

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

SPORADİK KOLOREKTAL KANSERLERDE
MİKROSATELLİT İNSTABİLİTE

Dr.SERKAN YARAŞ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr.HİKMET AKKIZ

ADANA - 2005

TEŐEKKÖR

Tez çalıőmamda ve uzmanlık eđitimi boyunca bana yol gősterici ve destek olan deđerli hocam Prof. Dr. Hikmet AKKIZ'a, tezimin yűrűmesi sırasında bana destek olan Gastroenteroloji Bilim Dalı çalıőanlarına teőekkűr ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	III
KISALTMA LİSTESİ	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Kolorektal Kanser	3
2.1.1.Kolon ve Rektum Kanserinde Çevresel Faktörlerin Rolü	3
2.1.2.Familyal Kolon Kanseri	3
2.1.3.Kolorektal Kansere Predispozisyon Yapan Faktörler	4
2.1.4.Patoloji	4
2.1.5.Histoloji	5
2.1.6.Evrelendirme	5
2.1.7.Klinik Belirtiler	6
2.1.8.Tanı ve Tarama	6
2.1.9.Tedavi	6
2.2.Kolorektal Kanser Patogenezi	6
2.2.1.Kromozomal İnstabilite Yolağı	8
2.2.2.Mikrosatellit İnstabilite Yolağı	10
2.2.3.Mikrosatellit İnstabilitenin Prognoza Etkisi	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	14
4.BULGULAR	18
5.TARTIŞMA	22
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	27
7.KAYNAKLAR	28
8.ÖZGEÇMİŞ	31

TABLO LiSTESi

Tablo 1. Mikrosatellit instabil ve stabil gruplarda cinsiyet dağılımlı.(sayfa 18)

Tablo 2. Mikrosatellit stabil ve instabil grupların yaş ortalamaları (sayfa 19)

Tablo 3.Mikrosatellit instabilite durumuna göre olguların proksimal ve Distal kolon tutulumlarının karşılaştırılması. (sayfa 19)

Tablo 4.Mikrosatellit instabil olgularla Mikrosatellit stabil olguların diferansiasyonlarının karşılaştırılması (sayfa 20)

Tablo 5.Dukes evrelendirmesine göre mikrosatellit instabil ve stabil grubun karşılaştırılması (sayfa 20)

KISALTMA LİSTESİ

APC geni: Adenomatöz poliposis koli geni

DCC (Deleted in colon cancer) : Kolon kanserlerinde detasyona uğrayan gen

5-FU: 5 florourasil

HNPCC : Herediter non poliposis kolorektal kanser

IGLF (Insulin like growth factor) : İnsülin benzeri büyüme faktörü

MMR: mismatch onarım sistemi

MSİ : Mikrosatellit instabilite

MSİ – H : Yüksek seviyede mikrosatellit instabilite

MSİ – L : Düşük seviyede mikrosatellit instabilite

MSS : mikrosatellit stabilite

TGF – β IR : Transforming growth faktör beta-2 reseptörü

ÖZET

Mikrosatellit instabilite sporadik kolon kanserlerinin yaklaşık %15'inde gözlenen bir genetik yolaktır. DNA mismatch (hatalı eşleşme) onarım sistemindeki defektlerden dolayı oluşmaktadır . DNA mismatch onarım sistemi hatalı olan kişilerde mikrosatellit instabilite oluşmakta ve mutasyon riski artmaktadır. Tümör süpresör genlerinde oluşan bu mutasyonlar kolorektal kanser gelişimine yol açmaktadır.Mikrosatellit instabilite en sık proksimal kolon kanserlerinde saptanmaktadır.

Kanser dokularında mikrosatellit instabilite PCR yöntemi ile saptanabilmektedir.

Bu tez çalışmasında, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde tanı almış kolorektal kanserli 50 hastadan elde edilen kanserli parafin doku örneklerinde mikrosatellit instabilite aranmıştır. Örneklerden 20'sinde (%40) mikrosatellit instabilite saptanmıştır. Bu 20 olguyla mikrosatellit instabilite saptanmayan 30 olgu karşılaştırılmıştır. Mikrosatellit instabil 20 olguda, tümörlerin mikrosatellit instabil olmayan olgulardan daha sık oranda proksimal kolonda yerleştiği saptanmıştır (%40'a karşılık %13,3). Bu bulgumuz literatür ile uyumludur. Mikrosatellit instabil grupta tanı olma yaşı stabil grupla karşılaştırıldığında bu hastaların daha erken yaşta tanı aldıkları saptanmıştır. (52,2'ye karşılık 61,97 yaş). Bu bulgumuz literatür ile uyumlu değildir. Mikrosatellit instabil kolorektal kanserli hastalarda prognozun instabil olmayanlara göre daha iyi olduğu öne sürülmektedir. Bu tez çalışmasında her iki grup arasında anlamlı sağkalım farkı saptanmamıştır.

Mikrosatellit instabilitenin prognoza etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha büyük sayıda hasta popülasyonlarıyla çalışmalar yapılmasının daha güvenilir sonuçlar vereceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Kolorektal Kanser , Mikrosatellit İnstabilite , Sağkalım

ABSTRACT

Microsatellite Instability is a genetic pathway found about 15 % of sporadic colorectal cancers. Microsatellite Instability arises from the defects in the DNA mismatch repair system (MMR).

In the population with defected DNA mismatch repair system (MMR), microsatellite instability and the risk for mutations increases. These mutations in tumour suppressor genes leads to the development of colorectal cancer. Microsatellite instability can be demonstrated in cancer tissues by PCR (Polymerase Chain Reaction)

Microsatellite Instability has been detected mostly in proximal colon tumours and has been suggested as a good prognostic indicator in colorectal cancer.

We have investigated microsatellite instability in cancer tissues obtained from patients with colorectal cancer, at the hospital of Çukurova University Faculty of Medicine between 2000-2003. Among the total 50 samples, 20 were found to have microsatellite instability. These 20 patients were compared to other 30 patients whose tumours showing no microsatellite instability.

In microsatellite instable group, lesions are detected more frequently in proximal colon than that of microsatellite stable group.(40% versus 13,3%, respectively). This observation was compatible with the data in the literature.

These two groups were also compared about the age at diagnosis. Microsatellite instability group found to be at a younger age at diagnosis than microsatellite stable group (52,2 years versus 61,97 years, respectively).

We found no survival time differences between these two groups of patients with colorectal cancer.

For more reliable results, further studies with larger populations of patients should be designed to investigate the effect of microsatellite instability on development of colorectal cancer.

Keywords: Colorectal Cancer, Microsatellite Instability, Survival.

1.GİRİŞ

Kolorektal kanserler dünya genelinde en sık görülen ikinci kanser olması ve kanser kaynaklı ölümler sıralamasında üçüncü sırada yer alması nedeniyle önemli bir sağlık problemidir.¹

Gelişmiş ülkeler kolorektal kanser açısından en yüksek insidansa sahiptir.Kolon kanserleri daha sık oranda splenik fleksuranın distalinde (%60) yerleşim gösterirler.²

Kolorektal kanserli hastalarda prognozun en güçlü belirleyicisi tümörün evresidir.³ Kolorektal kanserin tedavisinde en yaygın kemoterapötik ajan 5- FloroUrasildir (5-FU).⁴

Proksimal ve distal kolon kanserlerinin gelişmesinde farklı genetik mekanizmalar rol oynamaktadır.⁵ Kolorektal kansere yol açan moleküler genetik değişiklikler hakkında geçen 10 yılda oldukça önemli gelişmeler olmuştur. Bu gelişmelere rağmen bilgiler klinik uygulamalara, özellikle yönetime yeterince yansımamıştır.

Günümüzde bütün kanserlerin, genetik değişikliklerin birikimlerinin sonucunda ortaya çıktığı konusunda yaygın bir düşünce vardır.⁶

Kolorektal kanser gelişiminin kromozomal instabilite veya mikrosatellit instabilite şeklinde adlandırılan 2 farklı mutasyonel yolak üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir.⁶

Kromozomal instabilite kanserlerin çoğunda tanımlanan bir özelliktir.Tüm kolorektal kanserlerin yaklaşık %80-%85'inin oluşumundan sorumlu genetik sebeptir.Kromozomal instabilite kavramında, hücre bölünmesi sırasında bütün kromozomun veya kromozomların büyük fraksiyonlarının kaybı veya kazanımı söz konusudur.Kromozomal instabilite fenomeninde her hücre başına düşen kromozom sayısında dengesizlik (anöploidi) ve allel kaybında artış söz konusudur.⁷

Mikrosatellit instabilite, çoğu organa ait tümörde bulunabilir, fakat en çok kolon kanserinde etkili olduğu düşünülmektedir.⁸ Mikrosatellit instabilite, tüm insan genomunda yaklaşık yarım milyon civarında bulunan mikrosatellit tekrarlarla ilişkilidir. Mikrosatellit bölgeler 1 ile 5 DNA bazı uzunluğunda kısa DNA tekrarlarıdır. DNA replikasyonu sırasında DNA polimeraz enziminin mikrosatellit bölgelerde DNA dizisi üzerinde kayması nedeniyle, bu bölgeler mutasyonlar açısından artmış riske sahiptirler.Bu mutasyonlar,TGBF-RII, ILGF,E2F4 ve BAX gibi mikrosatellit bölgeler içeren tümör gelişiminde önemli olan genlere ait mutasyonlardır.⁹ Mikrosatellit instabilite, kolorektal kanserlerin %15-20'sinin gelişiminde etkilidir.¹⁰ Yüksek sıklıkta mikrosatellit instabilite taşıyan kolon kanserleri ,mikrosatellit stabil olanlardan farklı klinik ve patolojik özelliklere sahiptirler.¹¹ Mikrosatellit instabilite kolorektal kanserlerde olumlu prognostik faktör

olarak tanımlanmıştır.¹²

Bu teze konu olan araştırmada 2000-2003 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hastanesinde tanı almış, cerrahi ve medikal tedavi (kemoterapi) uygulanmış olan 50 hastadan elde edilen tümörlü dokularda mikrosatellit instabilite araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 KOLOREKTAL KANSER

Kolorektal kanserin insidansı toplumdan topluma değişmekte olup gelişmiş ülkeler en yüksek insidansa sahiptir.Bu farklılık büyük bir olasılıkla diyet özelliklerini de içine alan çevresel faktörlere dayanmaktadır.² Kolon kanserlerinin yaklaşık %40'ı splenik fleksuranın proksimalinden, %60'ı distalinden köken almaktadır.²

2.1.1Kolon ve Rektum Kanselerinde Çevresel Faktörlerin Rolü

Kolorektal kanser gelişiminde, yüksek oranda yağ içeren diyetin etkili olduğu kanıtlanmıştır.² Liften zengin diyetin kolorektal kanser gelişimine karşı koruyucu özelliği öne sürülmektedir. Diyetle alınan selenyum yetersizliği, kolon bakterilerince üretilen fekapentenler ve heterosiklik aminler olasılıkla kolon kanseri riskini arttırmaktadır.²

Yüksek lifli diyet dışında, fiziksel aktivitelerin, düşük vücut kitle indeksinin, non-steroid antiinflamatuvar ilaçların ve kalsiyumun riski azaltabileceği öne sürülmüştür.² Sarıyeşil sebzeler, karoten içeren gıdalar, C ve E vitaminleri ve östrojen replasman tedavisi kolorektal kanser için diğer olası koruyucu faktörlerdir.²

2.1.2.Familyal Kolon Kanseri

Familyal adenomatöz polipozis (FAP) ve Gardner sendromu otozomal dominant geçişli olup yüzlerce-binlerce prekanseröz kolon adenomları ve kolon dışı tümörlerle karakterizedir. Kolektomi yapılmazsa bu lezyonlar kansere ilerlemektedir. Kalıtsal kanserlerin bu formları toplam kolorektal kanserlerin %1'inden azını oluşturur.²

Herediter Non Polipozis Kolorektal Kanser Sendromu (HNPCC) da kalıtsal bir hastalık olup, polipozis olmaksızın tek adenomlardan köken alır. Kolon kanserlerinin yaklaşık %6'sını oluşturur.(2) HNPCC de otozomal dominant yolla geçen bir hastalık olup DNA mismatch onarım genlerindeki germline mutasyonlardan dolayı ortaya çıkmaktadır. DNA replikasyonu sırasında DNA polimeraz tek baz-çiftlik yanlış eşleşmeler yapabilir ve böylece DNA'da yapısal anormallikler gelişir. Bu değişiklikler mikrosatellit adı verilen tekrarlayıcı DNA dizilerinde lokalize olmaya eğilimlidir. Bu hatalar mismatch (hatalı eşleştirme) onarım genlerince kodlanan enzimler tarafından onarılır.² HNPCC'de en sık germline mutasyona uğrayan mismatch onarım genleri, ikinci kromozomdaki hMSH2 ve 3.kromozomdaki hMLH1'dir.¹³ HNPCC, kolonun proksimal kısmında yerleşme eğilimli, çok sayıda primer malignansinin bir arada olması (senkron veya metakron) ve müsinoz

karsinomların sık görülmesi ile karakterizedir. HNPCC'de görülen kolorektal kanserler genellikle 40-50 yaşlarında, genel populasyondaki kolorektal kanserin beklendiği yaştan 2 dekad erken ortaya çıkmaktadır.²

2.1.3.Kolorektal Kansere Predispozisyon Yapan Faktörler

Diyet ve diğer çevresel faktörler dışında kolorektal kanser için predispozisyon yapan diğer faktörler, yaş, kolorektal adenom ve karsinom öyküsü, inflamatuvar barsak hastalıkları başta olmak üzere predispozan hastalıklar ve aile öyküsüdür.²

Kolorektal kanser riski genel populasyonda 40 yaşın üzerinde hızlı bir artış göstermektedir. Hastaların %90'ı 50 yaş üzerindedir. Sporadik kolorektal kanserler için 3 ve 4. dekadlarda insidans artışı olmakla birlikte eğer aile öyküsü de mevcutsa herediter formlar akla getirilmelidir.²

Kolorektal kanserlerin çoğunluğu önceden bulunan adenomlardan köken alır. Adenom sayısı arttıkça kanser riski artmaktadır. Klinik ve morfolojik kanıtlar, adenomların büyüdükçe diferansiasyonlarının azaldığını, displastik hale geldiklerini ve daha sonra malign karakter kazandıklarını göstermektedir. Boyutun büyümesi veya villöz yapıların artmasıyla nükleer atipi sıklığı, displazi artmakta ve in situ veya invaziv karsinom gelişmektedir.²

Kolorektal kanserli hastalar, ikinci bir karsinom (senkron karsinom) veya gelişmekte olan ve sonradan belirti verecek karsinom (metakron karsinom) için artmış riske sahiptirler.²

Birinci derece yakınlarında kolorektal kanser öyküsü olan kişilerde kolorektal kanser riski 2-3 kat artmıştır.Yakınlarında erken yaşta kanser gelişmiş olan veya birden fazla yakınında kanser gelişmiş olan kişilerde bu risk daha da yüksektir.²

İdiopatik inflamatuvar barsak hastalığı (ülseratif kolit, Crohn hastalığı) olan kişilerde kolon kanseri gelişme riski artmıştır. Özellikle ülseratif kolitte bu risk hastalık süresine bağlı olup, ülseratif kolit başlangıcından 7 yıl sonra ortaya çıkar.²

2.1.4.Patoloji

Kolon adenokarsinomunun morfolojik özellikleri tümörün köken aldığı bölgeye göre değişir.Proksimal kolonda yerleşen karsinomlar iri yapılı ve polipoid olmaya ve daha fazla nekroz alanı içermeye eğilimlidir. Distal kolondaki kanserler annüler yapıda olup barsak duvarını sarmaya eğilimlidir.²

2.1.5.Histoloji

Kolon karsinomları karakteristik olarak adenokarsinomlardır, orta veya iyi differansiye bezler oluştururlar ve değişken oranda müsin salgırlarlar. Müsinoz karsinomlar HNPCC'de, ülseratif kolitli hastalarda ve erken yaşta başlayan kanserlerde en sık görülür. Adenokarsinom dışında anorektal bileşkede skuamöz, kloajenik veya transisyonel hücreli karsinomlar, melanomlar ve çok daha nadir olmak üzere primer lenfomalar ve karsinoid tümörler saptanabilir. Hepsi birden tüm kolon kanserlerinin %5'inden azını oluştururlar. ²

2.1.6.Evrelendirme

Modifiye Dukes Sınıflandırması

A: Mukozaya sınırlı tümör

B1:Muskularis mukozaya kadar ilerlemiş fakat muskularis mukozayı invaze etmeyen tümör.

B2: Muskularis mukozayı invaze etmiş fakat lenf nodu tutulumu olmayan tümör

C:Bölgesel lenf nodu tutulumu yapan tümör

D: Uzak metastaz varlığı.

TNM Sınıflandırılması

Evre0: karsinoma insitu, intraepitelyal tümör veya lamina propriayı invaze eden tümör (TisN0M0).

Evre1: Submukozayı invaze eden tümör (T1N0M0) Dukes A.

Muskularis mukozayı invaze eden tümör (T2N0M0)

Evre2: Muskularis propriayı aşarak subserozayı veya non-peritonealize perikolik veya perirektal dokuları invaze eden tümör (T3N0M0)Dukes B

Viseral peritonu perfora eden olan tümör(T4N0M0)

Evre3: Bağırsak duvarının herhangi bir derinlikte perforasyonu ile birlikte bölgesel lenf nodu metastazı

N1: 1-3 sayıda bölgesel lenf nodu metastazı.

N2: 4 yada daha fazla bölgesel lenf nodu metastazı;

TxN1M0(Dukes C)

TxN2M0

Evre4: bağırsak duvarının herhangi bir derinlikte perforasyonu ve lenf nodu tutulumunun olması veya olmamasıyla birlikte metastaz varlığı (TxNxM1)

2.1.7.Klinik Belirtiler

Proksimal kolon kanserleri genellikle belirtiler ortaya çıkmadan önce büyük boyuta ulaşırlar. Halsizlik, nefes darlığı, anjina gibi mikrositer hipokromik anemi bulguları, sağ kolon tümörlerinin temel belirtileri olabilir. Çekumun geniş çapından dolayı sağ kolon kanserleri nadiren obstrüksiyonuna yol açarlar. ²

Proksimal kolondan daha dar bir lümene sahip olan sol kolonda, lezyonun genellikle sirküferans yapıda olması nedeniyle, tümörler, obstrüktif belirtilerle ortaya çıkarlar.

Distal lezyonlarda hemotokezya, proksimal lezyonlardan daha sık görülür. ²

2.1.8.Tanı ve Tarama

Kolorektal kanser şüphesi durumunda endoskopik veya radyolojik değerlendirme uygulanmalıdır.Bu açıdan kolonoskopi, kolon grafisinden doğruluk bakımından (özellikle 1cm çapından küçük tümörlerde) üstündür. ²

2.1.9.Tedavi

a)Cerrahi Tedavi

Cerrahi rezeksiyon kolorektal kanserlerin çoğunda tercih edilen tedavi seçeneğidir. Cerrahinin hedefi, tutulan bağırsak segmentinin lenfatik damarları ile birlikte geniş rezeksiyonudur.Cerrahi rezeksiyon sonrası rekürrens serozal penetrasyonlu hastalarda sık olması ve metakroz lezyon ihtimali nedeniyle düzenli aralıklarla öykü, fizik muayene ve CEA düzeyleriyle takip önerilmektedir. ²

b)Kemoterapi

5 floro-urasil (5- FU) ile lökoverin kombinasyonunun postoperatif dönemde 6 ay süreyle uygulanması standart tedavi olarak düşünülmektedir. ²

Evre 3 (Dukes C) olgularda kesinlikle önerilirken, evre 2 (Dukes B) lenf nodu tutulumu olmayan olgularda adjuvan kemoterapinin gerekliliği tartışılmalıdır..Mevcut sistemle kemoterapinin ileri evre kolorektal kanser tedavisindeki sonuçları başarısız olmuştur. Floroprimidinler (5-FU, 5-florodeoksiüridin), nitrozürelere ve mitomisin-C bu hastalarda kullanılabilir. Rekürrens açısından riskli rektal ve rektosigmoid kanserlerde (Dukes B2 ve C lezyonlar) preoperatif ve /veya postoperatif radyoterapi lokal rekürrensi azaltmaktadır. ²

2.2.Kolorektal Kanser Patogenezi

Kolorektal kanser, çevresel faktörlerin de gelişimine katkıda bulunduğu bir genetik hastalıktır. Genetik düzeydeki değişiklikler, normal kolon hücresinin büyüme özelliklerini değiştirir, uygun olmayan büyüme ve transformasyona yol açarlar. Herediter Non Polipozis

Kolorektal Kanser Sendromunda (HNPCC) DNA mismatch onarım genlerinde bir allelde germline mutasyon, diğer allelde somatik mutasyon olur. Familial Adenomatöz Polipoziste APC geninde germline inaktivasyon olur. Sporadik kolorektal kanserde tümör baskılayıcı genin her iki alleli de somatik olarak inaktive olur. ¹⁴

Normal kolon mukozasında, yüzey epitelinin tümünün yenilenmesi, kript hücrelerinin proliferasyonu ve diferansiasyonu ile 4-7 günde gerçekleşir. Kolon kriptlerinin alt 1/3 kısmı mitozun olduğu proliferasyon bölgesidir. Prolifere olan hücreler, kript lümeni boyunca yüzeye doğru ilerledikçe matürasyona uğrarlar ve bölünme yeteneklerini kaybederler. Sonuçta hücreler apoptoza uğrarlar ve lümeneye dökülürler. Adenomatöz poliplerde kriptlerdeki düzen değişmiştir. Bütün kript lümeni boyunca hücreler diferansiasyon olmaksızın sürekli hücre proliferasyonu söz konusudur. Bu durum, yüzey hücrelerin sayısında artışa yol açar, epitelyal hücreler aşağıya, kript lümenine doğru ilerler. Normal kript elemanlarının arasında dallanmalara yol açar. Böylece tübüler adenomlarda tipik olarak gözlenen dallanmış glandüler patern oluşur.¹³ Adenom büyüdükçe, altta uzanan mezenşimde de büyüme olur. Mezenşim büyümesi, epitel büyümesiyle benzer oranda olduğunda epitelyal proliferasyon engellenmez ve böylece glandüler komponentlerin uzun parmaklı çıkıntıları oluşur. Bu histolojik yapı, villöz adenomdur. Sıklıkla, kolon adenomları hem tübüler hem de villöz komponentleri birlikte içerirler. Villöz subtipin büyüme karakteristiklerinin fazla olması nedeniyle, villöz adenomlar tübüler adenomlardan genellikle daha büyüktürler. ¹⁴

Adenomlar benign neoplazmlardır. Büyümenin otonom olmasına rağmen invazyon veya metastaz yeteneği yoktur. Çoğu kolon kanserinin, kolon adenomlarından köken aldığı kesin olarak bilinmesine karşın çoğu adenomun karsinoma ilerlemediği de bilinmektedir. Tam olarak hangi zaman aralığında karsinoma ilerlemenin olduğu bilinmemektedir. Familial Adenomatöz Polipoziste bir adenom üzerinde en az 2-3 dekadlık sürede karsinom geliştiği ileri sürülmektedir. Herediter Non Polipozis Kolorektal Kanserde (HNPCC) adenoma- karsinoma süreci daha kısadır. ¹⁴

Kolorektal kanserler histolojik olarak farklı evrelerden geçerek adenomdan karsinoma ilerlerler.¹⁵ Çoğunlukla adenomlar şeklinde başlarlar ve bunlardan bazıları progresif olarak displastik hale gelerek neoplazm içinde bir karsinom odağı oluştururlar. ¹⁶

Karsinogenezin çok basamaklı bir işlem olduğu genel olarak kabul görmektedir. Bu basamaklar, baskın davranan onkogenin aktivasyonu veya bir tümör süpresör genin

inaktivasyonu ile sonuçlanan mutasyon işlemini temsil etmektedir. Her bir mutasyon hücrelerin bazı büyüme avantajlarına verdiği davranış yanıtını değiştirir.¹⁷

Kolorektal kanser gelişiminin değişik basamaklarında mutasyona uğrayan genler tümör süpressör genler, protoonkogenler, DNA onarım genleri, büyüme faktörleri ve bunların reseptör genleri, hücre döngüsünde etkili genler ve apoptozis ilişkili genlerdir. Mutasyonların birikimi, adenoma, karsinoma ve metastaz evreleri şeklinde kanserin progresyon göstermesine katkıda bulunur. Bozulmuş sinyal yollarına sahip olan çoğu hücreler programlı hücre ölümü veya apoptozise uğrayabilirler. Buna karşın hücrelerden biri seleksiyon işlemine uğrayabilir ve öteki hücrelerin aksine apoptotik yollardan kaçabilir. Klonal genişlemeyi takiben genetik olarak değişmiş tek hücre tam büyümüş bir tümöre dönüşebilir.¹⁵

Bütün dokular büyüme kontrollerine tabidir, genel bir prensip olarak mutasyonlar veya epigenetik değişiklikler dokuların bu büyüme kontrollerinden kaçmalarına yol açmaktadır.¹⁷

Kolorektal kanser için patolojik açıdan farklı iki spesifik genetik yolak tanımlanmıştır. Bunlar kromozomal instabilite (CIN) ve mikrosatellit instabilite (MSI) yollarıdır. CIN ve MSI iki majör kalıtsal sendromla ilişkilidir. Bunlar sırasıyla Familial adenomatöz polipozis (FAP) ve Herediter Non Polipozis Kolorektal Kanserdir. MSI güç saptanabilen DNA değişikliklerinin 1000 kat artmasına yol açar. Kromozomal instabilitede ise kromozom kırıkları, duplikasyonlar, tekrar düzenlemeler ve delesyonlar gibi hücre bölünmesi sırasında oluşan büyük kromozomal değişiklikler gözlenir.¹⁵

2.2.1. Kromozomal İnstabilite Yolu

Kolorektal kanser gelişiminin APC genindeki mutasyonlarla başladığı düşünülmektedir. Kolorektal kanserde (ve diğer solid tümörlerin çoğunda) genetik instabilitenin predominant formu kromozomal instabilitedir.⁵

Kolon mukozası hücrelerin oluşturduğu kript denilen kompartmanlardan oluşmuştur. Adenomların normal kriptlerin tabanında yerleşmiş olan normal kök hücrelerden geliştiğine inanılmaktadır. Kök hücreler, kript uzunluğu boyunca yukarıya doğru göç ederler ve kriptin ortalarına gelene kadar bölünürler. Bundan sonra, göç eden hücrelerin bölünmesi durur ve bunun yerine matür hücrelere farklılaşırlar. Kript tabanından apeksine kadar olan bu migrasyon yaklaşık 3-6 günde gerçekleşir.⁵ Bu hücre migrasyonunda APC'nin önemli bir rolü vardır. (18) Normal olarak kolon epitelyal hücrelerinin yapımı ile kript apeksindeki kaybının hızı yaklaşık olarak birbirine eşittir. Yapım- yıkım oranı artarsa

neoplazi gelişir.⁵

Kalitatif ve kantitatif açıdan anormal kromozom sayısı olarak bilinen anöploidi, kolon kanseri hücrelerinin sık gözlenen bir özelliğidir. Kolon kanserlerinde mitoz sırasında kromozomal instabiliteye yol açacak şekilde, anormal hücre bölünmesinin anöploidi ile sonuçlandığına inanılmaktadır. Kromozomal instabilite, kolorektal kanserlerin %85 'de ortak özelliktir, en küçük adenomda da gözlenebilmesi, kromozomal instabilitenin kolorektal kanser gelişiminde çok erken evrelerde oluştuğunu düşündürmektedir. APC gen mutasyona uğradığında, kromozomların ayrılmasında defekt oluşabilmektedir.¹⁵

APC Geni: Beşinci kromozomdaki (5q21) APC gen lokusundaki mutasyonların kolorektal kanser başlangıcı ve progresyon sırasındaki en erken olaylar olduğu düşünülmektedir. APC gen ürünü 312 kDa ağırlığında olan sitoplazma ve nükleusun her ikisinde de bulunan bir proteindir. APC, normal kolon epiteli tarafından eksprese edilir.^{15,34,35}

FAP (Famlyal Adenomatöz Polipozis) hastalarında APC geninin alelik mutasyonunu ile heterozigozitenin kaybı alışıldık bir bulgudur. APC genindeki mutasyonlar sporadik kolorektal kanserler ve adenomların %60-80'inde saptanmaktadır. APC mutasyonlarına sahip olan FAP hastaları yüzlerce, binlerce kolorektal adenomları ve erken başlangıçlı karsinomlar geliştirmeye eğilimlidirler.¹⁵

APC'nin, kolon epitelyal hücrelerin transformasyonunda β -katenin sinyalinin negatif regülatörü olduğu düşünülmektedir. APC geninde mutasyon taşıyan kolon tümörlerinde hücre proliferasyonu için bilinen bir faktör olan c-myc seviyesinin arttığı saptanmıştır. Yakınlarda kolon kanseri gelişiminde APC gen mutasyonu, β -kateninin aktivasyonu ve c-myc geninin pozitif regülasyonu arasında doğrudan bir bağlantı kurulmuştur.¹⁵

Kolorektal Kanserde Kaybolmuş Gen (DCC):

DCC geninin protein ürünü büyük bir membran proteini olup, bir sinir büyüme faktörü olan netrin için reseptör görevine sahip gibi görünmektedir. 18q'daki bir yada daha fazla genin fonksiyon kaybı tümör gelişimi için önemli bir basamak gibi görünmektedir. Bu bölgedeki aday genler smad ve smad2 olup her ikisi de TGF-B sinyal yolağına sahip olurlar ve kolorektal kanserde mutasyonlar saptanmıştır.¹

TP53:TP53 geninde mutasyon adenoma –karsinoma dizisinde ,çok büyük bir olasılıkla metastazdan önce olmaktadır. Bu açıdan TP53 mutasyonu bir benign adenomdan malign karsinomaya geçişi belirlemektedir, sporadik kanserlerde %70 oranında görülür.Gen, kromozom 17p'de lokalizedir .TP53 'ün çoğu apoptotik yolakta merkezi rolü vardır.¹ Son

zamanlarda DNA hasarına yanıt olarak P53 tarafından APC geninin transkripsiyonunun artırılarak indüklenebildiği gösterilmiştir. P53 normal hücre büyüme ve bölünmesinin negatif düzenleyicisidir. P53 genindeki mutasyonların kolorektal kanserlerde sık görülmesine karşın bu mutasyonların doğal veya mutant APC gen ekspresyonu üzerine etkileri açıklanmış değildir.^{15,36}

K-Ras geni:

Sporadik kolorektal kanserlerin %50sine yakın kısmında K-ras onkogeninde mutasyon saptanmaktadır. Ras protein ailesi sinyal yönetimine katılırlar ve çeşitli fonksiyonlara sahip çok sayıda proteinlerin sinyal yollarının bir parçasıdır. APC mutasyonlar ile birleştirildiğinde bu mutasyonlar olasılıkla selektif avantajın eklenmesi ve subklonal evolusyona yol açar. Histolojik olarak bu durum hafifçe displastik odağın ortaya çıkması şeklinde görülebilir. Ras ailesi proteinleri sinyal iletimine yüzey reseptörleri ile katılırlar ve artmış ekspresyonları hem hücre adezyonu hem de hücre siklusunu etkileyebilir.¹⁷

2.2.2. Mikrosatellit İnstabilite Yolağı

Hereditör Non Polipozis Kolorektal Kanserin (HNPCC) kalıtsal özelliği, DNA mismatch onarım sistemine ait çok sayıdaki genlerin birindeki germline mutasyondan ileri gelmektedir. DNA mismatch onarım sistemi, DNA replikasyonu sırasındaki polimeraz hatalarını düzelten bir mekanizmadır.¹⁴

Mikrosatellitler bir ile beş DNA bazı arasında değişen uzunlukta ,kısa ikili tekrarlardır ,daha çok kodlanmayan bölgeler olmak üzere bütün genom boyunca dağılmışlardır.⁸

Bütün mikrosatellit boyunca aynı DNA tekrarlıyorsa (örneğin poliadenin, poliA tekrarları) mono nükleotid tekrarları, eğer iki ayrı baz tekrarlıyorsa (örneğin sitozin/adenine (C/A)_n) dinükleotid tekrarı olarak isimlendirilir .Bütün insan genomu boyunca yaklaşık yarım milyon mikrosatellit lokus dağılmış halde bulunmaktadır.¹⁹

Mikrosatellit instabilite, normal dokudan farklı olarak tümörde mikrosatellit içindeki tekrarlayan ünitelerin insersiyon veya delesyonları nedeniyle mikrosatellitin uzunluğunun değişime uğraması şeklinde tanımlanır. Mikrosatellit instabilite, mismatch onarım genlerindeki altta yatan bozukluğa bağlı olarak gelişir. İnsan mismatch onarım sistemi(MMR), hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 ve hPMS2 proteinlerinden oluşur. Mismatch onarım sistemi DNA replikasyonu sırasında kimyasal veya fiziksel hasar nedeniyle oluşan anormalliklerin tanınması ve eksiz edilmesinden

sorumludur.⁸

DNA replikasyonu sırasında DNA polimeraz enziminin mikrosatellit bölgelerde DNA dizisi üzerinde kayabilmesi nedeniyle bu bölgeler mutasyon açısından artmış riske sahiptir. Bu replikasyon hatalarının düzeltilmemesi durumunda çerçeve kayması mutasyonları veya protein trunkasyonlarına yol açabilir. Bu mutasyonlar TGF β -R2, ILGF, E2F4 ve BAX gibi mikrosatellit bölgeler içeren genleri etkilemektedir. Bu genler mikrosatellit instabilite göstermeyen tümörlerde nadiren mutasyona uğramaktadırlar.^{8,20}

Ailesel kolon kanseri sendromlarından HNPCC (Hereditör Non-Polipozis Kolorektal Kanseri)de germline gen defektlerine bağlı olarak mismatch onarım sistemi inaktive olur.^{8,21} Sporadik kolon kanserlerinin % 15 kadarında mismatch onarım sisteminin somatik inaktivasyonu gözlenir. Her iki durumda da oluşan kolon kanseri mikrosatellit instabil fenotipe sahiptir.^{8,22} İnsan genomu boyunca aşırı sayıda mikrosatellit bölge bulunduğundan mikrosatellit instabilitenin insidansı araştırılan lokusa göre değişir. Bir tümörün mikrosatellit instabilite pozitif olarak sınıflamasında önce, araştırılacak ideal lokus sayısında karışıklık oluşmaktadır. 2 mononükleotid tekrarı (Bat25, Bat26) ve 3 dinükleotid tekrarı (D2S123, D5S346, D17S250) olmak üzere toplam 5 mikrosatellit lokusundan oluşan bir panel MSI araştırılan tüm kolorektal kanserlerde araştırılmak üzere NCI (National Cancer Institute) konsensus konferansınca seçilmiştir. Böylece kanserler üç gruba ayrılırlar.^{13,23} Araştırılan lokusların >%30-40'ında mikrosatellit instabilite gösteren tümörler yüksek seviyede mikrosatellit instabil (MSI-H) olarak adlandırılır. Araştırılan lokusların <%30-40'ında mikrosatellit instabilite gösteren tümörler düşük seviyede mikrosatellit instabil (MSI-L) olarak adlandırılır. Hiçbir lokusta mikrosatellit instabilite saptanmayan tümörler ise mikrosatellit stabil (MSS) olarak adlandırılır.¹³

Yakın zamanlarda, sporadik mikrosatellit instabil kolorektal kanserlerde saptanan bir bulgu olarak promotor metilasyonu, kolon kanseri patogeneğinde epigenetik değişikliklerin rolünü göstermiştir. Birçok tümör baskılayıcı genin promotor bölge hipermetilasyonu sonucu inaktive oldukları tanımlanmıştır. (15,24,25) MSI-H kolorektal kanserlerle sıklıkla ilişkili olan önemli bir moleküler özellik CpG adası metilatör fenotiptir.^{9,25} CIMP, genlerin promotor bölgelerinde lokalize olan multiple CpG adalarının metilasyonu ile karakterizedir. CpG adaları insan genlerinin yaklaşık %50 sinde görülür. Sitozin ve guanin rezidülerinin bulunduğu yoğun bölgelerdir. Sitozin rezidülerinin metilasyona eğilimli olması gen sessizleşmesi ile sonuçlanır.^{9,27} Kolorektal kanserde CpG adalarının hipermetilasyonu p16, MGMT ve mismatch onarım geni hMLH1 gibi neoplastik

gelişim de önemli olduğu bilinen genlerin transkripsiyonel baskılanmasını sağlayan bir epigenetik mekanizmadan sorumludur.^{9,26,27}

TGFβ2R :TGFβ reseptör 2 nin mutasyona uğraması durumunda TGFβ1 ligandının kolon epitel hücreindeki büyüme baskılayıcı etkileri kaybolur. Mikrosatellit instabil kolorektal kanserlerde poliadenin (A₁₀) bölgesinde çerçeve kayması şeklinde mutasyon gözlenir. Bu poliadenin dizisi, TGFβ2Rnin sisteinden zengin bölgesinde, 125-128. kodonlarda bulunur ve transmembran zincirin eksternal (ekstrasellüler) bölgesindedir. MSI kolorektal kanserlerin %90ında TGFβ2R mutasyonu gözlenir, geri kalan %10unda ise İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (ILGF2) genindeki ekzonik mikrosatellit mutasyona bağlı olarak ligand aktive olamamaktadır. ILGF2R poliguanin (G₈) dizisine sahiptir ve bu dizide çerçeve kayması mutasyonları MSI kolorektal kanserlerde gözlenmektedir.¹⁴

Kolon kanserlerinden Transforming Growth Factor-β (TGF-β) sinyali normal epitelyal hücrelerin çoğalmasını güçlü bir şekilde inhibe etmektedir. Çünkü, tümör hücreleri TGF-β'a sıklıklı dirençlidir, bu hücreler preneoplastik lezyonlara yol açmakta , motiliteyi arttırmakta ve kanseri yaymaktadırlar. Kolon kanserlerinde TGF-β 'ya direncin yapısal temeli TGF-β reseptör 2'nin inaktive olmasını sağlayan somatik mutasyonlara bağlanmaktadır. Mikrosatellit instabil kolon kanseri hücre serilerinde, TGFβ-RII genindeki mikrosatellit bölgelerde mutasyonlar saptanmıştır. MSI ferotipindeki kolorektal kanserlerin %90'ı mutant TGF-βRII genine sahiptir.^{15,28}

İnsülin benzer büyüme faktörü 2 reseptörü (ILGF-2R) hücre büyümesinde yaşamında ve diferansiasyonunda kritik bir rol oynarken buna karşın mutasyona uğradığında bu reseptörler tümörögenizde major bir role sahip olurlar. IGF-IIR/mannoz 6 fosfat reseptörü IGF-II ve latent TGF-β1 ligandı ile etkileşerek tümör büyüme inhibitörü olarak çalışır.IGFIIR geni kodlayan bölgesinde bir çok mikrosatellitler içerir. Bunlarda biri poli(G)₈ tekrarı şeklindedir ve bir iki baz delesyonu veya insersiyonu şeklinde sıklıklı mutasyona uğrar.^{15,28,30} Bu nedenle MSI hücrelerde mutasyona bağlı olarak IGFII-R fonksiyon kaybı, IGF-II akümülyasyonu ve aktivasyonunu ve TGF-β aşağı –regülasyonuna bağlı olarak hücre proliferasyonunu hızlandırabilir.^{15,31}

PTEN tümör baskılayıcı geni, mutated in multiple advanced cancers(MMAC) adıyla da bilinir ve kromozom 10q23 de yerleşmiştir. PTEN, hücre siklusu kaçışına ve apoptozise aracılık eder. PTEN geninin kodlayıcı bölgesi birçok mikrosatellit içerir Endometrial ve kolon kanserlerinde PTEN geninde mutasyonlar gözlenir.¹⁵

BAX:MSI tümörlerin yaklaşık %50'sinde Bax geninde mutasyonlar gözlenir.^{15,32,33} Bu

mutasyonlar Bax, geninin mikrosatellit bölgesinde olur. Bax,, anti-apoptotik protein Bcl-2 ile heterodimer oluşturarak apoptozisi indükler. Mutasyona uğramış Bax geni apoptozisten kaçışa yol açarak kolorektal kanser başlangıcını indükler.¹⁵ . Son zamanlarda TGFβ2R ve BAX mutasyonlarının adenoma- karsinoma sürecinin geç dönemlerinde olduğu gösterilmiştir.¹⁴

Beta Katenin/ TCF 4:

WNT sinyal yolağı APC, β-Katenin ve TCF-4 transkripsiyon faktöründen oluşmaktadır.MSI kolorektal kanserlerin yaklaşık %27sinde β-Kateninin 3. ekzonundaki fosforilasyon bölgesinde mutasyonlar gözlenmektedir.¹⁴

DNA Mismatch Onarım Sistemi Genleri:

DNA mismatch onarım genlerinden ikisi (hMSH3 ve hMSH6) mikrosatellit bölgeler içermekte olup, MSI kolorektal kanserlerde mutasyona uğrayabilmektedirler. hMSH3 poliadenin (A₈) ve hMSH6 polisitozin (C₈) mikrosatellitlerini bulundurlar ve Herediter Non Polipozis Kolorektal Kanserde (HNPCC) sırasıyla %52 ve %33 oranında çerçeve kayması mutasyonlarına uğrayabilirler.¹⁴

2.2.3.Mikrosatellit İnstabilitenin Prognoza Etkisi

Yüksek düzeyde mikrosatellit instabiliteye sahip tümörlerin metastaz ihtimalinin de daha az olması ile birlikte daha iyi bir prognoza sahip oldukları öne sürülmüştür.^{17,37} MSI pozitif kolorektal kanserlerin bazılarında kötü histolojik karakteristiklere rağmen düzelmiş prognozu açıklamak için bir çok teori ortaya atılmıştır.³²

Bir teoride DCC/18q, 17p/p53 ve K-ras gibi genlerin kaybı durumunda kötü prognozun ortaya çıktığı öne sürülmüştür. MSI kolorektal kanserlerde genetik materyalin kaybı (heterozigozite kaybı,allel kaybı) nadir gözleendiği için bu genler nadiren etkilenmektedir. MSI+ kolorektal kanserlerde DCC/18q, 17p/p53 ve K-ras genlerinin normal olması düzelmiş prognozla ilişkili olabilir.³²

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Doku Eldesi

Bu tez çalışmasında, çalışma grubunu Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Kolorektal Kanser tanısı almış 50 hastanın kanserli doku örnekleri kullanılmıştır. Bu hastalardan cerrahi tedavi sırasında laparotomik yolla alınan kanserli doku örnekleri DNA izolasyonu amacı için parafinli dokulara (2-3 cc) alınmış ve moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere Gastroenteroloji bilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarına getirilmiştir.

3.2. Araçlar ve Gereçler

3.2.1. Cihazlar

Moleküler incelemelerde kullanılan başlıca teknik malzemeler şunlardır; Thermal cycler, jel görüntüleme cihazı (Uvitec), Santrifüj, hassas terazi, otomatik pipetler, vorteks, UV transilluminatör, elektroforez tankı ve güç kaynağı, deepfreeze ve buzdolabı. Bu teknik malzemeler araştırmanın yapıldığı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Gastroenteroloji Bilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarlarında bulunmaktadır.

3.2.2. Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda, moleküler incelemelerde marker olarak Roche'dan DNA 100 base pair ladder (katalog no: 1721933) kullanılmıştır. Primerler İyontek'ten, Taq DNA polimerazlar ve dNTP'ler Fermentas'dan temin edilmiştir.

3.3. Yöntem

Kolon kanserli hastalarda Bat-25, BAT-26, DS5349, D17S250 ve D2S123 bölgelerindeki instabiliteyi saptamak amacı ile sırasıyla DNA izolasyonu, PCR, ve agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Hastalardan alınan doku örnekleri DNA izolasyonu amacı ile fenol-kloroform yöntemine göre işleme tabi tutulmuştur. Forward ve Reverse primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile ilgili bölgeler amplifiye edilmiştir. PCR ile çoğaltılan bölgeler agaroz jelde yürütülerek elde edilen bantlara göre sonuçlar yorumlanmıştır.

3.3.1.2. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar ^{38,39}

a) Lizis Tamponu (pH: 8.0)

- 0,209 gr Tris-HCl
- 0,249 gr EDTA
- 0,67 gr SDS
- Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.3.1.3. Elektroforetik Analiz Solüsyonları

a) 10 X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok solüsyonu

- 108 g Tris-base (0,9 M)
- 55 g Borik asid (0,9 M)
- 8,3 g EDTA pH 8,0 (20mM)
- Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
- Manyetik karıştırıcıda çözülerek pH= 8,0'e ayarlandı.

b) 1X TBE (Çalışma solüsyonu)

- 100 ml 10X TBE üzerine, 900 ml distile su eklendi.
- Elektroforez tankına konularak kullanıldı.

c) Etidiyum Bromid Solüsyonu (10mg/ml)

- 0,1 g etidiyum bromid 10 ml distile su içinde çözüldü.
- Işığa hassas olduğu için alüminyum folyo ile sarılarak +4 °C'de saklandı.

d) Yükleme tamponu (6X)

- 1 X TBE
- %40 Sukroz
- %0,025 Brom fenol mavisi

3.3.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda fenol kloroform yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. DNA izolasyonunda kullanılan doku miktarı ve kimyasal bileşikler izolasyon protokolünde yer alan miktarlara bağlı kalınarak belirlenmiştir. İzolasyonda kullanılan solüsyonlar ve izlenen yol aşağıdaki şekildedir.

1. 2 ml'lik steril tüpe belli miktardaki doku ilavesinden sonra 1 ml Ksilol ilave edildi. Tüpün kapağı kapatılıp alt-üst edilerek homojen karışım sağlandı ve + 4 °C'de 30 dakika bekletildi.

2. Pipetle supernatan uzaklaştırıldı.

3. Aynı işlem ikinci bir kez tekrarlandı.

4. Tüplerin üzerine %100'lük 1 ml Et-OH ilave edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı.

7. Daha sonra her bir tüpe 300 µl Lizis tamponu %10'luk SDS ve 0,5 µl Proteinaz K ilave edildi. Tüp alt-üst edilerek homojen karışım sağlandı.

8. 55-60 C°'de Heat block'ta 1 gece inkübe edildi.

9. 1 gecelik inkübasyondan sonra karışımın üzerine toplam hacmin iki katı fenol-kloroform ilave edildi. 0 C⁰'de 30 dakika bekletildi.

10. +4 C°'de 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Supernatan steril bir ependorfa aktarıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı

11. Daha sonra supernatan üzerine toplam hacmin iki katı sadece kloroform eklendi. Bu işlem iki kez tekrarlandı.

12. Santrifüj sonrasında supernatan ependorfa aktarıldıktan sonra solüsyonun hacminin 2-2.5 katı %99,5'luk etanol eklendi. Tüp 2-3 kez yavaşça baş aşağı edilerek DNA'nın presipite olması sağlandı.

13. +4 °C'de 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra tüp kurutuldu.

14. Tüpe yaklaşık olarak 25 µl steril distile su konuldu.

15. Örnekler -20 °C'de PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir⁴.

3.3.3. PCR Reaksiyonunun Hazırlanması

PCR reaksiyonu için gereken bileşenler; primerler, termostabil DNA polimeraz, dNTP karışımı, MgCl₂, reaksiyon tamponu ve kalıp DNA'dır. PCR reaksiyonları hazırlanmadan önce kullanılacak olan reaksiyon bileşenlerinin stokları günlük kullanımlar şeklinde hazırlanarak kontaminasyon riskini önlemek amacı ile steril ependorflara belirli hacimlerde paylaştırıldı. PCR' da tampon bileşimi, dNTP ve MgCl₂ konsantrasyonları PCR reaksiyonlarının verimini etkileyen önemli faktörlerdir. Optimal dNTP konsantrasyonu MgCl₂ konsantrasyonuna bağlıdır. MgCl₂ dNTP'ler ile çözülebilir kompleksler oluşturarak termostabil DNA polimeraz aktivitesini yükseltir³⁹.

PCR reaksiyonu, 0,5 µl'lik ependorflar da ve buz üzerinde çizelgede verildiği gibi hazırlandıktan sonra çalışılan bölgeye göre programlanmış olan termalcyle'in örnek bölmesine yerleştirilerek program başlatılmıştır. PCR işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen ürünlerin elektroforezi yapıldı. Her bölge için belli bir bant uzunluğu beklendiği için oluşan bantların beklediğimiz bantlar olup olmadığı analiz edildi.

3.3.3.3. PCR Ürünlerinin Elektroforezi

Her bölge için öngörülen PCR programları tamamlandıktan sonra amplifiye olan bölgeler %2'lik agaroz jelde analiz edildi. Bunu için PCR reaksiyonu ürünlerine 6X yükleme tamponundan 1/5 oranında (1 hacim yükleme tamponu, 5 hacim PCR reaksiyonu ürünü) eklendi. Örnekler agaroz jele yüklendikten sonra 100mA, 70 Voltta 35 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonucu Uvitec jel görüntüleme cihazı ile fotoğrafı çekilerek yorumlandı. Sonuçlar her bölge için kullanılan primerlerin çoğalttığı bölgelere göre beklenen bant uzunlukları moleküler weight marker yardımıyla yorumlanmıştır.

ÇOĞALTILAN BÖLGELER VE BEKLENEN BANT UZUNLUKLARI

D2S123 (Tet)	197–227 bp
D17S250 (Fam)	151–169 bp
D5S346 (Fam)	96–122 bp
Bat-25 (Hex)	120 bp
Bat-26 (Tet)	116 bp

Verilerin istatistiksel analizi 'SPSS for Windows (10.0 versiyonu)' paket programı ile yapıldı. Grupların karşılaştırmasında Student'in t testi, Mann Whitney U testi, ki kare testleri kullanılmıştır. $P < 0,05$ ve altındaki değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

Araştırılan 5 gen lokusuna göre mikrosatellit instabil grup içinde 11 olgunun (%55) yüksek seviyede mikrosatellit instabil (MSİ-H) tümöre, 9 olgunun (%45) ise düşük seviyede mikrosatellit instabil (MSİ-L) tümöre sahip olduğu saptandı.

Mikrosatellit instabil ve stabil grupta cinsiyet açısından karşılaştırıldığında farklılık saptanmadı. Her iki grupta da erkek hasta sayısı kadın hasta sayısından daha fazla idi. (Tablo1) ($p < 0,01$)

Tablo – 1 Mikrosatellit instabil ve stabil gruplarda cinsiyet dağılımı.

	Erkek	Kadın	Toplam
Mikrosatellit İnstabil	12 (%60)	8 (%40)	20
Mikrosatellit Stabil	17 (%56,7)	13 (%43,3)	30
Toplam	29 (%58)	21 (%42)	50

Mikrosatellit instabil ve Mikrosatellit stabil gruplar yaş bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. ($p < 0,05$) Mikrosatellit instabil grubun yaş ortalaması 52,2 yaş mikrosatellit stabil grubun ortalaması 61,69 yaş olarak saptandı.(Tablo2)

Tablo -2 Mikrosatellit stabil ve instabil grupların yaş ortalamaları

Mikrosatellit İnstabilite	Yaş Ortalaması	Standart Sapma	Sayı
Mikrosatellit İnstabil	52,20	11,14	20
Mikrosatellit Stabil	61,69	8,29	30
Toplam	58,06	10,58	50

Proksimal kolonda tümör yerleşimi açısından mikrosatellit instabil grup ile mikrosatellit stabil grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p < 0,05$). Mikrosatellit instabil grupta 8 olguda (%40) proksimal kolon tutulumu gözleminde mikrosatellit grupta 4 olguda (%13,3) proksimal kolon tutulumu gözlemlendi. (Tablo 3)

Tablo - 3 MSI durumuna göre olguların proksimal veDistal kolon tutulumlarının karşılaştırması.

	Proksimal Kolon Tutulumu	Distal Kolon Tutulumu	Toplam
Mikrosatellit İnstabil	8 (%40)	12 (%60)	20
Mikrosatellit Stabil	4 (%13,3)	26 (% 86,7)	30
Toplam	12 (% 24)	38 (0,76)	50

Mikrosatellit instabil grup ile mikrosatellit stabil grup arasında tümör grade'i açısından yapılan karşılaştırmada istatistiksel açıdan anlamlı fark saptandı. Mikrosatellit instabil grupta kötü diferansiye tümör oranı daha yüksekti. (Tablo 4)

Tablo - 4 Mikrosatellit instabil olgularla Mikrosatellit stabil olguların diferansiasyonlarının karşılaştırması

	Mikrosatellit Instabil	Mikrosatellit Stabil	Toplam
İyi Diferansiye	2 (%10)	3 (%10)	5 (%10)
Orta Diferansiye	14 (%70)	26 (%87,7)	40 (%80)
Kötü Diferansiye	4 (%20)	1 (%3,3)	5 (%10)

Dukes evrelenmesine göre mikrosatellit instabil grup ve mikrosatellit stabil grup arasındaki fark saptanmadı. mikrosatellit instabil grupta en sık rastlanan evre Dukes D şeklinde saptandı. (%35), mikrosatellit stabil grupta en sık rastlanan evre C şeklinde saptandı.(Tablo 5)

Tablo – 5 Dukes evrelenmesine göre mikrosatellit instabil ve stabil grubun karşılaştırılması

	mikrosatellit instabil	Mikrosatellit Stabil	Toplam
Dukes A	6 (%30)	7 (%23,3)	13 (%26)
Dukes B	1 (%5)	6 (%20)	7 (%14)
Dukes C	6 (%25)	13 (%43,3)	19 (%38)
Dukes D	7 (%35)	4 (%13,4)	11 (%22)
Toplam	20	30	50

Mikrosatellit instabilitenin 3 yıllık yaşam oranına etkisi açısından yapılan karşılaştırmada 2 grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı sonuç saptanmamıştır.

5.TARTIŞMA

Yüksek seviyede mikrosatellit instabilite gösteren kolon kanserleri farklı klinik ve patolojik özellikler gösterirler.² Yüksek seviyede mikrosatellit instabilite (MSI-H), Herediter Non Polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC)'li hastaların %90'ından fazlasında ve sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %15'de saptanmaktadır.³²

Sporadik kolorektal kanserlerin herediter formlardan çok daha sık görülmelerinden ötürü, mikrosatellit instabilite gösteren tümörlerin çoğu sporadik tümörlerdir.²³

Mikrosatellit instabil sporadik kolorektal kanser patogeneğinde bilinen mekanizma, hMLH1 gibi bazı DNA mismatch onarım genlerinin promoter bölgelerinin metilasyonudur. DNA metilasyonu yaşla ilişkili bir fenomendir ve mikrosatellit instabil sporadik kolorektal kanserler yaşlılarda ve kadınlarda daha sık gözlenmektedir. Bazı çalışmalar hMLH1 geninde ekspresyon kaybının genç olgular arasında son derece nadir rastlandığını göstermektedir. Bu açıdan daha erken yaşlarda ortaya çıktığı bilinen herediter non poliposis kolorektal kanser (HNPCC) ile sporadik mikrosatellit instabil kolorektal kanserin ayırımında tanı alma yaşı önemli bir özelliktir.⁴⁰

Çalışmamızda mikrosatellit instabil grupta tanı alma yaşı, mikrosatellit stabil gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha erken saptanmıştır (p<0,05) Bu bulgumuz literatür bilgileri ile uyumlu değildir. Bu durum çalışmadaki her iki hasta grubunun da yeterince geniş olmamasına bağlı olabilir.

Avusturalya'da yapılan bir çalışmada proksimal kolon kanser insidansında özellikle kadınlar arasında artış saptanmıştır. Bu çalışmada mikrosatellit instabilite kolorektal kanserin yaşlı kadınlarda ve genç erkeklerde daha sık olduğu saptanmıştır.³⁵ Bizim çalışmamızda cinsiyetin mikrosatellit instabil gruplar arasında anlamlı olarak farklı olmadığı saptanmıştır. Literatürdeki bazı bilgilere göre kadınlarda daha fazla mikrosatellit instabilite gözleendiği öne sürülse de daha geniş hasta gruplarında yapılacak çalışmaların daha kesin ve güvenilir sonuçlar için gerekli olduğu sonucu çıkarılabilir.

Yüksek seviyede mikrosatellit instabil (MSI-H) kanserler daha çok proksimal kolonda yerleşirler.Herediter non polipozis kolorektal kanseri hastaların 2/3'nde, mikrosatellit instabil sporadik kolorektal kanserli hastaların %90'ından fazlasında lezyon splenik fleksuranın proksimalinde izlenmektedir. Sağlıklı kişilerde proksimal ve Distal kolona ait çeşitli farklılıkların bu bölgelerden kaynaklanan tümörlerin farklı yollarla

oluşmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.²²

Çok sayıda araştırmaya göre, Kuzey Amerika ve Avrupa'da son 40 yılda sağ kolon yerleşimli kanserlerin oranında sürekli bir artış gözlenmektedir. Bu durum, sağ kolon yerleşimli kanserlerin insidansında kesin bir yükselme ile birlikte, sol kolon yerleşimli kanserlerin insidansının göreceli olarak az artması, sabit kalması veya düşmesinin bir sonucudur. Yakın zamanlarda sağ kolon yerleşimli kanser insidansında benzer eğilimler Asya ülkelerinden de bildirilmektedir. Bu anatomik yer değişikliği, büyük olasılıkla multifaktöryel nedenlerle olmaktadır. Sağ kolon yerleşimli kanserler özellikle kadınlarda, Afrika kökenli Amerikalılarda ve yaşlılarda daha sık gözlenmektedir. Sağ tarafta yerleşen kolorektal kanser oranında yaşla birlikte artış dikkati çekmektedir ve sağ kolon yerleşimli kanserler 70 yaşından sonra baskın olarak gözlenmektedir.¹⁴

Bu bakımdan, son zamanlardaki demografik değişikliklerin ve özellikle ortalama yaşam süresinin uzamasının, tüm kolon kanserleri arasında sağ kolon yerleşiminin artışına belirgin olarak katkıda bulunduğu düşünülmektedir.¹⁴

Proksimal ve distal kolondaki kanserlerin moleküler biyoloji açısından farkları göz önüne alındığında karsinojenlere karşı cevaplarının farklı olduğu akla gelebilir. Proksimal kanserler sıklıkla hipermetilasyon, DNA mismatch onarım defektleri ve mikrosatellit instabilite ile ilişkili iken, distal kanserlerde kromozomal instabilite ve allel kaybı gözlenmektedir. Tutulan kolon bölgelerinin oranındaki değişikliğin kliniğe yansımaları da önemlidir. Hedef popülasyonun yaşı göz önüne alındığında, kanser taraması amacıyla uygulanan sigmoidoskopi ile distal kolonun taranması tanı açısından artan oranda duyarsız hale gelecektir.¹⁴

Çalışmamızda, proksimal kolonda primer tümör yerleşimi açısından mikrosatellit instabil grupla mikrosatellit stabil grup arasında anlamlı fark saptandı. Mikrosatellit instabil grupta diğer gruba göre daha sık oranda proksimal kolon yerleşimli tümör bulundu. Bu bulgumuz da literatür bilgileri ile uyumludur.

Mikrosatellit instabil kolorektal kanserler, az diferansiye olmaya eğilimlidirler. Bu tümörlerde ayrıca müsinöz komponent ve signet-ring hücre konfigürasyonuna daha sık rastlanır. Mikrosatellit instabil kolorektal kanserler baskın olarak sitotoksik T hücrelerinin katıldığı yaygın lenfosit infiltrasyonu gösterirler. Tümör çevresinde B ve T hücre birikimi Crohn hastalığındakine benzer. Müsinöz ve skirröz karsinomlar biyolojik olarak daha agresif özelliklere sahiptir. Bu özelliklere sahip olan olguların sağkalım diğer olgulardan daha kısadır.^{2,8,32}

Çalışmamızda grade açısından mikrosatellit instabil grupla mikrosatellit stabil grup arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. Mikrosatellit instabil grupta az diferansiye tümörler diğer gruba göre anlamlı olarak fazla saptanmıştır ($p < 0,05$). Bu bulgu literatür ile uyumludur.

Müsinöz adenokarsinom tipinde ve az diferansiye olmaya eğilimli olmalarına karşın, mikrosatellit instabil tümörlerin evreye spesifik olarak sağkalım oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bir çalışmada rektal kanserler 91 hastada polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analiziyle mikrosatellit instabilite durumları araştırılmış ve hastalısız yaşam süresi ve toplam yaşam oranlarının mikrosatellit instabil hastalarda daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada 181 sporadik kolorektal kanserli hastanın mikrosatellit instabilite durumunun prognoz için istatistiksel olarak anlamlı fark yaratmadığı belirtilmiştir.^{22,26}

Bir çalışmada 40 yaş altındaki mikrosatellit instabil kolorektal kanserli hastaların, mikrosatellit instabil olanlara göre daha fazla 5 yıllık yaşam oranına sahip oldukları (%68 karşılık, %32, $PL < 0,05$) ve bu avantajın tümör evre ve grade'inden bağımsız olduğu saptanmıştır. Bunu destekleyen başka bir çalışmada 50 yaş altındaki hastalarda yapılmış ve 5 yıllık yaşam oranları mikrosatellit instabil tümürlü olgularda %76, mikrosatellit stabil olgularda 554 olarak saptanmıştır. ($P < 0.001$) Aynı çalışmada kemoterapi olmayan Dukes C kanserli mikrosatellit instabil kanserli olguların 5 yıllık yaşam oranları %70 iken, mikrosatellit instabil kanserli olgularda bu oran %40 saptanmıştır. ($P < 0.05$)⁸

Kolorektal kanserli olgularda prognozun, histolojik grade ile ilişkili olduğu saptanmıştır, az diferansiye olan tümörler daha kötü prognoza sahiptir. Az diferansiye ve iyi diferansiye tümörler arasında yapılan bir karşılaştırmada, sağkalım için relatif risk iyi diferansiye lehine olacak şekilde 1,68 oranında saptanmıştır.² Müsin ilişkili antijenlerin progresyon ve metastazda etkili olabileceği düşünülmektedir.²

Kolorektal kanserlerde bazı genetik değişiklikler prognostik belirteçler olarak düşünülmektedir. Örneğin kromozom 18q'daki allel kaybı kötü prognozla ilişkilidir. Geçmişte yapılan çalışmaların hepsinde olmasa da çoğunda 18q'daki allel kaybının evre 2 ve evre 3 kolorektal kanserde kötü prognozun bir belirteci olduğu gösterilmiştir. Bu allel kaybı DCC (Deleted in Colon Cancer) genini içermektedir, fakat aynı bölgede çok sayıda başka genler de bulunmaktadır. DCC geninin ürünü, nöron aksonlarının migrasyonuna kılavuzluk yapan netrin-1 reseptörüdür. Kolon kanserlerinde

DCC kaybı metastaz ve kötü prognozla ilişkilidir. DCC proteini netrin-1'e bağlanmadığında apoptozu başlatmaktadır. Bu nedenle, 18q kaybı ve sonuçta DCC kaybı apoptozu engeller ve bu nedenle kemoterapiye direnç yol açar. Prognostik değere sahip diğer değişiklikler kromozom 17p, 1p, 3p, 4p, 5q ve 8p'deki allel kayıplarıdır. Bu allel kayıpları, DCC(Deleted in Colon Cancer), p53, p27 genlerine ait ürünlerin düzeylerindeki değişikliklere, ras geni mutasyonuna ve Floroprimidin metabolizmasını etkileyen genlerde artmış ekspresyona yol açarlar.⁴¹

Yüksek düzeyde mikrosatellit instabil kolorektal kanserlerde mikrosatellit bölgelerde mutasyonların birikimi söz konusudur fakat allel kaybı nadir gözlenmektedir. Yüksek düzeyde mikrosatellit instabil kolorektal kanserlerde TGFB1 tip 2 reseptörünü kodlayan gendeki mutasyonun iyi prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu etkinin mekanizması bilinmemektedir. Yüksek düzeyde mikrosatellit instabilite prognozu iyi yönde etkilemektedir ve kemoterapi sonrası beklenen yaşam süresini de iyi yönde etkiliyor olabilir. Bu tümörlerde 18q'da allel kaybı genellikle gözlenmediği için, adjuvan kemoterapiye yanıtta allel kaybının etkisi olası görünmemektedir. TGFB1 yolağı, hücre döngüsünü geç G1 fazında bloke ederek tümör proliferasyonunu inhibe etmektedir. Bu nedenle Tip 2 TGFB1reseptör genindeki mutasyon kemoterapiye duyarlılığı artırıyor olabilir. Buna karşın, mismatch onarım aktivitesi kaybolmuş kolon kanseri hücre serileri ve yüksek düzeyde mikrosatellit instabil kolon kanseri hücre serileri in vitro koşullarda 5 Florourasil'e göreceli olarak dirençlidirler.⁴¹

Bir çalışmada mikrosatellit instabil özelliği taşıyan Dukes C kolorektal kanserli hastalarda adjuvan kemoterapiye cevabın belirgin olarak artmış olduğu gösterilmiştir.³² Bu çalışmaya göre adjuvan kemoterapiden sonra 5 yıllık toplam sağkalım mikrosatellit instabil grupta %90 iken mikrosatellit stabil grupta %35 olarak saptanmıştır.(P=0.0007) Aynı çalışma popülasyonunda adjuvan kemoterapinin etkisi ihmal edildiğinde mikrosatellit instabilitenin sağkalıma etkisinin ortadan kalktığı görülmüştür.³²

Kolorektal karsinom tedavisi ile ilgili klinik çalışmalar gözden geçirildiğinde, kolorektal kanser adjuvan kemoterapisinde 5 Floorourasil ve Levülönik Asit kombinasyonunun önemini koruduğu görülmektedir.²

5 Florourasil içeren adjuvan kemoterapinin, mikrosatellit stabil (MSS)veya düşük düzeyde mikrosatellit instabil (MSI-L) tümörlerde yararlı etkileri öne sürülmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada her iki grup arasında 3 yıllık yaşam oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Literatürde mikrosatellit instabilitenin prognoz üzerine

olumlu katkılarını ileri süren çalışmalar çoğunlukta olmakla birlikte mikrosatellit instabilitenin prognoza etkisi kesinleşmemiştir. Bizim çalışmamızda hasta gruplarının yeterli sayıda olmamasından dolayı prognoza etkisi konusunda net bir sonuç beklenmemelidir. Bu konuda daha büyük hasta popülasyonlarını içeren ileri çalışmalar gerektiği düşünmekteyiz.

6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Mikrosatellit instabil kolorektal kanser grubunda primer tümörlerin, mikrosatellit stabil gruba göre proksimal kolonda daha sık yerleştiği saptandı.
2. Mikrosatellit instabil kolorektal kanser grubunda tanı olma yaşının, mikrosatellit instabil gruba göre daha erken olduğu belirlendi.
3. Mikrosatellit instabil kolorektal kanser grubunda müsinöz adenokarsinom sıklığı, mikrosatellit stabil gruba göre daha düşük oranda idi.
4. 4.Mikrosatellit instabil kolorektal kanser grubuyla mikrosatellit stabil grup arasında 3 yıllık yaşam oranları arasında fark saptanmadı.
5. Mikrosatellit instabilitenin, kolorektal kanserde prognoz üzerine olumlu katkıları öne sürülmektedir.bu konuda daha fazla sayıda hasta ile yapılacak çalışmalar daha güvenilir ve kesin sonuçlar verecektir.

KAYNAKLAR

- 1) **Gill S, Thomas RR, Goldberg RM.** Review article: colorectal cancer chemotherapy. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003;18:683-692
- 2) **Feldman, M.** *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease Pathophysiology/Diagnosis/Management, 7th edition. Philadelphia. Saunders:2002*
- 3) **Compton C, Greene FL.** The Staging of Colorectal Cancer :2004 and Beyond. *CA Cancer J Clin*, 2004;54:295-308.
- 4) **Meyerhardt JA, Mayer RJ.** Systemic Therapy for Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 2005;352:476-487.
- 5) **Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, Jallepalli PV, Shih I.M, Vogelstein B.** The role of chromosomal instability in tumor initiation. *PNAS*, 2002;99:16226-16231.
- 6) **Gryfe R, Kim H, Hsiesh ETK, Aronson MD, Holowaty EJ, Redston M.** Tumor Microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 2000;342:69-76.
- 7) **Iacopetta B.** Are There Two Sides To Colorectal Cancer. *Publication of the International Union Against Cancer*, 2002;101:403-408.
- 8) **Lawes DA, Sengupta S, Boulos PB.** The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. *European Journal of Surgical Oncology* , 2003;29:201-212.
- 9) **Wheeler JMD, Bodmer W.** DNA Mismatch repair genes and colorectal cancer. *Gut*, 2000;47:148-153.
- 10) **Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT.** Use of 5-Fluorouracil and Survival in Patients With Microsatellite-Unstable Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 2004;126:394-401.
- 11) **Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM.** Tumor Microsatellite – Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 2003;349:247-256.
- 12) **Parc Y, Gueroult S, Mourra N, Serfaty L, Fléjou JF, Tiret E, Parc R.** Prognostic significance of microsatellite instability determined by immunohistochemical staining of MSH2 and MLH1 in sporadic T3N0M0 colon cancer. *Gut*, 2004;53:371-375.
- 13) **Jass JR.** HNPCC and sporadic MSI_H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Familial Center*, 2004;3:93-100.
- 14) **Rustgi AK, Crawford JM.** *Gastrointestinal Cancers*, 1st edition. Saunders:2003.

- 15) **Narayan S, Roy D.** Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular Cancer*, 2003;2:41.
- 16) **Tejpar S, Cutsem EV.** Molecular and genetic defects in colorectal tumorigenesis. *Best practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2002;16:171-185.
- 17) **Ilyas M, Straub J, Tomlinson IPM, Bodmer WF.** Genetic Pathways in Colorectal and other Cancers. *European Journal of Cancer*, 1999;35:1986-2002.
- 18) **Fodde R.** The APC gene in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 2002;38:867-871.
- 19) **Marian B.** Colorectal cancer: modeling causes, prevention and therapy. *Elsevier*, 2004;1:1-6.
- 20) **Wynter CVA, Higuchi T, Leggert BA, Young J, Jass JR.** Methylation patterns define two types of hyperplastic polyp associated with colorectal cancer. *Gut*, 2004;53:573-580.
- 21) **Luebeck EG, Moolgavkar SH.** Multistage carcinogenesis and the incidence of colorectal cancer. *Medical Sciences*, 2002;99:15095-15100.
- 22) **Kurzwaski G, Suchy J, Debniak T, Kladny J, Lubiński A.** Importance of microsatellite instability (MSI) in colorectal cancer: MSI as a diagnostic tool. *Annals of Oncology* 15, 2004;4:283-284.
- 23) **Lawes DA, Gupta SS, Boulos PB.** The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. *EJSO*, 2003;29:201-212.
- 24) **Kambara T, Simms LA, Whitehall VLJ, Spring KJ, Wynter CVA, Walsh MD.** BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancer of the colorectum. *Gut*, 2004;53:1137-1144.
- 25) **Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JPI.** CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Medical sciences*, 1999; 96:8681-8686.
- 26) **Kahlenberg MS, Sullivan JM, Witmer DD, Petrelli N.J.** Molecular Prognostics in colorectal cancer. *Surgical Oncology*, 2003;12:173-186.
- 27) **Houlston RS, Tomlinson IPM.** Polymorphisms and Colorectal Tumor Risk. *Gastroenterology*, 2001;121:282-301.
- 28) **Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons L, Lutterbaugh J, Fan RS.** Inactivation of the type 2 TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, 1995;14:102 – 105.
- 29) **Souza RF, Yin J, Smolinski KN, Zou TT, Wang S, Shi YQ.** Frequent mutation of the E2F-4 cell cycle gene in primary human gastrointestinal tumors. *Cancer Res*, 1997;57:2325-1353.

- 30) **Ouyang H, Shiwaku HO, Hagiwara H, Miura K, Abe T, Kato Y.** The insulin – like growth factor II receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium, stomach, and colorectum. *Cancer Res*, 1997;57:1851 – 1854.
- 31) **Baba S.** Recent Advances in Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *World Journal of Surgery*, 1997;21:678-687.
- 32) **Haydon AMM, Jass JR.** Emerging pathways in colorectal-cancer development. *The Lancet Oncology*, 2002;3:83-88.
- 33) **Grady WM.** Genomic instability and colon cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2004;23:11-27.
- 34) **Bisgaard ML, Ripa R, Knudsen AL, Bülow S.** Familial adenomatous polyposis patients without an identified APC germline mutation have a severe phenotype. *Gut*, 2004;53:266-270.
- 35) **Lindblom A.** Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Current Opinion In Oncology*, 2001;13:63-69.
- 36) **Sevignani C, Wlodarski P, Kirillova J, Mercer WE, Daieison KG, Lozzo RV.** Tumorigenic Conversion of p53-deficient colon Epithelial Cells by an Activated Ki-ras Gene. *J. Clin. Invest*, 1998; Volume 101:1572-1580.
- 37) **Meyers M, Hwang A, Wagner MW, Boothman DA.** Role of DNA Mismatch Repair in Apoptotic Responses to Therapeutic Agents. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2004;44:249-264.
- 38) **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 16(3): 215.
- 39) **Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- 40) **Rass JR.** HNPCC and Sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Familial Cancer*, 2004;3:93-100.
- 41) **Watanabe T, Wu TT, Cataland PJ, Ueki T.** Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *The New Englan Journal of Medicine*, 2001;344:1196-1206.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Serkan YARAŞ

Doğum Tarihi ve Yeri: 28.05.1975/Yumurtalık/ADANA

Medeni Durumu: Evli

Adres: Beyazevler Mahallesi 17.Sok. Onsa Sitesi A Blok No:30/22 Seyhan/ADANA

Telefon: (0 322) 227 83 03

E.mail: serkan_yaras@yahoo.co.uk

Mezun olduğu Tıp Fakültesi: Hacettepe Üniversitesi Tıp fakültesi(1999)

Görev Yerleri: ÇÜTF İç Hastalıkları ABD

Yabancı Dili: İngilizce