda tüm kanserlerin %30'unda görülmektedir.(77) Ras gen mutasyonları tümör tiplerinde farklı insidanslarda bulunmaktadır (Tablo-8). Bu kanserler içinde özellikle K-ras geni mutasyonları diğer ras genlerine (N-ras ve H-ras) oranla daha sık görülmektedir (78). Mutant K-ras geni pankreas, kolon ve akciğer adenokarsinomlarında daha yaygın iken, mutant N-ras daha çok hematopoetik neoplazilerde görülür (79).

Tablo-8: Kanserli doku ve organlarda saptanan K-ras gen mutasyon oranları (80).

Kanserli doku veya organ	K-ras	Kanserli doku veya organ	K-ras
Safra yolu	%33	Karaciğer	%8
İdrar kesesi	%4	Akciğer	%19
Meme	%4	Melanoma	%2
Serviks	%9	Myeloid lösemi	%5
Kolon	%32	Over	%17
Endometriyum	%15	Pankreas	%60
Böbrek	%1	Troid	%4

K-ras geni, KRK gelişiminde major rol oynayan bir proto-onkogendir. K-ras geni hücre zarı iç yüzeyinde bulunan 21 kDa büyüklüğünde GTP bağlayabilen bir membran proteini kodlar. Bu protein GTP'ye bağlıyken aktif formdadır. K-ras geni ekstrasellüler mitojenik sinyallerin intraselüler alana iletiminden sorumludur. K-ras geni 12. kromozomun kısa kolunda yerleşmiştir (Şekil-6). Hücre büyümesini ve bölünmesini uyaran herhangi bir dış uyarı ile K-ras geni GTP'ye bağlanır ve aktif hale geçerek uyarıyı hücre içi ileti yollarına aktararak hücre büyüme ve bölünmesinde fizyolojik rol oynar. K-ras

mutasyonu ile GTP-az aktivitesi ortadan kalkar ve hücre proliferasyonu düzensizleşir.(81)



Şekil-6: K-ras geninin 12. kromozom üzerindeki yerleşimi. (82)

KRK ile ilişkili K-ras mutasyonları daha sık exon 1'de kodon 12, 13 ve exon 2'de kodon 61'de bulunmaktadır. Bu mutasyonlar GTPaz aktivitesinin azalmasına bu da poliplerin gelişmesine ve progresyonuna neden olan aktive K-ras proteini ile sonuçlanmaktadır. K-ras'ın KRK patogenezindeki oynadığı belirgin rol K-ras mutasyonunun vakaların %50'sinden fazlasında bulunması gerçeği ile vurgulanmaktadır. Benign adenomlar mutant K-ras eksprese etmezler. Artmış ekspresyon displastik poliplerde görülmektedir ve ayrıca adenom-karsinom dizisinin progresyonu ile ilişkilidir (83).

APC ve K-ras gen mutasyonlarını takiben 18. kromozomun uzun kolunda kayıplar izlenir. Kromozom 18q21'de yerleşim gösteren DCC (deleted in colon cancer) ile SMAD4 ve SMAD2 genleri kayba uğramış olur (84). DCC olarak adlandırılan genin ekspresyonun kaybı KRK'lerin %70'inden fazlasını oluştururken; aynı zamanda bu gen sinir sisteminin normal gelişmesinde aksonal yol göstermede önemli olan moleküller için bir reseptörü kodlar. Sporadik kolon kanserlerinin %15'inde TGF- β II (transforming büyüme faktörü- β II) reseptörlerinden sinyallerin azaltılmasında görev alan SMAD4 geninin mutasyona uğradığı gözlenmiştir (85). DCC'nin kaybı apoptozis mekanizmasını bozmakla birlikte metastaz ve kötü prognozla ilişkilidir. (86)

P53 tümör baskılayıcı geni 17. kromozomun kısa kolunda lokalize hücre siklusunun progresyonu ve apoptozun kontrolünde anahtar rol oynayan, 53 kDa'lık nükleer fosfoprotein kodlamaktadır. KRK'lerin %50'si inaktif olmuş P53 proteini taşımaktadır. Çoğu mutasyon sonucunda p53'ün yarılanma süresi artar ve hücre içerisinde birikir. Bu birikim immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilebilir. P53 gen değişimleri KRK'lerin gelişimi sürecinde geç dönemde yer alır. Çoğunlukla kötü prognoz, hematojenik metastaz ve tedaviye direnç gelişiminden sorumlu olduğu belirtilmektedir (87).

KRK gelişiminde ikinci bir yolak olan mikrosatellit instabilitesi (MSI) genom boyunca nükleotid tekrar dizilerinde meydana gelen mutasyonlar olarak ortaya çıkan bir çeşit genomik instabilitedir. KRK'lerin yaklaşık %15'i MSI yoluyla oluşmaktadır ve bu tümörlerin büyük bir kısmı sporadiktir. MSI yoluyla meydana gelen KRK'lerin küçük bir kısmı kalıtsaldır ve MMR genlerinden birinin germline mutasyonu ile oluşmaktadır. Mikrosatellitler genom içerisinde bulunan basit DNA dizileridir. Bir veya daha fazla baz çiftinin 100'den fazla tekrarıyla oluşurlar. Tekrar özellikleri göz önünde bulundurulduğunda DNA replikasyonu boyunca hataya yatkındırlar (72). CIN yolağının tersine MSI ile sonuçlanan moleküler mekanizmalar göreceli olarak daha iyi bilinmektedir. Bu yolak DNA replikasyonu boyunca DNA polimeraz tarafından yapılan hataları tespit eden MMR sistemiyle ilişkilidir (88). Mikrosatellit dizileri özellikle replikasyon hatalarına karşı hassastırlar ve bu nedenle MMR sisteminin etkisini zayıflatan çeşitli mutasyonlar MSI gelişimine yatkınlık oluşturabilir (89). MMR sistemi, farklı yollarla heterodimerik proteinler oluşturarak DNA replikasyonundaki "mismatch" hataları tanıyıp tamir eden en az 7 farklı protein (MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 ve PMS2) içermektedir (90). MMR genlerinde germline mutasyonlara sahip HNPCC'li hastalarda MSI tümörleri gelişir (91). MMR sistem defektine neden olan bir başka alternatif yol promotör hipermetilasyon ile MMR genlerinin susturulmasıdır. Bu sporadik MSI tümörlerinin altında yatan mekanizma gibi görünmektedir. Daha spesifik olarak, MLH1 promotör hipermetilasyonun yüksek derecede olması ve bu nedenle bu genin susturulması sporadik MSI

tümörlerde tespit edilmiştir (92). MSI yolağı nadir moleküler genetik özellikleriyle birlikte normal bir karyotip göstermesiyle CIN yolağından farklılık gösterir (93). Çoğu laboratuvar MSI'yi, yüksek sensitivite ve spesifisiteye sahip olduğu bilinen 5 mononükleotid marker paneli olan BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ve MONO-27 arasından en az %30 stabil olmayan loküs bulunması olarak tanımlamaktadır (94). MSI pozitif tümörler instabilite derecesindeki kantitatif farklılıklara bağlı olarak MSI-yüksek (MSI-H)ve MSI-düşük (MSI-L) olarak alt bölümlere ayrılırlar. %10-29 oranında anstabil (stabil olmayan) lokus içeren tümörler MSI-düşük grubundadır. MSI pozitif tümürlü hastalar CIN tümörlerine göre daha iyi bir prognoza sahip olma eğilimindedirler (95)

CpG ada metilatör fenotip (CIPM) yolağı sporadik KRK gelişiminde kolon dokusunun malign transformasyonu ile sonuçlanan en sık ikinci yoldur ve sporadik KRK'lerin yaklaşık %15'inde görülür. Bu yolak, kendi promotörlerinin hipermetilasyonu ve beraberinde var olan genel DNA hipometilasyonu aracılığı ile tümör süpresör genlerin susturulması sonucunda gelişen epigenetik instabilite ile karakterizedir. CpG adaları içeren bu promotörler hipermetilasyona karşı değişik derecelerde hassastırlar ve çoğunlukla spesifik DNA dizileriyle belirlenirler. Genel DNA hipometilasyonu ve genlerin susturulmasına neden olan promotör hipermetilasyonunun altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılammıştır (83).

Son zamanlarda KRK gelişimde üzerinde durulan bir diğer mekanizma serrated yolağıdır (96). Önceden adenom ve hiperplastik polip şeklinde iki çeşit kolorektal polipin olduğuna inanılırdı. Bunlardan hiperplastik poliplerin malign potansiyeli olmayıp benign oldukları düşünülürdü. Bununla birlikte adenomların KRK'lere prekürsör lezyonlar olduğu bilinmekte idi. Önceden hiperplastik polip olarak sınıflandırılırken aslında TSA (traditional serrated adenomas; klasik serrate adenomlar), SSA (sessile serrated adenomas; sesil serrate adenomlar) ve THP (true hyperplastic polyps; gerçek hiperplastik polipler) gibi heterojenöz bir grup polip oldukları ortadadır (97). Hiperplastik polipler en sık polip tipidir ve sol kolon-rektumdaki poliplerin %80'ini oluşturur. Her lezyon için farklı morfolojik özellikler olup, TSA tek tip

anormal hücre popülasyonu içermesiyle SSA'dan farklılık gösterir. Sesil serrate adenomlar tek tip değildir (98). Bu lezyonların malignite geliştirme potansiyeline sahip olduklarını gösteren yeterli deliller bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar TSA ve SSA'nın farklı yollarla progrese olduklarını göstermektedir. Çoğu serrate adenokarsinomun MSI-L veya MSS (mikrosatellit stabil) olarak TSA zemininden kaynaklandığı kanıtlanmıştır. %15-20 oranında serrate adenokarsinom SSA zemininden kaynaklanmaktadır ve bunlar MSI-H'dir (99). Bu yolakların her ikisinde de mikrosatellit dizileri ve CpG ada metilasyonu üst üste binen rol oynuyor görünmesine rağmen, her biri için belirli spesifik mutasyonlar tanımlanmıştır.

Adenom-karsinom dizisinin progresyonunda K-ras'ın rolü detaylı bir şekilde açıklanmıştır ve K-ras mutasyonları TSA'ların ve serrate rektal lezyonların %80'inde saptanmıştır fakat SSA'da çok nadirdir (100). SSA lezyonları BRAF mutasyonları ile karakterize olma eğilimindedirler (101).

BRAF, KRAS gibi serin/treonin kinazlardan oluşan RAF ailesinin bir üyesidir ve ERK/MAPK yolağının çok önemli bir komponentidir (102). RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK yolu ile BRAF aktivasyonun hücre proliferasyonu ile sonuçlandığı ve apoptozis inhibisyonunda rol oynadığı bilinmektedir (103). İnsanlarda 1796. nükleotidin timinden adenine transversiyonu ile sonuçlanan V600E dönüşümü yaygın bir BRAF mutasyonudur. Bu mutasyon yolağın aktivasyonuna ve sonrasında hücresel proliferasyona yol açmaktadır (104). K-ras'da olduğu gibi BRAF mutasyonları özellikle malign melanomda olduğu gibi diğer tümörlerde de tespit edilmiştir (105).

KRK'de aktif BRAF mutasyonlarının oranı %5-15 olarak bildirilmektedir. Mutasyonların büyük çoğunluğu V600E hotspot mutasyonlarıdır. BRAF V600E hotspot mutasyonları sıklıkla MSI fenotip ile birlikte. İlginç olarak, BRAF mutasyonları sadece aberan MLH1 promotör metilasyonu sonucu MSI fenotip sporadik tümörlerde bulunmaktadır. BRAF mutasyonu MSI-pozitif HNPCC'li hastalarda belirlenmemiştir. MSI-pozitif sporadik tümörlerin büyük çoğunluğu CpG ada metilatör fenotip (CIMP) olup genin promoter bölgesinde lokalize CpG adalarında yaygın hipermetilasyonla karakterizedir. Hem MSI pozitif hem de CIMP pozitif tümörlerin büyük

hiperplastik poliplerden ve serrate adenomalardan geliřtiđi dűřűnűlmektedir. Arařtırmalar bu lezyonlarda BRAF mutasyonlarının yűksek sıklıkta olduđunu gűstermektedir. űzetle, BRAF V600E mutasyonu KRK'lı hastalarda mikrosatellit instabilite ve CpG ada metilatűr fenotip (CIPM) ile birlikte dir (106).

GEREÇ VE YÖNTEM

Materyal

Bu çalışma 2009-2011 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı tarafından KRK tanısı almış ve/veya takip edilmekte olan, K-ras geni mutasyonları (kodon 12, kodon 13) bakılan 50 hasta üzerinde, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu onayı (13 Mart 2012, 2012-6/5) ile retrospektif olarak yapılmıştır. K-ras geni kodon 12 ve kodon 13 mutasyonları bakılan 50 hastaya BRAF geni kodon 600 mutasyonu ve K-ras geni kodon 61 mutasyonu bakıldı. Çalışmaya alınan hastaların demografik özellikleri (yaş, cinsiyet), patolojik özellikleri (tümör lokalizasyonu, büyüme paterni, histolojik tip, diferansiyasyon, klinik evreleme) ve K-ras (kodon12, 13, 61) ile BRAF (kodon 600) gen mutasyonları sonuçları kaydedildi.

DNA İzolasyonu

QIAmp DNA FFPE Tissue Kitiyle DNA Eldesi

İzolasyon işlemine başlamadan önce örnekler oda sıcaklığına getirildi. Isı bloğu 70°C'ye ayarlandı. Tüm santrifüj basamakları oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Parafinize kolorektal tümör bloklarından lam üzerine kesitler alınarak hazırlanmış olan örnekler 70°C'de 1 saat inkübe edildi. Dört adet şale içerisine ksilen konuldu. İlk üç şale içerisinde örnekler ikişer dakika bekletildi. Son şale içerisinde ise 10 dakika bekletildi. Dört adet şale içerisine %96'lık etil alkol konuldu. Örnekler sırasıyla dört adet şale içerisindeki alkolden geçirildi ve kuramaya bırakıldı. Daha önceden işaretlenmiş olan tümör bölgesi üzerine bir damla distile su damlatıldı. Bölge dikkatli bir şekilde bistüri ile kazınarak temiz ependorf tüpe alındı. Örnekler üzerine 180 µl Buffer ATL eklendi. 25 µl Proteinase K eklenerek iyice vortekslendi. 56°C'de dokular

tamamen lizise uğrayana kadar inkübe edildi. İnkübasyon sırasında örnekler 1 saatte birkaç kez vortekslendi. Gerekli durumlarda örnekler gece inkübasyonuna bırakıldı. Örnekler son olarak 90°C'de bir saat daha inkübe edilerek kısa süreli santrifüj yapıldı. Örnekler üzerine sırasıyla 200 µl Buffer AL ve 200 µl %96'lık etil alkol eklendi. Kısa süreli vortekslenerek santrifüj edildi. Tüplerin içindeki karışım QIAamp MinElute spin kolonlara aktarıldı. Tüplerin kapakları kapatılarak 6000xg (9000 rpm) hızda 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolonların yerleştiği tüpler atıldı. QIAamp MinElute spin kolonlar temiz 2 ml'lik collection tüplere yerleştirildi. QIAamp MinElute spin kolonlar dikkatlice açılarak içlerine 500 µl Buffer AW1 eklendi. Tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra 6000xg (9000 rpm) hızda 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolonların yerleştiği tüpler atıldı. Tekrar QIAamp MinElute spin kolonlar temiz 2 ml'lik collection tüplere yerleştirildi. QIAamp MinElute spin kolonlar dikkatlice açılarak içlerine 500 µl Buffer AW2 eklendi. Tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra 6000xg (9000 rpm) hızda 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolonların yerleştiği tüpler atıldı. QIAamp MinElute spin kolonlar son kez temiz 2 ml'lik collection tüplere yerleştirildi. 20.000xg (14.000 rpm) hızda dört dakika santrifüj edildi. QIAamp MinElute spin kolonların yerleştirildiği 2 ml'lik collection tüpler atıldı. QIAamp MinElute spin kolonlar 1,5 ml'lik ependorf tüplere yerleştirildi. QIAamp MinElute spin kolonlar dikkatlice açılarak tam ortalarına gelecek şekilde 50 µl Buffer ATE eklendi. Kolonların kapakları kapatılarak 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 20.000xg (14.000 rpm) hızda iki dakika santrifüj edildi. Spin kolonlar atıldı. 1,5 ml'lik ependorf tüplerde DNA elde edildi. Bu şekilde elde edilen DNA'lara sample assesment için çalışma yapıldı. Sonuca göre K-ras ve BRAF genleri için mutasyon analizleri yapıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Protokolü

PCR yöntemi, genomik DNA'nın sıcaklığın etkisiyle çift zincirinin tek zincir hale gelmesi sonrasında uygun sıcaklıkta ilgili primerlerin ilgili primer bölgesine yapışması ve DNA Taq polimeraz enzimi katalizörlüğünde

ortamdaki dört deoksinükleotid trifosfatın (adenin, guanin, sitozin, timin) yeni zincire eklenmesi sonucunda ilgili gen bölgelerinin çoğaltılması temeline dayanmaktadır.

Bu çalışmada K-ras geninde kodon 12 ve 13 bölgelerini içeren ekzon 1'i, kodon 61 bölgesini içeren ekzon 2'yi ve BRAF geninde kodon 600 bölgesini içeren ekzon 15'i çoğaltmak için PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyon) yöntemi kullanıldı.

Öncelikle PCR reaksiyonu karışımı hazırlandı. Yaklaşık 25 µl'lik PCR karışımı 0,2 ml'lik PCR tüpünde aşağıdaki sıra ile karıştırıldı (Tablo 9).

Tablo-9: K-ras geni 1. ve 2. ekzon ile BRAF geni 15. ekzon için PCR reaksiyonu karışımında kullanılan malzeme ve miktarları

Kullanılan malzeme	Miktar
dNTP (10 mM)	0,4 µl
10x PCR Buffer (Magnezyumlu)	3 µl
2 pmol/ml ilgili gene özgü primer forward	2 µl
2 pmol/ml ilgili gene özgü primer reverse	2 µl
Distile su	14,4 µl
Genomik DNA	4,0 µl
Taq polimeraz enzimi (5 ünite/µl)	0,2 µl

dNTP: dört deokribonükleozid trifosfat, **pmol:** pikomol

K-ras geni 1. ve 2. ekzon bölgelerinin PCR reaksiyonu ile çoğaltılması için bu bölgelere spesifik forward ve reverse primer dizileri (Tablo-10) kullanıldı.

Tablo-10: K-ras geni 1. ve 2. ekzonları mutasyon analizi için kullanılan primer dizileri ve annealing sıcaklıkları.

	Primer (forward) Primer (reverse)	Annealing sıcaklıkları
K-ras (Ekzon 1)	5'-GGTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG-3' 5'-TGAAACCCAAGGTACATTTTCAG-3'	53 ⁰ C
K-ras (Ekzon 2)	5'-TTTGTATTAAGGTACTGGTGGAG-3' 5'-CCTTTATCTGTATCAAAGAATGGTC-3'	53 ⁰ C

Aynı şekilde BRAF geninde kodon 600 bölgesinin bulunduğu 15. ekzonun PCR reaksiyonu için bu bölgeye spesifik forward ve reverse primer dizileri (Tablo-11) kullanıldı.

Tablo-11: BRAF geni 15. ekzon mutasyon analizi için kullanılan primer dizisi ve annealing sıcaklığı.

	Primer (forward) Primer (reverse)	Annealing sıcaklıkları
BRAF (Ekzon 15)	5'-TCTTACCTAAACTCTTCATAATGCTTG-3' 5'-GACTTTCTAGTAACTCAGCAGCATC-3'	60 ⁰ C

İlgili gen bölgelerinin kopya sayısını çoğaltmak için PCR tüplerine Tablo-9'da belirtilen malzemeler karşılardaki miktarlarda konularak PCR karışımı hazırlandı. Hazırlanan bu reaksiyon karışımları PCR yapılmak üzere PCR cihazına yerleştirildikten sonra belirlenen program uygulandı. K-ras geni 1. ve 2. ekzonlarının analizi için PCR döngü programı olarak Tablo-12'de, BRAF geni 15. ekzon analizi için PCR döngü programı olarak Tablo-13'de

belirtilen sıcaklık ve süreler kullanılarak PCR işlemi PCR cihazında gerçekleştirildi. 'DNA Taq Polimeraz' enziminin katalizörlüğünde gerçekleştirilen PCR işlemi sonrasında ilgili gen bölgelerinin kopya sayıları çoğaltılmış oldu. Bunu doğrulamak için ürünler jel elektroforezinde yürütüldü.

Jel Elektroforez Protokolü

Agaroz Jel Elektroforezi, DNA ve PCR ürünlerinin ayrılması ve tanımlanması için kullanılan standart bir metottür. Bu çalışmada PCR ile çoğaltılmış ürünlerin tanımlanması için %2'lik agaroz jel elektroforezi uygulandı. %2'lik jel hazırlanması için 5 ml 10xTris-Borik Asit-EDTA (TBE) solüsyonu 45 ml distile su ile beher içerisinde karıştırıldı. Karışımın içine 1 gr agaroz eklendi. Çözelti mikrodalga fırında "medium" ayarında agaroz çözününceye kadar ısıtıldı. Eriyen jel içine 5 µl etidyum bromid eklenerek karıştırıldı. Jel, elektroforez aparatına dökülerek soğumaya bırakıldı. Elektroforez tankı, 1xTBE ile doldurularak jel yürütme işlemine hazır hale getirildi. PCR ürünleri brom-fenol mavisini ile muamele edilerek agaroz jele yüklendi. 90-100 volt akımda 15 dk kadar yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra ultraviyole ışın altında jel görüntüsüne bakıldı. Jel görüntüsünde ilgili bölgelerde parlak renkte bant olup olmadığına bakıldı. Bant görüntüsü alınan örnekler dizi analizi ile genotiplerinin belirlenmesi için işlemlere devam edildi. Bant görüntüsü alınamayan örneklere önceki işlemler sırasıyla tekrar uygulandı.

Tablo-12: K -ras geni Ekzon 1 ve Ekzon 2 için PCR Döngü Programı

	Sıcaklık	Süre
1-Başlangıç denatürasyonu	95 °C	15 dakika
2-Denatürasyon	95 °C	20 saniye
3-Annealing (primere özgü sıcaklık)	53 °C	30 saniye
4-Extention	72 °C	20 saniye
5-Son extention	72 °C	5 dakika
Kapak sıcaklığı 103 °C		
2,3 ve 4 işlemler sırasıyla 42 siklus		

Tablo-13: BRAF geni Ekzon15 için PCR Döngü Programı.

	Sıcaklık	Süre
1-Başlangıç denatürasyonu	94 °C	10 dakika
2-Denatürasyon	94 °C	30 saniye
3-Annealing (primere özgü sıcaklık)	60 °C	30 saniye
4-Extention	72 °C	30 saniye
5-Son extention	72 °C	7 dakika
Kapak sıcaklığı 103 °C		
2,3 ve 4 işlemler sırasıyla 40 siklus		

DNA Dizi Analizi “Cycle Sequencing” İşlemi

Agaroz jelde yürütülerek kontrol edilen PCR ürünleri, DNA dizi analizi için Tablo-14’te belirtilen malzemelerle karşılıklarında belirtilen miktarlarda karıştırıldı. Karışım her örnek için ayrı ayrı hazırlanarak PCR tüplerine konuldu. Sonrasında ikinci kez PCR işlemi işlemi için tüpler PCR cihazına yüklendi.

Tablo-14: İkinci PCR işlemi için kullanılan malzeme ve miktarları

Kullanılan malzeme	Miktar
Big Dye Cycle Sequencing v3.1 Kit	2 µl
5x Sequencing Buffer	2,5 µl
Forward ya da reverse primer	1,5 µl
PCR Ürünü	1,5 µl
Distile H2O	4 µl

PCR cihazında belirlenmiş olan sıcaklık ve süreler kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi (Tablo-15). İkinci kez gerçekleştirilen PCR işlemi sonrasında elde edilen ürünlere ‘Sephadex G-50’ ile temizleme işlemi yapıldı. Bunun için 1 gr Sephadex 14 ml distile suda çözülür ve çalkalanarak oda ısısında bekletilir. Sephadex kolonlarının içerisine 600 µl dağıtılır. 2000xg’de 2 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası Sephadexli kolonlar 1,5 ml’lik tüpe aktarılır. 10 µl Cycle Sequencing ürünü Sephadex üzerine bırakılır. 2750xg’de 2 dakika tekrar santrifüj edilir. Alttaki tüpe aktarılmış olan ürün dizileme için uygun olan üründür. Oluşan yaklaşık 10 µl’lik ürünler Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzers cihazına yüklenir.

Tablo-15: İkinci kez PCR işlemi için kullanılan malzeme ve miktarları

	Sıcaklık	Süre
1-Başlangıç denatürasyonu	96 °C	1 dakika
2-Denatürasyon	96 °C	10 saniye
3-Annealing (primere özgü sıcaklık)	50 °C	5 saniye
4-Extention	60 °C	4 dakika
5-Bekleme	4 °C	∞
Kapak sıcaklığı 103 °C		
2,3 ve 4 işlemler sırasıyla 25 siklus		

Genotiplerin Belirlenmesi

Olguların genotiplerini belirlemek için ürünler 'Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzers' cihazında yürütüldü. Yürütülen ürünlerin bilgileri "Sequencing Analysis" programında analiz edildi. Kodon 600'ün yer aldığı BRAF geni ekzon 15 bölgesi (Şekil-7), Kodon 12 ve 13'ün yer aldığı K-ras geni ekzon-1 bölgesi (Şekil- 8) ve kodon 61'in yer aldığı K-ras geni ekzon-2 bölgesi (Şekil- 9) analiz edilerek olası mutasyonlar saptandı.

Forward Primer TCTTACCTAAACTCTTCATAATGCTTGCTCTGATAGGAAAATGAGATCTACTGTTTT CCTTTACTTACTACACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATA GGTGATTTTGGTCTAGCTACA GTG AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGA ACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTATTTTTCCACTGA TTAAATTTTTGGCCCTGAGATGCTGCTGAGTTACTAGAAAAGTC Reverse Primer

Şekil-7: BRAF geni ekzon 15 nükleotid dizisi. Kullanılan forward ve reverse primer dizileri sarı ile işaretli ve BRAF geni kodon 600 bölgesi kırmızı ile işaretli olarak gösterilmiştir.

Forward Primer

GGTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACCTTATGTGTGACATGTTCTAATATA
GTCACATTTTCATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTT
GTGGTAGTTGGAGCT**GGTGGC**GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTC
AGAATCATTTTGTGGACGAAT ATGATCCAACAATAGAGGTTAAATCTTGTTTTAATA
TGCATATTACTGGTGCAGGACCATTCTTTGATACAGATAAAAGGTTTCTCTGACCAT
TTTCATGAGTACTTATTACAAGATAATTATGCTGAAAGTTAAGTTAT**CTGAAATGTA**
CCTGGGTTTCA

Reverse Primer

Şekil-8: K-ras geni ekzon 1 nükleotid dizisi. Kullanılan forward ve reverse primer dizileri sarı ile işaretli, kodon 12 bölgesi kırmızı ile işaretli ve kodon 13 bölgesi yeşil ile işaretli olarak gösterilmiştir.

Forward Primer

TTTGTATTAAAAGGTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACCTTATGTGTGACA
TGTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTTATTATAAGGATTCCTACAGGAAGCA
AGTAGTAATTGATGGAGAAACCTGTCTCTTGGATATTCTCGACACAGCAGGT**CAA**
GAGGAGTACAGTGCAATGAGGGACCAGTACATGAGGACTGGGGAGGGCTTTCTT
TGTGTATTTGCCATAAATAACTAAATCATTGGAAGATATTCACCATTATAGGTAA
ATCTTGTTTTAAATATGCATATTACTGGTGCAG**GACCATTCTTTGATACAGATAAAG**
G

Reverse Primer

Şekil-9: K-ras ekzon 2 nükleotid dizisi. Kullanılan forward ve reverse primer dizileri sarı ile işaretli, kodon 61 bölgesi kırmızı ile işaretli olarak gösterilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada yaş değişkeni medyan (minimum-maksimum) değerleriyle ifade edilmiş olup, çalışmada yer alan kategorik değişkenler sayı ve ilgili yüzde değerleriyle belirtilmiştir. Kategorik değişkenlerin mutasyon grupları arasında yapılan karşılaştırmalarında Pearson ki-kare ve Fisher'in kesin ki-kare testleri kullanılmıştır. Çalışmanın analizleri SPSS 13.0 (Chicago, IL.) programında yapılmış olup $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı tarafından KRK tanısı almış ve/veya takip edilmekte olan 50 hasta dahil edildi. Hastaların demografik bulguları (yaş ve cinsiyet), tümör özellikleri (lokalizasyon, büyüme paterni, histolojik tip, grade ve evre) ile K-ras geni kodon 12, 13, 61 ve BRAF geni kodon 600 mutasyon analiz sonuçları kullanıldı (Tablo-16a, 16b ve 16c).

Tablo-16a: Hastaların cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, büyüme paterni, histolojik tip, grade, evre ve mutasyon sonuçları

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Lokalizasyon	Büyüme paterni	Histolojik tip	Grade	Evre	K-ras Kodon 12	K-ras Kodon 13	K-ras Kodon 61	BRAF Kodon 600
1	E	66	Sigmoid	Üİ	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
2	K	54	Rektum	Üİ	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
3	E	70	Sağ kolon	ÜV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
4	E	59	Rektum	ÜV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
5	K	41	Rektum	Anüler	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
6	K	66	Sigmoid	ÜV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
7	K	56	Rektum	ÜV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
8	E	62	Rektosigmoid	Üİ	Adeno Ca	3	IV	N	N	N	N
9	E	67	Sağ kolon	UI	Adeno Ca	2	IV	GAT	N	N	N
10	E	49	Rektosigmoid	Polipoid	Adeno Ca	2	IV	N	GAC	N	N
11	E	49	Çekum	Polipoid	Müsinöz	2	IV	N	N	N	N
12	K	59	Sigmoid	UI	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
13	K	49	Rektum	UV	Müsinöz	2	IV	N	N	N	N

E: erkek, **K:** kadın, **UV:** ülserovejetatif, **UI:** ülseroinfiltratif, **Adeno Ca:** adenokarsinom, **N:** mutasyon negatif

Tablo-16b: Hastaların cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, büyüme paterni, hisyolojik tip, grade, evre ve mutasyon sonuçları

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Lokalizasyon	Büyüme paterni	Histolojik tip	Grade	Evre	K-ras Kodon 12	K-ras Kodon 13	K-ras Kodon 61	BRAF Kodon 600
14	E	67	Rektosigmoid	UI	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
15	K	66	Çıkan kolon	UV	Adeno Ca	2	IV	GTT	N	N	N
16	E	56	Rektum	İnfiltratif	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
17	E	51	Rektum	UV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
18	E	51	Rektum	ÜV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
19	K	60	Transvers kolon	ÜV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
20	E	55	Rektum	ÜV	Adeno Ca	2	IV	GCT	N	N	N
21	E	32	Sağ kolon	Polipoid	müsinöz	2	IV	N	N	N	N
22	E	70	Sigmoid	ÜV	Adeno Ca	3	IV	N	N	N	N
23	K	56	Sigmoid	ÜV	Adeno Ca	2	IV	GAT	N	N	N
24	E	66	Rektum	ÜV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
25	K	44	Sağ kolon	İnfiltratif	Adeno Ca	2	IV	N	GAC	N	N
26	E	43	Sigmoid	Polipoid	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
27	E	59	Rektum	UV	Adeno Ca	2	IV	N	N	CAT	N
28	K	41	Rektum	UI	Adeno Ca	3	IV	N	N	N	N
29	E	39	Rektum	UV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
30	E	49	Çekum	UV	Adeno Ca	3	IV	N	N	N	N
31	E	35	Transvers kolon	İnfiltratif	Adeno Ca	3	IV	N	N	N	N
32	E	56	Rektosigmoid	UV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
33	K	61	Sol kolon	UI	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
34	K	61	Rektum	UV	Adeno Ca	2	IV	GTT	N	N	N
35	E	58	Çekum	UV	Adeno Ca	2	IV	GTT	N	N	N
36	K	38	Rektum	UV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	GAG
37	E	58	Çekum	UV	Adeno Ca	2	IV	GAT	N	N	N
38	E	58	Rektum	UV	Adeno Ca	3	IV	N	N	N	N

E: erkek, K: kadın, UV: ülserovejetatif, UI: ülseroinfiltratif, Adeno Ca: adenokarsinom, N: mutasyon negatif

Tablo-16c: Hastaların cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, büyüme paterni, hisyolojik tip, grade, evre ve mutasyon sonuçları.

39	K	43	Rektum	Tübülo Villöz	Adeno Ca	2	IV	GAT	N	N	N
40	E	49	Rektum	UV	Adeno Ca	2	IV	N	GAC	N	N
41	K	57	Sağ kolon	UV	Adeno Ca	2	IV	TGT	N	N	N
42	E	70	Sol kolon	UV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
43	E	70	Rektum	UI	Adeno Ca	2	IV	GTT	N	N	N
44	K	62	Sol kolon	Ülseratif	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
45	K	65	Rektum	UV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
46	E	73	Rektosigmoid	UV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
47	K	30	Sağ kolon	UI	müsinöz	3	IV	GAT	N	N	N
48	K	63	Sol kolon	UV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
49	K	76	Sigmoid	UV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N
50	E	66	Çıkan kolon	UV	Adeno Ca	2	IV	N	N	N	N

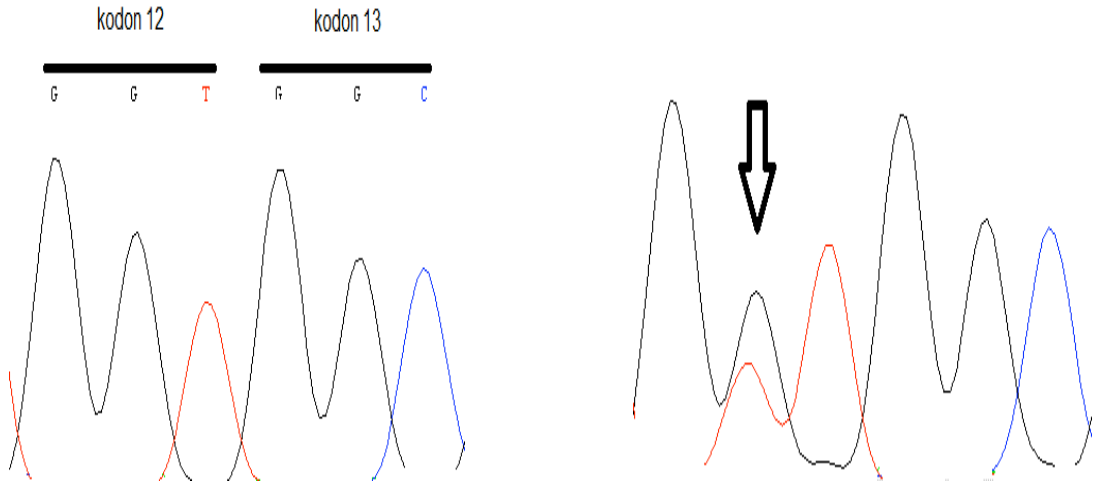
E: erkek, **K:** kadın, **UV:** ülserovejetatif, **UI:** ülseroinfiltratif, **Adeno Ca:** adenokarsinom, **N:** mutasyon negatif

Çalışmaya alınan 50 hastanın 29'u erkek (%58), 21'i kadın (%42) olup, erkek/kadın oranı 1,38 idi. Hastaların medyan yaş değeri 58 (30-76) yıl olarak saptandı. Erkek hastaların ortalama yaşı $57 \pm 10,98$ yıl iken, kadın hastaların ortalama yaşı $54,67 \pm 11,45$ yıl olarak bulundu. Hastaların 35'i (%70) 50 yaş ve üstünde idi. Tümör lokalizasyonuna göre sınıflandırıldığında 50 hastanın 4'ü (%8) çekum, 8'i (%16) çıkan kolon, 2'si (%4) transvers kolon, 4'ü (%8) inen kolon, 7'si (%14) sigmoid kolon, 5'i (%10) rektosigmoid ve 20'si (%40) rektum yerleşimli idi. Histolojik tiplerine göre değerlendirilen tümör örneklerinin 46'sı (%92) adenokarsinom, 4'ü (%8) müsinöz karsinom tipinde idi. Değerlendirmeye alınan tümör örneklerinin 43'ü (%86) orta derece diferansiye (grade II), 7'si (%14) kötü derece diferansiye (grade III) idi. Tümör evresine göre değerlendirmeye alınan 50 hastanın tamamı evre IV idi. Büyüme paternine göre sınıflandırıldığında tümör örneklerinin 5'i (%10) polipoid, 30'u (%60) ülserovejetan, 10'u (%20) ülseroinfiltratif, 1'i (%2) anüler, 3'ü (%6) infiltratif ve 1'i (%2) ülseratif tipte idi (Tablo-17).

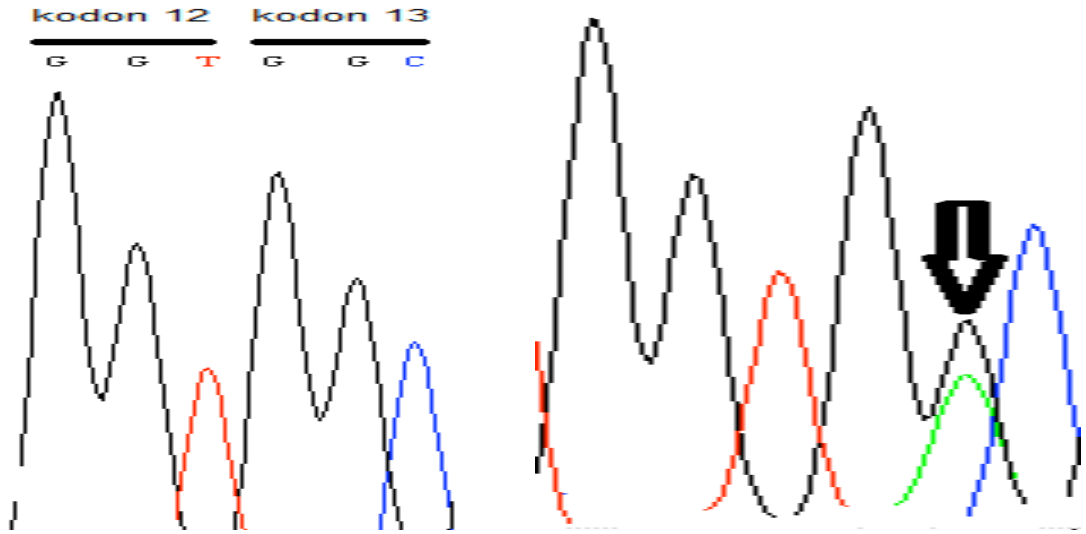
Tablo-17: Hastaların cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, histolojik tip, diferansiyasyon, büyüme paterni ve evre bakımından dağılımları.

	Sayı (%)
Cinsiyet	
Erkek	29 (%58)
Kadın	21 (%42)
Yaş	
50>	15 (%30)
50≤	35 (%70)
Tümör Lokalizasyonu	
Çekum	4 (%8)
Çıkan kolon	8 (%16)
Transvers kolon	2 (%4)
İnen kolon	4 (%8)
Sigmoid kolon	7 (%14)
Rektosigmoid kolon	5 (%10)
Rektum	20 (%40)
Histolojik Tip	
Adenokarsinom	46 (%92)
Müsinöz karsinom	4 (%8)
Diferansiyasyon	
Orta diferansiye	43 (%86)
Kötü diferansiye	7 (%14)
Büyüme Paterni	
Polipoid	5 (%10)
Ülseroinfiltratif	10 (%20)
Ülserovejetan	30 (%60)
Anüler	1 (%2)
İnfiltratif	3 (%6)
Ülseratif	1 (%2)
Evre	
Evre IV	50 (%100)

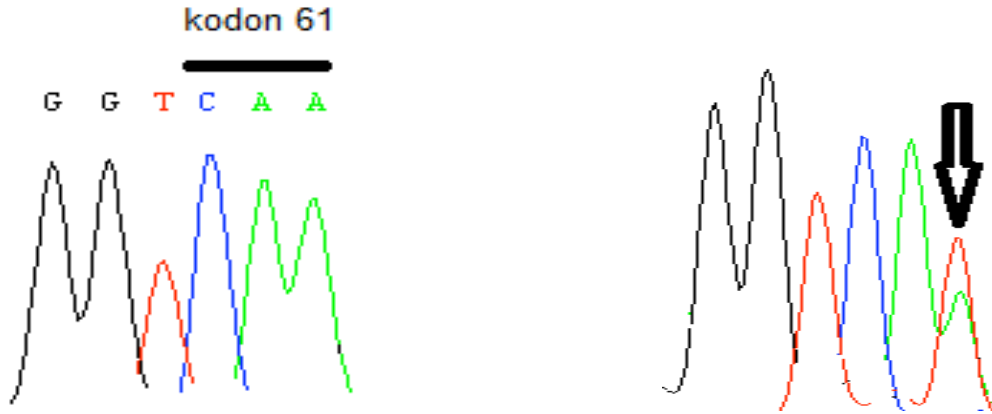
Tüm olgular K-ras geni açısından değerlendirildiğinde; %30'unun (n=15) K-ras mutasyonu taşıdığı, %70'inin (n=35) yabancıl tip olduğu saptanmıştır. K-ras mutasyonu taşıyan 15 hastanın %93,3'ünde (n=14) K-ras ekzon 1 mutasyonu saptanmış olup, bu mutasyonların dağılımına bakıldığında %73,3'ünün (n=11) kodon 12 üzerinde olduğu ve Glisin ile Aspartat (Gly12Asp: %33,3, n=5), Glisin ile Valin (Gly12Val: %26,6, n=4), Glisin ile Sistein (Gly12Cys: %6,6, n=1) ve Glisin ile Alanin (Gly12Ala: %6,6, n=1) arasında yer değiştirme şeklinde nokta mutasyonu olduğu (Şekil-10), %20'sinin (n=3) kodon 13 üzerinde ve Glisin ile Aspartat arasında yer değiştirme (Gly13Asp: %20, n=3) şeklinde nokta mutasyonu olduğu (Şekil-11), %6,6'sının (n=1) ekzon 2 kodon 61 üzerinde Glutamin ile Histidin (Gln61His; %6,6, n=1) arasında yer değiştirme şeklinde nokta mutasyonu olduğu (Şekil-12) gözlenmiştir (Tablo-18).



Şekil-10: K-ras geni kodon 12 yabancıl tip (solda) ve heterozigot mutasyon taşıyıcılığı (sağda). Kodon 12 üzerinde GGT'den GTT'ye heterozigot dönüşüm okla gösterilmiştir.



Şekil-11: K-ras geni kodon 13 yabanıl tip (solda) ve heterozigot mutasyon taşıyıcılığı (sağda). Kodon 13 üzerinde GGC'den GAC'ye heterozigot dönüşüm okla gösterilmiştir.



Şekil-12: K-ras geni kodon 61 yabanıl tip (solda) ve heterozigot mutasyon taşıyıcılığı (sağda). Kodon 61 üzerinde CAA'dan CAT'ye heterozigot dönüşüm okla gösterilmiştir.

Tablo-18: Hastaların K-ras gen mutasyon tipleri ve yüzde değerleri

Dizi analizi yöntemi ile saptanan K-ras geni kodon 12, 13 ve 61 mutasyonları			
	Yabani Tip (AA)	Nokta Mutasyonu (AA)	Sayı (%)
K-ras kodon 12	GGT (Gly)	GAT (Asp)	5 (% 33,3)
	GGT (Gly)	GTT (Val)	4 (% 26,6)
	GGT (Gly)	GCT (Ala)	1 (% 6,6)
	GGT (Gly)	TGT (Cys)	1 (% 6,6)
K-ras kodon 13	GGC (Gly)	GAC (Asp)	3 (% 20)
K-ras kodon 61	CAA (Gln)	CAT (His)	1 (% 6,6)

AA; Aminoasit, **Gly;** Glisin, **Gln;** Glutamin, **Asp;** Aspartat, **Val;** Valin, **Ala;** Alanin, **Cys;** Sistein, **Asp;** Aspartat, **His;** Histidin

Ayrıca olgular BRAF geni açısından değerlendirildiğinde; %2'sinin (n=1) BRAF mutasyonu taşıdığı, %98'inin (n=49) yabani tip olduğu saptanmıştır. BRAF geninde kodon 600 bölgesinde GTG'den GAG'ye heterozigot dönüşüm (V600E mutasyonu) saptanmıştır (Şekil-13).



Şekil-13: BRAF geni kodon 600 yabani tip (solda) ve heterozigot mutasyon taşıyıcılığı (sağda). Kodon 600 üzerinde GTG'den GAG'ye heterozigot dönüşüm okla gösterilmiştir.

Cinsiyet grupları arasında yaş ortalamaları bakımından anlamlı fark bulunmadı. Tüm hastalar medyan yaş açısından değerlendirildiğinde, K-ras mutasyonu taşıyan hastalar ile yabani tip olan hastalar arasında istatistiksel

olarak anlamlı bir fark olmamakla birlikte, K-ras mutasyon taşıyıcısı olan hastaların medyan yaş değeri 57 olarak, yabancı tip olan hastaların medyan yaş değeri 59 olarak saptanmıştır (Tablo-19).

Tüm hastalar cinsiyet açısından değerlendirildiğinde, K-ras mutasyonu taşıyan hastaların %53,3'ünün erkek (n=8), %46,7'sinin kadın (n=7) olduğu, yabancı tip olan hastaların %60'ının erkek (n=21), %40'ının kadın (n=14) olduğu ve K-ras mutasyon taşıyıcıları ile yabancı tip olan olgular arasında cinsiyet açısından anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür (Tablo-19).

Tüm hastalar tümör lokalizasyonu açısından değerlendirildiğinde, K-ras mutasyonu taşıyan hastaların %13,3'ü (n=2) çekum, %33,3'ü (n=5) çıkan kolon, %6,7'si (n=1) sigmoid kolon %6,7'si (n=1) rektosigmoid ve %40'ı (n=6) rektum yerleşimli olarak, yabancı tip olan hastaların %5,7'si (n=2) çekum, %8,6'sı (n=3) çıkan kolon, %5,7'si (n=2) transvers kolon, %11,4'ü (n=4) inen kolon, %17,1'i (n=6) rektosigmoid, %11,4'ü (n=4) sigmoid kolon ve %40'ı (n=14) rektum yerleşimli olarak bulunmuştur. K-ras mutasyonu taşıyan hastalar ile yabancı tip olan hastalar arasında tümörün çekum, transvers kolon, inen kolon, rektosigmoid kolon, sigmoid kolon ve rektum yerleşimi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür. K-ras mutasyonu taşıyan hastaların, yabancı tip olan hastalara göre tümörün çıkan kolon yerleşim oranının daha yüksek olduğu ve iki grup arasındaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlaşılmıştır (p=0.043) (Tablo-19).

Tüm örnekler grade açısından değerlendirildiğinde, K-ras mutasyonu taşıyan hastaların %93,3'ü (n=14) grade II, %6,7'si (n=1) grade III olduğu, yabancı tip olan hastaların %82,9'u (n=29) grade II, %17,1'i (n=6) grade III olduğu ve K-ras mutasyon taşıyıcıları ile yabancı tip olan olgular arasında grade açısından anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür. Tüm örnekler histolojik tip açısından değerlendirildiğinde, K-ras mutasyonu taşıyan hastaların %93,3'ünün (n=14) adenokarsinom, %6,7'sinin (n=1) müsinöz karsinom olduğu, yabancı tip olan hastaların %91,4'ünün (n=32) adenokarsinom, %8,6'sinin (n=3) müsinöz karsinom olduğu ve K-ras mutasyon taşıyıcıları ile yabancı tip olan olgular arasında histolojik tip

açısından anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür. Tüm örnekler büyüme paterni açısından değerlendirildiğinde, K-ras mutasyonu taşıyan hastaların %13,3'ünün (n=2) polipoid, %20'sinin (n=3) ülseroinfiltratif, %60'ının (n=9) ülserovejetan, %6,7'sinin (n=1) infiltratif olduğu, yabancı tip olan hastaların %8,6'sının (n=3) polipoid, %20'sinin (n=7) ülseroinfiltratif, %60'ının (n=21) ülserovejetan, %2,9'unun (n=1) anüler, %5,7'sinin (n=2) infiltratif ve %2,9'unun (n=1) ülseratif olduğu ve K-ras mutasyon taşıyıcıları ile yabancı tip olan olgular arasında büyüme paterni açısından anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür (Tablo-19).

Tablo-19: Hastaların cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, histolojik tip, diferansiyasyon, büyüme paterni ve evre bakımından istatistiksel olarak karşılaştırılması.

	Yabanıl Tip n=35	Mutasyon Taşıyıcısı n=15	p-değeri
Yaş	59 (32-76)	57 (30-70)	0.539
Cinsiyet (E/K)	21 (60)/14 (40)	8 (53.30)/7 (46.7)	0.900
Tm.lokalizasyonu			
Çekum	2 (5.7)	2 (13.3)	0.574
Çıkan Kolon	3 (8.6)	5 (33.3)	0.043
Transves Kolon	2 (5.7)	0 (0)	1.000
İnen Kolon	4 (11.4)	0 (0)	0.302
Sigmoid Kolon	6 (17.1)	1 (6.7)	0.659
Rektosigmoid Kolon	4 (11.4)	1 (6.7)	1.000
Rektum	14 (40)	6 (40)	0.753
Büyüme Paterni			
Polipoid	3 (8.6)	2 (13.3)	0.629
Ülseroinfiltratif	7 (20)	3 (20)	1.000
Ülserovejetatif	21 (60)	9 (60)	0.752
Anüler	1 (2.9)	0 (0)	1.000
İnfiltratif	2 (5.7)	1 (6.7)	1.000
Ülseratif	1 (2.9)	0 (0)	1.000
Histolojik Tip			
Adenokarsinom	32 (91.4)	14 (93.3)	
Müsinöz Karsinom	3 (8.6)	1 (6.7)	1
Grade			
Orta Diferansiye	29 (82.9)	14 (93.3)	
Kötü Diferansiye	6 (17.1)	1 (6.7)	0.659

Not: Tümör lokalizasyonu açısından bakıldığında mutasyon taşıyan olgularda çıkan kolon yerleşiminin yabanıl tip hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmektedir (**p= 0.043**).

TARTIŞMA VE SONUÇ

KRK tüm dünyada en yaygın görülen malignitelerden biridir. KRK tedavisinde önemli gelişmelere rağmen önemli derecede morbidite ve mortalite nedenidir (107). KRK tüm dünyada erkeklerde dördüncü en sık, kadınlarda üçüncü en sık görülen kanser türüdür (108).

Afrika ve Asya'da en az; Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya'da en sık oranda görülür (109). KRK'e yakalanma sıklığı, gelişmiş ülkelerde hızla artmaktadır. ABD'de KRK görülme sıklığı akciğer kanserinden sonra ikinci sıradadır. Her 10 yılda bir, risk iki katına çıkmaktadır (110). Her yıl ABD'de 160.000 yeni KRK tanısı konulmakta ve her yıl KRK hastalarının 57.000'i ölmektedir (111).

TCKSDB'nin verilerine göre ülkemizde kanser sıklığı giderek artmaktadır. 2004-2006 yılları arasındaki verilere göre 41.438'i erkek, 27.709'u kadın olmak üzere, toplam 69.147 kanserli olgu değerlendirilmiştir. Bu verilere göre kadınlarda KRK görülme sıklığının, özellikle 40-45 yaşlarından sonra, erkeklerde ise 55-60 yaşlarından sonra arttığı belirlenmiştir. KRK yaşa standardize insidans hızı bakımından akciğer kanseri ve meme kanserini takiben 3. sırada yer almıştır (3).

KRK gelişiminde hem çevresel, hem de genetik faktörler rol oynamaktadır. Genetik yatkınlık, kanser gelişme riskini belirgin olarak artırmaktadır. KRK'lerin yaklaşık %85'i sporadik olup, yalnızca %15'i kalıtsal özellik göstermektedir (68). 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 (112).

KRK kadın ve erkekleri aynı oranda etkilemektedir. KRK tüm dünyada görülen kanserlerin %9,4'ünde erkekleri ve %10,1'inde kadınları etkiler (22). TCKSDB'nin 2004-2006 verilerine göre ülkemizde KRK olgu sayısı erkeklerde 2.888, kadınlarda 2.186 olarak saptanmıştır. Bu verilere

göre KRK'lerin %7'si erkekleri, %7,9'u kadınları etkilemektedir (3). 2010 yılında Yunxia ve ark.'nın (113) 101 KRK tanılı hasta üzerinde yaptıkları çalışmada %58,4'ünü erkek, %41,6'sını kadın olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda değerlendirmeye alınan toplam 50 hastanın 29'u erkek (%58), 21'i kadın (%42) olup, erkek/kadın oranı 1,38 idi. KRK en sık 60-79 yaşları arasında görülmektedir. Tüm olguların %10'undan azı 50 yaşından önce ortaya çıkmaktadır (23). 2011 yılında Lanthaler ve ark.'nın (114) 31 KRK hastası üzerinde yaptıkları çalışmada median yaşı 64 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda hastaların medyan yaşı 58 (30-76) olup, hastaların %30'u 50 yaşın altında idi.

Kolon ve rektumdaki kanserlerin dağılımı şu şekildedir; %22 çekum/çıkan kolon, %11 transvers kolon, %6 inen kolon, %55 rektosigmoid kolon ve %6 diğer bölgeler (66). 2011 yılında Shen ve ark.'nın (7) 118 KRK hastası üzerinde yaptıkları çalışmada %23,7'sini çekum/çıkan kolon, %6,8'ini transvers kolon, %4,2'sini inen kolon, %65,3'ünü rektosigmoid kolon yerleşimli olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda kolon ve rektumdaki kanserlerin dağılımı şu şekildedir; %24'ü çekum/çıkan kolon, %4'ü transvers kolon, %8'i inen kolon, %64'ü rektosigmoid kolon yerleşimli olup literatürde verilen bilgiler ile uyumludur.

Kolorektal adenokarsinomda derecelendirme tümör dokusunda tübül oluşumunun derecesi ve hücresel dizilime göre yapılır (115). 2011 yılında Herreros ve ark.'nın (116) 186 KRK hastası üzerinde yaptıkları çalışmada hastaların %9'unu grade I, %84'ünü grade II ve %7'sini grade III olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda KRK hastalarının %92'si grade II, %8'i grade III olarak saptandı. Az diferansiyasyon gösteren tümörlerde lenf nodu metastaz riski %81, iyi diferansiyasyon gösteren tümörlerde ise %30' dur. Sağkalım üzerinde tümör diferansiyasyonu önemli ve bağımsız bir prognostik faktördür. (117)

Kolorektumdaki kanserler yüksek oranda adenokanser histolojik tipindedir. Müsinöz karsinoma tanısı için müsinöz komponentin tümörün %50'sinden fazla olması gerekir. Taşlı yüzük hücreli karsinomlar da bu gruba dahil edildiğinde, kolorektal karsinomlar içerisinde görülme sıklığı %10'dur.

Müsinöz karsinomlar diğer tiplere göre daha ileri evrede, daha hızlı yayılım, daha fazla lenf düğümü tutulumu ve daha kötü prognoz gösterirler. Müsinöz karsinomlar içerisinde taşlı yüzük hücreli karsinom daha saldırgandır ve prognozu daha kötüdür (115). Chen ve ark. (118) 45 taşlı yüzük hücreli, 332 müsinöz karsinom ve 2984 diğer histolojik tip KRK hastası üzerinde yaptıkları çalışmada taşlı yüzük hücreli kanserin müsinöz kansere göre, müsinöz kanserin ise diğer tiplere göre sağkalımının belirgin olarak daha kötü olduğunu belirtmişlerdir (119). 2010 yılında Zlobec ve ark.'nın (120) 404 KRK hastası üzerinde yaptıkları çalışmada tümörlerin %7,4 oranında müsinöz komponent içerdiğini tespit etmişlerdir. 2008 yılında Akkirpik ve ark.'nın (121) yaptığı çalışmada K-ras gen mutasyonları tümörün müsinöz komponentinin varlığı ile yüksek oranda birliktelik göstermiştir. K-ras kodon 12/13 nokta mutasyonlarının yanısıra ras gen ailesinin aşırı ekspresyonunun bu hastalığın gelişiminde önemli olduğunu fakat sağkalımın bir ön belirteci olmadığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda hastaların %92'sinin histolojik tipi adenokarsinom iken, %8'i müsinöz ve taşlı yüzük hücreli kanser tipinde idi. Ayrıca K-ras mutasyon taşıyıcıları ile yabancı tip olan olgular arasında histolojik tip açısından anlamlı bir fark saptanmadı.

Önceki yıllarda KRK hastalarında yapılmış birçok çalışmada K-ras ve BRAF genlerinde farklı oranlarda mutasyon saptanmıştır (Tablo-20). Örneğin 2008 yılında Georgiva ve ark.'nın (122) 23 KRK hastası üzerinde yaptıkları çalışmada K-ras geni kodon 12'de %30 oranında, kodon 13'te %4,3 oranında ve BRAF geni kodon 600'de %8,7 oranında nokta mutasyonu saptamışlardır. Aynı çalışmada ERK aktivasyonu ile K-ras geni kodon 12 mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu ve kodon 12 mutasyonlu hastalarda ERK aktivasyonunun yüksek olduğunu saptamışlardır. K-ras geni kodon 13 ve BRAF geni kodon 600 mutasyonları ile ERK aktivasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamamışlardır. 2010 yılında Yunxia ve ark.'nın (113) 101 KRK hastası üzerinde yaptıkları çalışmada %32,7 oranında K-ras gen (kodon 12, 13, 45, 69 ve 80) mutasyonu saptamışlardır. Metastaz sonrası K-ras mutasyonu saptanan hastalarda median sağkalımı 18 ay, yabancı tip olan hastalarda

median sağkalımı 19 ay olarak saptamışlardır. K-ras mutasyon durumunun metastaz sonrasında bağımsız bir prognostik faktör olmadığını belirtmişlerdir. 2009 yılında Chen ve ark.'nın (118) 90 KRK hastası üzerinde yaptıkları çalışmada %36 oranında K-ras gen (kodon 12 ve 13) mutasyonu saptamışlardır. K-ras geni kodon 12 üzerinde GGT'den GAT'ye heterozigot dönüşümü kodon 12 ve kodon 13'deki diğer mutasyonlara göre daha yüksek oranda saptamışlardır. 2010 yılında Zlobec ve ark.'nın (120) 404 KRK hastası üzerinde yaptıkları çalışmada %30,1 oranında K-ras gen (kodon 12 ve 13) mutasyonu ve %12 oranında BRAF gen (kodon 600) mutasyonu saptamışlardır. Aynı çalışmada BRAF gen mutasyonunun sağ kolon yerleşimli, yüksek gradeli, peritümöral lenfositik infiltrasyonu olmayan ve MSI-H olan tümörlerde anlamlı derecede daha sık görüldüğünü saptamışlardır. BRAF gen mutasyonunun sağ kolon yerleşimli KRK hastalarında kötü prognostik faktör olduğunu vurgulamışlardır. 2010 yılında Kaji ve ark.'nın (122) 101 KRK hastası üzerinde yaptıkları çalışmada lateral yayılım gösteren tümör örneklerinde K-ras gen (kodon 12 ve 13) mutasyon taşıyıcılık oranını % 58 saptarken, BRAF (kodon 600) geninde mutasyon saptamamışlardır. Bizim çalışmamızda, karsinomların %30'unda (n=15) KRAS gen (kodon 12, 13 ve 61) mutasyonu, %2'sinde (n=1) BRAF gen (kodon 600) mutasyonu saptanmıştır. BRAF gen mutasyonu taşıyan bu olgu 38 yaşında kadın hasta idi. Bu olguda tümör rektum yerleşimli, ülserovejetan ve grade II adenokanser histolojik tipte idi.

2007 yılında Yoshida ve ark.'nın (124) yaptıkları çalışmada 45 düz ve deprese erken evre KRK örneğini ve 43 polipoid erken evre KRK örneğini BRAF ve K-ras gen mutasyonları açısından analiz etmişlerdir. Düz ve deprese erken evre KRK örneklerinin %11'inde BRAF mutasyonu, polipoid erken evre KRK örneklerinin %30,2'sinde K-ras mutasyonu saptamışlardır. Submukozal invazyon derinliğini BRAF mutasyonu taşıyan örneklerde K-ras mutasyonu taşıyan örneklere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptamışlardır. Bizim çalışmamızda KRK örnekleri büyüme paternine göre sınıflandırıldığında hastaların 5 (%10)'ünde tümör polipoid, 30 (%60)'ünde ülserovejetan, 10 (%20)'ünde ülseroinfiltratif, 1 (%2)'inde anüler,

3 (%6)'ünde infiltratif ve 1 (%2)'inde ülseratif tipte idi ve K-ras mutasyon taşıyıcıları ile yabani tip olan olgular arasında büyüme paterni açısından anlamlı bir fark saptanmadı.

2008 yılında Jeon ve ark. (125) 78 KRK örneğini K-ras mutasyon durumu açısından incelemişler ve %29,5'inde K-ras mutasyonu saptamışlardır. K-ras geninde en sık kodon 12 üzerinde %78,3 oranında mutasyon saptamışlardır. Kodon 12 üzerinde sırasıyla %43,5'inde GGT'den GAT'ye, %21,7'sinde GTT'ye ve %13'ünde AGT'ye dönüşüm saptamışlardır. Kodon 13 üzerinde %17,4'ünde mutasyon saptamışlardır. Ayrıca aynı çalışmada tümör yerleşim yeri ile K-ras mutasyon durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmamışlardır. Bizim çalışmamızdaki 50 olgunun %30'unun (n=15) K-ras mutasyonu taşıdığı, %70'inin (n=35) yabani tip olduğu saptanmıştır. K-ras mutasyonu taşıyan 15 hastanın %93,3'ünde (n=14) KRAS ekzon 1 mutasyonu saptanmış olup, bu mutasyonların dağılımına bakıldığında %73,3'ünün (n=11) kodon 12 üzerinde olduğu ve Glisin ile Aspartat (Gly12Asp: %45,45, n=5), Glisin ile Valin (Gly12Val: %36,36, n=4), Glisin ile Sistein (Gly12Cys: %9,09, n=1) ve Glisin ile Alanin (Gly12Ser: %9,09, n=1) arasında yer değiştirme şeklinde nokta mutasyonu olduğu, %20'sinin (n=3) kodon 13 üzerinde ve Glisin ile Aspartat arasında yer değiştirme (Gly13Asp: %100, n=3) şeklinde nokta mutasyonu olduğu, %6,6'sinin (n=1) ekzon 2 kodon 61 üzerinde Glutamin ile Histidin (Gln61His; %100, n=1) arasında yer değiştirme şeklinde nokta mutasyonu olduğu gözlenmiştir.

2007 yılında Poehlman ve ark. (126) yaptıkları çalışmada 65 KRK tanılı hastanın % 29'unda K-ras mutasyonu saptamışlardır. K-ras mutasyonlarının % 15,4'ini kodon 12, % 12,3'ünü kodon 13 ve % 1,3'ini kodon 61 üzerinde saptamışlardır. Kodon 12 üzerinde en sık olmak üzere % 63 GGT'den GAT'ye, % 26 GGT'den GTT'ye ve % 5 GGT'den GCT'ye dönüşüm izlenmiştir. Kodon 13 üzerinde % 100 GGC'dan GAC'ye ve kodon 61 üzerinde % 100 CAA'dan CAC'ye dönüşüm izlenmiştir. Bu çalışmada ortalama sağkalım, cinsiyet, tümörün distal ve proksimal lokalizasyonu, grade, evre ve lenf nodu metastazı açısından incelenmiş ve K-ras mutasyonu

taşıyan hastalar ile yabancı tip olan hastalar arasında bu parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bununla birlikte, ortalama sağkalım ve tümör lokalizasyonu açısından kodon 12 mutasyonu taşıyan hastalar ile yabancı tip olan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptamışlardır. Kodon 12 mutasyonu taşıyan hastalarda ortalama sağ kalımı daha kısa ve tümör lokalizasyonunu yüksek oranda distal kolon yerleşimli olarak bulmuşlardır. 2011 yılında P. Vasovcak ve ark.'nın (127) yaptığı başka bir çalışmada, 103 KRK örneğinde K-ras geni mutasyon (kodon 12, 13 ve 61) oranı % 31,1 BRAF geni mutasyon oranı % 8,7 olarak saptamıştır. Aynı çalışmada hastaların K-ras ve BRAF gen durumu ile cinsiyet, lokalizasyon, evre, L.N metastazı açısından kıyaslanmıştır ve BRAF mutasyonu taşıyan hastalarda tümör anlamlı olarak yüksek oranda proksimal yerleşimli olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda hastalar K-ras mutasyon durumu ile yaş, cinsiyet ve tümörün histolojik tipi, lokalizasyonu, büyüme paterni, diferansiasyonu, evresi açısından incelendi. Sadece tümör lokalizasyonu ile K-ras mutasyon durumu arasında anlamlı ilişki olduğu görüldü. K-ras mutasyonu taşıyan hastaların, yabancı tip olan hastalara göre çıkan kolon yerleşim oranının daha yüksek olduğu ve iki grup arasındaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı.

2011 yılında Shen ve ark.'nın (7) 118 KRK tanılı hasta üzerinde yaptıkları çalışmada %34,7'sinde K-ras gen mutasyonu ve %1,7'sinde BRAF gen mutasyonu saptamışlardır. K-ras mutasyonlarının %23,7'sini kodon 12, %10,2'sini kodon 13 ve %0,8'ini kodon 61 üzerinde saptamışlardır. Kodon 12 üzerinde %13,6 oranla en sık GGT'den GAT'ye, %6,8 GGT'den GTT'ye ve %1,7 GGT'den GCT'ye ve AGT'ye dönüşüm izlenmişlerdir. Kodon 13 üzerinde %10,2 GGC'den GAC'ye ve kodon 61 üzerinde %0,8 CAA'dan CAT'ye dönüşüm izlenmişlerdir. Ortalama sağkalım, cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, tümör diferansiyasyonu ve tümör TNM sınıflaması açısından incelenmiş ve sadece cinsiyet açısından K-ras mutasyonu taşıyan hastalar ile yabancı tip olan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. K-ras mutasyonu kadınların % 44,7'sinde, erkeklerin % 28,2'sinde saptanmıştır. Bizim çalışmamızda K-ras mutasyonu taşıyıcıları ile

yabani tip olanlar arasında cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir saptanmadı.

Farklı çalışmalarda değişik parametreler K-ras ve BRAF genlerinin mutasyon durumu ile karşılaştırılmıştır. Örneğin, 2010 yılında Naguib ve ark.'nın (128) 186 KRK hastası üzerinde yaptıkları çalışmada % 22'sinde K-ras gen (ekzon 1 ve 2) ve % 15,6'sında BRAF gen (ekzon 11 ve 15) mutasyonu saptamışlardır. Cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, tümör diferansiyasyonu, Dukes sınıflaması, MSI, vucut kitle indeksi, alkol ve sigara kullanımı, fiziksel aktivite, hormon replasman tedavisi, HDL (yüksek dansiteli lipoprotein), LDL (düşük dansiteli lipoprotein), TG (trigliserit), ve plazma vitamin C düzeyi açısından incelenmiş. K-ras mutasyon taşıyıcılığını Dukes C, D olan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı ve yüksek oranda, MSI olan hastalarda ise istatistiksel olarak anlamlı ve düşük oranda saptamışlardır. Ayrıca HDL düzeyi, K-ras mutasyon taşıyan hastalarda anlamlı olarak düşük düzeyde saptanmıştır. Tümör diferansiyasyonu kötü olan hastalarda ve MSI olan hastalarda BRAF mutasyon taşıyıcılığı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca distal kolon yerleşimli tümörü olan hastalarda BRAF gen mutasyonu düşük oranda saptanmıştır. Ayrıca 2011 yılında Yokota (129) ve ark.'nın ileri evre ve nüks KRK tanılı 229 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada K-ras gen (kodon 12 ve 13) mutasyon oranını % 34,5 ve BRAF gen (kodon 600) mutasyon oranını % 6,5 olarak saptamışlardır. Aynı çalışmada hastaların K-ras ve BRAF gen durumu ile yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, klinik durum (ileri evre veya nüks), ortalama sağ kalım, tümörün diferansiyasyonu, tümörün metastaz yaptığı yer ve metastaz sayısı, kan ALP düzeyi, beyaz küre sayısı, kemoterapi protokolleri ve Anti-EGFR tedavisi alıp almadıkları açısından kıyaslanmıştır. BRAF mutasyon taşıyıcılarında ve K-ras kodon 13 mutasyon taşıyıcılarında tümörün sağ kolon yerleşimini anlamlı olarak daha yüksek oranda saptamışlardır. Ayrıca ileri evre ve nüks KRK hastalarında BRAF gen mutasyon durumunun güçlü bir prognostik faktör olduğunu vurgulamışlardır.

Tablo-20: Geçmiş yıllarda kolorektal kanser hastalarında yapılan K-ras analizlerinde saptanan mutasyon yüzdeleri (7, 113, 116, 118, 120-135)

Yapılan Çalışmalar ve yılları	Vaka Sayısı	K-ras gen bölgeleri	Mutasyon Yüzdeleri
A. Poehlmann ve ark. (2007)	65	Kodon 12, 13 ve 61	% 29,2
Akkirpik ve ark. (2008)	53	Kodon 12 ve 13	% 11
T. Yokota ve ark. (2011)	229	Kodon 12, 13 ve 61	% 34,5
C. H. Jeon ve ark. (2008)	78	Kodon 12, 13 ve 14	% 29,5
Georgieva ve ark. (2008)	23	Kodon 12 ve 13	% 34,3
P. Vazovcak ve ark. (2011)	103	Kodon 12, 13 ve 61	% 31,1
S. Yoshida ve ark. (2008)	88	Kodon 12 ve 13	% 30,2
E. Kaji ve ark. (2011)	98	Kodon 12 ve 13	% 58
Naguib ve ark. (2010)	186	Kodon 12 ve 13	% 22
H. Shen ve ark. (2011)	118	Kodon 12, 13 ve 61	% 34,7
Y. L. Chen ve ark. (2009)	90	Kodon 12 ve 13	% 36
Yunxia ve ark. (2010)	101	Ekzon 1 ve 2	% 32,7
Zlobec ve ark. (2010)	404	Kodon 12 ve 13	% 30,1
Baldus ve ark. (2010)	100	Kodon 12 ve 13	% 41
Hutchins ve ark.	1583	-	% 34
A. Jakubauskas ve ark (2010)	20	Kodon 12, 13 ve 66	% 25
Vaughn ve ark. (2011)	2121	Kodon 12 ve 13	% 42,4
P. Wojcik ve ark. (2010)	163	-	% 36
M. Herreros ve ark. (2011) fultex	186	Kodon 12 ve 13	% 48
Lang ve ark. (2011)	125	Kodon 12 ve 13	% 35,2
Bizim çalışmamız	50	Kodon 12, 13, 61	% 30

Piotr Wojcik ve ark.'nın (134) 2010 yılında yapmış oldukları bir çalışmada KRK hastalarında %3,5-20,6 arasında değişen farklı oranlarda BRAF gen mutasyonlarının olabileceğini vurgulamışlardır (Tablo-21). Aynı çalışmada BRAF gen mutasyonlarının Anti-EGFR tedavilerine direnç oluşturduklarını ve kötü bir prognostik faktör olduklarını saptamışlardır.

Özellikle V600E nokta mutasyonlarında bu durumun daha belirgin olduğunu saptamışlardır. Biz çalışmamızda % 2 oranında (n=1) BRAF mutasyonu saptadık.

Tablo-21: BRAF gen mutasyon çalışmaları (134).

Çalışma	Yıl	Vaka sayısı	Mutasyon Yüzdesi	Mutasyon Tipleri
Miranda ve ark.	2006	202	3.5 (7)	V600E
Maestro ve ark.	2007	324	3.7 (12)	V600E
Lee ve ark.	2008	134	4.5 (6)	V600E
Asaka ve ark.	2009	908	4.5 (41)	V600E
Yuen ve ark.	2002	215	5.1 (11)	Exon 11 ve 15
Suehiro ve ark.	2008	199	6.5 (13)	Exon 11 ve 15
Ikehara ve ark.	2005	82	7.3 (6)	Exon 11 ve 15
Nagasaka ve ark.	2004	234	9.0 (21)	V600E
Samowitz ve ark.	2005	911	9.5 (87)	V600E
Rajagopalan ve ark.	2002	330	9.7 (32)	Exon 11 ve 15
Deng ve ark.	2004	80	10.0 (8)	V600E
Shen ve ark.	2007	87	12.6 (11)	Exon 11 ve 15
Barault ve ark.	2008	585	13.3 (78)	V600E
Weisenberger ve ark.	2006	187	13.9 (26)	V600E
Ogino ve ark.	2006	837	14.1 (118)	V600E
Goel ve ark.	2007	126	20.6 (26)	V600E

KRK tedavisi, hedefe yönelik yeni tedavi ajanlarının kullanılmaya başlanmasıyla kişiselleşmiştir. Metastatik KRK hastalarında K-ras mutasyon durumu tedavi protokolü üzerinde artmış etkiye sahiptir (114). EGFR'ye yönelik ajanlar EGFR'yi reseptör düzeyinde bloke eder. K-ras mutasyonu bulunan hastalarda EGFR'ye yönelik ajanlar etkili değildir. K-ras mutasyon durumu EGFR'ye yönelik tedavi seçiminde faydalı bir biyomarkerdir (114).

KAYNAKLAR

1. Houlston SR, Tomlinson PM. Polymorphisms and colorectal tumor risk. *Gastroenterology* 2001;121:282-301.
2. <http://www.who.int/en/> Erişim: 14.11.2011
3. <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-1950/kanserle-savas-daire-baskanligi.html> Erişim: 14.11.2011
4. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244:217-21.
5. Libutti SK, Saltz LB, Rustgi AK, Teper JE. Cancer of Colon. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). *Principles and Practice of Oncology*. 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. 1060-109.
6. Jiang Y, Mackley H, Cheng H, Ajani JA. Use of K-Ras as a predictive biomarker for selecting anti-EGF receptor/pathway treatment. *Biomark Med* 2010;4:535-41.
7. Shen H, Yuan Y, Hu HG, et al. Clinical significance of K-ras and BRAF mutations in Chinese colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2011;17:809-16.
8. Asmis TR, Powell E, Karapetis CS, et al. Comorbidity, age and overall survival in cetuximab-treated patients with advanced colorectal cancer (ACRC)--results from NCIC CTG CO.17: a phase III trial of cetuximab versus best supportive care. *Ann Oncol* 2010;22:118-26
9. Tol J, Dijkstra JR, Klomp M, et al. Markers for EGFR pathway activation as predictor of outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with or without cetuximab. *Eur J Cancer* 2010;46:1997-2009.
10. Van Cutsem E, Lang I, D'haens G, et al. KRAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol* 2008;26:2.
11. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1626-34.
12. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al. KRAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J Clin Oncol* 2008;26:4000.
13. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wildtype BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:5705-12.
14. Di Fiore F, Van Cutsem E, Laurent-Puig P, et al. Role of KRAS mutation in predicting response, progression-free survival, and overall survival in irinotecan-refractory patients treated with cetuximab plus

- irinotecan for a metastatic colorectal cancer: Analysis of 281 individual data from published series. *J Clin Oncol* 2008;26:4035.
15. Cunningham D, Atkin W, Lenz, HJ et al. Colorectal cancer. *The Lancet* 2010;375:1030–47.
 16. Labianca R, Beretta GD, Kildani B et al. Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2010;74:106–33.
 17. Sağlıker Y. Harrison iç hastalıkları prensipleri. 15. baskı. İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri: 2004.
 18. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525–32.
 19. Parkin DM, Pisani P, Miller DS. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999;49:33-64.
 20. Cooper GS, Yuan Z, Landefeld CS, Johanson CF, Rimm AA. A national population-based study of incidence of colorectal cancer and age : implications for screening in older Americans. *Cancer* 1995;75:775-81.
 21. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Eng J Med* 1990;323:1664-72.
 22. Boyle P, Lonhman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ* 2000;321:805-8
 23. Goldman L, Ausiello DA. Small and large bowel tumors. In: DuBois RN (ed). *Cecil textbook of medicine*. 23rd edition. Philadelphia: Saunders; 2008. 355-63.
 24. Akız H. Kolorektal kanserlerin gelişmesinde çevresel risk faktörleri. *Türkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics* 2009;2:1-4
 25. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:14.
 26. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 2010;138:2044–58.
 27. Kim DH, Smith-Warner SA, Spiegelman D, et al. Pooled analyses of 13 prospective cohort studies on folate intake and colon cancer. *Cancer Causes and Control* 2010;21:1919–30.
 28. Juhn E, Khachemoune A. Gardner syndrome: skin manifestations, differential diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 2010;11:117–22.
 29. Benchabane H, Ahmed Y. The adenomatous polyposis coli tumor suppressor and Wnt signaling in the regulation of apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2009;656:75–84.
 30. Nieuwenhuis MN, Vasen HFA. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Crit Rev Onc Hematol* 2007;61:153–61.
 31. Sampson JR, Jones N. MUTYH-associated polyposis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009;23:209–18.
 32. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002;30:227–32.

33. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch CF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet* 2009;76:1–18.
34. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991;34:424-5.
35. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453-6.
36. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261-8.
37. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Listrom MB, Rilke FO. Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine. In: Rosai J (ed). *Gastrointestinal pathology an atlas and text*. 2nd edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1999. 909-1068.
38. Christine A, Iacobuzio-D, Elizabeth M. Epithelial neoplasms of the colorectum. In: Christine A, Iacobuzio-D (eds). *Gastrointestinal and Liver Pathology*. 2nd edition. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2005. 367-94.
39. Hare HH, Mahendraker N, Sarwate S, Tangella K. Muir-Torre syndrome: a rare but important disorder. *Cutis* 2008;82:252–6.
40. Kopacova M, Tacheci I, Rejchrt S, Bures J. Peutz-Jeghers syndrome: diagnostic and therapeutic approach. *World J. Gastroenterol* 2009;15:5397–408.
41. Beggs AD, Latchford AR, Vasen HFA, et al. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut* 2010;59:975–86.
42. Jenne DE, Reimann H, Nezu JI, et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nature Genetics* 1988;18:38–43.
43. Rosai J. Ackerman's *Surgical Pathology*. In: Rosai J (ed). *Gastrointestinal Tract, Large Bowel*. 9th edition. China: Mosby Company; 2004. 776-823.
44. Jacobs LR. Fiber and colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1988;17:747.
45. Jacobs LR. Relationship between dietary fiber and cancer. Metabolic, physiologic and cellular mechanisms. *Proc Soc Exp Bio Med* 1986;183:299.
46. Itzkowitz S. Colon carcinogenesis in inflammatory bowel disease: Applying molecular genetics to clinical practice. *J Clin Gastroenterol* 2003;36:70-4.
47. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759.

48. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 2010;138:2044–58.
49. Kodner IJ, Fry RD, Felshman JW. Colon, Rektum and Anus. In: Schwartz SI (ed). *Principles of Surgery*. 2nd edition. New York: Mc Crow-Hill Book Company; 1999. 1265-82.
50. Burt RW. Familial risk and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1996;25:793.
51. Steele GD, Mayer RJ. Adenocarcinoma of the colon and rectum. In: Zuidema GD. (ed). *Surgery of the Alimentary Tract*. 4th edition. Philadelphia: WB Saunders Company; 1991. 118-32.
52. Topuz E, Aykan FN. *Sindirim Sistemi Kanserleri*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları; 1998.
53. Dukes CE. The Classification of Cancer of the Rectum. *J Pathol* 1932;354:323-32.
54. Trowbridge RH, Burt RW. Colorectal cancer screening. *Surg Clin N Am* 2002;82:943-57.
55. Friedman SL, McQuaid KR, Grendell JH. *Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology*. 2nd edition. McGraw-Hill: Lange medical books; 2007.
56. Burns JL, Blackwell SJ. Plastic surgery. In: Townsend CM, Beauchamp RD (eds). *Sabiston Textbook of Surgery*. 18th edition. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2008. chap 73.
57. Libutti SK, Saltz LB, Teper JE. Colon Cancer. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA (eds). *Cancer*. 1st. edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2008. 1232-301.
58. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on cancer sixth edition staging. *J.Natl Cancer Inst* 2004;96:1408-9.
59. Greene FL, Page DL (eds). *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th edition. New York: Springer; 2002.
60. Guluserian KJ, Bland KI. Current protocols and outcomes for colonic cancer: Why do we fail? *Surg Oncol Clin North Am* 2000;9:731-4.
61. Lamont JP, McCarty TM, Digan RD, Jacobson R, Tulanon P, Lichliter WE Should locally excised T1 rectal cancer receive adjuvant chemoradiation? *Am J Surg* 2000;180:402-6.
62. Fleming ID, Cooper JS, Henson DE. Colon and Rectum. In: American Joint Committee On Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. 5th. edition Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. 83-90.
63. Giantonio BJ, Levy D, O'Dwyer PJ, et al. Bevacizumab (anti-VEGF) plus IFL (irinotecan, fluorouracil, leucovorin) as front-line therapy for advanced colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22:255.
64. Tol J, Punt CJ. Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *Clin Ther* 2010;32:437-53.
65. Solilicres D, Greer W, Muglioeco AM. KRAS mutation testing in the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR therapies. *Curr Oncol* 2010;17:31-40.

66. Çevikbaş U. (Çeviren) . Temel Patoloji. İstanbul; Nobel Tıp Yayınevi: 2000.
67. Brown G. Colorectal Cancer. In: Quirke P (ed). Pathology for the radiologist: Pathological insights into colorectal cancer. 1st. edition. Cambridge: Cambridge University Press; 2007.15-27
68. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P et al. Carcinoma of The Colon Rectum (2010). WHO Classification of Tumours of the Digestive System. 2010;4:132-73.
69. Yang VW, Lewis J, Wang TC, Rustgi AK: Colon cancer: an update and future directions. Gastroenterology 2010;138:2027–8.
70. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. N Engl J Med 2009;361:2449-60.
71. Daniel C. Chung. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. Gastroenterology 2000;119:854-65.
72. Bedeir A, Krasinskas AM. Molecular diagnostics of colorectal cancer. Arch Pathol Lab Med 2011;135:578-87.
73. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. Gastroenterology 2008;135:1079-99.
74. Karen EK. Early Detection and Prevention of Colorectal Cancer. In: Tauseef A, Courtney WH (eds). Colon Cancer Carcinogenesis: Gene Pathways Involved in Colon Cancer Carcinogenesis. 1st edition. USA: Slack press; 2009. 19-31
75. Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, Phelps J, Sandoval IT, Rai K. A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. Cell 2009;137:623-34.
76. Sillars-Hardebol AH, Carvalho B, deWit M, et al. Identification of key genes for carcinogenic pathways associated with colorectal adenomato-carcinoma progression. Tumour Biol 2010;31:89-96.
77. Ramos FJ, Taberero J. K-ras mutation satatus as a predictive biomarker in metastatic colorectal cancer. Biomarkers Med 2008;2:97-9
78. Bos JL. Ras oncogenes in human cancers. Cancer Res 1989;49:4682-9.
79. Cox AD, Der CJ. Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras? Biochim Biophys Acta 1997;1333:51-71.
80. Telkoparan P, Tazebey UH. Ras Protein Ailesi: Hücresel İşlevi, Moleküler Kontrolü, Onkogenezdaki Rolü. Türk Biyokimya Dergisi 2011;36:367-73
81. Zeng M, Kikuchi H, Pino MS, Chung DC. Hypoxia activates the K-ras proto-oncogene to stimulate angiogenesis and inhibit apoptosis in colon cancer cells. PLoS One 2010;5:10966.
82. <http://ghr.nlm.nih.gov/> erişim tarihi: 07.06.2012
83. Harrison S, Benziger H. The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review. Surgeon 2011;9:200-10.
84. Sachse C, Gillian S, Murray JV, et al. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. Carcinogenesis 2002;23:1839-45.

85. Nusbaum R, McInnes RR, Willard HF (eds). Thompson & Thompson Genetics in medicine. 6th. edition. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2005.
86. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001;344:1196.
87. Tortola S, Marcuello E, González I, et al. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17:1375-81.
88. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:153-62.
89. Shah SN, Hile SE, Eckert KA. Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias and variability in clinical cancer phenotypes. *Cancer Res* 2010;70:431-5.
90. Poulgiannis G, Frayling IM, Arends MJ. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch Syndrome. *Histopathology* 2010;56:167-79.
91. Bellizzi AM, Frankel WL. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol* 2009;16:405-17.
92. Auclair J, Vaissiere T, Desseigne F, et al. Intensity dependent constitutional MLH1 promoter methylation leads to early onset of colorectal cancer by affecting both alleles. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:178-85.
93. Walther A, Johnstone E, Swanton C. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009;9:489-99.
94. Bacher JW, Flanagan LA, Smalley RL. Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI high tumours. *Dis Markers* 2004;20:237-50.
95. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer* 2010;46:2788-98.
96. Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2010;138:2088-100.
97. Farris AB, Misdraji J, Srivastava A. Sessile serrated adenoma: challenging discrimination from other serrated colonic polyps. *Am J Surg Pathol* 2008;32:30-5.
98. Torlakovic EE, Gomez JD, Driman DK. Sessile serrated adenoma (SSA) vs traditional serrated adenoma (TSA). *Am J Surg Pathol* 2008;32:21-9.
99. O'Brien MJ, Yang S, Mack C, et al. 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* 2006;30:1491-501.
100. Worthley DL. Serrated neoplasia of the colorectum. *World J Gastroenterol* 2007;13:3792-8.

101. Sandmeier D, Benhattar J, Martin P, Bouzourene H. Serrated polyps of the large intestine: a molecular study comparing sessile serrated adenomas and hyperplastic polyps. *Histopathology* 2009;55:206-13.
102. Vakiani E, Yantiss RK. Pathologic features and biologic importance of colorectal serrated polyps. *Adv Anat Pathol* 2009;16:79-91.
103. Pratilas CA, Solit DB. Targeting the mitogen activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res* 2010;16:3329-34.
104. Minoo P, Moyer MP, Jass JR. Role of BRAF-V600E in the serrated pathway of colorectal tumourigenesis. *J Pathol* 2007;212:124-33.
105. Welbrock C, Hurlstone A. BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochem Pharmacol* 2010;80:561-7.
106. Kambara T, Simms L, Whitehall VLJ , et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 2004;53:1137-44.
107. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 2005;54:1283–6.
108. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006;24:2137-50.
109. Anne BB, Clive A. Colorectal cancer. Clinical review. *BMJ* 2007;335:715-8.
110. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE. Other Tumours of the Large Intestine, Chapter 41. In: Whitehead R, Churchill Livingstone (eds). *Gastrointestinal and Oesophageal Pathology*. 2nd edition. New York; 1995. 863-905.
111. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71–96.
112. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.
113. Yunxia Z, Jun C, Guanshan Z, Yachao L, Xueke Z, Jin L. Mutations in epidermal growth factor receptor and K-ras in Chinese patients with colorectal cancer. *BMC Med Genet* 2010;11:34.
114. Lanthaler AJ, Spizzo G, Mitterer M, Mian C, Mazzoleni G. Interlaboratory comparison of K-ras testing by real-time PCR and RFLP in colorectal cancer samples. *Diagn Mol Pathol* 2011;20:90-3.
115. Küpelioğlu AA. Kolorektal kanserde histopatoloji. *Türkiye Klinikleri* 2004;9:25-27.
116. Herreros-Villanueva M, Rodrigo M, Claver M, et al. KRAS, BRAF, EGFR and HER2 gene status in a Spanish population of colorectal cancer. *Mol Biol Rep* 2011;38:1315-20.
117. Grene F, Stewart A, Norton H. A new TNM staging strategy for nodepositive (stage III) colon cancer: an analysis of 50,042 patients. *Ann Surg* 2002;236:416.

118. Chen YL, Chang YS, Chang JG, Wu SM. Genotyping of K-ras codons 12 and 13 mutations in colorectal cancer by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2009;1216:5147-54.
119. Chen JS, Hsieh PS, Chiang JM, et al. Clinical outcome of signet ring cell carcinoma and mucinous adenocarcinoma of the colon. *Chang Gung Med J* 2010;33:51-57.
120. Zlobec I, Bihl MP, Schwarb H, Terracciano L, Lugli A. Clinicopathological and protein characterization of BRAF- and K-RAS-mutated colorectal cancer and implications for prognosis. *Int J Cancer*. 2010;127:367-80.
121. Akkiprik M, Celikel CA, Düşünceli F, et al. Relationship between overexpression of ras p21 oncoprotein and K-ras codon 12 and 13 mutations in Turkish colorectal cancer patients. *Turk J Gastroenterol* 2008;19:22-7.
122. Georgieva M, Krasteva M, Angelova E, et al. Analysis of the K-ras/B-raf/Erk signal cascade, p53 and CMAP as markers for tumor progression in colorectal cancer patients. *Oncol Rep* 2008;20:3-11.
123. Kaji E, Kato J, Suzuki H, et al. Analysis of K-ras, BRAF, and PIK3CA mutations in laterally-spreading tumors of the colorectum. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:599-607.
124. Yoshida S, Ikehara N, Aoyama N, et al. Relationship of BRAF mutation, morphology, and apoptosis in early colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2008;23:7-13.
125. Jeon CH, Lee HI, Shin IH, Park JW. Genetic alterations of APC, K-ras, p53, MSI, and MAGE in Korean colorectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis* 2008;23:29-35.
126. Poehlmann A, Kuester D, Meyer F, Lippert H, Roessner A, Schneider-Stock R. K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. *Pathol Res Pract* 2007;203:489-97.
127. Vasovcak P, Pavlikova K, Sedlacek Z, et al. Molecular genetic analysis of 103 sporadic colorectal tumours in Czech patients. *PLoS One* 2011;6:e24114.
128. Naguib A, Mitrou PN, Gay LJ, et al. Dietary, lifestyle and clinicopathological factors associated with BRAF and K-ras mutations arising in distinct subsets of colorectal cancers in the EPIC Norfolk study. *BMC Cancer* 2010;10:99.
129. Yokota T, Ura T, Shibata N, et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. 2011;104:856-62
130. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 2010;16:790-9.
131. Hutchins G, Southward K, Handley K, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1261-70.
132. Jakubauskas A, Giskevicius L. KRas and BRaf mutational status analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using

- multiplex polymerase chain reaction-based assay. Arch Pathol Lab Med 2010;134:620-4.
133. Vaughn CP, Zobel SD, Furtado LV, Baker CL, Samowitz WS. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. Genes Chromosomes Cancer 2011;50:307-12.
 134. Wójcik P, Okoń K, Osuch C, Klimkowska A, Tomaszewska R. BRAF mutations in sporadic colorectal carcinoma from polish patients. Pol J Pathol. 2010;61:23-6.
 135. Lang AH, Drexel H, Geller-Rhomberg S, et al. Optimized allele-specific real-time PCR assays for the detection of common mutations in KRAS and BRAF. J Mol Diagn 2011;13:23-8.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasının hazırlanmasında destek ve katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Tahsin Yakut'a ve uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde emeklerini esirgemeyen değerli hocalarıma; başta Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Tahsin Yakut olmak üzere, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nın saygıdeğer öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Tuna Gülten'e; birlikte çalıőmaktan büyük mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma; tez çalıőmasının yürütülmesinde desteklerinden dolayı tez sorumlu araőtırmacısı Onkoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Özkan Kanat başta olmak üzere Onkoloji Bilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma; eğitimim süresince benden yardımlarını esirgemeyen ve birçok paylaşımda bulunduğum Tıbbi Genetik Anabilim Dalı personel ve çalışma arkadaşlarıma; biricik oğlum Arda Selim'e, desteğini her zaman hissettiğim değerli eşim Dr. Özlem Görükmez'e, eğitim hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olan annem, babam ve kardeşlerime teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

AD,SOYAD: Orhan GÖRÜKMEZ

ADRES: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim
Dalı, Görükle, Bursa

DOĞUM TARİHİ: 01 Haziran 1981

DOĞUM YERİ: Çorum

MEDENİ HALİ: Evli

TELEFON : +90224 2954398

E-mail: orhang@uludag.edu.tr

DİPLOMA NO: 14784

YABANCI DİLİ: İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU:

1988-1993 Yıldırım Beyazıt İlkokulu, Kütahya.

1993-1999 Küyahya Lisesi, Kütahya

2000-2006 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

Haziran 2008 - Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim
Dalı'nda uzmanlık eğitimine başladım. Halen araştırma görevlisi olarak
çalışmaktayım.