

164900

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

KOLON POLİPLERİNDE K-RAS MUTASYON SIKLIĞI

GASTROENTEROLOJİ YANDAL

UZMANLIK TEZİ

DR. TARKAN KARAKAN

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. G. ŞÜKRÜ DUMLU

ANKARA - 2005

## İÇİNDEKİLER

|       |                                                         |    |
|-------|---------------------------------------------------------|----|
| I.    | İÇİNDEKİLER                                             | 2  |
| II.   | TEŞEKKÜR                                                | 3  |
| III.  | KISALTMALAR                                             | 4  |
| IV.   | GİRİŞ                                                   | 5  |
| V.    | GENEL BİLGİLER                                          | 7  |
|       | a. KOLON POLİPLERİ                                      | 7  |
|       | i. Neoplastik Polipler                                  | 8  |
|       | ii. Patogenez                                           | 15 |
|       | iii. Kolon Karsinogenez Yolları                         | 19 |
|       | iv. Epidemiyoloji                                       | 22 |
|       | v. Adenom Gelişimi için Risk Faktörleri                 | 26 |
|       | vi. Adenom Karsinom İlişkisinde K-ras Mutasyonu         | 29 |
| VI.   | GEREÇ VE YÖNTEM                                         | 31 |
|       | a. Kolorektal poliplerin histopatolojik özellikleri     | 32 |
|       | b. Hastaların demografik, klinik ve endoskopik verileri | 33 |
|       | c. DNA Ayırıştırma Yöntemi                              | 34 |
|       | d. Oligonükleotidler ve PCR Çoğaltma Yöntemi            | 34 |
|       | e. Restriksiyon Enzim Analizi                           | 35 |
| VII.  | BULGULAR                                                | 36 |
| VIII. | TARTIŞMA VE SONUÇ                                       | 40 |
| IX.   | ÖZET                                                    | 53 |
| X.    | KAYNAKLAR                                               | 54 |

**TEŞEKKÜR**

Gastroenteroloji yandal ihtisası yaptığım dönemde yetişmemde katkısı olan tüm Gastroenteroloji Bilim Dalı öğretim üyelerine, ayrıca tezimin her aşamasında sonsuz desteklerini esirgemeyen tez yöneticim Prof. Dr. G. Şükrü Dumlu'ya ve Gastroenteroloji Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Selahattin Ünal'a; laboratuvar aşamasında önemli desteklerini gördüğüm Yrd. Doç Dr. Mehmet Ali Ergün ve Dr Doruk Engin'e, yandal ihtisası süresinde birlikte çalıştığım tüm asistan, hemşire ve bölüm personeline, tez yazım aşamasında sonsuz destek veren eşim Şebnem ve oğlum İnan Karakan'a teşekkürlerimi sunarım.

**KISALTMALAR**

aa: amino asit

ADH: Alkol dehidrojenaz

Ala: Alanin

APC: Adenomatöz Polipozis Coli

CI: Confidence Interval

COX: Cyclooxygenase

DCC: Deleted in Colon Cancer

DNA: Deoksiribonükleik asit

FAP: Familial Adenomatöz Polipozis

GDP: Guanin difosfat

GTP: Guanin trifosfat

HNPCC: Hereditör non-polipozis kolorektal kanser

kDa: Kilodalton

MAP: Mitogen-activated protein

MTHFR: Metilenetetrahidrofolat redüktaz

NSAİİ: Non-steroid Anti-İnflamatuvar İlaçlar

OR: Odds ratio

PCR: Polimeraz Chain Reaction

Val: Valin

## **KOLON POLİPLERİNDE K-RAS MUTASYON SIKLIĞI**

### **GİRİŞ**

Gastrointestinal polip, barsak lümenine doğru çıkıntı yapan bir kitle lezyonu şeklinde tanımlanabilir. Polip makroskopik görünümü itibariyle, saplı-sapsız, boyutu ve soliter-multipl oluşuna göre sınıflandırılabilir. Ancak tüm bunların dışında, en önemli sınıflama histopatolojik olarak yapılan sınıflamadır. Polipler barsak lümenine doğru çıkıntı yaptıklarından dolayı ve feçesin geçişi sırasında sürtünmeye maruz kaldıkları için, birtakım semptomlara yol açabilirler. Peristaltik aktivite ile hareket eden barsak içeriğinin poliplere sürtünmesi sonucu; ülserasyon, kanama veya karın ağrısı meydana gelebilir. Bazen büyük polipler barsak obstruksiyonuna dahi yol açabilirler. Polipler nadiren semptomatiktir. Klinik olarak poliplerin oluşturduğu en büyük tehlike, bazı poliplerin taşıdığı malignite riskidir.

Kolorektal kanserlerin büyük bir kısmının başlangıç noktası benign özellikteki adenomatöz poliplerdir. Buna rağmen, tüm kolon adenomlarının ancak küçük bir yüzdesi kolon kanserine dönüşmektedir. Gelişmiş ülkelerde adenomatöz poliplerin sıklığının artması nedeniyle, bu tür poliplerin tanınması ve endoskopik olarak çıkarılması, kolon kanserinden korunmada büyük önem taşımaktadır. Ancak tüm hastalara kolonoskopi gibi maliyeti yüksek ve invaziv bir işlem uygulamak pratik olarak zorluklar taşımaktadır. Bu nedenle poliplerin değişik tiplerinin taşıdığı genetik özellikler (malignite potansiyeli) ve poliplerin doğal seyrinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

İnsanlarda tümör dokusunda çok sayıda onkogen belirlenmiştir. Kolon kanserinde en önemli onkogenlerden bir tanesi ras proto-onkogen ailesidir. Ras proto-onkogen ailesinin en önemli üyesi k-ras, birçok kolon adenomu ve kanserinin

gelişiminde rol oynamaktadır. Kolorektal adenomlarda k-ras mutasyonu, adenomun çapı ve displazi, karsinoma in situ gibi ileri düzey patolojik değişikliklerin varlığı ile korelasyon göstermektedir. K-ras mutasyonu saptanan adenomlar, malignite potansiyeli yüksek lezyonlardır. Bu nedenle k-ras mutasyonunun gösterilmesi klinisyenlerin hasta takip ve tedavi yaklaşımlarını etkileyebilir.

Bu çalışmanın amacı, kolonoskopi sırasında saptanan adenomatöz poliplerde k-ras mutasyonu sıklığının belirlenmesi, ikincil hedef olarak da k-ras mutasyonu ile polibin morfolojik, histolojik özellikleri ile hastaların demografik, klinik, diyetetik özellikleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır.



## GENEL BİLGİLER

### Kolon Polipleri

Kolon polipleri iki majör gruba ayrılabilir: Neoplastik (adenomlar ve karsinomlar) ve non-neoplastik (tablo 1).

|                                                             |
|-------------------------------------------------------------|
| <b>Tablo 1:</b> Kolorektal poliplerin sınıflandırılması     |
| <b>NEOPLASTİK MUKOZAL POLİPLER</b>                          |
| Benign (Adenom)                                             |
| Tübüler adenom                                              |
| Tübülovillöz adenom                                         |
| Villöz adenom                                               |
| Malign (Karsinom)                                           |
| Non-invaziv karsinom                                        |
| Karsinoma-in situ                                           |
| İntramukozal karsinom                                       |
| İnvaziv karsinom (muskularis mukozayı aşan)                 |
| <b>NON-NEOPLASTİK MUKOZAL POLİPLER</b>                      |
| Hiperplastik polip (metaplastik polip)                      |
| Normal epitel (polipoid yapıda)                             |
| Juvenil polip (retansiyon polibi)                           |
| Peutz-Jeghers polibi                                        |
| İnflamatuvar polipler                                       |
| İnflamatuvar barsak hastalığı                               |
| Bakteriyel enfeksiyonlar veya Amebiyazis                    |
| Şistozomiazis                                               |
| <b>SUBMUKOZAL LEZYONLAR</b>                                 |
| Kolitis sistika profunda                                    |
| Pnömatosis sistoides intestinalis                           |
| Lenfoid polipler (benign-malign)                            |
| Lipomlar                                                    |
| Karsinoidler, Metastatik neoplazmlar, Diğer nadir lezyonlar |

## NEOPLASTİK POLİPLER

### Patoloji

Adenomatöz polipler benign neoplastik epitelden kaynaklanan pedinküllü (saplı) veya sesil (sapsız) poliplerdir (1,2). Neoplastik özellikler, histolojik olarak, glandüler yapılarda göze çarpar. Tübüler adenomlar en sık görülen gruptur. Tübüler adenomlarda karmaşık dallanmış adenomatöz gland yapıları görülür. Villöz adenomlarda ise glandüler yapılar, polibin yüzeyinde merkezine doğru parmaklı çıkıntılar şeklinde uzanır. Tübüler adenomlar (villöglandular) ise her iki grubun özelliklerini taşır. Polipler baskın olan glandüler yapının tipine göre sınıflandırılır. Örneğin saf villöz adenom nadirdir ve bileşiminde villöz yapılar baskın olan polipler villöz adenom olarak adlandırılır. Dünya Sağlık Örgütü'nün adenom sınıflamasına göre; bir polibin glandüler yapılarının %80'inden fazlası dallanma gösteriyorsa bu polibe tübüler, %80'inden fazlası villöz yapıda ise villöz adenom denilmektedir (3). Adenomatöz poliplerin %80-86'sı tübüler, %8-16'sı tübülovillöz ve %3-16'sı villöz adenomlardır (4,5). Tübüler adenomlar küçük olup, genellikle displazi içermez. Halbuki villöz adenomlar büyük boyutta olup, displazi içermeye eğilimindedir.

Tanım olarak tüm kolon adenomları displastiktir. Adenomatöz epitel anormal hücresel farklılaşma ve yenilenme özellikleri gösterir. Bunun sonucu olarak, kolon kriptlerinde hiperselülerite, hücre çekirdeklerinde hiperkromatik özellikler, değişen oranlarda mükün üretimi görülür. Uzunlamasına yerleşen hücre çekirdekleri, mikroskopik olarak, bahçe çitine benzer bir görünüme sahiptir. Bu hücresel özellikler nedeniyle, hematoksilin-eozin boyaması ile, adenomatöz epitel bazofilik bir görünüm sergiler. Baskın olan hücre tipleri kolumnar epitel veya olgunlaşmamış Goblet hücreleridir. Ancak nadiren nöroendokrin hücreler, Paneth hücresi, skuamöz morüller,

ve melanosit içerebilir. Çapraz mikroskopik kesitlerde adenomatöz poliplerin lümeni pürüzsüz bir şekilde düzgündür. Hiperplastik poliplerde ise lümen düzensizdir.

Adenomlarda görülen displazi üç gruba ayrılır: hafif, orta ve şiddetli. Birçok adenomda değişik derecelerde displazi odaklarına rastlanır. Ancak bir polibin displazi derecesi içerdiği en şiddetli displaziye göre adlandırılır. Hafif displazide hücrelerin kutuplaşma özellikleri korunmuştur. Ancak çekirdekleri hiperkromatik, uzunlamasına ve genişlemiş görünümündedir. Çekirdek içinde belirgin nükleolus görülmez. Goblet hücrelerinde müsin kaybı vardır. Yapısal olarak hücrelerde kalabalıklaşma, dallanma ve tomurcuklanma görülebilir. Orta şiddette displazide ise çekirdek yapıları pleomorfik, stratifiye görünümde olup, Goblet hücrelerinde müsin kaybı artmıştır. Şiddetli displazide ise hücre çekirdekleri pleomorfik, stratifiye görünümde olup, çok sayıda nükleolus içermektedir. Çekirdek-sitoplazma oranı artmış ve hücreler daha kalabalık görünümündedir. Şiddetli displazide ise stratifikasyon ve çekirdek polimorfizmi daha şiddetlidir. Nükleolus sayısı, çekirdek-sitoplazma oranında artış ve glandüler kalabalıklaşma gibi bulgular oldukça sıktır. Hücre proliferasyonu arttıkça, kriptlerde hücreler ve glandlar üst üste binmeye başlar, dağınık, düzensiz bir görünüm sergiler. Bu duruma karsinoma in situ denilmektedir. Birçok patolog, şiddetli displazi ile karsinoma in situ tanımını birleştirerek, ikisini birlikte şiddetli displazi olarak tanımlamaktadır (4). Buradaki amaç, cerrahi gerektirmeyen, çoğu kez endoskopik olarak tedavi edilebilecek lezyonlarda karsinom terimini kullanmamaktır. Günlük kullanımda Kolorektal adenomlarda sadece iki çeşit displazi terimi kullanılmaktadır. Hafif displazi; hafif ve orta şiddetteki displaziyi içermektedir. Şiddetli displazi ise şiddetli displazi ve karsinoma in situ terimlerini birleştirmektedir.

Karsinoma in situ; bazal membranı aşmayan, kript içerisindeki hücre proliferasyonunu temsil etmektedir. Eğer bir neoplazi odağı bazal membranı aşarak, mukozanın lamina propria tabakasına ulaşırsa, bu lezyona intramukozal karsinom denilmektedir. Karsinoma in situ ve intramukozal lezyonların ikisi de metastatik potansiyeli olmayan, non-invaziv lezyonlardır. Muskularis mukozanın üzerinde lenfatik sistem olmadığından, bu tabakanın üzerindeki lezyonların invaziv özelliği yoktur (6). Hatta karsinoma in situ ve intramukozal karsinomalara, agresif tedavilerden kaçınmak için, non-invaziv karsinom terimi de kullanılmaktadır. Muskularis mukozayı geçen bir neoplastik ola dolamsı halinde ise bu polibe invaziv karsinom veya malign polip denilmektedir. Adenomun histolojik alt tipi ve çapı, displazi gelişimi yönünden önemli parametrelerdir (Tablo 2).

**Tablo 2:** Adenomların çapı, histolojik alt tipi ve displazi gelişme riski arasındaki ilişki (5,7,8).

| ALT TİP      | ADENOM ÇAPI |        |       | DİSPLAZİ DERECEŚİ |      |          |
|--------------|-------------|--------|-------|-------------------|------|----------|
|              | <1 cm       | 1-2 cm | >2 cm | Hafif             | Orta | Şiddetli |
| Tübüler      | %77         | %20    | %4    | %88               | %8   | %4       |
| Tübülovillöz | %25         | %47    | %29   | %58               | %26  | %16      |
| Villöz       | %14         | %26    | %60   | %41               | %38  | %21      |

## **ADENOMUN BÜYÜKLÜĞÜ**

Adenomlar büyüklük olarak üç kategoriye ayrılır: 1 cm den küçük, 1-2 cm arası ve 2 cm den büyük polipler (7). Adenomların çoğu 1 cm den küçüktür. Ancak adenom büyüklüğü ile ilgili çalışmalarda, çalışma dizaynı, hasta grubunun yaşı, kolondaki lokalizasyonlarına göre farklılıklar göstermektedir. Otopsi çalışmalarında ise başka nedenlerle ölen hastalar incelendiği için daha gerçekçi sonuçlar elde edilmektedir. Otopsi çalışmalarında adenomların sadece %13-16'sı 1 cm den büyüktür (9-11). Cerrahi veya endoskopik çalışmalarda ise semptomatik hasta grubu incelendiğinden, 1 cm den büyük poliplerin insidansı daha yüksektir (%26-40) (4,5,7). Kolon kanserinin prevalansının yüksek olduğu bölgelerde yapılan çalışmalarda, daha büyük poliplerin insidansı artmaktadır (12,13). Yaşla birlikte adenom büyüklüğü artmaktadır (10,14,15). Bu durum düşük kolon kanser prevalansı olan bölgeler için dahi geçerlidir (12). Büyük adenomlar sıklıkla distal kolonda yerleşmektedir (4,7,10).

## **DİMİNUTİF POLİPLER**

Diminutif polip terimi 5 mm veya daha küçük polipler için kullanılmaktadır. Diminutif polipler endoskopik işlemler sırasında sık olarak rastlanmaktadır. Eski inanışın aksine diminutif poliplerde de malign potansiyel olabilir. Yapılan çalışmalarda Diminutif poliplerin %30-50'si adenomatöz poliplerdir (16-20). Adenomatöz olmalarına rağmen, diminutif poliplerde kanser riski oldukça düşüktür. Diminutif poliplerin %1'inden daha azı villöz komponent içerir. Şiddetli displazi veya karsinom odakları ise

hemen hemen hiç görülmez. Distal kolonda diminutif polip saptanan olguların retrospektif analizinde, sadece %33 hastada, proksimal kolonda yine diminutif özellikte polip saptanmıştır. Prospektif kolonoskopik çalışmalarda da distalde diminutif polip bulunan hastaların %24-34'ünde proksimal kolonda diminutif polip bulunmuştur (18-20). Epidemiyolojik bir çalışmada, diminutif polip saptanan hastalarda, biyopsi alınmadan takip edilse bile, yaşam sürelerinin genel toplumdan farklı olmadığı bildirilmiştir (17). Tüm bu bilgiler ışığında, diminutif polipler, adenomatöz polip dahi olsa, fazla klinik ve biyolojik önem taşımamaktadır. Bu durumun tek istisnası, herediter non-polipozis kolonkanser sendromunda diminutif poliplerin bile villöz özellikler veya şiddetli displazi göstermesidir. Bunun dışında diminutif polipler genel olarak benign özellikte poliplerdir.

## **ADENOMATÖZ POLİPLERİN MALİGN POTANSİYELLERİ**

Adenomatöz poliplerde malign potansiyeli gösteren en önemli üç özellik; polip büyüklüğü, histolojik tipi ve displazi varlığıdır. Her üç özellik birbirleri ile yakından ilişkili olduğundan, malign potansiyelin hangisine bağlı olduğunu belirlemek oldukça zordur. Örneğin, 1 cm nin altındaki poliplerde malignite potansiyeli %1.3 iken, eğer histolojik olarak villöz özellikler veya displazi mevcutsa, kanser riski %10-27 gibi değerlere ulaşmaktadır (8). Ancak 1 cm den küçük, tübüler özellikler gösteren, hafif displazi bulunan bir adenom nadiren kanseröz dönüşüm gösterir (Tablo 3). 1 cm den büyük, villöz özellikte veya şiddetli displazi-karsinoma in situ içeren poliplere ileri derecede patoloji içeren adenomlar (adenoma with advanced pathology-AAP) denilmektedir.

**Tablo 3:** Adenom çapı, Histolojik alt tip, Displazi derecesi ve İnvaziv karsinom görülme sıklığı

| <b>KARSİNOM YÜZDESİ</b> |                       |                     |               |                          |             |                 |
|-------------------------|-----------------------|---------------------|---------------|--------------------------|-------------|-----------------|
|                         | <b>Histolojik tip</b> |                     |               | <b>Displazi derecesi</b> |             |                 |
| Adenom çapı             | <i>Tübüler</i>        | <i>Tübülovillöz</i> | <i>Villöz</i> | <i>Hafif</i>             | <i>Orta</i> | <i>Şiddetli</i> |
| < 1 cm                  | 1                     | 4                   | 10            | 0.3                      | 2           | 27              |
| 1-2 cm                  | 10                    | 7                   | 10            | 3                        | 14          | 24              |
| > 2cm                   | 35                    | 46                  | 53            | 42                       | 50          | 48              |

## **DİĞER ADENOM VARIYANTLARI**

### **Düz Adenomlar**

Muto ve ark. son yıllarda düz adenomlar olarak bilinen yeni bir adenom alt grubu tanımlamıştır (21). Düz adenomlar endoskopik olarak düz veya çok hafif çıkıntı yapan adenomlardır. Bazı tipleri ise ortasında bir çöküntü içerir. Bunlara deprese adenomlar denilmektedir. Düz adenomlar 1 cm den küçük adenomlardır. Özellikle Japonya'dan yapılan çalışmalarda bu tip düz adenomların tanınması için değişik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan kromoendoskopi ve büyütmeli endoskopi yöntemleri giderek yaygınlaşmaktadır (22). Düz adenomlar tüm adenomların %8.5-12 sini oluşturmaktadır. Prospektif bir çalışmada, bir yıllık zaman diliminde, kolonoskopi yapılan 148 hastanın 18 tanesinde (%12) özel bir teknik uygulamadan (kromoendoskopi, büyütmeli endoskopi) düz adenom saptanmıştır. İngiltere'de yapılan daha geniş bir prospektif bir çalışmada, özel endoskopik teknikler kullanılarak saptanan

adenomların %36'sı düz adenomlar olup; bunların 4 tanesi deprese adenom ve bu 4 tane polibin 3 tanesinde ise kanser veya şiddetli displazi saptanmıştır. Lynch ve ark. tarafından hereditör düz adenom sendromu tanımlanmıştır (23). Moleküler genetik yöntemlerin gelişmesiyle birlikte bu sendromun, familial adenomatöz polipozis sendromunun bir varyantı olduğu anlaşılmıştır. Düz adenomların doğal seyri bilinmemektedir. Muhtemelen düz adenomlar tipik polipoid adenomlara dönüşmektedir. Ancak bazı kanserli dokuların komşuluğunda rezidüel düz adenom bölgelerinin saptanması ve düz adenomlarda k-ras mutasyonunun çok nadir görülmesi, bu tip adenomların polipoid faza geçmeden kansere dönüşebildiğini göstermektedir. Muhtemelen düz adenomlar nadir görülen fakat iyi bilinen küçük de novo kolon kanserlerinin öncülleridir.

### **Serrated Adenomlar**

Serrated adenomlar, adenomatöz ve hiperplastik özellikleri birlikte taşıyan poliplerdir. Eskiden “miks hiperplastik-adenomatöz polipler” denilen bu polipler, histolojik olarak kript epitelinde testere dişi manzarası gösterirler. Bu görünüm hiperplastik poliplere benzemekle birlikte, serrated adenomlarda nükleer atipi görülür. Bu yönüyle adenomatöz poliplere benzer.

### **Aberran Kriptler**

İnsan ve karsinogen ile temas eden rat kolon mukozalarının incelenmesi sonucu preneoplastik bir lezyon olan aberran kriptler terimi ortaya atılmıştır (24). Aberran kript, makroskopik olarak normal mukozada, eliptik, “kuş gözü” benzeri hücresel birikimlerdir. Metilen mavisi ile boyandığı zaman mikroskopta düşük büyütme ile veya

son zamanlarda geliştirilen büyütme endoskop yardımıyla görülebilmektedir. Yukarıdan bakıldığında, aberran kriptlerin lümeni düzensiz, eliptik şekildedir. Aberran kriptler, hayvan çalışmalarında karsinogenez ve kemoprofilaksinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Ancak aberran kriptlerin adenomların mutlak başlangıç noktası olup olmadığı veya hayvan çalışmalarının insanlardaki adenom patogenezinin uyarlanabilirliği halen netlik kazanmamıştır. İnsanlardaki aberran kriptler genellikle hiperplastik özelliktedir. Ancak displastik özellikteki aberran kriptler erken preneoplastik lezyonlar olabilir. Moleküler çalışmalarda displastik aberran kriptlerde APC mutasyonları saptanmıştır.

## **PATOGENEZ**

### **Histogenez**

Adenomatöz polipler hücresel proliferasyon ile apoptozis arasındaki dengesizlikten köken alır. İlk bulgu, kript epitelinde bir odakta, kript tabanında sınırlı kalmayan ve tüm kript boyunca uzanan hücresel proliferasyonun ortaya çıkmasıdır. Bu anomaliye unikriptal adenom denilmektedir. Lümeneye bakan tarafta DNA sentezleyen hücrelerin lümeneye dökülmesi gerekirken, tekrar kript lümenine, aşağıya doğru bükülmesi ve alttaki kript epitel hücrelerinin arasına girmesi ile adenom oluşmaya başlar. Yeni adenomatöz glandlar bükülme veya dallanma ile oluşmaya başlar. Bu aşamada adenomun histolojik tipi belirir. Bir teoriye göre, alttaki mezenşimal hücreler (bağ dokusu ve kapillar damarlar) ile olan etkileşim, adenomun histolojik tipini belirlemektedir. Örneğin, tübüler adenomlarda mezenşimal proliferasyon çok az görülür ve gelişebilecek fazla alan olmadığından epitel hücreleri üst üste biner. Böylece tübüler adenomların boyutu daha küçük olur. Villöz adenomlarda ise mezenşimal proliferasyon,

epitel proliferasyonuna eşlik eder. Bunun sonucu olarak, daha uzun çıkıntılar gelişir ve daha büyük bir polip meydana gelir.

Güncel adenom gelişim teorisine göre, adenomlar monoklonal özellikte olup, tek bir hücreden köken alır. İntestinal dokusunda XO/XY mozaik paterni olan Turner ve FAP sendromları olan bir hastada Y kromozom probu kullanılarak inceleme yapılmıştır. Bu çalışmada normal sağlıklı kriptler monoklonal olmasına rağmen (XO veya XY), adenomların %76'sı poliklonal özellikte bulunmuştur. Sporadik adenomlarda ise bu konuda henüz bilgi bulunmamaktadır.

### **Adenom-Karsinom Hipotezi**

Genel olarak kabul edilen görüş, kolon kanserlerinin yaklaşık olarak hepsi, adenomlardan kaynaklanmaktadır. Nadiren kolon kanseri düz, adenomatöz olmayan poliplerden de novo olarak gelişebilir. Adenom-karsinom ilişkisi epidemiyolojik, klinik, patolojik ve moleküler çalışmalardan köken almaktadır.

### **Epidemiyolojik Kanıtlar**

Bir toplumdaki adenom prevalansı ve multipl adenomu olan hasta prevalansı, kolon kanseri prevalansı ile paralellik gösterir (25). Adenom prevalansı, kolon kanseri açısından düşük riskli bölgeden yüksek riskli bir bölgeye göç edildiğinde artmaktadır. Adenomatöz polip ve kolon kanserinin prevalansları yaş ile artmaktadır (26). Adenom prevalansı kolon kanseri prevalansını 5-10 yıl geriden takip etmektedir. Bu bulgu adenomun öncül bir lezyon olduğu savını desteklemektedir. FAP olgularında da durum benzerdir. Adenom gelişimi kanser gelişiminden 10-12 yıl öncesine rastlamaktadır. Sporadik adenomlarda bile polip-kanser geçişi en az 4 yıldır.

### **Kliniko-patolojik Kanıtlar**

Adenomların kansere dönüştüğü gösteren en kuvvetli kanıtlar endoskopik tarama çalışmalarından gelmektedir. Ulusal Polip Çalışması'nın sonuçlarına göre (4);

- Adenomların kolonoskopik olarak çıkarılması, beklenen kolon kanseri insidansını azaltmaktadır
- Tarama proktosigmoidoskopileri sonucunda beklenen rektal kanser insidansı ve ölümleri azalmaktadır
- Patolojik incelemelerde kolon kanseri dokusunda rezidü adenom bölgeleri saptanmıştır
- Normal mukozada küçük kanser odakları oldukça nadir iken, adenomlarda göreceli olarak çok siktir
- Büyük adenomlar ile kolon kanserlerinin anatomik dağılımları benzerdir
- Kolon kanseri nedeniyle çıkarılan kolonların üçte birinde adenom saptanmıştır. Birden fazla senkron kanseri olanlarda ise 2/3 oranında adenom eşlik etmektedir (27).

### **Moleküler ve Genetik Kanıtlar**

Adenom karsinom geçişinde bir takım mutasyonlarda birikim olmaktadır (28,29). Tümör baskılayıcı genler inaktive olurken, onkogenler aktive olmaktadır. K-ras geninde çeşitli mutasyonlar meydana gelir. Küçük adenomların sadece %9 unda ras gen mutasyonu görülürken, 1 cm'den büyük adenomlarda %58, Kolorektal kanserlerde ise %47 oranında rastlanmaktadır. Bu nedenle k-ras mutasyonu tümöröenez oluşumunda

ara basamaklarda rol oynadığı düşünülmektedir. K-ras mutasyonu adenomların polipoid şekilde gelişmesinde etkili olmaktadır. Birçok adenom ve karsinomda k-ras mutasyonunun olmaması, tümör gelişimi için daha başka genetik mutasyonlara ihtiyaç olduğunu düşündürmektedir (1,2).

Kolon kanseri gelişiminde, tümör baskılayıcı genler, mutasyon veya allelik delesyon ile inaktive olmaktadır. Özellikle kromozom 5q, 18q ve 17p bölgelerindeki mutasyonlar sonucu tümör baskılayıcı genlerin işlev kaybı, kolon kanseri gelişimi için önemli bir genetik etkidir. Beşinci kromozomun uzun kolunda (5q) yerleşmiş olan APC geni, kolon kanseri için “gatekeeper” yani “kapı bekçisi” rolündedir. Bu gendeki mutasyon, FAP veya sporadik kolon kanserleri için önemli bir basamaktır. Bu nedenle APC geni bir tümör baskılayıcı gendir (32).

APC geni kolon epitel hücrelerinin homeostazından sorumludur. Diğer bir tümör baskılayıcı gen DCC (Deleted in colon cancer) kromozom 18q üzerinde yer almaktadır. DCC geninin işlev kaybı, tümör gelişiminin geç basamaklarında ortaya çıkar. Bu nedenle küçük tübüler veya tübülovillöz adenomların sadece %11-13’ünde saptanırken; kanser odağı bulunan adenomlarda %47, aşikar kolon kanserinde ise %73 oranında bulunur. Kolorektal kanserlerde en sık ortaya çıkan allelik delesyon ise 17p kromozomunda, yani p53 geninin bulunduğu lokusta meydana gelir. Adenomlarda 17p delesyonu nadir olarak görülür. Bu nedenle 17p delesyonu adenom-karsinom dönüşümünde geç bir basamağı işaret eder (33, 34, 35,36).

Kolon kanserlerinin adenomlardan kaynaklandığına dair en önemli kanıt, tümör komşuluğunda yer ala adenomların benzer genetik değişiklikleri taşımasından gelmektedir. Ancak tümör gelişimi için zaman içinde yukarıda sayılan birtakım ek mutasyonlara ihtiyaç vardır.

## KOLON KARSİNOGENEZ YOLLARI

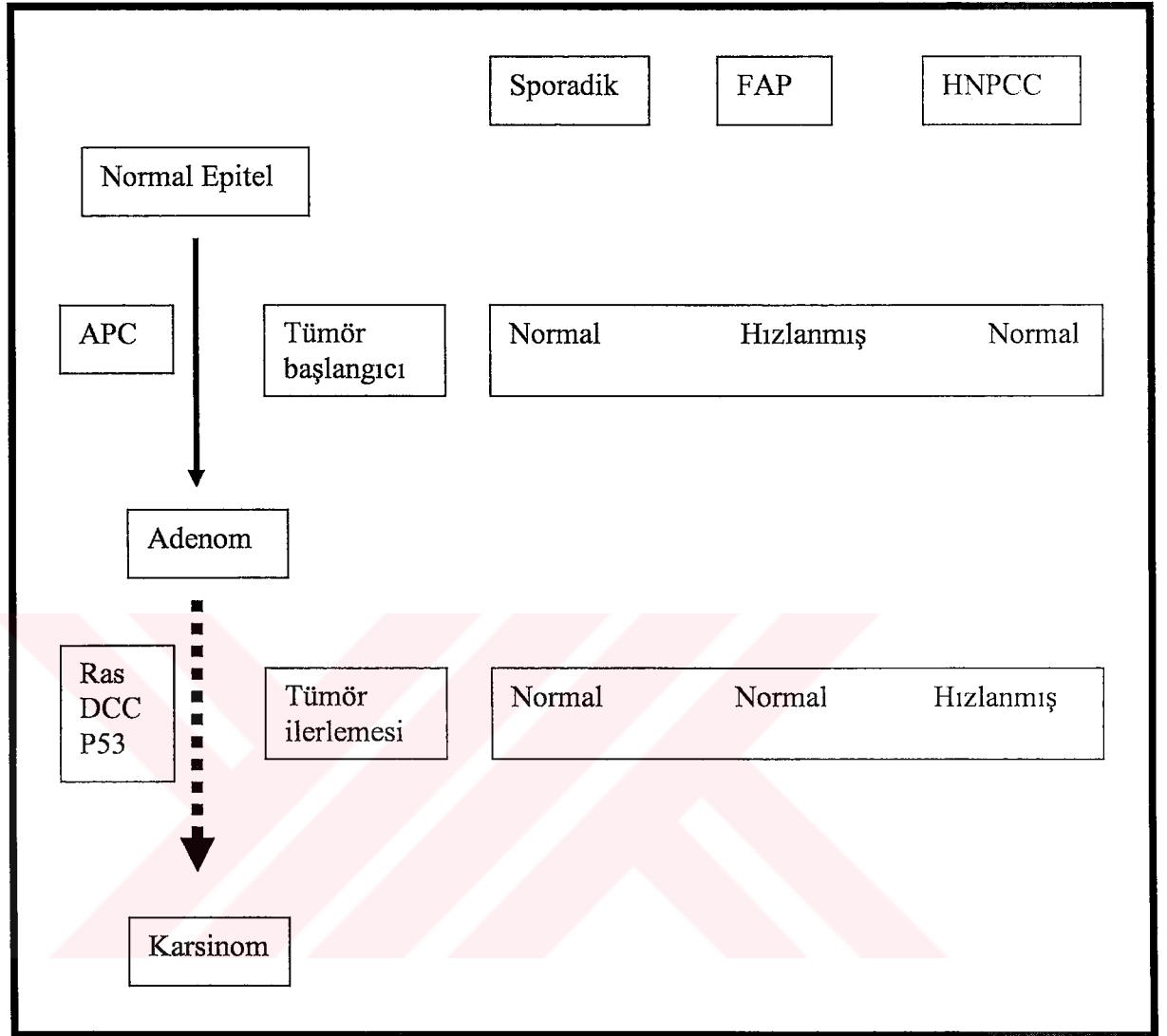
Kolon karsinogenezi iki kısımdan oluşur: adenom oluşumu (tümör başlangıcı) ve adenomun kansere dönüşmesi (tümör ilerlemesi). Muhtemelen tüm adenomlar APC geninin işlev kaybı ile ortaya çıkar. Toplumda görülen sporadik adenomlarda, somatik mutasyon sonucu her iki APC gen allelinde delesyon oluşur. Bu “ikili darbe”nin meydana gelme ihtimali düşük olduğundan, bu tip adenomlar hayatın ileri yaşlarında ve nadir ortaya çıkar (37,38).

FAP sendromunda ise, APC gen allelinin bir tanesi ebeveynden kaynaklanan mutasyon sonucu (germline mutasyon) delesyona uğramıştır. Diğer APC gen alleli mutasyona uğrayınca (somatik mutasyon) kolon kanseri gelişmeye başlar. FAP hastaları doğuştan birinci darbeye sahip olduğundan, hayatın erken dönemlerinde adenom gelişmeye başlar ve bunlar çok sayıdadır. Bu nedenle FAP, hızlanmış tümör başlangıcı ile karakterize bir sendromdur. Buna rağmen, FAP hastalarında adenom geliştikten sonra bile, her bir adenomun kansere dönüşme süreci farklıdır. Bu nedenle, FAP hastalarındaki kaçınılmaz kolon kanseri gelişimi, adenomların çok premalign potansiyeli olmasından değil, adenomların çok sayıda olmasından kaynaklanmaktadır (39-43).

Diğer bir karsinogenez mekanizması ise DNA bazının yanlış eşleşmesini tamir etmekle görevli enzimlerdeki mutasyondan kaynaklanmaktadır. Bu yol özellikle HNPCC hastalarındaki temel mekanizmadır. Bu enzimlerdeki mutasyonlar, karakteristik bir fenotip olan mikrosatellit instabilite’ye neden olur. Mikrosatellit instabilite; DNA bazında oluşan hataların tamiri yapılamadığından, giderek biriken DNA dizi hatalarına verilen isimdir (44-48). Mikrosatellit instabilite, HNPCC’de %85,

sporadik kolon kanserlerinde ise %15 oranında görülür. HNPCC kanserleri de adenomlardan gelişir. Ancak bu hastalarda bir tane adenom bile olsa, bu adenom küçük boyutlarda bile villöz histoloji, şiddetli displazi gibi premalign özellikler sergiler. Bu nedenle HNPCC hastalarında artmış tümör başlangıcı değil, artmış tümör ilerlemesi mevcuttur. Yani bir tek adenom bile hızla kansere ilerleme gösterebilir. FAP hastalarında ise adenomların sayısının fazlalığı kanser riskini artırır (Şekil 1). HNPCC hastalarında küçük adenomların bile hızla kansere dönüşmesinden dolayı, bu hastalardaki tarama kolonoskopileri daha kısa aralıklarla yapılmalıdır (49-55).





**Şekil 1:** Kolon kanseri gelişimi mekanizmaları. Adenomatöz polipler tümör başlatıcı faktörlerin etkisiyle oluşur. Adenomların kansere dönüşmesi ise tümör ilerletici faktörlere bağlıdır. Basitleştirilmiş bir teoriye göre, Herediter kolon kanseri sendromlarından FAP’da tümör başlangıç aşaması, HNPCC’de ise tümör ilerleme fazı hızlanmıştır. Sporadik kolon kanserlerinde ise her iki faz da normaldir (56-61).

## EPİDEMİYOLOJİ

### Adenom Prevalansı

Adenomatöz poliplerin prevalansını etkileyen dört faktör vardır. Bunlar: toplumdaki kalıtsal kolon kanseri yatkınlığı, yaş, cinsiyet ve ailevi kolon kanseri öyküsü. Toplumlar arasında adenom prevalansı değişmekle birlikte, kolon kanseri olan toplumlarda adenom riski de artmıştır. Buna örnek olarak Japonya’da yaşayan Japonlarda adenom prevalansı düşük iken, Hawaii’ye (kolon kanserinin endemik olduğu bölge) göç eden Japonlarda, kolon adenom prevalansı artmıştır. Adenom prevalansı yüksek sosyoekonomik seviye ile artmaktadır (Tablo 4). Ancak bu bulgu, bu kişilerin daha sık doktor kontrollerine gitmeleri ve dolayısıyla adenomların tespit edilmesinden de kaynaklanabilir. Otopsi çalışmalarından elde edilen veriler adenom prevalansı hakkında daha iyi fikir vermektedir. Kolon kanseri açısından düşük riskli bölgelerde adenom prevalansı %12 nin altındadır. Orta ve yüksek riskli bölgelerde ise % 30-40 arasındadır. yüksek riskli bölgelerde 65 yaş üstü popülasyonda %50 ile 2/3 oranında adenom prevalansı bildirilmektedir (13,15,26).

Adenomatöz poliplerin asemptomatik sağlıklı insanlardaki prevalansı ile ilgili bilgiler yakın zamanda, kolonoskopinin yaygın olarak kullanılması ile, toplanmaya başlanmıştır. Yakın dönemdeki veriler, orta risk grubundaki asemptomatik insanlarda kolon adenomatöz poliplerinin prevalansının %24 ile %47 arasında değiştiğini göstermektedir. %47 rakamı erkek savaş gazilerinde yapılan çalışmadan gelmektedir (15,26). Otopsi serilerine paralel olarak, erkeklerde kadınlara göre 1.5 kat daha fazla adenom görülmektedir. Yaşlı insanlarda, özellikle 65 yaş üstü olgularda adenom sıklığı artmaktadır. Aslında yaş faktörü, adenom prevalansını etkileyen en önemli bağımsız

değişkendir. Bu durum düşük ve yüksek riskli bölgeler için de geçerlidir. İlerleyen yaşla birlikte, sadece adenom görülme sıklığında artış değil; daha büyük adenomlar, adenom sayısında artış ve displazi görülme sıklığında artış gözlenmektedir.

Adenom prevalansı, ailesinde kolon kanseri öyküsü olanlarda artmıştır. Özellikle birden fazla akrabasında kolon kanseri olanlar ve genç yaşta kolon kanseri olan akrabası olanlarda, bu ilişki daha belirgindir. Irk, adenom gelişimde önemli bir faktör değildir. Güney Amerika'da yaşayan siyah ırkta adenom sıklığı düşük olmasına rağmen, Amerika'da yaşayan siyah ırkta adenom sıklığı toplumdan farklı değildir (62).



**Tablo 4:** Adenomatöz Polip Prevalansı

| <b>PREVALANS ORANI (%)</b> |               |              |              |            |              |              |            |
|----------------------------|---------------|--------------|--------------|------------|--------------|--------------|------------|
| <b>Ülke</b>                | <b>Sıklık</b> | <b>Erkek</b> |              |            | <b>Kadın</b> |              |            |
|                            |               | <b>Yaş</b>   |              |            | <b>Yaş</b>   |              |            |
|                            |               | <i>20-29</i> | <i>40-59</i> | <i>60+</i> | <i>20-39</i> | <i>40-59</i> | <i>60+</i> |
| Hawaii-japonya             | Çok yüksek    | 50           | 69           | 64         | 0            | 71           | 58         |
| New Orleans, beyaz         | Yüksek        | 0            | 39           | 47         | 0            | 10           | 35         |
| New Orleans, siyah         | Yüksek        | 19           | 26           | 52         | 0            | 27           | 41         |
| Brezilya                   | Orta          | 5            | 14           | 30         | 8            | 14           | 23         |
| Japonya (Akita)            | Orta          | 21           | 31           | 46         | 0            | 8            | 37         |
| Japonya (Miyagi)           | Düşük         | 1            | 9            | 23         | 4            | 9            | 17         |
| Kosta Rica                 | Düşük         | 0            | 6            | 13         | 2            | 4            | 9          |
| Kolombiya                  | Düşük         | 2            | 7            | 18         | 2            | 10           | 15         |

### **Adenom İnsidansı**

Yeni adenom gelişme sıklığı belirleyebilmek için aynı kişiye değişik zamanlarda kolonoskopi yapılması gereklidir. İki çeşit çalışma adenom insidansına ışık tutmaktadır. Birincisi post-polipektomi takip kolonoskopileri, diğeri ise negatif kolonoskopi sonrası yapılan tarama kolonoskopileridir. Ancak bu çalışmalarda kolonoskopi sırasında adenomların gözden kaçma olasılığı (%15-24) göz ardı edilmemelidir (63). Polipektomi sonrası kontrollerde görülen polipler rekürrens kabul edilir. Negatif kolonoskopi sonrası görülen polipler ise yeni poliplerdir. Bu poliplerin insidansı %24-41 olarak bildirilmiştir. Bir çalışmada kolon adenomu için artmış risk faktörleri bulunan hastalara kolonoskopi taraması yapılmış ve 2 yıl sonra tekrarlanan kolonoskopide %38 oranında yeni polibe rastlanmıştır. Asemptomatik, ortalama riskli popülasyonda yapılan tek bir takip çalışmasında ise, 5.5 yıl içinde %27 adenom insidansı saptanmıştır. Ancak bu çalışmada premalign karakterde polip insidansı %1 den azdır.

### **Anatomik Dağılım**

Otopsi çalışmalarında asemptomatik, normal popülasyonda adenomların tüm kolon segmentlerinde eşit dağıldığı gösterilmiştir (64). Bu eşit dağılım kolonoskopik çalışmalarla desteklenmiştir. Otopsi çalışmalarında, büyük adenomlar distal kolonda, kolon kanserinin en sık olduğu segmentte yerleşme eğilimindedir. Bu durum adenom-kanser ilişkisini desteklemektedir. Benzer şekilde, cerrahi olarak çıkarılan örneklerde de büyük adenomlar distal kolonda yerleşme eğilimindedir. Bu durum distal kolondaki adenomların daha semptomatik olduğunu akla getirmektedir. Yaşlı hastalarda adenom dağılımı proksimal kolona doğru kaymaktadır. Bu durum yaşlı popülasyondaki tarama

programları için tercih edilecek tetkik yönteminin kolonoskopi olması gerektiğini göstermektedir (Tablo 5).

**Tablo 5:** Adenomatöz Poliplerin Anatomik Dağılımı (Adenomlu Hastaların Yüzdesi)

|                        | ÇEKUM-<br>ASENDAN | TRANSVERS | DESENDAN | SİGMOİD | REKTUM |
|------------------------|-------------------|-----------|----------|---------|--------|
| <b>Otopsi Serileri</b> |                   |           |          |         |        |
| Tüm adenomlar          | 34                | 26        | 10       | 19      | 10     |
| Adenom>1 cm            | 34                | 11        | 14       | 16      | 21     |
| <b>Kolonoskopi</b>     |                   |           |          |         |        |
| Aseptomatik            | 23                | 24        | 24       | 24      | 5      |
| Semptomatik            | 8                 | 14        | 19       | 47      | 12     |

### ADENOM GELİŞİMİ İÇİN RİSK FAKTÖRLERİ

Adenom gelişiminde kalıtsal ve çevresel etkenler rol oynar. Hill tarafından ortaya atılan görüşe göre; toplumda adenoma yatkın bir genotip sıklığıdır. Ancak adenom gelişmesi için çevresel faktörler ile kalıtsal faktörler birlikte rol oynar. Bir faktör adenomun başlangıç aşamasında rol oynarken diğer faktör adenomun gelişmesinde veya kansere dönüşmesinde rol oynamaktadır (65).

### **Kalıtımsal Faktörler**

Herediter polipozis veya non-polipozis kolon kanseri sendromlarında kalıtımsal faktörler kanıtlanmıştır. Ancak sporadik kolon adenomlarında kalıtımsal faktörler yeni tanınmaya başlamıştır. Ancak tüm kolon adenom veya karsinomlarının %95 inde bu sendromlar mevcut değildir (sporadik adenomlar). Epidemiyolojik çalışmalar, birinci derece akrabasında kolon kanseri veya adenomu olanlarda, 2-3 kat artmış kolon kanseri riski olduğunu göstermiştir. Birçok çalışma, birinci derece akrabasında adenom saptanan kişilerde, artmış adenom sıklığı bildirmiştir. Ulusal Polip Çalışması sonuçlarına göre, özellikle 60 yaş altı birinci derece akrabalarında adenom saptanan bireylerde, kolon kanseri riski artmıştır (4,66).

Kolon kanserlerinin yaklaşık %10-30'u ailesel olup, bu kişiler kolon kanserine yatkınlık oluşturan genetik bir özellik taşımaktadır. Bu riske “ortak kolon kanseri riski” denilmektedir. Son yıllarda kolon kanserinde etkili olan birçok mutasyon bildirilmiştir. Bunlar arasında kromozom 5q üzerindeki APC geninde, kodon 1307 mutasyonu, MSH6 (DNA yanlış eşleşme tamir geni), tip I transforming growth factor receptor allele-T $\beta$ R-I, çeşitli nutrient ve çevresel ajanın metabolizmasında görev alan enzimlerin mutasyonu (örneğin metilenetetrahidrofolat redüktaz, N-asetiltransferaz 1 ve 2) sayılabilir (67).

### **Diyet ve Yaşam Biçimi**

Kolon kanserleri kalıtımsal etkenler dışında çevresel etkenlerle de ortaya çıkabilir. Kolon kanserlerinin yaklaşık yarısı ile üçte ikisi ayrıca adenomların dörtte üçü yaşam biçimi-diyet ayarlanması ile engellenebilir. Kolon kanserine yol açan diyet faktörleri aynı zamanda kolon adenomlarına da yol açabilir. Diyetteki lif, bitkisel besinler ve karbonhidrat adenomlara karşı koruyucu özelliktedir. Artmış fiziksel aktivite

ve folat alımı da adenom oluşumunu önlemektedir. Ancak adenom riskini arttıran diyet bileşenleri; aşırı yağlı diyet, aşırı alkol alımı, obezite ve sigara içimidir. Düşük kalsiyum alımı kolon kanseri riskini arttırmasına rağmen, kolon adenom riskini etkilememektedir. Aspirin ve non-steroid antiinflatuvar ilaçlar (NSAİİ) deneysel çalışmalarda kolon kanseri gelişimini azaltmaktadır. Ayrıca FAP'da NSAİİ kullanımı ile adenom sayısı ve çapı azalmaktadır. Ancak bu ilaçların sporadik adenomlar üzerine etkisi bilinmemektedir. İki küçük çalışmada NSAİİ kullanımının sporadik adenomlar üzerine etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Ancak iki büyük çalışmada aspirin kullanımının sporadik adenom insidansını azalttığı gösterilmiştir. Selektif COX-2 inhibitörlerinin etkisi ise henüz net olarak bilinmemektedir (68,69,70).

Kolon adenomlarının diyetle önlenmesine yönelik prospektif çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların tasarımları büyük benzerlik göstermektedir. Genellikle polipektomi sonrası, hastalar lifli-az yağlı diyet ve kontrol grubu olarak ayrılmakta ve bu hastalara 1,3 ve 4. yılda kontrol kolonoskopi yapılmaktadır. Bu tip çalışmalar sadece polip rekürrensini önlenmesi ile ilgili bilgi vermektedir. Ancak sağlıklı bir bireyin uzun dönem izlenmesi ve kolon kanseri gibi bir sonlanma noktası olan bir çalışmanın yapılması da etik olarak mümkün değildir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan iki büyük çalışmada diyetdeki lif artışı ve yağ oranının azalması kolon adenom rekürrensini azaltmamıştır. Avustralya'dan yapılan diğer bir çalışmada da benzer şekilde diyetin adenom rekürrensi üzerine olumlu bir etkisi bulunmamıştır. Destekleyici antioksidanlar, örneğin vitamin C, E ve beta-karotenin de etkili olduğu gösterilmiştir. Kalsiyum desteğinin (1200 mg/gün elementer kalsiyum) %15 oranında rekürrensi azalttığı bildirilmiştir. Kalsiyumun koruyucu etkisi çok yönlü olarak gerçekleşir. Kalsiyum kolon

epitel hücrelerinin proliferasyonunu azaltır, safra asitleri ve karsinojenlere bağlı mukozal hasarı azaltır (71-82).

### **ADENOM-KARSİNOM İLİŞKİSİNDE K-RAS MUTASYONU**

İnsanlarda tümör dokusunda çok sayıda onkogen belirlenmiştir. Kolon kanserinde en önemli onkogenlerden bir tanesi ras proto-onkogen ailesidir. Ras proto-onkogen ailesinin en önemli üyesi k-ras, birçok kolon adenomu ve kanserinin gelişiminde rol oynamaktadır. K-ras geni tüm ras ailesi içinde en çok mutasyona uğrayan gendir (83). Nadiren n-ras mutasyonları da bildirilmiştir. Ras ailesi genleri sinyal iletiminde rol oynayan 21-kDa ağırlığında bir proteini kodlar. Ras proteinlerinin en önemli görevi, büyüme faktörlerinin Raf-mitogen-activated protein (MAP) kinaz ile etkileşime girmesinin sağlanmasıdır. MAP-kinaz sinyal yolu erken cevap elemanlarının nükleer ekspresyonunu sağlar. K-ras geni dört ekzondan oluşur. Bu ekzonlar, dördüncü ekzonun devreye girip girmemesine bağlı olarak, 188 veya 189 amino asit dizisinden oluşan peptidlerin sentezine yol açar. K-ras tarafından kodlanan proteinlerin üç domain bölgesi vardır: (a) GTP/GDP ye bağlanan kısım (b) karboksiterminalinin post-translasyonel modifikasyonu (izoprenilasyon) sonrası plazma membranının iç yüzeyine tutunmayı sağlayan kısmı (c) hücrel hedef noktalarına bağlanan kısmı. İnaktif k-ras GDP'ye bağlanır. Aktive olduktan sonra GDP, GTP ile yer değiştirir. Aktive k-ras GTP'nin hidrolizi ile hızla deaktive olur. K-ras genindeki onkogenik mutasyonlar, GTP'nin hidrolizini önleyerek, k-ras'ın aktif formda kalmasına neden olur. K-ras genindeki en sık mutasyon oluşan bölgeler, kodon 12, 13 ve 61 dir. Bu bölgeler, k-ras geninin GTP/GDP bağlanma bölgeleridir. Mutasyon geliştiği zaman, ras proteininin

%30'u GTP'ye bağılı şekilde kalır, normal k-ras geni olan dokuda ise GTP bağılı olan formun oranı <%0.3 dır (84).

K-ras mutasyonu birçok gastrointestinal tümörde görölmektedir. Diğer tümörlerde olduğu gibi, Kolorektal kanserlerde de k-ras mutasyonu kodon 12, 13 ve 61 de görölr. Kodon 12 kolon kanserinde en sık mutasyona uğrayan bölgedir ve bu kodonda missense mutasyon tipi görölr. K-ras mutasyon sıklığı kolon kanserlerinde %37-41 oranında bildirilmiştir. K-ras mutasyonu kolon karsinogenezinin erken dönemlerinde gerçekleşir. Vogelstein ve ark. küçük tübüler adenomlarda %13, büyük adenomlarda %42 ve invaziv karsinom odağı içeren adenomlarda %57 oranında k-ras mutasyonunu bildirmişlerdir. 1 cm'den büyük adenomlarda k-ras mutasyonu sıklığı %58 iken, 1 cm'den küçük adenomlarda bu oran %9'dur. Diğer araştırmacıların sonuçları da benzer nitelikte olup, kolon adenomlarında k-ras mutasyonu sıklığı ortalama olarak %40 civarındadır (67).

K-ras mutasyonları APC mutasyonlarından sonra gelişir ve adenomatöz lezyonların büyümesine neden olur. APC mutasyonu taşıyan küçük adenomlarda k-ras mutasyonu sıklığı %20 iken, ileri patolojik özellikler taşıyan büyük adenomlarda k-ras mutasyonu sıklığı %50 civarındadır. Bu nedenle k-ras mutasyonu adenom-karsinom ilişkisinde erken dönemde devreye girerek, adenomun büyümesini sağlamaktadır. Ancak ilginç olarak, k-ras mutasyonu gelişmesi adenomun adenokansere dönüşmesi için mutlak şart değildir (84).

Bu bilgiler doğrultusunda kolon adenomlarında k-ras mutasyonunun sıklığının belirlenmesi amacıyla, çeşitli nedenlerle kolonoskopi yapılan hastalarda saptanan poliplerde k-ras mutasyonu çalışılması planlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Kolon adenomlarında k-ras mutasyon sıklığının belirlenmesi amacıyla, çeşitli nedenlerle kolonoskopi yapılan hastalarda saptanan polipler çalışmaya dahil edilmiştir. Prospektif olarak, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı Endoskopi Ünitesi'nde yapılan konsekütif kolonoskopiler sırasında saptanan 40 adet polip, polipektomi kementi ile çıkarıldı. Ardından polip dokusunun bir kısmı patolojik inceleme için formaldehid içeren solusyonda saklanarak patoloji bölümüne gönderildi. Polip dokusunun diğer kısmı ise serum fizyolojik içeren kaplarda -80°C'de saklandı. Hastaların demografik özellikleri, ailesinde kolon kanseri öyküsü, beslenme alışkanlıkları, ek hastalıkları, kolonoskopik bulguları, polibin alındığı kolon segmenti, polip büyüklüğü not edildi.

Çıkarılan poliplerin histopatolojik özellikleri ise tablo 6'da, hastaların demografik özellikleri ise tablo 7'da, gösterilmiştir.

**Tablo 6:** Kolorektal poliplerin histopatolojik özellikleri

| <b>Histopatolojik özellikler</b> | <b>n, (%)</b> |
|----------------------------------|---------------|
| Tübüler                          | 18 (%45)      |
| Tübülovillöz                     | 16 (%40)      |
| Villöz                           | 6 (%15)       |
| <b>Displazi</b>                  |               |
| Hafif                            | 2 (%5)        |
| Şiddetli                         | 1 (%2.5)      |
| Karsinoma in situ                | 1 (2.5)       |
| <b>Adenom çapı</b>               |               |
| < 1cm                            | 9 (%22.5)     |
| 1-2 cm                           | 28 (%70)      |
| > 2 cm                           | 3 (%7.5)      |

**Tablo 7:** Hastaların demografik, klinik ve endoskopik verileri

|                                   |               |
|-----------------------------------|---------------|
| Yaş (ortalama±SD, yıl)            | 57±12         |
| Cinsiyet (erkek/kadın)            | 27/13         |
| Ailede kolon kanseri öyküsü       | 6/40 (%15)    |
| <b>Kolonoskopik bulgular</b>      |               |
| Hemorroidal hastalık              | 11/40 (%27.5) |
| Divertikül                        | 9/40 (%22.5)  |
| Kolit                             | 3/40 (%7.5)   |
| Senkron polip                     | 5/40 (%12.5)  |
| Anjiyodisplazi                    | 1/40 (%2.5)   |
| <b>Beslenme özellikleri</b>       |               |
| Yağdan fakir diyet                | 19/40 (%47.5) |
| Hayvansal gıda ağırlıklı          | 15/40 (%37.5) |
| Bitkisel/Lifli gıda ağırlıklı     | 6/40 (%15)    |
| <b>Eşlik eden hastalıklar</b>     |               |
| Esansiyel Hipertansiyon           | 9/40 (%22.5)  |
| Tip 2 DM                          | 7/40 (%17.5)  |
| Kolesistektomi                    | 4/40 (%10)    |
| Romatooid Artrit                  | 3/40 (%7.5)   |
| <b>Kolonoskopi yapılma nedeni</b> |               |
| Kabızlık                          | 11 (%27.5)    |
| Kanser taraması                   | 7/40 (%17.5)  |
| Kanama                            | 7 (%17.5)     |
| Ailede kolon kanseri öyküsü       | 6/40 (%15)    |
| Karın ağrısı                      | 5 (%12.5)     |
| İshal                             | 4 (%10)       |

### **DNA Ayrıştırma Yöntemi**

Örnekler 300 µl lizis solusyonu (0.2 M NaOH / 2 M NaCL) içeren tüplere konuldu ve ardından 6 dakika kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve içine 1µl etanol eklendi. Tüpler -20 °C’de bir gece bekletildi. DNA’lar 15 dakika 4°C’de santrifüj etmek suretiyle ayrıştırıldı ve %70 etanol ile iki kez yıkandı. Ardından 20 ml distile suya konuldu.

### **Oligonükleotidler ve PCR Çoğaltma Yöntemi**

Oligonükleotid k5’ (ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT) ve k3’ (TCA AAG AAT GGT CCT GGA CC) primerleri kullanılarak k-ras -2 bölgesindeki kodon 12 ve 13 çoğaltıldı. BstNI ve HphI enzimleri için bir restriksiyon bölgesi oluşturmak amacıyla k5’ primerinin 3’ ekstremitesinin 28. pozisyonundaki G bazı, C bazı ile yer değiştirildi. Normal allel ile karşılaşıldığında, BstNI’nın iki bölünme noktası (CCTGG) 114 nükleotitten oluşan bir band oluşturdu. Diğer 29 ve 14 nükleotitten oluşan bantlar jel üzerinde görünmez hale geldi. Kodon 12’nin ilk iki nükleotidinde mutasyon olması durumunda, BstNI’nın bölünme noktası sentezlenemediğinden, mutasyonu içeren parçalar bir kez bölünür ve 143 nükleotidden oluşan büyük bir bant oluşur. Diğer 14 nükleotitten oluşan bant ise jel üzerinde görünmez. DNA ekstraktının 2 µl miktarı aşağıdaki maddelerden oluşan 50 µl’lik solusyona konuldu: 16.6 mM amonyum sülfat, 6.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 6.7 µM EDTA, 67 mM Tris HCl (pH=8.8), 1.7 mg BSA (Bovine serum albumin), 10 mM β-merkaptoetanol 0.7 M, 200 µM her bir dNTP, 250 µM her bir primerden ve 2.5 ünite Taq polimeraz. Amplifikasyon Perkin Emler Cetus Termal Cycler kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir: 94°C’de 40

saniye denaturasyon, 45 saniye 60°C’de primerin oluşturulması, 50 saniye 70°C’de primerin uzatılması şeklinde olup, her siklus 1 saniyede gerçekleşecek şekilde 40 siklus uygulanmıştır.

### **Restriksiyon Enzim Analizi**

10-20  $\mu$ l PCR  $\mathfrak{r}$ r $\mathfrak{u}$ n $\mathfrak{u}$ , BstNI ile 60°C’de ve HphI ile 37°C’de,  $\mathfrak{r}$ reticinin  $\mathfrak{o}$ nerdiği koşullarda (New England Biolabs) sindirime tabi tutuldu. Sindirilmiř  $\mathfrak{r}$ r $\mathfrak{u}$ nlere, etidyum bromid içeren %8 polyakrimid jel ile elektroforez uygulandı. Jel, ultraviyole ışık altında g $\mathfrak{o}$ r $\mathfrak{u}$ nt $\mathfrak{u}$ lendi.



## BULGULAR

İncelemeye alınan 40 adet polipten, 1 cm'den küçük olan 9 polibin sadece 1 tanesinde (%11.1), 1-2 cm arasında büyüklüğü olan 28 polibin 6 tanesinde (%21.4) ve 2 cm'den büyük olan 3 tane polibin 2 tanesinde (%66.6) k-ras mutasyonu saptandı (tablo 8).

**Tablo 8:** Kolon adenom çapı ile k-ras mutasyonu görülme sıklığı

| Adenom çapı | Yüzdesi      | k-ras mutasyonu | p     |
|-------------|--------------|-----------------|-------|
| < 1cm       | 9/40 (%22.5) | 1/9 (%11.1)     | <0.05 |
| 1-2 cm      | 28/40 (%70)  | 6/28 (%21.4)    | <0.05 |
| > 2 cm      | 3/40 (%7.5)  | 2/3 (%66.6)     | <0.05 |

Adenomların histopatolojik özellikleri ile k-ras mutasyonu görülme sıklığı açısından değerlendirildiğinde; tübüler adenomların (n=18) 2 tanesinde (%11.1), tübülovillöz adenomların (n=16) 2 tanesinde (%12.5) ve villöz adenomların (n=6) 4 tanesinde (%66.6) k-ras mutasyonu saptandı (tablo 9).

**Tablo 9:** Adenomların histopatolojik özellikleri ile k-ras mutasyonu görülme sıklığı arasındaki ilişki

| Histopatolojik özellikler | n, (%)   | k-ras mutasyonu | p     |
|---------------------------|----------|-----------------|-------|
| Tübüler                   | 18 (%45) | 2 (%11.1)       | AD    |
| Tübülovillöz              | 16 (%40) | 2 (%12.5)       | AD    |
| Villöz                    | 6 (%15)  | 4 (%66.6)       | <0.05 |

Adenomlarda görülen displazi şiddetli ile k-ras mutasyonu birlikteliği incelendiğinde; tüm displazi ve karsinoma in situ görülen adenomlarda k-ras mutasyonunun pozitif olduğu saptandı ( $p<0.05$ ).

K-ras mutasyonu ile beslenme alışkanlıkları arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, yağdan fakir diyet ile beslenen 19 hastanın 2 tanesinde (%10.5), hayvansal gıda ağırlıklı diyet ile beslenen 15 hastanın 6 tanesinde (%40) ve bitkisel/lifli gıdalarla beslenen 6 hastanın 1 tanesinde (%16.6) k-ras mutasyonu saptandı (tablo 10).

**Tablo 10:** Diyet ve k-ras mutasyonu ilişkisi

| Beslenme özellikleri          | n, (%)        | k-ras mutasyonu | p     |
|-------------------------------|---------------|-----------------|-------|
| Yağdan fakir diyet            | 19/40 (%47.5) | 2 (%10.5)       | AD    |
| Hayvansal gıda ağırlıklı      | 15/40 (%37.5) | 6 (%40)         | <0.05 |
| Bitkisel/Lifli gıda ağırlıklı | 6/40 (%15)    | 1 (%16.6)       | AD    |

Yaş dağılımına bakıldığında; k-ras mutasyonu görülen 9 hastanın yaş ortalaması  $65\pm12$  yıl, k-ras mutasyonu saptanmayan 31 hastanın yaş ortalaması ise  $55\pm6$  yıl idi ( $p<0.05$ ). Kadın erkek cinsiyet arasında ise anlamlı bir fark bulunmadı.

Ailesinde kolon kanseri öyküsü olan 6 hastanın 2 tanesinde (%33.3) k-ras mutasyonu mevcuttu. Ailesinde kolon kanseri öyküsü olmayan 34 hastanın ise 7 tanesinde (%20.5) k-ras mutasyonu saptandı. Bu değişkenler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $p>0.05$ , AD).

Kolesistektomi öyküsü olan 4 hastanın 2 tanesinde (%50) k-ras mutasyonu saptandı. K-ras mutasyonu saptanan bu polipler 1-2 cm çapında olup, bir tanesi

tübülovillöz, diğeri ise villöz adenom idi. Villöz adenomu olan kolesistektomize hastada hafif displazi saptandı.

Kolon adenomlarının çapları ile histopatolojik özellikleri arasındaki ilişkiye bakıldığında; 1 cm'den küçük poliplerin (n=9) hepsi tübüler adenom, 1-2 cm arasındaki poliplerin (n=28) 9 tanesi tübüler, 16 tanesi tübülovillöz adenom, 3 tanesi ise villöz adenom; 2 cm'den büyük adenomların ise (n=3) hepsi villöz adenom idi (tablo 11). Adenomun büyüklüğü arttıkça villöz yapıda olma ihtimali artmakta idi (pozitif korelasyon,  $p<0.05$ ,  $R= +2.3$ )

**Tablo 11:** Kolon çapı ile histopatolojik özellikler arasındaki ilişki

| Adenom çapı | Yüzdesi      | Histopatoloji              | p     |
|-------------|--------------|----------------------------|-------|
| < 1cm       | 9/40 (%22.5) | 9/9 tübüler (%100)         | <0.05 |
| 1-2 cm      | 28/40 (%70)  | 9/28 tübüler (%32.1)       | <0.05 |
|             |              | 16/28 tübülovillöz (%57.1) | <0.05 |
|             |              | 3/28 villöz (%10.7)        | <0.05 |
| > 2 cm      | 3/40 (%7.5)  | 3/3 villöz (%100)          | <0.05 |

Adenomlardaki displazinin şiddeti, adenomun çapı ile artış göstermekte idi ( $p<0.05$ ,  $R=1.6$ ). (Tablo 12)

**Tablo 12:** Adenom çapı ile displazi şiddeti arasındaki ilişki

| Adenom çapı | Yüzdesi      | Displazi                      | p     |
|-------------|--------------|-------------------------------|-------|
| < 1cm       | 9/40 (%22.5) | 0 (%0)                        | <0.05 |
| 1-2 cm      | 28/40 (%70)  | 1/28 Hafif (%3.6)             | <0.05 |
|             |              | 1/28 Şiddetli (%3.6)          | <0.05 |
| > 2 cm      | 3/40 (%7.5)  | 1/3 Karsinoma in situ (%33.3) | <0.05 |
|             |              | 1/3 Hafif (%33.3)             |       |

Adenomların histopatolojik özellikleri ile displazi derecesi arasında anlamlı bir ilişki saptandı: Tübüler adenomların (n=18) hiçbirinde displazi saptanmaz iken, tübülovillöz adenomlarda (n=16) 2 tane hafif displazi saptandı. Villöz adenomlarda (n=6) ise 1 şiddetli displazi, 1 tane de karsinoma in situ saptandı (p<0.05). (tablo 13)

**Tablo 13:** Adenomların histopatolojik özellikleri ile displazi şiddeti arasındaki ilişki

| Histopatolojik özellikler | n, (%)   | Displazi                    | p     |
|---------------------------|----------|-----------------------------|-------|
| Tübüler                   | 18 (%45) | 0/18 (%0)                   | <0.05 |
| Tübülovillöz              | 16 (%40) | 2/16 hafif (%12.5)          | <0.05 |
| Villöz                    | 6 (%15)  | 1 şiddetli (%16.6)          | <0.05 |
|                           |          | 1 karsinoma in situ (%16.6) |       |

Adenomların histopatolojik özellikleri, adenom çapı ve displazi şiddeti ile hastaların demografik özellikleri, beslenme alışkanlıkları, ailesinde kolon kanseri olması gibi değişkenler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolorektal adenomatöz poliplerin prevalansı ülkelere göre büyük oranda değişmektedir. Kolorektal adenom prevalansı, kolorektal kanser prevalansına paralellik göstermektedir. Kolorektal adenomlarla ilgili eski yayınlar otopsi verilerine dayandığı için, yeni yapılan endoskopik çalışmalardan daha yüksek rakamlar vermektedir. Asemptomatik, orta-derecede riskli bireylerdeki adenom prevalansı; sigmoidoskopik çalışmalarda %10, kolonoskopik çalışmalarda %27'nin üzerindedir. Ancak bu bireylerdeki kolorektal kanser prevalansı %1 civarındadır. Üç yıllık zaman diliminde, normal bir endoskopi bulgusu sonrasında, kümülatif yeni adenom insidansı, sigmoidoskopik çalışmalarda %7, kolonoskopik çalışmalarda %27 civarındadır (11-16).

Kolorektal adenomlar yaşla birlikte artar. Imperiale ve ark. yaptığı bir çalışmada, 40-49 yaş aralığındaki sağlıklı kişilerde, kolonoskopik olarak tarama yapılmıştır (26). Bu çalışmada, saptanan polipler iki kategoride incelenmiştir: Birinci kategoride en distalde saptanan ve en ileri düzey patolojik özelliklere sahip olan polip (1 cm'den büyük, villöz komponent, karsinom, vb.), ikinci kategoride ise en proksimalde yer alan, aynı özelliklere sahip polip değerlendirmeye alınmıştır. Bu çalışmada %78.9 hastada lezyon saptanmamış, %10 hastada hiperplastik polip saptanmış, %8.7 tübüler adenom ve %3.5 ileri düzey patolojik özellikler saptanmıştır. Hiçbir hastada kanser saptanmamıştır. İleri düzey patolojik özellikler saptanan 33 polibin, 18 tanesi (%55) sigmoidoskopi ile ulaşılabilir mesafede imiş. Eğer bu bulgular bir toplum modeline uygulanacak olursa; 40-49 yaş aralığında bir tek kanser tespit etmek için 1000 civarında hastanın taranması gerekmektedir. Bu nedenle kolorektal kanser tarama programları ileri yaş grubundaki hastalara tavsiye edilmektedir.

Kolorektal adenom gelişimi için çeşitli risk faktörleri belirlenmiş ve bu risk faktörleri profilaksi veya hedef tarama gruplarının belirlenmesinde kullanılmıştır (tablo 14).

**Tablo 14:** Kolorektal adenom ve karsinomların risk faktörlerinin farklılıkları

| <i><b>Risk Faktörü</b></i> | <i><b>Adenom</b></i> | <i><b>Karsinom</b></i> |
|----------------------------|----------------------|------------------------|
| <b>Kolondaki dağılım</b>   | Uniform              | Distal ağırlıklı       |
| <b>Cinsiyet (E/K)</b>      | 1.5-2.0              | 1                      |
| <b>Norveç - İngiltere</b>  | Benzer prevalans     | 2.5 kat risk farkı     |
| <b>İran – Kolombiya</b>    | Çok farklı risk      | Benzer risk            |
| <b>Sigara</b>              | Artmış risk          | İlişki yok             |
| <b>Alkol</b>               | Artmış risk          | İlişki yok             |
| <b>E Vitamini</b>          | Artmış risk ?        | Azalmış risk ?         |

Lieberman ve ark. yaptığı prospektif, çapraz kesitsel bir çalışmada, 50-75 yaş aralığında 3121 hasta incelenmiştir (28). Tüm hastalara kolonoskopi yapılarak, ileri düzey patolojiye sahip adenom taraması yapılmıştır. İleri düzey adenom tanım olarak; 1 cm den büyük, villöz komponenti olan, şiddetli displazi içeren veya karsinom olgularıdır. İncelenen değişkenler ise; birinci derece akrabasında kolorektal kanser olması, kolesistektomi öyküsü, sigara-alkol kullanımı, serum kolesterol düzeyi, fiziksel aktivite ve diyet faktörleridir. 1441 hastada polip saptanmaz iken, 329 hastada ileri düzey patolojik özellikleri olan adenom saptanmıştır. Çok değişkenli analizde: ailede kolorektal kanser öyküsü olması (Odds ratio (OR), 1.66; %95 CI, 1.16-2.35), sigara içimi (OR, 1.85, %95 CI, 1.33-2.58), alkol kullanımı (OR, 1.02, %95 CI, 1.01-1.03) olarak bulunmuştur. Lifli gıdalar (OR, 0.95, %95 CI, 0.91-0.99), vitamin D alımı (OR,

0.94, %95 CI, 0.90-0.99) ve NSAİİ kullanımı (OR, 0.66, %95 CI, 0.60-0.74) arasında ters ilişki saptanmıştır. Tek değişkenli analizlerde ise günde 4.2 gr ve üzeri lifli gıda alımı 645 IU günde vitamin D alımı ve günlük olarak NSAİİ kullanımı ile kolorektal adenom gelişimi arasında ters ilişki bulunmuştur. artmış fiziksel aktivite, günlük olarak multivitamin preparatı kullanımı ile kırmızı et kökenli yağ ve kalsiyum alımı arasında sınırda bir ilişki saptanmıştır. Vücut kitle indeksi, kolesistektomi öyküsü ve serum kolesterol düzeyi ile kolorektal adenomlar arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Alkol kullanımı ile kolorektal adenomlar arasında bir ilişki olduğu ileri sürülmektedir. Alkolü metabolize eden polimorfik alkol dehidrojenaz enzimi (ADH 3) tarafından alkolün karsinojenik asetaldehide dönüştürülmesi ile kolon neoplazmlarına yol açtığı iddia edilmektedir. Tiemersma ve ark. ADH 3 polimorfizmi ile kolorektal adenomlar arasındaki ilişkiyi araştırmıştır (29). Bu çalışmaya 433 adenomatöz polibi olan hasta ile 436 polibi olmayan kontrol grubu alınmıştır. Çok değişkenli analizlerde, yaş, cinsiyet ve kolonoskopi endikasyonları açısından benzer olan bu iki grupta; alkol kullanımının kadınlarda kolorektal adenom riskini arttırdığı gösterilmiştir. Erkeklerde ise kadınlara göre, haftada 21 kat daha fazla alkol kullanımı risk artışına neden olmaktadır. ADH3\*1/\*1 genotipi en yüksek riski oluşturmaktadır. Bu çalışma, benzer çalışmalarda olduğu gibi, alkol kullanımının kolorektal adenom riskini arttırdığını göstermektedir.

Adenom oluşumunun erken ve geç dönemlerinde farklı faktörler etki edebilmektedir. Yapılan bir çalışmada 9 mm nin altındaki poliplere polipektomi yapılmayıp, bu hastalar 3 yıl boyunca takip edilmiştir. Üç yıl sonra polipektomi yapılarak, çeşitli faktörlerin polip gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Sağlıksız diyet uygulayan, yağdan zengin ve lifden fakir diyet ile antioksidan almayan hastalarda artmış

adenom gelişimi saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada, sigara içiminin adenom gelişiminin erken dönemlerinde etkili olabildiği, ancak geç dönemlerinde etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Bu bilgiler, kolorektal adenom gelişiminde, değişik faktörlerin değişik zamanlarda etki ettiği, ve yaşam tarzı değişikliklerinin kolorektal kanser gelişiminde oldukça etkili olduğunu tezini desteklemektedir.

Folat metabolizmasındaki genetik farklılıklar, adenom gelişimi üzerine etkili olabilir. Chen ve ark. yaptığı çalışmada metilenetetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geninin değişik polimorfik alt tipleri ile kolorektal adenom ve karsinom arasındaki ilişki gösterilmeye çalışılmıştır (28). Kolorektal kanser ile MTHFR geninin (667C: T, ala: val) polimorfizmi ile doğrusal bir ilişki saptanmış fakat adenomlarla herhangi bir ilişkisi saptanmamıştır. Kolorektal kanser ile metioninin ters ilişkisi ve alkolün doğrusal ilişkisi, (val:val) tipi pleomorfizmde daha belirgin bulunmuştur. ancak bu bulgular, kolorektal adenomlarda desteklenmemiştir. Bu çalışmada da görüldüğü gibi, genetik faktörler ile çevresel faktörlerin etkileşiminin belirlenmesi, kanser önlenmesi ve risk gruplarının belirlenmesi açısından oldukça önemlidir.

K-ras mutasyonu kolorektal adenomlarda sık olarak rastlanmaktadır ancak bu mutasyona neyin yol açtığı halen bilinmemektedir. Martinez ve ark. kolorektal adenomlarda, kolorektal kanser riskini arttıran faktörler ile adenomlardaki k-ras mutasyonu arasındaki ilişkiyi saptamaya çalışmışlardır (29). Bu çalışmada 40-80 yaş grubundaki 678 hastada, buğday kepeği alımının adenom rekürrensi üzerine etkisi araştırılmıştır. Risk faktörleri hastalara sunulan anketlerle belirlenmiştir. K-ras geninin kodon 12 ve 13 bölgesindeki mutasyonlar 0.5 cm'den büyük poliplerde, PCR yöntemi ve direk sekans analizi ile belirlenmiştir. 678 hastanın 120 (%18) tanesinde k-ras

mutasyonu saptanmıştır. K-ras mutasyonu sıklığı ileri yaş ve düşük folat alımı ile korele bulunmuştur. 72 yaşından büyük hastalarda 65 yaş altındaki hastalar göre, k-ras mutasyonu 2 kat daha sık saptanmıştır. Folat seviyesi en düşük tertil içinde bulunan hastalar göre, Folat düzeyleri en yüksek tertilde olan hastalardaki poliplerde, k-ras mutasyonu %50 daha az görülmektedir. Bu sonuçların ışığında, profilaksi çalışmalarında gözlenen, folatın kolon adenomlarına karşı koruyucu etkisi, k-ras mutasyonunu azaltmasından kaynaklanabilir.

Kolonoskopide saptanan poliplerin çıkarılması, kolorektal kanser riskini azaltmaktadır. Bu yargıya gözlemsel çalışmalar ve retrospektif değerlendirmelerle varılmıştır. Polipektominin kanser gelişimi üzerine etkisini araştırmak için randomize çalışma yapmak etik olmayacağından, tüm bilgilerimiz bu çalışmalardan gelmektedir. Tarama sırasında rektumda hiperplastik polip saptanması, total kolonoskopi yapılmasını gerektirmemektedir. Adenom çıkarılan hastalara takip kolonoskopisi 3 yıl sonra önerilmektedir. Ancak, 0.5 cm'den büyük adenom, ailede kolon kanseri öyküsü olanlar 3 yıl sonra periodik takiplerine devam etmelidir. 0.5 cm'den küçük olan tek bir tübüler adenom ve ailede kolon kanseri öyküsü olmayanlarda 5 yıl beklenebilir. Eğer 5 yıl sonraki incelemesinde de neoplazi saptanmaz ise 5 yıllık takipler önerilir.

Tüm endoskopik incelemelerin amacı erken kanser veya adenom teşhisidir. Bu amaçla yeni gelişen teknoloji ürünleri olan kromoendoskopi ve büyütme endoskopi, tanısal amaçla kullanılmaya başlanmıştır. Kromo ve büyütme endoskopiler kolonik mukozal yüzey hakkında detaylı bilgiler verir ve güncel polip prevalansını hakkında yeni bilgiler vermektedir. Kromoendoskopi ile neoplastik ve non-neoplastik lezyonların ayrımı yüksek özgünlük ile yapılabilmektedir. lezyonun sınırlarının net olarak belirlenmesi ve detaylı makroskopik analiz, diğer avantajlarıdır. Özellikle düz lezyonlar

ve deprese tümörler daha iyi teşhis edilmekte ve eskiden konvansiyonel kolonoskopilerle birçok lezyonun atlandığını ortaya koymaktadır (22). Ayrıca kromoendoskopi ile sporadik adenom taraması yapılabilir. Ülseratif kolitli hastalarda intra-epitelial neoplazi araştırması amacıyla, metilen mavisi uygulaması sonrası, şüpheli alanlardan biyopsi alınabilir. Öğrenme eğrisi uzun olmasına rağmen, kromoendoskopi her gastroenterolog öğrenmeli ve uygulamaya koymalıdır. Büyütmeli endoskopi ile kromoendoskopinin birleştirilmesi ile mukozal detaylar hakkında çok daha iyi yorumlar yapılabilmektedir. Her bir lezyon için spesifik boyanma paternleri (pit patern) belirlenmiştir. Bu paternler histopatolojik incelemeler ile oldukça paralel sonuçlar vermektedir. Kiesslich ve ark. yaptığı bir çalışmada, sigmoidoskopi ile normal bulunan mukoza indigokarmin (%0.4, 1-10 ml) ile boyanmıştır. 48 normal görünümlü mukozaya sahip hastanın boyama sonrası 27 tanesinde 178 (176 düz, 2 deprese) lezyon saptanmıştır. Ortalama lezyon çapı 3 mm dir. Histolojik incelemede 67 adenom, 2 kanser olgusu yakalanmıştır. Lezyonların sınıflamasında pit paterni esas alınmıştır. Pit paterni I-II non-adenomatöz, III-IV ise adenomatöz polip ile uyumlu bulunmuştur. Pit paterni III-IV olan lezyonlarda daha fazla displazi saptanmıştır (22).

Sonuç olarak, kromoendoskopi, lezyonların görünmesi ve sınırlarının belirlenmesinde oldukça yüksek duyarlılığa (%92) ve özgüllüğe (%93) sahiptir. Pit paterni sınıflaması hiperplastik ve adenomatöz poliplerin ayırımında ve sonraki takip planlarının belirlenmesinde oldukça yardımcı bir yöntemdir.

Gelişen teknoloji ile ortaya çıkan diğer bir görüntüleme metodu ise konfokal lazer endoskopidir. Konfokal lazer endoskopi, in vivo koşullarda mukozanın alt tabakaları hakkında fikir vermektedir. Kiesslich ve ark. Mainz'deki Johannes Gutenberg Üniversitesi'ndeki deneyimlerinde, 27 hastaya akriflavin hidroklorid veya fluoresan

sodyum verilerek, mavi lazer illuminasyonu uygulanmıştır. Ayrıca 42 hastaya sadece fluoressan sodyum verilerek aynı işlem yapılmıştır. Konfokal görüntüler, hücresel ve Vasküler değişiklikler açısından sınıflandırılmış ve çift –kör yöntemle, histoloji ile kıyaslanmıştır. Acriflavin hidroklorid ve fluoressan sodyum eşit olarak yüksek duyarlılıkta, histoloji ile korelasyon göstermiştir. Ancak akriflavin hidroklorid yüzey epitelinde yoğunlaşırken, fluoressan sodyum lamina propria'nın alt tabakalarında tutulma eğilimi göstermiştir. Bu nedenle çalışmaya fluoressan sodyum ile devam edilmiştir. 390 farklı lokalizasyondan alınan 13020 konfokal görüntü 1038 histolojik örnek ile kıyaslanmıştır. Konfokal endoskopi ile yüzey altı inceleme hücresel yapı hakkında daha iyi fikir vermiştir. Neoplastik değişiklikleri tahmin etmekteki duyarlılığı %97, özgüllüğü %99.4, tanısal doğruluğu %99.2 olarak bulunmuştur (22).

Bu çalışmaya göre, konfokal endoskopi canlı dokularda sanal histolojik değerlendirme yapabilmesi açısından, per-malign lezyonların teşhisinde oldukça yararlıdır.

### **Kolon Adenom ve Karsinomlarındaki Genetik ve Epigenetik Faktörler**

Kolorektal kanserler, progresif olarak biriken birtakım genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu, kolon epitelindeki neoplastik transformasyonlardır. Kolon kanserinin oluşabilmesi için yaklaşık 10-15 yıl geçmesi gerektiği için, diğer kanser tiplerine göre, genetik ve moleküler karsinogenez mekanizmaları daha çok araştırılmıştır. Moleküler genetik mekanizmaların aydınlatılması sonucu, üç farklı temel patogeneze ortaya çıkmıştır. Birincisi, kolon kanseri gerek moleküler gerekse morfolojik açıdan çok basamaklı bir süreçten geçmektedir. İkincisi, genomik instabilitenin kaybı anahtar mekanizmayı oluşturmaktadır. Üçüncüsü Herediter kolon kanserlerindeki

germline mutasyonlar, somatik mutasyon şeklinde oluştuğunda, sporadik kolon kanserlerine neden olmaktadır (1-60).

Kolon kanseri Wingless/Wnt sinyal yolundaki sinyal elemanlarının bozuklukları ile ortaya çıkar. Bundan sonra tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu veya onkogenlerin aktivasyonu meydana gelir. Bu değişiklikler k-ras, p53 ve TGF-beta sinyal yolunu etkilemektedir (1-36).

Genomik instabilite, hücrede zamanla birtakım onkogenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna yol açan önemli bir değişikliktir. Genomik instabilite, adenomun oluşundan sonra fakat, kanser oluşumundan önce meydana gelir. Kıyaslamalı genomik hibridizasyon yöntemi ile, genomik instabilite gelişen hücrelerde progresif mutasyonların birikerek, kanser oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir.

Kolon kanserinin genetiği ile ilgili bilgi birikimi, herediter kolon kanserleri olan, FAP, ve onun varyantı Gardner sendromundan gelmektedir. FAP ve Gardner sendromları kolon kanserine duyarlılığı arttıran germline mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. En önemli mutasyon APC geni mutasyonudur. APC geninin 15 ekzonu vardır ve çok büyük bir proteini kodlar (310 kDa, 2843 aa). Bu proteinin işlevi birçok proteinin oligomerizasyonu ve beta-katenin, gamma-katenin, glikojen sentetaz kinaz enzimlerinin intrasellüler bağlanma noktası görevi görmesidir. APC genindeki germline mutasyonlar, FAP, Gardner, attenué FAP, Turcott sendromu veya düz adenom sendromuna yol açar. Sporadik adenom ve adenokanserlerde de APC geninin rol oynadığı gösterilmiştir. Kolon adenom ve karsinomlarının %30'unda bu bölgede allelik kayıp olduğu saptanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda kolon adenokarsinomlarında APC gen mutasyon oranının sanılandan çok daha yüksek, %70 civarında olduğunu göstermiştir. Bu mutasyon kolon kanseri karsinogenezinin ilk

basamaklarında mevcut olup, ardından gelen mutasyonlara da zemin hazırlar. Kolon kanserinin öncül lezyonlarından kabul edilen aberran kript odaklarında bile APC gen mutasyonu saptanmıştır. Sporadik kolon kanserinde görülen mutasyonların büyük bir kısmı ekzon 15'in 5' ucunda, 1280-1500 numaralı amino asit rezidüleri arasında gerçekleşir. Bu mutasyon beta-katenin işlevi ile ilişkilidir. APC mutasyonlarının %90'ından fazlası, stop kodon veya truncated gen mutasyonlarına yol açar (43-48).

APC geninin tümör oluşumundaki en önemli etkisi, Wingless/Wnt sinyal yolunu aktive ederek, ardından hücre proliferasyonunu arttırmasından kaynaklanmaktadır. APC mutasyonu, APC proteini ile beta-katenin'in birleşmesini önleyerek, Wingless/Wnt yolunu aktif hale getirir (55-60).

İnsanlarda tümör dokusunda çok sayıda onkogen belirlenmiştir. Kolon kanserinde en önemli onkogenlerden bir tanesi ras proto-onkogen ailesidir. Ras proto-onkogen ailesinin en önemli üyesi k-ras, birçok kolon adenomu ve kanserinin gelişiminde rol oynamaktadır. K-ras geni tüm ras ailesi içinde en çok mutasyona uğrayan genidir. Nadiren n-ras mutasyonları da bildirilmiştir. Ras ailesi genleri sinyal iletiminde rol oynayan 21-kDa ağırlığında bir proteini kodlar. Ras proteinlerinin en önemli görevi, büyüme faktörlerinin Raf-mitogen-activated protein (MAP) kinaz ile etkileşime girmesinin sağlanmasıdır. MAP-kinaz sinyal yolu erken cevap elemanlarının nükleer ekspresyonunu sağlar. K-ras geni dört ekzondan oluşur. Bu ekzonlar, dördüncü ekzonun devreye girip girmemesine bağlı olarak, 188 veya 189 amino asit dizisinden oluşan peptidlerin sentezine yol açar. K-ras tarafından kodlanan proteinlerin üç domain bölgesi vardır: (a) GTP/GDP ye bağlanan kısım (b) karboksiterminalinin post-translasyonel modifikasyonu (izoprenilasyon) sonrası plazma membranının iç yüzeyine tutunmayı sağlayan kısmı (c) hücresel hedef noktalarına bağlanan kısmı. İnaktif k-ras

GDP'ye bağlanır. Aktive olduktan sonra GDP, GTP ile yer değiştirir. Aktive k-ras GTP'nin hidrolizi ile hızla deaktive olur. K-ras genindeki onkogenik mutasyonlar, GTP'nin hidrolizini önleyerek, k-ras'ın aktif formda kalmasına neden olur. K-ras genindeki en sık mutasyon oluşan bölgeler, kodon 12, 13 ve 61 dir. Bu bölgeler, k-ras geninin GTP/GDP bağlanma bölgeleridir. Mutasyon geliştiği zaman, ras proteininin %30'u GTP'ye bağlı şekilde kalır, normal k-ras geni olan dokuda ise GTP bağlı olan formun oranı <%0.3 dür (60-64).

K-ras mutasyonu birçok gastrointestinal tümörde görülmektedir. Diğer tümörlerde olduğu gibi, Kolorektal kanserlerde de k-ras mutasyonu kodon 12, 13 ve 61 de görülür. Kodon 12 kolon kanserinde en sık mutasyona uğrayan bölgedir ve bu kodonda missense mutasyon tipi görülür. K-ras mutasyon sıklığı kolon kanserlerinde %37-41 oranında bildirilmiştir. K-ras mutasyonu kolon karsinogenezinin erken dönemlerinde gerçekleşir. Vogelstein ve ark. küçük tübüler adenomlarda %13, büyük adenomlarda %42 ve invaziv karsinom odağı içeren adenomlarda %57 oranında k-ras mutasyonunu bildirmişlerdir. 1 cm'den büyük adenomlarda k-ras mutasyonu sıklığı %58 iken, 1 cm'den küçük adenomlarda bu oran %9'dur. Diğer araştırmacıların sonuçları da benzer nitelikte olup, kolon adenomlarında k-ras mutasyonu sıklığı ortalama olarak %40 civarındadır(80-84).

K-ras mutasyonları APC mutasyonlarından sonra gelişir ve adenomatöz lezyonların büyümesine neden olur. APC mutasyonu taşıyan küçük adenomlarda k-ras mutasyonu sıklığı %20 iken, ileri patolojik özellikler taşıyan büyük adenomlarda k-ras mutasyonu sıklığı %50 civarındadır. Bu nedenle k-ras mutasyonu adenom-karsinom ilişkisinde erken dönemde devreye girerek, adenomun büyümesini sağlamaktadır.

Ancak ilginç olarak, k-ras mutasyonu gelişmesi adenomun adenokansere dönüşmesi için mutlak şart değildir.

Bizim çalışmamızda, 40 adet polipten 9 tanesinde (%22.5) k-ras mutasyonu saptandı. İncelemeye alınan 40 adet polipten, 1 cm'den küçük olan 9 polibin sadece 1 tanesinde (%11.1), 1-2 cm arasında büyüklüğü olan 28 polibin 6 tanesinde (%21.4) ve 2 cm'den büyük olan 3 tane polibin 2 tanesinde (%66.6) k-ras mutasyonu bulundu. Literatürle uyumlu olarak, adenom çapı arttıkça, genetik mutasyon sıklığı da artmaktadır. Bunun başlıca nedeni, k-ras mutasyonu ile tetiklenen hücresel proliferasyon mekanizmaları olabilir. Vogelstein ve ark. yaptığı çalışmada, 1 cm'den büyük adenomlarda k-ras mutasyonu sıklığı %58 iken, 1 cm'den küçük adenomlarda bu oran %9'dur. Diğer araştırmacıların sonuçları da benzer nitelikte olup, kolon adenomlarında k-ras mutasyonu sıklığı ortalama olarak %40 civarındadır. Bizim sonuçlarımızda da, 2 cm'den büyük olan poliplerde %66.6 oranında k-ras mutasyonu saptanırken, 1 cm'den küçük poliplerde bu oranı yaklaşık %11 olarak belirlendi.

Yapılan bir çalışmada, küçük tübüler adenomlarda %13, büyük adenomlarda %42 ve invaziv karsinom odağı içeren adenomlarda %57 oranında k-ras mutasyonunu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda, adenomların histopatolojik özellikleri ile k-ras mutasyonu görülme sıklığı açısından değerlendirildiğinde; tübüler adenomların (n=18) 2 tanesinde (%11.1), tübülovillöz adenomların (n=16) 2 tanesinde (%12.5) ve villöz adenomların (n=6) 4 tanesinde (%66.6) k-ras mutasyonu saptandı. Büyük adenomlar ve invaziv karsinom odağı içeren polipler sıklıkla villöz yapıdaki poliplerdir. Bu poliplerin yaklaşık yarısında k-ras mutasyonu görülür. Bu nedenle villöz adenomlarda saptadığımız %66'lık k-ras mutasyonu, bu poliplerin malign gelişime eğilimli olmalarından kaynaklanmaktadır.

Displazi ve karsinoma in situ içeren adenomlarda, yukarıda da belirtildiği gibi, k-ras mutasyonu daha sık görülmektedir. İncelediğimiz 40 adenomdan, 4 tanesinde displazi ve karsinoma in situ saptadık. Bunlardan 2 tanesi hafif displazi, 1 tanesi şiddetli displazi ve bir tanesi de karsinoma in situ odağı içermekte idi. Tüm displazi içeren adenomlarda k-ras mutasyonu saptandı.

K-ras mutasyonu ile beslenme alışkanlıkları arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, yağdan fakir diyet ile beslenen 19 hastanın 2 tanesinde (%10.5), hayvansal gıda ağırlıklı diyet ile beslenen 15 hastanın 6 tanesinde (%40) ve bitkisel/lifli gıdalarla beslenen 6 hastanın 1 tanesinde (%16.6) k-ras mutasyonu saptadık. Yapılan bir çalışmada 9 mm'nin altındaki poliplere polipektomi yapılmayıp, bu hastalar 3 yıl boyunca takip edilmiştir. Üç yıl sonra polipektomi yapılarak, çeşitli faktörlerin polip gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Sağlıksız diyet uygulayan, yağdan zengin ve lifden fakir diyet ile antioksidan almayan hastalarda artmış adenom gelişimi saptanmıştır. Bizim çalışmamızda hayvansal gıda ağırlıklı beslenen hastalarda k-ras mutasyonu sıklığı diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksekti. Bu bulgu, hayvansal gıdaların içerdiği yüksek yağ oranından da kaynaklanabilir. Lieberman ve ark. yaptığı prospektif, çapraz kesitsel bir çalışmada, günde 4.2 gr ve üzeri lifli gıda alımı, günde 645 IU vitamin D alımı ve günlük olarak NSAİİ kullanımı ile kolorektal adenom gelişimi arasında ters ilişki bulunmuştur. Artmış fiziksel aktivite, günlük multi-vitamin preparatı kullanımı ve kırmızı et kökenli yağ ve kalsiyum alımı arasında sınırda bir ilişki saptanmıştır. Bu bulgular k-ras mutasyonu ile diyet tarzı arasında bir ilişki olduğunu desteklemektedir.

Kolon adenomlarının prevalansı yaşla birlikte artar. Çalışmamızda k-ras mutasyonu görülen 9 hastanın yaş ortalaması  $65 \pm 12$  yıl, k-ras mutasyonu saptanmayan

31 hastanın yaş ortalaması ise  $55\pm6$  yıl idi ( $p<0.05$ ). Kadın erkek cinsiyet arasında ise anlamlı bir fark bulunmadı.

Ailede kolon kanseri öyküsü bulunması, kolon kanserine genetik bir yatkınlığı gösterebilir. Ailesinde kolon kanseri öyküsü olan 6 hastanın 2 tanesinde (%33.3) k-ras mutasyonu mevcuttu. Ailesinde kolon kanseri öyküsü olmayan 34 hastanın ise 7 tanesinde (%20.5) k-ras mutasyonu saptandı. Bu değişkenler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $p>0.05$ , AD). Bizim bulgularımız, ailede kolon kanseri öyküsü olmasının k-ras mutasyonu gelişimi için bir risk faktörü oluşturmadığı yönündedir. Ancak ailesinde kolon kanseri öyküsü olan hasta sayımızın az olması sonuçlarımız etkilemiş olabilir.

Kolesistektomi ve kolon kanseri ilişkisi uzun yıllardır tartışma konusu olmuştur. Lieberman ve ark. yaptığı çalışmada, kolesistektomi öyküsü ile kolorektal adenom görülme sıklığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Kolesistektominin k-ras mutasyonu gelişimi üzerine etkisi ise bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda, az sayıda kolesistektomize hastanın ( $n=4$ ), 2 tanesinde (%50) k-ras mutasyonu saptandı. K-ras mutasyonu saptanan bu polipler 1-2 cm çapında olup, bir tanesi tübülovillöz, diğeri ise villöz adenom idi. Villöz adenomu olan kolesistektomize hastada hafif displazi saptandı. Ancak hasta sayısının az olması nedeniyle, kolesistektominin k-ras mutasyonu gelişimine katkılarını daha geniş çalışmalar ile değerlendirmenin uygun olacağı görüşündeyiz.

## ÖZET

Kolorektal kanserlerin büyük bir kısmının başlangıç noktası benign özellikteki adenomatöz poliplerdir. Buna rağmen, tüm kolon adenomlarının ancak küçük bir yüzdesi kolon kanserine dönüşmektedir. Adenomatöz polipler benign neoplastik epitelden kaynaklanan pedinküllü (saplı) veya sesil (sapsız) poliplerdir. Gelişmiş ülkelerde adenomatöz poliplerin sıklığının artması nedeniyle, bu tür poliplerin tanınması ve endoskopik olarak çıkarılması, kolon kanserinden korunmada büyük önem taşımaktadır. Adenom gelişiminde kalıtsal ve çevresel etkenler rol oynar. K-ras mutasyonu birçok gastrointestinal tümörde görülmektedir. Kolorektal kanserlerdeki k-ras mutasyonu kodon 12, 13 ve 61 de görülür. Kodon 12 kolon kanserinde en sık mutasyona uğrayan bölgedir. K-ras mutasyon sıklığı kolon kanserlerinde %37-41 oranında bildirilmiştir.

Bu çalışmada kolonoskopik olarak çıkarılan adenomlarda k-ras mutasyonu sıklığı ve bunun adenomun morfolojik, histolojik özellikleri ile hastaların demografik, klinik ve diyet tarzları ile olan ilişkisi araştırıldı. 40 adet polipten, 1 cm'den küçük olan 9 polibin sadece 1 tanesinde (%11.1), 1-2 cm arasında büyüklüğü olan 28 polibin 6 tanesinde (%21.4) ve 2 cm'den büyük olan 3 tane polibin 2 tanesinde (%66.6) k-ras mutasyonu saptandı. K-ras mutasyonu için diğer risk faktörleri ise; villöz içerik, displazi varlığı, ailede kolon kanseri öyküsü ve ileri yaş olduğu saptandı. Kolesistektomi öyküsü, cinsiyet ile k-ras mutasyonu arasında ilişki saptanmamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızdaki bulgular, kolorektal adenomlarda k-ras mutasyonu oluşumunun polibin büyümesine ve malign potansiyel kazanmasına katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

**KAYNAKLAR**

1. Abdollah S, Macias-Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attisano L, Wrana JL. TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J. Biol. Chem.* 272:27678–85, 1997
2. Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R, Hoschuetzky H.. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci* 107:3655–63, 1994
3. Aoki T, Takeda S, Yanagisawa A, Kato Y, Ajioka Y, Watanabe H, Kudo S, Nakamura Y. APC and p53 mutations in de novo colorectal adenocarcinomas. *Hum Mutat*; 3: 342–6, 1994.
4. Arai T, Akiyama Y, Okabe S, Ando M, Endo M, Yuasa Y.. Genomic structure of the human Smad3 gene and its infrequent alterations in colorectal cancers. *Cancer Lett.* 122:157–63, 1998
5. Arminski TC, McLean DW: Incidence and distribution of adenomatous polyps of the colon and rectum based on 1000 autopsy examinations. *Dis Colon Rectum* 7: 249-258, 1964.
6. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, et al.. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 50: 7717–22, 1990
7. Bird RP: Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer *Cancer Lett* 93:55-63, 1995.
8. Bond JH. Clinical evidence for the adenoma-carcunoma sequence, and management of patients with colorectal adenomas. *Semin Gastrointest Dis*; 11: 176–84, 2000.
9. Boughdady IS, Kinsella AR, Haboubi NY, Schofield PF. K-ras gene mutations in adenomas and carcinoma of the colon. *Surg Oncol*; 1: 275–82. 1992
10. Clark JC, Collan Y, Eide TJ: Prevalance of polyps in an autopsy series from areas with varying incidence of large-bowel cancer. *Int J Cancer* 36: 179-188, 1985.
11. Correa P: Epidemiology of polyps and cancer. In Morson BC (ed): *The Pathogenesis of Colon Cancer*. Philadelphia, WB Saunders, 1978, s126-131.

12. Dave S, Hui S, Kroenke K, Imperiale TF Is the distal hyperplastic polyp a marker for proximal neoplasia? *J Gen Intern Med* 18:128–137, 2003
13. Eide TJ, Stalsberg H: Polyps of the large intestine in northern Norway. *Cancer* 42: 2839-2845, 1978.
14. Fearon E, Vogelstein B.. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759–67, 1990
15. Fenoglio CM, Kaye GI, Lane N: Distribution of human colon lymphatics in normal, hyperplastic and adenomatous tissue. *Gastroenterology* 64: 51-58, 1973.
16. Fujimori T, Satonaka K, Yamamura-Idei Y, Nagasako K, Maeda S. Noninvolvement of ras mutation in flat colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer*; 57: 51–5. 1994
17. Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, Rashid A, Longo P, et al.. Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am. J. Pathol.* 153:1063– 78, 1998
18. Fynan TM, Reiss M.. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. *Crit. Rev. Oncolog.* 4:493–540, 1993
19. Gardner RJ, Kool D, Edkins E, Walpole IR, Macrae FA, et al.. The clinical correlates of a 30 truncating mutation (codons 1982–1983) in the adenomatous polyposis coli gene. *Gastroenterology* 113:326–31, 1997
20. Gemma A, Hagiwara K, Vincent F, Ke Y, Hancock AR, et al.. hSmad5 gene, a human hSmad family member: its full length cDNA, genomic structure, promoter region and mutation analysis in human tumors. *Oncogene* 16:951–56, 1998
21. Gottlieb LS, Winawer SJ, Sternberg S, et al: National Polyp Study (NPS): The diminutive colonic polyp. *Gastrointest Endosc* 30: 143-150, 1984.
22. Grady WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, et al.. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat. Genet.* 26:16–17, 2000
23. GradyW, Myeroff L, Swinler S, Rajput A, Thiagalingam S, et al.. Mutational inactivation of transforming growth factor  $\beta$  receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* 59:320–24, 1999
24. Granqvist S, Gabrielsson N, Sundelin P: Diminutive colonic polyps- clinical significance and management. *Endoscopy* 1: 36-43, 1979.

25. Hofstad B, Vatn M. Growth rate of colon polyps and cancer. *Gastrointest Endosc Clin North Am*; 7: 3 345–63, 1997.
26. Hoosein N, McKnight M, Levine A, Mulder K, Childress K, et al.. Differential sensitivity of subclasses of human colon carcinoma cell lines to the growth inhibitory effects of transforming growth factor- $\beta$ 1. *Exp. Cell Res.* 181:442–53, 1989
27. Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, et al.. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat. Genet.* 28:184–87, 2001
28. Howe JR, Guillem JG.. The genetics of colorectal cancer. *Surg. Clin. North Am.* 77:175–95, 1997
29. Huang J, Papadopoulos N, McKinley A, Farrington S, Curtis L, et al.. APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9049–54, 1996
30. Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 127:2061–69, 1994
31. Ikeda M, Orimo H, Moriyama H, Nakajima E, Matsubara N, et al.. Close correlation between mutations of E2F4 and hMSH3 genes in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* 58:594–98, 1998
32. Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF: Results of screening colonoscopy among persons 40 to 49 years of age. *N Engl J Med* 346:1781–1785, 2002
33. Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF: Results of screening colonoscopy among persons 40 to 49 years of age. *N Engl J Med* 346:1781–1785, 2002
34. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, et al.. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* 399:798–802, 1999
35. Itzkowitz SH: Gastrointestinal adenomatous polyps. *Semin Gastrointest Dis* 7:105–112, 1996
36. Jacoby R, Marshall D, Kailas S, Schlack S, Harms B, Love R.. Genetic instability associated with adenoma to carcinoma progression in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology* 109:73–82, 1995

37. Jass JR, Sobin LH (eds): World Health Organization: Histological typing of intestinal tumors, 2nd ed. New York, Springer-Verlag, 1989.
38. Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, et al.. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res.* 54:5523–26 1994
39. Johannsen LGK, Momsen O, Jacobsen NO: Polyps of the large intestine in Aarhus, Denmark: An autopsy study. *Scand J Gastroenterol* 24: 799-815, 1989.
40. Jones P, Laird P. Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.* 21:163–67, 1999
41. Kiesslich R, Jung M, DiSario JA, Galle PR, Neurath MF: Perspectives of chromo and magnifying endoscopy: how, how much, when, and whom should we stain? *J Clin Gastroenterol* 38:7–13, 2004
42. Kinzler K, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87:159–70, 1996
43. Ko JM, Cheung MH, Wong CM, Lau KW, Tang CM, Kwan MW, Lung ML. Ki-ras codon 12 point mutation activation in Hong Kong colorectal carcinoma patients. *Cancer Lett*; 134: 169–76. 1998
44. Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10:1054–72, 1996
45. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:89–96, 1999.
46. Konishi F, Morson BCJ: Pathology of colorectal adenomas: a colonoscopic survey. *J Clin Pathol* 35: 830-839, 1982.
47. Kono S, Ahn YO. Vegetables, cereals and colon cancer mortality: long-term trend in Japan. *Eur J Cancer Prev*; 9: 363–5. 2000
48. Lamlum H, Al Tassan N, Jaeger E, Frayling I, Sieber O, et al.. Germline APC variants in patients with multiple colorectal adenomas, with evidence for the particular importance of E1317Q. *Hum. Mol. Genet.* 9:2215–21, 2000
49. Lev R: Adenomatous Polyps of the Colon: Pathological and Clinical Features. New York, Springer-Verlag, 1990.
50. Lieberman DA, Prindiville S, Weiss DG, Willett W; VA Cooperative Study Group 380: Risk factors for advanced colonic neoplasia and hyperplastic polyps in asymptomatic individuals. *JAMA* 290:2959–2967, 2003
51. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P: hereditary flat adenoma syndrome: a variant of familial adenomatous polyposis? *Dis Colon Rectum* 35: 411-419, 1992.

52. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, et al. Inactivation of the type II TGF- $\beta$  receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268:1336–38, 1995
53. Marra G, Boland C.. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:1114–25, 1995
54. Massague J.. TGF- $\beta$  signaling: receptors, transducers, and mad proteins. *Cell* 85:947–50, 1996
55. Matsumura Y, Yoshiike N, Yokoyama T, Tanaka H. Dietary intake and cancer mortality in Japan. *Biofactors*; 12: 95–9. 2000
56. Messerini L, Ciantelli M, Baglioni S, Palomba A, Zampi G, Papi L.. Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic mucinous colorectal cancers. *Hum. Pathol.* 30:629–34, 1999
57. Miyaki M, Iijima T, Kimura J, Yasuno M, Mori T, et al.. Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res.* 59:4506–9, 1999
58. Miyaki M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Enomoto M, Igari T, et al.. Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res.* 54:3011–20, 1994
59. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, et al.. Activation of beta catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC *Science* 275:1787–90, 1997
60. Muto T, Bussey HJR, Morson BJ: The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36: 2251-2260, 1975.
61. Muto T, Kamiya J, Sawada T : Small “ flat adenoma” of the large bowel with special reference to its clinico-pathologic features. *Dis Colon Rectum* 28: 847-853, 1985.
62. Nagata C, Shimizu H, Kametani M, Takeyama N, Ohnuma T, Matsushita S. Diet and colorectal adenoma in Japanese Males and females. *Dis Colon Rectum*; 44: 105–11. 2001
63. Neugut AI, Jacobson JS, Rella VA: Prevalence and incidence of colorectal adenomas and cancer in asymptomatic persons. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 7:387–399, 1997

64. Neugut AI, Jacobson JS, Rella VA: Prevalence and incidence of colorectal adenomas and cancer in asymptomatic persons. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 7:387–399, 1997
65. O'Brien H, Matthew JA, Gee JM, Watson M, Rhodes M, Speakman CT, Stebbings WS, Kennedy HJ, Johnson IT. K-ras mutation, rectal crypt cells proliferation, and meat consumption in patients with left-sided colorectal carcinoma. *Eur J Cancer Prev*; 9: 41–7. 2000
66. O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, et al: The National Polyp Study: Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 98: 371-380, 1990.
67. Rickert RR, Auerbach O, Garfinkel L: Adenomatous lesions of the large bowel: an autopsy study. *Cancer* 43: 1847-1855, 1979
68. Ryan ME, Parent K, Wyman JB, et al: Significance of diminutive colorectal polyps in 3282 flexible sigmoidoscopic examinations. *Gastrointest Endosc* 31: 149-156, 1985.
69. Shinya H, Wolff WI: Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps. *Ann Surg* 190: 676-683, 1979.
70. Takada H, Ohsawa T, Iwamoto S, Yoshida R, Nakano M, Imada S, Yoshioka K, Okuno M, Masuya Y, Hasegawa K, Kamano N, Hioki K, Muto T, Koyama Y. Changing site distribution of colorectal cancer in Japan. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 1 249–54.
71. Tang WY, Elnatan J, Lee YS, Goh HS, Smith DR. c-Ki-ras mutation in colorectal adenocarcinomas from a country with a rapidly changing colorectal cancer incidence. *Br J Cancer*; 81: 237–41,1999.
72. Tedesco FJ, Hendrics JC, Pickens CA ,et al: Diminutive polyps: Histopathology, spatial distribution and clinical significance. *Gastrointest Endosc* 28: 1-8, 1982.
73. Thomas RJ, Liu YS, St Clair F, Norris PM, Valentine R, Phillips WA. Frequency and clinico-pathological associations of ras mutations in colorectal cancer in the Victorian population. *Aust N Z J Surg*; 67: 233–8, 1997
74. Tiemersma EW, Wark PA, Ocke MC, Bunschoten A, Otten MH, Kok FJ, Kampman E Alcohol consumption, alcohol dehydrogenase 3 polymorphism, and colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:419–425, 2003
75. Tominaga S, Kuroishi T. An ecological study on diet/nutrition and cancer. *Int J Cancer*; 10 (Suppl.): 2–6. 1997

76. Umetani N, Sasaki S, Masaki T, Watanabe T, Matsuda K, Muto T. Involvement of APC and K-ras mutation in non-polypoid colorectal tumorigenesis. *Br J Cancer*; 82: 9–15, 2000.
77. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Eng J Med*; 319: 525–32, 1988.
78. Weston AP, Campbell DR: Diminutive colonic polyps: Histopathology, spatial distribution, concomitant significant lesions and treatment complications. *Am J Gastroenterol* 90: 24-31, 1995.
79. Williams AR, Balasooriya BAW, Day DW: Polyps and cancer of the large bowel: a necroscopic study in Liverpool. *Gut* 23: 835-842, 1982.
80. Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien MJ, et al. Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. *N Engl J Med*, 328, 901–906, 1993.
81. Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Michael IA (ed.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, 1990; 153–8.
82. Yamagata S, Muto T, Uchida Y, Masaki T, Higuchi Y, Sawada T, Hirooka T. Polypoid growth and K-ras codon 12 mutation in colorectal cancer. *Cancer*; 75: 953–7. 1995
83. Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, Hori M, Kitagawa T, Sugano H, Kato Y. Frequent c-Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res*; 53: 953–6. 1993
84. Zhu D, Keohavong P, Finkelstein SD, Swalsky P, Bakker A, Weissfeld J, Srivastava S, Whiteside TL. K-ras gene mutations in normal colorectal tissues from K-ras mutation-positive colorectal cancer patients. *Cancer Res*; 57: 2 485–92, 1997.