

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EGE BÖLGESİ REKTOSİGMOİD
KANSERLERİNDE DOMİNANT K-RAS
MUTASYON TİPİNİN BELİRLENMESİ, İLGİLİ
MUTASYONLARIN PROTEİN FONKSİYONU
VE YANITLARINA ETKİSİ**

YUSUF KAĞAN DAĞDEVİREN

TEMEL ONKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2010970040

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EGE BÖLGESİ REKTOSİGMOİD
KANSERLERİNDE DOMİNANT K-RAS
MUTASYON TİPİNİN BELİRLENMESİ, İLGİLİ
MUTASYONLARIN PROTEİN FONKSİYONU
VE YANITLARINA ETKİSİ**

**TEMEL ONKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

YUSUF KAĞAN DAĞDEVİREN

Danışman Öğretim Üyesi: Doç.Dr. Yasemin BASKIN

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2012.KB.SAG.063 sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2010970040

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Yusuf

Kağan Dağdeviren '**EGE BÖLGESİ REKTOSİGMOİD KANSERLERİNDE DOMİNANT KRAS MUTASYON TİPİNİN BELİRLENMESİ, İLGİLİ MUTASYONLARIN PROTEİN FONKSİYONU VE YANITLARINA ETKİSİ**' konulu Yüksek Lisans tezini 25/07/2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Doç.Dr. Yasemin BASKIN
BAŞKAN


Prof.Dr. Nur OLGUN

ÜYE


Prof.Dr. İlhan ÖZTOP

ÜYE


Prof.Dr. Hülya ELLİDOKUZ

ÜYE


Prof.Dr. Serap AKSOYLAR

ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vii
TEŞEKKÜR	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1 Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2 Araştırmanın Amacı.....	2
1.3 Araştırmanın Hipotezleri	2
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Kanser.....	4
2.2.Kolorektal kanserlerde, epidemiyoloji, insidans ve mortalite	4
2.2.1. Kolorektal Kanserlerde Risk Faktörü.....	4
2.2.2.İnsidans.....	4
2.2.3.Mortalite	7
2.2.4.Sağkalım.....	8
2.3. Kolon Kanserinde Etyoloji.....	9
2.3.1.Kalıtsal Risk Faktörleri	9
2.3.2.Polipler	12
2.3.3. İnflamatuar Barsak Hastalıkları (İBH).....	13
2.3.4. Çevresel Faktörler.....	13
2.4.Anatomi.....	14
2.5.Patoloji	15
2.6.Kolorektal Kanser Tanısı	16
2.6.1. Fizik muayene	16
2.6.2. Radyolojik Tanı	17
2.6.3. Labaratuar Tetkikleri	17

2.7.Kolorektal Kanselerde Evreleme.....	18
2.8. Kanserin Moleküler Temelleri	19
2.8.1. Karsinogenez	20
2.8.2. Kolorektal Kanselerde Multi-Step Karsinogenez.....	20
2.9. KRAS Onkogeni	25
2.9.1. Genetik Protein Fonksiyon İlişkisi.....	28
2.9.2. K-RAS Gen Mutasyonun Klinik Önemi	31
2.10. Hedefe Yönelik Tedavi Yaklaşımı	32
2.10.1. Anti-EGFR Tedavi	33
2.10.2. Kolorektal Kanserde Anti-EGFR Tedavisi	33
2.10.3. Kolorektal Kanserde K-Ras Fenotipinin Cetuximab Tedavi Yanıtlarına Etkisi	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Araştırmanın Tipi	36
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	36
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	36
3.4. Çalışma Materyali	36
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	37
3.6. Veri Toplama Araçları	37
3.6.1. Spin Kolon Tabanlı Nükleik Asit İzolasyonu	37
3.6.2. Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu.....	42
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	49
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	49
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	50
3.10. Etik Kurul Onayı	50
3.11. BAP Başvuru Onayı.....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1.Demografik Veriler	54
4.2.Mutasyon Bulguları.....	58
4.3.Klinik Bulgular	62
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	70
7. KAYNAKLAR.....	71
8. EKLER	79

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. AJCC Verilerine Göre KRK'de Tümör Yeri, Cinsiyet ve Etnik Köken	6
Tablo 2. 1975-2010 Yılları Arasında NCI'ya Göre Kolorektal Kanser İnsidansları Değişimi	8
Tablo 3. Tüm KRK Olguları ile Rektum ve Rektosigmoid Kanser Dağılımının Belli Yaş Aralıklarına Göre Sağkalım Oranları	9
Tablo 4. HNPCC Hastalarında Mutasyon Saptanma Oranı.....	12
Tablo 5. Kolorektal Kanserlerde Evrelemenin Karşılaştırılması.....	19
Tablo 6. Kolorektal Tümör Gelişiminde Rol alan Genler, Lokalizasyon ve Fonksiyonu	21
Tablo 7. Kolorektal Karsinomlarda K-RAS Mutasyonu	30
Tablo 8. K-RAS Mutasyon Klasifikasyonu	31
Tablo 9. Plate kullanım Şeması	44
Tablo 10. Mutasyon Analizi İçin 96 Kuyucuklu Plate Yükleme Şeması	47
Tablo 11. Çalışmaya Alınan Olguların KRAS Fenotipi	56
Tablo 12. Genel Sağkalım Ortalaması	59
Tablo 13. Genel Sağkalım Medyan	59
Tablo 14. Olgular Arası 12 ay, 24 ay ve 5 Yıllık Sağ Kalım Analizi.....	60
Tablo 15. K-RAS Mutasyonu Genel Sağkalım Süre Ortalaması.....	61
Tablo 16. Medyan Sağkalım Ortalaması	61
Tablo 17. Mutasyon Durumu Cinsiyet Karşılaştırması	62
Tablo 18. KRAS Mutasyon Durumu Karşılaştırılması.....	62
Tablo 19. Kolon ve Rektumda Mutasyon Fenotip Dağılımları	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Tüm Kanserlerde Kadın ve Erkek İnsidansı	5
Şekil 2. Türkiye Kanser Daire Başkanlığı'na Göre Türkiye İnsidansı	5
Şekil 3. AJCC Verilerine Göre Kolon Kanserin Dağılımı	7
Şekil 4. Erkek ve Kadınlarda Kanserden Dolayı 10 En Yaygın Ölüm Nedeni	7
Şekil 5. 1975 – 2005 Yılları Arasında Kolorektal Kanserde Erkek ve Kadınlarda İnsidans ve Mortalite Değişim Grafiği	7
Şekil 6. APC Geninde Oluşan İnaktivasyon Sonucu Progresyonun Artışı	10
Şekil 7. Kalın Bağırsak Anatomisi ve Seroza Yönünden Değerlendirmesi	14
Şekil 8. Kolorektal Kanserlerin Yerleşim Dağılımı	15
Şekil 9. Adenokarsinoma Görüntüsü	16
Şekil 10. Kolon Yerine Göre Belirti Farklılıkları	16
Şekil 11. Kolorektal Kanser Evrelendirmesi	19
Şekil 12. Kolorektal Adenom-Karsinom Oluşum Sürecinde Değişiklikler	21
Şekil 13. Kromozomal İnstabilite Yolu	22
Şekil 14. DNA Mikrosatellit İnstabilitesi Yolu	23
Şekil 15. En Sık Gözlenen K-RAS Mutasyon Dağılımı	24
Şekil 16. RAS İzofrom Mutasyonları	25
Şekil 17. K-RAS Geninin Kromozomal Lokalizasyonu	25
Şekil 18. K-RAS Proteini	26
Şekil 19. RAS Proteinlerinin İnaktivasyon ve Aktivasyonu	26
Şekil 20. RAS-RAF-MEK- MAPK Sinyal Yolağı	27
Şekil 21. PI3 Kinaz/AKT ve RAS-RAF-MEK-ERK Sinyal Yolağı	28
Şekil 22. K-RAS Mutasyonlarının 3D Protein Yapısında Yolaçtığı Değişikliklerin Biyoinformatik Analiz	29

Şekil 23. Cetuximab ile EGRF Reseptörünün Bağlanması.....	34
Şekil 24. K-RAS WT ve Mutasyon Durumunda Cetuximab Tedavi Farklılığı.....	35
Şekil 25. DNA İzolasyonu İş Akışı	39
Şekil 26. Mutasyon Analizinde Kullanılan Ticari Kitin İçindeki Tüplerin Renkleri.....	45
Şekil 27. Olguların Cinsiyete Göre Dağılımı	51
Şekil 28. Rektosigmoid Olguların Cinsiyete Göre Dağılımı	52
Şekil 29. Tüm Olguların Yaş Dağılımı	52
Şekil 30. Rektosigmoid Olguların Yaş Dağılımı.....	53
Şekil 31. Olguların Primer Tümör Yerleşim Yeri Dağılımı.....	53
Şekil 32. Tümör Yerleşim Yeri	54
Şekil 33. Olguların Kras Mutasyon Durumuna Göre Dağılımı	55
Şekil 34. Rektosigmoid Olguların KRAS Mutasyon Durumuna Göre Dağılımı	55
Şekil 35. Tüm Olgularda Sağkalım Analizi	57
Şekil 36. Karşılaştırmalı Sağkalım Analizi	59
Şekil 37. K-RAS Mutasyon Karşılaştırmalı Sağkalım Analizi	61
Şekil 38. Rektosigmoid ve Kolonda En Çok Gözlenen ve Hiç Gözlenmeyen Mutasyonlar	64

KISALTMALAR

A :	Adenin Bazı
ABD :	Amerika Birleşik Devletleri
ACSC :	American Cancer Society
AJCC :	American Joint Committee on Cancer
APC :	Adenomatöz Polipozis Koli
ASCO :	American Society of Clinical Oncology
C :	Sitozin Bazı
CP :	Threshold Crossing Point Values
CT :	Bilgisayarlı Tomografi
DCC :	Deleted in Colorectal Cancer
DNA :	Deoksiribo Nükleik Asit
EGFR :	Epidermal Growth Factor Reseptor (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü)
FAP :	Familial Adenomatous Polyposis (Ailesel Polipozis Sendromları)
G :	Guanin Bazı
GDP :	Guanozin dfosfat
GIS :	Gastrointestinal Sistem
GSK :	Glikojen Sentaz Kinaz-3
GTP :	Guanozin trifosfat
HNPCC :	Hereditör Non Polipozis Kolorektal Kanser
IgG :	Immunglobulin-G
İBH :	İnflamatuar Barsak Hastalıkları
İMA :	İnferior Mezenterik Arter
İMV :	İnferior Mezenterik Ven
KRAS :	V-K1-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
KRK :	Kolorektal Kanser
MAPK :	Ras/mitojen-aktiflenmiş protein kinaz
MMR :	Miss match Repair (DNA Tamir geni)
MRG :	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSI :	Mikrosatellit İnstabilitesi
NCCN :	National Comprehensive Cancer Network
NCCN :	National Comprehensive Cancer Network
NSAİD :	Non Steroid Antiinflamatuvar ilaçlar

PET :	Pozitron Emisyon Tomografisi
PI3K/Akt :	fosfoinozotid-3-kinaz
RAF :	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
Rb :	Retinoblastom
rpm :	Revolution per minute (Dakikadaki devir sayısı)
RT-PCR :	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SMA :	Superior Mezenterik Arter
SMV :	Süperior Mezenterik Ven
T :	Timin Bazı
TGF-p :	Transforming Growth Factor-P
TPA :	Tissue polipeptit antijen
TPS :	Tissue polipeptit spesifik antijen
USG :	Ultrasonografi
UV :	Ultraviyole
ÜK :	Ülseratif Kolit
VHL :	Von Hippel-Lindau Geni

TEŞEKKÜR

Uzun yıllardır bıkmadan ve yorulmadan tüm bilgi ve tecrübelerini büyük bir şevkle aktaran, samimiyetiyle her zaman yanımda olan Enstitü Müdürümüz Prof.Dr. Nur OLGUN'a,

Elinden gelen desteği asla esirgemeyen, her zaman büyük bir özveriyle uğraşan, hiçbir zaman yardım istemimi geri çevirmeyen Enstitü Müdür Yardımcı'mız Prof.Dr. İlhan ÖZTOP'a,

Eğitimimin ilk gününden bu yana her zaman benim yanımda olan, eğitimim dışında özel hayatımda da devamlı desteğini gördüğüm, çalışkanlığı, dürüstlüğü ve etik ilkelerdeki vazgeçilmezliğiyle hayatımın bundan sonraki her alanında ısrarla örnek alacağım, üzerimde çok fazla emeği geçen, bu emeğini asla unutmayacağım sevgili danışmanım Doç.Dr. Yasemin BASKIN'a teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin tüm istatistiksel analizini yapmamda bilgi ve katkılarıyla her zaman yanımda olan, yardımını asla esirgemeyen sevgili hocam Prof.Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a,

Bu tezin ortaya çıkmasında büyük katkıları olan, arkadaşlıklarını ve dostluklarını asla unutmayacağım, bana ekip olma güzelliğini gösteren ve yaşatan iki özel insana Araş.Gör.Gizem ÇALIBAŞI'ya ve Vet.Hek. Arsalan AMİRFALLAH'a,

Yardımları ve sıcak arkadaşlıkları ile her zaman yanımda olduklarını hissettiren Tekniker Ayşe ÖZCAN KESKİN ve Tekniker Nurçin KAYACIK'a,

Olgularımın cerrahi klinik bilgilerini bana sağlayan Genel Cerrahi AD Öğretim Üyesi Doç.Dr. Aras Emre CANDA'ya,

Doku örneklerimin teminini ve incelenmesini sağlayan Patoloji AD Öğretim Üyesi Prof.Dr. Sülen SARIOĞLU'na,

Başta Enstitü Sekreteri Şenay AÇIKALIN olmak üzere yardımlarından dolayı enstitü tüm çalışanlarına ve idari personeline, olguların klinik bilgilerinin temininde yardımlarını esirgemyen Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı hekim ve çalışanlarına, bir aile edasıyla kenetlenen ve her türlü güçlüğü altından kalkılabileceğini ispatlayan Temel Onkoloji Anabilim Dalı tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Ve tabiki, hayatımın her anında beni sevgiyle kucaklayan, her konuda desteklerini asla esirgemeyen, hep yanımda olan sevgili **Aileme** ve usanmadan bana destek olmayı asla bırakmayan sevgili eşim Ayça♥ya ne kadar teşekkür etsemde azdır.

SEVMEKLE BAŞLAYACAK HERŞEY DÜNYAYI.....

ÖZET

EGE BÖLGESİ REKTOSİGMOİD KANSERLERİNDE DOMİNANT K-RAS MUTASYON TİPLERİNİN BELİRLENMESİ, İLGİLİ MUTASYONLARIN PROTEİN FONKSİYONU VE YANITLARINA ETKİSİ

Yusuf Kağan Dağdeviren

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Balçova – İzmir

kagan.dagdeviren@yahoo.com

Rektum yerleşimli tümörler, tüm kolorektal grubunun ~%27-32'sini oluşturmaktadırlar. Bu bölge tümörlerinin; tümör davranışı ve metastatik süreçlerinin kolonun diğer bölgelerinden farklılandığı bildirilmektedir. Ancak bu bölge tümörlerinin gerek karsinogenez gerekse tedavi seçeneklerinde önemli bir hedef olan K-RAS mutasyon durumuna ilişkin literatürde ayrıntılı bilgi bulunmamaktadır.

Amaç: Çalışmamızın amacı rektum yerleşimli tümörlerde K-RAS mutasyonlarının durumunu saptamak, bu mutasyonların protein fonksiyonları üzerine etkilerini belirleyerek tümör davranışları üzerine bilgi edinmektir.

Yöntem: 2009-2011 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde rektosigmoid kanser tanısı konulmuş, patoloji blokları uygun örneklerde, Temel Onkoloji AD'nda K-RAS mutasyon analizi yapıldı. Spin kolon tabanlı nükleik asit izolasyonu ile elde edilen DNA materyalinde K-RAS geni kodon 12 ve 13 bölgeleri RT-PCR yöntemi ile incelenerek elde edilen veriler mutasyon açısından değerlendirildi.

Bulgular: Rektosigmoid grubun %11.4'ü G12D mutasyonuna, %8.6'sı G12V ve %5.7'si G12A mutasyonuna sahiptir. Olguların %65.7'si WT'dir. Buna karşın kolon grubunun %12.2'si G12D, %10.2'si G12V mutasyonuna sahiptir. Kolon grubunun %69.4'ü WT'dir. Kolon grubunda G12A ve G12S mutasyonları hiç saptanmazken, rektum grubunda G12C ve G13R mutasyonları hiç görülmemiştir. Tüm olgu grubunda en sık rastlanan mutasyon G12D (%11.9) mutasyonudur.

Sonuç: Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar ve protein modelleme çalışmaları, mutant K-RAS proteinlerinin heterojen davranış modellerini kanıtlamaktadır. Buna bağlı olarak tümör

spesifik mutant K-RAS proteinlerinin tümör davranışına ve sağıltım çıktılarının farklılığına yönelik klinik çalışmalar henüz bulunmamaktadır.

Çalışmamız rektosigmoid ve kolon bölgelerinde, K-RAS mutasyon tiplerinden agresif ve daha yavaş seyirli olarak bilinen fenotiplerin farklı dağılım hızlarına sahip olduğunu göstermiştir. Bu olgularda tümör davranışı ve sağıltım çıktılarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte olgu sayımızın azlığı buna neden olmuş olabilir. Bu konuya odaklanan prospektif, iyi dizayn edilmiş ve daha fazla olgunun yer aldığı bir çalışmanın literatüre önemli katkısı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Rektosigmoid kanserler, K-RAS genotipi, K-RAS fenotipi

ABSTRACT

DETERMINATION OF DOMINANT K-RAS MUTATION TYPE AND THE EFFECT OF DETERMINED MUTATIONS ON PROTEIN FUNCTION AND RESPONSE IN AEGEAN REGION RECTOSIGMOID CANCERS

Yusuf Kağan Dağdeviren

Dokuz Eylül University Hospital Balçova – İzmir

kagan.dagdeviren@yahoo.com

Tumors located at the rectum constitute 27% - 32 of the all colorectal group cancers. Tumors in this anatomic region have different processes in tumor and metastases behavior from other parts of the colon tumors. There is no exhaustive information in literature about K-RAS mutation of tumors located in rectum region.

Objective: Purpose of this study was to determine K-RAS mutation status and identifying these mutations on protein function and tumor behavior of rectum located tumors.

Method: Recto sigmoid cancer diagnosed patients between 2009-2011 years in Dokuz Eylül University Hospital enrolled to this study. DNA was isolated from paraffin embedded pathology blocks with spin column base DNA isolation method in Basic Oncology Department Laboratory. Isolated DNA was amplified with real time PCR to genetic analyses.

Results: Recto sigmoid groups offered 11.4% G12D, 8.6% G12V and 5.7% of G12A mutations. %65.7 of cases with rectum tumors were wild type for KRAS mutations. For all that, colon groups offered 12.2% G12D, 10.2% G12V mutations. %69.4 of colon group was wild type for KRAS mutation. G12A and G12S mutations were not detected in colon groups like G12C and G13R mutations in rectum groups. The common mutation in the entire study group was G12D (%11, 9) mutation.

Conclusion: Molecular and protein modeling studies demonstrate that KRAS mutant proteins have heterogeneous patterns of behavior. Clinical trials have continued about this behavior differences relations with treatment outcomes. Aggressive and slowly progressing K-RAS mutation phenotypes in recto sigmoid and colon study showed different distribution rates. There were no statistical relations between tumor behavior and treatment outcome in our study. This could be related to small number of study group. A well designed prospective study with large number of patients contributes to the literature.

Key Words: rectosigmoid cancers, K-RAS genotype, K-RAS phenotype

1. GİRİŞ VE AMAÇ:

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Kanser, kalp ve damar hastalıklarından sonra en sık görülen ölüm sebepleri arasındadır. Kolorektal kanserler değişen beslenme ve yaşam şekilleri ile kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen ilk 5 kanser türü arasında yerini almıştır. Türkiye’ de 2004-2006 yılı kanser insidansı çalışmalarında görüldüğü gibi erkeklerde en sık 4. kadınlarda ise 2. sırada yer almaktadır (1). Rektosigmoid kanserler ise tüm kolorektal kanserler arasında %29’luk bir kısmı oluşturmaktadır (23). Kolorektal karsinogenezinde epidermal büyüme faktör reseptörü (Epidermal Growth Factor Reseptör, EGFR) önem taşımaktadır (2). Bu nedenle EGFR kanser tedavisinde önemli bir hedef haline gelmiştir (3,4).

Hücresinin içi ve dışı arasındaki sinyal iletimini sağlayan EGFR’nin dış yüzüne epidermal büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü- α gibi ligandların bağlanması ile hücre içinde bulunan tirozin kinaz alt birimi fosforillenir. Reseptör aktivasyonu K-RAS G proteini, RAF protein kinazı [Ras/mitojen-aktiflenmiş protein kinaz (MAPK) yolağı] ve fosfoinozimid-3-kinaz (PI3K/Akt) gibi hücre içi sinyal yollarında yer alan efektörlerin aktivasyonunu yönetir (5). Bu yollardan MAPK yolağında yer alan ve Kirsten RAS geninden eksprese olan K-RAS proteini GTPaz aktivitesine sahip olan RAS protein ailesinin üyelerindedir (6).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda kolorektal kanserlerde K-RAS mutasyonlarının %30-40 oranlarında bulunduğu saptanmıştır (7). En yaygın K-RAS geni mutasyonlarının ekson2’nin kodon 12 (tüm raporlanan K-RAS mutasyonlarının ~82%’ i) ve kodon 13’ünde (tüm raporlanan K-RAS mutasyonlarının ~17%’ i) bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca kodon 61, 63 ve 146 gibi farklı pozisyonlarda da aktifleyici mutasyonlar raporlanmıştır. Ancak bu değişikliklerin raporlanan tüm K-RAS mutasyonları arasındaki oranı çok az olmakla birlikte (1-4%) rektosigmoid kanserlerdeki klinik önemleri de belli değildir (8).

EGFR’nin aktiflenip fosforillenmesi ile K-RAS’da geçici olarak aktiflenir. RAS GDP bağlı iken inaktiftir. Ancak GDP’nin GTP’ye dönüşmesi ile aktiflenir (4). RAS-GTP/GDP düzeyleri guanin nükleoid değişim faktörleri ve GTPaz aktifleyici proteinlerle düzenlenir ve bu dengedeki bozukluklar karsinogenezi indükler (9).

EGFR'nin sinyal yolağının kolorektal karsinogenezindeki rolünün aydınlatılması ile EGFR karşıtı monoklonal antikorların metastatik kolorektal kanserinde kullanımı gündeme gelmiştir. Özellikle cetuximab ve panitumumab gibi EGFR karşıtı antikorlar metastatik kolorektal ve rektosigmoid kanserinde etkili olmuşlardır (3). Cetuximab (Erbix®) ve panitumumab (Vectibix®) gibi EGFR inhibitörü olarak tasarlanan monoklonal antikorlar EGFR'a bağlanarak reseptöre özgün ligandların bağlanmasını, reseptör internalizasyonunu engelleyerek reseptör tirozin kinaz aktivitesini ve alt yolakların aktivasyonunu direkt inhibe eder (10). Ancak EGFR yolağında yer alan RAS proto-onkogeninde fonksiyon kazandıran mutasyonlar; tümör hücre proliferasyonu, apoptoza karşı direnç, invazyon ve metastazın artması, anjiyogenez aktivasyonunu sağlayan hücre içi sinyal yolaklarının EGFR'dan bağımsız olarak çalışmasına neden olurlar. Bu yüzden K-RAS genindeki mutasyonlar hedefe yönelik anti-EGFR sağaltımlarının başarısız olmasının sebebidir (3).

K-RAS mutasyonlarının hedefe yönelik antikor tedavileriyle ilişkisinin belirlenmesi nedeniyle American Society of Clinical Oncology (ASCO) ve National Comprehensive Cancer Network (NCCN)'in protokellerinde sağaltımdan yararlanacak hastaların moleküler bir testle belirlenmesi önerilmiştir (11).

1.2. Araştırmanın Amacı :

Dokuz Eylül Üniversitesi (DEU) Patoloji AD arşivinde parafin blok örneklerinden rektosigmoid kanser histopatolojik tanısı konulan ve Klinik Onkoloji AD'nda tedavi edilen hastalarda K-RAS mutasyon analizi yapılarak K-RAS mutasyonlarını ve dağılımlarını değerlendirerek mutasyonların protein yapısı üzerindeki etkinliğini, protein fonksiyonlarının değişip değişmediğini araştırmaktır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri :

Rektosigmoid kanserlerde K-RAS mutasyonların dağılımına ait Türk kaynaklı veriler oldukça azdır. Dünyada da henüz araştırma safhasında olan bir konudur. Aynı zamanda Ege bölgesi ve çevresinde rektosigmoid kanser tanısı almış hastalarda K-RAS mutasyonu analizi

yapılarak mutasyon pozitif hastaların Cetuximab tedavi rejimlerine göre klinik dosyalarının incelenme ve değerlendirilmesi sağlanabilir.

İnsan ve diğer canlıların ele alındığı genom projeleri, yeni deneysel teknolojilerin uygulanmasıyla beraber bir çok farklı veriye çok hızlı olarak ulaşım imkanı sağlamaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen verilerle genom sonrası çağın gündeme gelmesini ve yeni yüksek teknolojilerle donanmış yeni araştırma alanlarının moleküler biyoloji çalışmalarına katılmasını sağlanabilir.

Ege Bölgesi hasta verileri değerlendirileceği için, bölgemiz dahilinde rektosigmoid tanısı almış hastaların K-RAS mutasyon durumları ve verdikleri yanıtlar incelenerek, bölgesel bir veritabanı elde edilebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser; hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve ölümünü regüle eden genlerde bozukluk sonucu oluşan hücrelerdeki anormal büyüme olarak tanımlanabilir. Dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme neden olan hastalık grubunu oluşturmaktadır (12). Çevresel ve/veya kalıtsal birçok faktörün etki ettiği kanser; bir çok genin etkili olduğu çok basamaklı hücresel değişimlerdir (13).

Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümü için genomun hasara uğraması gerekmektedir. Genomdaki hasar, DNA replikasyonunda meydana gelen hataların sonucu olabileceği gibi, metabolizma sırasında meydana gelen serbest radikallerin bazı DNA bazları üzerinden hasar oluşturması gibi nedenlerden de kaynaklanabilir. DNA hasarı, iyonize radyasyon, UV ve kimyasal karsinojen gibi ajanların etkileşimi ilede gerçekleşebilmektedir (14).

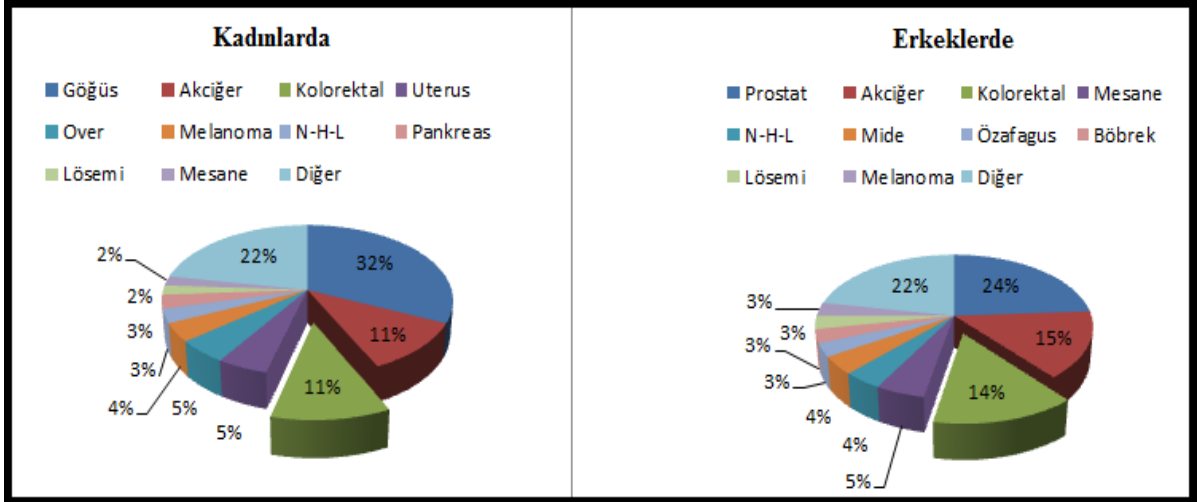
2.2. KOLOREKTAL KANSERLERDE VE REKTUM KANSERLERİNDE EPİDEMİYOLOJİ

2.2.1. Kolorektal Kanserlerde Risk Faktörü:

Kolorektal kanser kolon, rektum ve appendiksdeki büyümeleri kapsar. Kolorektal kanserler en çok adenomatöz polip sonucu ortaya çıkar. Bu tümörler genellikle iyi huyludur, ancak zaman içinde kansere dönüşebilir. KRK riski 60 yaş ve üzeri kişilerde daha çoktur ve olguların neredeyse %83'ünü oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerde yaygın bir şekilde gözlenmesine karşın az gelişmiş ülkelerde daha az sıklıkla rastlanmaktadır (15).

2.2.2. İnsidans:

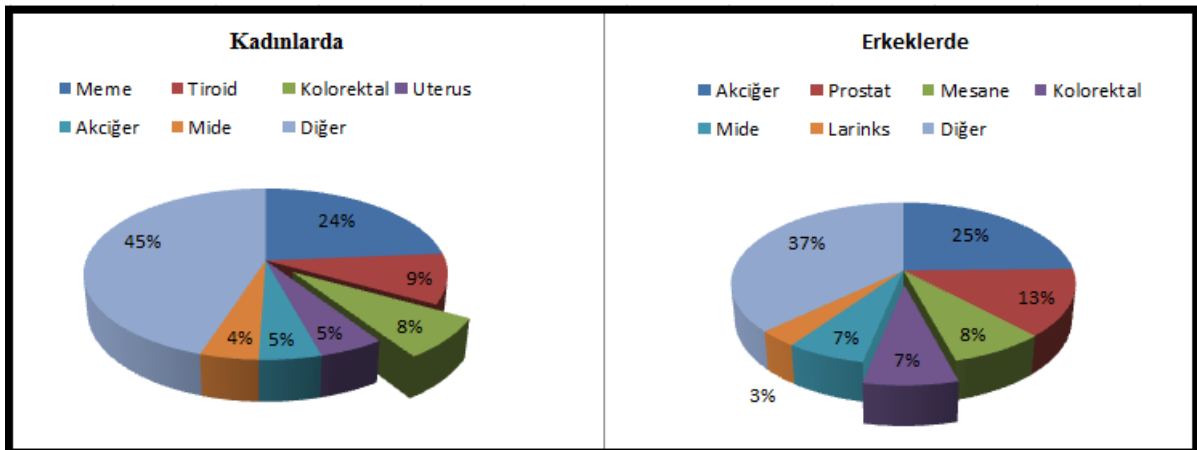
KRK; hem erkeklerde hem de kadınlarda tüm kanserler arasında üçüncü sıklıkta görülen kanserdir. Erkeklerde akciğer ve prostat kanserlerinden sonra, kadınlarda ise akciğer ve meme kanserinden sonra kansere bağlı ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır (Şekil 1). Genel olarak her yıl yaklaşık 1,200,000 yeni KRK vakası olduğu düşünülmektedir. Bu sayı bütün kanser vakalarının yaklaşık olarak % 10'unu oluşturmaktadır (16). Kolorektal kanser nedeniyle ölenlerin sayısının yıllık 609,000 olduğu tahmin edilmektedir (17).



Şekil 1: Tüm Kanserlerde Kadın ve Erkek İnsidansı (17)

ACS verilerine göre 2011 yılında 101.340 kolon, 39.870 rektum kanseri vakası saptanmış olup; kolorektal kanser insidansı son 20 yılda 100.000’de 66,3’ten, 45,3’e gerilediği gözlenmektedir. Bu hızlı düşüşün en önemli nedeni, kanserin erken tanı ve teşhisini sağlayarak hastalığın prognozunu olumlu katkılar sağlayan kolorektal kanser tarama programlarının geliştirilerek dünyada yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmasıdır (18).

Dünyada kolorektal kanser yüz binde 20’lerde iken, Avrupa Ortalaması yüz binde 37’dir. Türkiye’de ise; Türkiye Kanser Daire Başkanlığı’nın son verilerine göre erkeklerde yüz binde 20.8 (%7) ile akciğer, prostat ve mesaneden sonra 4. sıradadır. Kadınlarda ise meme ve tiroidden sonra yüz binde 13.2 ile (%8) 3. sıradadır (19).



Şekil 2: Türkiye Kanser Daire Başkanlığı’na Göre Türkiye İnsidansı (19)

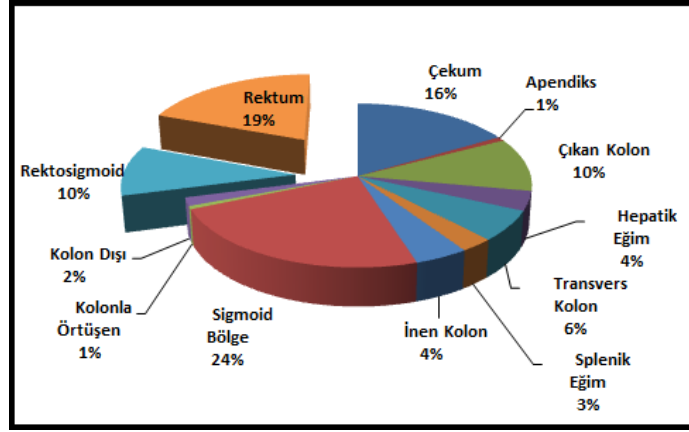
2006-2010 yılları arasındaki veriler incelendiğinde KRK tanı medyan yaşı 69 olarak gözlenmektedir. Tanı için yaş dağılımına bakıldığında ise yaklaşık %0.1’i 20 yaş altı,

%1.2'si 20 ve 34 yaş arasında, %4.'ü 35 ile 44 yaş arasında, %13.8'i 45 ve 54 yaş arasında, %20.8'i 55 ve 64 yaş arasında, %24'ü 65 ve 74 yaş arasında, %24.1'i 75 ve 84 yaş arasında ve % 12'si 85 yaş üstü olarak kaydedilmiştir (20).

KRK insidansını etkileyen en önemli demografik faktör yaştır. Bütün gruplar için sporadik KRK insidansı 45-50 yaş üstünde belirgin olarak artmaktadır. Hemen hemen bütün ülkelerde yaşa bağlı insidans artışı kadınlarda erkeklerden daha azdır. ABD'de ve Kanada'da yaşa bağlı insidans artışında azalma olmasına rağmen Japonya, Kore ve Çin'de ise insidans giderek artmaktadır (17). Genel olarak KRK insidansı ve mortalite hızları sosyoekonomik olarak gelişmiş olan batı ülkelerinde en fazladır (21). Bunun nedeni yüksek yağ ve kırmızı et tüketimi, obeziteyle sonuçlanan fiziksel aktivite azlığı olduğu düşünülmektedir (22). Özellikle erken tarama testlerinin ön plana çıkması sebebiyle 2000 yılından sonra erkek ve kadın insidanslarındaki azalma gözlenmektedir (23). Aşağıdaki tabloda American Joint Committee on Cancer (AJCC)'e göre 1988-2001 yılları arasında kolorektal kanserlerin yerine göre sınıflandırması, kişi sayısı, ırk ve cinsiyete göre dağılımı gözlenmektedir (24).

Tablo 1 : AJCC Verilerine Göre KRK'de Tümör Yeri, Cinsiyet ve Etnik Köken (23)

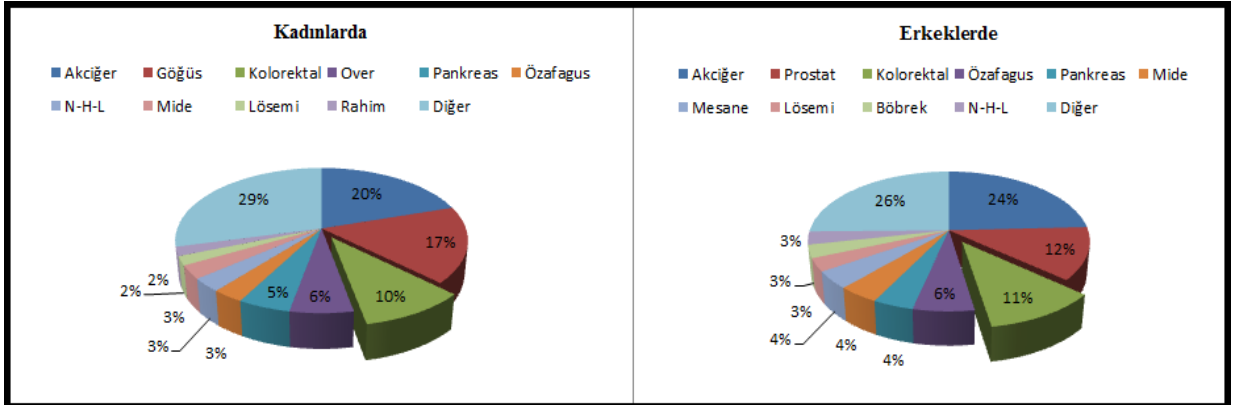
	Toplam	Cinsiyet		İrk			Kolondaki % Oran
		Erkek	Kadın	Beyaz	Siyah	Diğer	
KOLON VE REKTUM	182.589	92.880	89.709	150.522	16.830	15.237	100,0
KOLON	129.445	62.825	66.620	106.695	12.732	10.018	70,9
Çekum	30.203	13.186	17.017	25.528	3.166	1.509	16,5
Apendiks	1.455	726	729	1.210	146	99	0,8
Çıkan Kolon	19.236	8.682	10.554	15.966	1.961	1.309	10,5
Hepatik Eğim	6.998	3.361	3.637	5.782	655	561	3,8
Transvers Kolon	11.142	5.012	6.130	9.231	1.073	838	6,1
Splenik Eğim	5.045	2.725	2.320	4.012	689	344	2,8
İnen Kolon	8.194	4.248	3.946	6.380	994	820	4,5
Sigmoid Bölge	43.016	22.767	20.249	35.220	3.520	4.276	23,6
Kolonla Örtüşen	1.129	584	545	911	135	83	0,6
Kolon Dışı	3.027	1.534	1.493	2.455	393	179	1,7
REKTUM VE REKTOSİGMOİD	53.144	30.055	23.089	43.827	4.098	5.219	29,1
Rektosigmoid	17.984	9.967	8.017	14.897	1.403	1.684	9,8
Rektum	35.160	20.088	15.072	28.930	2.695	3.535	19,3



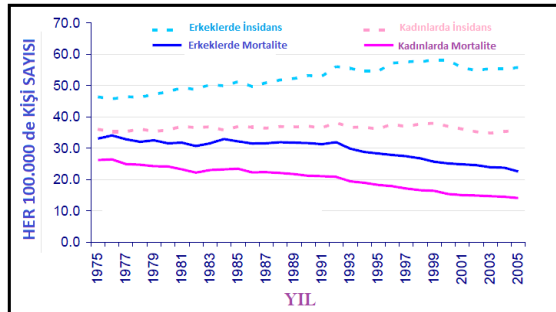
Şekil 3: AJCC Verilerine Göre Kolon Kanserinin Dağılımı (23)

2.2.3. Mortalite:

Kolorektal kanser akciğer sonra kanser ölümlerinin ikinci en yaygın nedenidir (Yaklaşık % 10). 2006 yılında İngiltere'de yapılan araştırmada kolorektal kanser nedeni ile 15.957 ölüm gözlemlenmiştir. Bunun kolon kanseri nedeniyle olanların sayısı 10.119'du. 5.838 kişi ise rektum kanseri sebebiyle oluştu. Tüm erkek kanser ölümlerinin % 11'i (8.511) ve tüm kadın ölümlerinin %10'undan (7.446) sorumludur.



Şekil 4: Erkek ve Kadınlarda Kanserden Dolayı 10 En Yaygın Ölüm Nedeni (24)



Şekil 5: 1975–2005 Yılları Arasında Kolorektal Kanserde Erkek ve Kadınlarda İnsidans ve Mortalite Değişim Grafiği (24)

2.2.4. Sağkalım:

KRK'de son yıllarda yapılan çalışmalarda 5 yıllık sağkalım oranlarının arttığı gözlenmektedir. Bu sonuçlar cinsiyet, ırk ve etnik farklılıktan bağımsızdır. İlk bakışta diyet, yaşam tarzı alışkanlıklarında değişimler ya da kemopreventif ajanların yaygınlaşmasının da katkıda bulunduğu düşünülse de polipektomini ile birlikte yapılan kolonoskopi uygulamalarının yaygınlaşmasının bu sonuçlarda rolü olduğu düşünülmektedir (22).

Tablo 2 : KRK Yerleşim Yerine Göre 1, 3, 5 ve 10 Yıllık Sağkalım Analizi (23)

	RELATİF SAĞKALIM ORANI (%)											
	TOPLAM				ERKEK				KADIN			
	1YIL	3 YIL	5 YIL	10 YIL	1YIL	3 YIL	5 YIL	10 YIL	1YIL	3 YIL	5 YIL	10 YIL
KOLON VE REKTUM	83,3	69,9	63,6	57,7	84,2	70,6	63,7	57,8	82,4	69,1	63,5	57,5
KOLON	82,0	69,3	64,0	58,9	83,0	70,4	64,7	60,0	81,1	68,3	63,4	57,9
Çekum	79,8	65,7	61,2	56,7	80,9	66,2	60,7	56,6	78,9	65,4	61,6	56,7
Apendiks	85,0	68,2	59,3	50,4	84,3	68,4	59,1	49,2	85,6	68,1	59,2	51,3
Çıkan Kolon	81,7	70,3	66,0	60,7	82,8	70,6	66,0	60,6	80,8	70,0	66,0	60,8
Hepatik Eğim	78,6	66,6	62,1	55,0	78,7	66,1	61,1	55,0	78,4	67,0	62,9	54,8
Transvers Kolon	79,7	67,2	62,4	56,6	80,9	69,2	63,6	58,6	78,7	65,6	61,4	54,9
Splenik Eğim	80,1	64,9	59,6	53,3	81,0	66,3	60,3	54,6	79,1	63,3	58,7	51,4
İnen Kolon	84,8	72,4	65,5	58,3	85,9	74,0	66,8	60,1	83,6	70,8	64,1	56,5
Sigmoid Bölge	86,9	74,8	68,7	64,0	87,4	75,8	69,7	65,5	86,4	73,6	67,7	62,5
Kolonla Örtüşen	74,3	60,1	54,7	50,9	74,6	58,2	52,9	43,9	73,9	62,2	55,9	55,9
Kolon Dışı	50,1	34,6	29,2	23,4	52,5	38,3	33,7	28,4	47,7	30,9	24,5	17,9
REKTUM VE REKTOSİGMOİD	86,5	71,3	62,7	55,0	86,7	71,1	61,9	53,8	86,1	71,5	63,7	56,5
Rektosigmoid	86,3	71,4	62,8	55,6	86,4	71,0	61,6	53,2	86,2	72,0	64,3	58,1
Rektum	86,5	71,2	62,6	54,7	86,9	71,2	62,1	54,1	86,1	71,3	63,3	55,5

Tablo 3: Tüm KRK Olguları ile Rektum ve Rektosigmoid Kanseri Dağılımının Belli Yaş Aralıklarına Göre Sağkalım Oranları (23)

KANSER BÖLGESİ/YAŞ ARALIĞI	Toplam	Yüzde	RELATİF SAĞKALIM ORANI (%)			
			1 YIL	3 YIL	5 YIL	10 YIL
Tüm Kolon	182.589	100,0				
20-49	15.670	8,6	87,6	70,0	62,8	56,7
50-64	44.949	24,6	87,4	72,2	64,9	59,0
65-74	54.379	29,8	85,0	71,7	65,0	59,3
75+	67.591	37,0	77,9	66,2	61,3	55,1
Rektum ve RS	53.144	100,0				
20-49	5.836	11,0	90,3	72,9	64,7	57,0
50-64	15.605	29,4	90,7	75,3	65,9	58,2
65-74	15.816	29,8	87,5	72,8	64,2	56,2
75+	15.887	29,9	79,4	64,0	55,6	47,7
Rektosigmoid	17.984	100,0				
20-49	1.663	9,2	89,6	70,1	61,5	52,8
50-64	5.211	29,0	89,9	74,5	65,0	57,9
65-74	5.654	31,4	87,6	72,7	64,5	57,5
75+	5.456	30,3	80,1	66,9	58,4	50,2
Rektum	35.160	100,0				
20-49	4.173	11,9	90,6	74,0	66,0	58,7
50-64	10.394	29,6	91,1	75,7	66,3	58,3
65-74	10.162	28,9	87,4	72,9	63,9	55,2
75+	10.431	29,7	79,1	62,5	54,1	46,1

2.3. KOLON KANSERLERİNDE ETYOLOJİ

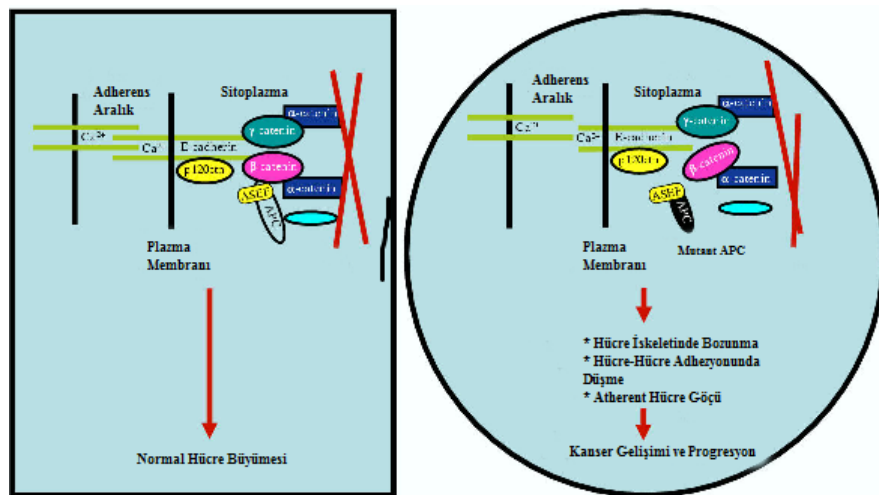
Kolorektal kanser etyolojisinde çok sayıda faktörün rol oynayabileceği düşünülmele beraber kesin neden bilinmemektedir. Genetik, deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar hastalığın kalıtsal ve çevresel faktörlerin biraraya gelmesi sonucu ortaya çıktığını göstermektedir (25).

2.3.1. Kalıtsal Risk Faktörleri

Kolorektal kanserlerin ortaya çıkışında genetik değişiklikler önemli rol oynar. Hastaların büyük çoğunluğunda kolon kanseri bir seri somatik mutasyon sonucunda gelişir. Kolorektal kanserler malign gelişim ile sonuçlanan genetik ve hücresel olaylar zinciri açısından bilgi elde etmek amacıyla oldukça detaylı araştırılmış bir kanser tipidir. Tümörlerin malign formu zaten var olan benign tümörlerden gelişir.

2.3.1.1 Ailesel Polipozis Sendromları (FAP) (Familial Adenomatous Polyposis): Otozomal dominant geçiş gösteren, hemen hemen tüm vakalarda penetransı %100 olan bir hastalıktır. Normalde yüzlerce benign poliple seyreden bir durum söz konusudur. Tüm KRK insidansının % 1'ini oluşturur. Otuzlu yaşlara kadar hastalarda yüzler ve binlerce polip gelişir ve cerrahi olarak kolon çıkarılmaz ise hastaların tümünde KRK gelişebilir (26). Beyin tümörü ile kolonda polip birlikteliği Turcot sendromu olarak adlandırılmaktadır. Turcot sendromundaki poliplerin sıklığı daha azdır fakat klasik FAP'dakinden daha büyüktürler (27). APC geni 15 eksondan oluşur ve yaklaşık 2850 aminoasid tarafından kodlanır. APC genindeki bütün germline mutasyonlar moleküler tanısal yöntemlerle saptanabilir ve hasta ve yakınları için genetik analiz yapılabilir (28).

FAP ile birlikte izlenen kolorektal kanserlerdeki mekanizma şu şekilde gerçekleşir; APC genine ait mutant bir allel etkilenmiş bir ebeveynden aktarılır. Diğer allelde ortaya çıkan kazanılmış bir somatik mutasyon kanser gelişimine yol açar. APC geni 5 numaralı kromozomun uzun kolunda (5q21) haritalanmış bir tümör baskılayıcı genidir. Bu mutasyon kolondaki normal epitelyal hücrelerde ortaya çıkar. APC geni Wnt arayolunu kontrol eden genidir. Wnt arayolu uyarıldığı zaman hücre proliferasyonu artar. Wnt proteinleri hücre yüzeyindeki Wnt reseptörlerine bağlanırlar. APC-Axin-GSK kompleksini inaktive edecek proteinleri indükleyerek devreye sokarlar. Bu kompleks β -katenin proteinini fosforilleyerek ubiquinizasyonla proteozomlarda yıkılmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla hücrede β -katenin miktarının azalması ile Wnt arayolu inaktif, artmasıyla aktif hal almaktadır (Şekil 4).



Şekil 6: APC Geninde Oluşan İnaktivasyon Sonucu Progresyonun Artışı (29)

β -katenin nükleusa girerek transkripsiyon faktörleri ile etkileşir. Aralarında c-Myc geninin de yer aldığı çeşitli genlerin aktifleşmesine yol açar. APC mutasyonları sonucunda her iki allel de kayba uğrayınca Wnt arayolu üzerindeki kontrol kalkar. Bu yol sürekli açık kalır. Hücre bölünmesi kontrolsüz kalır. Erken adenom evresine geçilmiş olur. Bunu takip eden RAS onkogen mutasyonları tabloyu bir ileri aşamaya taşır. Onkogenlerin bir allelinde ortaya çıkan bir mutasyon onkojenik progresyon için yeterlidir. 12p üzerinde yer alan RAS onkogenindeki mutasyonlar APC genindeki mutasyonla üstüste binince polip giderek büyür ve parmaksı uzantılara sahip bir hal alır. Bu aşama intermediate adenom aşamasıdır. Bunu takiben 18. kromozomun uzun kolunda kayıplar izlenir. Erken ve intermediate adenomların %10'unda 18q'da kayıp vardır. Geç dönem adenomlar ve adenokarsinomlarda bu kromozoma ait kayıp oranı %50'lere yükselir. 18q21'de yerleşim gösteren DCC (deleted in colon cancer) ve SMAD4 ve SMAD2 genleri kayba uğramış olur (30).

2.3.1.2. *Hereditär Non Polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC)*: Tüm KRK'in %3'ünü oluşturmaktadır. Dikkati çeken fenotipik özelliği sağ veya proksimal kolonda 100'e kadar polip (nonpolipozis) içermesidir. HNPCC vakalarında; APC gen mutasyon mekanizmasına ek olarak hatalı eşleşme tamir (MMR) genlerindeki mutasyonların bu hastalığın patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir. Tip 1 HNPCC hızla kolorektal kansere progresyon gösterir ve erken yaşta kolon kanser gelişimi ile karakterizedir. Ortalama kanser ortaya çıkma yaşı 43'tür. Tip 2 HNPCC mide, ince barsak, safra kanalı, renal pelvis, üreter, mesane, uterus, over, deri gibi ekstrakolonik malignite varlığı ile ayırt edilmektedir. Klinik tanısı HNPCC olan ailelerin %15-60'ında bu genlere ait mutasyonlar saptanmıştır. Hayat boyu KRK gelişim riski % 80 civarındadır (31).

HNPCC ile asosiyeye olduğu bilinen ve MMR mekanizmasını kontrol altında tutan MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 olmak üzere 4 farklı gen bulunmaktadır. HNPCC'li ailelerin ~%90'ında MLH1 ve MSH genlerinden birisinde, %7-10'unda MSH6 geninde mutasyonlar saptanırken %5'inden azında ise PMS2 geninde mutasyonlar gözlenir (Tablo 4). Germline mutasyonu saptanırsa diğer aile üyeleri bu mutasyon açısından genetik olarak taranmalıdır (32).

Tablo 4 : HNPCC Hastalarında Uygulanan Moleküler Genetik Testler (33)

Gen	Mutasyon Saptanma Oranı (%)	
	Tüm Gen DNA Dizi Analizi	Delesyon Analizi
MLH1	60-69	5-10
MSH2	50-69	17-50
MSH6	-	nadir

HNPCC'de kolorektal kanserli vakaların %90'nında ve adenomalı vakaların %80'inde MSI tesbit edilmiştir. Bu hastalık, genellikle sağ kolon kanseriyle karakterizedir ve erken yaşta ortaya çıkar. Lynch I, Lynch II Sendromları olarak da bilinmektedirler. Lynch I'de kolon ve rektumda kanserler olmasına karşın, Lynch II sendromunda mide, kolorektal, jinekolojik, üriner sistem, ve meme kanserleri birlikte görülebilir (30).

2.3.1.3. Hamartamatoz Polipozis Sendromları: Gastrointestinal sistem boyunca en çok ince barsaklarda, daha az oranda mide ve kolonda olmak üzere 1-4 cm büyüklüğünde hamartamatöz polipler ile birlikte dudaklar ve ağız mukozasında melanin lekeleri ve benekleri ile karakterizedir. Kanser gelişme riski %2-3 kadardır (30).

2.3.1.4. Juvenil polipozis: Polipler genellikle kolon ve rektumdadır, puberte sırasında kaybolabilir. Hastaların %70'inde soliter, geri kalanlarda 2-3 polip olabilir, nadiren sayı 10'dan fazla olduğunda hastalık juvenil polipozis olarak nitelendirilir. Kanser bakımından risk taşır (34).

2.3.1.5. Ailesel Kolorektal Kanser: Tahmini olarak % 20–30 KRK vakasında, bilinen sendromlardan bağımsızdır. Aile hikayesi yaşam boyu KRK'e yakalanma riskini artırır. En az bir tane birinci derece akrabada KRK varlığı KRK'e yakalanma riskini iki kat artırır. Ailede bir kişide 60 yaş altında KRK görülmesi de KRK'e yakalanma riskini artırır (35).

2.3.2. Polipler

Kolorektal kanserlerin % 33'ünün etyolojisinde polip bulunmuştur. Her bir polip için kanser riski polipin boyutları ve histolojik tipi ile ilişkilidir. Tübüler adenomlar villöz adenomlara göre daha az kanser riski taşımaktadır. Genel olarak 2 cm'den büyük poliplerin yaklaşık yarısı karsinoma dönüşmektedir. En sık görülen polip tipi hiperplastik polipler olup kanserleşmezler. Adenomatöz polipler ise 2. sıklıkta görülen ve neoplastik tipte poliplerdir. Çapı 2 cm'den büyük, sapsız, villöz yapıda, multipl ve displazik özellik gösteren adenomatöz polipler, KRK gelişimi açısından risk oluşturmaktadırlar (36-37).

2.3.3. İnflamatuvar Barsak Hastalıkları (İBH)

İBH'nda artmış KRK riski mevcuttur (38). Temel özellikleri nedeniyle ülseratif kolit ve granülatöz kolit (chron) olmak üzere ikiye ayrılır.

2.3.3.1. *Ülseratif Kolit*: Spesifik olarak ülseratif kolitte (ÜK) hastalığın süresi, yaygınlığı ve displazi ile ilişkili olarak yüksek KRK riski söz konusudur. ÜK'li olgularda tanıdan 20 yıl sonra KRK riski % 5–10, 30 yıl sonra % 10–20 bulunmuştur (39).

2.3.3.2. *Granülatöz Kolit*: Chron hastalığı ileokolik bölgeyi veya kolonun sınırlı bir bölgesini etkilemektedir. Kolonik tutulum yokluğunda KRK riskinde artış söz konusu değildir. Kolonik tutulum 30 yaşından önce saptanmış ise risk artmaktadır. Karsinomlar chron hastalığının lokalizasyonu ile ilişkilidir. Chron hastalığındaki intestinal kanserlerin %73'ü kolon ve rektumda saptanmıştır (40).

2.3.4. Çevresel Faktörler

2.3.4.1. *Kalori Alımı, Fiziksel Aktivite ve Obezite*: Vücut kitle indeksinde artış KRK riskinde iki kat artışla sonuçlanabilir. Ayrıca yüksek açlık kan şekeri, yüksek insülin düzeyleri ve obezite ile KRK riskinde artış gösterilmiştir (39). Fiziksel inaktivite KRK riskinde artışla ilişkilendirilebilir. En son verilerde, evre I-III kolon kanseri tanısı aldıktan sonra fiziksel aktivitenin kanser ilişkili riski ve genel sağkalımı arttırdığı ve evre III kolon kanserinde rezeksiyonu takiben rekürrens riskini azalttığı saptanmıştır (40).

2.3.4.2. *Kırmızı Et Tüketimi*: Yüksek ateşte pişirilmiş et tüketiminin de özellikle rektum kanserinde olmak üzere KRK riskini arttırdığı bilinmektedir. Yüksek proteinli diyet karsinogeneze yol açabilir ve yüksek proteinli diyet artmış epitelyal proliferasyonla ilişkilidir. Kırmızı etteki yağ komponentleri tümör başlatıcı olabilir ve yağlar luminal bakteriler tarafından kolonik epitelyal proliferasyona yol açan karsinojenlere dönüşebilir (41).

2.3.4.3. *Yüksek Lifli Diyet*: Buğday kepeği, meyve ve sebze yüksek lifli besinlerdir. Yüksek lifli diyet fekal karsinojenleri dilüe eder, kolon geçiş süresini kısaltır, ve uygun bir luminal çevre oluşumuna yol açar. Bununla beraber en son yapılan çalışmalarda yüksek lif alımı ile KRK arasında ters bir ilişki saptanmamıştır (42).

2.3.4.4. *Meyve ve Sebze tüketimi*: Kolorektal kansere karşı koruyucu etkisi olduğu kabul edilmiştir. Antioksidan vitaminler (E, C, ve A), folat, tioeter, terpenler, bitki fenoller, etkin kemopreventif ajanlar olup olmadığını gösteren ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (43).

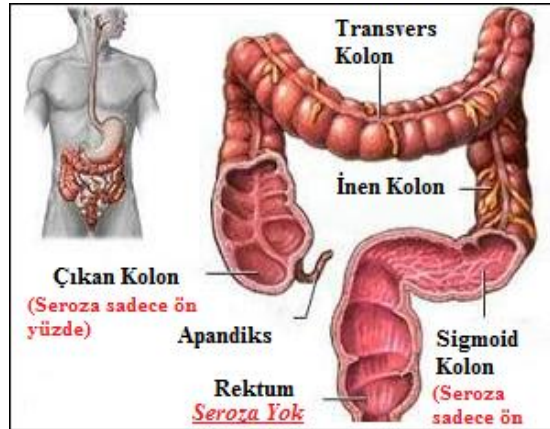
2.3.4.5. *Alkol Ve Sigara Tüketimi*: Günlük alkol alımı KRK riskini iki kat arttırmaktadır. Asetaldehid aracılı folat metabolizması bu ilişkiden sorumlu tutulmaktadır. Alkol tüketimi ile özellikle erkeklerde görülen rektal kanseri arasında kuvvetli ilişki mevcuttur (44). Uzamış sigara kullanımı ile KRK riski ilişkilidir. 35 paket yılı aşan sigara içimi riskde artışla ilişkili olduğu saptanmıştır.

2.3.4.6. *Non Steroid Antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİD)*: Pek çok çalışmada aspirin ve NSAİD kullanımının KRK ve adenom insidansı ile ters ilişkisi olduğu gösterilmiştir (45).

2.4. ANATOMİ

Kalın barsaklar yaklaşık 120-200 cm olup ileoçekal valvden anüse kadar uzanır. Bu mesafe, toplam gastrointestinal sistem uzunluğunun 1/5' ini teşkil eder. Terminal ileum ileoçekal valvde posteromedial sınırdaki çekuma eklenir. Çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektumdan oluşmaktadır. Sağ kolon; çekum, apandiks, çıkan kolon, fleksura hepatica ve transvers kolon başlangıcına kadar, sol kolon; transvers kolonun distali, fleksura lienalis, inen kolon, sigmoid kolon ve rektumdan oluşur (46).

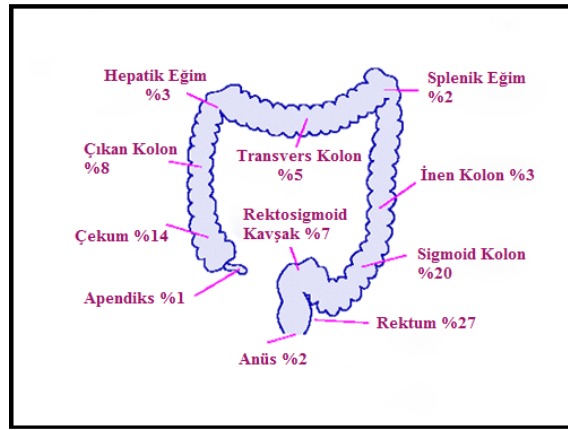
Kolorektal kanserlerde metastaz aşamasında etkili olan seröz tabaka varlığı ise kalın bağırsağın her yerinde aynı yapıda değildir. İnen ve çıkan kolonların sadece ön yüzleri seröz tabaka ile kaplı olmasına karşın rektum bölgesinde bu yapı bulunmamaktadır (Şekil 7).



Şekil 7: Kalın Bağırsak Anatomisi ve Seroza Yönünden Değerlendirmesi (47)

Sağ kolon arteriyel beslenmesini ince barsaklar gibi superior mezenterik arter (SMA), sol kolon arteriyel beslenmesini inferior mezenterik arter (İMA) sağlar. Rektum ve anal kanalın arteriyel beslenmesini ise superior, orta, inferior ve median sakral arterler sağlar. Aynı isimli arterlerin beslediği alanlardaki venöz dönüşü sağlarlar. Sağ kolonun venöz dönüşü superior mezenterik ven (SMV) yoluyla portal vene ulaşırken sol kolonun venöz

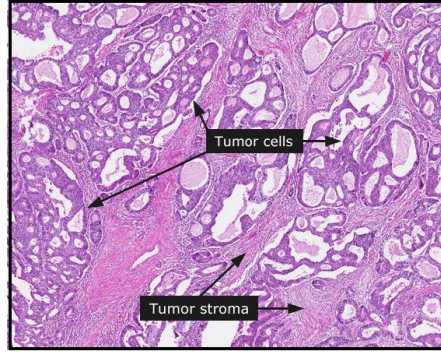
dönüşü ise inferior mezenterik ven (İMV) yoluyla splenik vene, ordanda portal vene gider. İMV inen kolon, sigmoid kolon ve proksimal rektumu direne eder. Rektumun üst kısmı süperior rektal ven aracılığıyla İMV'e direne olur. Bu drenaj portal sistemdir. Orta ve alt bölge ise orta rektal ven ve inferior rektal ven aracılığıyla internal pudental vene oradan da internal iliak ven yoluyla sistemik dolaşıma drene olurlar (48). Kolorektal kanserlerin, kalın bağırsaktaki dağılımları yüzdesel olarak değişiklik göstermektedir. Dağılım yüzdeleri rektumda %27, sigmoid kolonda %20, çekumda %14, çıkan kolonda %8, inen kolonda %3, transvers kolonda %5, splenik fleksurada %2, hepatic fleksurada %3 olarak tanımlanmıştır. Rektosigmoid kavşakta ise %7 olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 8)



Şekil 8. Kolorektal Kanserlerin Yerleşim Dağılımı (49)

2.5. PATOLOJİ

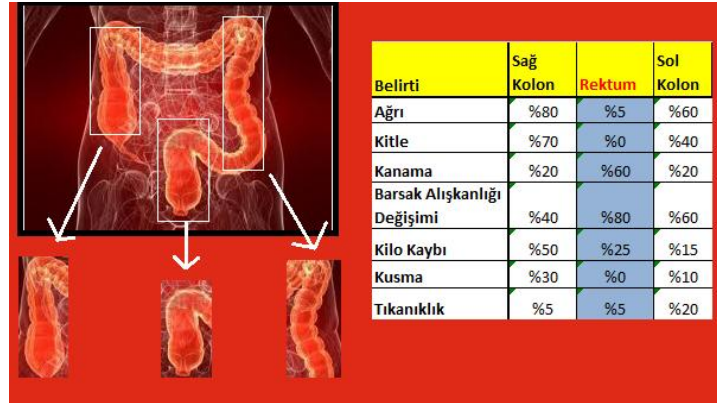
Kolorektal kanserlerin % 85-90'ı adenokarsinom (şekil 9) kalan %10-15'lik kısım ise intrasellüler müsin birikimine bağlı müsinöz, ya da kolloid olarak sınıflandırılır. Skuamöz ve adenoskuamöz kanserler ise nadir olarak bildirilmektedir. Kolorektal kanserler iyi diferansiye, orta derecede diferansiye ve kötü diferansiye olarak sınıflandırılmaktadır. Kolon kanserinin %20'si kötü diferansiyedir ve kötü prognoza sahiptir (50). Müsinöz kolon kanserinin taşlı yüzük hücreli tipinde kanseröz hücreler çok fazla müsin içerir ve çekirdek periferde doğru yer değiştirmiştir. Bu kanser tipi agresif seyreder ve kötü prognozla ilişkilidir (51).



Şekil 9: Adenokarsinoma görüntüsü (52 Y, Kadın, Stage II) (52)

2.6. KOLOREKTAL KANSER TANISI

Hikaye, fizik muayene ve tanısal testlerle tanıya gidilir. Özellikle aile hikayesi, kanama, dışkılama alışkanlığındaki değişiklikler ve kilo kaybı sorgulanmalıdır. Kolorektal kanserlerde semptom ve bulgular tümörün lokalizasyonu, makroskopik yapısı, tümörün yayılım derecesi ve kanama, perforasyon ve tıkanma gibi komplikasyonların oluşumuna göre değişir (53). Rektum ve kolon kanseri karşılaştırıldığında rektumda hiç kitle varlığı gözlenmezken ağrı da oldukça az bir oran karşımıza çıkmaktadır. Kusma ise kolonun diğer bölgelerine göre hiç gözlenmemektedir (Şekil 10).



Şekil 10: Kolon Yerine Göre Belirti Farklılıkları

2.6.1. Fizik muayene

Hastalığın lokal yayılım derecesi ve varsa uzak yayılım bulguları araştırılmalıdır. Karnın muayenesinde ve tuşe rektalde kitle varlığı araştırılmalıdır. Ayrıntılı anorektal muayene yapılmalıdır. İnspeksiyonda abse, sinüs, eksternal hemoroid, dermatit ve cilt lezyonlarının varlığı araştırılmalıdır. Daha sonda anal kanal ve rektumun parmakla muayenesi yapılmalıdır.

2.6.2. Radyolojik Tanı: (54)

Akciğer Grafisi: Kolorektal karsinomlar karaciğerden sonra en sık akciğere metastaz yaparlar. Bu nedenle cerrahi girişim öncesi ve takipler esnasında akciğer grafisi çekilmelidir.

Baryumlu Kolon Grafisi: Digital radyografi cihazları ile yapılan çift kontrast yöntem en etkin primer başvurulması gereken radyolojik görüntüleme yöntemidir.

Ultrasonografi (USG): Batın içi kitlelerin değerlendirilmesinde, karaciğer metastazların saptanmasında ve rektum tümörlerinin evrelendirilmesinde kullanılmaktadır.

Bilgisayarlı Tomografi: Cerrahi girişim öncesi abdominal kavitenin değerlendirilmesine imkan tanır. Tetkikin tek dezavantajı barsak duvarı katmanlarında invazyon derinliğini ayırt edememesidir.

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG): Yumuşak dokunun görüntülenmesinde BT'ye göre daha üstün bir yöntem olması ve multiplanar inceleme olanağı sağlaması avantajlarıdır.

Pozitron Emisyon Tomografisi (PET): Pelvisteki nüks tümör ile fibröz dokuyu ayırt etmekte kullanılır. Temeli hastaya fluorodeoksiglukoz adlı substrat enjekte ederek doku metabolizmasındaki farklılığı ortaya koymaya dayanır. Kanserli hücrelerde hipermetabolizma olması nedeniyle kanser hücrelerinin bulunduğu yerde aktivite tutulumu olacaktır (55).

Endoskopik İncelemeler: Endoskopik tetkik öncesi iyi bir barsak temizliği yapılması şarttır. Endoskopi ile direk tanı ve inceleme için biopsi alınabilir.

Rektosigmoidoskopi: Linea dentata'nın 20-25 cm proksimalindeki lezyonlar görüntülenebilir. 40 yaş altı düşük riskli bireylerin taraması için uygundur.

Fleksibl Sigmoidoskopi: Kolorektal kanserlerin % 50'si bu bölgede olduğu için double kontrastlı baryum enema ile birlikte yapılırsa kolonoskopiye alternatif olabilir.

Kolonoskopi: Diğer radyolojik teşhis metotlarına karşın endoskopik tetkikin en önemli üstünlüğü; biyopsi alma, tanıyı doğrulama ve gereğinde tedaviyi aynı anda gerçekleştirmesidir.

2.6.3. Laboratuvar Tetkikleri

Laboratuvar tetkiklerinde; Kan sayımı, karaciğer fonksiyon testleri, CRP, dışkıda gizli kan, Siyaltransferaz, Galaktosiltransferaz II, Procalcitonin, CEA, CA-19-9, CA 50, CA 242, TPA ve TPS'dir. En sık kullanılanları CEA, CA 19-9 ve TPA'dır. Primer tümörün rezeksiyonundan önce CEA düzeyi tespit edilirse prognoz açısından yol gösterici olabilir.

Ancak bunların hiçbiri tek başına tanı koymaya uygun değildir. Diğer radyolojik tetkiklerle desteklenmesi gerekmektedir (56).

2.7. KOLOREKTAL KANSERLERDE EVRELEME

Evrelemede amaç; hastalığın yayılım derecesini saptamak bu şekilde tedavinin planlanması ve prognoz açısından tahminde bulunabilmektir. Kolon kanserleri genellikle intramukozal epitelyal lezyonlar olarak başlarlar ve tümörün gelişmesi ile submukozaya ulaşarak invaziv kanser haline gelirler. Bu aşamadan sonra lokal yayılım yanında lenfatik ve hematojen yayılım da ortaya çıkabilir. Lokal yayılımda tümörün barsak katları boyunca yayılarak serozaya doğru ilerlemesi söz konusudur. Serozaya ulaşan tümör komşu organları tutabilir. Rektum bölgesinin serozası olmadığından özellikle rektum karsinomlarında komşu organ tutulumu daha çok görülür. Kolon kanseri perikolik, intermediate ve ana lenf düğümleri aracılığıyla lenfatik yayılım gösterir. Kötü difaransiye tümörlerde lenfatik yayılım daha sık görülür. Hematojen yayılım en sık portal ven aracılığı ile karaciğerde görülür.

Karaciğerdeki metastatik tümörlerin %80'e yakınında primer odaklı bir kolorektal tümördür. Karaciğer ve akciğer metastazı olmadan diğer organlara hematojen yayılım nadir olarak görülür. *Proksimal rektum kanserleri* superior hemoroidal venler aracılığıyla karaciğere hematojen metastaz yaparken *distal rektum kanserlerinde* portokaval anastomozlar ve inferior vena kava aracılığı ile akciğerlere ve diğer organlara erken hematojen yayılım görülebilir. Kolon kanserinde yayılım prognoz açısından son derece önemli olduğundan değişik evreleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar içinde Dukes tarafından oluşturulan evreleme sistemi ve TNM sistemi (T:Tümör invazyonu, N:Lenf nodu tutulumu, M:Metastaz) en sık kullanılan sistemlerdir (57).

TNM Klinik Sınıflaması

Tis: İnsitu karsinom	N0: Lenf nodu tutulumu yok
T1: Submukoza invazyonu	N1: 1-3 lenf nodu tutulumu
T2: Muskularis propriaya invazyon	N2: >4 lenf nodu tutulumu
T3: Seroza invazyonu	M0: Uzak metastaz yok
T4: Komşu organ invazyonu	M1: Uzak metastaz var

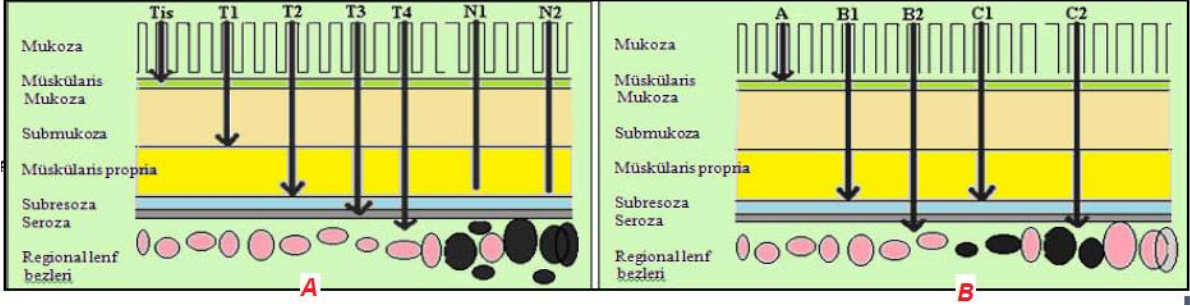
Dukes Evrelendirmesi

A Sadece mukozada

B Tüm duvar (+), lenf ganglionu (-)

C Tüm duvar(+), lenf ganglionu (+)

D Uzak metastaz (+)



Şekil 9: Kolorektal Kanser Evrelendirmesi (A) TNM (B) Dukes (58)

Tablo 5 : Kolorektal Kanserlerde Evrelemenin Karşılaştırılması (57)

Evre	TNM	Dukes Sınıflaması	Tümör İnvazyon Derecesi	5 Yıllık Sağkalım İhtimali
0	T0,N0,M0		Gözle görülür tümör yok	
I	T1,N0,M0	A	Tümör müskülaris mukoza ve submukozayla sınırlı	%97
I	T2,N0,M0			%90
II	T3,N0,M0	B1 B2	Tümör müskülaris propriaya sınırlı	%78
II	T4,NO,MO			%63
III	T1-4,N1,M0	C1 C2	Tümör serozaya ulaşmıştır. Komşu organ tutulumu olabilir.	%56-65
III	T1,4,N2,M0			%26-37
IV	T1-4,N1-2,M1	D	Uzak metastaz var.	% 1

2.8. KANSERİN MOLEKÜLER TEMELLERİ

Kanserin kökeninde ölümcül olmayan genetik hasar yatar. “Genetik kanser hipotezi” olarak ifade edilen bu görüşte, bir tümörün mutasyona uğrayan tek bir öncül hücrenin büyümesi ve çoğalması ile oluştuğu, dolayısıyla tümörün monoklonal olduğu ileri sürülmektedir. Söz konusu genetik hasar, hücrenin büyümesini stimüle eden *proto-onkogenler*, hücrenin büyümesini inhibe eden *tümör baskılayıcı genler*, programlı hücre ölümünü regüle eden genler ve *DNA yanlış eşleşme tamir genlerinde* gerçekleşmektedir.

Proto-onkogenler; Normal bir hücrede; hücre bölünmesi ihtiyaca göre kontrollü bir şekilde yürütülmektedir. Bu durum normal hücrede proliferasyon ve diferensiyonu kontrol eder. Proto-onkogenler hücre bölünmesi sırasında görev alan proteinleri kodlarlar, şayet mutasyona uğrar ve aktivasyon kazanırlarsa (onkogene dönüşme) hücrenin sürekli olarak bölünmesine ve büyümesine neden olurlar.

Tümör Süpresör Genler; Hücre bölünmesini baskılayıcı özellikte olan proteinleri kodlarlar. Bu genlerde meydana gelen bir mutasyon, hücre bölünmesinin artık baskılanamaması ve kontrolsüz hücre büyümesi ile sonuçlanır.

DNA Yanlış Eşleşme Tamir Genleri; DNA polimerazın 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi ile yanlış eşleşmeler düzeltilirken, ancak tekrarların olduğu bazı bölgelerde düzeltme gözden kaçabilmektedir. Onarımdan kaçan bu alanlar, DNA yanlış eşleşme tamir genleri tarafından düzeltilirler. Bu genlerde mutasyon olması durumunda, onarım yapılamayacağından, mikrosatellit instabilitesi olarak bilinen durum ortaya çıkmaktadır (59).

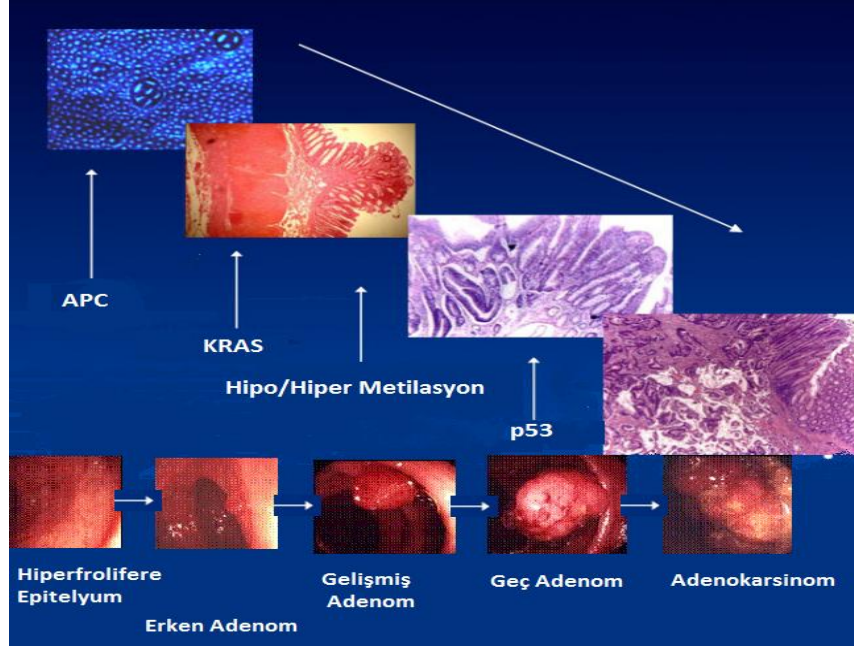
2.8.1. Karsinogenez:

Karsinogenez, birçok mutasyonun birikimi sonucu fenotipik ve genotipik düzeyde çok basamaklı olarak ilerleyen bir süreçtir. Farklı hücrelerde birbirinden bağımsız olarak biriken mutasyonlar, tümörü oluşturan hücrelerin heterojenitesine yol açar. Böylece, tümörlerin çoğu monoklonal orjinli olmalarına rağmen, genellikle farklı karakterde yapılar ortaya çıkar (61). Kanselerde karsinogenez mekanizması oldukça karmaşık ve çok faktörlüdür. Kansere sebep olan ajanlara *karsinojen* denir.

2.8.2. Kolorektal Kanselerde Multi-Step Karsinogenez:

Kolorektal karsinogenez, normal hücrenin malign hücreye dönüşümünde genetik ve epigenetik değişikliklerin rol aldığı çok basamaklı bir süreçtir (Şekil 10). Bu süreçte her basamakta farklı lezyonlar gelişmekte ve böylece moleküler değişimlere farklı morfolojik lezyonlar eşlik etmektedir (61,62).

Kolorektal kanser genetik temeli adenom-karsinom dönüşüm basamakları ile benign prekürsör lezyonlardan KRK oluşum modeline dayanır. Adenomlar epitelyal aşırı büyüme, displazi, anormal diferansiyasyon, bazen küçük invaziv hücre odakları ile karakterizedir. (63). Onkogenler, tümör süpresör genleri, ve DNA hasarını önleyen genlerden oluşan üç sınıf gende meydana gelen değişikliklerle tümör oluşumu gerçekleşir. (64).



Şekil 10: Kolorektal Adenom-Karsinom Oluşum Sürecinde Değişiklikler

- Siklooksijenazların yüksek ekspresyonuyla 5q üzerindeki APC geninin kaybı veya mutasyonu (Hiperprolifere Epitelyum oluşur)
- DNA Hipermetilasyonu (Erken Adenom oluşur)
- Kromozom 12p'deki KRAS geninin mutasyonu (Gelişmiş Adenom)
- Kromozom 18q'daki DCC geninin kaybı veya mutasyonu (Geç Adenom)
- Kromozom 17p'deki p53 geninin kaybı veya mutasyonu (Karsinoma oluşur)

Adenom-karsinom oluşum basamakları da göz önünde bulundurulduğunda, bu mutasyonlar, kanserin hücre yaşamı, büyümesi ve invazyonunda rol alan doğal kontrol mekanizmalarında bozulmalarla karakterize çok yönlü bir hastalık olduğunu destekler.

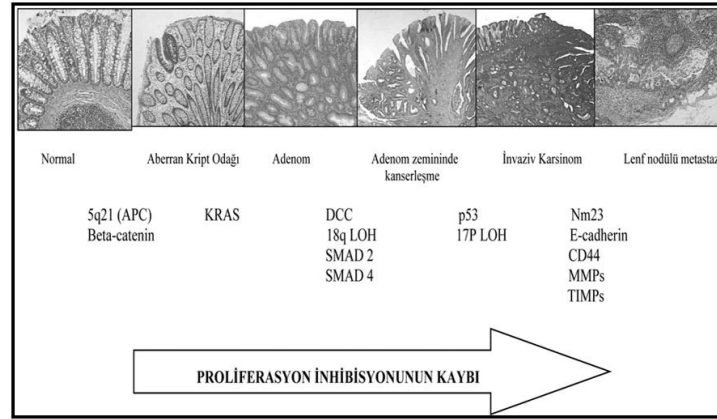
Tablo 6: Kolorektal Tümör Gelişiminde Rol Alan Genler, Lokalizasyon ve Fonksiyonu (65)

Gen	Tip	Kromozom	Hücre Yerleşimi	Fonksiyon
APC	Tümör Baskılayıcı Gen	5q21-22	Stoplazma	Büyüme Sinyali İnhibisyonu
DCC	Tümör Baskılayıcı Gen	18q21	Hücre Membranı	Hücre-hücre adhezyon Etkileşimi
p53	Tümör Baskılayıcı Gen	17p13.1	Nükleus	Transkripsiyon Faktörü, Büyüme İnhibisyonu, Hücre Döngüsü Kontrolü
KRAS	Proto-Onkogen	12p12.1	Hücre Membranı / Stoplazma	İntrasellüler Sinyal İletimi

Kolorektal kanserlerin gelişimini açıklamak üzere iki model tanımlanmıştır.

1. Kromozomal instabilite yolu
2. DNA mikrosatellit instabilitesi yolu

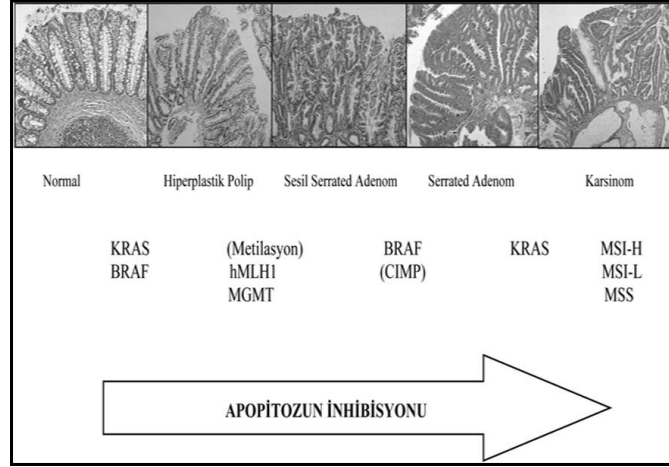
2.9.2.1. Kromozomal instabilite yol: Başlıca tümör baskılayıcı genlerin aktivitelerinin kaybıyla ilişkilidir. Bunlar; adenomatöz polipozis coli (*APC*), retinoblastom (*Rb*), p53 ve Von Hippel-Lindau (*VHL*) genleri olup normalde anormal hücre büyümesini önleyen ‘kapıcılar’ olarak görev yaparlar. *APC* genindeki anormallikler sıktır ve genellikle somatiktir ancak famiyal adenomatöz polipozis koli hastalarında kalıtsal olabilir. Ayrıca hücre siklusundaki *Rb* ve *p53* yollarındaki anormalliklerle, *DCC* ve *K-RAS* genleriyle de oldukça sık ilişkilidir. Bu yol sıklıkla anöploid tümörlerle sonuçlanır. Bu yoldaki genler, promoterin hipermetilasyonu ile inaktive edilebilir; bu da gerekli proteinlerin yapımında yetersizliğe neden olur. Bu durum, genetik instabiliteyle de ilişkili görünmektedir. Genetik instabilite kanserin önemli bir özelliği olarak öne sürülmektedir. Kromozomal instabilite yolağında proliferasyon inhibisyonunun kaybı sözkonusudur (66).



Şekil 11. Kromozomal İnstabilite Yolu (68)

2.9.2.2. DNA mikrosatellit instabilitesi yolu: Bu süreç lokalize epitelyal proliferasyon ile başlar ve 10-35 yıl gibi oldukça yavaş gelişen bir süreçtir. Gelişim sebebi süregelen mutasyonların birikimidir. Biyolojik temeli; proliferasyon inhibisyonunun kaybolmasıdır. Moleküler temeli ise; tümör baskılayıcı genlerde mutasyon veya kayıplar nedeniyle oluşan işlev kayıplarıdır. Ayrıca Proto-onkogenlerde mutasyonlar nedeniyle oluşan işlev kazanımlarıdır. Bu yol DNA “mismatch” onarım genlerinde oluşan bozukluklar nedeniyle, mikrosatellit instabilitesi (MSI) üzerinden gerçekleşir. Burada da gen mutasyonlarının birikmesi izlenir. Ancak etkilenen genler farklıdır. Hereditör non polipozis kolorektal

kanserlerin (HNPKK) gelişimi bu yolla açıklanmaktadır. Çoğu replikasyon hataları DNA polimerazın 3', 5' ekzonükleaz aktivitesi ile hemen düzeltilir. Bu onarımdan kaçan hatalar ise “mismatch repair” (MMR) denilen bir sistem yolu ile onarılır. MMR genleri onarımda rol alan bir çok protein ve enzimi kodlar (66).



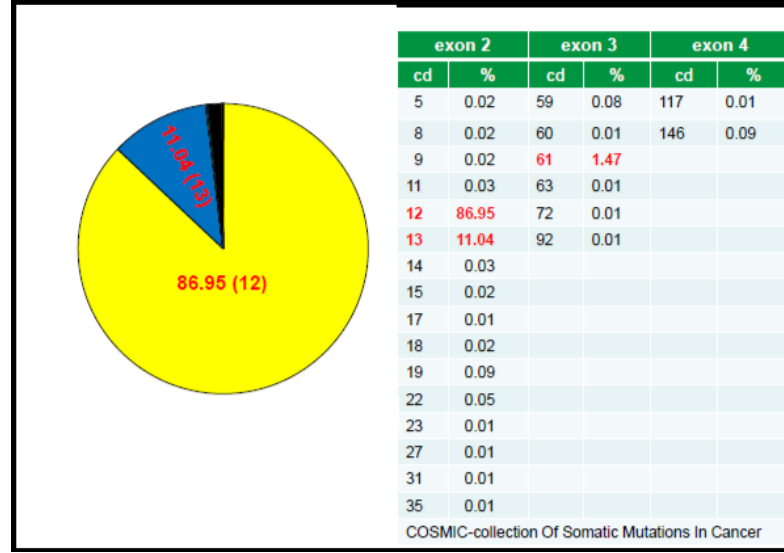
Şekil 12: DNA Mikrosatellit İnstabilitesi Yolu (68)

2.9. K-RAS ONKOGENİ

K-RAS onkogeni RAS gen ailesinin bir üyesi olup, Kirsten Rat Sarkom Virüsü ile hücrel homoloji göstermektedir (22). *K-RAS* geni, kolorektal karsinom gelişimindeki genetik yollardan biri olan tümör baskılayıcı yolda yer alan bir proto-onkogendir. *K-RAS* geni ekstrasellüler mitojenik sinyallerin iletiminde rol alan, GTP bağlayabilen bir membran proteinidir. Sitoplazma zarının içinden efektör moleküllere sinyal iletimini sağlayan intrinsek GTP-az aktivitesine sahip bir protein kodlar. Hücre büyümesini ve bölünmesini uyarıyan herhangi bir dış uyarı ile K-RAS geni GTP'ye bağlanır ve aktif hale geçerek uyarıyı hücre içi ileti yollarına aktararak hücre büyüme ve bölünmesinde fizyolojik rol oynar. K-RAS mutasyonu ile GTP-az aktivitesi ortadan kalkar ve hücre proliferasyonu düzensizleşir. *RAS* gen mutasyonları tümör tiplerinde farklı insidanslarda bulunmaktadır. En yüksek insidansları, pankreas (%90), kolon (%50) ve akciğer adenokarsinomlarda (%30) rastlanmaktadır. Bu kanserler içinde özellikle K-RAS geni mutasyonları diğer RAS genlerine (N-RAS ve H-RAS) oranla daha sık görülmektedir (70).

Mutasyonların sıklığı üç ras genine benzer olarak dağılmamıştır. Her ne kadar mutant H-RAS ilk olarak keşfedilmiş olsa da daha sonra yapılan yoğun çalışmalar K-RAS ve N-RAS mutasyonlarının insan kanserlerinde daha sık görüldüğü ortaya çıkmıştır. En sık olarak

nokta mutasyonlar kodon 12 (%86) ve kodon 13(%11)'te nadiren de kodon 61(%1) ve 146(<%1)'da gözlenmektedir (**Şekil 13**). Mutant Kodon proto-onkogenlerinin onkogenlere dönüşmesine neden olur ve bu otonom hücre büyümesi ve çoğalmasıyla sonuçlanır (**72**).



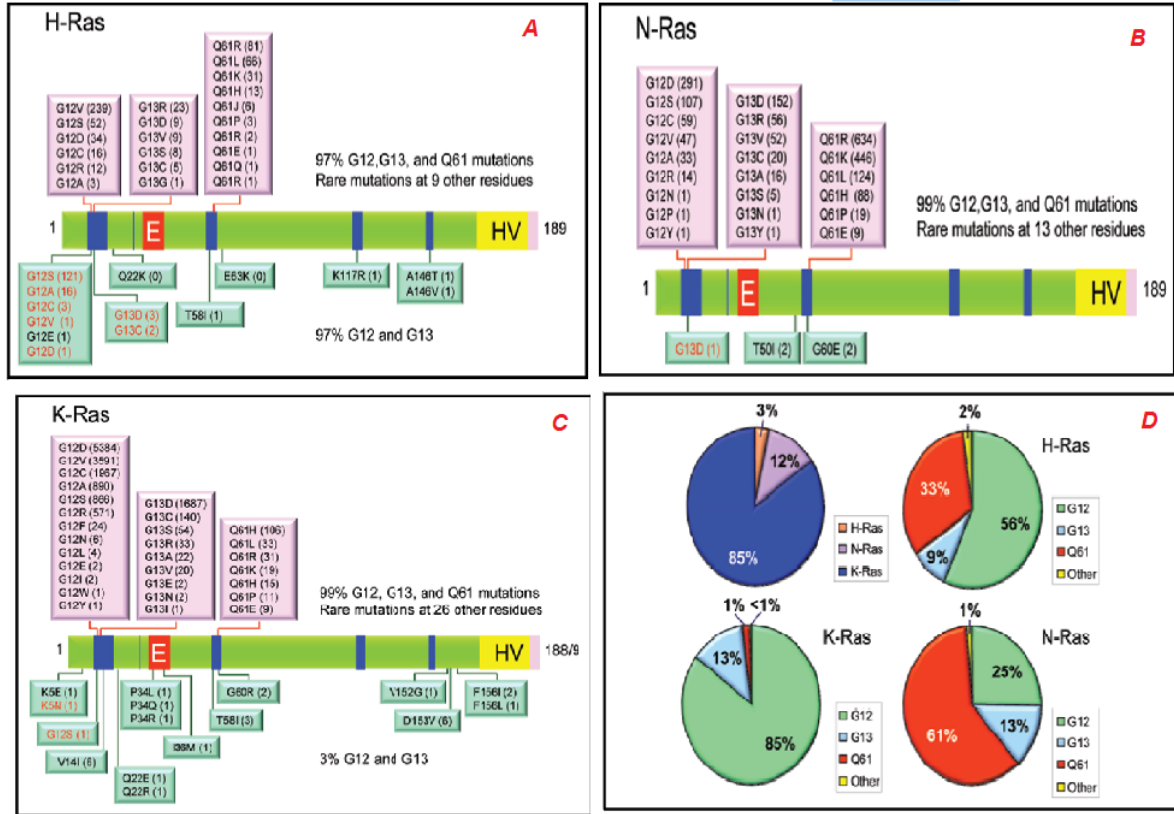
Şekil 13: En Sık Gözlenen K-RAS Mutasyon Dağılımı (**89**)

Bu mutasyonlar KRK'lerin gelişimi sürecinde erken evrede meydana gelir ve tümör progresyonu süresince de korunur. Bu mutasyonlar küçük poliplerde de bulunabilir ve lezyon boyutu arttıkça sıklığı artar (**22**). K-RAS mutasyonlarının, adenom oluşum başlangıcında rolü olmamasına rağmen adenom progresyonunda kesinlikle büyük önemi mevcuttur. K-RAS mutasyon sıklığı; 1 cm'den küçük adenomlarda % 10-15, 1 cm'den büyük adenomlarda % 30-60 ve primer kolorektal karsinomlarda yaklaşık %50'dir (**70**).

RAS izoformları yanlış mutasyonunda en yaygın olarak %85 K-RAS'a , az olarak ise %12 N-RAS'a ve %3 H-RAS'a rastlanmaktadır (**Şekil 14 A,B,C**). İlginç bir şekilde, her yanlış mutasyonda, izoformların sıklığı arasındaki farklılıklar çeşitlilik göstererek Q61'de en fazla N-RAS'da iken; G12 mutasyonu en fazla K-RAS'ta olmuştur (**Şekil 14 D**).

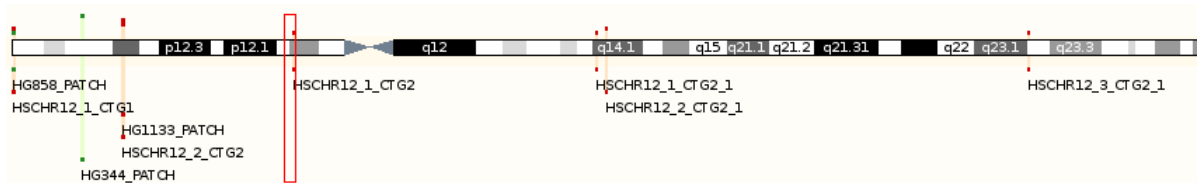
Üç ras genini kodlayan proteinler güçlü amino asit benzerliği (%90) gösterirler. Hücre kültürü ve hayvan deneylerinde aynı güçlü transforme edici etkiyi sergilerler. Tüm RAS genleri farklı kromozomlar üzerinde lokalize olmasına rağmen (K-RAS; 12. kromozom, H-RAS; 11. kromozom, N-RAS; 1. kromozom) tümü 21 kD'luk bir protein kodlamaktadır. Bunlardan K-RAS kromozom 12'nin kısa kolunda (12p12.1) lokalizedir (**Şekil 15**). Dört ekzon içeren K-RAS geninde dördüncü ekzon alternatif olarak kırılırken, 4A ekzonlu transkript 189 amino asit; 4B transkript ise 188 amino asitli bir protein üretmektedir. Bunlar arasındaki fark karboksil uçtaki 25 amino asittir. Bu transkriptlerden 4B varyanti 10-20 kat

daha fazla eksprese edilmektedir (90).

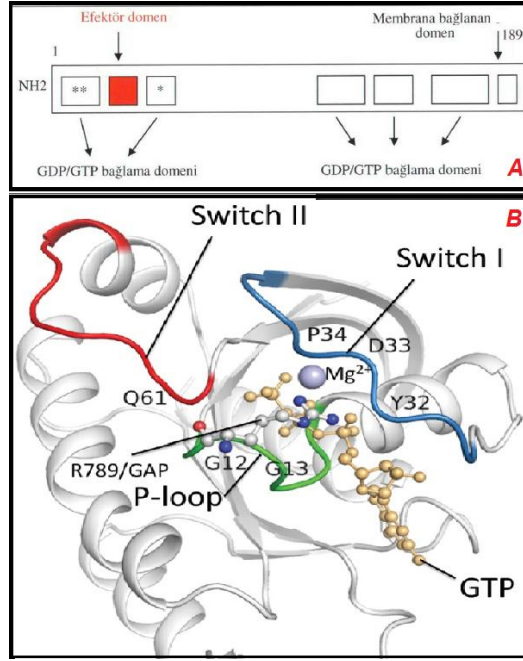


Şekil 14: RAS İzoform Mutasyonları (A) H-RAS izoformlarının (B) N-RAS izoformlarının (C) K-RAS izoformlarının Mutasyon sıklığı (D) İzoform mutasyonların kodon bölgesindeki % Dağılımları (74).

RAS proteinlerinin biyolojik aktivasyonu için lipid modifikasyonu ve plazma membranına kuvvetli bağlanması gerekmektedir. RAS proteinleri başlangıçta inaktif sitoplazmik protein olarak sentezlenir. Daha sonra bir dizi posttranslasyonel modifikasyona uğrayarak plazma membranının iç yüzeyine transloke edilirler. Karboksi ucun modifikasyonu proteinin hidrofobik özelliğini artırır (74).

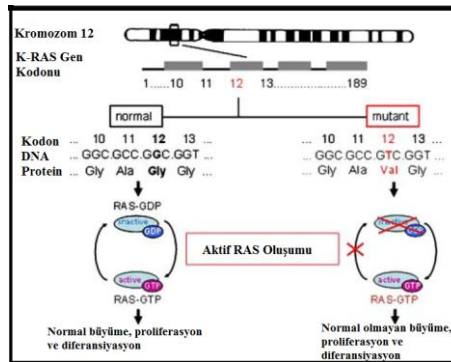


Şekil 15: K-RAS Geninin Kromozomal Lokalizasyonu (75)



Şekil 16: K-RAS Proteini (A) Proteinin şematik Yapısı (B) K-RAS Proteinin 3 Boyutlu Yapısı (P-loop: Yeşil, 1. Bağlanma Bölgesi: Mavi, 2. Bağlanma Bölgesi : Kırmızı). GTP ve Mg²⁺ iyonları küçük Toplar olarak görülmektedir (76).

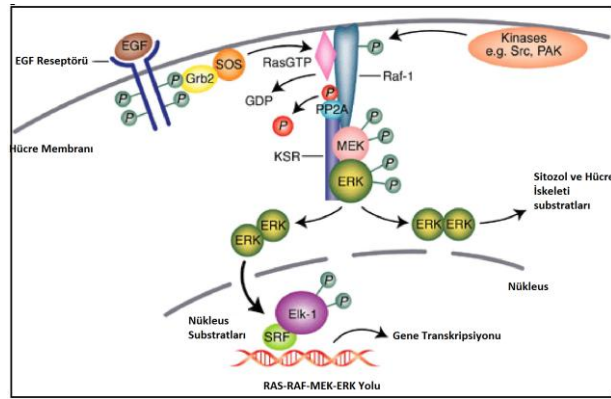
Normalde RAS proteinleri GDP bağlı inaktif formdadır. Ekstrasellüler ligandların bir çeşidi ile hücre yüzeyinde uyarı başlatılır. Sitokinler (interlakin), norotransmitterler (karbakol), hormonlar (insulin) ve büyüme faktörleri (EGF) ile geçici olarak aktive edilirler. Guanin nükleotidi salıveren proteinler (GNRPs), (örneğin; SOS 1/2, Ras GRF/CDC25) inaktif formdaki GDP yerine GTP bağlayarak aktif forma dönüşümü (Ras*GTP) sağlar. Aktif RAS, bu uyarıların oluşturduğu sinyali ilettikten kısa bir süre sonra tekrar inaktif formuna (Ras*GDP) dönüştürülür. GTPaz aktive eden proteinler (GAPs) (örneğin; p120,NF1-GAP) RAS'ın intrinsik GTP hidrolizini uyarır ve onun inaktif formuna dönüşmesine neden olur (Şekil 17) (77).



Şekil 17: Ras Proteinlerinin İnaktivasyon ve Aktivasyonu (78)

K-RAS aktivitesi normal koşullarda guanozin difosfat (GDP) ve guanozin trifosfat (GTP) bağlı proteinler aracılığıyla kontrol edilmekte olup, GTP'nin bağlanması sonucu aktive olmaktadır. Sitoplazma zarının içinden efektör moleküllere sinyal iletimini sağlayan intrinsek GTP-az aktivitesine sahip bir protein kodlar. Hücre büyümesini ve bölünmesini uyaran herhangi bir dış uyarı ile K-RAS geni GTP'ye bağlanır ve aktif hale geçerek uyarıyı hücre içi ileti yollarına aktararak hücre büyüme ve bölünmesinde fizyolojik rol oynar. K-RAS mutasyonu ile GTP-az aktivitesi ortadan kalkar ve hücre proliferasyonu düzensizleşir (71).

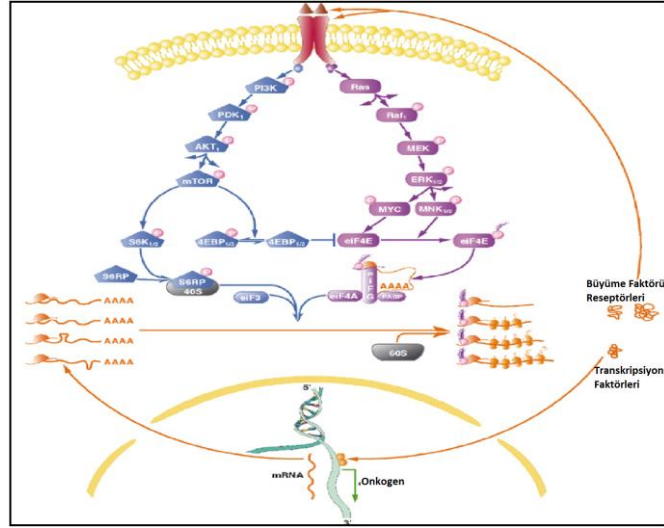
K-RAS, EGFR sinyal yolları ile etkileşim sonucu hücre fonksiyonların düzenlenmesinde önemli role sahiptir. RAS proteinleri çok sayıda sinyal yolağının düzenlenmesinde rol oynarlar. RAS sinyalinin hedef alt yolları arasında RAF serin treonin kinazlar (ARAF-BRAF-RAF1) ve bunların da aktive ettiği RAS-RAF-MEK-ERK yolağı yer alır (Şekil 18).



Şekil 18: RAS-RAF-MEK- MAPK Sinyal Yolağı (79)

RAS aktive olduktan sonra RAF onkogenini harekete geçirmektedir. RAF onkogeni de MAPK1 ve MAPK2'yi fosforilleyerek hücre büyümesi ve sağkalım ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinazlar olan ERK-1 ve ERK-2, sıklıkla K-RAS mutasyonuna eşlik eder ve mitojen aktive edici protein kinazların (MAPK) aktivasyonunu gösterir. K-RAS aracılı büyüme faktörü sinyal kaskadı RAF kinazları plazma membranına toplar ve G1-S hücre siklus değişimini kontrol eden faktörleri fosforile eden ERK1 VE ERK2'yi aktive eden MEK1 ve MEK2 ERK kinazları uyarır. MAPK kaskadını aktive eden eden K-RAS dışı aracılı büyüme faktörleri ile de MAPK kaskadı aktive olmasına rağmen, kanser oluşum sürecinde sinyalizasyon bozulması, temel olarak K-RAS ve BRAF mutasyonlarına bağlı oluşur. (80).

BRAF ve K-RAS mutasyonu MEK ve ERK yollarını fosforile ederek bozulmuş büyümeye yol açar. K-RAS ve BRAF mutasyonları KRK'de birbirinden bağımsız olarak hareket ederler fakat iki onkogen birbirlerinin etkilerini aynı sonuca giden farklı yollardan ortak hücresel yolağa doğru güçlendirirler (80). MAPK kaskadı ile birlikte, K-RAS sinyali, intrasellüler 3. pozisyondaki lipid fosfatidil-inositol-4,5-bifosfatı fosforilleyen, fosfatidilinozitol 3-kinaz yolağı aracılığıyla hücre büyümesi ve yaşamını destekleyen kaskadı uyarır (81). KRK'lerin %15-30'unda PI3K alt birimi olan katalitik p110'u kodlayan PIK3CA aktive edici mutasyonlar saptanır. PIK3CA mutasyonları K-RAS-mutant KRK'de yaklaşık %10 görülür. Mutant K-RAS PI3K sinyalizasyonunu etkisiz olarak aktive edebilir (82).



Şekil 19: PI3 Kinaz/AKT ve RAS-RAF-MEK-ERK Sinyal Yolağı (83)

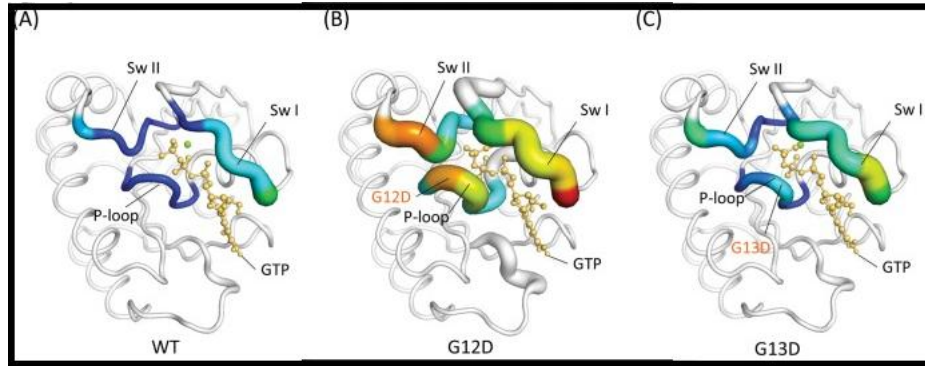
Hedefe yönelik monoklonal antikorlar, kanser tedavisinde son yıllarda önemli yer tutmaktadır. K-RAS mutasyonu setuksimab direnci için prediktif bir gösterge olarak kabul edilmekte olup metastatik KRK'lerde K-RAS mutasyonu olmayan tümörlerde cetuksimab tedavisine iyi yanıt alınmaktadır. Bu nedenle KRK'de K-RAS genindeki mutasyon varlığının gösterilmesi, hastaların prognozunu ve moleküler hedeflenmiş tedavilere cevabı belirlemede önemli hale gelmiştir (84).

2.9.1. Genotip Protein Fonksiyon İlişkisi:

Wild Type 12. ve 13. kodon dizilimleri sırasıyla GGT ve GGC'dir, ve protein translasyonunda bu kodon gysin aminoasidini kodlamaktadır. Gysin protein yapısı içerisinde genellikle düz zincirlerin yer aldığı nötral/non-polar küçük bir aminoasittir. Buna karşın p.G12A fenotipinde alanin ve p.G12V fenotipinde valin aminoasitlerine değişim

olmakla birlikte her iki aminoasitte nötral ve non-polar yapıdadır. P.G12R fenotipinde glisin yerine bazik polar ve oldukça büyük bir aminoasit olan arjinin gelmiştir. P.G12S fenotipinde serin aminoasidi yer alır. Bu polar bir özelliğindedir. P.G12D ve p.G13D fenotiplerinde glisin yerine oldukça büyük asidik ve polar özellikteki aspartat aminoasidi gelmiştir.

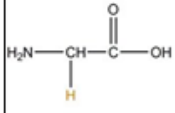
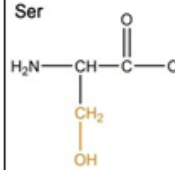
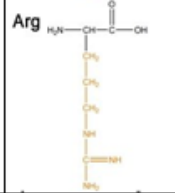
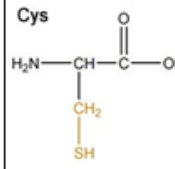
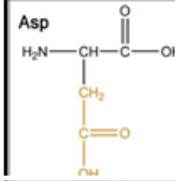
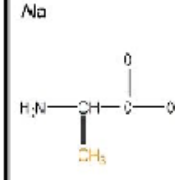
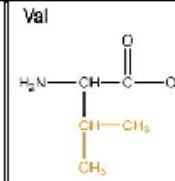
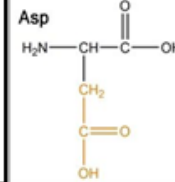
Bu değişimler; iyonik bağ kapasitesi oldukça düşük bir aminoasit yerine bazik ve/veya asidik polar aminoasitlerin gelmesi kimyasal olarak iyonik bağ kapasitesini değiştirecektir. Küçük bir aminoasit yerine daha büyük aminoasitlerin gelmesi ise protein katlanma ve fonksiyonel konformasyonunu etkileyecektir.



Şekil 20: K-RAS Mutasyonlarının 3D Protein Yapısında Yolaçtığı Değişikliklerin Biyoinformatik Analizi (76)

Şekil 22’de Yapıları (A) WT, (B) G12D ve, (C) G13D K-RAS proteinlerinin P-loop bölgeleri gözükmemektedir. Mavi ile gösterilen I ve II bölgelerindeki bağlanma en düşük, kırmızı ile gösterilen bölgelerde en yüksek B-faktör değerini verir. Diğer bölgelerdeki yapı daha dar ve beyazdır. B-Faktör’den bağımsızdır.

Tablo 7. Kolorektal Karsinomlarda K-RAS Mutasyonu

Codon	12	13	DNA	Protein	Aminoasit	Kısaltılmış	Kimyasal Şekil	Yapısı
WT	GGT	GGC	c.34G:	p.G12 G	Glycine	G(gly)	<p>Gly</p> 	Nötral Non-Polar
	AGT	GGC	c.34G>A	p.G12S	Serine	S(ser)	<p>Ser</p> 	Nötral Polar
	CGT	GGC	c.34G>C	p.G12R	Arginine	R(arg)	<p>Arg</p> 	Bazık Polar
	TGT	GGC	c.34G>T	p.G12C	Cysteine	C(cys)	<p>Cys</p> 	Nötral Hafif Polar
	GAT	GGC	c.35G>A	p.G12D	Aspartate	D(asp)	<p>Asp</p> 	Asidik Polar
	GCT	GGC	c.35G>C	p.G12A	Alanine	A(ala)	<p>Ala</p> 	Nötral Non Polar
	GTT	GGC	c.35G>T	p.G12V	Valine	V(val)	<p>Val</p> 	Nötral Non Polar
	GGT	GAC	c.38G>A	p.G13D	Aspartate	D(asp)	<p>Asp</p> 	Asidik Polar

Özellikle hem yapısal olarak daha büyük hem de bağ kapasitesi asidik ve polar yönde değişmiş olan p.G12D ve p.G13D'nin 3 boyutlu protein yapısında bu konformasyonel değişim en açık şekilde görülmektedir.

Bu aminoasit değişimleri 3D protein yapısında proteinin aktif hale gelmesini sağlayan GTP bağlanma bölgesinde yer almaktadır. Özellikle iyonik bağ kapasitesinin farklılaşması GTP molekülünün bağlanmasını ve bağlanma sürecini etkilemektedir. Daha sıkı bağlanmasına yol açarak protein yapısının devamlı aktif kalmasını sağlamaktadır. Proteinin aktif bölgesinde iyonik bağ kapasitesini değiştiren mutasyonların; ras proteininin EGFR yolağındaki kendinden sonra gelen RAF/MAPKinaz yolağının sürekli aktif kalması üzerine fonksiyonel etkisi daha büyük olacaktır.

p.G13D'nin konformasyonel yapıda oluşturduğu değişiklik, GTP bağlanma yarığını wild type'e daha yakın bir 3D yapı oluştururken, p.G12D fenotipinde GTP/Protein ilişkisi daha sıkı olmaktadır. Bu 3D yapı değişikliğinin protein fonksiyonuna yansması p.G13D'nin çok yavaş seyirli, p.G12D'nin ise çok agresif bir tablo çizmesine sebep olmaktadır. K-ras mutasyonları Finkelstein Klasifikasyonu'na göre ayrılmaktadır.

Tablo 8: K-RAS Mutasyon Klasifikasyonu (67)

Grup	Özelliği	Transversiyon
Çok yavaş seyirli		13 aspartat GGC → GTC
Yavaş seyirli	Nodal Metastaz Var. İç Organ Metastazı Yok	12 valin GGT → GTT
Çok Agresif Seyirli	Hızlı Yayılım ve Hematojen Metastaz	12 aspartat GGT → GAT

2.9.2. K-RAS Gen Mutasyonun Klinik Önemi

KRK'lerin gelişiminde rol alan genetik mekanizmaların ortaya konması, gerek erken tanı ve gerekse ileri dönemlerde prognozun belirlenmesi ve buna uygun ilave tedavilerin uygulanmasında moleküler birer belirteç olarak kullanılmasını sağlayacaktır. Ayrıca yüksek risk grublarının tanımlanmasına da yardımcı olacaktır. Kolon kanserleri genetik mekanizması en iyi tanımlanmış kanserlerden biridir. Moleküler temellerin bilinmesi hastalığın kliniği açısından önemli ipuçları vermektedir. Bu değişimler hastalığın erken tanısının konması, prognozu ve tedavinin etkinliğinde önemli bir role sahiptir. RAS mutasyonunun tanısı sonrası, terapötik yaklaşım söz konusu olabilmektedir. Mutasyonlar kolorektal kanserlerin gelişimi süresinde erken evrede ortaya çıkmaktadır. (85).

Kodon 12 ve 13'teki K-RAS mutasyon sıklığı, tekrarlayan hastalığı olmayanlarda %25, tekrarlayan tümörü olanlarda ise %71 'dir. G→T ve G→C transversiyonları kolorektal

karsinomların metastatik davranışıyla ilişkili bulunmuştur. G→A transversiyonunda böyle bir ilişki yoktur. Tümör evresi arttıkça çoklu mutasyonların sıklığı da artar. Hematojen veya lenfatik metastazı olan tümörler, bu özellikleri taşımayan tümörlerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek (%65) mutasyon oranına sahiptir. Kolorektal karsinomlarda spesifik K-RAS mutasyon tipi araştırıldığında, Kodon 13'te mutasyonu bulunan tümörlerin lokal veya uzak metastaz yapmadıkları görülmüştür. Kodon 12 mutasyonu bulunan tümörlerin ise perikolonik perirektal lenf nodlarına metastaz yapmadıkları saptanmıştır. Ancak uzak hematojen yayılım gösterdikleri bulunmuştur. Mutant RAS'ın varlığı hastaların kemoterapiye dirençli olabileceğini gösterir. Çeşitli hedef moleküllere yönelik monoklonal antikolar kanser tedavisinde günümüzün en etkin araçları arasına girmiştir. KRK tedavisinde en son varılan nokta ise moleküler olarak hedeflendirilmiş tedavidir. Metastatik kolorektal kanserlerde K-RAS mutasyonu olmayan tümörlerde Cetuximab tedavisine iyi yanıt alınmaktadır. Bu nedenle mutasyon analizi önemli hale gelmiştir (86).

2.10. HEDEFE YÖNELİK TEDAVİ YAKLAŞIMI

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

Hedeflenmiş tedavide, özgül moleküler defekti olan tümör hücrelerine yönelerek kanser hücrelerini hedef hücre aracılığıyla öldürürken, normal hücrelerin sağlıklı bir ortamda devamına imkân tanınmaktadır. Bu nedenle, hedeflenmiş tedavilerin en önemli üstünlüğü terapötik indekslerinin yüksek olmasıdır. Hedefe yönelik tedavide, hedeflenecek hücresel komponentler, hücre membran reseptörleri, sinyal iletim yolları, hücre siklus ajanları, anjiyogenez inhibitörleri, hücre-matriks veya protein reseptörleridir. Kolorektal kanser tedavisinde son yıllarda kullanılmaya başlanan anti-EGFR tedavisi de hedefe yönelik ve bireysel temelli bir tedavi örneğidir. Bireye yönelik tedavi yaklaşımında kişinin yaş ve cinsiyetinin yanında genotip ve fenotip özellikleri de önem kazanmıştır (87).

2.10.1. Anti-EGFR Tedavi

EGFR blokajı ile alt yolak sinyallerinin kesilmesi, tümör hücrelerinde büyümenin inhibisyonuna neden olabilmekte ve böylece kanserli hastalarda potansiyel iyileşme sağlanabilmektedir (87).

EGFR sinyal sistemi aktivasyonu için genellikle 3 adım gereklidir. İlk olarak, spesifik ligandlar konformasyonel bir değişiklik ile EGFR'nin ekstraselüler domainine bağlanır. Daha sonra, bu yapısal değişiklik EGFR ilişkili HER reseptörlerinden biri ile (heterodimer) ya da bir başka ligand bağımlı EGFR ile (homodimer) bir dimer formu oluşturmasına izin verir. Reseptör dimerizasyonu, sinyal iletim yollarının aktivasyonunu başlatan reseptörlerin intraselüler domaini ile birlikte tirozin kinaz rezidülerinin otofosforilasyonuna neden olur. EGFR gibi hücre yüzey reseptörlerinde, bağlanma ya da modülasyon olmaksızın alt yolların aktivasyonu, kontrolsüz hücre büyümesi, proliferasyon, apoptozun baskılanması, angiogenezin uyarılması ve metastatik yayılım gibi sonuçlar doğurabilir. Bu nedenle EGFR ve EGFR'nin alt yollarında yer alan diğer moleküller (RAS ve RAF proteinleri gibi) de malign transformasyonun regülasyonunda temel rol oynamaktadır (87,88).

2.10.2. Kolorektal Kanserde Anti-EGFR Tedavisi

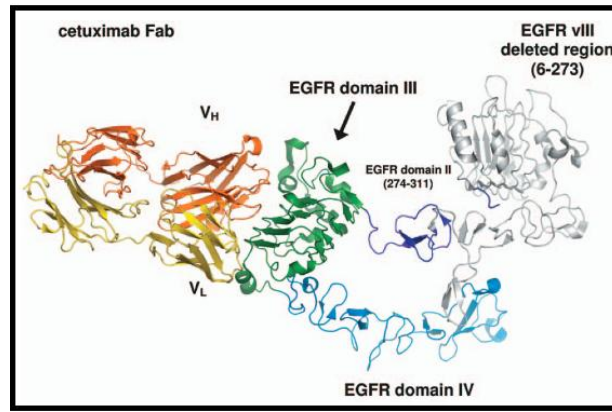
Bugün için, iki anti-EGFR antikoru kolorektal kanserin tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır (88). İnsan fare kimerik IgG-1 monoklonal antikoru olan Cetuximab, kolorektal kanser tedavisi için onaylanan ilk EGFR hedefli ajandır. Diğeri ise insan IgG-2k monoklonal antikoru olan Panitumumab onaylanmış ikinci ilaçtır. Anti-EGFR tedavi ile metastatik kolorektal kanserlerde yaşam süresinin 23.5 aya dek uzatılabildiği gösterilmiştir. Ancak, Cetuximab ve Panitumumab tedavileri son derece pahalı ve bazı yan etkileri olan tedavi yöntemleridir (90).

2.10.3. Kolorektal Kanserlerde K-RAS Fenotipinin Cetuximab Tedavi Yanıtlarına Etkisi

Cetuximab bir insan-murin kimerik antikor olup IgG-1 yapısındadır ve EGFR'nin ekstraselüler uzantısına yüksek afinite ile bağlanır. İnsanda birçok karsinom türünde EGFR ekspresyonu görülmektedir. KRK'li vakaların da yaklaşık %25-77'sinde EGFR ekspresyonu saptanmıştır. Metastatik KRK'lerde primer ve metastatik odakla uyumlu olarak olguların %40'ında aktifteyici K-RAS mutasyonları saptanmaktadır. Bu K-RAS mutasyonları EGFR hedefli ajanlara karşı dirençlilikle ilişkilidir. Anti-EGFR tedavileri için *Cetuximab* veya

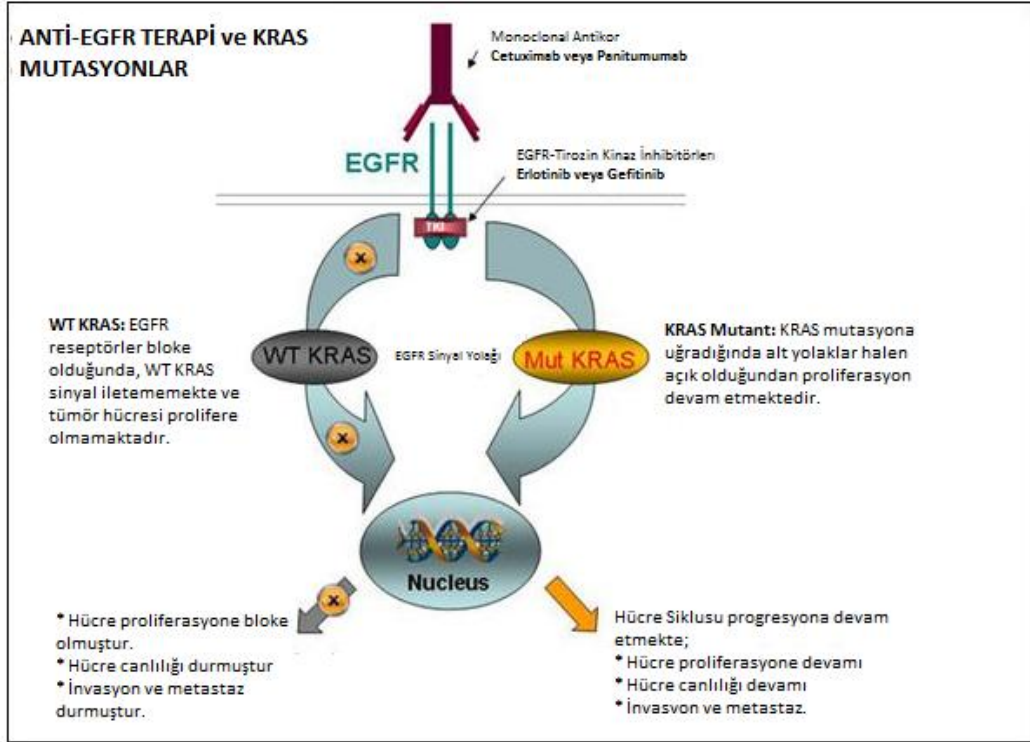
Panitunumab'a yanıt verecek hastaların belirlenmesi önemli bir klinik bilgidir. Cetuximab genellikle haftalık intravenöz infüzyon şeklinde uygulanır. Standart doz 400 mg/m^2 yükleme dozunu takiben 250 mg/m^2 haftada bir infüzyon şeklinde uygulanır. En sık gözlenen yan etki %75 gibi büyük bir oranla akne benzeri cilt döküntüsür. Döküntünün ortaya çıkması ilacın terapötik etkinliği ile ilişkili bulunmuştur (87).

İleri evre KRK hastalarının 1.sıra tedavisinde Folfiri rejiminin Folfiri+Cetuximab kombinasyonu K-RAS mutasyonu olmayan hastalarda tedaviye anlamlı genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım artışını sağlarken, K-RAS mutasyonu olanlarda Cetuximab'ın tedaviye eklenmesi ek katkı sağlamamaktadır.



Şekil 21: Cetuximab ile EGRF Reseptörünün Bağlanması (91) Cetuximab; VL bölgesi üzerinden reseptörün aktif domain III kısmına bağlanarak etkisini göstermektedir

K-RAS mutasyon durumu, kolorektal kanser hastaları için tedaviye ilişkin kararlarda dikkate değer bir role sahiptir. EGFR hedefli ajanların moleküler temeli dikkate alındığında, K-RAS mutasyonlu ve aktif RAS proteinli tümörlerde, reseptör seviyesinde EGFR blokajı, “alt yolak” sinyal aktivasyonunu durduramaz. Çünkü aktif RAS proteini EGFR'den bağımsız olarak sinyal aktivasyonunu sağlar. Bu yüzden Cetuximab tedavisi verilmeden önce tümör dokusunda K-RAS mutasyonu analizi yapılması mutlaka önerilmektedir. Özellikle K-RAS geni 12. ve 13. kodonlarındaki mutasyonlar EGFR inhibitörlerine mutlak yanıtızsızlık gösterir. Mutasyonu olmayan hastalarda EGFR hedefli tedavilerin yararlı olacağına dair bir garanti yoktur ve bu hastalarda tedavi yanıtı yaklaşık %30'lardadır (86).



Şekil 22 : K-RAS WT ve Mutasyon Durumunda Cetuximab Tedavi Farklılığı (92)

3.GEREC VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırma, DNA örneklerinden izolasyon ile elde edilen ürünlerde DNA dizileme yapıldıktan sonra K-RAS mutasyonunun varlığının veya olmadığının gösterilmesini kapsayan tanımlayıcı ve deneysel bir süreçten oluşmaktadır.

3.2 Araştırmanın Yeri Ve Zamanı

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi (DEU) Patoloji AD'ndan parafin blok örneklerinden rektosigmoid kanser histopatolojik tanısı konulan ve Klinik Onkoloji AD'nda tedavi edilen hastalarda K-RAS mutasyon analizi yapılarak K-RAS mutasyonlarını ve dağılımlarını değerlendirmek, mutasyonların protein yapısı üzerindeki etkinliğini, protein fonksiyonlarının değişip değişmediğini araştırmak üzere 2012-2013 tarihleri arasında yapıldı.

3.3 Araştırmanın Evreni Ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmanın evrenini; klinik ve patolojik olarak rektosigmoid tanısı almış hasta örnekleri oluşturacaktır. Örneklememiz ise bu hasta grubunda aynı zamanda K-RAS mutasyonu gözlemlenen verilerden oluşmuştur

3.4 Çalışma Materyali

2009-2011 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde rektosigmoid kanser tanısı konulmuş, patoloji blokları uygun örneklerde, Temel Onkoloji AD'nda K-RAS mutasyon analizi yapılmıştır. Mutasyon analizi yapılan yaşa ve cinse göre 84 adet olgunun retrospektif arşiv verileri de çalışmaya dahil edilmiştir. Olgularımızdan 35 adedi rektosigmoid tanısı almış örneklerden geri kalan 49 adedi ise karşılaştırma yapılması amacıyla veri bankamızda bulunan kolon kanseri tanısı almış hastalardan seçilmiştir. Olguların özellikleri onkoloji poliklinik kayıtlarından elde edilmiştir. Olguların dosya numarası, patoloji numarası, yaşı, cinsiyeti, doğdukları ve yaşadıkları yer, özgeçmiş ve soygeçmiş özellikleri, tümör evresi, primer tümör yerleşimi, tümör boyutu, varsa metastaz yeri, patolojik tanı tarihi, kemoterapi alıp almadığı, aldıysa çeşidi, en iyi yanıt,

(Klinik Onkoloji Hasta Rapor formundaki klinik değerlendirmelere göre yapılmıştır. Dünya Sağlık rgt'nün tedaviye cevap kriterleri referans alınmıştır.) hastanın son izlem durumu klinik ve patolojik kayıtlardan veriler elde edilmiştir.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmamızda bağımlı değişken klinik ve patolojik olarak rektosigmoid tanısı almış hasta örneklerinden oluşmuştur. Bağımsız değişkenimiz ise patolojiden alınan arşiv materyalinin Temel Onkoloji laboratuvarında DNA izolasyonu işlemlerinin ardından K-RAS mutasyonu saptadığımız hasta örnekleridir.

3.6. Veri Toplama Araçları

Dokuz Eylül Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı kolorektal kanser grubu kayıtları, Klinik Onkoloji Anabilim Dalı dosya kayıtları, Patoloji Anabilim Dalı hasta kayıtları, Temel Onkoloji Anabilim Dalı laboratuvar kayıtları kaynak olarak kullanılmıştır. İzolasyonu ve kalite kontrolü yapılan izole DNA'lar kullanılarak hedeflenmiş gene göre tasarlanan primerler eşliğinde hedef bölgeler PCR (Polimerase Chain Reaction) ile çoğaltılmıştır. PCR amplifikasyon ürünleri kolon tabanlı ticari pürifikasyon kitiyle pürifiye edilmiştir. Tüm bu işlemler Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır. alışmalar sırasında genel laboratuvar güvenlik önlemlerine uyulanmış ve iyi laboratuvar uygulamaları kılavuzu temel alınmıştır.

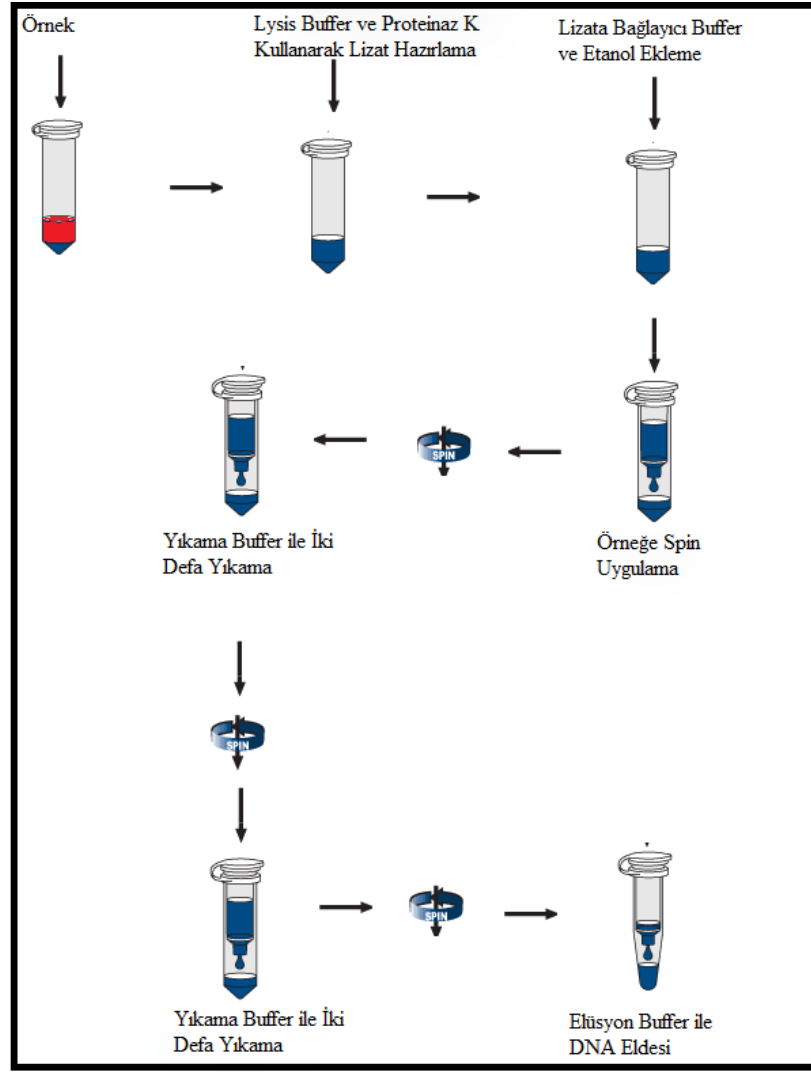
3.6.1. Spin Kolon Tabanlı Nükleik Asit İzolasyonu

Kolon tabanlı nükleik asit ekstraksiyonu, nükleik asitlerin kolayca ayrılmasını sağlayan katı faz ekstraksiyon metodudur. Bu metot nükleik asitin katı faza (silika veya başka bir madde) tampondaki tuz miktan veya pH bağımlı olarak ayrılmasını sağlar. Bu yöntem dört temel basamak içerir:

1. Hücrenin parçalanması
2. Nükleik Asitlerin kolona adsorbsiyonu
3. Kolonun yıkanması
4. Nükleik asitlerin kolondan tampon veya su ile dele edilmesi (93)

3.6.1.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

- DNA izolasyon kiti: QIAamp DNA FFPE Tissue Kit(50) (Cat. No:56404, Hilden, Almanya)
- Ksilol (moleküler çalışmalar için) (Merck KGaA, kat no: 1.08681.2500, Almanya)
- Etanol (saf) (Sigma-Aldrich, kat. no: 32221, Almanya)
- Mikrosantrifüj tüpü (1,5 mililitre/ml hacimli) [Citotest, ref.no (referans numarası):34730015S, Çin]
- Plastik konik tüp (12 ml hacimli) (Becton Dickinson Falcon, 4-2097-8, Amerika Birleşik Devletleri)
- Steril filtreli pipet ucu (Greiner Bio-one Filter Tip FT 1000, FT100, FT10)
- Otomatik pipetler(Eppendorf, kat. no: 022472101, GmbH Hamburg, Almanya)
- Vorteks (Heidolph Top Mix 94323, Bioblock Scientific, seri no: 54119, Almanya)
- Kuru ısı bloğu (Eppendorf Thermomixer Compact, seri no: 535YP233107, Almanya)
- Santrifüj (Eppendorf, seri no: 5452Y0451206, Almanya)
- Atık kabı



Şekil 23: DNA izolasyonu iş akışı şematik gösterimi

3.6.1.2. DNA izolasyonu işlem basamakları

- *QIAamp& DNA FFPE Tissue DNA izolasyonu prosedürü*
 - Ependorftaki kesitlerin üzerine 1 ml Ksilol kondu. (10 mikronluk 3 kesit kullanılır)
 - Örnek 10 sn vortekslendi.
 - Ksilolün eriyip erimediği gözlemlendi. (Buna göre ksilolle muamele uzatılabilir)
 - Vorteksle 2 dk maksimum hızda çevirildi.

- Üstteki süpernatant pellet kaldırılmadan çekilip atıldı.
- Pelletin üzerine 1 ml etanol konuldu.
- 10 sn vortekslendi.
- 2 dk maksimum hızda santrifüjlendi.
- Üstteki supernatant (etanol) pellet kaldırılmadan çekilip atıldı.
- Örnek içinde kalma ihtimali olan etanol 37°C de kuru ısı bloğunda uçuruldu.
- Buffer ATL ve proteinase- k karışımı hazırlandı.
- Her hasta için Buffer ATL: 180 µL Proteinase-k: 20 µL olarak hesaplandı.
- Proteinase-k ve Buffer ATL karışımı mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı. (Karışım hazırlanırken yarım ölçü fazla konulur. Mikrosantrifüj tüpüne önce buffer ATL sonra proteinase-k konulur ve faz farkı kaybolana kadar pipetajlanır)
- Kuru ısı bloğunda alkolün iyice uçtuğu görüldükten sonra örneklerin üzerine hazırlanan buffer ATL+proteinase-k solüsyonundan 200 µL konuldu. Ardından iyice pipetajlandı.
- Örnekler 56 °C kuru ısı bloğunda bütün gece inkübe edildi. (Parçalanmanın olup olmadığı kontrol edilir. Eğer parçalanma olmadıysa ek süre eklenebilir veya enzim ilavesi yapılabilir)
- 90 °C de kuru ısı bloğunda 1 saat inkübe edildi.
- Mini bir spin yapıldı. (Santrifüj de 6000 G veya 8000 rpm de 10 sn)
- Örneklerin üzerine 200 µL AL buffer'dan konuldu ve vortekslendi.
- 200 µL etanol konuldu ve vortekslendi.
- 6000 G'de mini bir spin yapıldı.
- Mikrosantrifüj tüpünün içindeki örnekler filtreli koleksiyon tüplerine alındı.
- 6000 G'de 1 dk santrifüj yapıldı. (Santrifüj sonrası alttaki koleksiyon tüpleri atılır ve filtreler yeni koleksiyon tüplerine geçirilir)
- Filtrelerin üzerine 500 µL yıkama tampon 1 (wash buffer 1 = AW1) konuldu.
- 8000 rpm'de 1 dk çevirildi. (Santrifüj sonrası alttaki koleksiyon tüpleri atılır ve filtreler yeni koleksiyon tüplerine geçirilir)
- Filtrelerin üzerine 500 µL yıkama tamponu 2 (wash buffer 2 = AW2) konuldu.
- 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi.

→ Santrifüj sonrası alttaki koleksiyon tüpleri atıldı ve filtreler yeni koleksiyon tüplerine geçirildi.

→ 14000 rpm'de 3 dk santrifüjlendi ve filtreler kurutuldu.

→ Alttaki koleksiyon tüpleri atılıp, filtreler steril 1.5'luk mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

→ Filtrelerin tam ortasına gelecek şekilde 55 µL tampon ATE (elution buffer) konuldu.

→ Oda ısısında 1 dk inkübe edildi. (İnkübasyon süresi 5 dk'ya kadar uzatılabilir)

→ 14000 rpm'de 1 dk çevrildi ve filtreler atıldı. (Mikrosantrifüj tüpünde elde edilen sıvı DNA'dır. Elde edilen DNA hemen çalışılabilir veya -20⁰ C'de saklanabilir.)

3.6.2. Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu:

Kantitatif Real-Time PCR da denilen gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time polymerase chain reaction, RT-PCR), klasik PCR ile aynı prensibe dayanır. Fakat bu yöntem her amplifikasyon turundan sonra hedefin kantitasyonuna olanak sağlar. Böylelikle PCR'ın kalitatif özelliğinin yanısıra RT-PCR kantitatifdir. Bu teknikte floresansı saptayabilen thermocyclerlar ürün konsantrasyonunu eş zamanlı takip ederek, spesifik nükleik asit dizisini amplifiye etmek için kullanılır. RT-PCR ürün kantitasyonunda iki genel metot vardır.

a) Çift iplikli DNA arasına giren floresans özellikli boyalardan yararlanır. veya;

b) Taqman tekniğinde olduğu gibi komplementer DNA ipliğine hibridize olan, floresans ışımaya yapan modifiye DNA oligonükleotid prob kullanılır. Bu metot floroforun (floresans özellikli molekül) diğer molekül ile soğurulduğu bir oligonükleotid prob kullanımını içerir. Komplementer DNA'ya bağlanmasının ardından prob PCR reaksiyonu boyunca prob 5'→3' Taq polimeraz aktivitesi tarafından degrade edilir.

RT-PCR'in en büyük avantajı duyarlılığı ve eş zamanlı olarak birçok örneği işlemesidir (93).

3.6.2.1. RT-PCR' da kullanılan malzeme ve cihazlar

→ Roche LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Instrument II)

→ Therascreen: K-RAS Mutation Kit (CE, IVD)

→ Steril filtrelili pipet ucu (Greiner Bio-one Filter Tip FT 1000, FT100, FT10)

→ Mikrosantrifüj tüpü (0,2 – 0,5 ve 1,5 mililitre/ml hacimli) [Citotest, ref.no (referans numarası):34730015S, Çin]

→ Otomatik pipetler(Eppendorf, kat. no: 022472101, GmbH Hamburg, Almanya)

→ 96'lık well-plate (Falcon BT Microtest™ 96 , ref.no. 353072, Çin)

→ Vorteks (Heidolph Top Mix 94323, Bioblock Scientific, seri no: 54119, Almanya)

→ Santrifüj (Eppendorf, seri no: 5452Y0451206, Almanya)

→ Soğuk Blok

→ Atık kabı.

3.6.2.1. RT-PCR İşlem Basamakları

Roche LightCycler 480 Instrument/ Therascreen: K-RAS Mutation Kit (CE, IVD)

Çalışma İçin Therascreen K-RAS Mutation Kit'i içinden alınacak tüpler: **1-9-10** nolu tüpler.

Kontrol çalışması; izole edilen örneklerin DNA miktarının çalışma için uygunluğunu saptamak amacıyla yapılır. Uygun değerler $24 < C_p(C_t) < 29$ 'dır.

→ Her bir hasta başına: **19,8µl kontrol reaksiyon miksi** (1 no'lu kırmızı vial) + **0,2 µl taq polimeraz** (10 no'lu vial) olmak üzere **20µl miks** hazırlandı.

→ Kontrol reaksiyon miks çözüldükten sonra homojenizasyonu sağlamak amacıyla kısa bir süre vortekslendi.

→ Kontrol reaksiyon miks ve taq polimeraz kullanılmadan önce tüp çeperinde kalan damlacıkları tüpün dibinde toplamak amacıyla mini bir spin yapıldı. (Kısa süreli ve düşük rpm'de spin yapılması solüsyon içindeki maddelerin merkezkaç kuvveti etkisi ile tüp dibine geç etmemesi ve homojenizasyonu bozmaması amacıyla yapılmaktadır. Bunun için 10 sn boyunca 2000 rpm yeterlidir. Taq polimeraz vortekslenmez. Vorteks enzimi degrade edebilir.

5 Hasta için çalışma örneği hesaplaması:

• 5 hasta + 1 standart miks (9 no'lu vial) + 1 negatif kontrol + 1 fazlalık/pipetaj hatası = **8 kat** olarak düşünülür.

→ $19,8 \times 8 = 158,4 \mu\text{l}$ **kontrol reaksiyon miksi**

→ $0,2 \times 8 = 1,6 \mu\text{l}$ **taq polimeraz** kullanılması gerekmektedir.

→ Ependorfun içine hesaplanan miktarlar konuldu ve iyice pipetaj yapıldı.

Plate hazırlama:

→ Hazırladığımız miks'den her bir kuyucuğa **20 µl** konuldu. (Toplam hasta sayısının 2 fazlası kadar kuyucuğa miks'den konulur. 5 hasta + 1 standart miks + 1 ntc = 7 gibi) Kuyucuklara en baştaki **[A1]** kuyucuğundan başlayarak yatay doğrultuda **[B1]**, **[C1]**, **[D1]**, **[E1]**.... şeklinde yükleme yapılır.

→ Koyduğumuz 20µl master kontrol mikslerinin üzerine **5 µl hasta DNA'sı** konulup pipetaj yapıldı. (Böylelikle her bir kuyucukta toplam **25 µl** karışım olmuş oldu)

→ Standart kuyucuğu için **20 µl master kontrol miks üzerine 5 µl standart miks** (9 no'lu vial) konuldu.

→ Negatif kontrol kuyucugu için sadece **20 µl master kontrol miks** konuldu.

→ Kuyucuklara yükleme sırasında pipet dik tutulup pipet içindeki sıvı kuyucuğun tam dibine bırakıldı ve pipetaj yapıldı. (Miks ve DNA örneklerinin kuyucuk dibine bırakılması, çepelere dokunulmadan pipetaj yapılması önem taşımaktadır)

Kontrol çalışması için plate kullanım şeması Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 9. Plate kullanım Şeması

Test	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Kontrol	STD	NTC	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5	Örnek 6	Örnek 7	Örnek 8	Örnek 9	Örnek 10

→ Yükleme işlemi bittikten sonra plate foil ile kapatılır.

• Foilin plate yüzeyinde çıkıntı yapmadan yapışması gerekmektedir. Çıkıntı olup olmadığı yatay ekseninde plate yüzeyine bakılarak anlaşılabilir. Eğer çıkıntı var ise foil çok dikkatli bir şekilde çıkarılır ve yeni bir foil ile tekrardan kapatılır. Foilin yapışkan kısmını açarken ve plate üzerine yapıştırılırken üzerine dokunulmaması gerekir. Foilin üzerinin kirlenmesi veya lekelenmesi ışınların kırılmasına yol açarak floresans şiddetinin cihaz tarafından yanlış ölçülmesine sebep olacaktır.

→ Plate cihaza yüklendi ve çıkan sonuçlarda Cp değeri ölçüldü. Cp değeri 24 -29 aralığında olanlar bir sonraki mutasyon çalışmasına doğrudan alındı. Cp değeri 24'den az olanlar dilüe edilerek çalışmaya alındı. Cp değeri 29'dan fazla olanlar çalışmaya alınmadı.

Mutasyon çalışması işlem prosedürü

Roche LightCycler 480 Instrument/ Therascreen: K-RAS Mutation Kit (CE, IVD)

Mutasyon Analizi Çalışma Prosedürü

Çalışma için Therascreen: K-RAS Mutation Kit'i içinden alınacak tüpler: **1-2-3-4-5-6-7-8** nolu tüplerdir. Örnekler plate kuyucuklarına yüklenmeden önce reaksiyon miksler hazırlanır ve bunlar plate kuyucuklarına uygun hacimlerde konulur.

Reaksiyon Miks Hazırlama Safhası:

→ İlk olarak steril ependorflar 1'den 8'e kadar numaralandırıldı.

→ Her bir ependorfa kendi üzerindeki numarayla aynı reaksiyon miksinden konuldu.

→ Kit içindeki tüpler -20°C 'den çıkarılıp birkaç dakika erimesini bekledikten sonra 2-3 sn vortekslenip hafif bir mini spin yapıldı.

→ Reaksiyon miksler işi bittikten hemen sonra -20°C 'ye kaldırıldı. (Taq polimeraz ise kullanılacağı zaman -20°C 'den çıkarılıp gerekli miktarda kullanıldıktan sonra hemen -20°C 'ye kaldırılır. Taq polimeraz enzimi vortekslenmez. Reaksiyon miksler ve taq polimeraz dışarıda kaldığı süre içinde de soğuk blok üzerinde tutulmalıdır.)

Mutasyon analizinde kullanılan ticari kitin içindeki tüpler farklı renklerde ve hacimdedirler.

Reagents Supplied	20 reactions	80 reactions	Tube
	Volume	Volume	
Control Reaction Mix	1300 μl	5200 μl	1
12ALA Reaction Mix	650 μl	2600 μl	2
12ASP Reaction Mix	650 μl	2600 μl	3
12ARG Reaction Mix	650 μl	2600 μl	4
12CYS Reaction Mix	650 μl	2600 μl	5
12SER Reaction Mix	650 μl	2600 μl	6
12VAL Reaction Mix	650 μl	2600 μl	7
13ASP Reaction Mix	650 μl	2600 μl	8
Mixed standard	300 μl	1000 μl	9
Taq DNA polymerase	60 μl	240 μl	10

Şekil 26: Mutasyon Analizinde Kullanılan Ticari Kitin İçindeki Tüplerin Renkleri

1. Nolu Tüpte Kontrol Reaksiyon Miks
2. Nolu Tüpte → 12ALA (Alanin) reaksiyon miks
3. Nolu Tüpte → 12ASP (Asparajin) reaksiyon miks
4. Nolu Tüpte → 12ARG (Arginin) reaksiyon miks
5. Nolu Tüpte → 12CYS (Sistein) reaksiyon miks
6. Nolu Tüpte → 12SER (Serin) reaksiyon miks
7. Nolu Tüpte → 12VAL (Valin) reaksiyon miks
8. Nolu Tüpte → 13ASP (Asparajin) reaksiyon miks hazırlandı.

→ Her bir hasta için kitin içindeki 1-8 no'lu tüplerden **19.8 µl reaksiyon miks**, kitin içindeki 10 no'lu tüpten **0.2 µl taq polimeraz** enzimi konuldu. (Her bir kuyucuğa hazırlanan karışım toplam 20 µl oldu)

- Master mikslere ependorfun içinde hazırlanır.

Örneğin 5 hasta için; 5 hasta + 1 standart miks + negatif kontrol + 1 pipetaj hatası= 8 örnek üzerinden hesaplama gerçekleştirildi.

$$19.8 \mu\text{l} \times 8 = 158.4 \mu\text{l} \text{ reaksiyon miks}$$

$$0.2 \mu\text{l} \times 8 = 1.6 \mu\text{l} \text{ taq polimeraz hesaplanarak hazırlandı.}$$

→ Bu karışımların herbiri 160 µl'lik ependorflara hazırlandı. (Bu aşamada enzim ependorfun en dibine girilerek bırakılır. Burada pipet ucundan çıkan baloncukları görecektir şekilde en sona kadar basılarak pipet dışarı çıkarılır. Yıkama ependorfun üst kısımlarında yapılır. Çünkü enzimi en alta bıraktığımızdan üst kısımlarda enzim bulunmadığı için pipet ucu enzimden temizlenmiş olur)

• 6 hastaya kadar olan çalışmalarımızda **yarım paylık** pipetaj hatası verebiliriz. 6 hastadan sonrası için **1 pipetaj hatası** vermek daha sağlıklı olacaktır.

Plate Hazırlanması:

• Plate hazırlanması sırasında reaksiyon mikslere ve taq polimeraz enziminin sıcaklıktan etkilenmemesi için tüm işlemler buz aküsü üzerinde yapılır.

• Plate kullanmadan hemen önce poşetinden çıkarılmalıdır ve kuyucukların bulunduğu üst yüzeyine dokunulmamalıdır.

• Ependorflara hazırlanan master mikslere plate'e yüklenmeden önce ependorfun içindeki hacmin yarısı kadar hacimle iyice pipetaj yapılmalıdır.

• Her bir kuyucuğa hazırladığımız master miks karışımından 20 µl olacak şekilde yükleme yapılır. Her bir yükleme plate'in sol kısmındaki harflerin doğrultusunda yatay olarak yapılır.

• Plate yükleme işlemi mümkün olduğunca hızlı yapılmalıdır. Aksi takdirde taq polimeraz aktivitesini kaybedebilir.

Tablo 10: Mutasyon Analizi İçin 96 Kuyucuklu Plate Yükleme Şeması

Test	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Kontrol	Mixed STD	NTC	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5	Örnek 6	Örnek 7	Örnek 8	Örnek 9	Örnek 10
B 12ALA	Mixed STD	NTC	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5	Örnek 6	Örnek 7	Örnek 8	Örnek 9	Örnek 10
C 12ASP	Mixed STD	NTC	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5	Örnek 6	Örnek 7	Örnek 8	Örnek 9	Örnek 10
D 12ARG	Mixed STD	NTC	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5	Örnek 6	Örnek 7	Örnek 8	Örnek 9	Örnek 10
E 12CYS	Mixed STD	NTC	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5	Örnek 6	Örnek 7	Örnek 8	Örnek 9	Örnek 10
F 12SER	Mixed STD	NTC	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5	Örnek 6	Örnek 7	Örnek 8	Örnek 9	Örnek 10
G 12VAL	Mixed STD	NTC	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5	Örnek 6	Örnek 7	Örnek 8	Örnek 9	Örnek 10
H 12ASP	Mixed STD	NTC	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5	Örnek 6	Örnek 7	Örnek 8	Örnek 9	Örnek 10

Plate'e Örneklerin yüklenmesi:

- Master mixlerin kuyucuklara yüklenmesinden sonra ilgili kuyucuklara 5 µl pozitif kontrol, negatif kontrol veya hasta DNA'larından konulur. Burada yükleme işlemi yukarıdan aşağıya doğru sütunları takip ederek yapılır. Yükleme işlemine öncelikle hasta DNA'lannın yüklenmesi ile başlandı.

- Plate'deki 20 µl'lik master mix'lerin üzerine 5 µl'lik DNA'lar kuyucuğun en dibine verilir ve dipte iyice pipetaj yapıldı. (Bu işlem 10 kez tekrarlandı)

- İlk hastanın DNA'sı 3 numaralı sütundan başlanarak yapıldı. (Her bir hasta için aynı sütundaki toplam 8 kuyucuğun her birine 5'er µl olacak şekilde yükleme yapılacağı için toplam 40 µl DNA kullanılır. Bu negatif ve pozitif kontrol içinde geçerlidir)

- Hastaların DNA'larının yüklenmesinden sonra negatif kontrol ve en son pozitif kontrol yükleme yapıldı. Negatif kontrol için 2. sütuna her bir kuyucuğa **5 µl** olacak şekilde **DNA/RNAaz free water** (veya **PCR grade su** da konabilir. Bunların hiçbirisi yoksa hiçbirşey konulmaz.) kondu. Kuyucuklarda sadece 20 µl master miks olur. Pozitif kontrol için 1. sütuna her bir kuyucuğa 5 µl olacak şekilde **standart miks** konulur. (Pozitif kontrolü en son yüklenmesinin sebebi bulaşa engel olmaktır)

Plate Üzerine Foil'in Yapıştırılması:

Kuyucuklara yükleme işlemi bitirildikten sonra foilin sağ ve sol kenarlarındaki beyaz bantlardan tutularak şeffaf kısmı ayrılır. Bu sırada foilin şeffaf kısmına dokunulmaz. Foil plate'in kenarlarından taşmayacak şekilde yapıştırılır ve kendi aparatı ile kuyucukların aralarından geçilerek sabitlenir. Bu işlem sırasında kuyucukların içerisindeki karışımların kenarlara sıçramaması için plate dikkatlice tutulur. Tutma işlemi sırasında plate'in üst kısmına dokunmamalıdır. Cihaz üstten okuduğu için hatalı okumaya sebep verebilir. Daha sonra plate cihaza verilir **(93)**.

RT-PCR'in en büyük avantajlarından birisi kabul edilen görsel verilerin eş zamanlı gözlenebilmesi ilkesini sağladığı şekilde her bir örneğin, orijinali ile grafiksel olarak değerlendirmesi yapıldı. Reaksiyonlar sonrası grafiklerden mutant varlığı ve mutantın hangi protein değişimiyle gerçekleştiği saptandı.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi:



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi:

Veri SPSS 15.0 paket programında değerlendirildi. İstatistiksel çözümler Ki-kare testi, Kaplan Meier yaşam analizi ile yapıldı. İstatistik anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları:

Çalışma bütçe kısıtlılığı nedeniyle tek merkezli olarak yapılmıştır. Hastanemizde kolorektal cerrahi ağırlıklı olarak uygulan bir merkez olması sebebiyle çalışma bir yanlılık içerebilir.

3.10 Etik Kurul Onayı

Bu araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu' nun (İzmir) 24.11.2011 tarihli ve 373-GOA protokol numaralı görüşmesinde “Ege Bölgesi rektosigmoid kanserlerinde dominant Kras mutasyon tipinin belirlenmesi, ilgili mutasyonların protein fonksiyonu ve ilaç yanıtlarına etkisi” isimli proje ile etik onay alınmıştır.

3.11. BAP Başvuru Onayı:

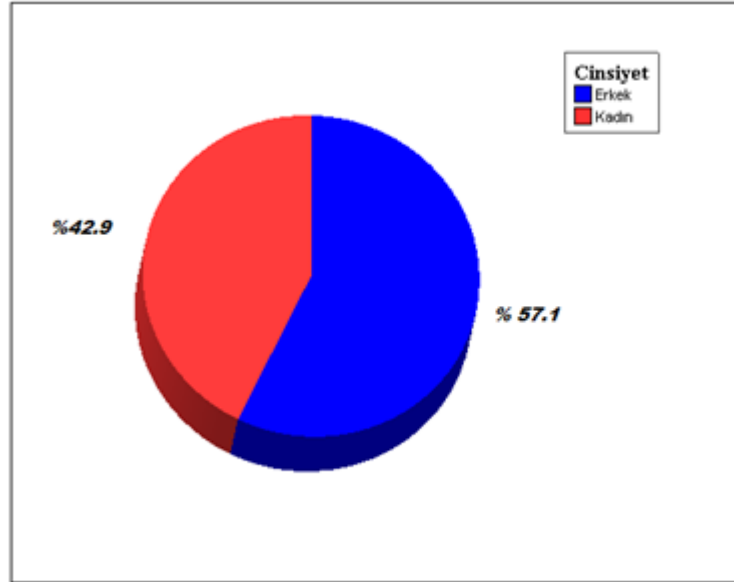
Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2012.KB.SAG.063 sayı ile desteklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1 DEMOGRAFİK VERİLER

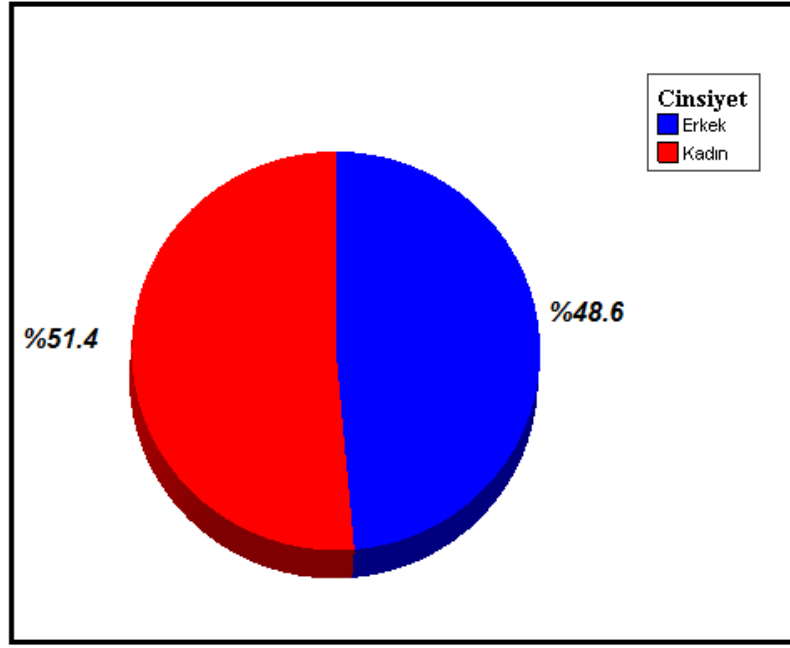
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrah Anabilim Dalı'nda kolon kanseri ve rektosigmoid kanseri olarak opere edilen ve histopatolojik tanısı Patoloji Anabilim Dalı'nda konulan, klinik izlemleri Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'nda yapılan 35 rektosigmoid kanser ve 49 kolon kanseri olgusu çalışmaya alındı.

84 olgunun %57,1 (n:48)'i erkek, %42,9 (n:36)'u kadındı.



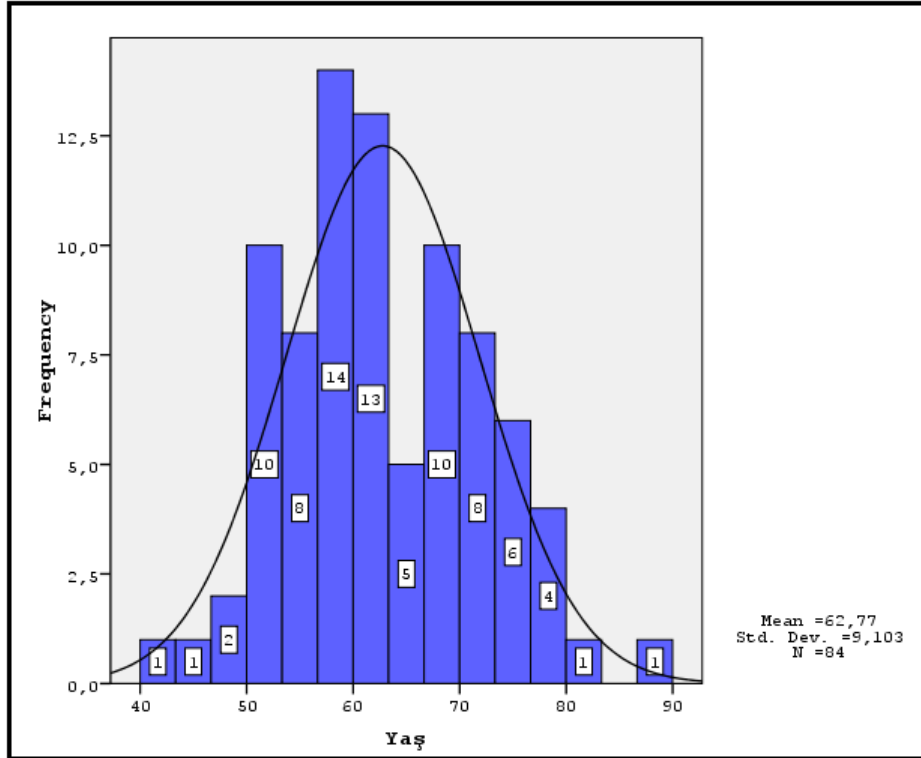
Şekil 27. Olguların cinsiyete göre dağılımları

Sadece rektosigmoid kanser olgularındaki cinsiyet dağılımı; %48,6 erkek, %51,4 kadın olguydu.

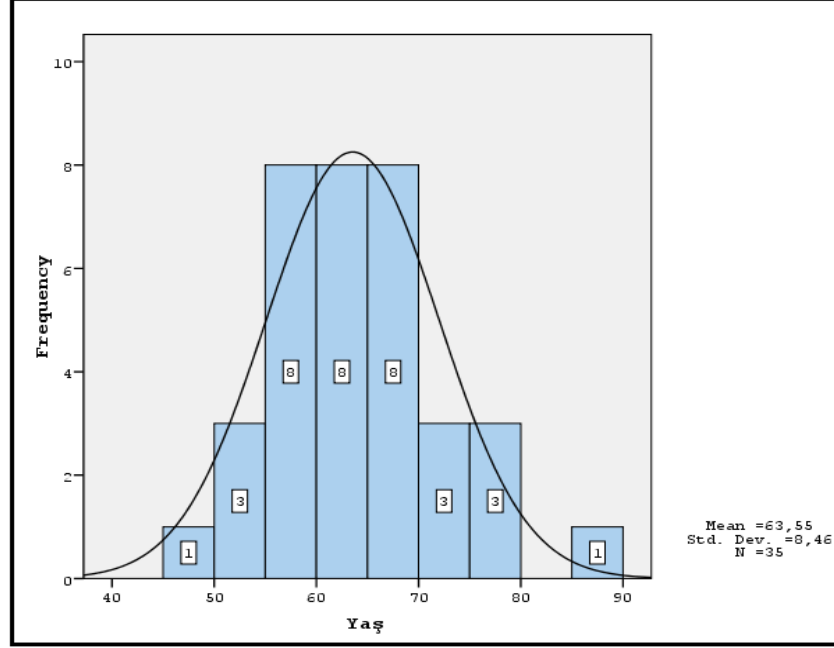


Şekil 28 : Rektosigmoid Olguların Cinsiyete Göre Dağılımı

Çalışma grubumuzun yaş ortalaması (\pm SD), 62,8 (\pm 9,1) ; medyan 62.8'dir (min-max; 42-87). Tanı almış kolorektal olgularımızın %32'si 55-60 yaş arasındadır (Şekil 29). Rektosigmoid olguların yaş ortalaması ortalaması (\pm SD), 63,6 (\pm 9,1) ; medyan 63.6'dır (min-max; 48-87). (Şekil 30) Rektosigmoid olgularımız toplam olgularımıza benzemektedir.

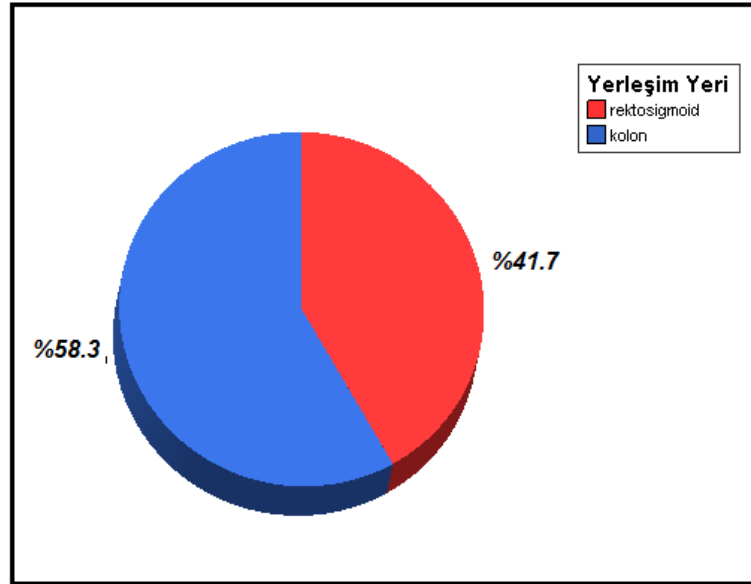


Şekil 29 : Tüm olguların Yaş Dağılımı



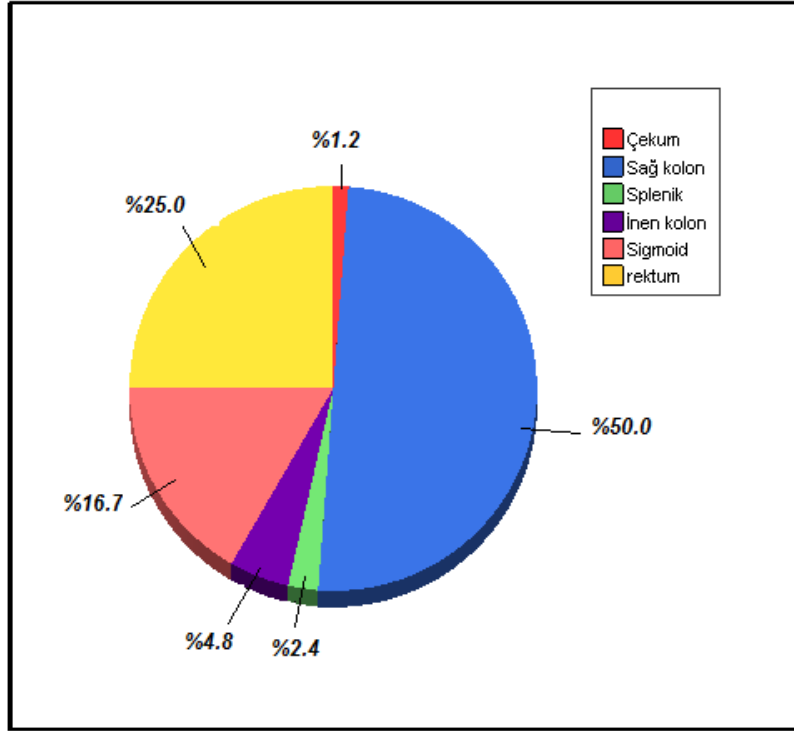
Şekil 30 : Rektosigmoid Olguların Yaş Dağılımı

Olguların primer tümör yerleşimleri %42 (n:35)'si rektosigmoid, %58'i (n:49) kolon yerleşimlidir.



Şekil 31 : Olguların Primer Tümör Yerleşim Yeri Dağılımı

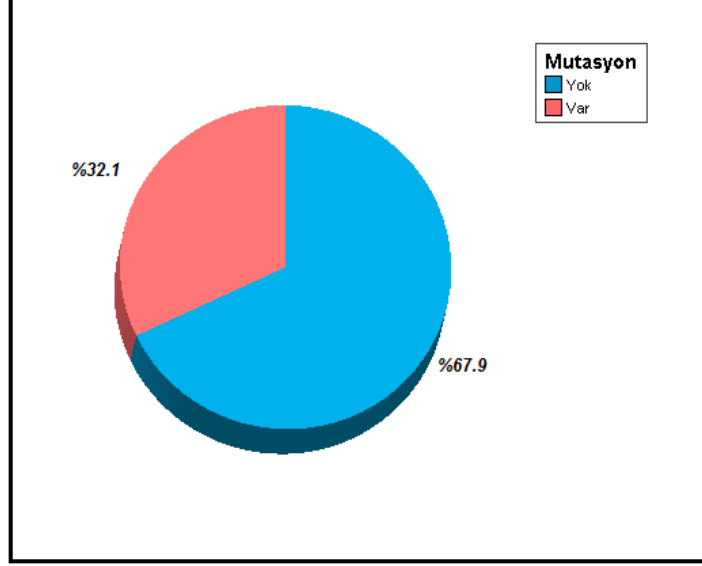
Kolon anatomisine göre primer tümör yerleşimleri değerlendirildiğinde %50.0 (n=42) sağ kolon, %25.0 (n=21) rektum, %16.7 (n=14) sigmoid bölge, %4.8 (n=4) İnen kolon, %2.4 (n=2) Splenik Fleksure ve %1.2 (n=1) çekumda olduğunu gözlemledik.



Şekil 32 : Tümör Yerleşim Yeri

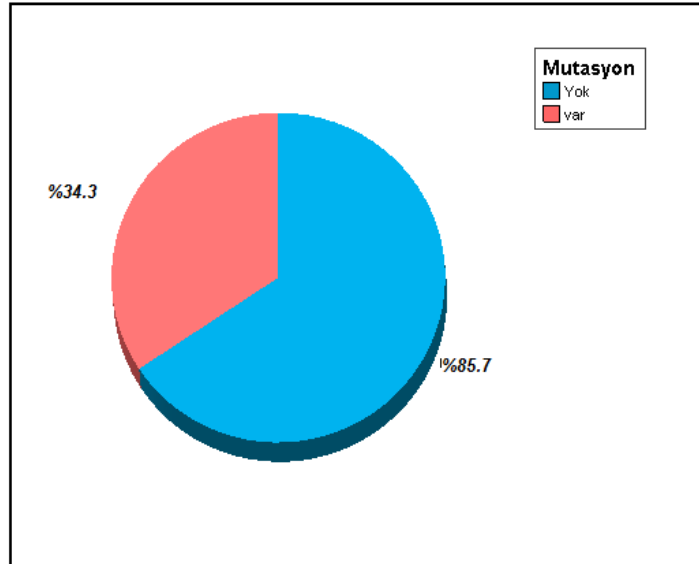
4.2 MUTASYON BULGULARI

Kolon ve rektosigmoid olgular birlikte değerlendirildiğinde; olguların %67,9'u yabancıl tip (WT), %32,1'i KRAS geni mutant olarak saptanmıştır.



Şekil 33: Olguların Kras Mutasyon Durumuna Göre Dağılımı

Rektosigmoid grubumuzun ise olguların %85.7 (n=23)'si yabancıl tip (WT), %34,3 (n=12)'ü KRAS geni mutant olarak saptanmıştır.



Şekil 34 : Rektosigmoid Olguların KRAS Mutasyon Durumuna Göre Dağılımı

Tablo 11: Çalışmaya Alınan Olguların KRAS Fenotipi

<i>OLGU NUMARALARI</i>	<i>K-RAS MUTASYON DURUMU</i>	DEĞİŞİM
KRASC0L1	WT	GGT/GGC
KRASC0L2	WT	GGT/GGC
KRASC0L3	G12C	GGT>TGT
KRASC0L4	G12V	GGT>GTT
KRASC0L5	WT	GGT/GGC
KRASC0L6	WT	GGT/GGC
KRASC0L7	WT	GGT/GGC
KRASC0L8	WT	GGT/GGC
KRASC0L9	G12D	GGT>GAT
KRASC0L10	G12D	GGT>GAT
KRASC0L11	WT	GGT/GGC
KRASC0L12	G12V	GGT>GTT
KRASC0L13	WT	GGT/GGC
KRASC0L14	G12D	GGT>GAT
KRASC0L15	WT	GGT/GGC
KRASC0L16	G12D	GGT>GAT
KRASC0L17	WT	GGT/GGC
KRASC0L18	G12D	GGT>GAT
KRASC0L19	WT	GGT/GGC
KRASC0L20	WT	GGT/GGC
KRASC0L21	WT	GGT/GGC
KRASC0L22	WT	GGT/GGC
KRASC0L23	WT	GGT/GGC
KRASC0L24	G13D	GGC>GAC
KRASC0L25	WT	GGT/GGC
KRASC0L26	WT	GGT/GGC
KRASC0L27	G12V	GGT>GTT
KRASC0L28	WT	GGT/GGC
KRASC0L29	WT	GGT/GGC
KRASC0L30	WT	GGT/GGC
KRASC0L31	G13R	GGC>CGC
KRASC0L32	WT	GGT/GGC
KRASC0L33	WT	GGT/GGC
KRASC0L34	WT	GGT/GGC
KRASC0L35	WT	GGT/GGC
KRASC0L36	G12V	GGT>GTT
KRASC0L37	WT	GGT/GGC
KRASC0L38	G12D	GGT>GAT
KRASC0L39	WT	GGT/GGC
KRASC0L40	WT	GGT/GGC
KRASC0L41	G12C	GGT>TGT

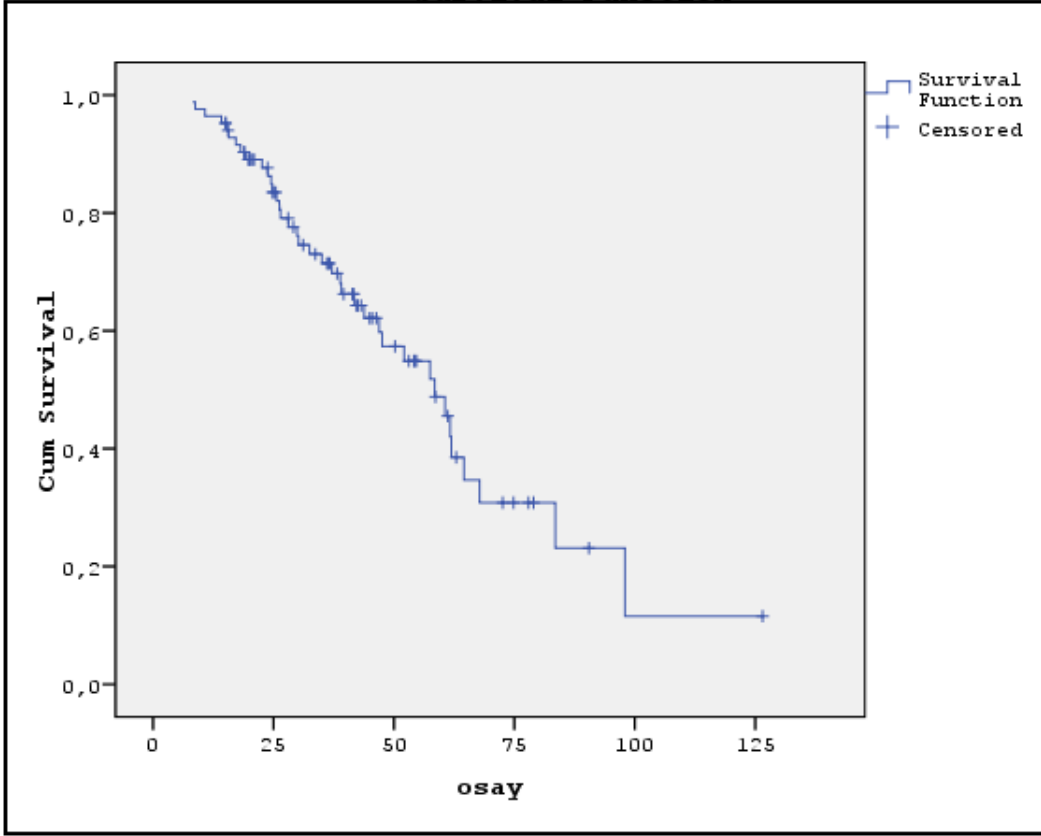
KRASCOL42	WT	GGT/GGC
KRASCOL43	WT	GGT/GGC
KRASCOL44	WT	GGT/GGC
KRASCOL45	WT	GGT/GGC
KRASCOL46	WT	GGT/GGC
KRASCOL47	G12V	GGT>GTT
KRASCOL48	WT	GGT/GGC
KRASCOL49	WT	GGT/GGC
KRASREC1	WT	GGT/GGC
KRASREC2	WT	GGT/GGC
KRASREC3	WT	GGT/GGC
KRASREC4	WT	GGT/GGC
KRASREC5	WT	GGT/GGC
KRASREC6	WT	GGT/GGC
KRASREC7	WT	GGT/GGC
KRASREC8	G12A	GGT>GCT
KRASREC9	G12D	GGT>GAT
KRASREC10	G12S	GGT>AGT
KRASREC11	G12V	GGT>GTT
KRASREC12	G12V	GGT>GTT
KRASREC13	WT	GGT/GGC
KRASREC14	WT	GGT/GGC
KRASREC15	WT	GGT/GGC
KRASREC16	WT	GGT/GGC
KRASRECT7	WT	GGT/GGC
KRASRECT8	WT	GGT/GGC
KRASRECT9	WT	GGT/GGC
KRASREC20	WT	GGT/GGC
KRASREC21	WT	GGT/GGC
KRASREC22	WT	GGT/GGC
KRASREC23	G12A	GGT>GCT
KRASREC24	G13D	GGC>GAC
KRASREC25	WT	GGT/GGC
KRASREC26	WT	GGT/GGC
KRASREC27	G12D	GGT>GAT
KRASREC28	WT	GGT/GGC
KRASREC29	WT	GGT/GGC
KRASREC30	WT	GGT/GGC
KRASREC31	G12D	GGT>GAT
KRASREC32	G12D	GGT>GAT
KRASREC33	G13D	GGC>GAC
KRASREC34	G12V	GGT>GTT
KRASREC35	WT	GGT/GGC

*WT: Yabani tip, *COL : Kolon Grubu Hastası *REC : Rektosigmoid Grubu Hastası

4.3 KLİNİK BULGULAR

Tüm olgu grubumuzun genel sağkalım süre ortalaması (ort \pm standart hata; min-max) $61,03 \pm 5,57$; 50,1-71,9 olarak gözlenmiştir.

Medyan sağkalım $58,47 \pm 6,61$; 45,5-71,4'dür.



Şekil 35: Tüm Olgularda Sağkalım Analizi

Sadece kolon grubunun genel sağkalım süre ortalaması (ort \pm standart hata; min-max) $56,45 \pm 6,49$; 43,7-69,2 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım $57,5 \pm 10,68$; 36,6-78,4'dür.

Rektosigmoid grubumuzun ise genel sağkalım süre ortalaması (ort \pm standart hata; min-max) $58,19 \pm 4,19$; 49,9-66,4 olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım $60,6 \pm 7,72$; 45,5-75,7'dir.

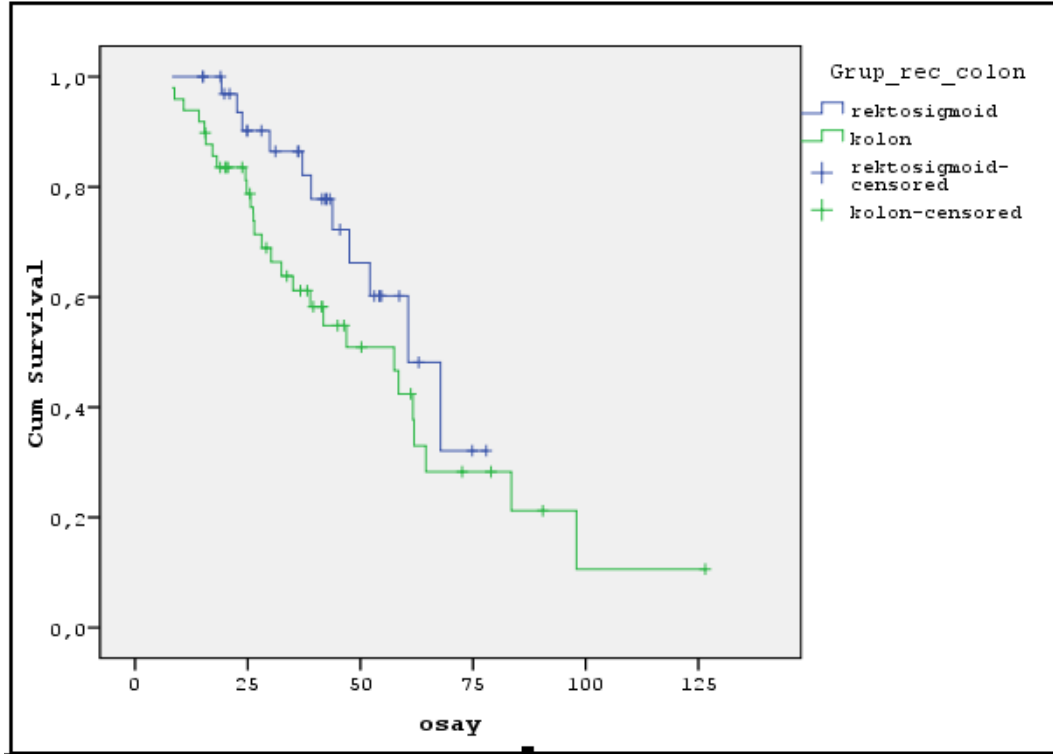
Tablo 12 : Genel Sağkalım Ortalaması

	Genel Sağkalım Süre Ortalaması			
	Tahmin	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
Rektosigmoid	58,195	4,192	49,979	66,410
Kolon	56,450	6,486	43,736	69,163
Tümü	61,030	5,570	50,113	71,948

Tablo 13 : Genel Sağkalım Medyan

	Medyan Sağkalım			
	Tahmin	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
Rektosigmoid	60,600	7,725	45,459	75,741
Kolon	57,500	10,681	36,565	78,435
Tümü	58,467	6,613	45,506	71,427

Log Rank p= 0,133



Şekil 34 : Karşılaştırmalı Sağkalım Analizi

Olgu grubunda 12 aylık sağ kalım %96, 24 aylık sağ kalım %84, 5 yıllık sağ kalım

%45 olarak bulunmuştur.

Kolon kanseri olgularımızda 12 aylık sağ kalım %93, 24 aylık sağ kalım %83, 5 yıllık sağ kalım %42 olarak bulunmuştur.

Rektosigmoid kanser olgularımızda ise 12 aylık sağ kalım %96, 24 aylık sağ kalım %90, 5 yıllık sağ kalım %48'dir.

Tablo 14 : Olgular Arası 12 ay, 24 ay ve 5 Yıllık Sağ Kalım Analizi

	Tüm Olgular (%)	Kolon Grubu (%)	Rektosigmoid Grup (%)
12 Aylık Sağkalım	96	96	93
24 Aylık Sağkalım	84	90	83
5 Yıllık Sağkalım	45	48	42

Yaşam süreleri açısından karşılaştırıldığında kolon ve rektosigmoid grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. (p=0,13)

K-RAS Mutasyon Durumu Açısından Değerlendirme

K-RAS mutasyonu gözlenen grupta genel sağkalım süre ortalaması (ort ± standart hatamin-max) $66,81 \pm 11,03$; $45,2-88,4$ olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım $61,7 \pm 12,62$; $36,9-86,3$ 'tür.

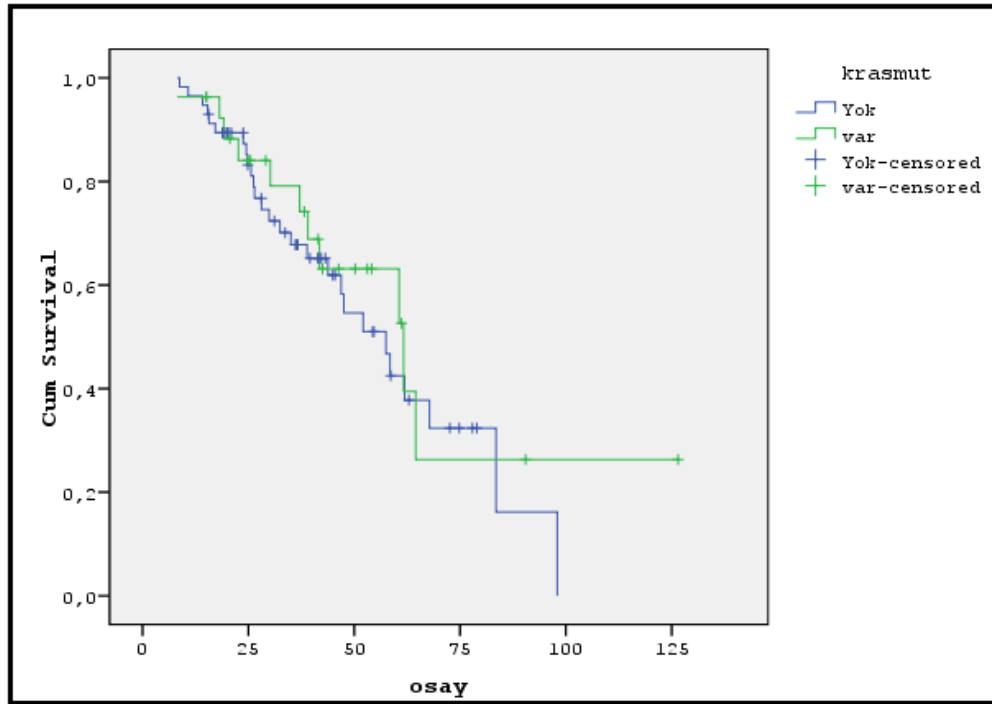
K-RAS mutasyonu gözlenmeyen tüm olgularda genel sağkalım süre ortalaması (ort± standart hata; min-max) $56,12 \pm 4,90$; $46,5-65,7$ olarak gözlenmiştir. Medyan sağkalım $57,5 \pm 6,33$; $45,1-69,9$ 'dur.

Tablo 15: K-RAS Mutasyonu Genel Sağkalım Süre Ortalaması

	Genel Sağkalım Süre Ortalaması			
	Tahmini	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
KRAS Mutasyonu Yok	56,125	4,903	46,515	65,735
KRAS Mutasyonu Var	66,816	11,025	45,208	88,425
Tümü	61,030	5,570	50,113	71,948

Tablo 16: Medyan Sağkalım Ortalaması

	Medyan Sağkalım			
	Tahmin	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
KRAS Mutasyonu Yok	57,500	6,336	45,081	75,741
KRAS Mutasyonu Var	61,667	12,616	36,940	78,435
Tümü	58,467	6,613	45,506	71,427



Şekil 37: K-RAS Mutasyon Karşılaştırmalı Sağkalım Analizi

Tablo 17: Mutasyon Durumu Cinsiyet Karşılaştırması

	Kolon		Rektum		Toplam
	WT	K-RAS Mut	WT	K-RAS Mut	
Erkek	23	8	10	7	48
Kadın	11	7	13	5	36
Toplam	34	15	23	12	84

Log Rank $p= 0.338$ (kolon), $p=0.403$ (Rektosigmoid) Anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Cinsiyet etkili bir değişken değildir.

Rektosigmoid grubun %11.4'ü G12D mutasyonuna, %8.6'sı G12V ve %5.7'si G12A mutasyonuna sahiptir.

Olguların %65.7'si WT'dir. Buna karşın kolon grubunun %12.2'si G12D, %10.2'si G12V mutasyonuna sahiptir. Kolon grubunun %69.4'ü WT'dir.

Kolon grubunda G12A ve G12S mutasyonları hiç saptanmazken, rektum grubunda G12C ve G13R mutasyonları hiç görülmemiştir.

Tüm olgu grubunda en sık rastlanan mutasyon G12D (%11.9) mutasyonudur.

İki grup arasında mutasyon çeşitleri bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 18: KRAS Mutasyon Durumu Karşılaştırılması

Mutasyon Durumu	Rektosigmoid	Kolon	Toplam
KRAS Mutasyonu Yok	23 %65,7	34 %69,4	57 %67,9
KRAS Mutasyonu Var	12 %34,3	15 %30,6	27 %32,1
Toplam	35 %100	49 %100	84 %100

Log Rank $p= 0.722$ Anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Tablo 19: Kolon ve Rektumda Mutasyon Fenotip Dağılımları

Mutasyon Tipi	Rektosigmoid	Kolon	Toplam
WT	23 %65,7	34 %69,4	57 %67,9
G12A	2 %5,7	0 %0	2 %2,4
G12C	0 %0	2 %4,1	2 %2,4
G12D	4 %11,4	6 %12,2	10 %11,9
G12S	1 %2,9	0 %0	1 %1,2
G12V	3 %8,6	5 %10,2	8 %9,5
G13D	2 %5,7	1 %2	3 %3,6
G13R	0 %0	1 %2	1 %1,2
Toplam	35 %100	49 %100	84 %100

	Rektosigmoid	<p>Gly</p> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ <p>Nötral Non-Polar</p>		Kolon
En Çok Gözlenen Mutasyonlar	G12D	<p>Asp</p> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Asidik Polar</p>	<p>Asp</p> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Asidik Polar</p>	G12D
	G12V	<p>Val</p> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Nötral Non-Polar</p>	<p>Val</p> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Nötral Non-Polar</p>	G12V
Hiç Gözlenmeyen Mutasyonlar	G13R	<p>Arg</p> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Bazik Polar</p>	<p>Ala</p> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Nötral Non-Polar</p>	G12A
	G12C	<p>Cys</p> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$ <p>Nötral Hafif Polar</p>	<p>Ser</p> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Nötral Polar</p>	G12S

Şekil 38: Rektosigmoid ve Kolonda En Çok Gözlenen ve Hiç Gözlenmeyen Mutasyonlar

5. TARTIŞMA

İlk önce çalışmamızı demografik açıdan inceleyecek olursak; K-RAS mutasyon durumu ile cinsiyet ilişkisinde kadın ve erkek hastalar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Okulczyk ve arkadaşları 63 kolorektal kanseri hasta üzerine yaptıkları çalışmada K-RAS mutasyon oranlarının kadın ve erkeklerdeki dağılımlarını bizim çalışmamıza benzer olarak rapor etmişlerdir. Kadın ve erkek hastalar arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır (96).

	Okulczyk ve ark.		Kolorektal Grubumuz	
	Hasta Sayısı	K-RAS Mutasyon	Hasta Sayısı	K-RAS Mutasyon
Erkek	30	10 (%33.3)	48	15 (%31.3)
Kadın	33	13 (%39.4)	36	12 (%33.3)

p=0.612 p=0.512

Aynı çalışmada 60 yaş altı ve 60 yaş üstü olarak yaşa bağımlı demografik araştırmada 60 yaşın üstündeki hastaların %36.9'unda K-RAS mutasyonu saptanmışken, bizim çalışmamızda aynı yaş grubundaki bu hastalarda oran %27.7'dir. Her iki çalışmada da 60 yaş altı ve üstü değerlendirilmesinde anlamlı bir fark bulunamamıştır.

	Okulczyk ve ark.		Kolorektal Grubumuz	
	Hasta Sayısı	K-RAS Mutasyon	Hasta Sayısı	K-RAS Mutasyon
60 Yaş Altı	17	6 (%35.3)	37	14 (%37.8)
60 Yaş Üstü	46	17 (%36.9)	47	13 (%27.7)

p=0.90 p=0.224

Okulczyk ve arkadaşlarının dışında Liu X ve ark.ları da (97) kolon ve rektum K-RAS mutasyon durumlarını değerlendirmişler ve anlamlı bir fark saptamamışlardır. Bizim çalışmamızda da istatistiksel olarak anlamlı olmasa da rektum grubu hastalarının daha büyük bir oranda gözlemlendiğini görmekteyiz.

	Okulczyk ve ark.		Xiluli Liu ve ark.		Kolorektal Grubumuz	
	Hasta Sayısı	K-RAS Mutasyon	Hasta Sayısı	K-RAS Mutasyon	Hasta Sayısı	K-RAS Mutasyon
Rektum	30	10 (%33.3)	23	3 (%13)	35	12 (%34.3)
Kolon	33	13 (%39.4)	90	30 (%30.0)	49	15 (30.6)

p=0.480 p=0.201 p=0.451

Kodon farklılığı olmaksızın Türkiye’inde içinde bulunduğu 3 ortadoğu ülkesi arasında K-RAS mutasyon sıklığını belirlemek için yapılan çalışmada (98) Türkiye popülasyonunun Ürdün popülasyonuna yakın olduğu belirtilmiştir. Okulczyk ve ark.larının Polonya ve Çek Cumhuriyeti’ni baz aldığı bir çalışma yapmışlardır. Bizim yaptığımız çalışma ise; her iki çalışma ile karşılaştırıldığında K-RAS mutasyon sıklığı açısından Çek Cumhuriyeti ile Ürdün popülasyonları ile benzer özellikler göstermektedir (99).

	Hasta Sayısı	K-RAS Mutasyon
Ürdün	59	16 (%33.3)
Mısır	93	16 (%18.4)
Türkiye	95	28 (%34.2)
Çek Cumhuriyeti	53	18 (%33.9)
Polonya	36	15 (%41.7)
Kolorektal Grubumuz	84	27 (%32.4)

Kodon12 ve 13 mutasyonlarıyla ilgili yapılan çalışmalarda Martinez ve ark. (100) Kuzey Meksika popülasyonu olgularında %53 kodon 12 ve %39 kodon 13 mutasyonu saptamışlardır. Yine yapılan başka bir çalışmada (Andersen ve ark.) (101) İskandinav ülkelerinde kodon 12 mutasyonuna %31, kodon 13 mutasyonuna %9 oranında rastlanmıştır. Bizim çalışmamızda ise tüm olgularda kodon 12 mutasyonu %27.4 (n=23), kodon 13 mutasyonu %4.8 (n=4) bulunmuş ve Kuzey İskandinav ülkeleri ile benzerlik göstermektedir.

Liu X. Ve ark.larının Cleveland’da 198 kolorektal kanserli hastada yaptıkları çalışmada 65 hastada (%32.8) K-RAS mutasyonu saptamışlardır. Bu oran bizim çalışmamızdaki %32.1 oranında saptanan K-RAS mutasyonu ile benzerlik göstermektedir. Çalışma sadece kodonlardaki mutasyon açısından değerlendirildiğinde kodon 12 mutasyonuna %69 (n=45) ve kodon 13 mutasyonuna %31 (n=20) oranında rastlanmıştır. Bizim çalışmamızda ise tüm mutasyonların %85.2’si kodon 12’de, %14.8’i kodon 13 de gözlenmiştir. Liu X. Ve ark’larının yaptığı çalışmada G12S ve G13R mutasyonu hiç gözlenmemiş, bizim çalışmamızda ise birer hastada bu mutasyonlara rastlanmıştır. G12R ve G13A mutasyonlarına ise çalışmamızda hiç rastlanmamıştır.

	Mutasyon		Liu X. ve ark.	Bizim Çalışmamız
Kodon12	G12D	Gly12Asp	22 (%33.8)	10 (%37.0)
	G12C	Gly12Cys	12 (%18.5)	2 (%7.4)
	G12V	Gly12Val	8 (%12.5)	8 (%29,6)
	G12R	Gly12Arg	1 (%1.5)	-
	G12A	Gly12Ala	1 (%1.5)	2 (%7.4)
	G12S	Gly12Ser	-	1 (%3.7)
	Diğer		1 (%1.5)	
Kodon 13	G13D	Gly13Asp	18 (%27.7)	3 (%11.1)
	G13A	Gly13Ala	1 (%1.5)	-
	G13R	Gly13Arg	-	1 (%3.7)
	Diğer		1 (%1.5)	
Toplam			65 (%100)	27 (%100)

Kolorektal kanserler dünyada olduğu gibi ülkemizde de görülme sıklığı açısından önemli, etnik ve coğrafi olarak da sıklığı değişen kanserlerdir. Kolon kanserinin karsinogenezinde *RAS* geni önemli bir yere sahiptir. Hedefe yönelik tedavilerin gelişmesiyle birlikte K-RAS gen mutasyonlarının bu tedavileri predikte edici rolü nedeniyle tedavi seçeneklerinde de klavuzlarda zorunlu biyomarker olarak yerini almıştır.

Rektosigmoid bölge kanserleri kolorektal kanserler içinde morfolojik, epidemiyolojik, tümör davranışları açısından farklılık göstermektedir. Sağaltım ve metastatik süreçleri de farklıdır (102).

Birkenkamp-Demtroder K. ve ark.'nın çalışmalarında kolon kanseri ile rektosigmoid bölge kanserleri arasında tümör davranışı ve sağaltıma yanıt farklılıkları açısından gözlenen farklılıkları açıklayacak pekçok genetik ekspresyon farklılıkları bildirilmiştir. Grubun yaptığı çalışma normal mukozadan farklılanan ekspresyon süreçlerini de kapsamaktadır. Bu açıdan dikkat çeken çalışmada rektosigmoid bölgenin karsinogenezinde gen ekspresyon farklılığına dayandırılan bir farklılık oluştuğunu, bu nedenle hasta prognozlarının ve tedavi hedeflerinin farklılanacağını söylemektedirler.

Bizim çalışmamız rektosigmoid bölge tümörlerinin K-RAS mutasyon farklılığına odaklanmıştır. Literatürde kolorektal karsinogenezinde ve tedavi seçeneklerinde önemli bir moleküler marker olan K-RAS'ın protein fonksiyonları düzeyinde rektosigmoid bölgede farklılığını gösteren bir bilgiye ulaşılamamıştır.

Çalışma grubumuzda G12A ve G12S mutasyonları kolon grubunda, G13R ve G12C rektum grubunda saptanmamıştır. Buna karşın sık rastlanan G12V ve G12D mutasyonları her iki grupta da benzer sıklıktadır.

Monticone M. ve ark.'nın yaptığı çalışmada K-RAS mutasyon durumunun hücre içi yollarda hücre siklusu, apoptoz ve nitrojen metabolizmasının düzenlenmesinde önemli olduğunu bildirmektedirler (103). Mutasyon tipine göre değişen fonksiyonları G12D ve G12V açısından tanımlamışlardır. G12V fenotipinin hücrenin apoptozdan kaçmasını ve interlökin-8 aracılıklı anjiyogenezi arttırıcı bir fonksiyon gördüğü ve daha agresif bir fenotip yarattığını söylemektedirler. Buna karşın G12D mutasyonunun apoptozu düzenleyen genleri etkilemeksizin hücre-hücre adhezyonunu ve kromatin organizasyonunu etkilediğini bildirmişlerdir.

G12D ve G12V mutasyon durumunu koregüle ettiği genler kanserle ilişkili biyolojik proseslerle oldukça yakın ilişkili bulunmuştur. G12V genotipinin wild type'e karşı hücre siklus aresti, apoptozis ve nitrojen metabolizmasını ilgilendiren hücre yollarında ekspresyon farklılığı yarattığı, buna karşın G12D fenotipinin biyogenez ve hücre iskelet organizasyonunu kontrol eden süreçlerde farklılandığı; G12D'nin G12V'ye göre immun sistem, sterol metabolizması ve steroid biosentesinin ekspresyonunun farklılandığını bildirmişlerdir. Bu çalışma tek bir gen mutasyonunun hücrenin diğer genetik sistemini etkileyerek tümör progresyonunu etkileyebileceğini göstermiştir. G12D ve G12V mutant RAS proteinleri, kanserde önemli bir yolak olan EGFR yolağında downstream proteinlerini farklı etkileyerek, tümör progresyonunu da farklılandırabilmektedirler.

Bu grubun yaptığı çalışmada G12V fenotipini daha agresif olarak tanımlamışlardır. Uçaryılmaz E.'nin 2006 tezinde G12D fenotipi daha agresif tanımlanmış ancak moleküler bir dayanak sunulmamıştır.

Costa ve Ark'ları tiroid karsinomunda, Oliveira ve ark'larının kolorektal karsinomalarda yaptıkları çalışmalarda da Monticone grubu ile benzer bir sonuca ulaşmışlardır (104-105).

Ihle N.T. ve ark'larının protein modelleme çalışmaları K-RAS mutasyonlarının oluşturduğu konformasyonel yapı değişikliklerini bildirmektedir. G12D mutasyonun fosfatidil inozitol-3-kinaz (PI3K) ve mitojen aktivated protein/ekstrasellüler signal regulated kinazkinaz (MEK) sinyal yolağını aktive ederken; G12C ve G12V

mutasyonlarının RaI (Ras Releated) sinyal yolağını aktive ettiği ve büyüme faktörü bağlı Akt aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir.

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar ve protein modelleme çalışmaları (106), mutant K-RAS proteinlerinin heterojen davranış modellerini kanıtlamaktadır. Buna bağlı olarak tümör spesifik mutant K-RAS proteinlerinin tümör davranışına ve sağaltım çıktılarının farklılığına yönelik klinik çalışmalar henüz bulunmamaktadır.

Çalışmamız agresif ve daha yavaş seyirli K-RAS mutasyon fenotiplerinin rektosigmoid ve kolon bölgelerinde farklı dağılım hızlarına sahip olduğunu göstermiştir. Bu olgularda tümör davranışı ve sağaltım çıktılarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte olgu sayımızın azlığı buna neden olmuş olabilir. Bu konuya odaklanan prospektif, iyi dizayn edilmiş ve daha fazla olgunun yer aldığı bir çalışmanın literatüre önemli katkısı olacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bizim olgu grubumuzda kolon ve rektosigmoid yerleşimli tümörler arasında K-RAS mutasyon durumu açısından istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı fark saptanmasa da, anatomik yerleşime göre tümörlerin moleküler karakteristiklerinin, buna bağlı olarak davranışlarının değiştiği bilinmektedir. Anatomik yerleşime göre değişebilen tümör karakteristikleri, anatomik yerleşime göre farklı ajanların kullanılmasını veya hastalık yönetiminin farklılanmasını beraberinde getirebilir. Yerleşim farkı gözetmeksizin aynı rejimlerin kullanılması, kanserin altında yatan moleküler değişikliklerle örtüşmeyebilir.

Bu çalışma bireyselleştirilmiş tıp yaklaşımı açısından yalnızca genetik mutasyonların değil protein modelleme ve protein-protein etkileşiminin tümör davranışı ve sağaltım çıktılarında önemli olduğunu göstermiştir.

Yeterli örneklem büyüklüğünde klinik çalışmalarla moleküler ve biyoinformatik düzeyde tartışılan bu bilgilerin hastaya yansımaları da araştırılmalıdır. Bu açıdan translasyonel bir çalışma modeline ihtiyaç bulunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. <http://www.kanser.gov.tr/index.php/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html>
Erişim Tarihi: 21.06.2013
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. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3:459-465.
6. Khosravi-far R, Der CJ. The Ras signal transduction pathway. *Cancer Metast Rev* 1994;13:67–89.
7. Van Krieken J. H. J. M, Jung A, Kirchner T, Carneiro F ve ark. *KRAS* mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch.* 2008; 453:417–431.
8. Plesec T.P, Hunt J.L. *KRAS* mutation testing in colorectal cancer. *Adv Anat Pathol* 2009; 16: 196-203.
9. Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003;21: 2787–99.
10. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5:341–54.
11. Lièvre A, Bachet J.B, Boige V, CayreA ve ark. *KRAS* mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J.Clin. Oncol* 2008; 26: 374-379.
12. Olah E. Basic concepts of cancer: genomic determination; 2005:[16(2)]
URL:<http://www.ifcc.org/ejifcc/vol16no2/160206200501.htm>
13. Lichtenstein, P, Holm N. V. Ve ark. 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.

14. Bertram, J. S. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* 2000; 21(6): 167-223.
15. Colorectal Cancer: The Diagnosis and Management of Colorectal Cancer. NICE Clinical Guidelines, No. 131. 2011 Nov. National Collaborating Centre for Cancer (UK). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK116638/pdf/TOC.pdf>
16. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012 ;62:10-29.
17. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1893-6.
18. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2013. URL: <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/allcancerfactsfigures/index>
19. <http://kanser.gov.tr/index.php/daire-faaliyetleri/kanser-kayitciligi/108-t%C3%BCrkiyede-kanser-kayitcigi.html>. Son erişim tarihi : 28.06.2013
20. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2010;60:277-81.
21. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999;49:33-8.
22. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1998;48:6-9
23. Lynn A.G.R, John L.Y.Jr, Gretchen E.K, Milton P.E ve ark. SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: U.S. SEER Program, 1988-2001, Patient and Tumor Characteristics. National Cancer Institute, SEER Program, NIH Pub. No. 07-6215, Bethesda, MD, 2007.
URL:http://seer.cancer.gov/publications/survival/seer_survival_mono_lowres.pdf
24. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html> Son erişim tarihi: 21.06.2013
25. Libutti S.K, Saltz L.B, ve ark., Tepper ancens of the Gastrointestinal Tract, Section 8. ‘Cancer of the Colon. In Devita, editors. Principles and Practice of Oncology. 7 th edition, Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins; 2005.p. 1061-1109.
26. Rustgi AK. Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med* 1994;331:1694-9
27. 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.

28. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, ve ark. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med.* 1993;329:1982-1987.
29. Narayan S, Roy D. Role of *APC* and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular Cancer* 2003, 2: 41
30. Büyükdoğan M. Kolorektal kanserlerde genetik ve etyolojik faktörler. *Selçuk Tıp Derg* 2009;25 (3):171-180
31. Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:1114-1125
32. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med.* 2003;138:560-570.
33. <http://www.kansergenetigi.com/tr/herediter-non-polipozis-kolorektal-kanser-hnpcc> Erişim tarihi 21.06.2013
34. Kalaycı G. Kolon Kanserleri, Genel Cerrahi. 2. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2002; 1343-1359.
35. 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 JMed.* 1994;331:1669-1674.
36. Ahsan H, Neugut A.I, Garbowski G.C, Jacobson J.S, ve ark. Family history of colorectal adenomatous polyps and increased risk for colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 1998 ;128:900-905.
37. <http://www.bowelandkeyholeclinic.com/article.asp?article=22> Erişim Tarihi 22.06.2013
38. Karlén P, Löfberg R, Broström O, Leijonmarck CE, ve ark. Increased risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol.* 1999 ;94:1047-1052.
39. 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.
40. 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.
41. Potter J.D. Nutrition and colorectal cancer. *Cancer Causes Control.* 1996; 7(1):127-46.
42. 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.

43. Wargovich MJ. New dietary anticarcinogens and prevention of gastrointestinal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1988;31:72-5.
44. 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.
45. Smalley W, Ray W.A, Daugherty J, Griffin M.R. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and incidence of colorectal cancer: a population-based study. *Arch Intern Med*. 1999;159:161-166.
46. Lü B, Xu J, Lai M, Zhang H, Chen J. A transcriptome anatomy of human colorectal cancers. *BMC Cancer*. 2006;6:40-47.
47. <http://www.edoctoronline.com/medical-atlas.asp?c=4&id=22136> son erişim tarihi 21.06.2013
48. Romolo J.L. Embryology and anatomy of the colon. *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract*, 1996;16:4-7
49. <http://www.ons.gov.uk/ons/search/index.html?newquery=cancer+registrations> son erişim tarihi 25.06.2013
50. Hassan C, Zullo A, Risio M, Rossini FP, ve ark. Histologic risk factors and clinical outcome in colorectal malignant polyp: a pooled-data analysis. *Dis Colon Rectum*. 2005;48:1588-1596
51. Kang H, O'Connell J.B, Maggard M.A, Sack J, ve ark. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum*. 2005;48:1161-1168
52. <http://www.proteinatlas.org/dictionary/cancer/colorectal+cancer+1> son erişim tarihi 22.06.2013
53. Steele G.D, Mayer R.J. Adenocarcinoma of the colon and rectum, In: Zuidema G.D, editors. *Surgery of the Alimentary Tract*, 4. Edition, St. Louis MO, WB Saunders Company, 1991, 118-132
54. Kodner I.J, Fry D.R., Fleshman J.W, Birnbaum E.H. Colon Rektum and Anus, *Diagnosis Schwartz Principles of Surgery* 1994; 2:1262-1264.
55. Scrock T.R. Colon and Rektum, Diagnostic Techniques, *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract*. 1996; 4: 23-38.
56. Malazgirt Z. *Kolon Kanseri Etiyolojisi Genel Cerrahi*, 1. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 1996, 371-372

57. <http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser/> Erişim Tarihi 22.06.2013
58. Bresailer R.S. Malignant and premalignant lesions of the colon, In: Friedman SL, McQuaid KR, Grendell JH., editors. Current diagnosis and treatment in gastroenterology, New York, McGraw Hill, 2003, 407-435.
59. Akdoğan Ö. Kolorektal Kanser ve Öncü Lezyonlarında KRAS ve BRAF Mutasyon analizleri Yoluyla Tanısal Yaklaşım ve Hedefe Yönelik Tedavi Seçimi, Ankara, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2011, 15-16.
60. Loeb, L. A, Christians F.C, Multiple mutations in human cancers. *Mutat Res* 1996;350(1): 279-286
61. Lynch J.P, Hoops T.C. The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2002;16:775-810
62. Garcea G, Sharma R.A, Dennison A, Steward W.P, ve ark. Molecular biomarkers of colorectal carcinogenesis and their role in surveillance and early intervention. *Eur J Cancer.* 2003;39:1041-1052.
63. Winawer S.J, Zauber A.G, O'Brien M.J, O'Brien MJ, ve ark. The National Polyp Study. Design, methods, and characteristics of patients with newly diagnosed polyps. The National Polyp Study Workgroup. *Cancer* 1992;70:1236-1241.
64. Vogelstein B, Kinzler K.W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004;10:789.
65. Rosai J. Large Bowel, Chapter 11, In: Rosai J, editors. *Ackerman's Surgical Pathology*, 8 th., St Louis: Mosby; 1996.p. 729-799.
66. Baskın Y. Kanseri tanı ve tedavisinde bireysel tıp uygulamaları. XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2011, Adana.
67. Uçaryılmaz E. Kolorektal Karsinomlarda Hatalı Eşleşme (Mismatch) Tamir Genleri MLH-1 ve MSH-2'nin Karsinogenezdeki Yeri ve Tümör Biyolojisi İle İlişkisi. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2006; 6-10.
68. Savaş B, Erinanç H, Perçinel S, Ensari A. Kolorektal Karsinogenez. *Güncel Gastroenteroloji* 2007; 11(1):27-33.
69. Wilson, R.H, Whiteside, M.C., Russell, S.E. Molecular genetics of colorectal. *Gastroenterology Clinics of North America* 1996; 25: 737-754

70. 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):535-541.
71. Zeng M, Kikuchi H, Pino MS, Chung DC. Hypoxia activates the K-ras proto-oncogene to stimulate angiogenesis and inhibit apoptosis in colon cancer cells. *PLoS One*. 2010;5:10966-9
72. Poehlmann A, Kuester D, Meyer F, Lippert H, ve ark. K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. *Pathol Res Pract*. 2007;203:489-497.
73. <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/> Son erişim tarihi 22.06.2013
74. Cox A.D., Der C.J.: Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment. *Biochem. Bioph. Acta*. 1997;1333: 51-71.
75. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000133703;r=12:27720158-27724772 Son erişim tarihi 28.06.2013
76. Er T.Z, Liu Y.Y, J Hwang J.K, Barrio M.J, ve ark. Computational Analysis of K-RAS Mutations: Implications for Different Effects on the K-RAS p.G12D and p.G13D Mutations *PLoS One*. 2013; 8(2): e55793. Published online 2013 February 20.
77. Akkiprik M. Kolorektal Kanserlerdeki Genetik Değişimlerin Klinik Önemi.Doktora Tezi. İstanbul, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2005, p.12-20.
78. Van Krieken JHJM, Jung A, K'rchner T, Carneiro F ve ark. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European 1. quality assurance program. *Virchows Arch*. 2008; 453: 417–431.
79. Tanaka H, Deng G, Matsuzaki K, Kakar S, ve ark. BRAF mutation, CpG island methylator phenotype and microsatellite instability occur more frequently and concordantly in mucinous than non-mucinous colorectal cancer. *Int J Cancer* 2006;118:2765-2769.
80. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418:934-939.
81. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002;296:1655-1659.

82. Li W, Zhu T, Guan KL. Transformation potential of Ras isoforms correlates with activation of phosphatidylinositol 3-kinase but not ERK. *J Biol Chem* 2004; 279: 398-402.
83. http://www.nature.com/onc/journal/v23/n18/fig_tab/1207546f2.html#figure-title Son erişim tarihi: 20.06.2013
84. Garcia-Foncillas J, Diaz-Rubio E. Progress in metastatic colorectal cancer: growing role of cetuximab to optimize clinical outcome. *Clin Transl Oncol*. 2010; 12:533-542.
85. Solilicres D, Greer W, Muglioeco AM, K-RAS mutation testing in the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR therapies. *Curr Oncol*. 2010; 17 (1): 31-40.
86. Kaptan B. Çukurova Bölgesinde kolorektal Kanserli Hastalarda K-RAS Mutasyonu Görülme Sıklığına Bakılarak Tedavide kullanılan İlaçlara Yönelik Prediktif Biomarkerlerin Tespitinin Önemi. Yüksek Lisans Tezi. Adana, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2010, 37-40.
87. Erdoğan Ö. Kolorektal kanser ve öncü lezyonlarında KRAS ve BRAF mutasyon analizleri yoluyla tanısal yaklaşım ve hedefe yönelik tedavi seçimi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 2011, 23-30.
88. Van Krieken, J. H., Jung A, 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): 417-431.
89. <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm151179.htm> Son erişim tarihi: 28.06.2013
90. Asghar, U., E. Hawkes, ve ark. Predictive and prognostic biomarkers for targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2010; 9(5): 274-281.
91. Patel D, Lahiji A, Patel S, Franklin M, ve ark. Monoclonal Antibody Cetuximab Binds to and Down-regulates Constitutively Activated Epidermal Growth Factor Receptor VIII on the Cell Surface. *Cancer Research*. 2007; 27: 3355-3366.
92. <http://www.colorectal-cancer.ca/en/treating-cancer/treatment-cancer/> Son erişim tarihi: 22.06.2013
93. Çalıbaşı G. Gastrointestinal stromal tümörlerde kit mutasyonlarının klinik önemi. Yüksek Lisans Tezi. İzmir, Dokuz Eylül üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2011.
94. http://books.google.com/books?id=OMoKGGG25aEC&pg=PA50&dq=real+time+pcr+and+oncology&hl=tr&ei=EERDTIugMJyU4gbHp6GHDg&sa=X&oi=book_result&

ct= result&resnum=2&ved=0CDIQ6AEwAQ#v=onepage&q&f=false Son Erişim Tarihi: 27.02.2013

95. Baskın Y, Çalıbaşı G. Temel Onkolojide Kullanılan Araştırma Yöntemleri Laboratuvar Eğitim, El Kitabı. 1. Baskı. İzmir, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları No:1. 2011

96. Okulczyk B., Kovalchuk O., Piotrowski Z., Myoeliwicz P. Ve ark. Clinical usefulness of K-RAS mutation detection in colorectal cancer and in surgical margins of the colon · Rocznik Akad Med Białymst. 2004; 49 Suppl 1: 52-54.

97. Liu X, Jakubowski M, Hunt JL. KRAS Gene Mutation in Colorectal Cancer Is Correlated With Increased Proliferation and Spontaneous Apoptosis. *American Journal of Clinical Pathology*. 2011; 135: 245-252.

98. Annie O.C., Amr S.S., Qing Zhang, ve ark. Differing DNA Methylation Patterns and Gene Mutation Frequencies in Colorectal Carcinomas from Middle Eastern Countries Clin Cancer Res 2005; 11: 8281-8287.

99. Okulczyk B, Piotrowski Z, Kovalchuk O, Nikliński J, ve ark. Evaluation of Kras gene in colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2003; 41(2): 97-100.

100. Martinez-Garza SG, Nunez-Salazar A, Calderon-Garciduenas AL, Bosques-Padilla FJ ve ark. Frequency and clinicopathology associations of K-ras mutations in colorectal cancer in a northeast Mexican population. *Dig Dis* 1999; 17(4): 225-229.

101. Andersen SN, Løvig T, Breivik J, Lund E, ve ark. K-ras mutations and prognosis in large-bowel carcinomas. *Scand J Gastroenterol*. 1997; 32(1): 62-69.

102. Birkenkamp-Demtroder K, Olesen S.H, Sorensen F.B, Laurberg S. Ve ark. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut*. 2005; 54: 374-384.

103. Monticone M, Biollo E, Maffei M, Donadini ve ark. Gene expression deregulation by KRAS G12D and G12V in a BRAF V600E context. *Molecular Cancer*. 2008; 7: 92.

104. Costa A.M, Herrero A, Fresno M.F, Heymann J, ve ark. BRAF mutation associated with other genetic events identifies a subset of aggressive papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 68: 618–634.

105. Oliveira C, Velho S, Moutinho C, Ferreira A, ve ark. KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene*. 2007; 26: 158–163.

106. Alyürük H, Çalıbaşı G, Cavas L, Baskın Y, ve ark. Protein modelling of a novel KIT mutation (N567Y) in the gastrointestinal stromal tumour. *European Journal of Cancer*. 2013; 49: 2449-2452.

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/37-08	Tarih: 24.11.2011
	Doç.Dr.Yasemin BASKIN'ın sorumlusu olduğu "Ege Bölgesi Rektosigmoid Kanselerinde Dominant K-Ras Mutasyon Tipinin Belirlenmesi, İlgili Mutasyonların Protein Fonksiyonu ve İlaç Yanıtlarına Etkisi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmannın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyî Klinik Uygulamaları Kılavuzu
----------------------	---

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Banu</i>
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Besti</i>
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Osman</i>
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Mehtap</i>
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Nejat</i>
Prof.Dr.Adnan MENDERES	Plastik Cerrahi	DEU Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Adnan</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Kongrelerde</i>
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Hüseyin</i>
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Servet</i>
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>M.Ömür</i>
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Ayşe</i>
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>İşıl</i>
Prof.PhD.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Katılmadı</i>
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>İhsan</i>

ÖZGEÇMİŞ

YUSUF KAĞAN DAĞDEVİREN

Yazışma Adresi: 34.sok. No:85 Gül Apt. Daire:4 Güzelyalı – İZMİR

Tel: 0 505 52 52 52 0

E-Mail: dagdeviren.kagan@gmail.com

Eğitim:

- 1992-1994 İzmir Karataş Lisesi
1995-2001 Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
2002-2005 Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Nükleer Tıp Yüksek Lisans Programı
2009- 2011 Eskişehir Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Sağlık Kurumları İşletmeciliği Önlisans Programı
2010- 2013 Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Yüksek Lisans Programı
2012 Eskişehir Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme Lisans Programı

İş Deneyimleri:

- 2001 Alsancak Çağın Eczanesi – *Yardımcı Eczacı*
2002 – 2003 Dokuz Eylül Üniversitesi Hastane Eczanesi – *Eczacı*
2003 – 2005 Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü – *Araştırma Görevlisi*
2006 Sağlık Bakanlığı Emekli Sandığı İzmir İl Müdürlüğü – *Eczacı*
2007- (...) Dokuz Eylül Üniversitesi Hastane Eczanesi – *Uzman Eczacı*

Yönetim Deneyimleri:

- Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Başeczacı Yrd. (2007-2012)
- Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Başeczacı (2012-2013)
- Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Akıllı İlaç Sistemleri Koordinatörü (2013-.....)

Yüksek Lisans Tez Çalışması:

- Radyoaktif İşaretli Manyetik Partiküllerin Manyetik Alan İle Yönlendirilmesi
(Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar Proje Desteği)
- Ege Bölgesi Rektosigmoid Kansерlerinde Dominant Kras Mutasyon Tipinin Belirlenmesi,
İlgili Mutasyonların Protein Foksiyonu ve Yanıtlarına Etkisi
(Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar Proje Desteği)

Araştırmacı Olarak Görev Aldığı Klinik Çalışmalar:

- Rezekte Edilemeyen veya Metastatik Hepatosellüler Karsinomlu Yetişkin Hastalarda MEDI-573 ve Sorafenib Kombinasyonunu tek başına Sorafenib Tedavisiyle Karşılaştırılan Bir Faz 1b/2, açık etiketli, randomize çalışma. (DEÜ, 2011)
- Daha önce metastatik hastalık için tedavi almamış HER2 pozitif metastatik gastrik ya da gastroözofageal bileşke adenokarsinomu olan hastalarda birinci basamak tedavi olarak, her ikisi de sisplatin / kapesitabin kemoterapisiyle kombine olarak iki trastuzumab doz rejiminin karşılaştırıldığı randomize, açık etiketli, çok merkezli Faz IIIb çalışma (DEÜ, 2012)
- Pediyatrik Hastalarda Kemoterapi ile İndüklenen Bulantı ve Kusmanın (CINV) Önlenmesi için Aprepitantin Etkililik ve güvenliliğinin İncelenmesine Yönelik, Merkez İçinde Körleme Koşulları Altında Yürütölen, Randomize, Çift Kör, Aktif Karşılaştırıcı-Kontrollü bir Faz III Klinik Çalışma (DEÜ, 2012)

Aldığı Ödüller:

- **Prof.Dr. Suphi Altunkal Nükleer Tıp Bilim Ödülü:**
Sentinel Lenf Düşümü Çalışmasında Yeni Bir Yöntem
(8th International Nuclear Oncology Congress – İstanbul 2008)
- **VI.Dokuz Eylül Üniversitesi Özel çalışma Modülü Sempozyumu Poster Birincilik Ödülü:**
Farkında mısınız? Kansер geliyorum der: Deri kanseri
(VI.Dokuz Eylül Üniversitesi Özel çalışma Modülü Sempozyumu – İzmir 2012)

Yayınları:

- Radioiodinated Magnetic Targeted Carriers (¹³¹I-MTC)

(K.Dağdeviren , P.Ünak, R.Bekiş etc)

Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Vol. 273 number 3 /sep 2007; p:635-639)

- An Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of DNA Damage Caused by Radioactive Iodine and Technetium

(P.Kara, K.Dağdeviren, M.Özsöz)

Turkish Journal of Chemistry Volume 31, Issue 3 (2007) p:243-249

- Radioiodinated Magnetic Targeted Carriers

(Kağan Dağdeviren, Perihan Unak, Recep Bekis, F. Zümrüt Biber, Turkan Ertay, Özden Ulker, Hatice Durak)

1st-INCC, 1st International Nuclear Chemistry Congress, Abstract Book p. 373, 22-29 May 2005

- Radioiodinated Magnetic Targeted Carriers (I-131-MTC)

(K. Dağdeviren, P. Unak, R. Bekis, F. Z. Biber, O. Ulker, T. Ertay, H. Durak)

European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, - Abstracts Annual Congress of the EANM İstanbul, 314, Volume 32, Supplement 1, September, Turkey, 2005

- Sentinel Lenf Düğümü Saptanmasında Yeni Bir Yöntem

(Recep Bekiş, İlker Medine, Kağan Dağdeviren, Türkan Ertay, Perihan Unak)

Turkish Journal of Nuclear Medicine, 17, 1, 49, No:22, 2008

Bildiriler:

- İnciraltı Kampüsü'nde Çalışan Hekimlerde Bilgisayar ve İstatistik Programı Kullanım Sıklığı

(Çalıbaşı G, Aytay AB, Otlu B, Çınar NB, Altay ÖC, Amirfallah A, Dağdeviren YK, Açıkgöz A, Aktaş S, Baskın Y, Ellidokuz H)

VI. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu, DEÜ Tıp Fakültesi – İzmir, 2012

- Farkında mısınız? Kanseri geliyor der: Deri kanseri

(Çalıbaşı G, Şahin AS, Acar İ, Takmet M, Salim O, Türk S, Amirfallah A, Dağdeviren YK, Açıkgöz A, Aktaş S, Baskın Y, Ellidokuz H)

VI. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu, DEÜ Tıp Fakültesi – İzmir, 2012

- Tıp ve Biyoinformatik

(Çalibaşı G, Ulgen A, Yazkan A, Sever D, Erkol EE, Derin E, Boyer E, Amirfallah A, Dağdeviren YK, Ellidokuz H, Baskın Y)

VI. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu, DEÜ Tıp Fakültesi – İzmir, 2012

- Elektromanyetik Alanlar ve Kanser

(Amirfallah A, Selçuk B, Daşdemir G, Yıldız MN, Duman M, Kantarcı S, Çalibaşı G, Dağdeviren YK, Baskın Y, Ellidokuz H)

VI. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu, DEÜ Tıp Fakültesi – İzmir, 2012

- Kanser Tedavisinde Çoklu İlaç Direnci

(Amirfallah A, Çalibaşı G, Dağdeviren YK, Baskın Y)

1.Ulusal Kamu Eczacıları Kongresi – Antalya ,2012

- Araştırma Makalesi Nasıl Yazılır?

(Baskın Y, Çalibaşı G, Amirfallah A, Dağdeviren YK)

1.Ulusal Kamu Eczacıları Kongresi – Antalya ,2012

- The Dose-dependent Variable Effects of Carvacrol on the Cell Proliferation

(Türkan Yiğitbaşı, Baskın Y, Çalibaşı G, Arsalan Amirfallah, Dağdeviren YK, Gazi Yiğitbaşı)

IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu – Bursa, 2012

Bilimsel Oral Sunumları:

- DMSA stabilitesinin Zamana Bağlı Değişimi

I.Uluslararası Radyofarmasi Kongresi, İstanbul (Ekim 2004)

- İyot İşaretli Manyetik Partikül Elde Edilmesi

Nükleer Tıp Sempozyumu, Ankara (Mayıs 2005)

Teknesyum İle Oluşturulan DNA Hasarının DNA Biyosensör Yöntemle Tespiti

Nükleer Tıp Sempozyumu, Ankara (Mayıs 2005)

- Radioiodinated Magneted Targeted Carriers

1st International Nuclear Chemistry Congress, Kuşadası (Mayıs 2005)

- Radioiodinated Magnetic Targeted Carriers (I-131-MTC)

EANM'05 Annual congress of the European Association of Nuclear Medicine , Istanbul (Ekim 2005)

Sunum Olmuş Bilimsel Çalışmaları:

- Electrochemical Biosensor For The Detection Of Dna Damage By Radioactive Iodine And Technetium

XVIII th International Symposium on Bioelectrochemistry and bioenergetics 3rd spring meeting
Coubra Portugal (June 2005)

- A New Agent for Sentinel Lymph Node Detection

EANM'08 Annual congress of the European Association of Nuclear Medicine , Berlin Germany (October 2005)

Verdiği Seminerler:

- **Nükleer Tıp Radyofarmasi Uygulamaları**, 2004, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü

- **Gama Kameralar ve Çalışma Prensipleri**, 2004, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü

- **Radyofarmasötiklerin Tutulum Mekanizmaları**, 2004, Dokuz Eylül Üniversitesi Nükleer Tıp A.D.

- **Tedavi Amaçlı kullanılan Radyofarmasötiklerin Etki Mekanizmaları**, 2004, Dokuz Eylül Üniversitesi Nükleer Tıp A.D.

- **Farmakolojik Stres Ajanları**, 2005, Dokuz Eylül Üniversitesi Nükleer Tıp A.D.

- **Personal Dozimetri**, 2005, Dokuz Eylül Üniversitesi Nükleer Tıp A.D.

- **Hastane Eczacılığı Uygulamaları**, 2009, 2010, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Asistan Eğitimi Seminerleri
- **Tek Gen Hastalıkları: Osteogenesis Imperfecta**, 2010, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.
- **Serbest Oksijen Radikalleri ve Kanserle İlişkisi**, 2011, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü
- **Nükleer Tıp ve PET Uygulamaları**, 2011, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü
- **Nükleer Tıp ve Tedavide Nükleer Onkoloji**, 2012, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü
- **Karsinogenesis**, 2012, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü

Katıldığı Sempozyum ve Seminerler

- **II. Uluslar arası Moleküler Tanı ve Uygulamaları Sempozyumu**, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 10-14 Mayıs 2004
- **İnsan Genom Projesi Sempozyumu**, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
- **Ulusal Toksikoloji ve Klinik Toksikoloji Sempozyumu** Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 8-9 Mayıs 2003
- **XVI. Ulusal Nükleer Tıp Kongresi**, Samsun, 10-14 Mayıs 2003
- **XVII. Ulusal Nükleer Tıp Kongresi**, Çeşme, Mayıs 2004
- **HPLC ve Diğer Separasyon Teknikleri Ulusal Sempozyumu**, GATA Ankara , 25-27 Mayıs 2003
- **Nükleer Tıp Sempozyumu**, Ankara, 30Nisan-3 Mayıs 2005
- **Uluslararası Avrupa Nükleer Tıp kongresi**, İstanbul, Ekim 2005

- **2. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp kongresi**, Çeşme, 11-13 Şubat 2011

- **6th Orpheus Organization For PhD Education In Biomedicine And Health Sciences**, İzmir, 27-30 Nisan 2011

- **3. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp kongresi**, Denizli, 2012

Katıldığı Kurslar ve Sertifikalar

- **DEXA uygulamaları ve Osteoporoz** Kursu, Samsun, 13 Mayıs 2003

- **Teknologlar İçin PET Kursu**, Ankara, Mayıs 2005

- **Akım Sitometri Kursu**, Çeşme, 10 Şubat 2011

- **Deney Hayvanları Kullanımı Sertifikası**, İzmir, 30 Mart 2011

- **Preteomik: Temel Bilgiler ve Uygulama Örnekleri Katılım Sertifikası**, İzmir, 4 Mayıs 2011

- **İyi Klinik Uygulamalar (İKU) Sertifikası**, Roche - Investigator Module of the Roche Good Clinical Practice course , 28th May 2012

Bağlı Olduğu Dernekler:

- Türkiye Nükleer Tıp Derneği

- Türkiye Kamu Eczacıları Derneği (TUKED)

