

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLOREKTAL KANSERLERDE RAS/RAF/MAP
KİNAZ YOLAĞININ KLİNİKOPATOLOJİK
ÖZELLİKLERLE İLİŞKİSİ**

MAHDİ AKBARPOUR

TEMEL ONKOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2018

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2012970160

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLOREKTAL KANSERLERDE RAS/RAF/MAP
KİNAZ YOLAĞININ KLİNİKOPATOLOJİK
ÖZELLİKLERLE İLİŞKİSİ**

**TEMEL ONKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

MAHDİ AKBARPOUR

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. Yasemin BASKIN

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2012970160

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Mahdi AKBARPOUR ‘Kolorrektal kanserlerde RAS/RAF/MAP Kinaz yolağının klinikopatolojik özelliklerle ilişkisi’ konulu Yüksek Lisans tezini 19/01/2018 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof.Dr. Yasemin BASKIN

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. İlhan ÖZTOP

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Doç.Dr. Nuket ELİYATKIN

ÜYE

Adnan Menderes Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof.Dr. Hulya ELLİDOKUZ

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Kemal ERGİN

YEDEK ÜYE

Adnan Menderes Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİN	iv
ŞEKİL DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜR	x
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ	5
1.1 Problemin Tanımı ve Önemi	5
1.2.Araştırmanın Hipotezleri	6
2.GENEL BİLGİLER	7
2.1.Kanser.....	7
2.2.Onkogenler	8
2.2.1.Tümör Baskılayıcı Genler	9
2.3.Kolorektal Kanser	10
2.3.1.Kolorektal Kanser Etiyolojisi.....	11
2.3.2.Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi.....	11
2.4. Kolon Kanseriinde Evreleme.....	12
2.5.Prognostik Faktörler	12
2.6.TNM sınıflaması.....	14
2.7. Kalıtsal Risk Faktörleri	14
2.8. Çevresel Faktörler	17
2.9. Kalın Bağırsak Anatomisi.....	19
2.11. Kolorektal Karsinogeneizde Moleküler Yollar	20
2.11.1. Kromozomal İnstabilite	20
2.11.2. Mikrosatellit İnstabilite	21
2.11.3. “CPG” Ada Metilator Fenotipi	21
2.12. Hedefe Yönelik Tedavi Yaklaşımı	22

2.12.1. Kolorektal Kanserde Anti-EGFR Tedavisi	24
2.13. KRAS ve NRAS geni	26
2.14. BRAF geni	26
2.15. PIK3CA geni	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Araştırmanın Tipi.....	28
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	28
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	28
3.4. Çalışma Materyali.....	28
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	28
3.6. Veri Toplama Araçları	29
3.6.1. Spin Kolon Tabanlı Nükleik Asit İzolasyonu	29
3.6.1.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Malzeme ve Cihazlar.....	29
3.6.1.2. DNA İzolasyonu için yapılan basamaklar.....	30
3.6.2. Pyrosekans Tabanlı Mutasyon Analizi.....	31
3.6.2.1. KRAS, NRAS ve BRAF PCR İşlemleri	31
3.6.2.2. Purifikasyon ve Sekans İşlemleri	32
3.6.3. Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu	38
3.6.3.1. RT-PCR’da Kullanılan Malzeme Ve Cihazlar	39
3.6.3.2. RT-PCR İşlem Basamakları	39
3.7. Araştırma Planı	41
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	42
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	42
3.10. Etik Kurul Onayı.....	43
4. BULGULAR	44
4.1.Demografik Veriler.....	44
4.2.Mutasyon Analizi.....	45
4.2.1. Mutasyon Tipi Dağılımı	46
4.3.Tanı Anındaki yaşa göre Mutasyon Analizi.....	51
4.4. Primer Tümör yerine göre Mutasyon Analizi	52

4.5. Metastaz Durumu	53
4.6. Tümör Evresi ve Mutasyonunun Değerlendirilmesi	54
4.7. Mutant Olguların Özellikleri	55
4.8. Diferansiyasyon ve Mutasyon durumu	57
4.9. Yaşam Analizleri	57
5. TARTİŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
7. KAYNAKLAR	76
8. EKLER	91

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. TNM sınıflaması	14
Tablo 2. Pyrosekans için uygulanan PCR protokolü	32
Tablo 3. RT-PCR için uygulanan PCR protokolü	40
Tablo 4. PIK3CA genindeki değerlendirilen mutasyonlar	40
Tablo 5. RT-PCR değerlendirmesi için kullanılan Ct değerleri	41
Tablo 6. Hastaların son durumu Cinsiyet Karşılaştırması	45
Tablo 7. Cinsiyete Göre Mutasyon Analizi Dağılımı	46
Tablo 8. Analiz edildiği genlerin mutasyon Dağılımı	46
Tablo 9. KRAS Mutasyonu Fenotip Dağılımı	47
Tablo 10. BRAF Mutasyonu Fenotip Dağılımı	48
Tablo 11. NRAS Mutasyonu Fenotip Dağılımı	49
Tablo 12. PIK3CA Mutasyonu Exon Dağılımı	50
Tablo 13. PIK3CA Geni Mutasyonu Fenotip Dağılım Yüzdesi	50
Tablo 14. Tanı Anındaki Yaşa Göre Mutasyon Analizi	52
Tablo 15. Primer Tümör Yerine Göre Mutasyon Analizi	53
Tablo 16. Evre-Mutasyon İlişkisi	55
Tablo 17. Mutant Olgu Karakteristiği	56
Tablo 18. Diferansiyasyon Dağılımı	58
Tablo 19. KRAS Sağkalım Ortalaması	59
Tablo 20. KRAS Sağkalım Medyan	59
Tablo 21. BRAF Mutasyonu Genel Sağkalım Süre Ortalaması	60
Tablo 22. BRAF Mutasyonu Medyan Sağkalım Ortalaması	60
Tablo 23. NRAS Mutasyonu Genel Sağkalım Süre Ortalaması	61
Tablo 24. NRAS Mutasyonu Medyan Sağkalım Ortalaması	62
Tablo 25. PIK3CA Mutasyonu Genel Sağkalım Süre Ortalaması	63
Tablo 26. PIK3CA Mutasyonu Medyan Sağkalım Ortalaması	63
Tablo 27. Herhangi Bir Mutasyonun Varlığında Genel Sağkalım Süre Ortalaması	64
Tablo 28. Herhangi Bir Mutasyonun Varlığında Medyan Sağkalım Ortalaması	64

Tablo 29. Sadece PIK3CA Mutasyonun Varlığında Diğer Tüm Yabancı Olgulara Göre Genel Sağkalım Süre Ortalaması	65
Tablo 30. Sadece PIK3CA Mutasyonun Varlığında Diğer Tüm Yabancı Olgulara Medyan Sağkalım Ortalaması	65
Tablo 31. Olgular Arası 12 ay, 24 ay ve 5 Yıllık Sağkalım Analizi	66
Tablo 32. KRAS, NRAS, BRAF ve PIK3CA Genlerinin Somatik Mutasyonların Literatür Özeti	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Kanserin çok faktörlü ve çok basamaklı olduğunun gösterim	7
Şekil 2. Kalın bağırsak anatomisi	19
Şekil 3. Kolorektumun histolojisi	19
Şekil 4. Aktif RAS/RAF	21
Şekil 5. RAS/RAF ve PI3K ilişkisi	25
Şekil 6. DNA izolasyonu iş akışı şematik gösterimi	30
Şekil 7. KRAS normal kodon 12, 13, 61 analizinin gösterimi.....	34
Şekil 8. NRAS normal kodon 12, 13, 61 analizinin gösterimi.....	34
Şekil 9. KRAS normal kodon 12 ve 13 genotip Pyrogram taraması	35
Şekil 10. KRAS normal kodon 61 genotip Pyrogram taraması	35
Şekil 11. NRAS normal kodon 12 ve 13 genotip Pyrogram taraması	36
Şekil 12. NRAS normal kodon 61 genotip Pyrogram taraması	36
Şekil 13. BRAF normal kodon 464-469 ve 600 analizinin gösterimi	37
Şekil 14. BRAF normal kodon 464-469 genotip Pyrogram taraması	37
Şekil 15. BRAF normal kodon 600 genotip Pyrogram taraması	38
Şekil 16. PIK3CA 542. ve 545. Kodonlarının Rotor-Gene standart eğrileri	41
Şekil 17. PIK3CA 1047. Kodonun Rotor-Gene standart eğrileri	41
Şekil 18. Olguların cinsiyete göre dağılımları	44
Şekil 19. Olgularda yapılan mutasyon analiz sayısı.....	45
Şekil 20. KRAS Geni Mutasyon Analizi Dağılımı	47
Şekil 21. KRAS Mutasyonu Yüzde Dağılımı	48
Şekil 22. BRAF Geni Mutasyon Analizi Dağılımı	48

Şekil 23. BRAF Mutasyonu Yüzde Dağılımı.....	49
Şekil 24. NRAS Geni Mutasyon Analizi Dağılımı.....	49
Şekil 25. PIK3CA Mutasyonu Ekzon Dağılımı	50
Şekil 26. PIK3CA Geni Mutasyonu Fenotip Dağılım Yüzdesi	61
Şekil 27. Metastaz Varlığı.....	54
Şekil 28. Tüm Olgularda Sağkalım Analizi	58
Şekil 29. KRAS Karşılaştırmalı Sağkalım Analizi	60
Şekil 30. BRAF Karşılaştırmalı Sağkalım Analizi	61
Şekil 31. NRAS Karşılaştırmalı Sağkalım Analizi	62
Şekil 32. PIK3CA Karşılaştırmalı Sağkalım Analizi.....	63
Şekil 33. Mutasyon Varlığı Karşılaştırmalı Sağkalım Analizi	64
Şekil 34. Sadece PIK3CA Mutasyonun Varlığında Diğer Tüm Yabanıl Olgularda Medyan Sağkalım	66

KISALTMALAR

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

KRAS: V-Ki-Ras Kirsten rat Sarcoma Viral Onkogen Homolođu

NRAS: Neuroblastoma Ras Viral Onkogen Homolođu

BRAF: V-Raf Murine Sarcoma Viral Onkogen Homolođu

PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinaz Katalitik Altbirim-Alfa

P53: Tumor Protein P53

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

PDGF: Platelet Kökenli Büyüme Faktörü

IGF: Insulin Benzeri Büyüme Faktörü

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

HNPCC : Heritate Non-Polyposis Colorectal Cancer

MMR: Mismatch Repari Gen

FAP: Familial Adenomatous Polyposis

WNT : Wingless-related integration site

c-Myc : cellular Myelocytomatosis viral Oncogene

DCC: Detected in colon cancer

SMAD4 : SMAD Family Member 4

SMAD2 : SMAD Family Member 2

FGF β : Fibroblast Growth Factor β

ERK : Extracellular signal-regulated Kinase

CIN: Chromozomal Instability

MMR : Miss Match Repair

RER: Replication Erro

MSI: Microsatellite Instability

MSS: Microsatellite stability

LOH: Loss Of Heterozigoty

MSH2 : MutS Homolog 2

MLH1 : MutL Homolog 1

MSH6: MutS Homolog 6

MSH3: MutS Homolog 3

PMS2: Mismatch Repair Endonuclease PMS2

PMS1: Mismatch Repair Endonuclease PMS2

MLH3: DNA mismatch repair protein Mlh3

CpG: Guanine-Cytosine

G: Guanin

C: Cytosine

STAT : Signal Transducer And Activator Of Transcription

ATP: Adenosin Triphosphat

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

MAPK: Mitogen-Avctivated Protein Kinase

NSAID: Non-steriod antiinflamatuvar ilaclar

RT: Radiotherapy

PCR: Polymerase Chain Reaction

KRK: Kolorektal Kanser

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi boyunca ilminden faydalandığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli Hocam, Prof.Dr.Yasemin BASKIN'a;

Bilgi ve katkılarıyla her zaman yanımda olan, yardımını asla esirgemeyen sevgili Hocam, Prof.Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a;

Kıymetli öneri ve deneyimlerini paylaşarak yol gösteren saygıdeğer Onkoloji Enstitüsü müdürümüz Prof.Dr.Nur OLGUN'a, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndaki saygı değer hocalarıma ve Onkoloji Enstitüsü idari personeline;

Bugünlere gelmemde destekleri ve sevgileriyle büyük pay sahibi olan babam Behzad AKBARPOUR'a ve annem Mahin ALIASGHARI'ye;

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca yardımlarını hiç esirgemeyen değerli ekip arkadaşlarım Dr.Arsalan AMİRFALLAH'a, Dr.Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL'a, MSc.Tuğba UYSAL'a, MSc. Ece ÇAKIROĞLU'na ve Ecz.Yusuf Kağan DAĞDEVİREN'e;

Bende her zaman hatırı olacak olan, manevi desteklerini her zaman hissettiğim Aynur UZUNOVALI'ya, Dr.Nargiz ALİYEVA'ya, MSc.Nazlı MERT ÖZÜPEK'e, Nurçin KAYACIK'a, MSc.Burçin BARAN'a, Ayşe ÖZCAN KESKİN'e ve Nermin TUNÇSİPER'e;

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum

Mahdi AKBARPOUR
İzmir, 2018

KOLOREKTAL KANSERLERDE RAS/RAF/MAP KİNAZ YOLAĞININ KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERLE İLİŞKİSİ

Mahdi AKBARPOUR, Vet.Hek.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir
mahdi.akbarpour@ogr.deu.edu.tr

ÖZET

Giriş: KRAS mutasyonu, metastatik kolorektal kanserde setuksimab gibi anti-epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) terapötik ajanlarında başarısızlığın doğrulanmış bir biyobelirteçtir. Pek çok çalışma NRAS gibi diğer RAS mutasyonlarının anti-EGFR monoklonal tedavilerine dirençle ilişkili olduğunu doğrulamıştır. Ancak, *PIK3CA* mutasyonlarının bu terapilerin etkinliği üzerindeki etkisi hala tartışmalıdır.

Amaç: Bu çalışmanın amacı RAS/RAF/MAPK yolağı ilişkili *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* genlerinde mutasyona sahip kolorektal kanserli hastalarda bu mutasyonlarla klinikopatolojik özelliklerin ilişkisini saptamaktır.

Metot: Bu çalışmaya, 2009-2014 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde kolorektal kanser teşhisi konmuş hastalar dahil edilmiştir. Spin kolon tabanlı DNA izolasyon yöntemi ile formalinle sabitlenmiş parafine gömülü bloklardan genomik DNA izole edilmiştir. *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyon durumları elde edilen örneklerden QIAGEN Pyrosequencing Q24 ve AmoyDx Real-time PCR kullanılarak saptanmıştır.

Bulgular: Hastaların %44,7'si 60 yaş ve üzeri ve %34,8'i kadındı. %90,6'sında en az bir metastaz vardı. *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyon oranı sırasıyla %21.2, %12.5, %4.2 ve %46.9 idi. *KRAS*'ta en sık görülen mutasyon %32,1 ile G13D idi. *KRAS* mutasyonu kadınlarda erkeklere göre anlamlı oranda fazlaydı ($p=0,02$). Primer tümör bölgesi kolon olan

vakalarda *NRAS* mutasyonu rektuma göre anlamlı oranda fazlaydı ($p=0,08$). Q61K, *NRAS* kodon 61'de saptanan tek süstitüsyonu. Saptanan diğer mutasyonlar E545D, E542K, E545K ve H1047L iken *PIK3CA*-H1047R en sık tekrarlanan mutasyonu. Belirtilenler dışında, gen mutasyonu ile yaş, cinsiyet, tümör farklılaşması, evre ve metastaz yeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Sonuç: Sonuç olarak, çalışmamız, Türk toplumunda metastatik kolorektal kanserli hastalarda *NRAS* ve *PIK3CA* mutasyonları ile klinik özellikler arasında korelasyonun göstermesi için yapılan ilk retrospektif çalışmadır. *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* yabanıl tip hastalarda *PIK3CA* mutasyonları gözlenmiştir. Bizim kohortumuzda mutasyonlar ve klinikopatolojik özellikler arasında istatistiksel bir ilişki olmasa da bu belirteçler hastalar için uygun terapilerin seçiminde önemli rol oynamaktadır. Birden fazla gen mutasyon örneğinin bilgisi, hastaların anti-EGFR tedavisinden görecekları yararların öngörülmesinde yararlı bilgiler verebilecektir.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*

THE ASSOCIATION OF CLINICOPATHOLOGICAL FEATURES OF COLORECTAL CANCERS WITH RAS/RAF/MAPK PATHWAY

Mahdi AKBARPOUR, D.V.M

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü
Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir
mahdi.akbarpour@ogr.deu.edu.tr

ABSTRACT

Background: Mutations in *KRAS* gene are validated biomarkers of failure to anti-epidermal growth factor receptor (*EGFR*) therapeutic agents like cetuximab in metastatic colorectal cancer. Many studies have confirmed cooperations of mutations of other genes like as *NRAS* and *BRAF* with resistance against anti-*EGFR* monoclonal therapies. However, the association of *PIK3CA* mutations on the efficacy of those approaches remains controversial.

Objective: Purpose of this study was to determine the association of clinicopathologic features in colorectal cancer patients with mutation in *RAS/RAF/MAPK* pathway related genes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *PIK3CA*.

Method: colorectal cancer diagnosed patients between 2009-2014 years in Dokuz Eylül University Hospital enrolled to this study. Genomic DNA was isolated from formalin fixed paraffin embedded blocks with spin column base DNA isolation method. Collected samples were used to determination of mutation status of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* by using QIAGEN Pyrosequencing Q24 and AmoyDx Real-time PCR methods.

Results: Forty four point seven percent of patients were sixty years or older and %34.8 were women. Ninety point six percent of them had at least one site of metastasis. *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* mutation were %21.2, %12.5, %4.2 and %46.9 respectively. G13D with %32.1 of mutation was the most observed mutation of *KRAS*. Mutation of women in *KRAS* was significantly more than men's with *KRAS* mutation ($p=0.02$). *NRAS* mutation of colon was significantly more in comparison to primary tumors of rectum ($p=0.08$). Q61K was the only detected substitution at codon 61 at *NRAS*. *PIK3CA*-H1047R was the most recurrent mutation while other mutations detected were E545D, E542K, E545K and H1047L. Except the ones which mentioned no significant association of detected genes mutation with age, gender, tumor differentiation, stage and metastases site was noted.

Conclusion: In conclusion, to our knowledge this was the first retrospective study to evaluate the *NRAS* and *PIK3CA* mutation in Turkish metastatic colorectal cancer patients to make clinical correlations. Mutations of *PIK3CA* in *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* wild type patients have been observed. Although there were no statistical relations between mutations and clinicopathologic features in our cohort, these markers have important role in selection of suitable therapies for patients. Knowledge of multiple gene mutation patterns could give useful information in predicting benefit of patients from anti-*EGFR* treatment.

Key Words: Colorectal cancer, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*

1.GİRİŞ VE AMAC

1.1.Problemin Tanımı ve Önemi

Kanser, sık görülmesinle beraber ölüme neden olması ve tedavi maliyetler ile beraber, uzun süreç ve yan etkileri nedeniyle günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biridir. Kanser, türü, değişen coğrafi bölgeleri , farklı yaşı grupları ve cinsiyetine göre değişiklikler göstermektedir (1).

Kanser, kalp ve damar hastalıklarından sonra en sık görülen ve dolayısıyla en çok ölüm sebepleri arasındadır. Türkiye’ de 2007-2011 yılı kanser insidansı çalışmalarında görüldüğü gibi erkeklerde ve kadınlarda ölüm nedenleri arasında 3. sırada yer almaktadır (2). Kolorektal karsinogenezinde moleküler yolları önem taşımaktadır (3). Bu nedenle EGFR yolağı kanser tedavisinde önemli bir hedef haline gelmiştir (3,4).

KRK’lerde EGFR yolağıyla ilişkili yer alan bazı proteinler kolon kanserini başlatan onkogen ürünleri olarak bilinir. Bu nedenle hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi için önemlidir. Bu onkogen ürünleri esas olarak hücre proliferasyonunda yer alan RAS/RAF/MAPK eksen, sağkalım ve mortalite-invazyonun anahtar medyatörleri olan PI3K/PTEN/AKT EGFR’nin iki ana sinyal yolağıdır (5).

KRAS’ın 2. ekzonunda meydana gelen mutasyonlar tüm metastatik kolorektal kanserlerin (mCRC) yaklaşık %35’inde meydana gelir (6). Bu mutasyonlar metastatik kolorektal kanserli hastalarda anti-epidermal büyüme faktörü reseptörü (*EGFR*) tedavisine direnç için doğrulanmış teranostik markerlardır. (7-11). Son zamanlarda, birçok çalışma metastatik kolorektal kanserli hastalarda meydana gelen *NRAS* mutasyonlarının metastatik kolorektal kanser tedavisinde anti-*EGFR* tedavisine direnç ile ilişkili olduğunu göstermiştir bu nedenle uluslararası tedavi protokülleri testin *KRAS* ve *NRAS* olarak değerlendirilmesini önermektedirler. (12,18). *BRAF* mutasyonları metastatik kolorektal kanserli hastaların %5-10’unda saptanmıştır (19). *PIK3CA* mutasyonlarının Birçoğu 9. ve 20. ekzonda bulunur ve metastatik kolorektal kanserli hastaların %10-15’inde saptanmıştır. Avrupa Konsorsiyomu’nun raporuna göre (20), 20. ekzonda görülen *PIK3CA* mutasyonları metastatik kolorektal kanserde anti-*EGFR* tedavisine dirençle ilişkilidir. Ancak, diğer çalışmalarda *PIK3CA* mutasyonları ve anti-*EGFR* tedavisinin etkinliği arasında net bir ilişki saptanmamıştır (21-22).

Günümüze kadar, her bir tümörün genetik profilinin tedavi seçimini ve tedaviye yanıtı etkilediği klinik olarak kanıtlanmıştır; aynı zamanda onkogen mutasyonlarının sıklığı popülasyona göre farklılık göstermektedir ve kolon kanseri hakkındaki genetik bilgilerin büyük çoğunluğu batı popülasyonunda verilmiştir, Türk popülasyonu hakkında çok az bilgi vardır. Bu çalışmanın amacı Türk popülasyonunda KKK hastalarında KRAS, BRAF, PIK3CA ve NRAS mutasyonlarının sıklığı ve baskın olan türünü belirlemek, klinikopatolojik özellikleri ile karşılaştırmak ve tedavi yanıtlarına ve sağkalım üzerinde etkilerini gözlenmemektir. Literatür de Türk popülasyonunda kolon kanseri ilişkili KRAS, BRAF, PIK3CA ve NRAS gen bölgelerinin sıklığını ve tedavi ilişkilerini birlikte gözlemleyen bir başka çalışma bulunmamaktadır.

Araştırmanın Hipotezleri:

1. Türk popülasyonunda kolorektal kanserlerde ilaç seçiminde incelenen genlere ait, hakim bir mutasyon var mıdır?
2. Olgularda saptanan mutasyonlar ve tedavi rejimleri sonuçlarına göre arasında anlamlı bağlantı var mıdır?
3. PIK3CA geninde görülen mutasyonlar kolorektal kanserlerde teranostik bir marker olarak kullanılabilir mi?

2.GENEL BİLGİLER

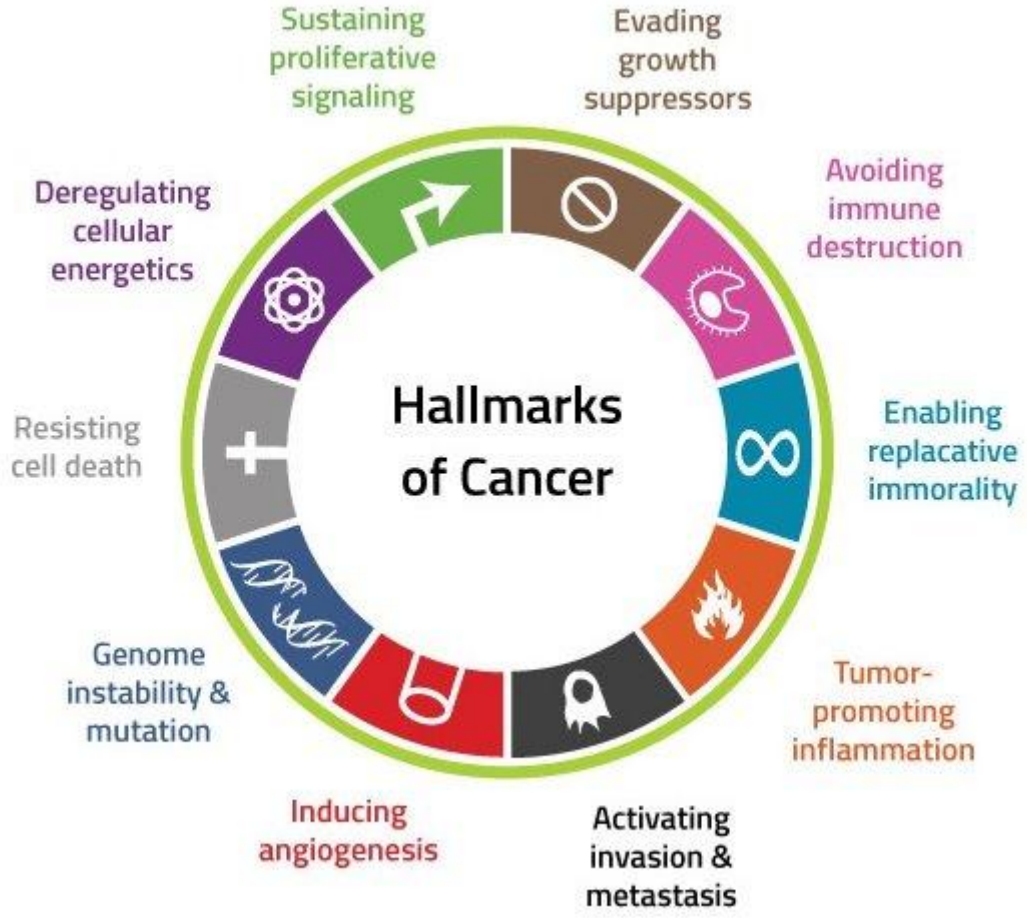
2.1. KANSER

Kanser tek bir hastalık değildir, sayısız endojen veya kanserojen ajanlar veya çeşitli etiyolojik mekanizmaları da kapsayan, farklı doku ve hücrelerde gelişebilen birçok farklı hastalık topluluğudur.(23).

Kanser hem çevresel hem de kalıtsal etkenlerden kaynaklı, çok genli, çok faktörlü ve çok basamaklı (Şekil-1) gelişim gösteren bir hastalıktır (23,24).

Bu hastalık durumlarının hepsinin ortak noktası, düzensiz (klonal) hücre büyümesi, hücrel farklılaşmayı bozma, invazivlik ve metastatik potansiyel dahil olmak üzere tümörleri oluşturan hücrelerin bazı biyolojik özellikleridir (25). En basit haliyle, kanserin genetik bir hastalık veya daha doğrusu anormal gen ekspresyonu hastalığı olduğu artık bilinmektedir.

Kanserin gelişmesinde önemli role sahip olan genler “Kanser Genleri” adlanır ve üç kısma ayrılır: 1. *Proto-onkogenler*: hücre büyümesi ve bölünmesini başlatan ve sürdüren, hücre programlanmış ölümünü baskılayan proteinleri üreten genlerdir. 2. *Tümör baskılayıcı genler*: Tp53 gibi büyümeyi baskılayan ya da hücre ölümünü çoğaltarak tümör büyümesini engelleyen genlerdir. 3. Mutasyonla inaktivasyon neticesi bu iki grubun mutasyon hızını arttıran *Genom Kararlılık Genleri*. Bu genler, DNA onarımını, kromatin bütünlüğünü koruyan ve düzenleyen genlerdir (27,28).



Şekil 1. Kanser hem çevresel hem de kalıtsal etkenlerden kaynaklı, çok genli, çok faktörlü ve çok basamaklı gelişim gösteren bir hastalıktır

2.2.Onkogenler

Onkogenler başlangıçta tümör kaynaklı virüslerde keşfedilmiştir. Daha sonra büyüme düzenleyici proteinleri kodlayan hayvan konak hücrelerinde, protoonkogenlerde, genlere benzer veya bunlardan türetilmiş olarak bulunmuştur (29).

Viral enfeksiyonlar sırasında bir protoonkogenin DNA sekansı bazen virüs tarafından kopyalanır ve genomuna dahil edilir. Viral enfeksiyon döngüsünde genin kesilmesi veya mutasyona uğramasıyla hata oluşur (30).

Bu viral onkojen, sonraki bir enfeksiyon esnasında konakçı hücresinde eksprese edildiğinde, anormal protein ürünü, bazen bir tümöre neden olan hücre büyümesinin normal düzenlenişine müdahale eder. Proto-onkogenler, viral bir aracı olmadan onkogen olabilirler. Kromozomal yeniden düzenlemeler, kimyasal maddeler ve radyasyon, onkojenik mutasyonlara neden olur. Onkogenleri üreten mutasyonlar genetik olarak baskındır.

Onkojenik defekt, "bölme" sinyalini ileten proteinlerden herhangi birinde olabilir. Salgılanan proteinleri, büyüme faktörleri, transmembran proteinleri (reseptörler), sitoplazmik proteinleri (G proteinleri ve protein kinazları) ve hücre bölünmesi için gerekli genlerin sentezlenmesini kontrol eden nükleer transkripsiyon faktörleridir (31).

G proteinlerinin mutant formları Ras tümör hücrelerinde sık görülür. Ras onkogenine, normal GTP bağlanmasına rağmen GTPaz aktivitesi olmayan bir proteini kodlar. Bu nedenle mutant Ras proteini, normal reseptörler vasıtasıyla gelen sinyallere bakılmaksızın aktive edilmiş (GTP'ye bağlı) olur. Sonuç düzensiz büyüme olabilir. Ras'daki mutasyonlar akciğer ve kolon kansinomlarının % 30 - %50'sinde, pankreatik kansinomaların % 90'ından fazlasında görülür (32).

2.2.1.Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör süpresör genleri normalde hücre bölünmesini sınırlayan proteinleri kodlar. Bu genlerden birinde veya daha fazlasında mutasyon oluşumu tümör oluşumuna neden olabilir. Tümör süpresör genlerindeki bozukluğa bağlı düzensiz büyüme, onkogenlere bağlı olmadığından genetik olarak resesifleşir (33).

Bir doğru kopyası ve bir de hatalı kopyasının genetik olarak aktarıldığı bir kişide her hücre genin birisinde arızalı kopyasını taşır. Bu 1012 somatik hücreden herhangi biri mutasyon geçirirse, tümör mutant hücrelerin birinden gelişebilir. PRb, p53 veya p21 için genlerin her iki kopyasında da mutasyonlar, hücre bölünmesine karşı normal sınırlarının kaybolduğu bir tümör hücresi oluşur (34).

Retinoblastom, iki bozuk Rb alleli olan çocuklarda görülen retina kanseridir. Retinoblastom gelişen küçük çocuklarda genellikle iki gözde de birden fazla tümör taşır. Her tümör, Rb geninin bir kopyasında mutasyon geçiren tek bir retinal hücreden türemiştir.

Çoklu tümörlerin açıklamaları Rb mutasyonu ile ilişkilidir. Somatik hücrelerinde, hatalı kopya p53 ile doğan bir kişi yaşamında birkez daha hatalı p53 mutasyonu geçirmesi muhtemeldir. Bazı kanserlerde normal bir hücreden malign bir tümöre doğru ilerleme bazen hiçbir şeyin nihai etkiden sorumlu tutulamayan bir mutasyon birikimini gerektirir (35).

Onkogenlerdeki ve tümör süpresör genlerindeki mutasyonlar bazen on yıllarca hiçbir etkiye sahip olmazlar. Örneğin, kolorektal kanserin gelişimi her biri mutasyona eşlik eden bir seri aşamayla gerçekleşir. Eğer kolondaki normal bir epitel hücresi, tümör süpresör APC geninin (adenomatöz polipozis coli) her iki kopyası da mutasyona uğradığında, normalden daha hızlı bölünmeye başlar ve benign bir polip (erken adenom) olan bir klon üretir. Henüz bilinmeyen nedenlerle dolayı APC mutasyonu kromozomal instabilite ile sonuçlanır. Bir kromozomun tüm bölgeleri, hücre bölünmesi sırasında kaybolur veya yeniden düzenlenir. Bu istikrarsızlık, klonu bir ara adenoma dönüştüren, genelde ras'da başka bir mutasyona neden olabilir. Üçüncü bir mutasyon (muhtemelen tümör süpresör geni DCC'de) geç bir adenoma neden olur. Ancak p53'ün her iki kopyası hasarlı hale geldiğinde malign kanser haline gelir. Dolayısıyla, tam sekans, üç tümör baskılayıcı genin her ikisinde (APC, DCC ve p53) en az yedi genetik "vuruş" ve bir protoonkogen ras üzerinde de bir tane olmasını gerektirir (36).

Kolorektal kanser farklı yollarla gerçekleşir ancak tam malignitenin gerçekleşmesi birden çok mutasyondan kaynaklandığı prensibi muhtemelen en geçerli olanıdır. Erken adenoma aşamasında bir polip algılanırsa ve ilk mutasyonları içeren hücreler cerrahi olarak çıkarıldığında, geç adenomlar ve karsinom gelişmeyecektir; dolayısıyla erken tespitin önemlidir (37).

2.3.KOLOREKTAL KANSER

KRK, bir seri olarak moleküler değişimler sonrası meydana çıkan ve normal mukozadan tek bir kriptin epitel hücresinde değişikliklere meruz kalmasından oluşmaya başlayan, iyi huylu tümörlerden (polipler), adenokarsinomlara (kötü) kadar çok basamaklı ve değişik morfolojiye sahip olan bir olgudur (38).

2.3.1.KOLOREKTAL KANSER ETİYOLOJİSİ

Epidemiyolojik çalışmalar kolorektal kanserin etyolojisine ipucu verirken, epidemiyolojik kalıpların ve belirgin korelasyonların neden ve sonuç ilişkisi yoktur. Diğer kanser türleri gibi, kolorektal kanser çok faktörlüdür ve karsinogenezin iki aşamalı modelini izler (38).

Bu modele göre, kanser bir dizi olayla gerçekleşir, tek bir sebepten dolayı değildir. Bu modeldeki iki aşama, başlatma ve tanıttır. İnisiyasyon, normal hücreyi potansiyel bir kanser hücresine dönüştüren, genetik mutasyon üreten ve geri dönüşü olmayan bir şekilde kanserojene maruz bırakır. Promotion, genellikle kanserojen olmayan ve kendi kendine ajanlar içermeyen ancak başlatılan hücrelerde tümör üretimini teşvik eder. İlerletici ajanların etkileri, uzun süreli veya tekrarlara maruz kalmaya bağlıdır. Bazı maddeler, yükseltici ajanların etkilerini inhibe etmek için harekete geçebilir (39).

2.3.2.KOLOREKTAL KANSER EPİDEMİYOLOJİSİ

Kolorektal kanser, üçüncü en sık rastlanan kanserdir ve dünyada ölümün dördüncü en yaygın kanser nedenidir ve yılda yaklaşık 1-2 milyon yeni vaka gözlenirken ve 600 000 ölüme neden olur (40).

İnsidans, 50 yaşın altındaki yaşlarda düşüktür, ancak yaşlarda artmaktadır. Gelişmiş ülkelerde teşhise göre medyan yaşı 70 yıldır. En yüksek insidans, Avrupa, Kuzey Amerika ve Okyanusya ülkelerinde bildirilirken, insidans, güney ve orta Asya ve Afrika'nın bazı ülkelerinde en düşüktür (41).

2008 yılında, bölgeye göre tahmin edilen yaş standartlı insidans, orta Afrika'da 100 000 kişi başına 4.03 vaka, Avustralya ve Yeni Zelanda'da erkeklerde 100.000'de 45.7'dir ve kadınlarda aynı bölgede 100 000 kişi başına 33.3'ten 100.000'e 33.0'e çıkmıştır. Bununla birlikte, İspanya ve doğu Avrupa'da ve doğu Asya'daki birkaç ülke gibi düşük risk taşıyan ülkelerde, beslenme kalıplarında ve sözde batı yaşam tarzına yönelik risk faktörlerinde meydana gelen değişikliklerden kaynaklanan hızlı artışlar kaydedildi. Bununla birlikte, ABD'de ve diğer birçok yüksek doğum oranı olan ülkede, sigmoidoskopi ve polipektomi ile kolonoskopi kullanımlarının artması nedeniyle insidans stabilize olmuş veya azalmaya başlamıştır (42,43).

2008 yılında, orta yaş grubundaki 100 000 kişide, yaş ve standardize edilmiş ölüm mortalitesi, orta ve doğu Avrupa'da erkekler için 20.1'e, kadınlarda aynı bölgede 2,7 ila 12.2 oranındadır (44).

Yüksek gelirli ülke ve doğu Asya ve doğu Avrupa ülkelerinde, erken teşhis ve tedaviden dolayı 1980'lerden beri mortalite azalmaktadır. Ancak bazı ülke veya bölgelerde oranlar artmaya devam etmektedir. Orta ve Güney Amerika ülkeleri ve Çin'deki kırsal alanlar dahil olmak üzere sağlık ve bakım kaynakları bakımından eksiktir (45).

2.4.EVRELEME

Kolorektal kanserler, lokal invazyon derinliğine (T evresi), lenf nodu tutulumuna (N evre) ve uzak metastaz varlığına (M evresi), (Tablo 1) göre sınıflandırılır. Bu aşamalar, terapötik kararların temelini oluşturan genel bir tanımlamayla yapılır.

TNM'ye ve Uluslararası Kansere Karşı Birlik Örgütünün (UICC) evresine göre sınıflandırma değerli prognostik bilgi sağlar ve tedavi kararlarını yönlendirir. Bu özellikle UICC evre II ve III kolorektal kanserli hastalar için bir dezavantajdır. UICC evre III hastalar ve ek risk faktörleri olan Evre II hastalar için adjuvan kemoterapi önerilir; Bununla birlikte, bu hastaların önemli bir bölümünde kemoterapiden fayda görmemektedir. Geliştirilmiş bilgilendirici belirteçler, adjuvant tedaviden fayda sağlayabilecek nüks riski yüksek olan hastaların belirlenmesine yardımcı olabilir.

2.5.PROGNOSTİK FAKTÖRLER

Genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım üzerine etkisi olan birçok faktör tanımlanmış olduğuna rağmen hiçbir faktör tümör evresi kadar prognostik öneme sahip değildir. Hastalarda beş yıllık sağkalım oranları TNM sistemindeki evrelerine göre değişmektedir. Evreye göre 5 yıllık sağkalım oranları rektum ile kıyaslandığında kolon kanserinde daha iyidir. Kolon kanserinde 5 yıllık sağkalım oranları evre-1'de %93, evre-2'de %72-85, evre-3'de %44-83 ve evre-4'te %8 iken, bu oranlar rektum kanserinde sırası ile %72, 52, 37 ve 4'tür (47).

Amerika patoloji derneği kolorektal kanserlerde prognostik ve prediktif olduğu varsayılan faktörleri ve değişkenleri birden dörde kadar ayırmışlardı (48).

Birinci kategori: yayınlanmış çalışmalarda birçok kanıt temelinde tanısal anlamı ispatlanmış, istatistiksel olarak sağlam ve hasta yönetiminde genel olarak kullanılan faktörler olarak tanımlandı. Güncel evrelemedeki TNM sistemi kategori-1 olarak sınıflandırılmış. Ek olarak kan ve lenf damar invazyonu, küratif olarak yapılan cerrahi ve operasyon öncesi CEA yüksekliği bu kategoride yer almaktadır.

Kategori-2A: Bu kategoriye tümör evresi, peritoneal yüzeyi içermeyen cerrahi materyalin sınır durumu ve neoadjuvant tedavi sonrası tümör kalması girer. Hazırlanan patoloji raporlarında olması önemlidir, fakat istatistiksel olarak daha sağlam çalışmalarla doğruluğu test edilmeli gereken faktörler olarak tanımlandı.

Kategori-2B: kategori-1 veya kategori 2A kapsamına göre yetersiz. Kategori-2B'ye; histolojik tip, MSI ile ilişkili mikroskopik özellikler, yüksek derece MSI (MSI-H), onsekizinci kromozomun küçük kolunun heterozigositesinin kaybı (kolon kanserinde kaybolmuştur) ve en son olarak tümör sınırının değişimleri.

Kategori-3: prognostik değeri belirlemede yeterince çalışılmamış faktörler bu kategori'ye dahildir. 18q heterozigositesinin kaybı ve MSI-H haric diğer DNA üzerinde moleküler belirteçler, peritonda oluşan invazyon, ince damarların dansitesi, tümör ile ilişkili protein ve karbonhidratlar, tümör çevresinde oluşan fibroz ve mikro tümör inflamatuvar yanıtlar.

Kategori-4: Bu kategoriye çok çalışmada gösterilmiş ama kabul edici tanısal anlam gösterilememiş faktörler dahil ediliyor. Tümörün çapı ve tümör kitlesinin değişimleri kategori 4'ü oluşturmaktadır.

2.6.Kolorektal kanser TNM sınıflaması

Tablo 1. TNM sınıflaması

T-Primer Tümör			
Tx Primer tümör saptanmadı			
T0 Primer tümör kaniti yok			
Tis In situ karsinom (intraepitelyal yada lamina propria invazyonu)			
T1 Submukozayı invaze eden tümör			
T2 Muskularis propriayı invaze eden tümör			
T3 Muskularis propriayı invaze edip subserozda veya peritonel olmayan perikolik ya da perirectal doku da tümör			
T4 Diğer organ ya da yapılara direct invazyon yada visseral peritonun perfore olması			
N- Bölgesel Lenf Nodu			
Nx Bölgesel lenf nodu değerlendirilemedi			
N0 bölgesel lenf nodu metastazi yok			
N1 1-3 lenf nodu metastazi			
N2 4 yada daha fazla lenf nodu metastazi			
M- Uzak Metastaz			
Mx Uzak metastaz değerlendirilemedi			
M0 uzak metastaz yok			
M1 Uzak metastaz var			
Evrelendirme	Primer Tümör	Lenf Nodu	Metastaz
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1, T2	N0	M0
Evre IIa	T3	N0	M0
Evre IIb	T4	N0	M0
Evre IIIa	T1, T2	N1	M0
Evre IIIb	T3, T4	N1	M0
Evre IIIc	Herhangi bir T	N2	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

2.7.Kalıtsal Risk Faktörleri

Kolorektal kanserler için genetik faktörler oldukça önemlidir. KRK çoğu bir seri somatik mutasyon sonucunda oluşmaktadır. Kolorektal kanserler bir seri genetik ve hücrel malign gelişimi açısından ayrıtılı olarak araştırılmıştır. Benign tümörlerin gelişimiyle malign tümörler oluşmaktadır.

Hereditær Non Poliposis Kolorektal Kanser (HNPCC): Daha önce 'Lynch sendromu' olarak bilinen HNPCC varyantının kalıtsal sendromları, kolorektal kanser gelişimine neden olmakta ve toplam vakaların% 3'ünü oluşturmaktadır. Aynı ailedeki erkek ve bayandan eşit

olarak otozomal ve dominant olarak nesilden nesile genetik olarak aktarılır. Lynch sendromu ile ilişkili olan kanserler, çekum veya sağ kolonu etkilemekte ve % 40 sporadik olan vakaların % 70'ini oluşturmaktadır. Poliplerde veya adenomlarda geniş veya düz olarak görünürler, yüksek dereceli displazi ve DNA onarımı genlerinde kalıtsal mutasyona sahiptir.

MSH2 ve MLH1 genlerin toplamının % 90'ını oluşturan vakalarda sık görülürken MSH6 geninin mutasyonları olan vakalarda nadiren karşılaşılır. Bu genlerin hastalarda inaktivasyonu, FAP polipozisi olan hastalarda olduğu gibi belirlenme yaşı ortalama 45, tekrarlayan sekanslarda veya mikrosatellit değişikliğe neden olur.

Adenom oluşum sıklığı normal popülasyonunkine benzerdir ancak MMR genlerinin değiştirilmesinden dolayı mutasyon oranı iki ila üç kat daha fazladır ve bu durumun daha büyük bir birikimiyle sonuçlanır ve malignite yönünden daha hızlı ilerler.

İki tip HNPCC klinik olarak tanımlanır: Tip I'de tümörler sadece kolonda bulunur. Tip II'de ise endometriyum, yumurtalık, karın, hepatobiliyer yol, idrar yolu, pankreas veya merkezi sinir sisteminde bulunan kolonun dışında bulunurlar.

HNPCC kanseri olan hastalar, polipleri daha yaygın olan FAP'lı hastalarla karşılaştırıldığında kısa sürede kötü huylu hale gelebilecek sınırlı sayıda adenom geliştirirler. Bu tümörler lenfositik infiltrasyonlu müsinöz histolojiye sahiptirler ve düşük mikrosatellit instabilitesi olan sporadik tümörleri ile karakteristik olarak kötü diferansiyasyon gösterirlerken aynı zamanda sporadik tümörlerin aksine diploid tipte tümörler de vardır.

Aynı zamanda, HNPCC tümörleri APC, β -katenin (CTNNB1) veya KRAS mutasyon varlığı konvansiyonel adenomların bazı özelliklerini göstermektedir.

Ailesel adenomatöz polipozis: FAP, CRC'lerin yüzde birinden sorumludur ve egemen otozomik özelliklere sahip kalıtsal bir hastalıktır.

Başlıca klinik bulgusu, 100'ü aşan çoklu kolonik ve rektal adenomların varlığıdır ve FAP polipozis tanısını gösterir. Bu adenomlar arasında, genellikle duodenal adenomlar, fundik bez

polipleri veya kemik, subkutanöz ve desmoid tümörler ile ilişkili klinik bulguları sunarken, 40 yaşından önce neredeyse sabit bir şekilde bir veya daha fazla malign hale gelecektir.

FAP'lı ailelerin genetik çalışması, kromozom 5q21 üzerinde bulunan ve 'anlamsız mutasyonlar', 'çerçeve kayması mutasyonlar' ve 'yanlış anlamlı mutasyonlar' olarak adlandırılan farklı tipte erken mutasyona uğramış olan sorumlu APC geninin tanımlanmasına izin vermiştir.

FAP polipozisi, hem germline hem de organizmanın dokularının tümünde bulunan iki allelden birinin mutasyonu ile ilgilidir. CRC hücrelerinde, iki allelden biri kaybolabilir veya somatik bir mutasyon görülebilir.

Bu gen, sporadik kanser vakalarının % 60'ında aynı mutasyon olduğunu gösterir ve FAP'da görülen mutasyonların sporadik mutasyon formları olduğunu gösterir. Bu problem için de APC geni promotör bölgesinin hipermetilizasyonu olabilecek farklı mekanizmanın gen transkripsiyonunda bir azalmaya neden olabileceği düşünülmelidir.

Neoplastik hastalıklara yakalanma eğiliminin nihayetinde spesifik genlerin ekspresyonunu modifiye eden endojen ve eksojen faktörlere bağlıdır.

Metilize edilmemiş veya hipometillenmiş genler, bir protein ürünü üretmek üzere transkribe olurken metillenmiş genlerin inaktif olduğundan dolayı belirli bir allelin ekspresyon eksikliği veya farklı ifadesini açıklayabilir. CRC ile ilişkili epigenetik fenomen, DNA dizilimindeki değişimleri içermez ancak genomik instabilite görülen reversibl genetik modifikasyonlar içermektedir.

Hamartomlar iyi huylu tümörlerdir ve hücreler orijinal dokulardan dağınık biçimde büyürler. Hamartomatöz polipozis sendromları juvenil polipozis sendromu (JPS) ve Peutz-Jeghers sendromu (PJS) çeşitli maligniteler için artmış risk ile ilişkilidir.

JPS, otozomal dominant bir durumdur. Juvenil polipozisdeki 'juvenil' kelimesi, hasta yaşı değil, polip histolojisini ifade eder. Juvenil polipozis tanısı en az üç juvenil polip, Bir sindirim sistemi boyunca juvenil polipozis veya juvenil poliplerin bulunduğu bir aile öyküsüdür. JPS insidansı 1:15 000-1: 50 000'dir Çocukluk polipozisi olan çocuklar rektal kanama, anemi, tıkanıklık veya abdominal ağrı, yaşları ise 4 ile 14 yaşları arasında olabilir. JPS'li bireylerde CRC (% 39-68) ve ince bağırsak, mide ve pankreas kanseri (% 21) riski artar.

JPS'de 15 yaşından itibaren her 2 yılda bir kolonoskopi ve 25 yaşından itibaren her 2 yılda bir üst gastrointestinal endoskopi yapılmalıdır. PJS olan asemptomatik bireylerde kanser taraması 30 yaşından itibaren başlamalı ve en az üç yıllık gastroduodenoscopy, kolonoskopi ve video kapsül endoskopisi veya baryum takip veya manyetik rezonans endoskopi uygulanmalıdır. PJS'li kadınlara önerilen yıllık olarak meme MR ve 30-50 yaş arası bilateral mamografi ± ultrasonografi, mamografi ve 50 yaşın üzerindeki klinik meme muayenesi uygulanmalıdır.

2.8.Çevresel Faktörler

Alkol alımıyla CRC arasındaki ilişki, geleneksel karsinoma-adenom ile ilgili tümör belirteçleri tarafından ayrı ayrı incelenmiştir

Alkollü içeceklerde asetaldehit insanlar için kanserojen ve toksik bir maddedir. Araştırmacılar, APC mutasyonları riski ile ilişkili olarak alkol kullanımı kontrol çalışmalarından birinde alkol alımının sadece APC vahşi tipte tümör riskini arttırdığı bildirilmiştir. 2006'da Bongaerts ve ark. alkolün KRAS geninde mutasyonlar barındıran tümörler ile ilişkili olmadığı sonucuna varmışlardır.

Kırmızı ve işlenmiş et tüketimi, gastrik çevrede mutajenik N-nitrozo bileşikleri (NOC'ler) üretimi yoluyla artan CRC riskiyle ilişkilendirilmiştir. KRK'nin yaklaşık % 50'sinde mutasyona uğramış KRAS, yani NOC aracılı DNA alkilasyonunun karakteristik olan kodonları 12 veya 13'te bir G> A geçişine sahip olduğu bildirilmiştir. NOCs, DNA polimerazına ve uyuşmazlık hatalarına neden olan DNA deaminasyonunu indüklediği ve temel bölgelerin oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir.

Kanıtlar, guanin kalıntılarının adenin ve sitozinden daha fazla N-nitroz deaminasyona daha duyarlı olduğunu düşündürmektedir. Etin yüksek sıcaklıklarda pişmesi heterosiklik aminler (HCA) ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) üretir.

Meyve ve sebzelerdeki bileşikler CRC gelişimine karşı koruma sağlayabilir. Örneğin, turpgil sebzelerden alınan 3,3'-diindolilmetan ve sülforafanın, hücre döngüsü durdurması yoluyla kolon kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Çeşitli klinik öncesi araştırma sonuçları Zeytinyağının CRC'ye karşı koruyucu etkisinin olduğu desteklenmektedir.

2.9.Kalın Bağırsak Anatomisi

Kalınbağırsak suyu sindirilemez içeriklerden absorbe edilen sindirim kanalı içerisinde bulunur Kalınbağırsak çekum, apandiks, tüm kolon, rektum ve anal kanalı içerir.

Terminal ileum çekum ile başlar. İnce bağırsaktan farklı olarak, daha kısa ancak çok daha büyük bir lümen vardır. İnce bağırsaktan farklı omental ekler, haustra ve teniae coli'nin varlığı ile ayırt edilmesidir. Çekum, çıkan kolondaki proksimal cep, ileoçekal kavşak seviyesine uzanır.

Terminal ileum içeriği medial duvardaki çekum içine açılır ve ileoçekal valf bu açıklığı korur. Apendiks, çekum için kör bir ek ile ince silindirik bir organdır.

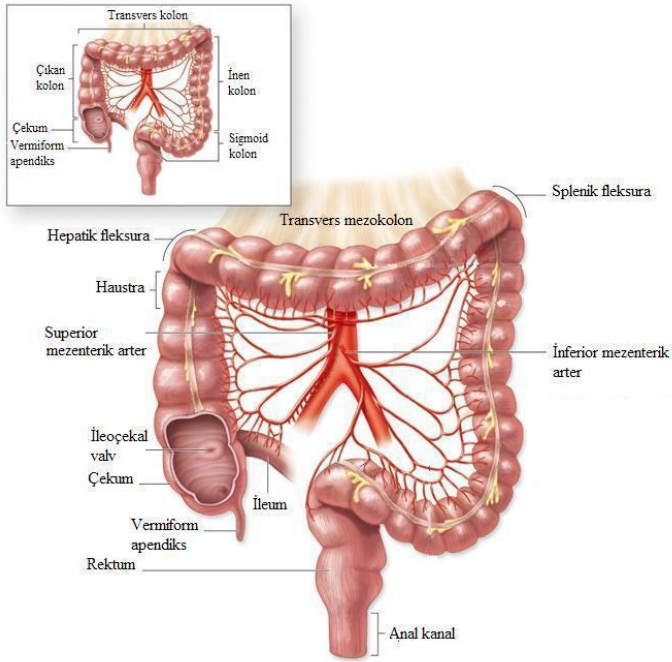
Apendiksin tabanı, ileoçekal kavşağın yaklaşık 1 ila 2 santimetre altındaki çekumun posteromedial duvarında yatar. Apendiks ucu sıklıkla periton boşluğunda yüzer ve geri çekilme pozisyonunda olabilir.

Mezoappendiks olarak adlandırılan kısa bir üçgen mezenter vardır. Çekum, kalın bağırsağın ikinci kısmı artan kolon olarak devam eder. Yukarı çıkan kolon, sağ iliyak fossadan karaciğerin sağ lobuna kadar, karnın sağ tarafında daha iyi çalışır.

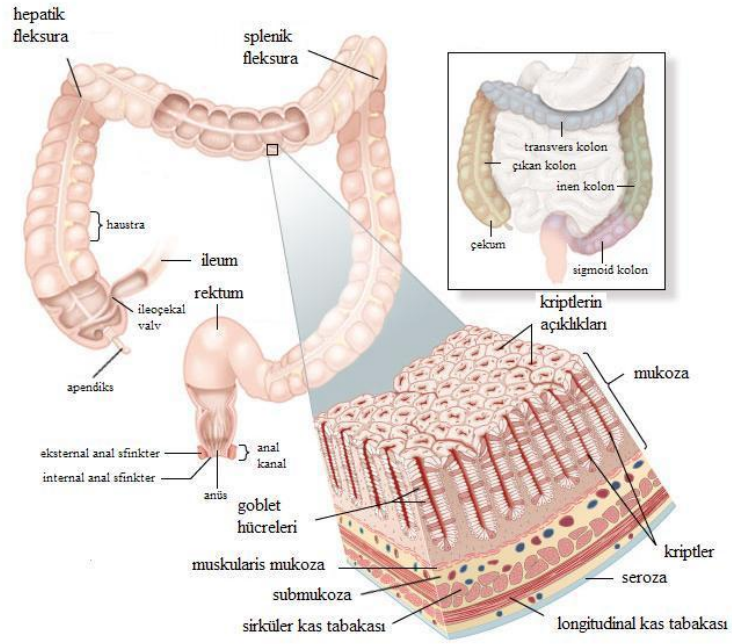
Bu noktada, sağ kolikül fleksiyonunda (hepatik fleksiyon) sola dönüş yapar. Doğru parakolik oluk olarak bilinen parietal periton ile kaplı dikey, dikey bir koridorda bulunur.

Transvers kolon, kalın bağırsağın üçüncü, en hareketli ve en uzun kısmıdır. Sağ ve sol kolik fleksiyonlar arasında bulunur.

Sol koliks fleksiyonu sağdan daha az hareketli ve frenikokolik bağ dokusu ile diyaframa yapışmıştır. Kökünü pankreasın alt sınırı boyunca çapraz mesokolondan alan transvers kolon bir mezenterere bağlıdır.



Şekil 2: kalın bağırsağın anatomisi



Şekil 3. Kolorektumun histolojisi (63)

2.11.KOLOREKTAL KARSİNOGENEZDE MOLEKÜLER YOLLAR

2.11.1.KROMOZOMAL İNSTABİLİTE (“Chromozomal Instability: CIN”) ARA YOLU

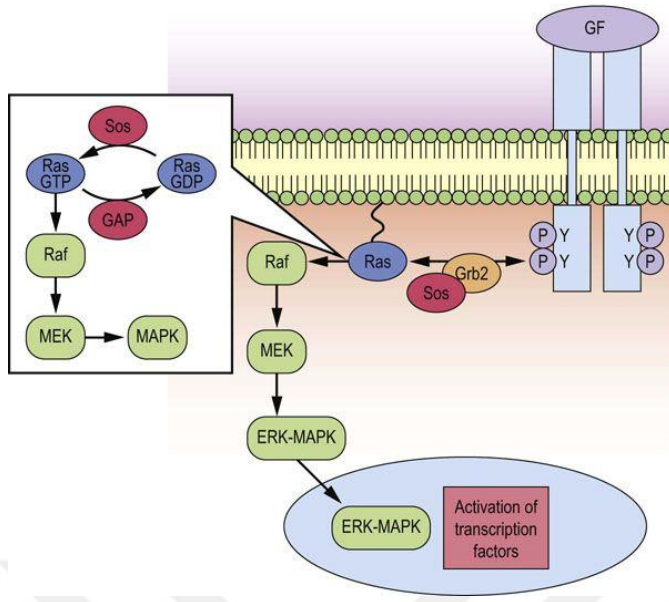
Kromozomal instabilite sporadik CRC'lerin% 65-70'inde görülür.Bu yol kromozom sayısındaki bir dengesizlik olan anöploidiyi ve LOH'yi içerir (64-68).

Bazı onkogen ve tümör süpresör genlerde spesifik mutasyonlar ile birlikte telomerin fonksiyonel işlevi ile birlikte bu dengesizliğe neden olabilir.Kromozomal bozukluklar, DNA hasarı onarımı ve telomere fonksiyonunda bazı onkogenlerde ve tümör süpresör genlerde spesifik mutasyonlar bu tür instabiliteden sorumlu olabilir (69).

Anöploidi, mitotik kontrol noktasındaki kromozomun ayrılma sırasındaki hatalardan dolayı ortaya çıkar. Anöploidideki olumsuz bir artış hücre ölümüne yol açabilir. CENP-A ve CENP-H gibi diğer sentromer protein genleri CRC'lerde aşırı eksprese edilebilir ve bu da setromerik olmayan kromatin pozisyonlarında yanlış konumlanmaya neden olabilir (70-72).

DNA hasar yolundaki bozukluklar ve fazla telomer kırılması kromozomal dengesizliğe yol açabilir. Aşırı telomer kırılması, CRC'lerde adenomdan karsinomaya geçişten sorumludur. Komşu olan normal dokular ile yapılan bir karşılaştırmada, hem adenomatöz poliplerde hem de karsinomalarda daha kısa kromozomların bulunduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar telomer kısaltılmasının başlangıçta dengesizliğe neden olduğunu ifade etmektedir. Ancak, APC genindeki mutasyonlar ve telomeraz aktivitesindeki bir artış metastazı yönlendirir (73-77).

Buna göre LOH, CIN'ye yol açar. LOH, mitotik hatalı ayrılma, iki homolog veya homolog olmayanlar arasındaki rekombinasyonun neden olduğu ebeveyn allellerinden birinin kaybıdır. Homolog olmayan kromozomlarda bir delesyon veya gen dönüşüm olayıdır (78,79).



Şekil 4. Aktif RAS/RAF

2.11.2 MİKROSATELLİT İNSTABİLİTE (MSI) ARA YOLU

Mikrosatellit instabilite, DNA kopyalama hatalarını düzeltmekten sorumlu olan DNA uyuşmazlığı onarım genlerinde mutasyonların inaktive edilmesiyle oluşur. Bu proteinleri işlevsiz hale getirecek olan germline mutasyonlar, LS durumunda olduğu gibi kansere de zemin hazırlayabilir (80).

MSI, kolorektal kanserlerin % 15'inde, % 3'de de LS ile ilişkili olarak bulunmuştur (81-83).

Geri kalanlar, MLH1 gen promotörünün hipermetilasyonunun neden olduğu sporadik vakalardır. 1997'de Ulusal Kanser Enstitüsü, beş işaretli MSI panelinin onaylandığı bir çalıştay düzenledi. Göstergelerin $\geq$ % 30'unda instabiliteye sahip tümörlere, MSI-yüksek (MSI-H) denir. < % 30'luk oranda olanlara MSI-düşük (MSI-L), mikrosatellit dengesizliği olanlarına MSI kararlı (MSS) denir (84-85).

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

Global DNA hipometilasyonu ve lokalize promotor hipermetilasyonu kanserde ortaya çıkan epigenetik olaylardır.

Hipometilasyon, hiperplastik ve adenomatöz poliplerde ve karsinomlarda gözlenen sitozin bazlarında metilasyonda gözle görülür azalma gözlenir. Satellite bölgelerindeki gibi tekrarlayan DNA dizilerinde hipometilasyon, genetik istikrarsızlığa neden olabilir (86).

Baskı veya promotör demetilasyon kaybı, retrotranspozonları yeniden aktif hale getirebilir. Aralardaki uzun sepilmiş olan nükleer element promotörünün demetilasyonu erken olarak önerildi. Bununla birlikte, aynı hastaların normal kolon mukozasında demetilasyon gözlemlenmiştir. İnsülin benzeri büyüme faktörü 2'nin (IGF2) baskı kaybı CRC tümörlerinin yaklaşık % 40'ında görülür ve bu da küçük yaştaki hastalarda microsatellit insatabiliteye neden olur. Destekleyici bölgedeki CpG Adası (CGI) hipermetilasyonu, tümör baskılayıcı rollere sahip olan veya hücre döngüsünde yer alan genlerin transkripsiyonel inaktivasyonu ile sonuçlanır (87,88).

BRAF genindeki mutasyonlar, CIMP tümörlerinde erken görülmektedir. BRAF V600E mutasyonu, MLH1 hipermetilasyonu ile güçlü bir korelasyon gösterir. Seçilmemişlerde % 20.3, sporadik vakalarda % 18.7 görülme sıklığına sahiptir. Başka bir çalışma, MSI-H sporadik CRC'nin % 80'inde MLH 1 hipermetilasyonunu, ekspresyon kaybıyla ve MMR genlerinde bilinen bir germline mutasyonu olmaksızın doğrulanmıştır.

Hipermetilatlı promotorler BRAF mutasyonları ile ilişkilidir. Toplam 759 hipermetilatlı bölge bulunmaktadır. Bu bağlı olarak, bu bölgelerin % 96'sı BRAF mutant tümörlerinde görülür. Bunların arasından, 229 bölge, Wnt sinyalleme, hedgehog sinyalleme, bZip transkripsiyon regülasyonu, PI3 kinaz ve IGF-protein kinaz B sinyal yolları gibi beş farklı yolu güçlendiren yükseltici bölgelerde lokalizedir.

Erken Wnt sinyalizasyon aktivasyonu, CIN tümörlerinde APC mutasyonlarıyla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, Wnt antagonistlerinin promotor hipermetilasyonu, sonraki aşamalarda Wnt aktivasyonunda rol oynadığını düşündürmektedir. Hipermetillenme, adenoma geçişinde normal olan yedi gen promotöründe ve adenomdan karsinomaya kadar olan bu yedi genin dördünde kaydedilmiştir (89).

2.12.HEDEFE YÖNELİK TEDAVİ YAKLAŞIMI

CRC, dünya çapında kanser mortalitesinin önde gelen üçüncü sebebidir ve CRC hastaları için prognoz doğrudan tanı süresine bağlıdır.

Erken tespit edildiğinde, genellikle cerrahi ile tedavi edilir. Daha ileri veya metastatik hastalıklar için cerrahi tedaviye kemoterapi eklenir.

Şimdiye kadar tarif edildiği gibi, moleküler seviyedeki birçok değişiklik CRC başlangıcını, progresyon ve metastaz. Kanserle ilgili mutasyonların moleküler karakterizasyonu hastalık prognozu ve tedaviye yanıt hakkında değerli bilgiler verir. CRC'de prognostikasyon için güncel klinik yöntemler Amerikan Kanser Komitesi (AJCC) TNM evreleme sınıflandırması. Gerçek hayatta, TNM evresi ile prognoz arasındaki ilişki çok daha karmaşıktır, çünkü her kanser evresi aynı zamanda heterojen bir gruptur.

NGS teknolojisinin ortaya çıkması, kanserlerin daha iyi, hızlı ve aynı zamanda daha ucuz moleküler karakterizasyonuna izin verdi. Bununla birlikte, klinik olarak ilgili biyolojik belirteçler, kodlayıcı DNA'daki mutasyonlardan, spesifik aktivite testleri tarafından bulunan işlevsiz proteinlere kadar çeşitli yollarla ölçülebilir.

Kolon kanseri araştırmalarında önemli ilerleme kaydedilmesine rağmen, genetik bulguların kolon kanseri hastaları için tanısal testlere dönüşümü zor ve mutasyonların çoğunun işlevi belirsizliğini koruyor. Günümüzde MSI durumu ve EGF sinyal yolağı da dahil olmak üzere prognostik ve / veya terapötik prediktif belirteçler olarak klinik bir değere sahip olmaya başlayan genetik biyolojik belirteçler az sayıdadır.

MSI'nın ilerlemiş prognoz ile ilişkili olduğunu, ancak 5-FU'ya dayalı kemoterapiye yanıtın azaldığını gösteren güçlü kanıtlar vardır EGF sinyali ile ilgili olarak, EGFR'ye, setuksimab'a ve panitumumab'a karşı iki monoklonal antikor piyasada mevcuttur.

5-FU, lökoverin ve oksaliptatin ile kombinasyon halinde kullanımları onaylanmıştır. (FOLFOX) ya da 5-FU, lökoovin ve irinotekan (FOLFIRI) ile evre I V metastatik CRC.

Ne yazık ki, bu rejimlerin etkinliği% 8-25 objektifle mütevazı kalmaktadır CRC'de bulunan büyük Ras / Raf mutasyon oranı nedeniyle yanıt oranları PTEN değişiklikleri ve PI3KCA mutasyonlarının da aynı etkiyi sağladığı öne sürülmüştür. Kişiselleştirilmiş

bakıma yönelik NGS uygulaması ile, sporadik kolorektal kanserlerin moleküler karakterizasyonu artan önemi varsaymaktadır.

Bununla birlikte, Kras, Braf ve MSI, klinik uygulamada zaten rutin olarak kullanılmaktadır. CRC yönetiminde PTEN ve / veya PI3KCA belirlenmesinin tanı, prognostik ve prediktif moleküler biyobelirteç olarak geliştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca GSK-3β'nın, kolorektal kanser tedavisi için moleküler sinyal yolağı çapraz-konuşma ve EMT düzenlemesindeki merkezi rolünü göz önünde bulundurarak ilginç bir hedefi temsil edebileceğini de öneriyorlar.

2.12.1. Kolorektal Kanserde Anti-EGFR Tedavisi

EGFR'nin kanserin ilerleyişindeki rolü açıklandığından beri bu reseptöre hedefe yönelik geliştirilen antikorlarla, EGFR, umut verici bir molekül haline gelmiştir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar göstermiştir ki, EGFR'ı engelleyerek ona bağlı olan sinyalin kesilmesi, tümör hücrelerinde büyümenin engellenmesine yol açmaktadır ve bu şekilde kansere maruz olan hastalarda iyileşme gözlenmektedir (90,91).

EGFR yolağının aktifleşmesine genel olarak 3 basamak tanımlanmıştır. Birincisi özel etken moleküllerin EGFR'nin ekstraselüler bölümüne bağlanmasıdır. Ardından bu yapısal değişiklik sonrası diğer bir reseptör ile dimer oluşturmaya sebep olmasıdır. Alt yolaklarının aktifleşmesi hücre içi bölümlerin kalıntılarından fosforile olmasına yol açır. Bu reseptörün fosforilasyonu RAS-MAPK, PI3K-Akt alt yollarını içeren sinyal basamaklarını başlatır. EGFR'nin indüklediği bu sinyal yolları, gen transkripsiyonu, hücre siklusu, hücre çoğalması, hayatta kalma, damarlanma, migrasyon ve invazyonu (Şekil, 5) kontrol etmektedir (90,92).

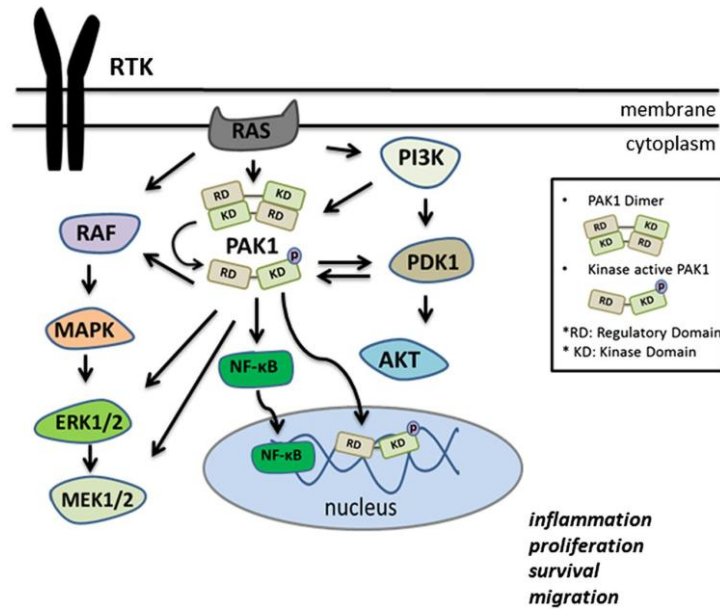
Uygulanan anti-EGFR ilaçlarının 2 tipi mevcuttur; birincisi anti-EGFR monoklonal antikorlarıdır. Bunlar, EGFR'nin ekstraselüler domainine bağlanır ve EGFR ın doğal ligandı ile rekabet eder. İkincisi ise, EGFR tirozin kinazlarının küçük molekül inhibitörleridir. Bunlar tirozin kinazlar ile bağlanmak için ATP üzerinde rekabet eder ve EGFR tirozin fosforilasyonunu engeller. Böylece, "alt yolak" sinyal yolları baskılanır (92).

Cetuximab ve Panitumumab ve iki küçük molekül EGFR tirozin kinaz inhibitörü Gefitinib ve Erlotinib, KRK, metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu ve pankreatik kanser tümörlerin tedavisinde kullanılır (90).

İleri evre kolorektal kanserli hastaların birinci seri tedavide FOLFİRİ ve FOLFİRİ cetuximab ile birlikte karşılaştırıldığında, KRAS yabanıl grubunda tedaviye cetuximab eklenmesi ile anlamlı genel sağ kalım ve hastalıksız sağ kalım artışına neden olarak KRAS mutasyonu olanlarda cetuximabın tedaviye eklenmesi ek katkı sağlamamıştır. KRAS mutasyonunun prediktif değeri OPUS (91) (FOLFOX ve FOLFOX+cetuximab) ve NCIC CO17 (92) (cetuximab versus en iyi destek tedavisi) çalışmalarında da onaylanmıştır.

FOLFOX kemoterapisine panitumumabın eklendiği faz-3 çalışmada K-RAS yabanıl hastalarda panitumumab alan grupta, progresyonsuz sağkalımda istatistiksel olarak artış (9,6 vs 8 ay; p:0.02) gözlenmektedir. Cevap oranları bu çalışmada %48'den %55'e artmıştır. KRAS mutant hastalarda ise panitumumab kolda sonuçlar istatistiksel anlamlı olarak (8,8 aydan 7,3 aya) daha da kötü görünmemektedir (93).

Cetuximab veya panitumumab başlanması planlanan metastatik hastalarda KRAS mutasyon durumunun belirlenmesi ve sadece KRAS mutasyonu olmayanlarda kullanılması önerilmektedir (94).



Şekil 5. RAS/RAF ve PI3K ilişkisi

2.13.KRAS ve NRAS

RAS ailesi yüksek dereceli dizi özdeşliği olan üç izoform (H-RAS, K-RAS ve N-RAS) içermektedir (98).

Tüm RAS proteinleri, aktif bir GTP'ye bağlı konformasyon ve inaktif bir GSYİH'ye bağlı konformasyon arasında döngü yapar. RAS sinyalleme kaskadı, hücre proliferasyonunu kontrol eden önemli bir yol oluşturur ve RAS proteinleri, çeşitli reseptör türlerinden hücre dışı sinyalleri entegre edebilir. RAS'ın aşağı yönünde sinyal iletiminde birkaç efektör bulunur.

Klasik yol üç ardışık aktive kinazın evrimsel olarak korunmuş bir modülünden oluşur: RAF, mitojenle aktive protein kinaz kinaz (MAPKK veya MEK) ve mitojenle aktive protein kinaz (MAPK).

RAS için bir başka efektör, hücre sağkalımının arttırılmasında rol oynayan AKT / PKB yolağını düzenleyen fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) 'dir. Hücrel çoğalmayı düzenleyen RAS'ın önemi,% 50 kadar kolorektal kanser de dahil olmak üzere tüm insan kanserlerinin yaklaşık üçte birinde K-RAS'ın aktive edici mutasyonlarının varlığı ile gösterilmiştir. Üstelik, vahşi tip K-RAS'lı kolorektal tümörlerin% 20'si B-RAF'da aktive edici mutasyonlar taşımaktadır (99,100).

K-RAS ve B-RAF arasındaki mutasyonların tamamlayıcısı, kolorektal kanser patogeneğinde RASRAF-MAPK yolağında merkezi bir rol oynar. Bu sonuç, bağırsak epitelinde onkojenik K-RAS'ın hedefe yönelik ekspresyonunun farelerde spontan tümörojeneze neden olabileceği gözlemiyle desteklenmektedir (101).

2.14.BRAF

BRAF, *RAS/RAF/MAPK* kinaz sinyalinde vasite olarak görev almaktadır. Bu konuda var olan araştırmaların sonucu olarak *BRAF* mutasyonu varlığında *KRAS* normal olsa bile, hastaların hiçbirinin anti-EGFR Ab'ye yanıt vermediği, *BRAF* ve *KRAS* yabanıl olduğunda da hasta grubunun %32 antikora yanıt verebildiği açıklanmıştır (107). Aynı şekilde, setüksimab

ve irinotecan ile kombine tedavi alan hastalarda yapılan bir diğer çalışmada ise, *BRAF* mutasyonu olan 13 hastanın hiçbirinde tedaviye yanıt görülmemiştir fakat *BRAF* normal olan hastaların %32 tedaviye yanıt göstermiştir (108).

2.15.PIK3CA

PI3K, hücre çoğalmasında yer alan sinyal iletim yolları, hayatta kalma, hücre hareketliliği ve adezyonu, değişim hücresel iskeletin yeniden ayarlanması ve hücreler arası trafiği düzenleyen lipid kinaz ailesidir (111).

Hem lipid hem de protein kinaz ikili bir aktivite göstermektedir (112). Memeli hücrelerinde üç ayrı sınıfa ayrılan PI3K çok farklı izoformlar içerir. Birinci sınıf PI3K bir p110 katalitik alt birim ve bir de düzenleyici adaptör alt birimden meydana gelir (113,114). Katalitik alt birim de birkaç düzenleyici domainden oluşur ve çoğu PI3K üyeleri bu 4 bölgeyi homolog olarak paylaşır: katalitik lipid kinaz domaini, helikal domain, C2-domaini ve Ras-bağlanma domaini (RBD) ve regulator altbirimle etkileşim içinde olan NH2- terminal domaini. Katalitik lipid kinaz domaini protein kinazlarla zayıf bir homoloji gösterir (111).

Sınıf I PI3K'nin yapısı ve aktivitesini göz önüne bulundurarak, Ia ve Ib olmak üzere iki alt sınıfa ayrılırlar (111). Sınıf Ia ilk olarak hücre içi tirozin kinaz aktivitesi olan reseptörlerin, ilerisindeki sinyalleri düzenlemek ve reseptörlerle ilgili olmayan tirozin kinazlarla bağlanmakla tanımlanmıştır (111,116). Tümör oluşum sürecinde devamlı olarak kontrolsüz bir şekilde reseptör tirozin kinaz aktivitesi göstermektedir (117).

PI3K'lar uzun süredir karsinogenez ile ilişkili bulunmaktadırlar. Bu bağlantının ilk nedenleri, Ras sarkoma virüslerindeki Src protein ve polyoma virüsündeki orta T protein gibi onkoproteinin fosfatidilinositol kinaz aktivitesi göstermesidir. PI3K'nın kanser ile bağlantısı hakkındaki en kesin bulgu, Avian retrovirüs olan ASV16 ile yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Bu virüs bir tavukta bulunan spontan bir sarkomdan elde edilmiştir ve tavuklarda yüksek oranda tümöre neden olabiliyor, laboratuvar ortamında tavuk embriyo fibroblastlarını transforme etmektedir (112).

3.GEREC VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Çalışma parafine gömülü dokulardan DNA elde edileterek *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* ve *PIK3CA* mutasyonunun varlık veya yokluğunun kanıtlamak için tanımlayıcı ve deneye dayalı süreçten oluşmuştur.

3.2 Araştırmanın Yeri Ve Zamanı

Bu çalışma literatür taraması ile Ekim 2013'te Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsünde başlamış ve Ocak 2018'de tez savunmasıyla sonlanmıştır.

3.3 Araştırmanın Evreni Ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmanın evrenini patoloji tanısı almış hastalar oluşturmuştur. Örneklememiz ise hastalarımızın eş zamanlı olarak *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* genlerinde analizden elde edilen bilgiler oluşturmaktadır.

3.4 Çalışma Materyali

2009-2014 yıllarında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde KRK olarak tanımlanan, patoloji örnekleri mevcut olan ve klinik verileri çalışmaya dahil oldukları anda eksiksiz olarak tamamlanan toplam 132 hastadan oluşturulmuştur.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada hasta örneklerinde yaptığımız *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* ve *PIK3CA* genlerinde mutasyonlar bağımsız ve klinikopatolojik özellikler bağımlı değişkenlerimizi oluşturmaktadır.

3.6. Veri Toplama Araçları

Klinik verileri için Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Onkoloji Anabilim Dalı dosya kayıtları kullanılmıştır. Örneklerin mutasyon durumu QIAGEN theascreen *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* Pyro Kit (CE, IVD) ve AmoyDx *PIK3CA* Five Mutations Detection Kit (CE, IVD) kullanarak yapılmıştır. Bütün laboratuvar işlemleri Onkoloji Enstitüsü, Moleküler Temel Onkoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

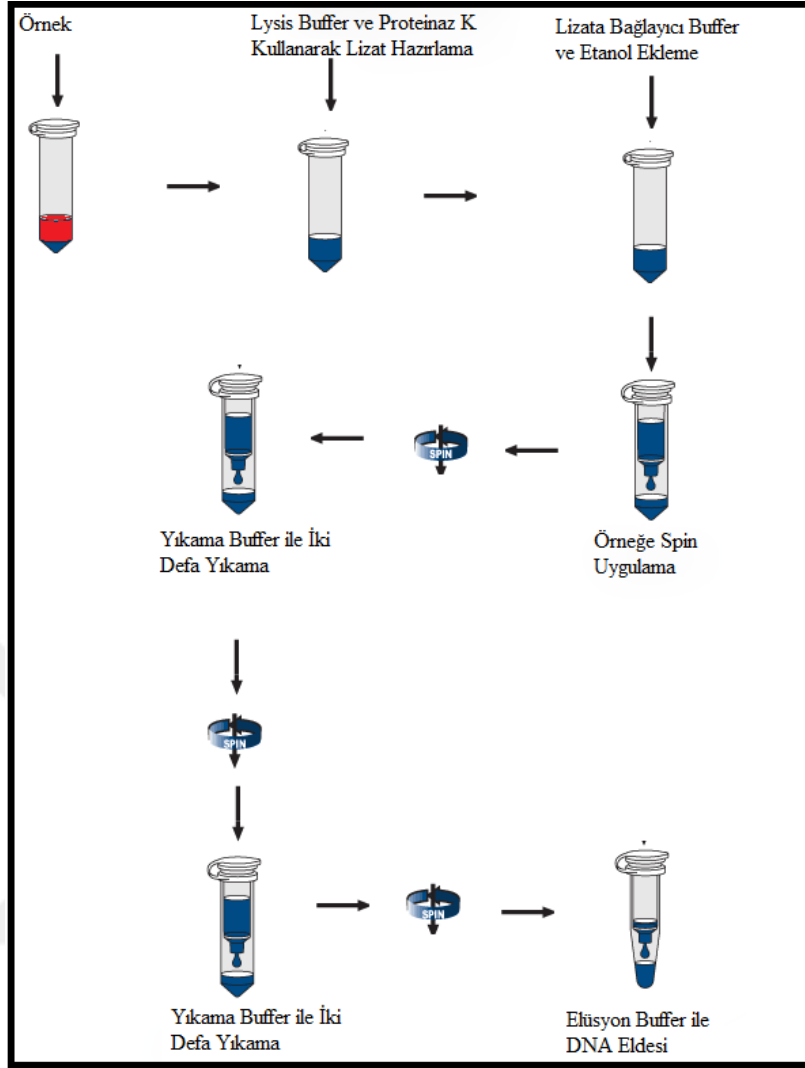
3.6.1. Spin Kolon Tabanlı Nükleik Asit İzolasyonu

Bu yöntem tuz miktarı veya pH'ye bağımlı olarak nükleik asitlerin kolayca ayıra bilmesi için kullanılan bir metodudur. Bu yöntemde nükleik asit katı faza bağlanarak ayrılması sağlanır. Bu yöntem dört aşamadan oluşur

1. Örneklerin parçalanması
2. Nükleik Asitlerin katı faza bağlanması
3. Kolonun yıkama solusiyonu ile yıkanması
4. Nükleik asitlerin saf su ile elde edilmesi

3.6.1.1.İzolasyonunda için gerekli Malzeme ve Cihazlar

- İzolasyon kiti: QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Cat. No:5644, Hilden, Almanya)
- Xylin (moleküler çalışmalar için) (Merckkat no: 1.08681.250, Almanya)
- Saf ethanol (Sigma-Aldrich, kat. no: 3221, Almanya)
- Eppendorf tüpü (1,5) [Citotest, No: 3470015S, Çin]
- Büyük tüp (12ml hacimli) (Becton Dickinson, 4-2097-8, Amerika)
- Sampler (FT 1000, FT100, FT10)
- Pipet boy (Eppendorf, No: 02272101,Hamburg, Almanya)
- Vorteks (Heidolph Top, No: 54119, Almanya)
- Isı blok (Eppendorf Thermomixer Compact, No: 535YP23107, Almanya)
- Santrifüj (Eppendorf, No: 5452Y04206, Almanya)



Şekil 6. DNA izolasyonu iş akışı şematik gösterimi

3.6.1.2. DNA izolasyonu için yapılan basamaklar

- Örnek kesitlerin üzerine Ksilol konuldu. (3 kesit yeterli)
- Örnek iyice vortekslendi.
- Ksilolün etkisini göstermesi için bekletildi.gözlemlendi.
- Santrifiuj da 2 dakika 6000 rpm hızıyla çevirildi.
- Üstteki ksilol pellete dokunmadan atıldı.
- Örnek üzerine 1 ml etanol eklendi.
- 15 saniye vortekste karıştırıldı.
- Daha sonra 2 dakika 6000 rpm hızda santrifujlendi.

- Alkol 37°C de kuru ısı bloğunda uçuruldu.
- Her tüp için 180 µL ALT ve 20 µL Proteinase eklendi.
- Örnekler 56°C gece boyu inkübe edildi.
- Ertesi gün 95 °C de 15 dakika inkübe edildi.
- Buharlanmış örneklerin toplanması için mini spin yapıldı.
- Daha sonra 200 µL AL buffer ve 200 µL alkol eklendi.
- Elde edilen örnekler filtreli tüplerine alındı.
- 9000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
- Örneklerin üzerine 500 µL birinci yıkama bufferi eklendi
- 9000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
- Tekrar 500 µL ikinci yıkama buffer konuldu ve 9000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi.
- Tamamen kuruması için 14000 rpm’de 4 dakika santrifüjlendi.
- Filtrelerin tam ortasına 50 µL saf su konuldu.
- Oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi.
- 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.

3.6.2. Pyrosekans Tabanlı Mutasyon analizi

3.6.2.1 KRAS, BRAF ve NRAS PCR İşlemleri

- PCR primerleri, Master Mix, coralLoad ve kitin içindeki H2O oda sıcaklığına çıkartılmıştır.
- Her bir primer için miks hazırlanmıştır. (2 ayrı Primer için 2 ayrı miks)
- (PCR Primer *KRAS,NRAS* 12/13, PCR Primer *KRAS,NRAS* 61),(PCR Primer *BRAF* 464-469, PCR Primer *BRAF* 600)
- Her örnek için (Kontrol ve NTC unutmamalı)

PyroMark PCR Master Mix	12.5µl
CoralLoad Concentrate, 10X	2.5µl
PCR Primer	1µl
H2O	4µl

- 0.2’lik tüplerine 20µl mix dağıtılıp üzerine 5µl ilgili DNA eklenmiştir

Tablo 2. PCR protokolü

Aşama	Sıcaklık	Süre	Devir
1	95°C	15 dakika	1
2	95 °C 53 °C 72 °C	20 saniye 30 saniye 20 saniye	42
3	72 °C	5 dakika	1

3.6.2.2 Purifikasyon ve Sekans İşlemleri

- Isı bloğu 80°C'a ayarlanmıştır. Q24 plate holder ısınma için üzerine konulmuştur.
- Reaktifler oda sıcaklığına getirilmiştir.

Annealing Buffer

Wash Buffer

Nukleotidler (A,T,G,C)

Sekans primerleri

Binding Buffer

Denaturation Solution

Streptavidin

Enzim ve Substrat

- Pyromark Q24 cihaz kartuşu yıkanmıştır.
- Pyrostasyonunun su kabı doldurulmuştur.
- Vakum istasyonu ile tüm su çekilmiştir.
- Costar plate ultra saf su ile doldurulmuştur.
- Cihazın el ünitesinin gidişini gözlemek için tüm sular çekilmiştir.
- Yıkama Buffer 1X şekilde hazırlanmıştır.
- %70 Etanol hazırlanmıştır.
- Pyromark yazılımın'da çalışılacak örneklerin listesi hazırlanmıştır. Her çalışma için bir WT kontrol ve bir NTC kontrol konulmuştur.
- Liste hazırlandıktan sonra Pyro Run file olarak kayıt edilmiştir.
- Kayıt edilen çalışma dosyası flaş belleği ile cihaza aktarılmıştır.
- PCR'ı hazırlanan örnekler thermocyclerden çıkarılmıştır.
- Binding miksi her örnek için hazırlanmıştır

Streptavidin 2 µl

Binding Buffer..... 40 µl

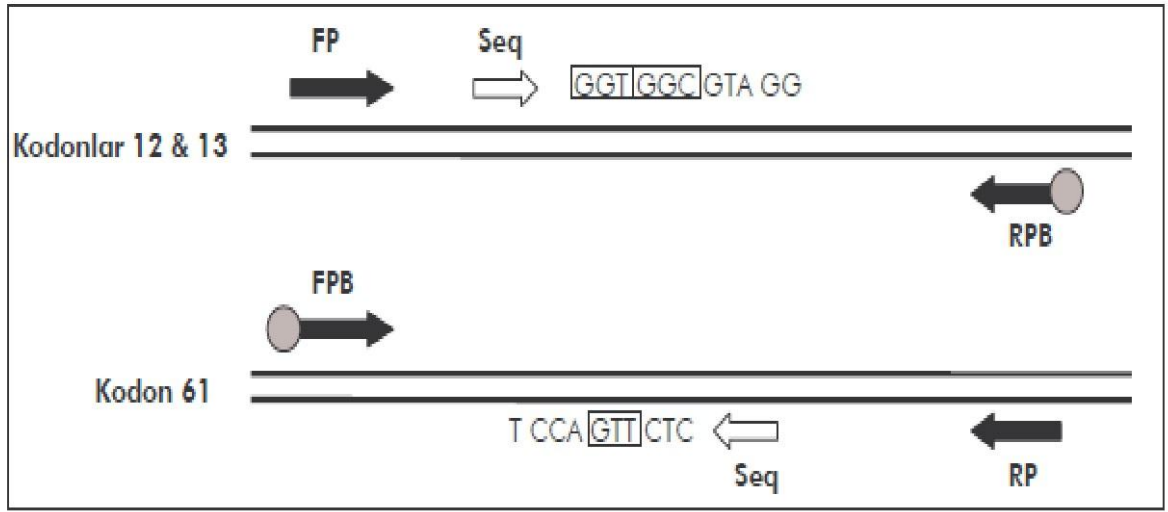
H2O 28 µl

- Costar plate'e 70 µl karışımı dağıtılmıştır. Üzerine 10 µl ilgili PCR ürünü konulmuştur ve plate üzeri seal ile kapatılmıştır.

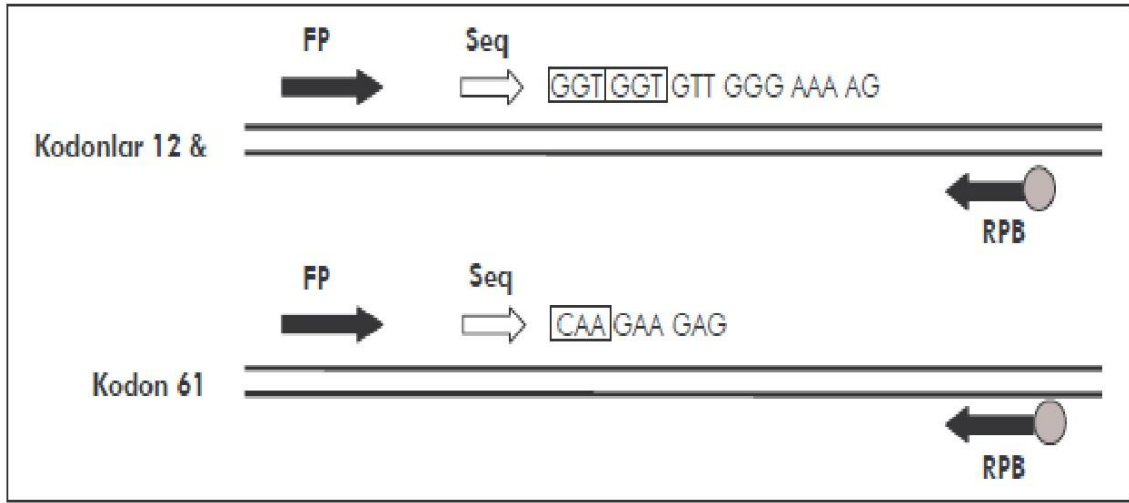
- Shaker üzerinde 1400 rpm’de 15 dakika bekletilmiştir.
- Vakum istasyonunda küvezeler %70 Etanol, Ultra saf su, Denaturasyon ve Yıkama bufferi ile yarım çizgisine kadar doldurulmuştur.
- PyroMark Q24 paltei alınıp ve holder üstüne koyularak Sekans Primerleri her örnek için hazırlanmıştır.

Annealing Buffer..... 24.2 µl
İlgili sekans Primerleri.....0.8 µl

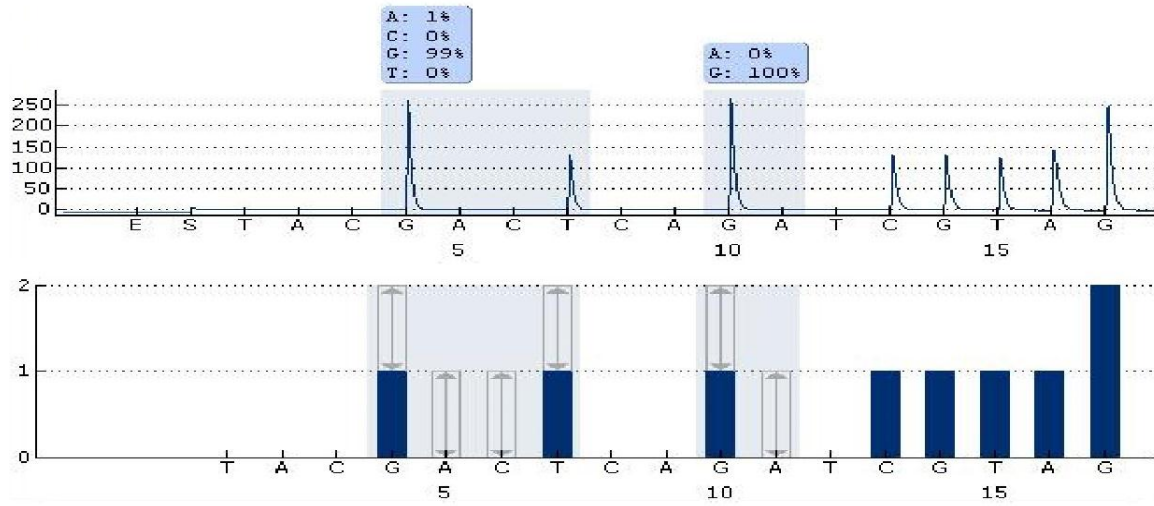
- Hazırlanan miks Q24 plate’e 25 µl olarak dağıtılmıştır.
- Shaker’de olan örnekler alınıp vakum istasyonunun el ünitesi ile çekilmiştir.
- Örnekler çekildikten sonra ilk Etanol ve sonra Annealing Buffer ve Washing Buffer küvezinde sırası ile 5,5 ve 10 saniye bekletilmiştir.
- Yıkama buffer küvezinden sonra el ünitesi PyroMark Q24plate’e yerleştirilmiş ve 15 saniye içinde hafif hareketler ile bekletilmiştir.
- Q24 plate 80°C olan ısı bloğuna alınmış ve 2 dakika ve sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Nükleotidler, Enzim ve Substrat kartuşta ilgili yerlerine konulmuş ve cihaza yerleştirilmiştir.
- Cihazın ekranında Run kısmından çalışmanın dosyası seçilmiş ve start tuşuna basarak çalışma başlatılmıştır.
- Çalışma bittikten sonra analiz için dosyalar cihazdan alınmıştır.



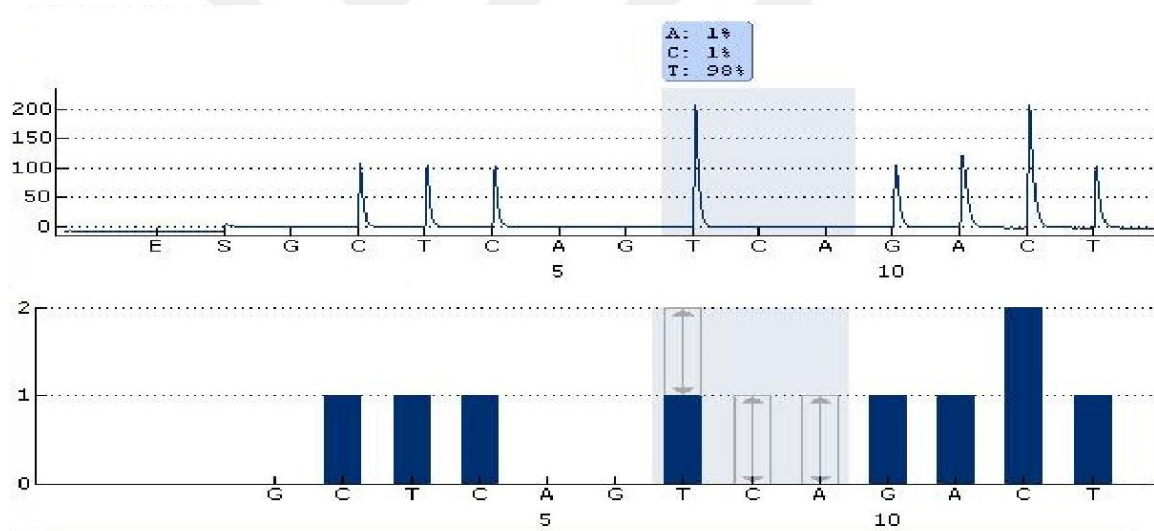
Şekil 7. KRAS analizinin gösterimi. Gösterilen dizin normal örnek için analiz edilen dizindir. FP: İleri PCR primerleri; RPB: Ters PCR primerleri (B, biotinlemeyi gösterir); Seq: Sıralama primerleri



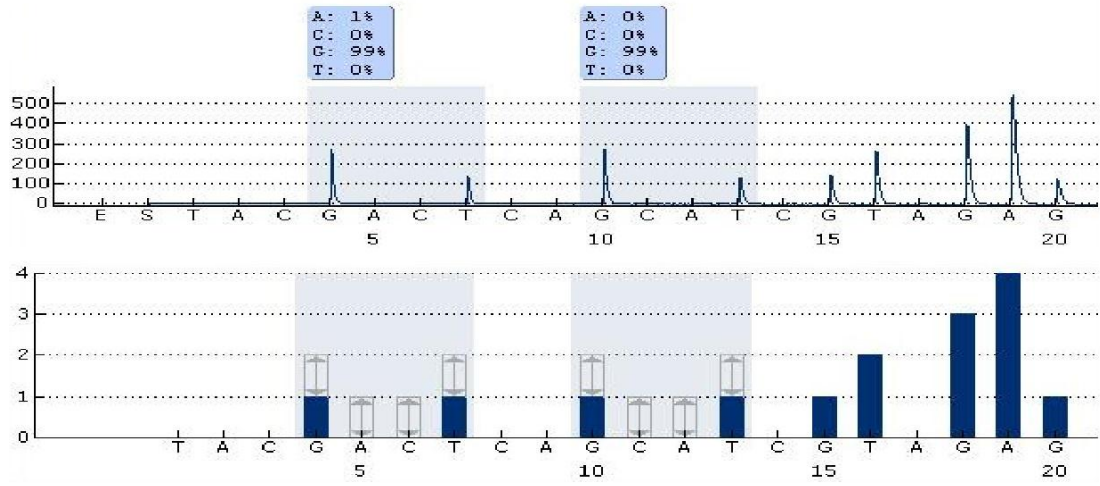
Şekil 8. NRAS analizinin gösterimi. Gösterilen dizin normal örnek için analiz edilen dizindir. FP: İleri PCR primerleri; RPB: Ters PCR primerleri (B, biotinlemeyi gösterir); Seq: Sıralama primerleri



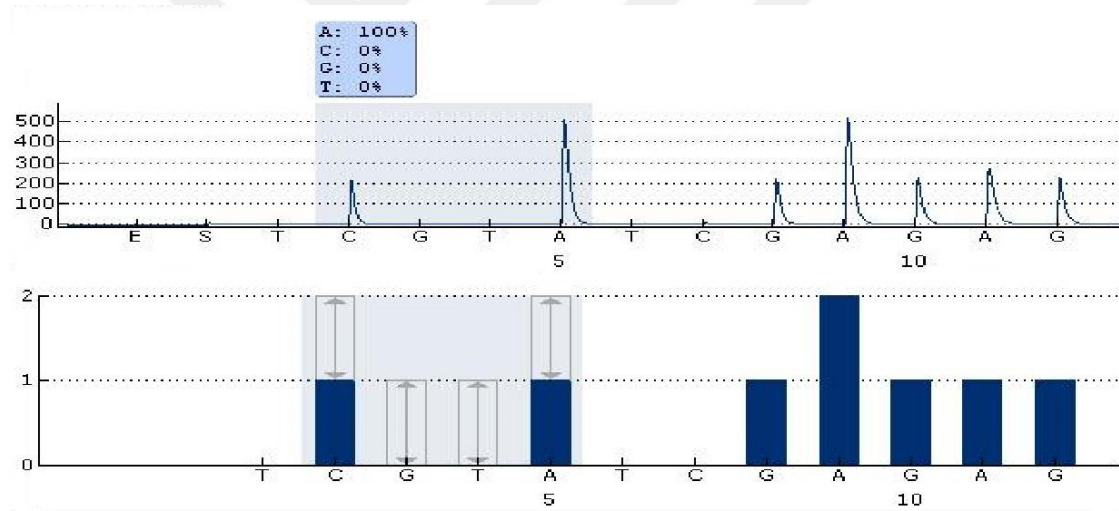
Şekil 9. KRAS 12. ve 13. Kodonlar içinde normal genotip ile bir örnek analizi sonrasında elde edilen Pyrogram taraması



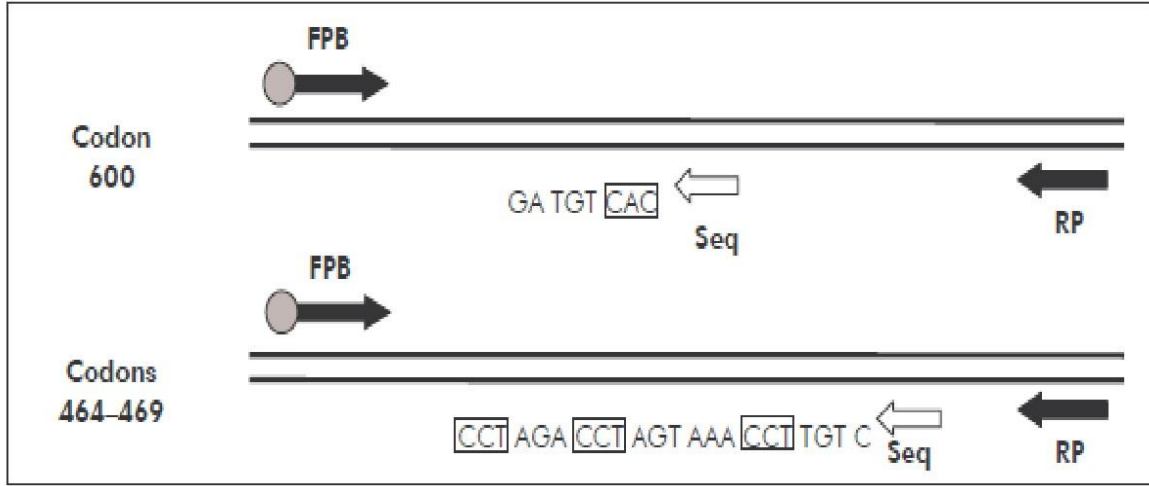
Şekil 10. KRAS 61. Kodon içinde normal genotip ile bir örnek analizi sonrasında elde edilen Pyrogram taraması



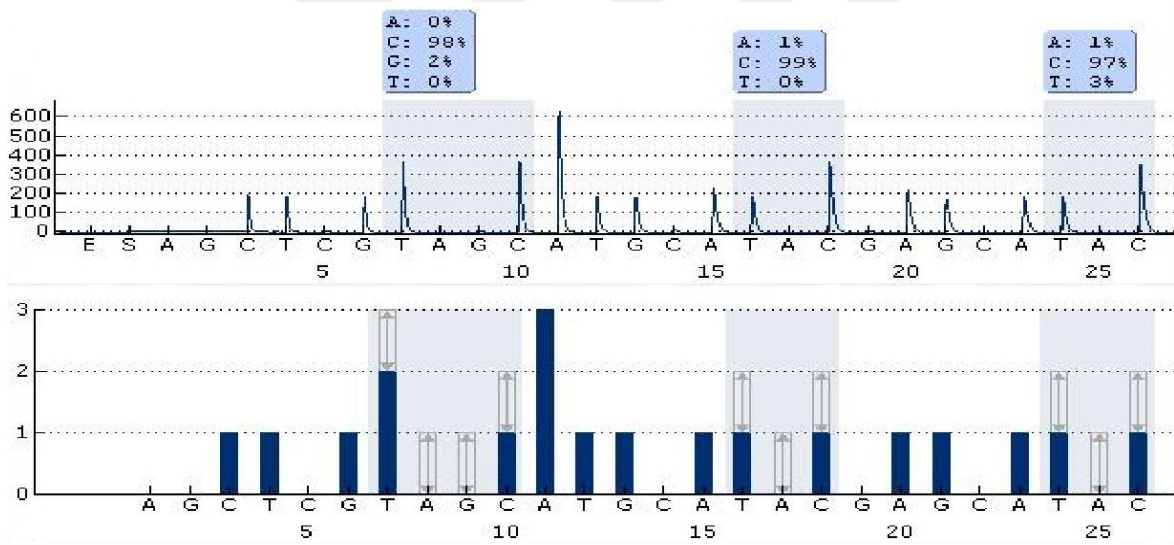
Şekil 11. NRAS 12. ve 13. Kodonlar içinde normal genotip ile bir örnek analizi sonrasında elde edilen Pyrogram taraması



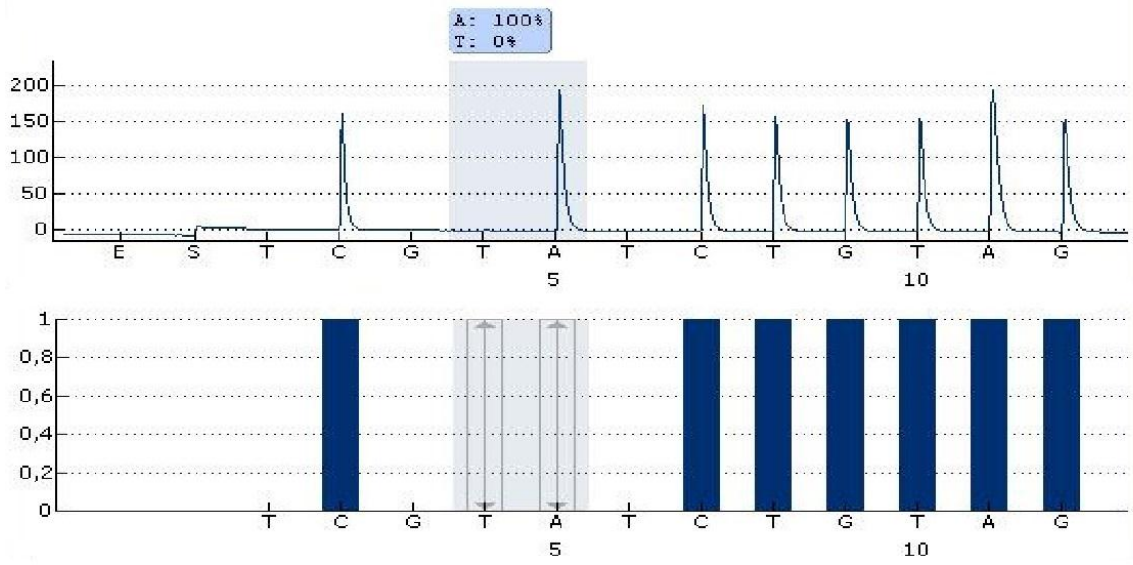
Şekil 12. NRAS 61. Kodon içinde normal genotip ile bir örnek analizi sonrasında elde edilen Pyrogram taraması



Şekil 13. *BRAF* analizinin gösterimi. Gösterilen dizin normal örnek için analiz edilen dizindir. FP: İleri PCR primerleri; RPB: Ters PCR primerleri (B, biotinlemeyi gösterir); Seq: Sıralama primerleri



Şekil 14. *BRAF* 464.-469. kodonları normal genotipdeki bir örneğin analiz sonrasında elde edilen Pyrogram taraması.



Şekil 15. BRAF 600. kodon normal genotipdeki bir örneğin analiz sonrasında elde edilen Pyrogram taraması.

3.6.3. Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) moleküler biyolojide en güçlü teknolojilerden biridir. PCR kullanarak, bir DNA veya cDNA şablonu içindeki spesifik sekanslar, sekans spesifik oligonükleotitler, ısıya dayanıklı DNA polimeraz ve termal bisiklet kullanılarak birçok bin ila bir milyon kat kopyalanabilir veya "amplifiye" edilebilir.

Gerçek zamanlı kantitatif PCR'de PCR ürünü her çevrimde ölçülür. Tepkimenin üstel amplifikasyon aşamasında reaksiyonları izleyerek kullanıcılar, hedefin başlangıç miktarını büyük bir hassasiyetle belirleyebilir. Gerçek zamanlı PCR'de, DNA miktarı, üretilen PCR ürün moleküllerinin (amplikonları) sayısı ile doğru orantılı olarak artan floresan sinyali veren flüoresan boyalar yoluyla her döngüden sonra ölçülür. Reaksiyonun üstel fazında toplanan veriler, amplifikasyon hedefinin başlangıç miktarı hakkında niceliksel bilgi verir.

Gerçek zamanlı PCR kullanılan floresan gazetecilere amplifikasyon sırasında PCR ürünü ile hibridize PCR primerleri veya problemleri bağlı çift sicimli DNA (dsDNA) - bağlayıcı boyalar veya boya molekülleri içerir. Tepkime boyunca flüoresandaki değişim, termal döngü ile flüoresan boya tarama yeteneğini birleştiren bir aletle ölçülür.

Flüoresansı döngü sayısına karşı planlarken, gerçek zamanlı PCR aracı, PCR reaksiyonunun tamamı boyunca ürünün birikimini temsil eden bir amplifikasyon şeması oluşturur.

3.6.3.1. RT-PCR' da kullanılan malzeme ve cihazlar

- QIAGEN Rotor Gene Q Real-Time PCR System
- AmoyDx *PIK3CA* Five Mutations Detection Kit (CE, IVD)
- Steril filtreli pipet ucu (Greiner Bio-one Filter Tip FT 1000, FT100, FT10)
- Mikrosantrifüj tüpü (0,2, 05 ve 1 ml (Citotest, 34730015S)
- Otomatik pipetler (Eppendorf, 022472101, Hamburg, Almanya)
- Vorteks (Heidolph Top Mix 94323, Bioblock Scientific, 54119, Almanya)
- Santrifüj (Eppendorf, 5452Y0451206, Almanya)

3.6.3.2 RT-PCR İşlem Basamakları

İşlemler sırasında eşik değerlerinde ortaya çıkabilecek varyasyonlardan kaçınmak için, her mutasyon testinde örnekler ve kontrol grupları aynı PCR işlemi sırasında analiz edilmelidir.

- *PIK3CA* reaksiyon karışımları ve standartlar eritildi. *PIK3CA* Taq DNA polimeraz, reaksiyon karışımları ve Mix Standartlar kullanmadan önce santrifüj edildi.
- Her örnek için, 20 µl E542K ve E545K ve 0,2 µl *PIK3CA* Taq DNA polimeraz ve 20 µl diğer reaksiyon karışımı (ya da eksternal kontrol reaksiyon karışımı) için 0,16 µl *PIK3CA* Taq DNA polimeraz oranını sağlayacak şekilde uygun miktarda *PIK3CA* Taq DNA polimeraz ve reaksiyon karışımları (eksternal kontrol reaksiyon karışımı) steril tüplere aktarıldı.
- Her solüsyon karışımı yaklaşık 15 sn karıştırılır ve 15 sn santrifüj edildi.
- 20 µl Master mix PCR reaksiyon kuyucuklarına aktarıldı.
- 5 µl DNA, 5 µl *PIK3CA* mixed standardı ya da 5 µl ddH₂O (no-template control, NTC) uygun 0.1'lik tüplere eklendi.

- Parafine gömülü örnekler için farklı depolama koşullarına bağlı olarak, her PCR tüpü için tavsiye edilen kalıp DNA miktarı 10 ya da 15 ng'dır
- i. 3 yıldan daha kısa süredir depolanan örnekler için 10 ng DNA kullanılır.
- ii. 3 yıldan uzun süredir depolanan örnekler için 15 ng DNA kullanılır

Not:

- Ekstrakte edilen DNA'nın dilüsyonu için TE (pH=8.0) kullanımı tavsiye edilir.
 - Taq polimeraz viskoz olduğu için santrifüj ve pipetaj işlemleri sırasında dikkatli olunmalıdır.
 - Fazla enzim eklenmesinden kaçınmak için pipet ucu ve Taq DNA polimeraz arasında temas yüzeyi en aza indirilmelidir.
- Reaktiflerin tüplerin tabanında toplanması için PCR tüpler spin santrifüj edildi.
PCR tüpleri Real-time PCR cihazına yerleştirildi.

Tablo 3. Aşağıdaki protokol Real-time PCR için uygulandı

Aşama	Sıcaklık	Süre	Devir
1	95°C	5 dakika	1
2	95 °C 64 °C 72 °C	25 saniye 20 saniye 20 saniye	15
3	93 °C 60 °C 72 °C	25 saniye 35 saniye 20 saniye	31

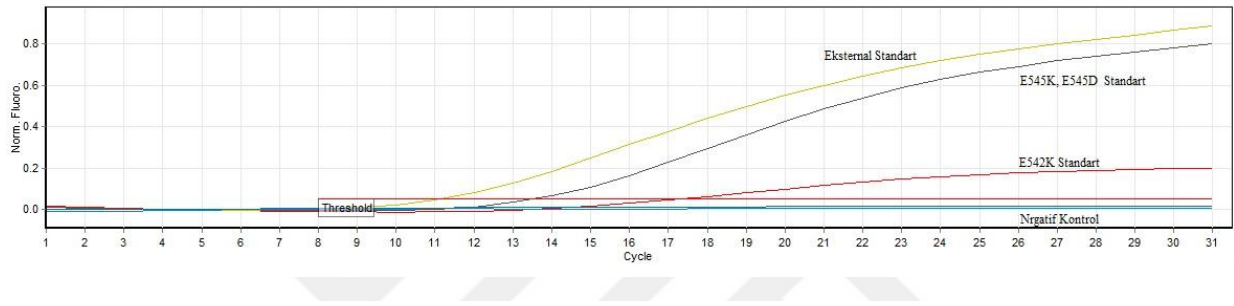
Not: Her bir kuyucuktaki toplam solüsyon hacminin 25 µl (20 µl reaktif, 5 µl kalıp) olduğundan emin olundu.

Tablo 4. Aşağıdaki liste analizi yapılan mutasyonları göstermektedir

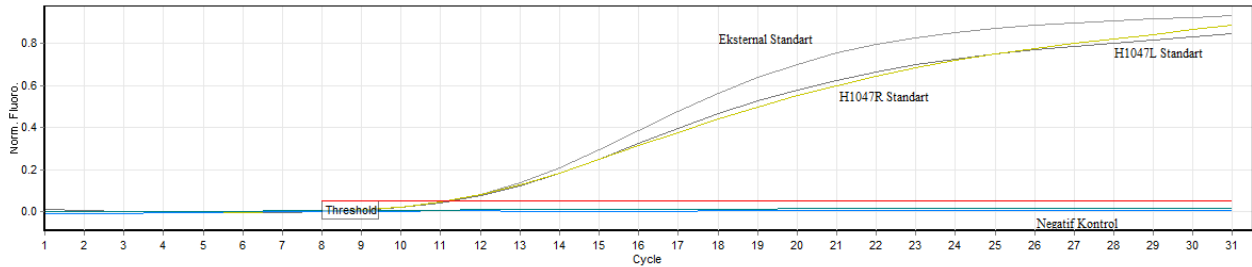
Sıra	Ekzon	Nükleotid değişikliği	Mutasyon
1	20	CAT>CGT	H1047R
2	20	CAT>CTT	H1047L
3	9	GAA>AAA	E542K
4	9	GAG>AAG	E542K
5	9	GAG>GAT	E545D

Tablo 5. Gen mutasyon durumunu değerlendirmek için kullanılan Ct değerleri

Mutasyonun Adı		H1047R	H1047L	E542K	E545K	E545D
Pozitif	Mutant Ct Değeri	Ct<28	Ct<27	Ct<28	Ct<28	Ct<27
	Δ Ct cut off değeri	≤ 14	≤ 13	≤ 14	≤ 13	≤ 12
Negatif	Mutant Ct Değeri	Ct ≥ 28	Ct ≥ 27	Ct ≥ 28	Ct ≥ 28	Ct ≥ 27



Şekil 16. PIK3CA 545. ve 542. kodonların standartlarının Rotor-Gene ile elde edilen görüntüleri.



Şekil 17. Rotor-Gene ile elde edilen PIK3CA 1047. kodonun standard görüntüsü.

3.7.Araştırma Planı

- Literatür taraması Ekim-Aralık 2013
- Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından etik kurul onayı alınması Ocak 2014
- Olguların Seçimi Şubat-Nisan 2014

- Malzeme Siparişı ve alınması Mayıs-Temmuz 2014
- Olguların klinik verilerinin toplanması Ağustos-Kasım 2014
- Kullanılan cihazların kalibrasyonu Aralık 2014
- Örneklerin toplanması ve DNA İzolasyonu Şubat-Nisan 2015
- Mutasyon analizlerinin yapılması Mayıs-Eylül 2015
- Mutasyon sonuçların değerlendirilmesi Ekim-Kasım 2015
- İlk verilerin analizi ve sunulması Baku-Azerbaycan Kasım 2015
- Olguların klinik verilerinin güncellenmesi Ocak-Mart 2016
- İstatiksel analizin tamamlanması Nisan-Temmuz 2016
- Literatür güncelleme ve yayın yazılması Ağustos-Aralık 2016
- Tez yazılması Şubat-Ağustos 2017
- Yayın submiti Eylül-Aralık 2017
- Tez Savunması Ocak 2018

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen sonuçlar SPSS Version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) istatistik programı kullanılarak analiz edildi. P değeri 2-terafli ve istatistiksel anlamlılık < 0.05 kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamız *PIK3CA* gen mutasyonlarını *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* yabanıl olan KRK hastalarında değerlendirmektedir. Ancak olgularımız sadece tek merkezden ve Dokuz Eylül Hastanesinden tamin edilmiştir. Bu nedenle elde ettiğimiz sonuçlar Türk popülasyonunun mutasyon durumunu açıklamayabilir. Saptadığımız sonuçlar tek yöntem ile elde edilmiştir, mutasyonların tekrarlılıkları ikinci bir metodla yapılmalıdır.

3.10. Etik Kurul Onay

Bu çalışma Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 31.01.2014 tarihinde 10840098-27 sayı ve 26 karar numarasıyla etik kurul onayı almıştır (Ek 1).



4.BULGULAR

4.1.DEMOGRAFİK VERİLER

Dokuz Eylül Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından histopatolojik tanısı konulan, klinik izlemleri Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı tarafından yapılan, gen analizleri ise Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Moleküler Onkoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen 132 olgu çalışmaya alınmıştır. 132 olgunun %65,2'si (n:86) erkek, %34,8'i (n:46) kadındı.

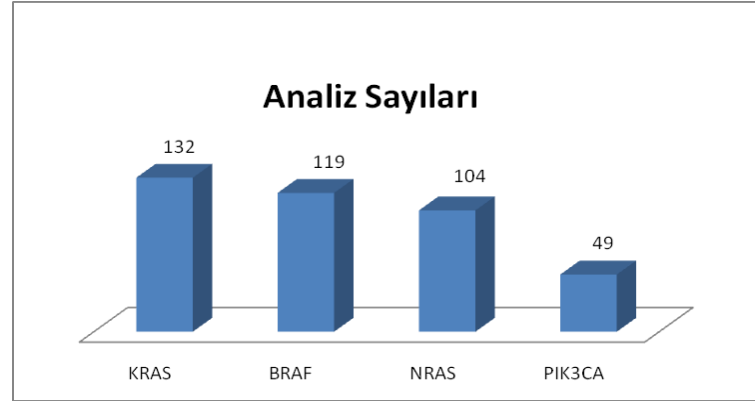


Şekil 18. Olguların cinsiyete göre dağılımları

Hastalarımızın %55,3'ü (n=73) 60 yaş ve altı, %44,7'si (n=59) 60 yaş ve üzeri hastaları kapsamaktadır.

Sosyal sigara alışkanlıkları bilinen 96 hastadan %43,8'i (n=42) sigara içmemekte, %56,3'ünün (n=54) sigara içtiği saptanmıştır.

Olgularımız Tedavi Rehberlerinde önerildiği gibi sekansiyel mutasyon taramasına tabii tutuldu. Olgularımızın tümüne ilk olarak (n=132) *KRAS* mutasyon analizi yapıldı. Yabanıl tip olanlara sırasıyla *BRAF*, ikili yabanıl olanlara *NRAS* ve üçlü yabanıl olanlara *PIK3CA* mutasyonu bakıldı. Tüm olgular arasından ise 119 hastaya *BRAF*, 104 hastaya *NRAS*, 49 hastaya ise *PIK3CA* gen analizi yapıldı.



Şekil 19. Olgularda yapılan mutasyon analiz sayısı

Hastaların son durumunun analizini yaptığımızda (n=132), erkek olan gurubun %53.5'i (n=46) kadın gurubu ise %50'si(n=23) yaşıyor olarak gözlenmiştir. Ex durumu erkeklerde %46.5(n=40), kadınlarda ise %50(n=23) saptanmıştır. (p=0.718)

Tablo 6. Hastaların son durumu Cinsiyet Karşılaştırması

	Son durum		Toplam (%)
	Yaşıyor (%)	Ex (%)	
Erkek	46(53.5)	40(46.5)	86(65.2)
Kadın	23(50)	23(50)	46(34.8)
Toplam	69(52.3)	63(47.7)	132(100)

4.2.MUTASYON ANALİZİ

Birincil sıra *KRAS* analizi yaptığımızda toplam 132 hastanın, %78.8'i (n=104) yabanıl tip, %21.2'si (n=28) mutant olarak saptandı. Hastaların %65.2'si (n=86) erkektir. Erkek olan hastalarının%15.1 (n=13), kadın hastalarının ise %32.6'sinde (n=15) *KRAS* mutasyonunu gözlenmiştir (p=0.026).

İkincil sıra (*KRAS* yabanıl olgularda) *BRAF* analizi yaptığımızda toplam 119 hastanın, %95.8'i (n=114) yabanıl tip, %4.2'si (n=5) mutant olarak saptandı. Hastaların %66.4'ü (n=79) erkektir. Erkek olan hastalarının %2.5'i (n=2), kadın hastalarının ise %7.5'i (n=3) *BRAF* mutasyonunu gözlenmiştir (p=0.333).

Üçüncül sıra (double negatif/*KRAS*-*BRAF* yabanıl olgularda) *NRAS* analizi yaptığımızda toplam 104 hastanın, %87.5'i (n=91) yabanıl tip, %12.5i (n=13) mutant olarak

saptandı. Hastaların %64.4 (n=67) erkektir. Erkek olan hastalarının %10.4'ü (n=7), kadın hastalarının ise %16.2'si (n=6) *NRAS* mutasyonunu gözlenmiştir. (p=0.537)

Dördüncül sıra (triple negative/panRAS-BRAF yabanıl olgularda) *PIK3CA* analizi yaptığımızda toplam 49 hastanın, %53.1'i (n=26) yabanıl tip, %46.9'u (n=23) mutant olarak saptandı. Hastaların %71.4'ü (n=35) erkektir. Erkek olan hastalarının %42.9'u (n=15), kadın hastalarının ise %57.1 de (n=8) *PIK3CA* mutasyonunu gözlenmiştir. (p=0.528)

Tablo 7. Cinsiyete Göre Mutasyon Analizi Dağılımı

	ERKEK (%)	KADIN (%)	TOPLAM (%)	P değeri
KRAS				
WT (%)	73 (84.9)	31 (67.4)	104 (78.8)	
Mutant (%)	13 (15.1)	15 (32.6)	28 (21.2)	
Toplam (%)	86 (65.2)	46(34.8)	132 (100)	p=0,026
BRAF				
WT (%)	77(97.5)	37(92.5)	114(95.8)	
Mutant (%)	2(2.5)	3(7.5)	5(4.2)	
Toplam (%)	79(66.4)	40(33.6)	119(100)	p=0,333
NRAS				
WT (%)	60(89.6)	31(83.8)	91(87.5)	
Mutant (%)	7(10.4)	6(16.2)	13(12.5)	
Toplam (%)	67(64.4)	37(35.6)	104(100)	p=0,537
PIK3CA				
WT (%)	20(57.1)	6(42.9)	26(53.1)	
Mutant (%)	15(42.9)	8(57.1)	23(46.9)	
Toplam (%)	35(71.4)	14(28.6)	49(100)	p=0,528

4.2.1.MUTASYON TİPİ DAĞILIMI

KRAS analizi yapılan toplam 132 hastanın %21.2'si (n=28), *BRAF* analizi yapılan 119 hastanın, %4.2'si (n=5), *NRAS* analizi yapılan 104 hastanın %12.5'i (n=13) ve *PIK3CA* analizi yapılan triple negatif 49 hastanın %46.9'u (n=23) mutant olarak saptandı.

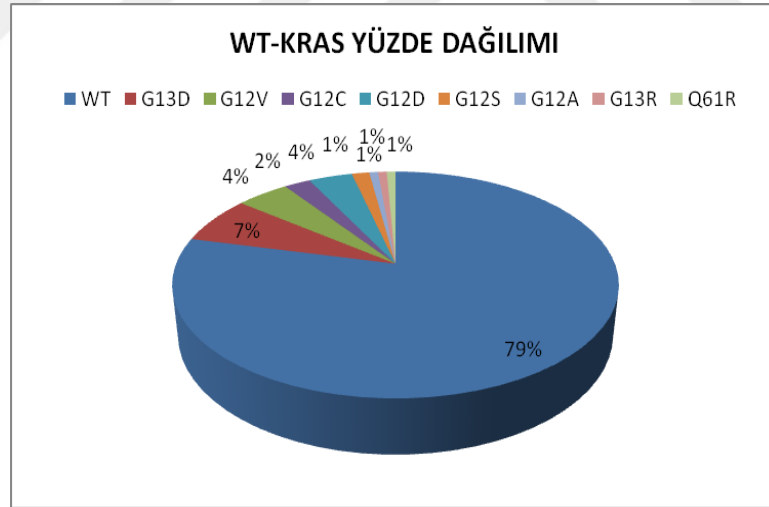
Tablo 8. Analiz edildiği genlerin mutasyon Dağılımı

	WT	%	MUTANT	%
KRAS	104	78.8	28	21.2
BRAF	114	95.8	5	4.2
NRAS	91	87.5	13	12.5
PIK3CA	23	46.9	26	53.1

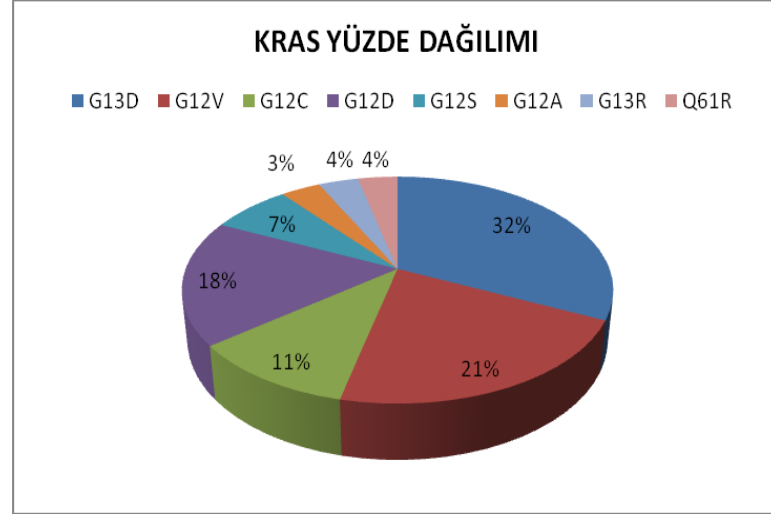
KRAS mutasyon fenotip dağılımına baktığımızda; tüm hastalarımızın %6.8'inde G13D ve %4.5'inde G12V değişim görüldü. Sadece *KRAS* mutasyonu görülen hastalarımızda bu oran G13D için %32.1 ve G12V için 21.4'dür. En az mutasyon fenotip dağılımı ise %3.6 oranında bulduğumuz G12A, G13R ve Q61R mutasyonlarıdır.

Tablo 9. *KRAS* Mutasyonu Fenotip Dağılımı

KRAS	SAYI(n)	Tüm KRAS Hastalarında %	MutantKRAS Hastalarında %
WT	104	78.8	-
G13D	9	6.8	32.1
G12V	6	4.5	21.4
G12C	3	2.3	10.7
G12D	5	3.8	17.9
G12S	2	1.5	7.1
G12A	1	0.8	3.6
G13R	1	0.8	3.6
Q61R	1	0.8	3.6



Şekil 20. *KRAS* Geni Mutasyon Analizi Dağılımı

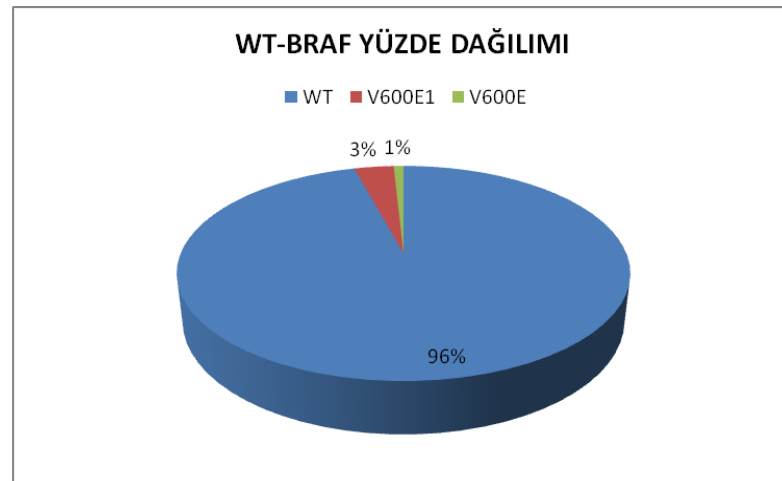


Şekil 21. KRAS Mutasyonu Yüzde Dağılımı

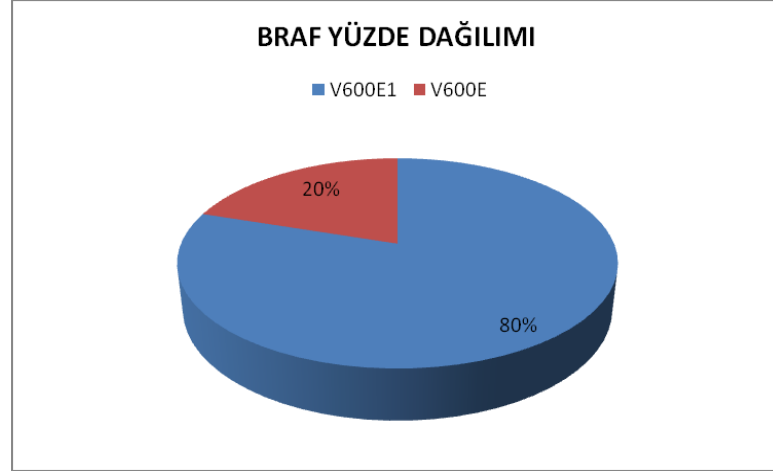
BRAF mutasyon analizi yaptığımız 119 olgumuzun %3.4'ünde V600E1 mutasyon değişimi saplandı. Bu tüm *BRAF* mutant olguların %80'ini oluşturmaktadır.

Tablo 10. *BRAF* Mutasyonu Fenotip Dağılımı

BRAF FENOTIP	SAYI(n)	Tüm BRAF Hastalarında %	Mutant BRAF Hastalarında %
WT	114	95.8	-
V600E1	4	3.4	80
V600E	1	0.8	20



Şekil 22. *BRAF* Geni Mutasyon Analizi Dağılımı

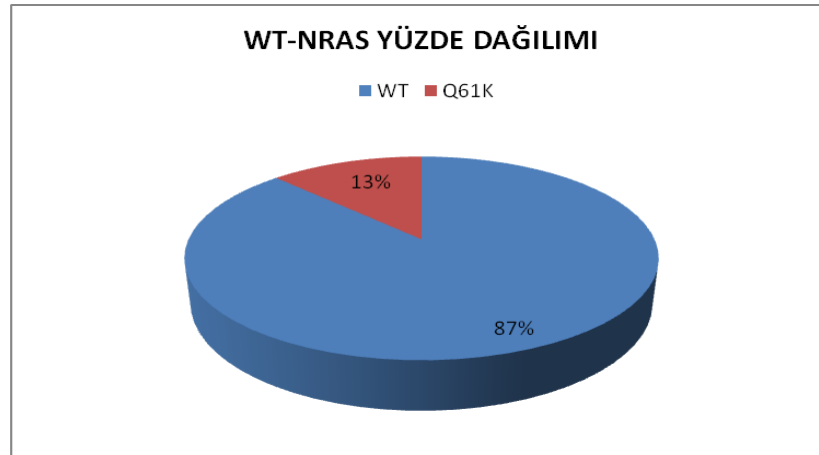


Şekil 23. BRAF Mutasyonu Yüzde Dağılımı

NRAS analizi yaptığımız 104 olgunun %12.5'i mutant olarak gözlenmiştir. NRAS mutant olgularımızın tümü Q61K fenotipinde bulunmaktadır.

Tablo 11. NRAS Mutasyonu Fenotip Dağılımı

NRAS Fenotip	SAYI(n)	%
WT	91	87.5
Q61K	13	12.5

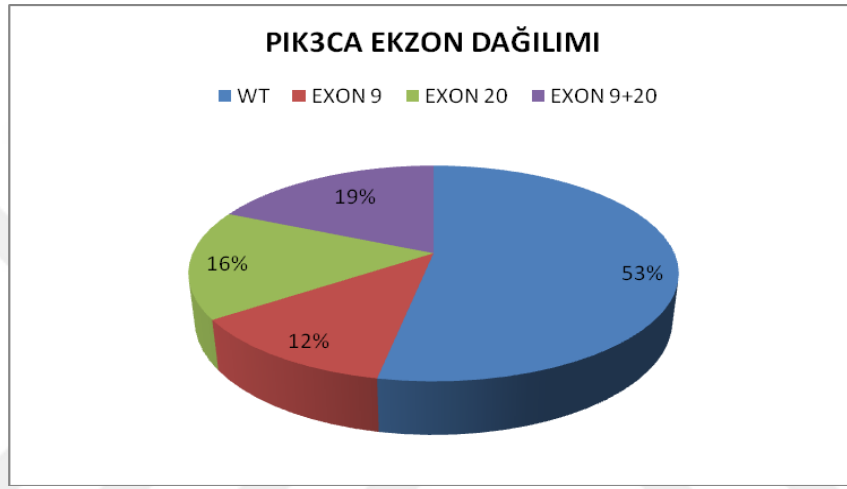


Şekil 24. NRAS Geni Mutasyon Analizi Dağılımı

PIK3CA mutasyon analizi yaptığımız triple negatif 49 hastamızın %12.2'sinde (n=6) Exon 9'da, %16.3'ünde (n=8) Exon 20'de, %18.4'ünde ise hem Exon 9 hem de Exon 20'de değişim gözlenmiştir.

Tablo 12. *PIK3CA* Mutasyonu Exon Dağılımı

PIK3CA Fenotip	SAYI(n)	Tüm PIK3CA Hastalarında %	Mutant PIK3CA Hastalarında %
WT	26	53.1	-
EXON 9	6	12.2	26.1
EXON 20	8	16.3	34.8
EXON 9 ve20	9	18.4	39.1

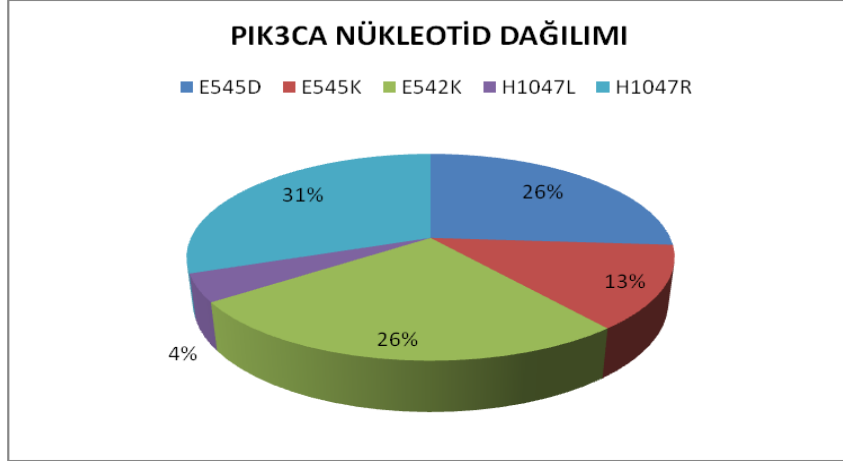


Şekil 25. *PIK3CA* Mutasyonu Ekzon Dağılımı

PIK3CA mutasyonlarımızın nükleotid dağılımlarına baktığımızda ise en çok mutasyon %30.4 ile (n=7) H1047R fenotip değişiminde, en az mutasyonu ise %4.4 ile H1047L fenotip değişiminde gözlemlenmektedir.

Tablo 13. *PIK3CA* Mutasyon fenotip Dağılımı

PIK3CA	FR	%
E545D	6	26.1
E545K	3	13.1
E542K	6	26.1
H1047L	1	4.4
H1047R	7	30.4



Şekil 26. *PIK3CA* Geni Mutasyonu Fenotip Dağılım Yüzdesi

4.3.TANI ANINDAKİ YAŞA GÖRE MUTASYON ANALİZİ

KRAS analizi yaptığımızda toplam 132 hastanın, %78.8'i (n=104) yabanıl tip, %21.2'si (n=28) mutant olarak saptandı. Hastaların % 55,3'ü (n=73) 60 yaş ve altıydı. 60 yaş altı hastaların %20,5'i (n=15), 60 yaş üstü hastalarının ise %22.0'sinde (n=13) *KRAS* mutasyonunu gözlenmiştir. (p=0.834)

BRAF analizi yaptığımızda toplam 119 hastanın, %95.8'i (n=114) yabanıl tip, %4.2'si (n=5) mutant olarak saptandı. Hastaların % 54,6'sı (n=65) 60 yaş ve altıydı. 60 yaş altı hastaların %3,1'i (n=2), 60 yaş üstü hastalarının ise %5,6'sinde (n=3) *BRAF* mutasyonunu gözlenmiştir. (p=0.658)

NRAS analizi yaptığımızda toplam 104 hastanın, %87.5'i (n=91) yabanıl tip, %12.5i (n=13) mutant olarak saptandı. Hastaların % 54,8'si (n=57) 60 yaş ve altıydı. 60 yaş altı hastaların %14'ü (n=8), 60 yaş üstü hastalarının ise %10,6'sinde (n=5) *NRAS* mutasyonunu gözlenmiştir. (p=0.768)

PIK3CA analizi yaptığımızda toplam 49 hastanın, %53.1'i (n=26) yabanıl tip, %46.9'u (n=23) mutant olarak saptandı. Hastaların % 61,2'si (n=30) 60 yaş ve altıydı. 60 yaş altı hastaların %50'si (n=15), 60 yaş üstü hastalarının ise %57,9'u (n=11) *PIK3CA* mutasyonunu gözlenmiştir. (p=0.528)

Tablo 14. Tanı Anındaki Yaş'a Göre Mutasyon Analizi

	≤60 (%)	>60 (%)	TOPLAM (%)	P değeri
KRAS				
WT (%)	58(79.5)	46(78.0)	104(78.8)	
Mutant (%)	15(20.5)	13(22.0)	28(21.2)	
Toplam (%)	73(55.3)	59(44.7)	132(100)	p=0,834
BRAF				
WT (%)	63(96.9)	51(94.4)	114(95.8)	
Mutant (%)	2(3.1)	3(5.6)	5(4.2)	
Toplam (%)	65(54.6)	54(45.4)	119(100)	p=0,658
NRAS				
WT (%)	49(86.0)	42(89.4)	91(87.5)	
Mutant (%)	8(14.0)	5(10.6)	47(42.2)	
Toplam (%)	57(54.8)	47(42.2)	104(100)	p=0,768
PIK3CA				
WT (%)	15(50)	8(42.1)	26(53.1)	
Mutant (%)	15(50)	11(57.9)	23(46.9)	
Toplam (%)	30(61.2)	19(38.8)	49(100)	p=0,528

4.4.PRİMER TÜMÖR YERİNE GÖRE MUTASYON ANALİZİ

KRAS analizi yaptığımızda toplam 132 hastanın, %78.8'i (n=104) yabanıl tip, %21.2'si (n=28) mutant olarak saptandı. Hastaların % 42,4'ünde (n=56) primer tümör yeri rektum, %57,6'sında (n=76) primer tümör yeri kolon olarak saptandı. Primer tümörü rektum yerleşimli hastaların %26,8'i (n=15) ve primer tümörü kolon olan hastaların %17,1'i (n=13) *KRAS* açısından mutant olarak saptandı. (p=0,201)

BRAF analizi yaptığımızda toplam 119 hastanın, %95.8'i (n=114) yabanıl tip, %4.2'si (n=5) mutant olarak saptandı. Hastaların % 42,9'unda (n=51) primer tümör yeri rektum, %57,1'inde (n=68) primer tümör yeri kolon olarak saptandı. Primer tümörü rektum yerleşimli hastaların %2'si (n=1) ve primer tümörü kolon olan hastaların %5,9'u (n=4) *BRAF* açısından mutant olarak saptandı. (p=0,390)

NRAS analizi yaptığımızda toplam double negatif 104 hastanın, %87.5'i (n=91) yabanıl tip, %12.5i (n=13) mutant olarak saptandı. Hastaların % 43,3'ünde (n=45) primer tümör yeri rektum, %56,7'sinde (n=59) primer tümör yeri kolon olarak saptandı. Primer tümörü rektum

yerleşimli hastaların %4,4'ü (n=2) ve primer tümörü kolon olan hastaların %18,6'sı (n=11) *NRAS* açısından mutant olarak saptandı. (p=0,037)

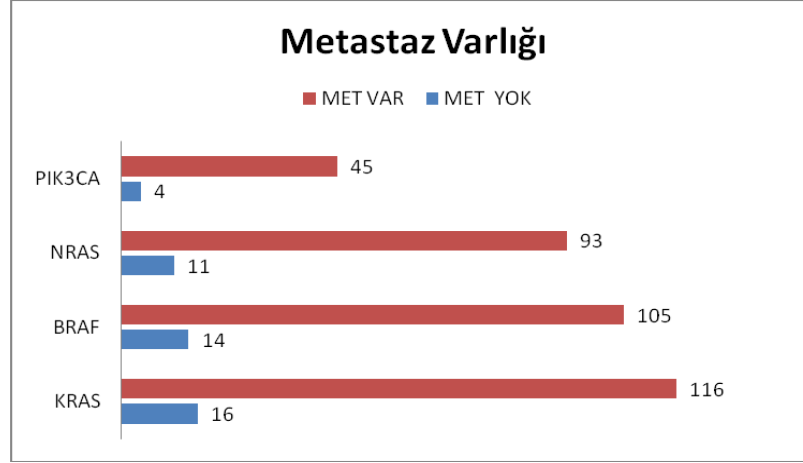
PIK3CA analizi yaptığımızda toplam triple negatif 49 hastanın, %53.1'i (n=26) yabancı tip, %46.9'u (n=23) mutant olarak saptandı. Hastaların % 46,9'unda (n=23) primer tümör yeri rektum, %57,1'inde (n=28) primer tümör yeri kolon olarak saptandı. Primer tümörü rektum yerleşimli hastaların %52,4'ü (n=11) ve primer tümörü kolon olan hastaların %53,6'sı (n=15) *PIK3CA* açısından mutant olarak saptandı. (p=1,000)

Tablo 15. Primer Tümör Yerine Göre Mutasyon Analizi

	REKTUM	KOLON	TOPLAM (%)	P değeri
KRAS				
WT (%)	41(73.2)	63(82.9)	104(78.8)	
Mutant (%)	15(26.8)	13(17.1)	28(21.2)	
Toplam (%)	56(42.4)	76(57.6)	132(100)	p=0,201
BRAF				
WT (%)	50(98.0)	64(94.1)	114(95.8)	
Mutant (%)	1(2.0)	4(5.9)	5(4.2)	
Toplam (%)	51(42.9)	68(57.1)	119(100)	p=0,390
NRAS				
WT (%)	43(95.6)	48(81.4)	91(87.5)	
Mutant (%)	2(4.4)	11(18.6)	13(12.5)	
Toplam (%)	45(43.3)	59(56.7)	104(100)	p=0,037
PIK3CA				
WT (%)	10(47.6)	13(46.4)	26(53.1)	
Mutant (%)	11(52.4)	15(53.6)	23(46.9)	
Toplam (%)	23(46.9)	28(57.1)	49(100)	p=1,000

4.5.METASTAZ DURUMU

Tüm olgularımız metastaz varlığı yönünden incelendiğinde; *KRAS* analizi yapılan olgularımızın %90,6'sında (n=116), *BRAF* analizi yapılan olgularımızın %91,3'ünde (n=105), *NRAS* analizi yapılan olgularımızın %89,4'ünde (n=93) ve *PIK3CA* analizi yapılan triple negatif olgularımızın %95,7'sinde (n=45) metastaz varlığı saptandı.



Şekil 27. Metastaz Varlığı

İlgili gen bölgeleri yabanıl veya mutant olmaları açısından incelendiğinde metastaz görülen *KRAS* genlerinin %21,6'sının (n=25, p=0,724), *BRAF* genlerinin %3,8'inin (n=4, p=0,371), *NRAS* genlerinin 11,8'inin (n=11, p=1,000) mutant genlerde gözlemlendiği bulundu. *PIK3CA* geninin metastaz açısından değerlendirilmesinde ise triple negatif 45 olgudaki metastazların %53,2'si (n=25) yabanıl tip hastalarda, %42,6'sı (n=20) mutant hastalarda gözlemlendi. (p=0,699).

4.6. TÜMÖR EVRESİ VE MUSASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Olgularımızın klinik verilerinin değerlendirilmesinde Evre 0, Evre I, Evre IIA ve Evre IIB'yi "Erken Evre", Evre IIIA, IIIB, IIIC ve Evre IV'ü "İleri Evre" kabul ettik. İlgili gen bölgelerinin analizinde genin yabanıl veya mutant olmasına karşılık gerçekleştirilen analizde:

KRAS yabanıl hastalarımızın %76'sının (n=73) ve mutant hastalarımızın %24'ünün (n=23) ileri evrede olduğu gözlemlendi (p=0.335).

BRAF yabanıl hastalarımızın %96.5'i (n=83) ve mutant hastalarımızın %3.5'i (n=3) ileri evre çıktı (p=0.607)

NRAS geninin analizinde bu oran mutant hastalarda %11.5 (n=9), yabanıl hastalarda ise 88.5 (n=69) olarak çıktı (p=1.000)

Triple negatif olan ve *PIK3CA* gen analizi yapılan ileri evre hastalarımızın ise %56.4'ü (n=22) yabanıl tip iken %43.6'sı (n=17) mutant olarak gözlemlendi (p=0.279)

Tablo 16. Evre-Mutasyon İlişkisi

	WT (%)	Mutant (%)	Toplam (%)	P değeri
	KRAS			
Erken Evre	29(85.3)	5(14.7)	34(26.2)	
İleri Evre	73(76.0)	23(24.0)	96(73.8)	
Toplam	102(78.5)	28(21.5)	130(100)	p=0.335
	BRAF			
Erken Evre	29(93.5)	2(6.5)	31(26.5)	
İleri Evre	83(96.5)	3(3.5)	86(73.5)	
Toplam	112(95.7)	5(4.3)	117(100)	p=0.607
	NRAS			
Erken Evre	21(87.5)	3(12.5)	24(23.5)	
İleri Evre	69(88.5)	9(11.5)	78(76.5)	
Toplam	90(88.2)	12(11.8)	102(100)	p=1.000
	PIK3CA			
Erken Evre	3 (33.3)	6 (66.7)	9 (18.8)	
İleri Evre	22 (56.4)	17 (43.6)	39 (81.3)	
Toplam	25 (52.1)	23 (47.9)	48 (100)	p=0.279

4.7.MUTANT OLGULARIN ÖZELLİKLERİ

KRAS mutant olgularda %39.3'lük bir oranla primer tümör bölgesi rektum olarak gözlenirken, *BRAF*, *NRAS* ve *PIK3CA* mutant olgularımızda primer bölgesi en çok kolonda gözlemlenmiştir.

BRAF Mutant olgularımızın %60'ı kadınlarda, *PIK3CA* mutant olgularımızın ise %65.2'si erkeklerde gözlemlenmiştir.

BRAF mutant olgularda 60 yaş üzeri hasta oranımız %60 iken *PIK3CA* gen bölgesi incelemesinde %65.2'lik bir oranla en çok mutant olgu 60 yaş ve altı hastalarda gözlenmiştir. Olgular diferansiyasyon açısından değerlendirildiğinde *KRAS*, *NRAS* ve *PIK3CA* olgularda en çok orta diferansiye gözlenirken *BRAF* mutant olgularda iyi diferansiye hastalarımız daha çoğunluktadır.

Histopatolojik olarak taşlı yüzük şeklindeki karsinoma sadece *PIK3CA* mutant hastada rastlanmıştır.

PIK3CA Mutant hastalarda diğer gen analiz bölgelerine kıyasla %95.2'lik yüksek bir oranda metastaz olmayan olgular olduğu gözlenmiştir.

KRAS, *NRAS* ve *PIK3CA* hastalarımızda metastazın en çok karaciğere yaptığı gözlemlenmiştir. *BRAF* mutant olgularımızda ise akciğer ve omentum birincil metastaz bölgesi olarak çıkmıştır.

Tablo 17. Mutant Olguların Karakteristiği

Karakteristik	Toplam Sayı (%)	<i>KRAS</i> (n=132)	<i>BRAF</i> (N=5)	<i>NRAS</i> (N=13)	<i>PIK3CA</i> (N=23)
CİNSİYET (n=132)					
Erkek	86 (65.2)	13 (46.4)	2 (40.0)	7 (53.9)	15 (65.2)
Kadın	46 (34.8)	15 (53.6)	3 (60.0)	6 (46.1)	8 (34.8)
TANI YAŞI					
≤60	73 (55.3)	15 (53.6)	2 (40.0)	8 (61.5)	15 (65.2)
>60	59 (44.7)	13 (46.4)	3 (60.0)	5 (38.5)	8 (34.8)
PRİMER TÜMÖR BÖLGESİ (n=132)					
Rektosigmoid	14 (10.6)	4 (14.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.7)
Rektum	42 (31.8)	11(39.3)	1 (20.0)	2 (15.4)	8 (34.8)
Kolon	56 (42.4)	10 (35.7)	3 (60.0)	10 (76.9)	11 (47.8)
Kolorektal	3 (2.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.4)
Sigmoid	14 (10.6)	3 (10.7)	1 (20.0)	1 (7.7)	0 (0.0)
Çekum	3 (2.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.4)
DİFERENSİYASYON (n=119)					
Az Diferansiye	13 (10.9)	1 (3.6)	1 (20.0)	2 (18.2)	6 (30.0)
Orta Diferansiye	63 (52.9)	14 (50.0)	1 (20.0)	6 (54.6)	12 (60.0)
İyi Diferansiye	43 (36.1)	13 (46.4)	3 (60.0)	3 (27.3)	2 (10.0)
EVRE (n=130)					
Evre I	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (8.3)	0 (0.0)
Evre II	16 (12.3)	5 (17.9)	2 (40.0)	2 (16.4)	4 (17.4)
Evre III	43 (33.1)	8 (28.6)	1 (20.0)	4 (32.8)	6 (26.1)
Evre IV	70 (53.9)	15 (53.6)	2 (40.0)	5 (41.7)	13 (56.5)
HİSTAPATOLOJİK TİP (n=132)					
Adenokarsinom	127 (96.2)	28 (100.0)	5 (100.0)	13 (100.0)	22 (93.7)
Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom	5 (3.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.4)
METASTAZ DURUMU (n=128)					
Var	116 (87.9)	25 (89.3)	4 (80.0)	11 (84.6)	1 (4.8)
Yok	12 (9.1)	3 (10.7)	1 (20)	2 (13.4)	20 (95.2)
METASTAZ YERİ (n=117)					
Lenf Nodu	3 (2.3)	1 (4.0)	0 (0.0)	1 (9.1)	0 (0.0)
Karaciğer	61 (46.2)	13 (52.0)	0 (0.0)	4 (36.4)	12 (57.1)
Akciğer	27 (20.5)	6 (24.0)	2 (50.0)	1 (9.1)	6 (28.6)
Rektum	1 (0.8)	1 (4.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Over	2 (1.5)	1 (4.0)	0 (0.0)	1 (9.1)	1 (4.8)
Omentum	9 (6.8)	1 (4.0)	2 (50.0)	2 (18.2)	0 (0.0)
Karaciğer + Akciğer	12 (9.1)	2 (8.0)	0 (0.0)	2 (18.2)	2 (9.6)
TÜMÖR YERİ (n=129)					
Sigmoid	29 (22.0)	6 (22.2)	2 (40.0)	3 (23.1)	5 (21.7)
Sağ Kolon	22 (16.7)	4 (14.8)	0 (0.0)	3 (23.1)	3 (13.0)
İnen Kolon	11 (8.3)	1 (3.7)	1 (20.0)	3 (23.1)	3 (13.0)
Rektum	45 (34.1)	11 (40.7)	0 (0.0)	1 (7.7)	10 (43.5)
Rektosigmoid	20 (15.2)	5 (18.5)	1 (20.0)	2 (15.4)	2 (8.7)
Transvers Kolon	2 (1.5)	0 (0.0)	1 (20.0)	1 (7.7)	0 (0.0)
ADJUVAN TEDAVİ (n=110)					
Var	59 (44.7)	13 (56.5)	3 (60.0)	6 (54.5)	8 (47.1)
Yok	51 (38.6)	10 (44.5)	2 (40.0)	5 (45.5)	9 (52.9)

4.8.DİFERANSİYASYON VE MUTASYON DURUMU

Analizi yapılan her 4 gen bölgesinde de hastalarımızın yaklaşık %50'si orta diferansiyasyon göstermektedir. Yine tüm analiz genlerimizde kötü diferensiyasyon gösteren olgularımızın çok büyük bir kısmı yabanıl olarak izlenmiştir. Bu oran *KRAS* ve *BRAF* genlerinde %90'dır.

4.9.YAŞAM ANALİZLERİ

Tüm olgu grubumuzun genel sağkalım süre ortalaması (ort ± standart hata; min-max) 77,61 ± 6,65; 64,6-90,6 olarak gözlenmiştir.

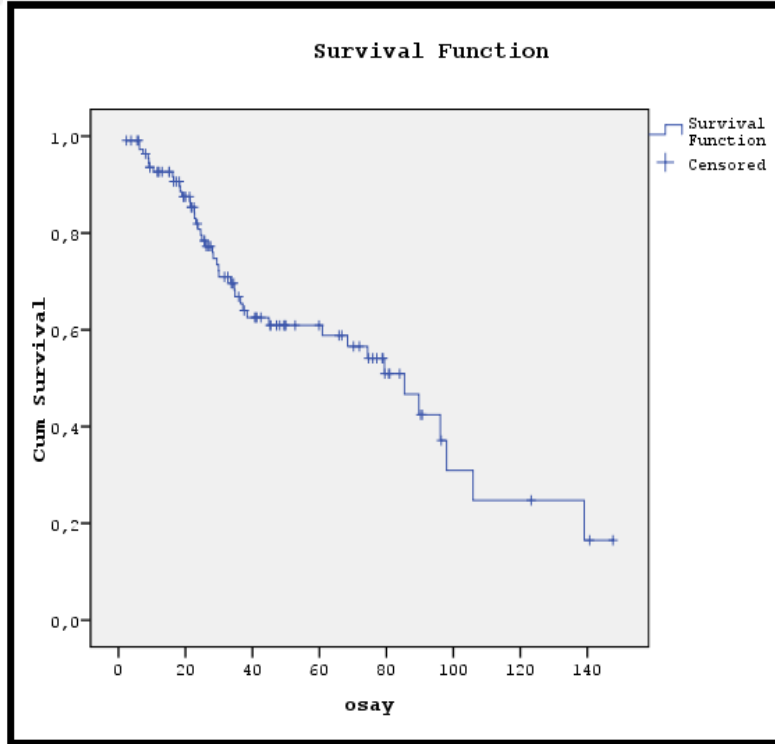
Medyan sağkalım 85,43 ± 10,90; 64,1-106,8'dir.

Olgularımız arasından sadece *KRAS* mutasyon analizi yapılan hastalar (n=132) seçildiğinde; *KRAS* mutasyonu gözlenmeyen (wildtype) grubun genel sağkalım süre ortalaması (ort ± standart hata; min-max) 75,33 ± 7,01; 61,6-89,1 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım 85,43 ± 11,75; 62,4-108,5'dir.

KRAS mutasyonu pozitif çıkan grubumuzun ise genel sağkalım süre ortalaması (ort ± standart hata; min-max) 80,13 ± 13,92; 52,9-107,4 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım ise 89,73 ± 37,17; 16,9-162,6'dır.

Tablo 18. Diferansiyasyon Dağılımı

	WT (%)	Mutant (%)	Toplam (%)
KRAS			
Kötü Diferansiye	9 (90.0)	1(10)	10(8.4)
Orta Diferansiye	48(76.2)	15(23.8)	63(52.9)
İyi Diferansiye	34(73.9)	12(26.1)	46(38.7)
Toplam	91(76.5)	28(23.5)	119(100)
BRAF			
Kötü Diferansiye	9(90.0)	1(10.0)	10(9.3)
Orta Diferansiye	55(98.2)	1(1.8)	56(52.3)
İyi Diferansiye	38(92.7)	3(7.3)	41(38.3)
Toplam	102(95.3)	5(4.7)	107(100)
NRAS			
Kötü Diferansiye	7(77.8)	2(22.2)	9(9.5)
Orta Diferansiye	43(87.8)	6(12.2)	49(51.6)
İyi Diferansiye	34(91.9)	3(8.1)	37(38.9)
Toplam	84(88.4)	11(11.6)	95(100)
PIK3CA			
Kötü Diferansiye	5 (83.3)	1 (16.7)	6 (13.0)
Orta Diferansiye	11 (47.8)	12 (52.2)	23 (50.0)
İyi Diferansiye	10 (58.8)	7 (41.2)	17 (37.0)
Toplam	26 (56.5)	20 (43.5)	46 (100)



Şekil 28. Tüm Olgularda Sağkalım Analizi

Tablo 19. KRAS Sağkalım Ortalaması

	Genel Sağkalım Ortalama			
	Tahmin	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
KRAS Mut. Yok	75,325	7,010	61,586	89,064
KRAS Mut. Var	80,125	13,915	52,851	107,399
KRAS Analizi Yapılanlar	77,606	6,651	64,570	90,643

Tablo 20. KRAS Sağkalım Medyan

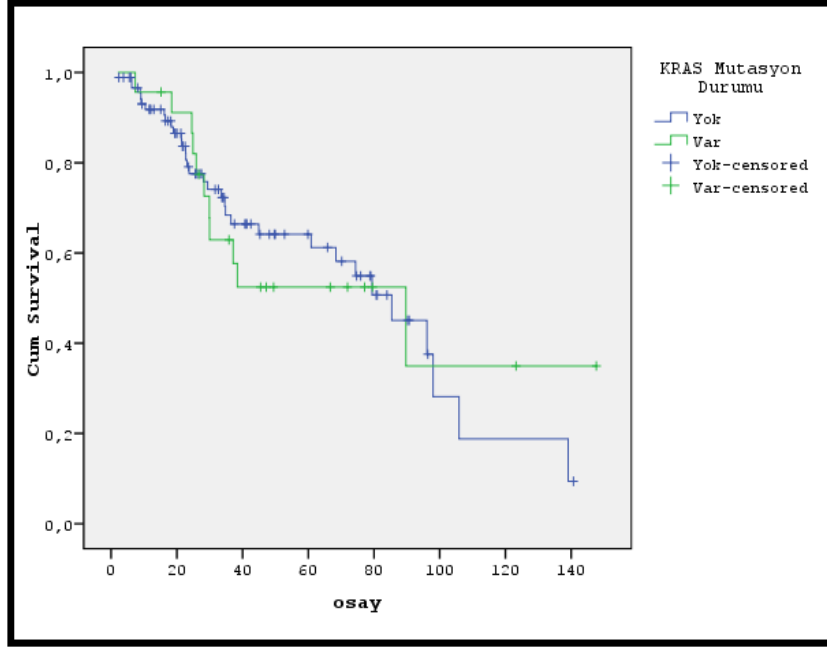
	Medyan Sağkalım			
	Tahmin	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
KRAS Mut. Yok	85,433	11,745	62,414	108,453
KRAS Mut. Var	89,733	37,166	16,887	162,579
KRAS Analizi Yapılanlar	85,433	10,898	64,073	106,793

Log Rank p= 0,956

KRAS yabanıl olgulardan *BRAF* analizi yapılan olgularımızın (n=119) genel sağkalım süre ortalaması (ort $\pm$ standart hata; min-max) 78,39 $\pm$ 7,22; 64,2-92,5 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım 85,43 $\pm$ 11,45; 63,0-107,9'dur.

BRAF mutasyonu gözlenmeyen (wildtype) grubun genel sağkalım süre ortalaması (ortalama $\pm$ standart hata; min-max) 78,71 $\pm$ 7,27; 64,5-93,0 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım 85,43 $\pm$ 11,75; 9,87-66,1-104,8'dir.

BRAF mutasyonu pozitif çıkan grubumuzun ise genel sağkalım süre ortalaması (ort $\pm$ standart hata; min-max) 28,71 $\pm$ 4,21; 20,5-37,0 olarak gözlenmiştir.



Şekil 29. KRAS Karşılaştırmalı Sağkalım Analizi

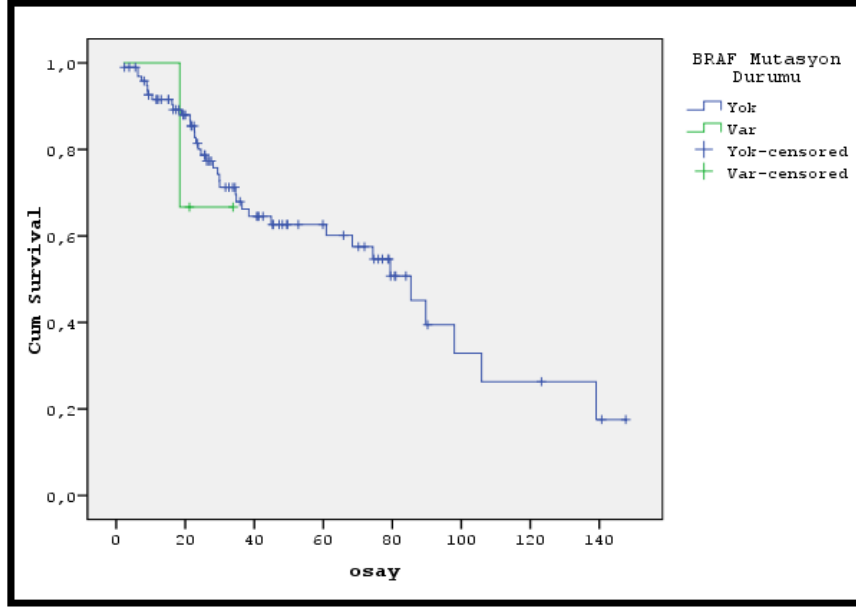
Tablo 21. BRAF Mutasyonu Genel Sağkalım Süre Ortalaması

	Genel Sağkalım Ortalama			
	Tahmini	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
BRAF Mutasyonu Yok	78,706	7,270	64,456	65,735
BRAF Mutasyonu Var	28,711	4,209	20,461	36,962
BRAF Analizi Yapılanlar	78,385	7,219	64,236	92,534

Tablo 22. BRAF Mutasyonu Medyan Sağkalım Ortalaması

	Medyan Sağkalım			
	Tahmin	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
BRAF Mutasyonu Yok	85,433	9,866	66,095	104,772
BRAF Mutasyonu Var	75,32	8,642	62,023	98,367
BRAF Analizi Yapılanlar	85,433	11,445	63,000	107,866

Log Rank p= 0,602



Şekil 30. BRAF Karşılaştırmalı Sağkalım Analizi

Double negatif olgulardan *NRAS* analizi yapılan olgularımızın (n=104) genel sağkalım süre ortalaması (ort $\pm$ standart hata; min-max) $72,39 \pm 7,39$; 57,9-86,9 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım $79,43 \pm 11,08$; 57,7-101,1'dir.

NRAS mutasyonu gözlenmeyen (wildtype) grubun genel sağkalım süre ortalaması (ort $\pm$ standart hata; min-max) $68,82 \pm 5,72$; 57,6-80,0 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım $79,43 \pm 8,60$; 62,6-96,3'dür.

NRAS mutasyonu pozitif çıkan grubumuzun ise genel sağkalım süre ortalaması (ort $\pm$ standart hata; min-max) $67,32 \pm 21,54$; 25,1-109,5 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım $29,97 \pm 8,93$; 12,5-47,5'dur.

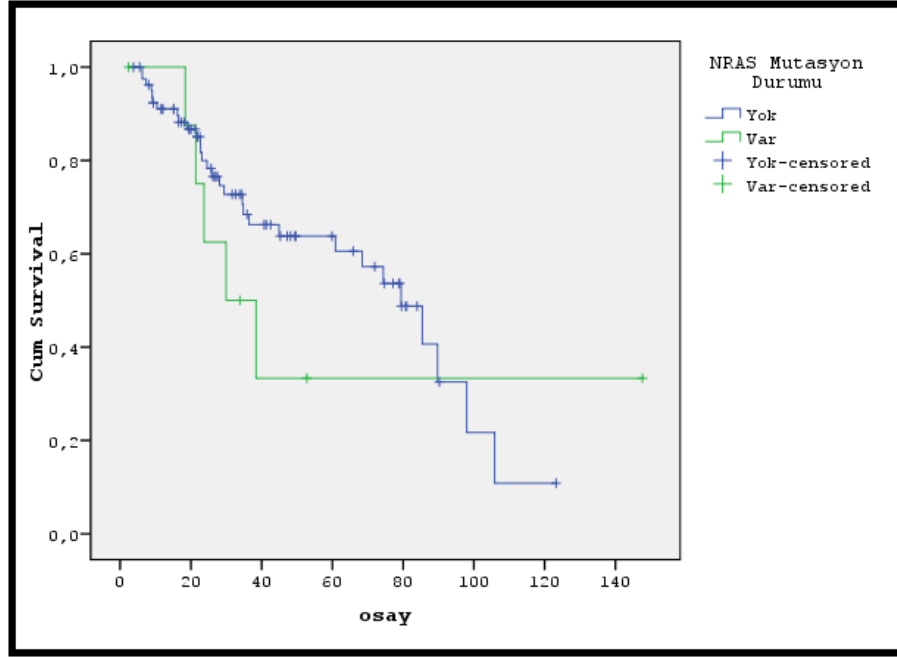
Tablo 23. NRAS Mutasyonu Genel Sağkalım Süre Ortalaması

	Genel Sağkalım Süre Ortalaması			
	Tahmini	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
NRAS Mutasyonu Yok	68,819	5,724	57,600	80,038
NRAS Mutasyonu Var	67,318	21,536	25,108	109,528
NRAS Analizi Yapılanlar	72,390	7,394	57,899	86,882

Tablo 24. NRAS Mutasyonu Medyan Sağkalım Ortalaması

	Medyan Sağkalım			
	Tahmin	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
NRAS Mutasyonu Yok	79,433	8,599	62,579	96,288
NRAS Mutasyonu Var	29,967	8,930	12,464	47,469
NRAS Analizi Yapılanlar	79,433	11,077	57,723	101,144

Log Rank p= 0,534



Şekil 31. NRAS Karşılaştırmalı Sağkalım Analizi

Triple negatif olgulardan *PIK3CA* analizi yapılan olgularımızın (n=49) genel sağkalım süre ortalaması (ort ± standart hata; min-max) 59,42 ± 7,11; 45,5-73,4 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım 60,90± 17,22; 27,1-94,7'dir.

PIK3CA mutasyonu gözlenmeyen (wildtype) grubun genel sağkalım süre ortalaması (ort ± standart hata; min-max) 64,53 ± 11,23; 42,5-86,5 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım 68,40 ± 25,97; 17,5-119,3'dür.

PIK3CA mutasyonu pozitif çıkan grubumuzun ise genel sağkalım süre ortalaması (ort ± standart hata; min-max) $51,56 \pm 6,72$; 38,4-64,7 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım $44,93 \pm 16,44$; 12,7-77,2'dir.

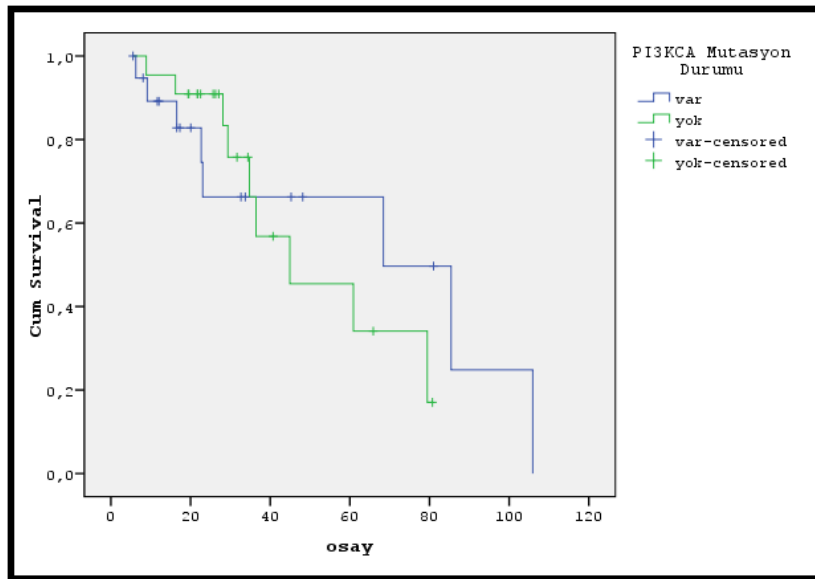
Tablo 25. *PIK3CA* Mutasyonu Genel Sağkalım Süre Ortalaması

	Genel Sağkalım Süre Ortalaması			
	Tahmini	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
PIK3CA Mutasyonu Yok	68,819	5,724	57,600	80,038
PIK3CA Mutasyonu Var	67,318	21,536	25,108	109,528
PIK3CA Analizi Yapılanlar	72,390	7,394	57,899	86,882

Tablo 26. *PIK3CA* Mutasyonu Medyan Sağkalım Ortalaması

	Medyan Sağkalım			
	Tahmin	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
PIK3CA Mutasyonu Yok	79,433	8,599	62,579	96,288
PIK3CA Mutasyonu Var	29,967	8,930	12,464	47,469
PIK3CA Analizi Yapılanlar	79,433	11,077	57,723	101,144

Log Rank p= 0,616



Şekil 32. *PIK3CA* Karşılaştırmalı Sağkalım Analizi

İncelenen 4 gen bölgesinde mutasyon varlığı olmaması (tüm genler yabancı) ve herhangi bir gende (veya birden çok gende) mutasyon varlığı olan olgularımızın karşılaştırması yapıldığında ise;

Herhangi bir gen bölgesinde hiçbir mutasyon içermeyen hastaların genel sağkalım süre ortalaması (ort $\pm$ standart hata; min-max) $80,14 \pm 8,77$; 62,9-97,3 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım $96,10 \pm 15,95$; 64,8-127,4'dür.

Herhangi bir gen bölgesinde mutasyon durumu pozitif çıkan grubumuzun ise genel sağkalım süre ortalaması (ort $\pm$ standart hata; min-max) $72,24 \pm 9,69$; 53,2-91,3 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım ise $85,43 \pm 34,78$; 17,3-153,6'dır.

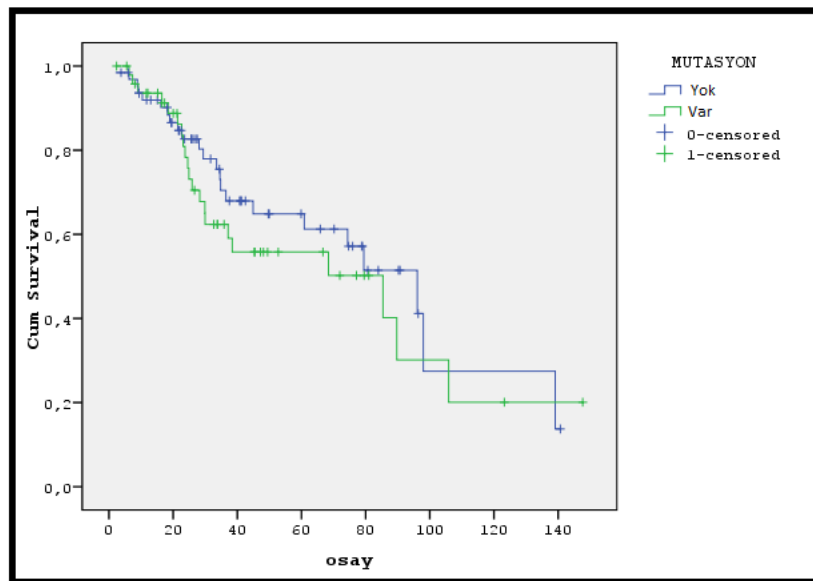
Tablo 27. Herhangi Bir Mutasyonun Varlığında Genel Sağkalım Süre Ortalaması

	Genel Sağkalım Süre Ortalaması			
	Tahmini	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
Mutasyonu Yok	80,135	8,771	62,944	97,326
Mutasyonu Var	72,244	9,694	53,244	91,245
Tümü	77,606	6,651	64,570	90,643

Tablo 28. Herhangi Bir Mutasyonun Varlığında Medyan Sağkalım Ortalaması

	Medyan Sağkalım			
	Tahmin	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
Mutasyonu Yok	96,100	15,949	64,840	127,360
Mutasyonu Var	85,433	34,779	17,267	153,600
Tümü	85,433	10,898	64,073	106,793

Log Rank p= 0,462



Şekil 33. Mutasyon Varlığı Karşılaştırmalı Sağkalım Analizi

İncelenen 4 gen bölgesinde mutasyon varlığı olmaması (tüm genler yabancı) ile sadece *PIK3CA* gen bölgesinde mutasyon olan olgularımızın karşılaştırması yapıldığında ise;

Analizi yapılan olgularımızın genel sağkalım süre ortalaması (ort $\pm$ standart hata; min-max) 76,10 $\pm$ 7,15; 62,1-90,1 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım 85,43 $\pm$ 10,95; 64,0-107,0'dır.

Alınan grupta herhangi bir gen bölgesinde hiçbir mutasyon içermeyen hastaların genel sağkalım süre ortalaması (ort $\pm$ standart hata; min-max) 80,14 $\pm$ 8,77; 62,9-97,3 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım 96,10 $\pm$ 15,95; 64,8-127,4'dür.

Sadece *PIK3CA* geninde mutasyon gözlenen grubumuzun ise genel sağkalım süre ortalaması (ort $\pm$ standart hata; min-max) 64,53 $\pm$ 11,23; 42,5-86,5 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım ise 68,40 $\pm$ 25,97; 17,5-119,3'dür.

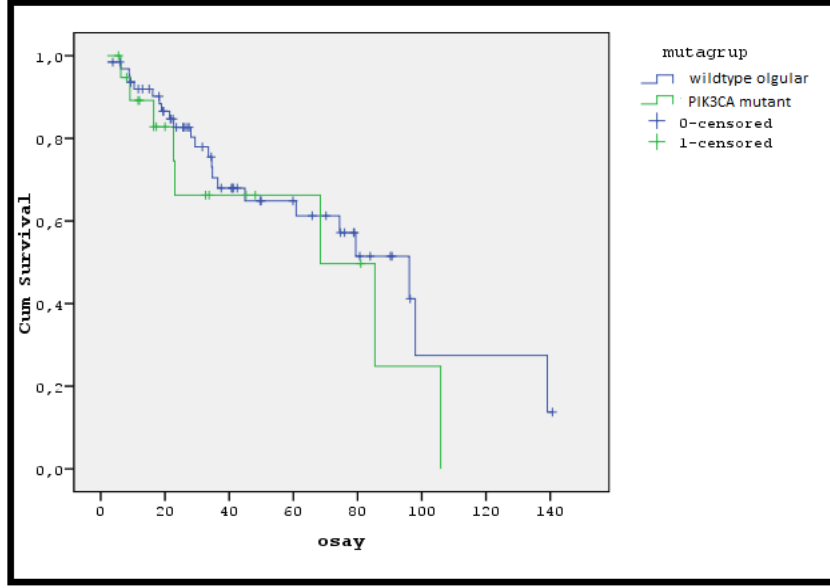
Tablo 29. *PIK3CA* Mutasyonun Varlığında Diğer Tüm Yabancı Olgulara Göre Genel Sağkalım Süre Ortalaması

	Genel Sağkalım Süre Ortalaması			
	Tahmini	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
Mutasyonu Yok	80,135	8,771	62,944	97,326
PIK3CA Mutasyonu Var	64,527	11,233	42,510	86,544
Tümü	76,097	7,145	62,093	90,101

Tablo 30. *PIK3CA* Mutasyonun Varlığında Diğer Tüm Yabancı Olgulara Göre Medyan Sağkalım Ortalaması

	Medyan Sağkalım			
	Tahmin	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
Mutasyonu Yok	96,100	15,949	64,840	127,360
PIK3CA Mutasyonu Var	68,400	25,972	17,496	119,304
Tümü	85,433	10,954	63,963	106,904

Log Rank p= 0,404



Şekil 34. *PIK3CA* Mutasyonunun Varlığında Diğer Tüm Yabancı Olgularda Medyan Sağkalım

Tüm olgu grubumuzda 12 aylık sağ kalım %92.6, 24 aylık sağ kalım %80.7, 5 yıllık sağ kalım %60.9 olarak bulunmuştur. İncelenen gen bölgelerinde wild type (yabancı) olanlar ile mutant olanlar karşılaştırıldığında; Yabancı tip olanlarda 12 aylık sağ kalım en yüksek *KRAS* geninde, 24 aylık sağkalım en yüksek *BRAF* ve *NRAS* geninde, 5 yıllık sağkalım en yüksek *PIK3CA* genindeki çalışmada gözlenmiştir. Mutant olanlarda 12 aylık sağ kalım en yüksek *KRAS* ve *PIK3CA* geninde, 24 aylık sağkalım en yüksek *KRAS* geninde, 5 yıllık sağkalım en yüksek *BRAF* genindeki çalışmada gözlenmiştir.

Tablo 31. Olgular Arası 12 ay, 24 ay ve 5 Yıllık Sağkalım Analizi

	12 Aylık	24 Aylık	5 Yıllık
TÜM OLGULAR (%)	92	80	61
KRAS			
Wild Type (%)	91	78	64
Mutant (%)	95	91	52
BRAF			
Wild Type (%)	92	80	62
Mutant (%)	66	66	66
NRAS			
Wild Type (%)	91	80	64
Mutant (%)	87	62	33
PIK3CA			
Wild Type (%)	89	66	66
Mutant (%)	95	90	46

5.TARTIŞMA

Çalışmamızda *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonlarını hastaların klinik özellikleri ile beraber sırasıyla 132, 104, 119 ve 49 KRK vakalarında retrospektif olarak gerçekleştirdik. Bu çalışma, Türk popülasyonunda yabancı tip *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* taşıyan KRK hastalarında *PIK3CA* mutasyonlarını değerlendiren ilk çalışmadır.

Mutasyon durumlarını değerlendirmek için *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* gen mutasyonlarını PyroMark Q24 (QIAGEN) aracılığıyla; *PIK3CA* mutasyonlarını ise gerçek zamanlı PCR yöntemi ile analiz edildi.

KRK'li hastalarda görülen somatik mutasyonların belirlenmesi için kapsamlı bir literatür taraması yapıldı. Olguların 2532'si Orta Doğu ülkelerinden 10 çalışma, 10100'ü Batı ülkelerinden 23 çalışma ve 1662'si Asya ülkelerinden 9 çalışmadan elde edilmiştir. Her çalışmada kullanılan test yöntemi ve saptanan mutasyon oranları Tablo 31'de özetlenmiştir.

Yabancı tip *KRAS* ve *NRAS* onkogenleri hücrel sinyal transdüksiyonunu düzenleyen G proteinlerine homoloji olan küçük bir protein ailesini kodlar (157). *KRAS* mutasyonunun frekansı dünya genelinde farklılık göstermektedir.

Soliman ve ark. *KRAS* gen mutasyonunun, Mısır KRK'lerinde batı ülkelerinin aksine genel olarak nadir ve sadece 40 yaşın üzerindeki hastalarda tespit edildiğini bildirmiştir (hastaların %11'inde) (158). Elbjeirami ve ark. yaptığı çalışmada ise Ürdünlü nüfusta *KRAS* mutasyon frekansı %44 olarak bildirmiş (159).

Çalışmada mutasyona uğramış *KRAS* yüzdesi %21.2 ile daha önce Türkiye'de Ekinci ve ark. tarafından yapılan çalışmaya benzerlik göstermekle birlikte (119). Ozen ve ark. gözlemlediğinden (120) ve komşu ülke Yunanistan'da Samara ve ark. tarafından saptanan %36.6 oranından farklılık göstermektedir (148). *KRAS* mutasyon sonucumuz taradığımız bazı batı ülkelerin bildirilen sonuçlarına benzemekte; ancak diğerlerine göre birçok farklılık göstermektedir (116, 133, 159, 147, 136, 138, 144, 130).

Çalışmamızdaki veriler *KRAS* gen mutasyonu ile tanı yaşı, primer tümör bölgesi, diferensiyasyon ve evre gibi herhangi bir kovaryant arasında istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir. Bu veriler Kawazoe ve ark. saptadığı verilerle uyumludur (161). Ancak Zhen ve ark. mutant hastalarda tümör diferensiyasyonu ve metastaz bölgesi arasında sırasıyla $p=0.02$ ve $p=0.05$ olarak anlamlı fark göstermiştir (162). Çalışmada, yalnızca erkek ve kadın hastalar arasında mutasyon durumu karşılaştırıldığında $p=0.02$ olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir.

KRAS mutasyon fenotip dağılımı batı ülkelerinin verilerine dayanarak daha çok G12D olarak gözlenmekte ancak bizim sonuçlarımızda G13D mutant olgularının %32.1'ini oluşturarak birinci sırada yer almaktadır. *KRAS* geninin on ikinci kodonunda daha sık görülen değişim batı ülkelerinde G12D iken (163,164) bizim çalışmamızda G12V olarak gözlemlenmiştir. G12D ise toplam mutant hastaların %17.9'unu oluşturmaktadır. Çalışmamızda mutant yüzde sırası G13D, G12V, G12D, G12C, G12S, G12A, G12R, Q61R olarak saptanmıştır. Bu veriler, *KRAS* mutasyon modelinde ırklar arasında bazı farklılıkların olabileceğini düşündürmektedir.

KRAS mutasyon sıklık oranlarının aksine, *NRAS* mutasyonu Türk popülasyonunda herhangi bir kolorektal kanserde daha önce bildirilmemiştir.

Yapılan literatür taramasında *NRAS* mutasyon frekans oranları oldukça düşük bulunmuştur. Derlenen Batı, Orta Doğu ve Asya ülkelerinde yapılan çalışmaların sadece 9'unda *NRAS* mutasyonu değerlendirilmiştir (20, 51, 53, 146, 129, 131, 141, 149, 161). Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre hastaların %12.5'i mutant olarak görülmüştür. Çalışmamızda *NRAS* mutasyonları 61. kodonda meydana gelmiştir ve bu sonuç De Roock (20) ve ark. yayınladığı sonuçlarla uyumludur. Hastaların karakteristik özelliklerini mutasyon durumuna göre değerlendirdiğimizde, primer tümör bölgesi kolon olan hastalarda anlamlı oranda ($p=0.03$) mutasyon görülmüştür, Kawazoe ve ark.ları bütün Ras genlerini dahil ederek, olgularda primer tümör bölgesinin rektum olduğu olgularda anlamlı oranda mutasyon bulmuşlar ($p=0.08$) (161).

Ras genlerinde olguların 12 aylık ve 5 yıllık sağkalım analizleri incelendiğinde hem *KRAS* hem *NRAS* mutant olan hastalar yabancı olgularla karşılaştırıldığı zaman daha düşük 5

yıllık sağkalım göstermektedir. *KRAS* mutant olan hastaların 12 aylık sağkalımı %95 iken bu yüzde 5 yıllık sağkalımda %52'ye düşmüştür. Bu oran *NRAS* mutasyonlarında sırasıyla %87 ve %33 olarak elde edilmiştir. Sonuçlara göre, mutant *Ras* genleri uzun zamanda daha da ölümcül bir etki göstermektedir.

BRAF geni *Ras-Raf-MEK-ERK* veya *MAPK* sinyal yolağının parçası olan bir proteini kodlamaktadır (165). Bu yolağın aktifleşmesi hücrel büyüme ve çoğalmaya neden olur. *BRAF* gen mutasyonu kötü prognoza neden olmaktadır. Zhe-Zhen Li ve ark. 322 örnek arasında 11 *BRAF* mutasyonu tespit etmişlerdir. Swati ve ark.ları *BRAF* gen mutasyon oranının dünya genelinde %2'den %25'e olmak üzere büyük farklılık taşıdığını göstermişler. Bizim sonuçlarımıza göre, toplam 119 hastanın %4.2'sinde mutasyon gözlenmiştir. Bu sonuç bazı Avrupa ülkelerindeki sonuçlara benzerlik gösterirken (130, 146) bazı Asya (151, 154) veya Avrupa verilerinden farklıdır (116, 138). Mutasyon sıklığındaki bu fark, mutasyonları değerlendirilmesinde farklı yöntemlerin kullanılmasına bağlı olabilir.

Çalışmamızda, *BRAF* mutasyonu ile karaciğer metastazı anlamlı ilişki tespit edilmiştir arasında ($p=0.04$). Kawazoe ve ark. 264 vakadan oluşan çalışmalarında toplam 14 hastada mutasyon tespit etmişler ve mutant olguların anlamlı olarak periton metastazı gerçekleştirdiğini gözlemlemişlerdir ($p=0.009$). Tran ve ark. (166) batı toplumuna dayalı çalışmalarında *BRAF* mutant KRK'in kadınlarda görülme oranının yüksek olduğunu bildirmiştir. Bu oran bizim çalışmamızda 37 kadın hastada 3 ve 77 erkek hastada 2 mutasyon olmak üzere sayı olarak düşük olsa da benzerlik göstermektedir. Ancak çalışmamızda *BRAF* mutasyonu ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.33$).

Zhang ve ark. (167) *BRAF* mutasyonu ile kolon kanseri arasında anlamlı bir ilişki olduğunu gösteren çalışmasının aksine çalışmamızda *BRAF* mutasyonu ile tümör bölgesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.3$); ancak *BRAF* mutasyonu bulunan kolon bölgesinin yüzde oranı rektum bölgesiyle kıyaslandığında sırasıyla %5.9 ve %2 olarak tespit edilmiştir.

BRAF mutant ve yabanıl tip olgularımızın 12 aylık sağkalımları sırasıyla %66 ve %92 olarak gözlemlenmiştir ve bu düşüş *BRAF* mutasyonlarının ölümcül olduğunu göstermektedir.

Bunun yanında, sağkalım oranlarını etkileyen diğer gen mutasyonları, tanı anında bulunan uzak metastaz(lar) ve tedavi yanıtı gibi başka faktörler de unutulmamalıdır.

PIK3CA geni, hücre sağkalımı sinyallerinin hücre içerisinde önemli rolü olan *PI3K*'nin katalitik altbirimini kodlar (168). Bir çok araştırma *PIK3CA* geninin somatik mutasyonlarının, KRK'yi de içeren birçok kanser oluşumu ve hastalık progresyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir (169). Literatüre baktığımızda *PIK3CA*'da mutasyon oranları yüksek oranda varyasyon göstermektedir. Farklı çalışmalarda, KRK'li hastaların mutasyon oranı 7 ile 30 arasında gözlemlenmiştir (170, 171). Türk popülasyonunda *PIK3CA* mutasyonlarının sıklığını tanımlayan çok az çalışma olmakla birlikte, bu konuda KRK'de yapılmış çalışma bulunmamaktadır.

KRAS, *NRAS* ve *BRAF* genleri yabanıl tip olan hasta örnekleri (triple negatif) *PIK3CA* durumunu incelemek için çalışmaya dahil edilmiştir. Toplam 49 olgunun 22'sinde mutasyon saptandı. Hastaların %30.6'sında ekzon 9'da ve %16.3'ünde ekzon 20'de mutasyon gözlemlenmiştir. Bizim elde ettiğimiz toplam mutasyon oranı Qiong ve ark. (172) yaptıkları retrospektif çalışma sonuçlarına % 44.1 uyumludur. Guedes ve ark.ları (173) yaptıkları çalışmada 59 hasta içinde 22'sinde *PIK3CA* mutasyonuna rastlamışlardır. Ekzon 9'daki mutasyon bizim çalışmamızda gözlemlendiği gibi en sık rastlanan mutasyon tipi olarak tanımlanmıştır. Simi ve ark. (134) *PIK3CA*'da %17.2 oranında mutasyon buldukları çalışmada, mutasyonların %11.2'si ekzon 9 ve %6'sı ekzon 20 mutasyonu olarak tespit edilmiştir. *PIK3CA*'nın 542, 545 ve 1047. kodonlarındaki amino asit değişimi çeşitli kanserlerde en sık görülen mutasyonlardır. Bu 3 mutasyon fonksiyonel olarak aktif olmasının hücrenin kontrolsüz büyümesi, istilası ve transformasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (174, 175, 176). Bizim çalışmamızda mutasyon oranları E542K'de %26.1, E545D ve E545K'de sırasıyla %26.1, %13.1, H1047R ve H1047L'de %30.4 ve %4.4 olarak gözlemlenmiştir. Lurkin ve ark. (140) E545K, E542K ve H1047R için sırasıyla %40, %15.6 ve %40 oranını saptamışlardır.

Hastaların karakteristik özelliklerini *PIK3CA* mutasyon durumuna göre değerlendirdiğimizde, anlamlı fark bulunmamaktadır ancak ileri evre tümörlerde erken evre'ye göre mutasyon sayısı sırasıyla 17 ve 6 olmak üzere daha fazla saptanmıştır (p=0.27). Histopatolojik tanısı adenokarsinom olan olgularımızın 22'si mutasyon taşımaktadır (p=0.35).

Bu verilere göre, *PIK3CA* mutasyonlarının karsinogenezde istila adımlarına katkıda bulunduğu öne sürülebilir.

Çalışma sonuçlarımıza göre Batı, Orta Doğu ve Asya ile Türk popülasyonu arasında gen mutasyonları ve klinik özellikler açısından önemli bir fark bulamamaktadır. Gen mutasyonlarında görülen bazı değişiklikler kullanılan farklı tarama metodları, yaşam tarzı, etnik ve genetik değişikliklerden oluşmuş olabilir. *EGFR* sinyalleri, KRK gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. KRK'li hastalarda *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* gibi genlerin mutasyonlarının açıklanması *EGFR*'a yönelik tedavi direncini değerlendirmede önemlidir (177, 178). *KRAS* mutant KRK setuksimab gibi anti-EGFR ajanlara cevap vermez (179). Bununla birlikte, yabanıl tip *KRAS*'lı hastaların sadece % 40-60'ı EGFR hedefe yönelik tedavilere cevap vermektedir (180). Bu nedenle anti-EGFR tedavisini etkileyebilecek diğer moleküler değişiklikleri belirlemek çok önemlidir. De Roock ve ark. *BRAF*, *NRAS* ve *PIK3CA* mutasyonlarının kemoterapiye dirençli metastatik KRK hastalarında anti-EGFR tedavi sonucunu etkilediğini ortaya koymuştur (20).

Yaşam tarzı ve diyet gibi birçok çevresel faktör, KRK için risk faktörleri olarak ortaya çıkmaktadır. Fazla et, yağ ve düşük fiber tüketen kişiler KRK için daha yüksek risk taşımaktadırlar (181, 183). Fiziksel aktivitenin azalması ve obezite de KRK riskinin artmasına yol açabilir (184, 185). Gelişmekte olan ülkelerin batılılaşması diyet ve yaşam tarzındaki değişikliklerle birlikte, KRK'nin artan insidansı ile ilişkilendirilmiştir (186, 187). Türkiye'de KRK insidansının artışı Batı ülkelerinin artan insidansına benzerdir. Çalışmamızın sonuçları *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonlarının Batı toplumundaki sıklıklarına benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda KRK insidansı ile klinikopatolojik faktörler arasında *NRAS* mutasyonu ve primer tümör bölgesi ilişkisi ve *KRAS* mutasyonunun kadınlarda fazla olması dışında herhangi anlamlı bir ilişkinin bulunmadığını tespit ettik.

Bütün bu sonuçlar KRK taraması, tanı yöntemleri ve kanser önleyici yaşam tarzı önerilerini Türk popülasyonunda etkileyebilir.

Mevcut çalışmanın olası bir kısıtlılığı, bulgularımızın genelleştirilebilirliğini potansiyel olarak sınırlayabilecek nispeten küçük örneklem boyutudur. Özellikle çalışma grubumuzun tek merkezli olması Türkiye genelinde olan vaziyeti açıklamak için sınır yaratmaktadır. *PIK3CA* mutasyon analizi diğer genlerde yabancı olan sadece 49 hastada yapılmıştır, bu nedenle gözlemlenen mutasyonların diğer genlerle olan ilişkisi açıklanamamaktadır.



Tablo 32. KRAS, NRAS, BRAF ve PIK3CA genlerinin somatik mutasyonlarının literatür taramasının özeti

Bölge	Yıl	Yöntem	hasta sayısı	KRAS (%)	NRAS (%)	BRAF (%)	PIK3CA (%)
Türkiye	2015	Pyrosekans ve PCR	31	7(22)	YOK	YOK	YOK
Türkiye	2013	Otogenomiks INFINITI	53	26(49.05)	YOK	YOK	
Iran	2015	PCR ve Direkt sanger	100	32(32)	YOK	YOK	YOK
Iran	2014	PCR-RFLP	80	YOK	YOK	37(46.25)	YOK
Iran	2011	PCR-RFLP	110	24(28)	YOK	YOK	YOK
Suudi Arabistan	2015	PCR	770	150(30.1)	YOK	12(2.4)	YOK
Suudi Arabistan	2015	Direkt sekans	700	216(28.6)	YOK	19(2.5)	YOK
Suudi Arabistan	2014	PCR	150	84(56)	YOK	YOK	YOK
Suudi Arabistan	2008	PCR ve direct sekans	448	YOK	YOK	YOK	51(11.38)
Irak	2012	PCR ve Ters hibridizasyon	50	24(48)	YOK	YOK	YOK
Portekiz	2005	PCR-SSCP otomat sekans	150	31(20.7)	YOK	18(12)	14(9.3)
Belçika	2010	Mass spektro	1022	299(40)	17(2.6)	36(4.7)	108(14.5)
İngiltere	2013	Pyrosekans ve direkt sekans	1976	836(42.3)	71(3.6)	178(9)	251(12.7)
İngiltere	2009	PCR ve Sanger sekans	168	62(36.9)	YOK	13(7.7)	26(15.47)
İtalya	2015	Pyrosekans	194	92(47.4)	7(3.6)	10(19.4)	32(16.5)
İtalya	2012	HRM analizi	209	90(43)	YOK	13(11.1)	7(3.3)
İtalya	2009	PCR	32	7(24.1)	YOK	3(9.67)	4(12.9)
İtalya	2008	HRM analizi	116	50(43)	YOK	11(9.5)	20(17.2)
Fransa	2015	Direkt Sanger sekans	826	301(37)	YOK	85(11)	113(14)
Fransa	2013	PCR ve direkt sekans	98	23(23.5)	YOK	2(2)	4(4)
Fransa	2010	Direkt sekans	42	19(45.2)	YOK	1(2.38)	6(14.28)
Fransa	2008	PCR ve direkt sekans	586	198(33.8)	YOK	78(13.3)	98(16.7)
Almanya	2013	Pyrosekans	171	70(40.9)	YOK	19(11.1)	20(18.7)
Almanya	2010	Multipleks PCR	294	119(48.6)	6(2)	13(5.3)	32(13.1)
Amerika	2014	açıklanmamış	484	240(49.6)	32(7.4)	10(4.1)	YOK
Amerika	2013	Pyrosekans	964	336(35)	YOK	131(13.7)	161(16.7)
Amerika	2009	PCR ve Pyrosekans	450	160(35.7)	YOK	69(15.8)	82(18.2)

Amerika	2008	PCR ve BigDye Terminator kit	62	24(38.7)	YOK	4(5.6)	2(3.2)
Sardunya	2012	Otomat DNA sekans	478	145(30.3)	YOK	1(0.26)	67(17.44)
Rusya	2013	HRM ve PCR sekans	195	70(35.9)	8(4.1)	8(4.1)	24(12.3)
Avustralya	2013	Direkt sekans	757	215(28.49)	YOK	120(15.9)	105(14)
Yunanistan	2015	PCR	322	118(36.3)	YOK	17(5.2)	9(2.7)
Çin	2014	Torent AmpliSeq Kanser Panel	93	47(50.5)	3(3.2)	1(1.1)	10(10.8)
Çin	2012	PCR ve direkt sekans	331	137(44.1)	YOK	9(5.8)	482.6)
Çin	2010	HotStarTaq (QIAGEN)	181	58(32)	YOK	29(16)	7(3)
Çin	2010	Pyrosekans	61	12(19.7)	YOK	3(4.9)	3(4.9)
Japonya	2013	Direkt sekans	254	85(33.5)	YOK	17(6.7)	YOK
Hindistan	2014	Nested PCR	204	48(23.5)	YOK	20(9.8)	12(5.9)
Tayvan	2012	direkt sekans ve HRM analizi	182	61(33.5)	YOK	2(1.1)	13(7.1)
Kore	2011	Direkt sekans	92	19(20.7)	YOK	383.3)	1(1.)

6.SONUC VE ÖNERİLER

Çalışma gurubumuzda KRK'li hastaların tümör örneklerinden *Ras/Raf/MAPK* yolağında önemli rolleri olan *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* genlerinin mutasyonları incelenmiştir. Saptanan mutasyonlar ile kilinikopatolojik özellikler arasında *KRAS* geninin mutasyonlarında kadınlarda; *NRAS* geninde ise primer bölge arasında anlamlı fark görülmekle birlikte incelediğimiz diğer genlerde anlamlı fark bulunmamıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da saptanan veriler daha önce Batı, Orta Doğu ve Asya'da yapılan araştırmalar ile uyum sağlamaktadır. Gözlemlediğimiz bazı değişikliklerin etnik, bölgesel ve kullanılan tarama yöntemlerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızın Türk popülasyonunda *NRAS* ve *PIK3CA* gen mutasyonlarını kolorektal kanserlerde tarayan ilk çalışma olması nedeniyle Türkiye genelinde yorum yapabilmemiz için yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Tarama gurubumuz tek merkezli ve çoğunlukla Ege Bölgesi'nden sevk edilen hastalardan oluşmuştur. Bu nedenle, ileri çalışmalarda başka illerden oluşan kapsamlı bir hasta grubu planlanmalıdır.

Yaptığımız çalışma gurubunun sayısının düşük olması nedeniyle, büyük örneklem içeren bir çalışma ve farklı tarama yöntemlerinin aynı zamanda elde edilen sonuçları onaylamak için kullanması ile elde edilen sonuçların güvenilirliğinin artmasını sağlayacağını düşünmekteyiz.

Literatürde önerilen ve rutin olarak çalışılan pan *Ras* genlerinin çalışmaya dahil edilmesi bazı cevapsız soruların yanıtı olarak değerlendirilmelidir.

Yaşam tarzının KRK'lerde büyük rolü olduğundan dolayı daha kapsamlı hasta takip sistemi genetik değişiklikler ile olan hastalık ilişkisini bulmak için gelecekte planlanan araştırmalar için faydalı olabilir.

7. KAYNAKLAR

- 1- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P., “Global Cancer Statistics, 2002”, *CA Cancer J Clin.* 2005; 5; (2); 74-108.
- 2- Ng K., Zhu AX. Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2008; 65:8–20.
- 3- Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S ve ark. Clinical relevance of EGFR- and *KRAS*-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treatment Reviews.* 2009; 35: 262–271.
- 4- Spano JP, Fagard R, Soria JC ve ark. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Ann Oncol.* 2005; 16:189–194.
- 5- Ciardiello F, Tortora G EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med.* 2008; 358: 1160–1174.
- 6- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicentre “RASCAL” study. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90:675–84.
- 7- Forbes S, Clements J, Dawson E, Bamford S, Webb T, Dogan A, et al. COSMIC 2005. *Br J Cancer.* 2006; 94:318–22.
- 8- Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type *KRAS* is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26:1626–34.
- 9- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O’Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2008; 359:1757–65.
- 10- Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009; 360:1408–17. 9

- 11- Vaughn CP, Zobell SD, Furtado LV, Baker CL, Samowitz WS. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011; 50:307–12.
- 12- Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013; 369:1023–34.
- 13- Peeters M, Oliner KS, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, et al. Analysis of KRAS/NRAS mutations in phase 3 study 20050181 of panitumumab (pmab) plus FOLFIRI versus FOLFIRI for second-line treatment (tx) of metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol*. 2014; 32 suppl 3: bstr LBA387.
- 14- Patterson SD, Peeters M, Siena S, Van Cutsem E, Humblet Y, Van Laethem J-L, et al. Comprehensive analysis of KRAS and NRAS mutations as predictive biomarkers for single agent panitumumab (pmab) response in a randomized, phase 3 metastatic colorectal cancer (mCRC) study (20020408). *J Clin Oncol*. 2013; 31(suppl):abstr 3617.
- 15- Tejpar S, Lenz HJ, Köhne CH, Heinemann V, Ciardiello F, Esser R, et al. Effect of KRAS and NRAS mutations on treatment outcomes in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated first-line with cetuximab plus FOLFOX4: New results from the OPUS study. *J Clin Oncol*. 2014; 32 suppl 3:abstr LBA444.
- 16- Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran SE, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014; 15:1065–75.
- 17- Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon JL, Hecht JR, et al. PEAK: a randomized, multicentre phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2014; 32:2240–7.
- 18- Ciardiello F, Lenz H-F, Kohne C-H, Heinemann V, Tejpar S, Melezinek I, et al. Treatment outcome according to tumour RAS mutation status in CRYSTAL study

- patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) randomized to FOLFIRI with/without cetuximab. *J Clin Oncol.* 2014; 32:5s. suppl; abstr 3506.
- 19- Barras. BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. *Biomarkers in Cancer* 2015;7(S1) 9-12.
 - 20- De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010; 11:753–62.
 - 21- Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 2009; 69:1851–7.
 - 22- Karapetis CS, Jonker D, Daneshmand M, Hanson JE, O’Callaghan CJ, Marginean C, et al. PIK3CA, BRAF, and PTEN status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer—results from NCIC CTG/AGITG CO.17. *Clin Cancer Res.* 2014; 20:744–53.
 - 23- Olah, E. "Basic Concepts Of Cancer: Genomic Determination." 2005. *JIFCC* 16(2).
 - 24- Lichtenstein, P, V. Holm, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* 2000. 343(2): 78-85.
 - 25- Bertram, J. S. "The molecular biology of cancer." *Mol Aspects Med.* 2000. 21(6): 167-223.
 - 26- Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., Thompson & Thompson *Tıbbi Genetik*, 6. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara. 2005, p.11.
 - 27- Ekmekçi A., Gen, Genetik Değişim ve Hastalıklar, Gazi Kitabevi. 2006, p.217-224.
 - 28- Klug W. S., Cummings M. R., Genetik Kavramlar, Öner C., Palme Yayıncılık, Ankara. 2003. p.28, 635, 643.
 - 29- Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L., “Genetic disorders: In Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L., eds. *Robbins pathologic basis of disease*” W.B. Saunders Company: Philadelphia. 1989, 121-162.
 - 30- Jesse d. Martinez, M. T. P., Kimberly E. Fultz, Natalia A. Ignatenko, Eugene w. Gerner 2003. *Molecular Biology of Cancer*, Chapter 1, pages 1-32.

- 31- Demirelli F. H., “Kanserin Moleküler Genetik Temelleri”, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Güncel Klinik Onkoloji Sempozyum Dizisi. 2003, 37, 9.
- 32- Karahan N., Kolorektal Karsinomlarda p53 Gen Ekspresyonunun Klinik ve Histopatolojik Parametreler İle İlişkisi, Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Isparta.2001.
- 33- Lewin B., Gene VIII, Pearson, United States of America. 2004,p.812-845.
- 34- Russel P. J., IGenetics: A Molecular Approach, Second Ed., Pearson 2006, p.606.
- 35- Haupt S., Berger M., Goldberg Z., Haupt Y., “Apoptosis- P53 Network”, *Journal of Cell Science*. 2003. 116, 4077-4085.
- 36- Nelson D. L., Cox M. M., Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Ed., W.H. Freeman. 2004, p470-473.
- 37- Bolsover S., Hyams J., Shephard E. A., White H. A., Wiedeman C., Cell Biology: A Short Course, Second Ed., Wiley-Liss, Canada. 2004, p415
- 38- Michor, F., Y. Iwasa, et al. "Dynamics of colorectal cancer." *Semin Cancer Biol*. 2005. 15(6): 484-93.
- 39- Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P et al. Carcinoma of The Colon Rectum. 2010. WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th edition, pages 132-173.
- 40-Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2013; 63: 11.
- 41-Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.2010.19: 1893.
- 42-Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin*. 1998. 48: 6.
- 43-Wilmark AB. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1997. 40: 483.
- 44-Nelson RL, Dollear T, Freels S, Persky V. The relation of age, race, and gender to the subsite location of colorectal carcinoma. *Cancer*. 1997.80: 193.
- 45-Obrand DI, Gordon PH. Continued change in the distribution of colorectal carcinoma. *Br J Surg*.1998. 85: 246.
- 46-Edge SB, Byrd DB, Compton CC, et al., eds. *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. New York: Springer. 2010.
- 47-Libutti SK, Teper JE, Saltz LB. Rectum Cancer. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA Eds. *Cancer*. Philadelphia:Lippincott Williams and Wilkins.2008: 1285-1301.

- 48-Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med 2000. 124: 979.
- 49- Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. J Natl Cancer Inst. 1995. 87:1114-1125
- 50- Büyükdoğan M. Kolorektal kanserlerde genetik ve etyolojik faktörler. Selçuk Tıp Derg 2009. 25 (3):171-180
- 51-Rustgi AK. Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. N Engl J Med 1994. 331:1694-9
- 52- Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, ve ark. The molecular basis of Turcot's syndrome. N Engl J Med. 1995. 332:839-47-52.
- 53- Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, ve ark. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. N Engl J Med. 1993. 329:1982-1987.
- 54- Kalaycı G. Kolon Kanserleri, Genel Cerrahi. 2. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi. 2002.1343-1359.
- 55- Fuchs C.S, Giovannucci E.L, Colditz G.A, Hunter D.J, ve ark. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. N Engl J Med. 1994. 331:1669-1674.
- 56- Schoen R.E, Tangen C.M, Kuller L.H, Burke G.L, ve ark. Increased blood glucose and insulin, body size, and incident colorectal cancer. J Natl Cancer Inst. 1999. 91:1147-1154.
- 57- Meyerhardt J.A, Giovannucci E.L, Holmes M.D, Chan A.T, ve ark. Physical activity and survival after colorectal cancer diagnosis. J Clin Oncol. 2006. 24:3527-3534.
- 58- Fuchs C.S, Giovannucci E.L, Colditz G.A, Hunter D.J, ve ark. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. N Engl J Med. 1999. 340:169-176.
- 59- Seitz H.K, Simanowski U.A, Garzon FT., Rideout J.M, ve ark. Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat. Gastroenterology. 1990. 98:406-413.
- 60- Rizzo DC. Delmar's Fundamentals of Anatomy & Physiology. Delmar. 2001.
- 61- Elson CO, Kagnoff MF, Fiocchi C, Befus AD, Targan S. Intestinal immunity and inflammation: recent progress. Gastroenterology, 1986. 91: 746-68.
- 62- Shamsuddin AM, Phelps PC, Trump BF. Human large intestinal epithelium: light microscopy, histochemistry, and ultrastructure. Hum. Pathol, 1982. 13(9): 790-803.
- 63- <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/330544/large-intestine>.
- 64- Worthley, D. L., V. L. Whitehall, et al. "Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer." World J Gastroenterol. 2007. 13(28): 3784-91.

- 65- Jass, J. R. "Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features." *Histopathology*.2007. 50(1): 113-30.
- 66- Snover, D. C. "Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma." *Hum Pathol*. Jan. 2011. 42(1):1-10. Epub 2010 Sep 24.
- 67- Vogelstein, B., E. R. Fearon, et al. "Genetic alterations during colorectal-tumor development." *N Engl J Med*.1988.319(9): 525-32.
- 68- Fodde, R. "The APC gene in colorectal cancer." *Eur J Cancer*. 2002. 38(7): 867-71.
- 69- Takayama, T., K. Miyanishi, et al. "Colorectal cancer: genetics of development and metastasis." *J Gastroenterol*. 2006. 41(3): 185-92.
- 70- Cheah, P. Y. "Recent advances in colorectal cancer genetics and diagnostics." *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009. 69(1): 45-55.
- 71- Kumar, A., Fausto, Michell Robbins *Pathologic Basis of Disease*.2010. 8th edition , chapter 17 pages 817-825.
- 72- Hickman, E. S., M. C. Moroni, et al. "The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer." *Curr Opin Genet Dev*.2002. 12(1): 60-6.
- 73- Castagnola, P. and W. Giaretti "Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer." *Biochim Biophys Acta*.2005. 1756(2): 115-25.
- 74- Andreyev, H. J., A. R. Norman, et al. "Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study." *Br J Cancer* .2001. 85(5): 692-6.
- 75- Davies, H., G. R. Bignell, et al. "Mutations of the BRAF gene in human cancer." *Nature*. 2002. 417(6892): 949-54.
- 76- Vakiani, E. and D. B. Solit "KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers." *J Pathol*. 2011. 223(2): 219-29.
- 77- Rajagopalan, H., A. Bardelli, et al. "Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status." *Nature*. 2002. 418(6901): 934.
- 78- Woodford-Richens, K. L., A. J. Rowan, et al. SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. 98(17): 9719-23.
- 79- Worthley, D. L., V. L. Whitehall, et al. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol*.2007. 13(28): 3784-91.
- 80- Klug W, C. M., Charlotte A. Spencer , Michael A. Palladino. 8th edition chapter 18, *Concepts of Genetics*. 2008.pages 435-455.
- 81- Iacopetta, B., F. Grieco, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2010. 6(4): 260-9.

- 82- Houlston, R. S. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol*. 2001. 54(4): 206-14.
- 83- Jacob, S. and F. Praz . DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* .2002.84(1): 27-47.
- 84- Lynch, J. P. and T. C. Hoops The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2002. 16(4): 775-810.
- 85- Knudson, A. G., Jr.. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1971.68(4): 820-3.
- 86- Kulis, M. and M. Esteller. DNA methylation and cancer. *Adv Genet*. 2010.70: 27-56.
- 87- Venkatachalam, R., M. J. Ligtenberg, et al The epigenetics of (hereditary) colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* .2010. 203(1): 1-6.
- 88- Chuang, J. C. and P. A. Jones Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res*. 2007.61(5 Pt2) : 24R-29R.
- 89- Sulewska, A., W. Niklinska, et al. DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007. 45(3): 149-58.
- 90- van Krieken, J. H., A. Jung, et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* .2008. 453(5): 417-31.
- 91- Neumann, J., E. Zeindl-Eberhart, et al. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract*.2009.205(12): 858-62.
- 92- Di Fiore, F., R. Sesboue, et al. Molecular determinants of anti-EGFR sensitivity and resistance in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* .2010.103(12): 1765-72.
- 93- Asghar, U., E. Hawkes, et al. Predictive and prognostic biomarkers for targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*.2010. 9(5): 274-81
- 94- Kranenburg, O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta*. 2005.1756(2): 81-2.
- 95- Mitin, N., K. L. Rossman, et al. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol*. 2005.15(14): R563-74.
- 96- Grimmond, S. M., D. Raghavan, et al. Detection of a rare point mutation in Ki-ras of a human bladder cancer xenograft by polymerase chain reaction and direct sequencing. 1992. *Urol Res* 20(2): 121-6.

- 97- Liou, J. M., M. S. Wu, et al.. Mutations in BRAF correlate with poor survival of colorectal cancers in Chinese population. *Int J Colorectal Dis.*2011. May 7. [Epub ahead of print]
- 98-Zeng M, Kikuchi H, Pino MS, Chung DC. Hypoxia activates the K-ras proto oncogene to stimulate angiogenesis and inhibit apoptosis in colon cancer cells. *PLoS One.* 2010. 5(6): e 10966.
- 99-Jiang Y, Mackley H, Cheng H, Ajani JA. Use of K-Ras as a predictive biomarker for selecting anti-EGF receptor/pathway treatment. *Biomark Med*, 2010. 4(4): 535-41.
- 100-Chau I, Cunningham D, Treatment in advanced colorectal cancer: what, when, and how? *Br J Cancer* 2009. 100: 1704-19.
- 101-Van Cutsem E, Kohne C-H, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009. 360: 1408.
- 102-Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009. 27: 663.
- 103-Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008. 359: 1757.
- 104-Douillard J, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized phase 3 study of panitumumab with FOLFOX4 compared to FOLFOX4 alone as 1st-line treatment (tx) for metastatic colorectal cancer (mCRC): the PRIME trial. *Eur J Cancer Suppl* 2009. 7: 6 (abst 10LBA).
- 105-Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004. 351: 337.
- 106-Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for K-RAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009. 27: 2091
- 107-Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008. 26:5705-5712.
- 108-Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, Masi G, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Floriani I, Bencardino K, Galluccio N, Catalano V, Tonini G, Magnani M, Fontanini G, Basolo F, Falcone A, Graziano F. KRAS codon 61, 146 and

- BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009. 101:715-721.
- 109-Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009. 361:98-99.
- 110-Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T, Rougier P, Lievre A, Landi B, Boige V, Ducreux M, Ychou M, Bibeau F, Bouché O, Reid J, Stone S, Penault-Llorca F. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 2009. 27:5924-5930.
- 111-Ikenoue T., Kanai F., Hikiba Y., Obata T., Tanaka Y., Imamura J., Ohta M., Jazag A., Guleng B., Tateishi K., Asaoka Y., Matsumura M., Kawabe T., Omata M., “Functional Analysis of PIK3CA Gene Mutations in Human Colorectal Cancer”, *Cancer Res.*2005. 65, (11), 4562.
- 112- Vogt P., Kang S., Elsliger M. A., Gymnopoulos M., “Cancer – Specific Mutations in Phosphatidylinositol 3- Kinase”, *Trends in Biochemical Sciences.*2007.32, (7), 343.
- 113- Liu Z., Roberts T. M., “Human Tumor Mutants in the p110alpha Subunit of PI3K”, *Cell cycle.*2006.5, (7).
- 114- Zhao J., Liu Z., Wang L., Shin E., Loda M. F., Roberts T. M., “The Oncogenic Properties of Mutant p110 α and p110 β Phosphatidylinositol 3- Kinases in Human Mammary Epithelial Cells”, *PNAS.*2005.102, (51) , 18443–18448.
- 115- Gardefors K.,The Effects of PIK3CA Mutations on the Function and Structure of the Phosphatidylinositol 3-kinase p110 α Catalytic Subunit in Breast Cancer, Project in Microbial Biotechnology, Department of Biomedicine and Surgery Division of Oncology Faculty of Health Sciences Linköpings Universitet. 2007.
- 116- Velho S., Oliveira C., Ferreira A., Ferreira A. C., Suriano G., Schwartz S., Duval A., Carneiro F., Machado J. S., Hamelin R., Seruca R. The Prevalance of PIK3CA Mutations in Gastric and Colon Cancer. *European Journal of Cancer.* 2005. 41, 1649–1654.
- 117- Doğan L, Güç D., “Sinyal İletimi Mekanizmaları ve Kanser”, *Hacettepe Tıp Dergisi.* 2004. 35, 34-42.
- 118- Engelman J. A., Cantley J. L., “The Evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism”, *Nature Reviews Genetics.* 2006. 7, 606-619.
- 119- Siyar Ekin A, Demirci U, Cakmak Oksuzoglu B, et al. KRAS discordance between primary and metastatic tumor in patients with metastatic colorectal carcinoma. *J BUON* 2015. 20:128-35.

- 120- Ozen F, Ozdemir S, Zemheri E, et al. The proto-oncogene KRAS and BRAF profiles and some clinical characteristics in colorectal cancer in the Turkish population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013. 17:135-9.
- 121- Asl JM, Almasi S, Tabatabaiefar MA. High frequency of BRAF proto-oncogene hot spot mutation V600E in cohort of colorectal cancer patients from Ahvaz City, southwest Iran. *Pak J Biol Sci*. 2014.17:565-9.
- 122- Naghibalhossaini F, Hosseini HM, Mokarram P, et al. High frequency of genes' promoter methylation, but lack of BRAF V600E mutation among Iranian colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res*.2011. 17:819-25.
- 123- Omidifar NM, Geramizadeh BM, Mirzai MM. K-ras mutation in colorectal cancer, a report from southern Iran. *Iran J Med Sci* 2015. 40:454-60.
- 124- Beg S, Siraj AK, Prabhakaran S, et al. Molecular markers and pathway analysis of colorectal carcinoma in the Middle East. *Cancer*. 2015.121:3799-808
- 125- Siraj AK, Bu R, Prabhakaran S, et al. A very low incidence of BRAF mutations in Middle Eastern colorectal carcinoma. *Mol Cancer*. 2014. 13:168.
- 126- Zahrani A, Kandil M, Badar T, et al. Clinico-pathological study of K-ras mutations in colorectal tumors in Saudi Arabia. *Tumori*. 2014.100:75-9.
- 127-Abubaker J, Bavi P, Al-Harbi S, et al. Clinicopathological analysis of colorectal cancers with PIK3CA mutations in Middle Eastern population. *Oncogene*. 2008. 27:3539-45.
- 128- Al-Allawi NA, Ismaeel AT, Ahmed NY, et al. The frequency and spectrum of K-ras mutations among Iraqi patients with sporadic colorectal carcinoma. *Indian J Cancer*. 2012. 49:163-8.
- 129-Smith CG, Fisher D, Claes B, et al. Somatic profiling of the epidermal growth factor receptor pathway in tumors from patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy +/- cetuximab. *Clin Cancer Res*. 2013. 19:4104-13.
- 130- Souglakos J, Philips J, Wang R, et al. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009.101:465-72.
- 131- Foltran L, De Maglio G, Pella N, et al. Prognostic role of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in advanced colorectal cancer. *Future Oncol*. 2015.11:629-40.
- 132-Bozzao C, Varvara D, Piglionica M, et al. Survey of KRAS, BRAF and PIK3CA mutational status in 209 consecutive Italian colorectal cancer patients. *Int J Biol Markers*. 2012.27:e366-74.

- 133-Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol.* 2009.20:84-90.
- 134- Simi L, Pratesi N, Vignoli M, et al. High-resolution melting analysis for rapid detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutations in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol.* 2008.130:247-53.
- 135- Manceau G, Marisa L, Boige V, et al. PIK3CA mutations predict recurrence in localized microsatellite stable colon cancer. *Cancer Med.* 2015.4:371-82.
- 136- Derbel O, Wang Q, Desseigne F, et al. Impact of KRAS, BRAF and PI3KCA mutations in rectal carcinomas treated with neoadjuvant radiochemotherapy and surgery. *BMC cancer.*2013.13:200.
- 137- Perkins G, Lievre A, Ramacci C, et al. Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS status for response to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2010.127:1321-31.
- 138-Barault L, Veyrie N, Jooste V, et al. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer.* 2008.122:2255-9.
- 139- Neumann J, Wehweck L, Maatz S, et al. Alterations in the EGFR pathway coincide in colorectal cancer and impact on prognosis. *Virchows Arch.*2013.463:509-23.
- 140-Lurkin I, Stoeck R, Hurst CD, et al. Two multiplex assays that simultaneously identify 22 possible mutation sites in the KRAS, BRAF, NRAS and PIK3CA genes. *PLoS One.* 2010.5:e8802.
- 141-Morris VK, Lucas FA, Overman MJ, et al. Clinicopathologic characteristics and gene expression analyses of non-KRAS 12/13, RAS-mutated metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.*2014.25:2008-14.
- 142-Nishihara R, Lochhead P, Kuchiba A, et al. Aspirin use and risk of colorectal cancer according to BRAF mutation status. *JAMA.*2013.309:2563-71.
- 143- Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, et al. PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. *J Clin Oncol.*2009.27:1477-84.
- 144-Freeman DJ, Juan T, Reiner M, et al. Association of K-ras mutational status and clinical outcomes in patients with metastatic colorectal cancer receiving panitumumab alone. *Clin Colorectal Cancer.*2008.7:184-90.

- 145-Palomba G, Colombino M, Contu A, et al. Prevalence of KRAS, BRAF, and PIK3CA somatic mutations in patients with colorectal carcinoma may vary in the same population: clues from Sardinia. *J Transl Med.* 2012.10:178.
- 146-Yanus GA, Belyaeva AV, Ivantsov AO, et al. Pattern of clinically relevant mutations in consecutive series of Russian colorectal cancer patients. *Med Oncol.* 2013.30:686.
- 147-Rosty C, Young JP, Walsh MD, et al. PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PLoS One.* 2013.8:e65479.
- 148- Samara M, Kapatou K, Ioannou M, et al. Mutation profile of KRAS and BRAF genes in patients with colorectal cancer: association with morphological and prognostic criteria. *Genet Mol Res.* 2015.14:16793-802.
- 149-Cai ZX, Tang XX, Gao HL, et al. APC, FBXW7, KRAS, PIK3CA, and TP53 Gene Mutations in Human Colorectal Cancer Tumors Frequently Detected by Next-Generation DNA Sequencing. *J Mol Genet Med.* 2014.8:145.
- 150- Ling Y, Ying JM, Qiu T, et al. Detection of KRAS, BRAF, PIK3CA and EGFR gene mutations in colorectal carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2012.41:590-4.
- 151- Berg M, Danielsen SA, Ahlquist T, et al. DNA sequence profiles of the colorectal cancer critical gene set KRAS-BRAF-PIK3CA-PTEN-TP53 related to age at disease onset. *PLoS One.* 2010.5:e13978.
- 152-Liao W, Liao Y, Zhou JX, et al. Gene mutations in epidermal growth factor receptor signaling network and their association with survival in Chinese patients with metastatic colorectal cancers. *Anat Rec.* 2010.293:1506-11.
- 153-Nakanishi R, Harada J, Tuul M, et al. Prognostic relevance of KRAS and BRAF mutations in Japanese patients with colorectal cancer. *Int J Clin Oncol.* 2013.18:1042-8.
- 154- Bisht S, Ahmad F, Sawaimoon S, et al. Molecular spectrum of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutation: determination of frequency, distribution pattern in Indian colorectal carcinoma. *Med Oncol.* 2014.31:124.
- 155-Hsieh LL, Er TK, Chen CC, et al. Characteristics and prevalence of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in colorectal cancer by high-resolution melting analysis in Taiwanese population. *Clin Chim Acta.* 2012.413:1605-11.
- 156-Kwon MJ, Lee SE, Kang SY, et al. Frequency of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in advanced colorectal cancers: Comparison of peptide nucleic acid-mediated PCR clamping and direct sequencing in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Pathol Res Pract.* 2011.207:762-8.

- 157- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*.1991.349:117-27.
- 158-Soliman AS, Bondy ML, Levin B, et al. Colorectal cancer in Egyptian patients under 40 years of age. *Int J Cancer* .1997.71:26-30.
- 159- Elbjeirami WM, Sughayer MA. KRAS mutations and subtyping in colorectal cancer in Jordanian patients. *Oncol Lett*.2012.4:705-10.
- 160- Janku F, Lee JJ, Tsimberidou AM, et al. PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers. *PLoS One*.2011.6:e22769.
- 161- Kawazoe A, Shitara K, Fukuoka S, et al. A retrospective observational study of clinicopathological features of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*.2015.15:258.
- 162-Zhe-Zhen Li, Feng Wang, Zi-Chen Zhang,et al. Mutation profiling in chinese patients with metastatic colorectal cancer and its correlation with clinicopathological features and anti-EGFR treatment response. *Oncotarget*. 2016.7:28356-28368.
- 163- Vaughn C, Zobell S, Furtado L, et al. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosom Cancer*.2011.50:307–12.
- 164- Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, et al. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 2009. 205:858–62.
- 165- Dhomen N, Marais R. New insight into BRAF mutations in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2007.17:31-9.
- 166- Tran B, Kopetz S, Tie J, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2011.117:4623-32.
- 167- Zhang J, Zheng J, Yang Y, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Chinese colorectal cancer patients: analysis of 1,110 cases. *Sci Rep*. 2015.5:18678.
- 168- Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*. 2009.9:550-62.
- 169- Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptortargeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009.101:1308–24.

- 170- Naguib A, Cooke JC, Happerfield L, et al. Alterations in PTEN and PIK3CA in colorectal cancers in the EPIC Norfolk study: associations with clinicopathological and dietary factors. *BMC Cancer*. 2011.11:123.
- 171- Mao C, Yang ZY, Hu XF, et al. PIK3CA exon 20 mutations as a potential biomarker for resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2012.23:1518–25.
- 172- Qiong He, Qi Xu, Wei Wu, et al. .Comparison of *KRAS* and *PIK3CA* gene status between primary tumors and paired metastases in colorectal cancer. *OncoTargets and Therapy*.2016.9 2329–2335
- 173- Joana G Guedes, Isabel Veiga, Patrícia Rocha, et al. High resolution melting analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA in KRAS exon 2 wild-type metastatic colorectal cancer *BMC Cancer*. 2013.13:169
- 174- Samuels Y, Diaz LA, Schmidt-Kittler O, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell*. 2005.7:561–73.
- 175- Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*.2005.102:802–807.
- 176- Bader AG, Kang S, Vogt PK. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*.2006.103:1475–9.
- 177- Peyssonnaud C, Eychene A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell*. 2001.93:53-62.
- 178- Harari PM, Allen GW, Bonner JA. Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol*. 2007.25:4057-65.
- 179-De Roock W, Lambrechts D, Tejpar S. K-ras mutations and cetuximab in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009.360:834; author reply 835-6.
- 180- Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*.2008.9:962-72.
- 181- Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer*.1975.15:617-31.
- 182-McKeown-Eyssen G. Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994.3:687-95.

- 183- Prentice RL, Sheppard L. Dietary fat and cancer: consistency of the epidemiologic data, and disease prevention that may follow from a practical reduction in fat consumption. *Cancer Causes Control*.1990.1:81-97.
- 184- Friedenreich CM, Orenstein MR. Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr*.2002.132:3456S-3464S.
- 185-Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. *N Engl J Med*. 2003.348:1625-38.
- 186- Popkin BM. The nutrition transition in low-income countries: an emerging crisis. *Nutr Rev*. 1994.52:285-98.
- 187- Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin*. 2011.61:212-36.

8.EKLER

8.1. Etik kurul Onayı

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: 10840098 – 27
Konu: Etik Kurulu Kararı

31.01.2014

Sayın Doç. Dr. Yasemin BASKIN

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Kolorektal Kansерlerde RAS/RAF/MAP kinaz yolağının klinikopatolojik özelliklerle ilişkisi” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.



Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

EK:
-Karar Formu (2 sayfa)

Tel: (0216)680 53 00
Faks: (0212)531 75 55
E-mail: ilknurfil@medipol.edu.tr

Adres: Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No: 19,34810
Kavacık/BEYKOZ

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kolorektal Kanserlerde RAS/RAF/MAP kinaz yolağının klinikopatolojik özelliklerle ilişkisi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Yasemin BASKIN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Onkoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	30.01.2014		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	30.01.2014		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
Karar Bilgileri	Karar No: 26	Tarih: 31.1.2014		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oy birliği" ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Tangül MÜDOK	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Berna EREN	Halk Sağlığı	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Emir YÜZBAŞIOĞLU	Protetik Diş Tedavisi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Op. Dr. Muhammed Fatih EVCİMİK	Kulak-Burun Boğaz	Özel Nisa Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	

* :Toplantıda Bulunma

8.2. Lab Arşiv izni

İlgili makama,

28.01.2014

“Kolorektal Kanserlerde RAS/RAF/MAP kinaz yolağının klinikopatolojik özelliklerle ilişkisi” başlıklı çalışma için gerekli arşiv izni verilmiştir.

Moleküler Onkoloji Laboratuvarı Sorumlusu

Doç Dr. Yasemin Baskın

8.3. Arşiv izni

İlgili makama,

28.01.2014

“Kolorektal Kanserlerde RAS/RAF/MAP kinaz yolağının klinikopatolojik özelliklerle ilişkisi” başlıklı çalışma için gerekli arşiv izni verilmiştir.

Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. İlhan Öztop

8.4. Özgeçmiş

TC Kimlik No/ Pasaport No:	N33826910
Doğum Yılı:	1983
Yazışma Adresi:	Korutürk Mah. Kauçuk Sk. No 42 K1. D2. Balçova /İZMİR
Telefon:	05075319394
Faks:	
E-posta:	akbarpour.mahdi@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Temel Onkoloji	Yüksek lisans	2017
Iran	Urmieh Üniversitesi	Veterinerlik Fakültesi	Veterinerlik	Vet. Hekim	2008

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül	Türkiye	İzmir	Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Proje elemanı	2013-2015
Dokuz Eylül	Türkiye	İzmir	Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Bursiyer	2014-2015
Tahran Üniversitesi	Iran	Tahran	Avecinna Arastirma Enstitüsü	Araştırmacı	2009-2011
Tahran Üniversitesi	Iran	Tahran	İmnölöji Arastirma Merkezi	Araştırmacı	2006-2008
Urmieh Üniversitesi	Iran	Urmiye	Tip Fakültesi	Araştırmacı	2005-2006

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yıl
Genc Araştırmacı birincilik Ödülü	Urmiyeh Üniversitesi	2005

Yayınlar

SCI, SSCI, AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Common Techniques for Preserving Fertility in Girls and Young Women Undergoing Cancer Treatment. J Reprod Infertil.2011; 12(2):85-92
In Vitro Cytotoxic Activity of the Essential Oil of Dorema ammoniacum D. Don. Middle-East Journal of Scientific Research .2011;7(4):511-514
The role of BRAF mutation in patients with high-risk malignant melanoma treated with high-dose adjuvant interferon therapy. Med Oncol.2015 Jan;32(1):440
PDGFR and KIT Mutation Status and Its Association with Clinicopathological Properties, Including DOG1.Oncol Res.2016;24(1):41-53

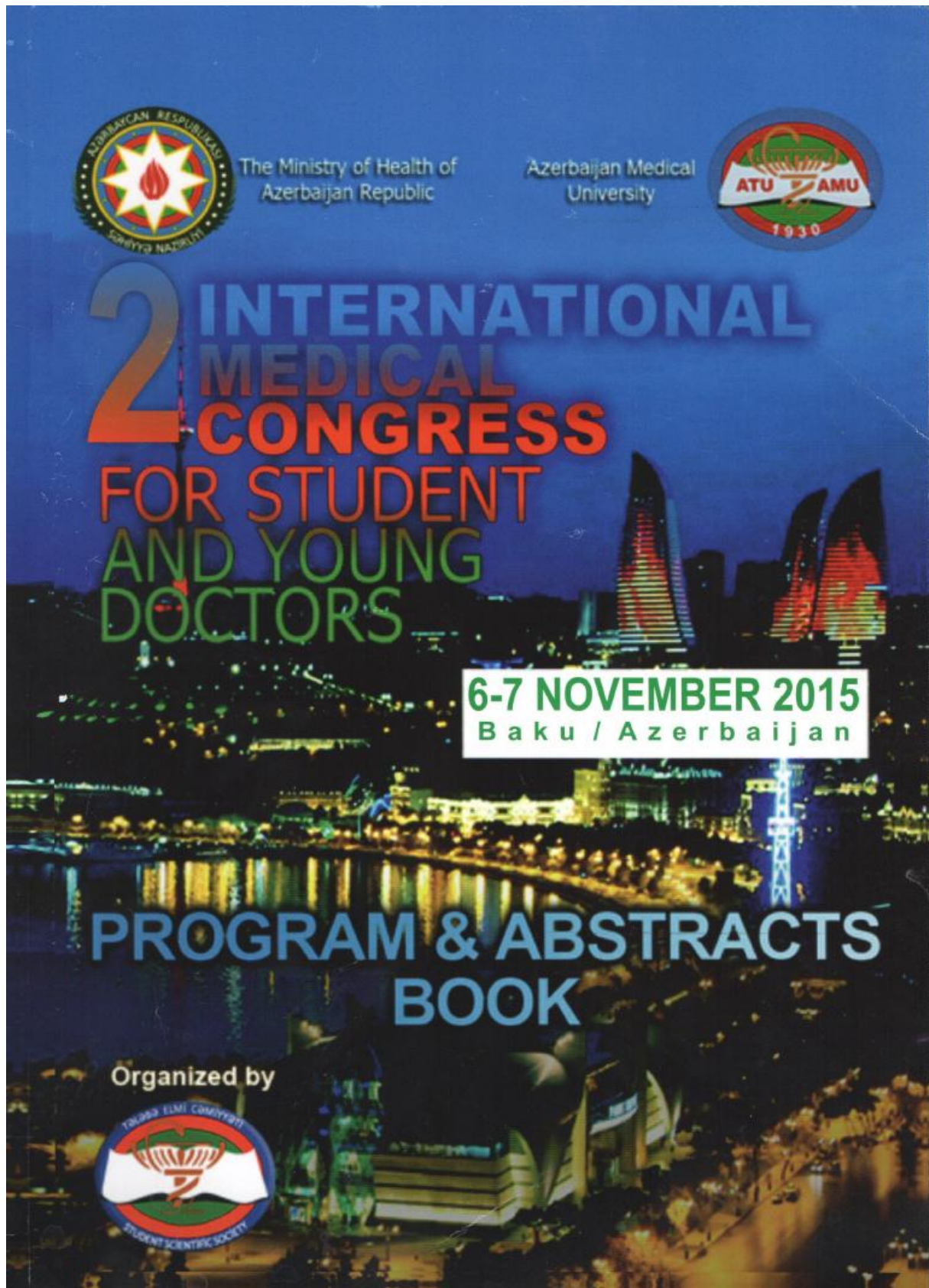
Diğer Dergilerde Yayımlanan Makaleler

İnciraltı Kampüsünde Biyoistatistik Ve Biyoinformatik Program Kullanım Sıklığı Ve Farkındalığı. Deü Tıp Fakültesi Dergisi, Cilt 28, Sayı 2, Ağustos 2014, 45 – 50

Hakemli Konferans/Sempozyumların Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

The Genomic Incorporation of DNA baits is a Novel Surrogate for Quantifying and Mapping the Induction and Repair of Radiation induced DNA Double Strand Breaks. 3 rd International Medical Congress For Student And Young Doctors, 2016. Bakü, Azerbaijan.
Role Of RAS/RAF/MAP Kinase Pathway In Personalized Cancer Management Of Metastatic Colorectal Cancer. 2 th International Medical Congress For Student And Young Doctors, 2015. Bakü, Azerbaijan.
Pro-Inflammatory Effects Of Carvacrol On Staphylococcus Aureus. 6 th Southeast European Conference On Chemotherapy And Infection, 2015. Thessaloniki, Greece.
W557-K558 deletions of exon 11 of c-KIT gene is related with metastatic behavior of Gastro Intestinal Stromal Tumors. Izmir Oncology Congress, 2014. Izmir, Turkey.
Evaluation of dose dependent cytotoxic activity of Cetuximab on Oral Cavity Cell Line. 5 th Turkey Medical Oncology Congress, 2014. Antalya, Turkey.
Serum Biomarkers for Head and Neck squamous Cell Carcinoma.17 th Fritz-Bender Foundation International Symposium: Progress Towards Individualized Cancer Treatment, 2013. Barcelona, Spain.
Cytotoxic and anti-neoplastic evaluation of PC, a novel Th1 stimulating adjuvant in neoplastic Balb/c mouse model.1 st International congress of Pharmacology and Pharmaceutical Science, 2008. Tehran, Iran.
Ethical, Social and Legal Aspects of Genetic Technology in Medicine. International congress of Bioethics, 2005. Tehran, Iran.

8.5. Tez Çıktıları



Congress President:

A.T.Amiraslanov(Academician, Rector)

Congress Vice-Presidents:

**Prof.I.I. Isayev, MD
Prof.A.A. Ayyubova, MD
Ass. M.C. Hasanov, MD**

Congress Consultants:

**Prof. S.C. Aliyev, MD
Prof.N.Y.Bayramov MD
Prof.S.N. Musayev, MD
Prof. H.K. Muradov, MD
Prof.R.M. Mammadhasanov, MD
Doc. R.R. Qabulova, MD
Prof.A.Y. Gaziyeu, MD
Prof.T.A. Suleymanov, MD
Prof.Z.I. Garayev, MD
Doc.N.V. Gasimov, MD
Doc.T.M. Ismayilov, MD
Doc.N.I. Naghiyev, MD
Doc.A.M. Mammadov, MD
Doc.C.L. Gasimov, MD
Doc. E.M. Novruzov, MD
N.Kh. Khalilov**

NOVEMBER 7, 2015

09:00-10:00 REGISTRATION

10:00-10:30 CONFERENCE

- Lighting Up the Inside of Cancer Cells to understand why they are murders

Dr. Vugar Yagublu/ Azerbaijan Medical University/ Germany

10:30-11:20 ORAL PRESENTATIONS: ONCOLOGY

*Chairman: Prof. Dr. Abuzar Gaziyeu, Doc. Nasimi Gasimov, Dr. Vugar Yagublu
Doc. Yasemin Baskin, PhD. Kamala Zeynalova*

- Promotor methylation profile of p14 and E-cadherin genes in urothelial bladder cancer
Bayram Bayramov, M. Alper Arslan, Sezgin Güneş, Recep Büyükalpelli, Oğuz Aydın/ Ondokuz Mayıs University/ Turkey
- The diagnosis and treatment of laryngeal granulomas.
Panahian V., Oksana Mammadova / Azerbaijan Medical University / Azerbaijan
- The identification of genomic copy number variation of E2F4 and E2F6 in breast cancer cell lines using FISH technique
Nargiz Aliyeva / The University of Sheffield / United Kingdom
- Role of RAS/RAF/MAP kinase pathway in personalized cancer management of metastatic colorectal cancer
Yasemin Baskin, Mahdi Akbarpour, Gizem Calibasi, Tugba Uysal, Ece Cakiroglu, Hulya Ellidokuz, İlhan Oztop / Dokuz Eylul University/ Turkey
- The research of the efficiency of magnetic resonance imaging in the identification of brain tumors
Sultanova Malahat C., Bayramov Rasim B., Aytan Seydaliyeva / Azerbaijan Medical University/ Azerbaijan