



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

KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA GSTM1, GSTT1, GSTP1 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Özlem GÖRÜKMEZ

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2014



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

KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA GSTM1, GSTT1, GSTP1 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Özlem GÖRÜKMEZ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Tahsin YAKUT

BURSA-2014

İÇİNDEKİLER

Özet	ii
İngilizce Özet	iii
Giriş	1
Gereç ve Yöntem	30
Bulgular	38
Tartışma ve Sonuç	53
Kaynaklar	59
Teşekkür	67
Özgeçmiş	68

ÖZET

Kolorektal kanser (KRK) dünya çapında üçüncü en sık görülen kanserdir ve kanser ölümlü nedenler arasında dördüncü sıradadır. KRK endojen faktörlere maruz kalma ile kişiye ait genetik altyapının kompleks olarak etkileşimi sonucunda riski değişen multifaktöriyel bir hastalık olarak düşünülmektedir. Glutasyon S-transferazlar KRK için yatkınlık oluşturan genler gibi davranmaktadır ve direkt olarak glutasyon ile kemoteropatikler, çevresel kirlenici maddeler ve geniş spektrumlu ksenobiyotikler arasındaki konjugasyonda gereklidirler.

Bu çalışmaya 116 kolorektal kanser tanılı hasta ve 128 kontrol dahil edildi. GSTT1 ve M1 gen polimorfizmini belirlemede Multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction) kullanıldı, GSTP1 (Ile105Val) gen polimorfizmi PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) kullanılarak çalışıldı. İstatistiksel analizde $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Çalışmamızda KRK yatkınlığı ve GSTT1 ve M1 delesyon polimorfizimleri arasında ilişki saptanmazken, GSTP1 (Ile105Val) gen polimorfizmi Ile/Ile genotipini hasta grubunda anlamlı olarak yüksek saptadık. Ayrıca kolorektal kanser hastalarının klinikopatolojik özellikleri ile GSTT1, M1 ve P1 gen polimorfizimleri arasında ilişki saptamadık. GSTT1 null, GSTM1 pozitif ikili kombine genotipi ve GSTT1 null, GSTM1 pozitif, GSTP1 Ile/Ile üçlü kombine genotipini hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptadık.

Sonuçlarımız GSTT1, M1 gen polimorfizimleri ile KRK ve klinikopatolojik özellikleri ile arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir. GSTP1 Ile/Ile genotipi ile KRK yatkınlığı arasında ise anlamlı ilişki saptanmıştır. Gelecekte daha büyük hasta grupları üzerinde yapılacak çalışmalar KRK hastalarında GST gen polimorfizimleri ve klinikopatolojik ilişkilerin ortaya konulmasında daha sağlıklı verilerin elde edilmesini sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Kolorektal kanser, GSTM1, GSTT1, GSTP1

SUMMARY

Investigation of GSTM1, GSTT1, GSTP1 Gene Polymorphisms in Colorectal Cancer Patients

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide and it is the fourth common cause of cancer related deaths. CRC is considered to be a multifactorial disease whose risk varies due to the complex interaction between individual genetic basis and exposure to endogenous factors. Glutathione S-transferases act like predisposing genes for CRC and they are required for the conjugation between chemotherapeutics, environmental pollutant and broad spectrum xenobiotics.

In this study 116 patients with CRC and 128 control subjects were enrolled in this study. Multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction) was applied in order to determine the polymorphisms for GSTT1 and M1 genes and PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) was applied for GSTP1 (Ile105Val) gene polymorphism. Values $p < 0,05$ were accepted to be statistically significant.

We detected statistically significantly high Ile/Ile genotype of GSTP1 gene polymorphism in CRC patients while we could not find relationship between predisposition for CRC and GSTT1 and M1 deletion polymorphisms. Besides we could not screen relationship between GSTT1, M1 and P1 gene polymorphisms and clinicopathological features of CRC. The combination of GSTT1 null, GSTM1 present genotype and combination of GSTT1 null, GSTM1 present, GSTP1 Ile/Ile genotype were statistically significantly higher in patients' group.

Our results revealed that there is no relationship between CRC and its clinicopathologic features and GSTT1, M1 gene polymorphisms. However there was a significant correlation between CRC and GSTP1 Ile/Ile genotype. Further studies with larger patient groups are required in order to exhibit the

relationships between GST gene polymorphisms and clinicopathologic features of CRC.

Key Words: Colorectal cancer, GSTM1, GSTT1, GSTP1

GİRİŞ

Kanser dünya çapında önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir ve son 20 yıl içinde gelişmiş ülkelerde mortalite nedenleri arasında ikinci sıraya yükselmiştir. Globocan verilerine göre 2012 yılında dünyada toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm bildirilmiştir. Dünya'da en çok tanı konulan kanserler sırasıyla akciğer (%13), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) iken kanserden ölümlerin ise en çok akciğer (%19,4), karaciğer (%9,1) ve mideden (%8,8) gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu şekilde kanser artış hızının devam etmesi durumunda 2025 yılında toplam 19,3 milyon yeni kanser vakası olacağı belirtilmiştir. Gerek kanser vakalarının (%56,8) gerekse kanserden kaynaklanan ölümlerin (%64,9) yarısından fazlasının az gelişmiş ülkelerde olduğu gösterilmiştir. Kolorektal kanserler (KRK) gastrointestinal sistemin en çok rastlanan kanseridir. Erkeklerde prostat ve akciğer kanserinden sonra üçüncü sıklıkta, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sıklıkta görülmektedir. Her yıl yaklaşık olarak kolorektal kanser (KRK) nedeniyle 694.000 insan ölmektedir (1,2).

Yaş sporadik KRK'in en büyük risk faktörlerinden birisidir. Kolon kanseri tanısı 40 yaşından genç bireylerde nadir konulan bir tanıdır. İnsidans 40 – 50 yaşlar arasında hızla yükselir ve ilerleyen her dekatta insidans artışı devam eder. Vakaların %90'ı 50 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır. Ortalama risk grubundaki bireyler için yaşam boyu kolon kanseri gelişme riski yaklaşık %5 civarındadır. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre %25 daha yüksektir. Risk oranı kalıtsal sendromlar söz konusu olduğunda yükselmektedir (3,4). Herediter KRK'ler tüm olguların %5'ini oluşturmaktadır. KRK'lerin tamamına yakını adenomlardan kaynaklanmaktadır (5).

Çevresel ve genetik faktörler KRK'nin gelişme olasılığını artırmaktadır (6). Genetik yatkınlığı olanlarda çevresel faktörlerin etkisi ile kanser gelişme riskinin arttığı ortaya konmuştur (7). Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesi genomun hasara uğramasına neden olan birçok mutasyonu gerektirmektedir. Genomdaki bu hasar, DNA replikasyonunda

meydana gelen hataların sonucu olabileceği gibi, metabolizma sırasında meydana gelen serbest radikallerin bazı DNA bazlarına saldırması gibi nedenlerden de kaynaklanabilmektedir. DNA hasarı, ionize radyasyon, UV radyasyon ve kimyasal karsinojen gibi ajanların etkileşimi ile de gerçekleşebilmektedir (8).

Genomda çoğunluğu tek nükleotit düzeyinde olmak üzere (insanda on milyon kadar), ikili, üçlü nükleotit tekrar sayılarında değişiklikler ve daha az kromozom düzeyinde bazı yapısal düzenlemeler şeklinde genetik polimorfizmler vardır. Tek nükleotit değişimlerini (varyasyon; polimorfizm) içeren genler, toplumda %1'den daha fazla sıklıkta bulunan allel genler olarak tanımlanır. İnsan genom dizilim çalışmaları her insan genomunda DNA'nın %99,9 benzerlik gösterdiğini kanıtlamıştır. Geriye kalan %0,1'lik fark, bireysel genotip ve fenotipik değişikliklerin sorumlusudur. Tek nükleotit değişimleri insan genomunda en çok bulunan (ortalama her 1000 nükleotitte bir) DNA dizi değişimleridir. Diğer genetik polimorfizm tipleri; değişik uzunlukta ikili ya da üçlü nükleotit tekrarları ve DNA'da eksilme ya da artmaları içerir (9).

Glutasyon S-transferazlar (GST) faz II metabolik enzimlerin süper familyasını temsil eder ve glutasyon ile kemoteropatik ilaçlar, karsinojenler, çevresel kirlenici maddeler ve ksenobiyotiklerin geniş spektrumu arasındaki konjugasyonu katalize ederler. GST izoenzimleri farklı gelişimsel orjinleri olan üç ayrı gen (sitozolik, mikrozomal ve mitokondrial transferazlar) ailesi tarafından kodlanmıştır ve bu da çevrede memeli türü için elektrofollere ve oksidatif strese karşı koruma sağlar. Bu genlerdeki polimorfizimler çoğunlukla enzimatik aktivitenin azalmasına yol açar. Örneğin GSTA1 genindeki C69T homozigot polimorfizmi wild tip homozigotla karşılaştırıldığında azalmış enzimatik aktiviteye sahiptir. Aynı zamanda GSTP1'in fonksiyonel polimorfizmi (rs1695, Ile105Val) düşük enzim aktivitesi ile sonuçlanır. Enzimatik aktivitesi olmayan GSTM1 geni null genotipi beyaz ırkın %40-60'ında rapor edilmiştir ve GSTT1 null genotip frekansı beyaz ırk popülasyonunda %10-20'dir. Sporadik KRK diyet veya yaşam tarzı gibi belli çevresel faktörler ile genetik altyapı arasındaki etkileşimden kaynaklanan

multifaktöriyel bir hastalıktır . Fakat sporadik KRK'deki genetik altyapının tam rolü belirsiz kalmıştır. Glutasyon ve kemoteropatikler, çevresel kirlenici maddeler ve ksenobiyotiklerin geniş spektrumu arasındaki konjugasyonda direkt olarak rol aldıklarından dolayı Glutasyon S-transferazlar KRK için ilgi çekici yatkınlık oluşturunca genlerdir. GST geninin genotip frekanslarında jeografik ve etnik varyasyonlar mevcuttur ve KRK ile GST genetik polimorfiziminin ilişkisi çeşitli etnik popülasyonlarda geniş bir şekilde araştırılmıştır fakat sonuçlar tutarsızdır (10). Biz burada Türk popülasyonunda KRK'ye olan yatkınlıkta GST genetik polimorfizminin etkisi az bilindiği için hem tek başına hem de kombine olarak GST gen polimorfizmi ile KRK yatkınlığı arasındaki ilişkiyi belirlemeyi amaçladık.

Kolorektal Kanser Epidemiyoloji

Kolorektal kanser, gastrointestinal sistemin en sık görülen kanseridir. KRK, tüm kansere bağlı ölümler arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alır ve 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %55'tir. Her yıl Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) yaklaşık olarak 146.970 yeni KRK vakası ortaya çıkmaktadır. Bunların ortalama 106.100'ü kolon kanseri, 40.870'i rektal kanserdir (11). TC Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Daire Başkanlığı'nın (TCKSDB) 2009 yılı istatistik sonuçlarına göre KRK, yaşa standardize hız dağılımı bakımından erkeklerde akciğer, prostat ve mesane kanserinden sonra dördüncü sırada, kadınlarda meme ve tiroid kanserinden sonra üçüncü sırada görülmektedir (12).

Sporadik KRK'lerin büyük çoğunluğu 6. dekatta gelişmektedir. Bir polibin oluşup kansere ilerlemesi için geçen süre yaklaşık olarak 10 yıl kabul edilmektedir. Yüksek riskli gruplarda bu süre çok daha kısa olabilir. Bu nedenle genelde 50 yaş ve üzeri bireyler orta risk grubu olarak değerlendirilirler. Kolorektal kanserlerin 45 yaş altı gibi daha erken yaşlarda ortaya çıkışı ise daha nadir bir durum olup, tüm kolon kanserlerinin yaklaşık %2-8'ini oluşturmaktadır. Vakaların %90'ı 50 yaşından sonra görülmektedir

(4,13,14). Yaş grupları ve cinsiyete göre kolorektal kanser insidansı ve mortalitesi aşağıdaki tabloda verilmiştir (15) (Tablo-1,2).

Tablo-1: Yaşa standardize SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) kolorektal kanser insidans oranları* (15).

Tanı Anındaki Yaş	Her İki Cinsiyet	Erkek	Kadın
Tüm yaşlar	45	52,2	39,3
65 Yaş altı	18,2	20,7	15,9
65 Yaş ve üzeri	230,4	270	200,9

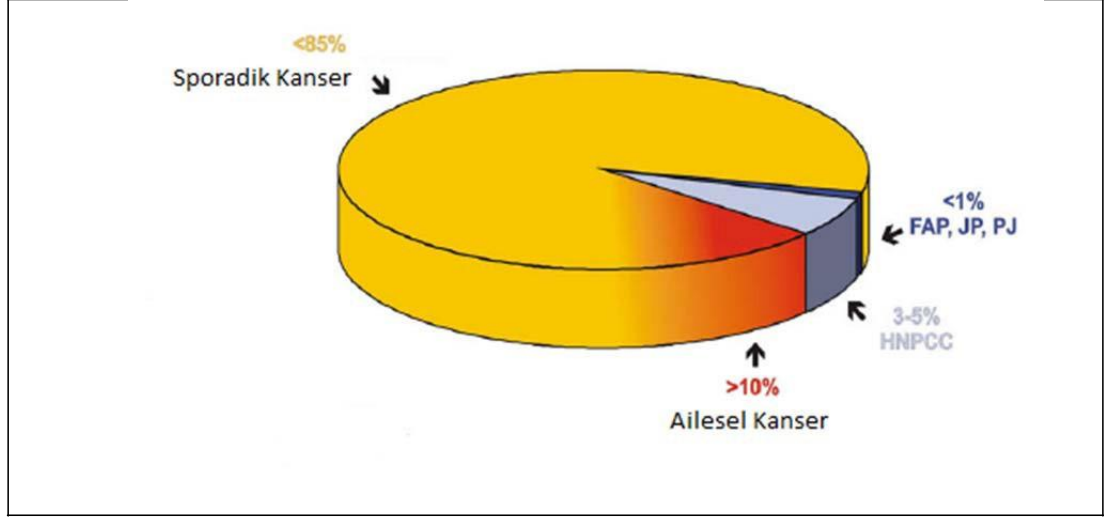
Tüm Irklar, 2006-2010, *Yüzbinde.

Tablo-2: Yaşa standardize Amerika Birleşik Devletleri kolorektal kanser mortalite oranları* (15).

Ölüm Anındaki Yaşı	Her İki Cinsiyet	Erkek	Kadın
Tüm Yaşlar	16,4	19,6	13,9
65 Yaş Altı	4,9	5,8	4,1
65 Yaş ve Üzeri	95,5	115,2	81,3

Tüm Irklar, 2006-2010, *Yüzbinde.

Dünya genelinde, KRK'lerin %85'i sporadik, yaklaşık %15'i aileseldir. (16) (Şekil-1).



Şekil-1: Sporadik ve ailesel kolorektal kanser insidansları. FAP: Familial adenomatozis polipozis, HNPCC:Hereditör nonpolipozis kolorektal kanser, JP:Familiyal Juvenil polipozis, PJ: Peutz-Jeghers sendromu (16).

Kolorektal Kanserde Etiyolojik Faktörler

KRK etiolojisinde temel mekanizma kolonik mukoza epitel hücrelerindeki genetik değişimdir (17). Buna eklenen ve kolorektal karsinogenezi başlatan belli başlı epidemiyolojik ve çevresel faktörler mevcuttur (18).

Çevresel Faktörler

Kolorektal kanser etiolojisinde günümüze kadar saptanan en önemli ekzojen risk faktörü diettir. Diyetle kırmızı et tüketiminin fazla olması, aşırı yağlı diyet, fibrin içeren gıdaların yetersiz tüketimi, günlük 30 gr'dan fazla alkol tüketimi, obezite özellikle de abdominal obezite kolorektal kanser riskini arttıran faktörler arasındadır. Sigara, kolorektal kanser için prekürsör olduğu kabul edilen büyük adenomlarla ilişkilidir. Amerika'da her 5 kolorektal kanserden biri sigaraya bağlıdır (19,20). KRK etiolojisinde etkili olan çevresel faktörler Tablo-3'te özetlenmiştir (21).

Tablo-3: Kolorektal kanser etiolojisinde etkili olan çevresel faktörler (21)

Muhtemel ilişkili faktörler	Muhtemel koruyucu faktörler
Yüksek yağ ve düşük lif tüketimi	Yüksek lif tüketimi
Bira tüketimi	Aspirin, NSAİ ilaçlar ve kalsiyum
Diyette selenyum düzeyinin düşük olması	Yeşil yapraklı sebze ile beslenme
Çevresel karsinojenler ve mutajenler	Siklooksijenaz-2(COX-2) inhibitörleri
Fecapenteanes (kolonik bakterilerden)	Azalmış vücut kitle indeksi
Heterosiklik aminler	Hormon replasmanı (östrojen tedavisi)

Genetik Faktörler

KRK'lerin büyük çoğunluğunun öncü lezyonu olan adenomatöz poliplerden kansere doğru uzanan süreci içerir. Bu süreç kalıtsal veya edinsel olsun bir dizi genetik değişikliklerle karakterizedir. Genel olarak kanser gelişimi tek bir mutasyonel süreç sonucunda olmamaktadır. Kanser gelişebilmesi için; büyüme ve hücre siklusu düzenlenmesine katılan onkogenlerde aktive edici mutasyonlar ile birlikte hücre siklusunda düzenleyici ve baskılayıcı etkileri olan tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kayıplarının olması gereklidir. Ardışık bir dizi genetik değişiklik ek hücrel değişiklik ile birlikte kanser gelişimine neden olur (22).

Famlyal Adenomatöz Polipozis (FAP)

Famlyal adenomatöz polipozis yaşamın ikinci dekatında kolon ve rektumda sayıları yüzlerce veya binlerce olabilen çok sayıda polip ile karakterize otozomal dominant (OD) geçiş gösteren kalıtsal bir hastalıktır. Doğumdaki insidansı 1/8300'dür ve her iki cinsiyette eşit olarak görülür. Çoğu hasta adenomların büyüklüğü ve sayısı artıp rektal kanama ve anemi yapana kadar veya kanser gelişene kadar asemptomatiktir. Genellikle poliplerin görülmesinden bir dekat sonra kanser gelişimi başlar. Konstipasyon, diyare, abdominal ağrı, palpable abdominal kitle, kilo kaybı gibi nonspesifik semptomlar görülebilir. Kolorektal adenokarsinomların sadece %1'inden sorumludur (16). FAP'ta görülen genetik anormallik APC (Adenomatous polyposis coli) gen mutasyonudur. FAP'lı hastaların %75'inde APC mutasyon

testi pozitifdir. FAP'lı hastaların çoğunda bilinen aile öyküsü vardır. Ancak hastaların %25'inde başka bir aile ferdinde tutulum yoktur. Klinik olarak hastalarda puberteden hemen sonra yüzlerce ya da binlerce adenomatöz polip gelişir. Bu hastalarda yaşam boyu KRK riski yüksek olup, bu risk 50 yaşında %100'e ulaşır (23).

Attenüe Familial Adenomatöz Poliposis Sendromu (AFAP), FAP'ın daha az agresif varyantıdır. Genellikle sağ kolona lokalizedir, rektum invazyonu nadirdir ve 10-100 arası polip mevcuttur. Tanı yaşı polipler için ortalama 44, kanser için ortalama 56'dır (24). Kolorektal karsinom gelişme riski %50'den fazladır. FAP'tan farklı olarak 55 yaş üzerinde ortaya çıkar. APC gen mutasyonu FAP'ın aksine sadece %30 hastada pozitifdir (23).

Gardner sendromu, FAP sendromunun kolon dışı bulgularla giden formudur. Epidermal kist, lipom, fibrom gibi cilt lezyonları, retinal pigmentasyonlar, osteomlar, desmoid tümörler, adrenal adenomlar gibi benign lezyonların dışında ampuller karsinom (%5), tiroid kanserleri (%2) ve mide kanseri (%1) gibi malign lezyonlarla birlikte bulunur. FAP'lı takip hastaları izlemde bu tümörler açısından da takip edilmelidir.

Turcot sendromu otozomal resesif nadir bir hastalıktır. Hastalarda 30'lu yaşlara kadar ortaya çıkan kolon kanseri ve beyin tümörleri mevcuttur. Hastaların 2/3'ünde APC gen mutasyonu gözlenmektedir. Hastaların 1/3'ünde DNA onarım bölgelerinin (MLH1, MSH2 vb.) mutasyonu mevcuttur. Beyinde APC gen mutasyonu ile seyreden medulloblastom ve MMR (mismatch repair) gen mutasyonu ile seyreden glioblastoma multiforme gözlenir. Yirmili yaş kolon kanser olgularında beyindeki kitleler bu nedenle hemen metastaz kabul edilmemelidir (25).

FAP, AFAP, Gardner ve Turcot sendromları kromozom 5q21 bölgesinde yerleşimli, tümör süpressör bir gen olan APC genindeki germline mutasyonlar sonucunda oluşmaktadır (26). Ailesel sendroma sahip hastalar APC geninin mutant bir kopyasını geçirirler; diğer APC alelinde işlev kaybına neden olan bir mutasyon geliştiğinde mukoza epitel hücrelerinin büyümesi normal olarak kontrol edilemez ve polip gelişir (27).

MUTYH (MutY homolog gen) İlişkili Polipozis Sendromu

Ecoli mutY geninin mutasyonu durumunda oksidatif strese bağılı ortaya çıkan DNA hasarları onarılamaz. Bazı mutiple kolorektal adenomlu kişilerde, mutY gen mutasyonu APC gen mutasyonu ile birliktelik göstermekte, FAP veya attenuated FAP sendromuyla klinik olarak karışabilen tablolara neden olmaktadır. Otozomal resesif (OR) bir kalıtsal geçiş gösteren MUTYH ilişkili polipozis sendromu ağırlıklı olarak proksimal yerleşimli kolon tümörleri ve üst gastrointestinal sistem polipleri, osteomlar, sebace bez tümörleri gibi kolon dışı bulgularla seyreder (28).

Lynch Sendromu (Hereditör Non-Polipozis Kolorektal Kanser Sendromu)

Tüm KRK'lerin %3'ünü oluşturmaktadır. Ailesel KRK'lerin en sık gözlenen formudur. Dikkat çeken fenotipik özelliği erken yaşta kolon kanser gelişimi, sağ veya proksimal kolonda 100'e kadar polip içermesidir (nonpolipozis olarak adlandırılır) (29). Ayrıca endometriyum, over, mide, ince bağırsak, hepatobiliyer sistem, idrar yolu, beyin ve cilt kanserleri için bir risk artışı ile karakterizedir. Hayat boyu KRK gelişim riski %52-80 (ortalama tanı yaşı 44-61), endometrial kanser riski %25-60 (ortalama tanı yaşı 48-62), mide kanser riski %6-13 (ortalama tanı yaşı 56), over kanser riski %4'tür (ortalama tanı yaşı 42,5) (30). HNPCC olgularındaki adenomlar, sporadik vakalara göre daha fazla villöz komponent içerir ve daha displastik olma eğilimindedir. Genel olarak evreye göre sağkalım oranları sporadik KRK vakalarına göre daha iyidir. HNPCC klasik olarak Modifiye Amsterdam kriterleri ile tanımlanmıştır. %80 penetransı olan OD bir hastalıktır (31). Lynch sendromunda görülen genetik sorun MMR (mismatch repair) gen mutasyonuna bağılı olarak gelişen mikrosatellit instabilite (MSI) artışıdır. Hastalarda gözlenen mutasyonlar MSH2 (%60), MLH1 (%30), MSH6 (%6) ve PMS2 (%5) şeklindedir. MSH6 mutasyonuna sahip olanlar diğerlerine göre daha ileri yaşlarda kanser geliştirirler. Mutasyona bağılı olarak; DNA replikasyonu sırasında ortaya çıkan hatalar onarılamaz. Bu özellikle mikrosatellit sekanslarında belirgindir (25). MSI, HNPCC olgularının %90'ında ve sporadik KRK vakalarının %12-15'inde mevcuttur. %60 vakada

MLH1 ve MSH2 genlerinden birinde germline mutasyonlar saptanmıştır. Germline mutasyon saptanırsa diğer aile üyeleri bu mutasyon açısından genetik olarak taranmalıdır .

HNPCC tanısı için 1990 yılında alınan ve “Amsterdam kriterleri” olarak geçen “İnternational Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma” (ICG-HNPCC) kriterleri revize edilerek şu şekilde belirlenmiştir: Ailede, biri birinci derecede olmak üzere üç ya da daha fazla bireyde histopatolojik olarak tanı almış KRK bulunması, KRK’in en az iki jenerasyonda ortaya çıkması, en az bir vakanın 50 yaş altında tanı alması, KRK’ye neden olabilecek FAP sendromlarının olmaması (30). Amsterdam kriterlerine uyan ancak MSI saptanmayan ailelerde, kolorektal ve kolon dışı kanser gelişme olasılığı, saptanan ailelere göre daha düşüktür. HNPCC ise aile temelli bir terimdir ve aile öyküsü bilinmeden HNPCC tanısı söylenemez. Bu amaçla kimlere MSI testinin yapılması gerektiğini belirleyebilmek amacıyla yenilenmiş Bethesda kriterleri geliştirilmiştir.

Bethesda Kriterleri;

50 yaşından daha genç tanısı konmuş KRK,

Senkron, metakron kolorektal ya da diğer HNPCC ilişkili tümörlerin varlığı,

60 yaşından daha genç bir bireyde yüksek derece mikrosatellit instabilite (MSI-H) özelliği gösteren KRK varlığı; tümör infiltrasyonu gösteren lenfosit varlığı, Crohn benzeri lenfositik reaksiyon, müsinöz/taşlı yüzük morfolojisi veya medüller büyüme paterni,

50 yaşından daha genç birinci derece akrabasında tanısı konmuş KRK veya HNPCC ilişkili tümör varlığı

Herhangi bir yaşta birinci veya ikinci derece iki akrabasında tanısı konmuş KRK veya HNPCC ilişkili tümör varlığı (32).

Muir-Torre sendromu

Muir-torre sendromu HNPCC varyantı olarak kabul edilmektedir (33). Muir-Torre sendromu OD geçişli bir sendromdur. MSH2 ve MLH1 mutasyonu görülür. Klinik olarak sebace cilt tümörleri ile birlikte; kolon, endometrium, genitoüriner sistem, meme ve over kanserleri görülür. Muir-Torre sendromlu

hastaların yaklaşık %35'inde MSI yoktur. Bu hasta grubunda mutY gen mutasyonu veya MLH1 gen hipermetilasyonu söz konusu olabilir (25).

Hamartomatöz Polipozis Sendromları

Peutz-Jeghers Sendromu intestinal polip ve ağız, eller, ayak tabanında mukokutanöz pigmente lekeler varlığı ile ilk kez 1921 yılında Peutz tarafından tanımlanmıştır. Lezyonun karakteristik özelliği kahverengiden siyaha kadar değişen renkte dudaklarda, ağız çevresinde ve oral mukozada yerleşmiş melanin pigmentasyonlarıdır. Bu melanitik lekeler avuç içi, ayak, burun mukozası, konjunktiva ve rektumda da olabilir. Polipler %55 ince barsakta lokalizedir, ancak mide, duodenum (%30), kolon ve rektumda da (%15) lokalize olabilirler. Polipler hamartomatoz poliplerdir. Nadirdir ve her iki cinsiyette eşit görülür. Vakaların çoğu OD geçiş gösterir. Vakaların %30'u yaşamın ilk 10 yılında, %50'si 20 yaşında bulgu verir. %22'sinde kanser (%13 gastrointestinal veya pankreatik, %9'u ekstraintestinal) gelişir. Ekstraintestinal kanserler over, uterin, serviks, testis, meme, tiroid, pankreas ve mesaneyi içerir (34). Klinik olarak tanı alan hastaların büyük kısmında, kromozom 19p13.3 üzerinde yer alan ve serin treonin kinaz (STK) proteinini kodlayan tümör süpresör STK11 geninde mutasyonlar tespit edilmiştir (35).

Juvenil polipler seyrek olarak yerleşim gösteren dilate kistik glandlar içeren lamina proprianın hamartomatöz proliferasyonlarıdır. En sık beş yaş altındaki çocuklarda görülür. Fakat bu tip poliplere yetişkinlerde herhangi bir yaşta da rastlanabilir. Yetişkinlerde görülenlere retansiyon polipleri adı verilir. Çocuklarda lezyonlar genelde daha büyük bir çapa sahipken (1-3 cm), yetişkinlerde daha küçüktür. Yuvarlak düzgün ya da hafifçe lobüle yapıda olup, bazen 2 cm uzunluğa kadar ulaşabilen bir sapa sahiptir. Genelde rektumda tek tek görülür ve hamartomatöz olduğundan malignite potansiyeline sahip değildir (36). OD kalıtılmaktadır. Hastaların %15 ile %20'sinde kromozom 18q21.1'de yerleşimli olan SMAD/DPC4 (deleted in pancreatic cancer lokus 4) geninde mutasyonlar tespit edilmiştir. SMAD/DPC4 geni TGF-beta sinyal yolağında kritik stoplazmik mediyatörlerin sentezinden sorumludur. Hastaların %25 ile %40'ında kromozom 10q22-23

yerleşimli BMPR1A (bone morphogenetic protein receptor 1A) geninde mutasyonlar saptanmıştır. Sporadik olgular da bildirilmiştir (37).

Cowden sendromu üç germ yaprağından gelişen organlardaki multipl hamartomlar ile karakterize, OD geçişli sendromdur. Cowden sendromu ile ilişkili klasik hamartom trishilemomadır. Diğer klinik bulguları; mukokutanöz lezyonlar, tiroid anomalileri, memenin fibrokistik hastalığı ve karsinomu, gastrointestinal hamartoma, çok sayıda erken başlayan uterin leiomyomlar, makrosefali ve mental retardasyondur. Gastrointestinal polipler, vakaların %35'inde görülmektedir. Cowden sendromunun gastrointestinal polipleri malign potansiyel taşımaz (38). Bununla birlikte hastaların yaklaşık %10'unda tiroid tümörleri ve yaklaşık %50'sinde meme tümörleri gelişir. Germline PTEN (phosphatase ve tensin homolog) mutasyonları bildirilmiştir (39).

Tablo-4: Kolorektal kanser sendromları, özellikleri, ilişkili genleri (40).

Kolorektal Kanser Sendromları	Kanserler/Özellikleri	Gen ve ya Genler
HNPCC	Kolon, Uterus, Over, Gastrik, Üreter, Böbrek, Hepatobiliyer, Duedonal	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM
FAP	Kolon, >100 Polip	APC
AFAP	Kolon, 10-100 Polip	APC
MAP	Kolon, 500'e Kadar Polip	MUTYH
JP	Kolon, Hamartomatöz Polipozis	SMAD4, BMPR1A
PJS	Kolon, Testis, Meme, Uterus	STK11
CS	OD	PTEN

HNPCC: Herediter Non-Polipozis Kolorektal Kanser, FAP: Familial Adenomatöz Polipozis, AFAP: Attenüe Familial Adenomatöz Polipozis, MAP; MUTYH (MutY homolog gen) ilişkili Polipozis, JP; Juvenil Polipozis, PJS; Peutz-Jeghers Sendromu, CS; Cowden sendromu

Prekanseröz Hastalıklar

Kolorektal polipler

İltihabi (inflamatuvar) barsak hastalıkları

Kolorektal Polipler

Polip terimi barsak lümenine doğru oluşan herhangi bir epitelyal lezyona verilen addır. Polip klinik ve endoskopik bir terim olup, makroskopik tanımlar yapılır ancak en önemli özelliği histolojik tipidir (41). Polipler patolojik olarak adenomatöz polip, juvenil polip (nonneoplastik hamartom), hiperplastik polip (hiperplastik mukozal proliferasyon) olarak sınıflandırılır. Adenomlar histolojik açıdan üç ana gruba ayrılır. Bunlar; tübüler adenomlar, villöz adenomlar ve tübülovillöz adenomlardır. En sık rastlanan ve kolonoskopide çıkartılan adenomların %70-85'i tübüler, %5'inden azını villöz adenomalar, %10-25'ini tübülovillöz adenomalar oluşturur (42). Kolorektal polipler olduğu mukozaya bir uzantı ile bağlı olabilir (pediküllü, saplı polip) ya da geniş bir taban ile mukoza üzerine oturabilir (sesil, sapsız polip). Poliplerde büyüme ya da ülserasyon gözlemlendiğinde malignite yönünden değişim akla getirilmelidir. Çok sayıda ve yaygın olduğunda polipozis olarak isimlendirilir. Kesin tanı histopatolojik inceleme sonucu yapılır. KRK'lerin %33'ünün etyolojisinde polip oluşumu gözlenmiştir. En sık görülen polip tipi hiperplastik polipler olup kanserleşmezler. Adenomatöz polipler ise 2. sıklıkta görülen ve neoplastik tipte poliplerdir. Adenomatöz poliplerin %1'inden azı maligndir; çapı 2 cm'den büyük, sapsız, villöz yapıda, multipl ve displazik özellik gösteren adenomatöz polipler, kolorektal kanser gelişimi açısından risk oluşturmaktadırlar. Orta yaş ve yaşlıların %30'undan fazlasında adenomatöz polip bulunabilir ama bu poliplerin %1'inden azı maligndir (41) Malignite insidansı tubuler adenomlarda %1-5, villoz adenomlarda yaklaşık %30-70'dir (43). Karsinom gelişim riski, adenomatoz poliplerin histolojik tipinden başka çap, displazi derecesi ve sayı ile de ilişkisi vardır (44). Çapları 2 cm'den büyük olanlarda karsinoma riski %50'ye kadar çıkmaktadır (45). "Serrated" polipler histolojik olarak hem adenomatoz hem de hiperplastik polip özellikleri gösterirler. Mikroskopik olarak testere dişi görünümüne sahip bu poliplerin, adenomatoz poliplerle benzer KRK riskine sahip olduğu gösterilmiştir. KRK'lerin büyük çoğunluğunun öncü lezyonu olan adenomatöz poliplerden, kansere doğru uzanan süreç, kalıtsal veya edinsel olsun bir dizi genetik değişikliklerle karakterizedir (25).

İnflamatuvar Barsak Hastalıkları

İnflamatuvar barsak hastalıklarında KRK riskinin hastalık süresi ile orantılı olarak arttığı bilinmektedir. Bu grupta ortalama %3-8 olan kanserleşme oranı, hastalığın başlamasından 10 yıl sonra %10'a, 25 yıl sonra %30'lara kadar yükselmektedir. Pankollitisi olanlarda daha sık görülen kanserler, çoğu kez multifokal gelişim gösterirler (46).

Klinik Bulgular ve Tanı

Kolon kanserleri genel olarak yavaş seyirlidir. Semptom ve bulgular tümörün lokalizasyonu, mikroskopik-makroskopik yapısı ve kanama, perforasyon, tıkanma gibi komplikasyonların varlığına göre değişir. Sağ kolonda gelişen kanserler vejetan veya ülseröz tiptedir. Çekum, çıkan kolon ve transvers kolonun sağ yarısının çapı, sol kolon ve sigmoid kolona göre yaklaşık 2-2,5 kat daha geniştir ve sağ kolonda dışkı suludur. Bu nedenle kural olarak tıkanma görülmez. Ancak bazı hastalarda çekumda lokalize tümörün ileoçekal kapağı infiltre etmesi ile ince bağırsak tipi tıkanma gelişebilmektedir. Sağ kolon kanserli hastalarda çoğunlukla karın ağrısı, hazımsızlık, halsizlik, çabuk yorulma gibi yakınmalar olmaktadır. Kısa bir süre içinde gelişen belirgin kilo kaybı bir diğer önemli bulgudur (47).

Sağ kolon lezyonları genellikle ülser olup gaitanın görünümünde değişiklik yapmaksızın kronik, sinsi kan kaybına yol açar. Kanser, aralıklı olarak kanama yaptığından rastgele yapılan gaita gizli kan testi negatif olabilir. Sonuç olarak herhangi bir erişkinde açıklanamayan demir eksikliği anemisinin varlığı (premenapozal multipar kadınlar istisna) kolonun tümünün endoskopik ve/veya radyografik olarak incelenmesini zorunlu kılar (48). Tümör sol kolonda yerleşmiş ise; lümenin darlığı, feçesin sert olması, tümörün daha çok anüler tarzda büyümesi nedeniyle konstipasyon bulguları sık görülür (49). Rektal kanama ikinci sıklıkta bildirilen yakınmadır. Aşkar ya da gizli olabilir. Tümör distale yaklaştıkça kanama kırmızı olur. Karın ağrısı, yemeklerden sonra şişkinlik, hazımsızlık gibi nonspesifik şikayetler akut apandisit, kolesistit veya peptik ülser ile karıştırılabilir. Rektum tümörlerinde

ağrılı dışkılama görülebilmekle birlikte bu geç dönem bulgusudur. Hastaların yaklaşık %5'i kemik ağrısı, sarılık, patolojik kırık, nörolojik bulgular, tromboflebitler ve deri nodülleri gibi metastaz bulguları ile başvururlar (50). Hastalığın tanısında dikkatli öykü, belirtilerin değerlendirilmesi ve fizik muayene önemlidir. Fizik muayenenin bir parçası olan dijital rektal muayenenin yapılması rektum kanserinin tanınmasında yararlıdır. KRK düşünülen hastada tanısal amaçlı gaita gizli kanama (GGK), kolonoskopi, kolonoskopik biyopsi de yapılmalıdır. Tedaviye başlamadan önce evreleme ve takip amacı ile de akciğer grafisi, abdomen ve pelvisin bilgisayarlı tomografi ile değerlendirilmesi, tam kan sayımı, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri, tam idrar tetkiki, tümör belirteçleri mutlaka bakılmalıdır. İzlemede bulgu ve belirtilere göre değişen tetkikler yapılır. Karsino Embriyojenik Antijen (CEA), CA19.9 gibi tümör belirteçleri hastalığın takibinde yararlıdır, ancak tanıda yerleri yoktur (51). Endorektal ultrasonografi veya endorektal coil ile yapılan manyetik rezonans görüntüleme (MR) ile tümörün barsak duvarındaki invazyon derinliği ve lenf nodu tutulumu tespit edilebilir. Pozitron emisyon tomografisi (PET), pahalı bir yöntem olup BT ve MR'de rekürrens ya da skar dokusu ayırımı yapılamayan hastalarda kullanılmaktadır (52).

Tarama

KRK'li hastalarda 5 yıllık sağ kalım tümörün evresi ile doğrudan ilişkilidir. A.B.D. Ulusal Çalışma Grubu tarafından yapılmış çalışmada kolonoskopik izleme poliplerin çıkarılmasının KRK insidansını %76-90 oranında azalttığı gösterilmiştir. Tarama öncesinde ilk yapılacak şey KRK ve ileri adenom ile ilişkili semptom ve bulguların araştırılmasıdır. KRK taramasına başlamadan önce ikinci önemli basamak risk değerlendirmesi yaparak KRK gelişimi açısından yüksek riske sahip bireylerin belirlenmesidir. Kendisinde veya ailesinde KRK veya adenomatöz polip öyküsü bulunanlar, genetik sendromlara veya inflamatuvar barsak hastalığına sahip olanlar yüksek riskli grupta yer alır ve özel tarama programlarına alınırlar. 50 yaş ve üzeri bireyler orta risk grubu olarak değerlendirilirler (13). Orta risk grubunda yer alan kişilere yıllık dışkıda gizli kan, 5 yılda bir fleksibl sigmoidoskopi

yapılmalıdır. Kolonoskopi diğer tarama yöntemlerinde patolojik bulgu olması halinde başvuru yapılan inceleme yöntemidir (53-55)

Evreleme

1930'lu yıllarda Cuthbert Dukes tarafından rektum kanserleri için kendi ismini taşıyan evreleme sistemi kullanılmaya başlanılmıştır. Kolon kanserlerinde de kullanılan bu evreleme sisteminde hastalık A, B, C olarak tümörün tuttuğu barsak katlarına ve lokal lenf nodu tutulumunun varlığına göre sınıflandırılmaktaydı. Sonraki yıllarda Dukes evrelemesinin çeşitli modifikasyonları kullanılmıştır. 1987'den itibaren American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından önerilen TNM sınıflaması dünya genelinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sınıflama sisteminde, tümörün barsak duvarında invazyon seviyesi (T), tutulan bölgesel lenf nodu sayısı (N) ve uzak metastaz durumu (M) temel faktörlerdir. En son olarak 2010 yılında AJCC 'nin 7. versiyonu yayınlanmıştır (56) (Tablo-5-7).

Tablo-5: Anatomik evre ve prognostik gruplar (56).

EVRE	T	N	M	DUKES	MAC*
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4A	N0	M0	B	B2
IIC	T4B	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
IIIC	T1-T2	N2b	M0	C	C1
	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
IVB	T4b	N1-N2	M0	C	C3
	T1-4	N0-N2	M1a	-	-
IVB	T1-4	N0-N2	M1b	-	-

MAC: Modifiye Astler-Coller sınıflaması

Tablo-6: Primer tümörün duvar invazyon derinliğine göre sınıflaması (56).

Tx Primer tümör değerlendirilemiyor
T0 Primer tümör bulgusu yok
Tis İntraepitelyal veya lamina propria invazyonu
T1 Submukoza invazyonu
T2 Muskularis propria invazyonu
T3 Muskularis propria boyunca perikolorektal doku invazyonu
T4a Viseral periton invazyonu
T4b Direkt diğer organ ve yapıların invazyonu

Tablo-7: Bölgesel lenf nodu tutulumu sınıflaması (56).

Nx Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0 Bölgesel lenf nodu tutulumu yok
N1a 1 bölgesel lenf nodu tutulumu var
N1b 2-3 bölgesel lenf nodu tutulumu var
N1c Tümör depozitleri var
N2a 4-6 bölgesel lenf nodu tutulumu var
N2b 7 veya daha fazla lenf nodu tutulumu var

Kolon ve rektum kanserleri hemen her organa metastaz yapabilir. TNM sınıflamasında, uzak organ metastazı yok ise M0, tek bir organ ya da bölgede sınırlı ise M1a, birden fazla sayıda organ ve ya bölge tutulumu ya da peritonda metastaz var ise M1b olarak sınıflandırılır (56).

Tedavi

Kolorektal karsinomlarda standart tedavi tipi cerrahi rezeksiyon olup, kemoterapi ve radyoterapi yardımcı tedavi yöntemleridir. Cerrahi tedavi prensipleri tümörün evresine ve lokalizasyonuna göre değişmektedir (57). Çıkan kolon ve çekum karsinomlarında ileokolektomi tercih edilirken, peritonla kaplı olmayan bölgede klasik abdominoperineal rezeksiyon yapılır. Kalın barsağın diğer bölgelerindeki karsinomlar ise anterior rezeksiyon ile tedavi edilir (58,59).

Kemoradyoterapi, cerrahi öncesi (neoadjuvan), cerrahi sonrası (adjuvan) veya palyatif amaçlı sistemik ve periton içi olarak uygulanabilmektedir. Adjuvan tedavinin amacı nüks oranlarını azaltmak ve uzun süreli sağ kalımı iyileştirmektir. Kolon kanserli hastaların %30-50'sinde lokal ve uzak nüksler görülür. Uzak nükslerin çoğu karaciğerde görülür. Uzak metastazlar, cerrahi uygulandığı sırada zaten var olan mikrometastazlardan gelişir. Adjuvan kemoterapi bu mikrometastazları hedef alır.

Son 50 yıl içerisinde 5-flourourasil (5FU) kolon kanserinin tedavisinde oldukça başarılı sonuçlar alınarak kullanılmıştır (60,61). Birçok çalışmada anti-EGFR monoklonal antikor (cetuximab, panitumumab) aracılı tedavinin KRAS mutasyonu içermeyen (wild-tip KRAS) metastatik KRK olgularında tümörün progresyonu azalttığı ve genel sağkalım üzerine olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir. BRAF mutasyonu varlığında, hastaların KRAS mutasyonu taşıyan KRK olgularına benzer şekilde anti-EGFR monoklonal antikor tedavisinden fayda görmesi beklenmez (62).

MSI-H (Microsatellite instability-high) saptanan KRK olguları standart 5-Flourourasil kemoterapisine cevapsızdır, ancak irinotekan ve mitomisin-C kemoterapilerine ise daha iyi cevap vermektedir (63).

Patoloji

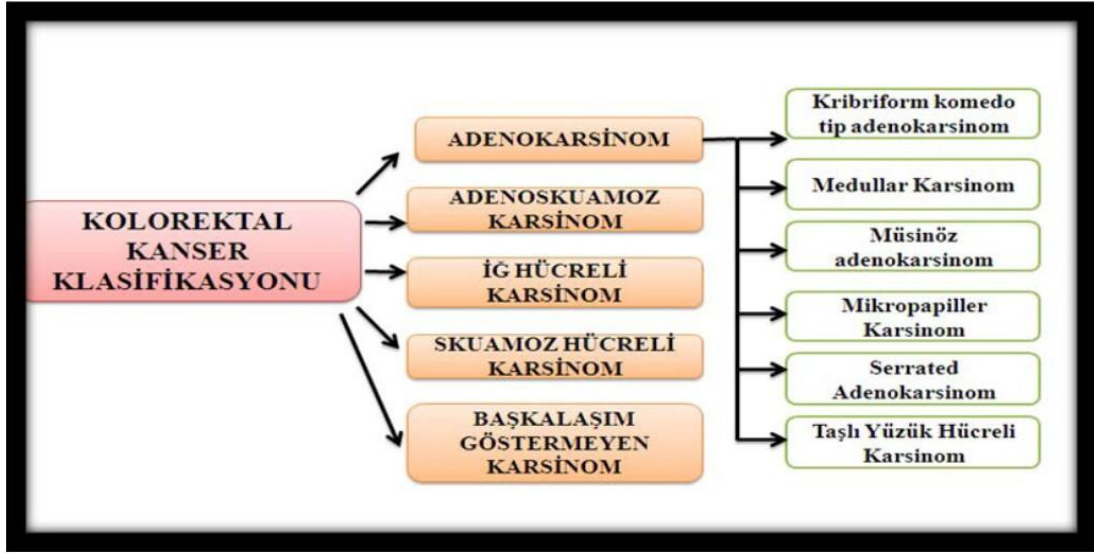
Kolon ve rektumdaki kanserlerin dağılımı şöyledir; %22 çekum/çıkan kolon, %11 transvers kolon, %6 inen kolon, %55 rektosigmoid, %6 diğer bölgeler (36).

Kolorektal karsinomalar makroskopik olarak polipoid, ekzofitik, ülseratif ve diffüz infiltratif tip olmak üzere dört grupta sınıflandırılır. Polipoid tip, lümen içine doğru büyüyen karnıbahar görünümlü tümörler olup daha çok çekum ve sağ kolonda görülür. Nodüler, lobule veya papiller yüzeye sahip olabilir. Ekzofitik tip aslında değişik derecelerde ülserasyonun eşlik ettiği bir polipoid karsinomadır. Ülseratif tip, ortası çökük nekrotik bir taban ve etrafında kabarık bir kenardan oluşan tipik malign ülser görünümüne sahiptir. Bazı tümörlerde, lezyonun çoğu alanında da ülserasyon meydana gelebilir.

Daha çok sol kolon karsinomalarında görülür. Diffuz infiltratif tip ise barsak segmentini nodüler kitle oluşturmaksızın diffüz olarak infiltre eder. Barsağın segmental diffüz kalınlaşması, midenin linitis plastica görünümüne benzer. Taşlı yüzük hücreli karsinomalarda rastlanır (64).

KRK'lerin %90'ından fazlası kolorektal mukozanın epitel hücrelerinden kaynaklanan adenokarsinomlardır. KRK'nin diğer nadir tipleri arasında nöroendokrin, skuamöz hücreli, adenoskuamöz, iç hücreli ve andiferansiye karsinomalar yer alır. Adenokarsinomlar histolojik tümör evrelemesinin temeli olan glandüler formasyon ile karakterizedir. İyi diferansiye olmuş adenokarsinomalarda tümörün %95'inden fazlası gland oluşturur. Az diferansiye adenokarsinomaların %50'den azı gland formasyonu gösterir. Pratikte kolorektal adenokarsinomların çoğu (%70) orta diferansiye olarak tanı alır. İyi ve az diferansiye karsinomalar sırasıyla %10 ve %20'sini oluşturur. Dünya sağlık örgütü sınıflamasına göre kolorektal adenokanser histolojik varyantları müsinöz, taşlı yüzük hücreli, medüller, mikropapiller, serrated, kribriform komedotip, adenoskuamöz, iç hücreli ve andiferansiye şeklinde listelenmiştir. Müsinöz adenokarsinomda tümör volümünün %50'sinden fazlası ekstraselüler müsin içerir. Müsin içeriği %10'dan fazla ve %50'den azsa müsinöz özelliğe sahip adenokarsinom veya müsinöz diferansiyasyon şeklinde isimlendirilir. Müsinöz adenokarsinom tipik olarak ekstraselüler müsin havuzu ile birlikte büyük glandüler yapılar gösterir. Müsinöz adenokarsinomun prognozu konvansiyonel adenokarsinom ile karşılaştırıldığı zaman farklı çalışmalarda sonuçlar çelişkilidir. Çoğu müsinöz adenokarsinom HNPCC hastalarında görülür ve yüksek seviyede MSI gösteren tümörlerdir. Bu tümörlerin düşük gradeli gibi davranmaları beklenir. Buna zıt olarak mikrosatellit stabil olan müsinöz adenokarsinomların özellikle ileri evrede tespit edildiklerinde daha agresif davranması beklenir. Taşlı yüzük hücreli adenokarsinomlar midenin tersine kolorektalde daha nadirdir ve tüm kolorektal karsinomların %1'inden azını temsil eder. Müsinöz karsinoma benzer olarak taşlı yüzük hücreli karsinomda tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasının taşlı yüzük hücre özelliği göstermesi şeklinde tanımlanır ve çekirdeği perifere iten belirgin intrastoplazmik müsin vakuelleri ile

karakterizedir. Taşlı yüzük hücreleri infiltratif büyüme paterni gösterebilir. Taşlı yüzük hücreli karsinoma az diferansiyedir (yüksek grade), konvansiyonel adenokarsinoma göre prognozu kötüdür. Fakat bazı taşlı yüzük hücreli karsinomalar MSI-H tümörler gibi olabilirler ve biyolojik olarak düşük gradeli tümörler gibi davranabilirler (65). KRK'lerin histopatolojik sınıflandırması şekil-2'de gösterilmiştir.



Şekil-2: Kolorektal kanser klasifikasyonu (66)

Karsinogenez

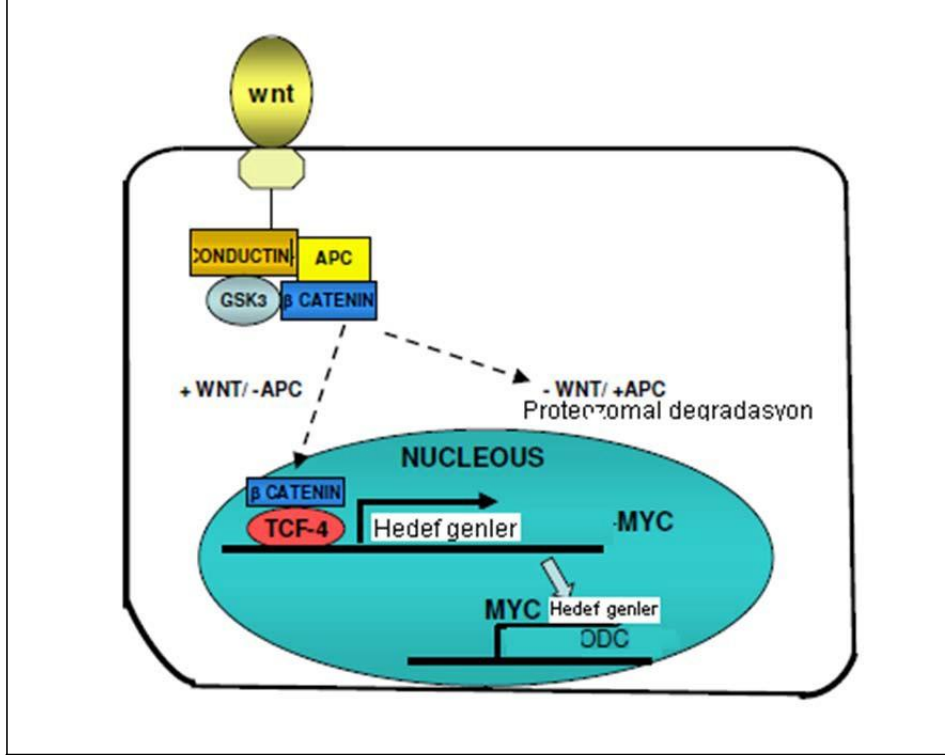
Dünya genelinde, KRK'lerin %85'i sporadik, yaklaşık %15'i aileseldir (16). Güncel çalışmalar, kolorektal karsinomlarının %75'inin, Fearon ve Vogelstein'in tanımladığı kromozomal instabilite ara yolu, %15'inin MSI ara yolu üzerinden geliştiğini, diğerlerinin ise, iki arayolla da ilişkili olmayıp, CpG ada metilasyon fenotipi arayolu üzerinden gelişebileceğini göstermektedir (67,68).

Kromozomal ayrışma, mitoz sırasında kromozomların mikrotübüllere uygun bağlanmalarını gerektirir. Kromozom ayrışma bozuklukları kolorektal tümörlerde hücrenin genetik materyalinde azalma veya artış ile sonuçlanabilir. Bu yolla ortaya çıkan kromozomal instabilite, basitçe kromozom sayısı ile ilişkilendirilemeyen ve tümör hücrelerinin yaşamı boyunca

devam eden sürekli bir hücresel bozulmaya neden olur (22,69). Normal bir hücreden adenokanser sürecini başlatan kritik ilk basamak, genellikle APC genindeki mutasyondur. FAP sendromuna neden olan bu bozukluk, sporadik kolorektal kanser olgularının da %80'inde her iki allelin mutasyonal kaybı ile başlar (17,70).

APC genine ait mutant bir allel etkilenmiş bir ebeveynden aktarılır. Kanser gelişimine, diğer allelde ortaya çıkan kazanılmış bir somatik mutasyon yol açar. Vakaların 1/3'ünde ise yeni ortaya çıkan bir germline mutasyon söz konusudur. APC geni 5 numaralı kromozomun uzun koluna (5q21) yerleşmiş bir tümör baskılayıcı gendir. Bu mutasyon kolondaki epitelyal hücrelerde ortaya çıkar. Mutasyonların büyük çoğunluğu nonsense veya frameshift mutasyonlardır. APC geni Wnt arayolunu kontrol eden gendir (Şekil-2). Wnt arayolu uyarıldığı zaman hücre proliferasyonu artar. Wnt proteinleri hücre yüzeyindeki Wnt reseptörlerine bağlanırlar. APC-Axin-GSK (glikojen sentaz kinaz-3) kompleksini inaktive edecek proteinleri indükleyerek devreye sokarlar. Bu kompleks β -katenin proteinini fosforilleyerek ubiquinizasyonla proteozomlarda yıkılmasına yol açmaktadır. KRK'lerin %80'den fazlasında inaktif APC, APC mutasyonunun olmadığı kanserlerin de %50'sinde β -katenin mutasyonları vardır. β -katenin nükleusa girerek transkripsiyon faktörleri ile etkileşir. T-hücre faktörü veya lenfosit çoğaltıcı faktör (TCF veya LEF) proteinleri olarak bilinen bir transkripsiyon faktörü ailesine bağlanır. TCF, DNA bağlayan bölgeye, β -katenin bir transaktivasyon bölgesine katılır. β -katenin-TCF kompleksi ile aktive edilen genlerin c-myc ve siklin D1 gibi hücre proliferasyonunu ve apoptozu düzenleyen genler olduğu düşünülmektedir. APC mutasyonları sonucunda her iki allel de kayba uğrayınca Wnt arayolu üzerindeki kontrol kalkar. Bu yol sürekli açık kalır. Hücre bölünmesi kontrolsüz olur. Mutant β -katenin, normal hücrelerde β -katenin'i fosforile eden ve degrade eden bir kinaz olan GSK-3 β 'ya bağlanma afinitesini kaybeder. Bu süreç sonucunda erken adenom evresine geçilmiş olur (71). APC proteininin, KRK oluşumunda önemli olan diğer bir fonksiyonu da mikrotübüllerle ilişkili kromozom ayrılmasında rol oynamasıdır. Mutant olmayan "wild" tip APC proteini bağlanarak mikrotübüllerin toplanmasını

destekler. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda; mitoz sırasında, mikrotübüllerin son kısmında APC kümelenmesi gösterilmiş ve mutant APC'nin mikrotübül bağlanma bölgesinden yoksun olduğu, hücrelerde defektif kromozomal ayrışma ve instabiliteye yol açtığı izlenmiştir (72-74).



Şekil-3: APC geni Wnt arayolu kontrolü. APC aktivitesi yokken β-kateninin aktive edilerek kolonik epitelde gen ekspresyonunu düzenlemesi ve poliamin metabolizması (ODC) için çekirdeğe girişindeki Wnt sinyali ve APC tümör süpresör gen ilişkisi veya APC aktivitesi varlığında β-kateninin proteozomal degradasyonu (16).

Bunu takip eden RAS onkogen mutasyonları tabloyu bir ileri aşamaya taşır. K-ras geni hücre zarı iç yüzeyinde bulunan 21 kDa büyüklüğünde GTP bağlayabilen bir membran proteini kodlar. Bu protein GTP'ye bağlıyken aktif formdadır. K-ras geni ekstrasellüler mitojenik sinyallerin intraselüler alana iletiminden sorumludur. K-ras geni 12. kromozomun kısa kolunda yerleşmiştir (75). Kodon 12, 13 veya 61'deki mutasyonlar; ras protoonkogenlerinin onkogenlere dönüşmesine neden olur ve bu otonom hücre büyümesi ve çoğalması ile sonuçlanır (76). 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. Ras gen mutasyonları tümör tiplerinde farklı insidanslarda bulunmaktadır. En yüksek insidansları, pankreas (%90), kolon (%50), akciğer adenokarsinomlarda (%30), tiroid tümörlerinde (%50) ve myeloid lösemilerde (%30) rastlanmaktadır. Bu kanserler içinde özellikle K-ras geni mutasyonları diğer ras genlerine (N-ras ve H-ras) oranla daha sık görülmektedir (77). Normal hücrelerde Ras proteinleri, sinyal uyarımı ile guanozin trifosfata (GTP) bağlanıp aktif duruma geçerler ve gelen sinyalleri nükleusa iletirler. Sinyal iletimi sonlandığında ise, bağlı olan GTP molekülü, guanozin trifosfataz (GTPaz) enzimi ile hidrolize edilir. Bunun sonucunda Ras proteinleri guanozin difosfata (GDP) bağlı durumda kalarak inaktif duruma geçerler. Böylelikle, Ras proteinleri bir sonraki uyarıcı sinyalleri beklemek üzere dinlenme evresine geçerler. Mutant Ras proteininde, GTPaz aktivitesi inhibe edildiğinden gen ürünleri kontrolsüz olarak üretilmeye devam etmektedir (78). RAS sinyalinin hedef alt yolları arasında RAF serin treonin kinazlar (ARAF – BRAF – RAF1) ve bunların da aktive ettiği MAPK–ERK yolağı yer alır. RAS aktive olduktan sonra RAF onkogenini harekete geçirmektedir. RAF onkogeni de MAPK 1 ve 2'yi fosforilleyerek hücre büyümesi ve sağkalım ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bunun sonucunda da hücre sağ kalımından sorumlu efektör moleküllerin düzenlenmesini kontrol etmektedir (79). Tüm insan tümörlerinin %8'inde, kolorektal tümörlerin ise %5-12'sinde BRAF mutasyonu rapor edilmiştir. Ayrıca yanlış eşleşme tamir sistemi defekti olan KRK'lerde, defekti olmayanlara göre çok önemli ölçüde BRAF mutasyonu görülmektedir. Bu nedenle BRAF mutasyonu ile MSI arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir (80-82). İnsanlarda en sık görülen BRAF mutasyonu 1796. nükleotidin timinden adenine transversiyonu ile sonuçlanan V600E dönüşümüdür (83). 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 parmaklı uzantılara sahip bir hal alır. Bu aşama intermediate (ara) adenom aşamasıdır. Bunu takiben 18. kromozomun uzun kolunda kayıplar izlenir.

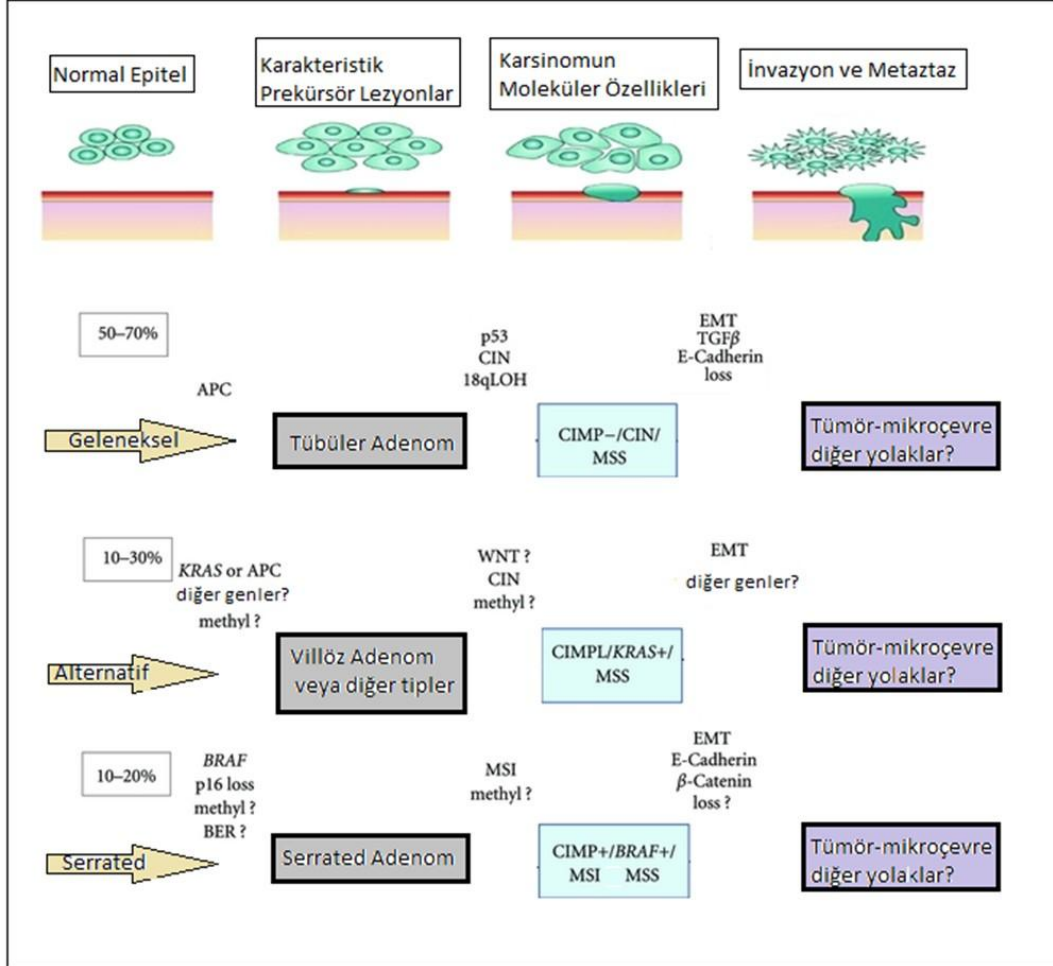
Erken ve intermediate adenomların %10'unda 18q'da kayıp vardır. Geç dönem adenomlar ve adenokarsinomlarda bu kromozoma ait kayıp oranı %50'lere yükselir. 18q21'de yerleşim gösteren DCC (deleted in colon cancer) ve SMAD4 ve SMAD2 genleri kayba uğramış olur (71). DCC önemli bir tümör süpresör genidir ve mutasyonu kolorektal karsinomların progresyonu, invazyonu ve metastazında rol almaktadır (84,85). DCC bir yüzey proteinini kodlar. Bu protein hücre adezyon proteinleri ve yüzey glikoprotein molekülleri ile oldukça homoloji gösterir (71). Bu bölgede, ilişkili olarak gösterilen diğer tümör süpresör genler SMAD2 ve SMAD4'tür (86,87). Her iki genin protein ürünü; hücre büyümesi, farklılaşması, matriks ürünleri ve apoptoz gibi birçok olayda rol oynar. KRK hücre dizisinde SMAD4 delesyonu, TGF-beta sinyalini engeller ve mutant SMAD2 ve SMAD4 proteinleri "ubikuitin-proteozom" yolu ile hızlı degradasyon için hedef haline gelir. SMAD kalıtsal mutasyonu nadir bir ailevi hastalık olan juvenil polipozis sendromlarının 1/3'ünde gözlemlenmiştir. Bu yol ile ilgili olarak, TGF-beta tip 2 reseptör mutasyonu, MSI gösteren kolorektal karsinomların %90'ında tek başına gösterilmesi, kolorektal karsinogenezde TGF-beta'nın rolü olduğunun önemli bir göstergedir (72, 88). TGF- β arayolu normal hücre büyümesini baskılayarak kontrol altında tutar. TGF- β arayolunun devreden çıkması ile geç dönem adenomlar gelişir. Daha sonra p53 geninde ortaya çıkan kayıplar tabloyu hızlandırır. Erken ve intermediate aşamasında p53 kaybı %20 civarındayken, geç dönem adenomlarda bu oran % 30 olarak izlenmekte ve kanserlerde %75'e çıkmaktadır. p53 geni bir tümör baskılayıcı genidir ve her iki allelin birden etkilenmesi şarttır (71). P53 insan kanserlerinde en sık görülen mutant gen olup 17p13 lokusuna yerleşmiştir. p53 gen fonksiyonu kaybı sonucunda hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkar ve DNA tamiri yapılmaksızın hücre siklusu kontrolsüz olarak devam eder. Normal bir hücrede DNA hasarı olduğunda, p53 geni aktive olarak, hem Rb proteininin fosforilasyonunu inhibe eden p21 proteinini hem de DNA onarımı ve apoptozisi düzenleyen transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır. Hipofosforile halde aktif olan Rb hücre siklusunu G1-S'de durdurarak hücreye DNA hasarını onarması için

zaman tanır. DNA hasarı onarılamazsa p53 apoptozu uyarır. p53 mutasyonlarında hücreler kontrolsüz bölünmeye devam eder (36).

Kolorektal karsinogenezin ikinci önemli yolu MSI'dır. Bu yol "herediter non-polipozis kolon kanser" (HNPCC) olgularında tanımlanmıştır. Mikrosatellitler 2-4 nükleotidden oluşan ve ardışık olarak 3-100 kez tekrarlanan dizilerdir. Tekrar sayısı arttıkça DNA replikasyonu sırasında insersiyon veya delesyon şeklinde hatalar çıkma olasılığı artar. Normal bir hücrede bu hatalar uygunsuzluk onarım genleri (Mis match repair genes- MMR) aracılığı ile tanınır ve onarılır. Bu onarım genlerindeki sorunlar hataların kalıcı olmasına ve mikrosatellit dizi uzunluğunda değişikliklere neden olarak MSI'ya neden olur. HNPCC sendromlarının %90'ında rol oynayan mikrosatellit dengesizliği, sporadik KRK'lerin %20'sinde görülmektedir. Bazı kritik genler (ILGF-II reseptörü, BAX, TGF- β reseptörü) promotör bölgelerinde mikrosatellit barındırırlar. Bu bölgelerdeki sorunlar; hücreyi, hücre büyümesini kontrol eden önemli gen mutasyonlarına yatkın hale getirir. Onarım sisteminde görev alan genler ise MSH2, MSH6, MLH1, MSH3 ve PMS2'dir (89,90). Mikrosatellit instabil tümörler karakteristik bazı klinikopatolojik özelliklere sahip olurlar. Bu tümörler daha proksimalde yerleşmiş olup, sıklıkla kötü diferansiye, medüller karsinom fenotipinde, peritümöral lenfositik infiltrasyon, tümör sınırında Crohn benzeri inflamatuvar yanıtla birlikte ve daha fazla müsinöz veya taşlı yüzük hücre komponenti barındırma eğilimindedirler (91). Sporadik MSI tümörlerinin altında yatan mekanizma promotör hipermetilasyon ile MMR genlerinin susturulmasıdır. Özellikle, MLH1 promotör hipermetilasyonu ile bu genin susturulması sporadik MSI tümörlerde tespit edilmiştir (92).

CpG ada metilatör fenotip (CIPM) yolağı sporadik KRK gelişiminde kolon dokusunun malign transformasyonu ile sonuçlanan ve sporadik KRK'lerin yaklaşık %15'inde görülen yoldur. Bu yolak, kendi promotörlerinin hipermetilasyonu ile tümör süpresör genlerin susturulması sonucunda gelişen epigenetik instabilite ile karakterizedir. APC geni hipermetilasyonu promotör bölgesinde APC ekspresyon kaybı ile ilişkili olarak sporadik karsinomlarda

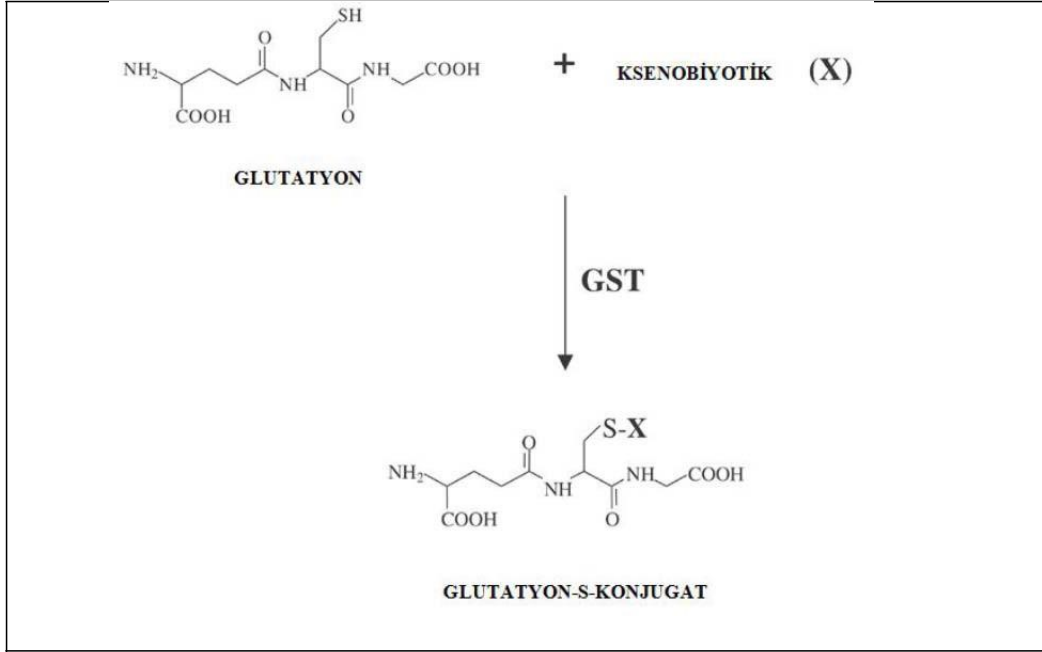
gösterilmiştir. CpG adaları içeren bu promotörler hipermetilasyona karşı değişik derecelerde hassastırlar (93).



Sekil-4: Kolorektal kanser patogeneğinde genomik instabilite ve multiple yolaklar. Kolon kanser patogenezin geleneksel, alternatif ve serrated olmak üzere yaklaşık prevalansları ile beraber üç farklı paralel yolak içerir. Her yolakta görülen ardışık genetik ve epigenetik değişiklikler karakteristik prekürsör lezyonlar ve karsinoma ile ilişkili kendine özgü moleküler özelliklerle birlikte özetlenmiştir. Geleneksel ve serrated yolaklar daha homojendir ve net bir şekilde ayrılabilir, alternatif yolak daha heterojendir. APC: adenomatöz polipozis coli, MSI: mikrosatellit instabilite, CIMP: CpG ada metilatör fenotip, CIMPL: CIMP-düşük, CIN: kromozomal instabilite, MSS: mikrosatellit stabil, BER: baz eksizyon tamir yolağı, Methyl: henüz bilinmeyen genlerdeki DNA metilasyon susturucu, EMT: epitelyel mezankimal transisyon, TGFβ: transforming growth faktör-beta, LOH: heterozigosite kaybı (94).

Glutasyon S-Transferaz Enzimleri; GSTM1, GSTT1 ve GSTP1

Ksenobiyotik vücuda yabancı olan, çoğu insan vücudunda metabolize olan kimyasal karsinojenler, ilaçlar ve çeşitli toksik bileşiklerden oluşmaktadır. Faz I ve faz II reaksiyonları olmak üzere iki ayrı reaksiyon ile metabolize olurlar. Faz I reaksiyonları monooksijenazlar veya sitokrom P-450 olarak adlandırılan enzimlerce katalizlenen hidrosilasyon, redüksiyon ve hidrolizden oluşur. Faz I'de oluşan hidrosile bileşikler faz II'de çeşitli polar metabolitlere dönüştürülmektedir. Faz II glukuronidasyon, sulfasyon, metilasyon, asetilasyon ve glutasyon ile konjugasyon reaksiyonlarını içerir. Glutasyon glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptittir. Glutasyon S-transferaz (GST) enzimleri glutasyon ile ksenobiyotiklerin reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir. Glutasyon S-transferaz enzim sistemleri birçok farklı ksenobiyotik ve endojen bileşiklerin detoksifikasyonu ve biyotransformasyonunda önemli rol oynar. Ksenobiyotik metabolizmasındaki bu iki fazın amacı, ksenobiyotiklerin sudaki çözünürlüklerini artırmak ve bu şekilde vücuttan atılmalarını kolaylaştırmaktır (Şekil-5) (95,97). İnsan sitozolik GST'lerin birçok formu bulunduğundan ayrı olarak sınıflandırılmışlardır. Bu sınıflandırılmaları, aminoasit dizileri gibi proteinin temel yapısına dayanmaktadır. İnsan dokularında sentezlenen sitozolik Glutasyon-S transferaz enzimleri, en az sekiz gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. Bu enzimler; Alfa (GST α), Mu (GSTM, GST μ), Pi (GSTP, GST π), Teta (GSTT, GST θ), Sigma (GSTS), Kappa (GSTK), Omega (GSTO) ve Zeta (GSTZ)'dir (96).



Şekil-5: GST enzimlerinin katalizlediği ksenobiyotik metabolizması (97).

GST								
	Alpha	Mu	Theta	Pi	Zeta	Sigma	Kappa	Omega
Kromozom	6p	1p	22q	11q	14q	4q	ND	10q
Genler	A1-A4	M1-M5	T1,T2	P1	Z1	S1	K1	O1

Şekil-6: GST gen ailesi (98).

İnsanlarda kromozom 1'in kısa kolunda (1p13.3) GST geninin 5 Mu sınıfı bulunmaktadır. Mu sınıfı GST genleri genellikle 8 ekzon içerir ve uzunluk olarak 6-16 kb arasında değişir. Mu sınıfı GST'ler dimerik proteinlerdir ve ekspresyonlarında bazı doku spesifiteleri vardır. Özellikle GSTM1 karaciğerde güçlü bir şekilde olmak üzere daha az oranda diğer dokularda ekspresse olur. GSTM2 başlıca kasa özgüdür, GSTM3 özellikle testis ve beyinde ekspresse olur. GSTM1 en yaygın olarak araştırılan GST polimorfizimlerinden biridir. Şimdiye kadar çalışılmış toplulukların çoğunda GSTM1 null alleli en sık alleldir. GSTM1 eksikliği ile akciğer kanserinin ilişkisini bildiren çalışmalar GST alanında araştırmalara yeni bir bakış açısı

getirmiştir ve GSTM1 eksikliği ile çeşitli kanserlere ve hastalıklara yatkınlığı araştırmada yeni bir alan olmuştur. GSTM1 eksikliğin klinik olarak en önemli bulgusu çocukluk çağı lösemilerinde kemoterapi sonrası sağ kalımına anlamlı olarak katkıda bulunmasıdır. (99). GSTM1 null fenotipi kişilerin %10 ile 60'ında olup Kafkaslarda ve Asyalılarda %50, Afrikalılarda %25'e kadar değişmektedir (100).

GST geninin iki Pi sınıfına sahip olan farelerin tersine insanlar GSTP1 olarak adlandırılan tek fonksiyonel GSTP1 genine sahiptir ve kromozom 11q13'e lokalizedir. GSTP1'de I105V ve A114V yer değiştirmelerini kodlayan iki SNP tanımlanmıştır. Bu SNP'ler ilk olarak cDNA klonunda tanımlanmıştır ve daha sonra genomik DNA da tanımlanmıştır. Çoğu tümörde ekspresse olmasından dolayı GSTP1'in ilaç direnci ile olan ilişkisi çalışılmıştır (101-103). Buna ek olarak iki polimorfik yer değiştirmenin ilaç metabolizmasını değiştirmesindeki ve kanserlere ve diğer hastalıklara yatkınlık oluşturmadaki etkisinden dolayı çalışmalara konu olmuştur. Bu iki varyant aynı zamanda geniş fonksiyonel tanımlamaların konusu olmuştur ve birkaç çalışma anti kanser ilaçlar olan thiotepa ve klorambusil ile GSTP1 varyantlarının farklı aktiviteler gösterdiğini rapor etmiştir (99). Karsinojenik diolepoxidlere karşı V105 ve I105 varyantlarının katalitik aktivitesindeki farklılıklar, bu allellerle kanser yatkınlığı arasındaki ilişkinin altta yatan nedeni olabilir. Fakat başka faktörlerde etkilidir (104). Çalışmaların çoğunda I105 ve V105'in aktivitesindeki farklılıklar rapor edilmiştir ancak farklılıklar tutarlı değildir. Örneğin bir çalışma 50 °C'de I105 varyantının V105 varyantından daha stabil olduğunu rapor ederken farklı bir çalışma 45 °C'de I105 varyantının daha az stabil olduğunu rapor etmiştir. GSH bağlanmasındaki farklar bu iki çalışmadaki farklılığı izah edebilir. Bu sonuçlar intraselüler ortamların bu varyantların stabilitesini değiştirebileceğini ve bu bireylerin belli ksenobiyotikleri ve bunların metabolitlerini konjuge etmekteki invivo kapasiteleri üzerinde etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. GSTP1 genotipi ksenobiyotik metabolizması ve kansere yatkınlık arasındaki ilişkinin altta yatan nedeni olabilecek yapı substrat ilişkisini ortaya koymak için daha ileri araştırmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (105,106).

Farelerde ekspresse edilen en az 3 teta sınıfı GST olmasına rağmen insanlarda sadece iki fonksiyonel teta sınıfı GST geni bulunmaktadır (GSTT1 ve GSTT2) ve her ikisinde kromozom 22q11.2'ye lokalizedir. SNP veri tabanları GSTT1'de birkaç missens mutasyonun varlığı tahmin etse de bunların azı iyi tanımlanmıştır. Gen delesyonu sonucunda oluşan GSTT1 eksikliği siktir. Çalışmalar D43N, T65M, and V169I'nın yer değiştirmesi ve nükleotit G412'nin delesyonunu içeren 18 tane SNP tanımlamıştır. GSTT1'in diğer iki nadir varyantı (D141N, E173K) Escherichia coli'deki rekombinant proteinin ekspresyonu sonrası karakterize edilen veri tabanı analizi ile tanımlanmıştır. Bunlar nadir olsa da diğer GST varayantlarıyla karşılaştırıldığında göreceli olarak yüksektir. Bu GSTT1'in tam delesyonunun sık olması ile açıklanabilir. Gen delesyonu sonucu oluşan GSTT1 eksikliği çoğu popülasyonda sık olarak görülür. Erken dönemde yapılan çalışmalar GSTT1'in dihalometanları mutajenik intermedietelere aktive ettiği bulunduktan sonra GSTT1 varlığının veya yokluğunun kansere ve diğer hastalıklara olan yatkınlıktaki etkisi merak oluşturmuştur. GSTT1 homozigotlarda GSTT1 proteininin tam yokluğunun olmasından dolayı karaciğer transplantasyonu uygulanan hastalarda GSTT1 eksikliği klinik ilgi oluşturmuştur (99). GSTT1 null genotipi beyaz ırkın %13-35'inde ve Asyalıların %35-55'inde mevcuttur.

GSTM1 ve GSTT1'in her ikisi için varyant allel, genin delesyonudur. Homozigot allel delesyonu olan bireyler null genotip olarak adlandırılır ve bunlarda enzim ekspresyonu görülmez. GSTP1'in fonksiyonel polimorfizmi (rs1695, Ile105Val) daha düşük enzim aktivitesi ile sonuçlanır. GST geninin genotip frekanslarında jeografik ve etnik varyasyonlar mevcuttur ve KRK ile GST genetik polimorfiziminin ilişkisi çeşitli etnik popülasyonlarda geniş bir şekilde araştırılmıştır fakat sonuçlar tutarsızdır (102,105,107,10).

GEREÇ VE YÖNTEM

Materyal

Bu çalışma 2009-2013 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı tarafından KRK tanısı almış ve/veya takip edilmekte olan ve Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına parafin blokları gelmiş 116 hasta, bilinen herhangi bir kanser hikayesi olmayan 128 kontrol üzerinde, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu onayı (05 Ekim 2013, 2013-18/2) ile retrospektif olarak yapılmıştır. Çalışmaya alınan hastaların demografik özellikleri (yaş, cinsiyet), patolojik özellikleri (tümör lokalizasyonu, histolojik tip, grade ve evre) ve GSTT1, GSTM1 ve GSTP1 geni analiz sonuçları kaydedilmiştir.

Yöntem

QIAmp DNA FFPE Doku Kitiyle DNA Eldesi

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

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

inkübasyonuna bırakıldı. Örnekler son olarak 90°C'de bir saat daha inkübe edilerek kısa süreli santrifüj yapıldı. Örnekler üzerine sırasıyla 200 µl Buffer AL ve 200 µl %96'lık etil alkol eklendi. Kısa süreli vortekslenerek santrifüj edildi. Tüplerin içindeki karışım QIAamp MinElute spin kolonlara aktarıldı. Tüplerin kapakları kapatılarak 6000xg (9000 rpm) hızda 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolonların yerleştiği tüpler atıldı. QIAamp MinElute spin kolonlar temiz 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi. QIAamp MinElute spin kolonlar dikkatlice açılarak içlerine 500 µl Buffer AW1 eklendi. Tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra 6000xg (9000 rpm) hızda 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolonların yerleştiği tüpler atıldı. Tekrar QIAamp MinElute spin kolonlar temiz 2 ml'lik collection tüplere yerleştirildi. QIAamp MinElute spin kolonlar dikkatlice açılarak içlerine 500 µl Buffer AW2 eklendi. Tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra 6000xg (9000 rpm) hızda 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolonların yerleştiği tüpler atıldı. QIAamp MinElute spin kolonlar son kez temiz 2 ml'lik collection tüplere yerleştirildi. 20.000xg (14.000 rpm) hızda dört dakika santrifüj edildi. QIAamp MinElute spin kolonların yerleştirildiği 2 ml'lik collection tüpler atıldı. QIAamp MinElute spin kolonlar 1,5 ml'lik ependorf tüplere yerleştirildi. QIAamp MinElute spin kolonlar dikkatlice açılarak tam ortalarına gelecek şekilde 50 µl Buffer ATE eklendi. Kolonların kapakları kapatılarak 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 20.000xg (14.000 rpm) hızda iki dakika santrifüj edildi. Spin kolonlar atıldı. 1,5 ml'lik ependorf tüplerde DNA elde edildi.

Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Kontrol grubundan genotip tayinleri için -20°C'de saklanan EDTA'lı tüplerden yaklaşık 2 cc'lik kan örneği alındı. DNA izolasyonu için 2 cc EDTA'lı kan, steril falkon tüpüne aktarıldı ve üzerine 1:3 oranında (6 cc) "lysis buffer" ilave edildi. Tüp, birkaç defa ters yüz çevrilerek iyi bir şekilde karıştırıldıktan sonra +4°C'de 15 dakika bekletildi. Oluşan nükleer pelleti çöktürmek için dakikada 1500 devirde 10 dk santrifüj edildi ve oluşan süpernatant döküldü. Pellet yeniden süspanse edildi. İkinci bir yıkama için yine 6 ml "lysis buffer" eklendi ve 10 dk 1500 rpm'de santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve pellet tamamen süspanse edildi. Bundan sonraki aşamalarda 'Dr. Zeydanlı' DNA

izolasyon kiti prosedürü uygulandı. Süspansiyon olmuş örnek 1,5 ml'lik nükleaz içermeyen tüp içine alınarak üzerine 500 µl solüsyon B ve 20 µl solüsyon A eklendi. Karışım vortekslenerek 42°C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üzerine 500 µl solüsyon C eklenip vortekslenerek 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Oluşan iki fazdan üstteki berrak faz alınarak temiz 1,5 ml'lik nükleaz içermeyen tüpe konuldu. Üzerine 500 µl solüsyon D konuldu. 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Oluşan süpernatant atılarak üzerine 500 µl solüsyon E konulup 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak tüpler kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra 100 µl distile su eklenerek çalışılma zamanına kadar -20°C'de saklandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Protokolü

İzole edilen DNA'larda GSTT1 ve M1 gen polimorfizmini belirlemede Multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction), GSTP1 (Ile105Val) gen polimorfizmi PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) yöntemleri kullanılarak genotipleme yapıldı. Bunun için PCR reaksiyonu karışımı hazırlandı. 25 µl'lik PCR karışımı 0,2 ml'lik PCR tüpünde aşağıdaki sıra ile karıştırıldı (Tablo-8).

Tablo-8: PCR reaksiyonu karışımı için kullanılan malzemeler ve miktarları

Kullanılan malzeme	Miktar
dNTP (10 mM)	0,4 µl
10x PCR Buffer (Magnezyumlu)	3 µl
10 pmol/ml ilgili gene özgü primer forward	1 µl
10 pmol/ml ilgili gene özgü primer reverse	1 µl
Distile su	16 µl
Genomik DNA	4,0 µl
Taq polimeraz enzimi (5 ünite/µl)	0,1 µl

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

GSTP1 (Ile105Val) , GSTM1 ve GSTT1 genlerin PCR reaksiyonu ile çoğaltılması için bu bölgelere spesifik forward ve reverse primer dizileri kullanıldı (Tablo-9) (108).

Tablo-9: GSTP1 (Ile105Val) , GSTM1 ve GSTT1 genleri için kullanılan primer dizileri ve annealing sıcaklıkları (108).

	Primer (forward)	Annealing sıcaklıkları
	Primer (reverse)	
GSTM1	5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'	58 ^u C
	5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'	
GSTT1	5'-TTCCTTACTGGTCTCACATCTC-3'	58 ^u C
	5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	
GSTP1	5'-ACCCCAGGGCTCTATGGGAA-3'	58 ^u C
	5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3'	
Albumin	5'-GCCCTCTGCTAACAAGTCCTAC-3'	53 ^u C
	5'-GCCCTAAAAAGAAAATCCCCAATC-3'	

İlgili gen bölgelerinin kopya sayısını çoğaltmak için PCR tüplerine Tablo-8'de belirtilen malzemeler karşılardaki miktarlarda konularak PCR karışımı hazırlandı. Hazırlanan bu reaksiyon karışımları PCR yapılmak üzere PCR cihazına yerleştirildikten sonra belirlenen program uygulandı. GSTM1, GSTT1, GSTP1 (Ile105Val) gen bölgeleri için PCR döngü programı olarak Tablo-10'da belirtilen sıcaklık ve süreler kullanılarak PCR işlemi PCR cihazında gerçekleştirildi. 'DNA Taq Polimeraz' enziminin katalizörlüğünde gerçekleştirilen PCR işlemi sonrasında ilgili gen bölgelerinin kopya sayıları çoğaltılmış oldu.

Tablo-10: PCR Döngü Programı

	Sıcaklık	Süre
1-Başlangıç denatürasyonu	94 °C	5 dakika
2-Denatürasyon	94 °C	1 dakika
3-Annealing (primere özgü sıcaklık)	58 °C	1 dakika
4-Extention	72 °C	1 dakika
5-Son extention	72 °C	10 dakika
Kapak sıcaklığı 103 °C		
2,3 ve 4 işlemler sırası ile 38 siklus		

Jel Elektroforez Protokolü

PCR ile çoğaltılmış GSTT1 ve M1 gen ürünlerinin tanımlanması için %2'lik agaroz jel elektroforezi uygulandı. %2'lik jel hazırlanması için 5 ml 10xTris-Borik Asit-EDTA (TBE) solüsyonu 45 ml distile su ile beher içerisinde karıştırıldı. Karışımın içine 1 gr agaroz eklendi. Çözelti mikrodalga fırında "medium" ayarında agaroz çözününceye kadar ısıtıldı. Eriyen jel içine 5 µl etidyum bromid eklenerek karıştırıldı. Jel, elektroforez aparatına dökülerek soğumaya bırakıldı. Elektroforez tankı, 1xTBE ile doldurularak jel yürütme işlemine hazır hale getirildi. PCR ürünleri brom-fenol mavisi ile muamele edilerek agaroz jele yüklendi. 90-100 volt akımda 15 dk kadar yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra ultraviyole ışın altında jel görüntüsüne bakıldı.

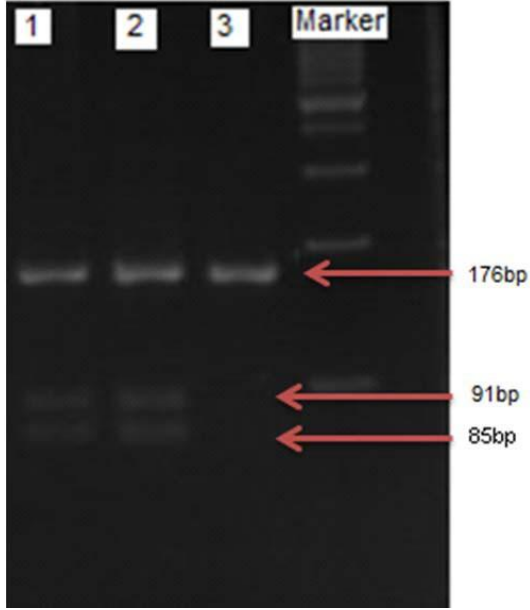
Restriksiyon Enzim Kesimine Bırakılması

PCR reaksiyonu sonucu elde edilen GSTP1 gen ürünlerinin genotip tayini için BsmAI (New England Biolabs) kesim enzimi kullanıldı. 5'...GTCTC(N)1...3' /3'...CAGAG(N)5...5' dizileridir (N; Adenin veya Sitozin

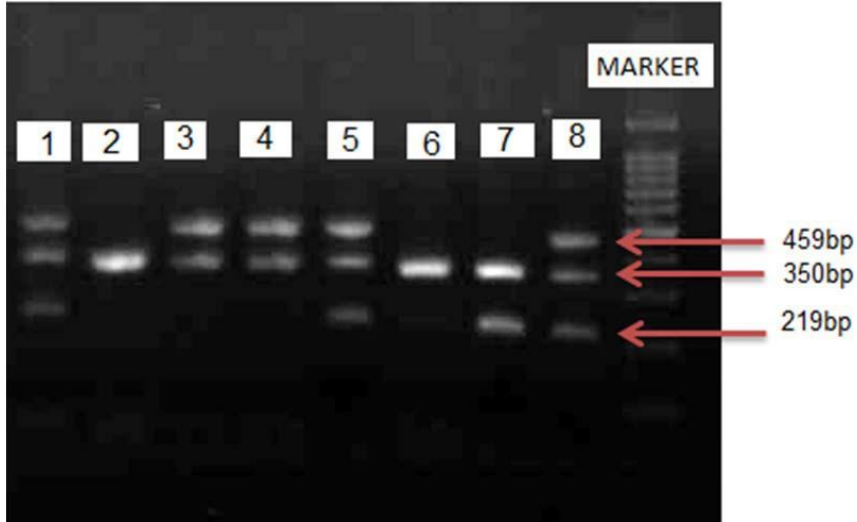
veya Guanin veya Timin). 0,2 ml'lik toplere 10 µl hacimdeki PCR ürünü, 2 µl restriksiyon enzim bufferı, 8 µl distile su ve her birey için 5 ünite/µl BsmAI enzimi olacak şekilde karışım hazırlandı. Karışım enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 56°C'de 14–16 saat inkubasyona bırakıldı. Restriksiyon enzim kesim sonuçları % 4'lük agaroz jelde değerlendirildi. Bu jel için 2 gr agaroz tartılıp 1XTBE solüsyonu ile 50 ml total hacme tamamlandı. Agaroz istenilen konsantrasyonda hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında kaynatıldı. İçerisine 5 µl etidyum bromid ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra jel aparatına döküldü. BsmAI enzimi ile kesim yapılmış ürünlere brom-fenol mavisini ile muamele edilerek jele yüklendi.

Genotiplerin Belirlenmesi

Yürütülen ürünler ultraviyole ışığında değerlendirilmiştir. GSTP1 genine ait 176 bp'lik PCR ürünü 85 bp ve 91 bp iki ayrı ürün oluşursa Val/Val (GG) genotipini, 176 bp, 91 bp ve 85 bp üç ayrı ürün oluşursa Ile/Val (AG) genotipi ve 176 bp şeklinde olursa Ile/Ile (AA) genotipi göstermektedir (Şekil-7). GSTM1 ve GSTT1 enzimlerinin delesyon taşıyıp taşımadığının belirlenmesi için kontrol bant olarak albumin geni kullanılmıştır. GSTM1 ve GSTT1 genleri delesyon taşımadıklarında sırası ile 219bp ve 459bp'lik bantlar vermektedirler. Kontrol bandı olan albumin ise 350bp'lik bir bant büyüklüğüne sahiptir. GSTM1 ve GSTT1 genlerinde aynı anda delesyon bulunduran örneklerde jel yürütmesi sonucunda sadece albumin bandı görülmektedir. Sadece GSTM1 ya da sadece GSTT1 delesyonu taşıyan örneklerde albumin bandı ve delesyon içermeyen genin bandı görülmektedir (Şekil-8).



Şekil-7: GSTP1 polimorfizmlerinin PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ürünlerinin %4'lük agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: 100 bp DNA marker. 1 ve 2 nolu kuyucuklar Ile / Val genotipi (176 bp, 91 bp, 85 bp), 3 nolu kuyucuk Ile / Ile genotipi (176 bp).



Şekil-8: GSTM1, GSTT1 polimorfizmlerinin PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: 100 bp DNA marker. 3 nolu ve 4 nolu kuyucuklar GSTT1+(459bp), GSTM1-, 1 nolu, 5 nolu ve 8 nolu kuyucuklar GSTT1+(459bp), GSTM1+(219bp), 7 nolu kuyucuk GSTT1-, GSTM1+(219bp), 2 nolu ve 6 nolu kuyucuklar GSTT1-, GSTM1-.

İstatistiksel Analiz

Verinin istatistiksel analizi SPSS21 istatistik paket programında yapılmıştır. Verinin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Normal dağılmayan veri için iki grup karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Kategorik verinin incelenmesinde Pearson Ki-kare testi, Fisher'in Kesin Ki-kare testi ve Fisher-Freeman-Halton testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlenmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı tarafından KRK tanısı almış ve/veya takip edilmekte olan ve Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına parafin blokları gelmiş 116 hasta, bilinen herhangi bir kanser hikayesi olmayan 128 kontrol dahil edildi. Hastaların demografik bulguları (yaş ve cinsiyet), tümör özellikleri (lokalizasyon, histolojik tip, grade, evre) ve GSTT1, GSTM1 ve GSTP1 geni analiz sonuçları kullanıldı (Tablo-11a, 11b, 11c ve 11d).

Tablo-11a: Hastaların cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, histolojik tip, grade, evre ve GSTT1, GSTM1, GSTP1 genotip dağılımı

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Lokalizasyon	Histolojik tip	Grade	Evre	GSTT1,M1 Genotip	GSTP1 Genotip
1	K	59	Çıkan Kolon	AC	-	IV	-	Ile/Ile
2	E	54	Rektum	MAC	2	IV	-	Ile/Val
3	K	48	Sigmoid Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
4	E	72	İnen Kolon	AC	2	IV	-	Val/Val
5	E	73	Çekum	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Val/Val
6	E	73	Rektum	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Val/Val
7	K	18	Çıkan Kolon	TYH	3	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
8	K	63	İnen Kolon	AC	2	IV	T1(0)M1(0)	Ile/Ile
9	K	65	Rektum	AC	2	IV	-	Ile/Ile
10	E	73	Rektosigmoid	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Val
11	K	24	Çıkan Kolon	TYH	3	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Val
12	K	63	İnen Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Ile
13	K	50	İnen Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
14	K	77	Sigmoid Kolon	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
15	K	62	Rektum	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Ile
16	E	78	Çıkan Kolon	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Val
17	E	59	Rektum	AC	2	IV	-	Ile/Ile
18	E	69	Çekum	TYH	3	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Val

E: erkek, **K:** kadın, **AC:** adenokarsinom, **MAC:** müsinöz adenokarsinom, **TYH** : taşlı yüzük hücreli

Tablo-11b: Hastaların cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, histolojik tip, grade, evre ve GSTT1, GSTM1, GSP1 genotip dağılımı

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Lokalizasyon	Histolojik tip	Grade	Evre	Genotip	Genotip
19	E	73	Çıkan Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
20	E	47	Rektum	TYH	3	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
21	E	60	Rektosigmoid	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
22	E	58	Rektum	AC	2	IV	-	Ile/Ile
23	E	69	Rektum	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Val
24	E	59	Rektum	MAC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Val
25	E	40	Rektum	MAC	2	IV	-	Ile/Ile
26	E	73	İnen Kolon	MAC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Val
27	E	67	İnen Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
28	E	67	Sigmoid Kolon	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
29	E	60	Rektosigmoid	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
30	E	54	Rektum	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
31	E	53	Çıkan Kolon	MAC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
32	E	56	Rektosigmoid	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Ile
33	E	69	Rektum	MAC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
34	E	64	Çıkan Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Val
35	E	73	Transvers kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
36	E	68	Rektum	MAC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Val
37	E	69	Rektum	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
38	E	43	Sigmoid Kolon	TYH	3	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Ile
39	E	70	Rektum	AC	3	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
40	E	25	Çıkan Kolon	TYH	3	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
41	E	67	Rektum	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Val
42	E	60	Rektosigmoid	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	-
43	E	57	Çıkan Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Ile
44	E	58	Rektum	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Val
45	E	47	Transvers kolon	MAC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Val
46	E	82	İnen Kolon	MAC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Ile
47	K	64	Sigmoid Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Val
48	E	71	Transvers kolon	MAC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Val
49	K	27	İnen Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Val/Val
50	K	62	Transvers kolon	MAC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
51	K	64		AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Val
52	K	56	Rektosigmoid	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile

E: erkek, **K:** kadın, **AC:** adenokarsinom, **MAC:** müsinöz adenokarsinom, **TYH:** taşlı yüzük hücreli

Tablo-11c: Hastaların cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, histolojik tip, grade, evre ve GSTT1, GSTM1, GSTP1 genotip dağılımı

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Lokalizasyon	Histolojik tip	Grade	Evre	Genotip	Genotip
53	K	56	Sigmoid Kolon	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
54	K	70	Çıkan Kolon	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
55	E	39	Rektum	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Ile
56	E	30	Rektosigmoid	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
57	E	62	Rektum	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Ile
58	E	62	Rektum	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Val
59	E	55	Rektum	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
60	K	46	Sigmoid Kolon	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
61	K	59	Sigmoid Kolon	MAC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Val
62	E	57	Çıkan Kolon	MAC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
63	E	57	Rektum	MAC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
64	E	69	Sigmoid Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Ile
65	E	57	İnen Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
66	K	56	Çıkan Kolon	MAC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
67	E	67	İnen Kolon	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	-
68	K	61	Rektum	MAC	2	IV	T1(0)M1(0)	Ile/Ile
69	K	78	Sigmoid Kolon	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
70	K	65	Sigmoid Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
71	K	72	Rektum	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	-
72	K	74	Çıkan Kolon	MAC	2	IV	T1(+)M1(+)	-
73	E	66	Çıkan Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Ile
74	E	66	Sigmoid Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Val
75	K	54	Rektum	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
76	E	70	Çıkan Kolon	AC	2	IV	-	Ile/Ile
77	K	53	Çekum	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
78	E	59	Rektum	MAC	2	IV	-	Ile/Ile
79	K	66	Sigmoid Kolon	AC	2	IV	-	Ile/Ile
80	K	56	Rektum	AC	2	IV	-	Ile/Ile
81	E	62	Rektosigmoid	AC	2	IV	-	Ile/Ile
82	E	67	Çıkan Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
83	E	49	Rektosigmoid	AC	2	IV	-	Ile/Ile
84	E	49	Çekum	MAC	-	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
85	K	59	Sigmoid Kolon	AC	2	IV	-	Ile/Ile
86	K	49	Rektum	TYH	3	IV	-	Ile/Ile
87	E	67	Rektosigmoid	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Val

E: erkek, **K:** kadın, **AC:** adenokarsinom, **MAC:** müsinöz adenokarsinom, **TYH:** taşlı yüzük hücreli

Tablo-11d: Hastaların cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, histolojik tip, grade, evre ve GSTT1, GSTM1, GSTP1 genotip dağılımı

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Lokalizasyon	Histolojik tip	Grade	Evre	Genotip	Genotip
88	K	66	Çıkan Kolon	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Val
89	E	56	Rektum	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Val
90	E	51	Rektum	AC	2	IV	-	Ile/Ile
91	E	51	Rektum	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
92	K	60	Transvers kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Ile
93	E	55	Rektum	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Val
94	K	56	Sigmoid Kolon	MAC	-	IV	-	Ile/Val
95	E	66	Rektum	AC	-	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
96	K	44	Çıkan Kolon	AC	2	IV	-	Ile/Val
97	E	43	Sigmoid Kolon	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
98	E	59	Rektum	AC	2	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
99	K	41	Rektum	AC	3	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
100	E	49	Rektum	AC	3	IV	-	Val/Val
101	E	35	Çıkan Kolon	AC	3	IV	T1(+)M1(+)	Val/Val
102	E	56	Rektosigmoid	AC	2	IV	-	Ile/Ile
103	K	61	İnen Kolon	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
104	K	47	Rektum	AC	-	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Val
105	K	61	Rektum	AC	-	IV	T1(0)M1(0)	Ile/Ile
106	E	34	Çıkan Kolon	AC	-	IV	-	Ile/Val
107	K	57	Rektum	AC	-	IV	-	Ile/Ile
108	E	58	Çekum	AC	-	IV	M1(+)T1(0)	Val/Val
109	E	61	Çekum	AC	-	IV	-	Ile/Ile
110	E	48	Sigmoid Kolon	MAC	-	IV	T1(+)M1(+)	Ile/Ile
111	K	38	Rektum	AC	-	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
112	E	73	Rektosigmoid	AC	-	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile
113	E	38	Sigmoid Kolon	MAC	-	IV	T1(+)M1(0)	Ile/Ile
114	E	59	Çıkan Kolon	AC	-	IV	M1(+)T1(0)	-
115	E	58	Çekum	AC	-	IV	-	Ile/Ile
116	E	49	Rektum	AC	2	IV	M1(+)T1(0)	Ile/Ile

E: erkek, **K:** kadın, **AC:** adenokarsinom, **MAC:** müsinöz adenokarsinom, **TYH:** taşlı yüzük hücreli

Yapılan DNA izolasyonu ve PCR çalışmaları sonrası GSTT1 geni ve GSTM1 geni polimorfizmleri açısından çalışmaya alınan 116 hastanın 92'sinden kullanılabilir veriler elde edilebilmiştir. Hastaların 58'i erkek (%63), 34'ü kadın (%37) olup, erkek/kadın oranı 1,7 idi. Yapılan DNA

izolasyonu ve PCR çalışmaları sonrası GSTT1 geni ve GSTM1 geni polimorfizmleri açısından çalışmaya alınan 128 kontrol grubunun 116'sından kullanılabilir veriler elde edilebilmiştir. Kontrol grubunun 59'u erkek (%50,9), 57'si (49,1) kadın olup, kontrol grubu ve hasta grubu arasında cinsiyet ($p= 0,079$) açısından istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Hastaların medyan yaş değeri 60 (18-82) yıl olarak saptandı, kontrol grubunun medyan yaş değeri 56 (47-86) yıl olarak saptandı. Kontrol grubu ve hasta grubu arasında yaş ($p= 0,065$) açısından istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Erkek hastaların medyan yaş değeri 60 (25-82) yıl iken, kadın hastaların medyan yaş değeri 61 (18-78) yıl olarak bulundu.

Yapılan DNA izolasyonu ve PZR çalışmaları sonrası GSTP1(Ile105Val) geni polimorfizmi açısından çalışmaya alınan 116 hastanın 111'inden kullanılabilir veriler elde edilebilmiştir. Hastaların 70'i erkek (%63,1), 41'i kadın (%36,9) olup, erkek/kadın oranı 1,7 idi. Yapılan DNA izolasyonu ve PZR çalışmaları sonrası GSTP1 (Ile105Val) geni polimorfizmi açısından çalışmaya alınan 128 kontrol grubunun 122'sinden kullanılabilir veriler elde edilebilmiştir. Kontrol grubunun 63'ü erkek (%51,6), 59'u (%48,4) kadın olup, kontrol grubu ve hasta grubu arasında cinsiyet ($p= 0,078$) açısından istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Hastaların medyan yaş değeri 59 (18-82) yıl olarak saptandı, kontrol grubunun medyan yaş değeri 56,5 (45-86) yıl olarak saptandı. Kontrol grubu ve hasta grubu arasında yaş ($p= 0,333$) açısından istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Erkek hastaların medyan yaş değeri 59 (25-82) yıl iken, kadın hastaların medyan yaş değeri 59 (18-78) yıl olarak bulundu. Hastaların 89'u (%76,7) 50 yaş üstünde, 27'si (%23,3) 50 yaş altında tanı almış idi.

Tümör lokalizasyonuna göre sınıflandırıldığında 115 hastanın 7'si (%6,1) çekum, 21'i (%18,3) çıkan kolon, 5'i (%4,3) transvers kolon, 11'i (%9,6) inen kolon, 18'si (%15,7) sigmoid kolon, 12'si (%10,4) rektosigmoid ve 41'i (%35,7) rektum yerleşimli idi. Histolojik tiplerine göre değerlendirilen 116 tümör örneğinin 87'si (%75) adenokarsinom, 22'si (%19) müsinöz adenokarsinom, 7'si (%6) taşlı yüzük hücreli karsinom idi. Değerlendirmeye alınan 100 tümör örneklerinin 89'u (%89) orta derece diferansiye (grade II),

11'i (%11) kötü derece diferansiye (grade III) idi. Tümör evresine göre değerlendirmeye alınan 116 hastanın tamamı evre IV idi (Tablo-12).

Tablo-12: Hastaların cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, histolojik tip, diferansiyasyon ve evre bakımından dağılımları.

	Sayı (%)
Cinsiyet	
Erkek	73 (%62,9)
Kadın	43 (%37,1)
Yaş (Yıl)*	59 (19-82)
Yaş	
50>	89 (%76,7)
50≤	27 (%23,3)
Tümör Lokalizasyonu	
Çekum	7 (%6,1)
Çıkan kolon	21 (%18,3)
Transvers kolon	5 (%4,3)
İnen kolon	11 (%9,6)
Sigmoid kolon	18 (%15,7)
Rektosigmoid kolon	12 (%10,4)
Rektum	41 (%35,7)
Histolojik Tip	
Adenokarsinom	87 (%75)
Müsinöz Adenokarsinom	22 (%19)
Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom	7 (%6)
Diferansiyasyon	
Orta diferansiye	89 (%89)
Kötü diferansiye	11 (%11)
Evre IV	116 (%100)

*Median

GSTT1 geni ve GSTM1 geni açısından 92 KRK hastasının,116 kontrolün verileri değerlendirildi. GSTM1 null genotipi taşıyan hasta sayısı 27 (%29,3), M1 pozitif genotipi taşıyan hasta sayısı 65 (%70,7) bulundu. GSTM1

null genotipi taşıyan kontrol sayısı 49 (%42,2), M1 pozitif genotipi taşıyan kontrol sayısı 67 (%57,8) bulundu. GSTM1 genotip dağılımı açısından KRK hastaları ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). GSTT1 için 34 hasta (%37) null genotipi taşıırken, 58 hasta (%63) T1 pozitif bulundu. GSTT1 null genotipi taşıyan kontrol sayısı 25 (%21,6) T1 pozitif genotip taşıyan kontrol sayısı 91 (%78,4) bulundu. GSTT1 genotip dağılımı açısından KRK hastaları ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). GSTP1 (Ile105Val) polimorfizmi açısından 111 KRK hastasının, 122 kontrolün verileri değerlendirildi. GSTP1 (Ile105Val) polimorfizmi için 76 hastada (%68,5) Ile/Ile genotipi, 28 hastada (%25,2) Ile/Val genotipi ve 7 hastada (%6,3) Val /Val genotipi bulundu. Kontrol grubunda ise GSTP1 (Ile105Val) polimorfizmi için 61 bireyde (%50) Ile/Ile genotipi, 58 bireyde (%47,5) Ile/Val genotipi ve 3 bireyde (%2,5) Val/Val genotipi bulundu. GSTP1 (Ile105Val) polimorfizmi Ile/Ile genotipi hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanırken ($p=0,004$), Ile/Val genotipi kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı ($p<0,001$). Ile/Val ve Val/Val genotipini birlikte değerlendirdiğimizde 76 hastada (%68,5) Ile/Ile genotipi, 35 hastada (%31,5) Ile/Val veya Val/Val genotipi, 61 kontrolde (%50) Ile/Ile genotipi, 61 kontrolde (%50) Ile/Val veya Val/Val genotipi saptanmıştır. GSTP1 (Ile105Val) polimorfizmi Ile/Ile genotipi hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanırken, Ile/Val veya Val/Val genotipi kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı ($p=0,004$). Hasta ve kontrol grubu allel frekansı açısından değerlendirildiğinde hasta grubunda Ile allel frekans sıklığı %81,1, Val allel frekans sıklığı %18,9 iken kontrol grubunda Ile allel frekans sıklığı %73,8, Val allel frekans sıklığı %26,2 saptanmıştır. Allel frekansları açısından kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,06$) (Tablo-13).

Tablo-13: Kolorektal kanser ve kontrol grubu arasında GSTT1, GSTM1 ve GSTP1 genotip ve allel frekanslarının dağılımı açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması

Genotip	Hasta (n = 92) n(%)	Kontrol (n = 116) n(%)	p Değeri
GSTM1			0,55
(+)	65 (%70,7)	67 (%57,8)	
(0)	27 (%29,3)	49 (%42,2)	
GSTT1			0,14
(+)	58 (%63)	91 (%78,4)	
(0)	34 (%37)	25 (%21,6)	
Genotip	Hasta (n = 111) n(%)	Kontrol (n = 122) n(%)	p Değeri
GSTP1 Ile105Val			
Ile/Ile	76 (%68,5)	61 (%50)	0,004
Ile/Val	28 (%25,2)	58 (%47,5)	<0,001
Val/Val	7 (%6,3)	3 (%2,5)	0,200
Val**	35 (%31,5)	61 (%50)	0,004
Allel			
Ile*	81,1	73,8	0,06
Val*	18,2	26,2	

* (%) allel sıklığı, ** Ile/Val veya Val/Val

GSTM1 ve GSTT1 ikili kombine genotip dağılımları değerlendirildiğinde hastaların 34'ü (%37), kontrollerin 56'sı (%48,3) GSTT1 pozitif, GSTM1 pozitif kombine genotipi taşımakta olup hasta grubu ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamaktadır (p=0,102). GSTT1 pozitif GSTM1 null kombine genotipi hastaların 24'ünde (%26,1) kontrollerin 35'inde (%30,2) saptanmış olup hasta grubu ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamaktadır (p=0,621). GSTT1 null, GSTM1 pozitif kombine genotipi hastaların 31'inde (%33,7), kontrollerin 11'inde (%9,5) saptanmış olup hasta grubu ve kontroller

arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,001$). GSTT1 null, GSTM1 null kombine genotipi hastaların 3'ünde (%3,3), kontrollerin 14'ünde (%12,1) saptanmış olup hasta grubu ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p = 0,041$) (Tablo-14).

Tablo-14: Kolorektal kanser ve kontrol grubu arasında GSTM1 ve GSTT1 ikili kombine genotip dağılımları açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması

Kombine Genotip		Hasta (n=92) n(%)	Kontrol (n=116) n(%)	p Değeri
GSTM1	GSTT1			
(+)	(+)	34 (%37)	56 (%48,3)	$p = 0,102$
(+)	(0)	31 (%33,7)	11 (%9,5)	$p < 0,001$
(0)	(+)	24 (%26,1)	35 (%30,2)	$p = 0,621$
(0)	(0)	3 (%3,3)	14 (%12,1)	$p = 0,041$

GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 (Ile105Val) kombine genotip dağılımları değerlendirildiğinde hastaların 24'ü (%27,6), kontrollerin 26'sı (%23,9) GSTT1 pozitif, GSTM1 pozitif ve GSTP1 Ile/Ile kombine genotipi taşımakta olup hasta grubu ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamaktadır ($p = 0,551$). GSTT1 pozitif, GSTM1 pozitif ve GSTP1 Val (Ile/Val, Val/Val) kombine genotipi hastaların 8'inde (%9,2), kontrollerin 26'sinde (%23,9) saptanmış olup hasta grubu ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p = 0,012$). GSTT1 null, GSTM1 pozitif, GSTP1 Ile/Ile kombine genotipi hastaların 19'unda (%21,8), kontrollerin 6'sında (%5,5) saptanmış olup hasta grubu ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p = 0,001$). GSTT1 null, GSTM1 pozitif, GSTP1 Val (Ile/Val, Val/Val) kombine genotipi hastaların 10'unda (%11,5), kontrollerin 5'inde (%4,6) saptanmış olup hasta grubu ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p = 0,124$). GSTT1 pozitif, GSTM1 null, GSTP1 Ile/Ile kombine genotipi hastaların 12'sinde (%13,8), kontrollerin 19'unda (%17,4) saptanmış olup hasta grubu ve

kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,62). GSTT1 pozitif, GSTM1 null, GSTP1 Val (Ile/Val, Val/Val) kombine genotipi hastaların 11'inde (%12,6), kontrollerin 13'ünde (%11,9) saptanmış olup hasta grubu ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=1). GSTT1 null, GSTM1 null, GSTP1 Ile/Ile kombine genotipi hastaların 3'ünde (%3,4), kontrollerin 7'sinde (%6,4) saptanmış olup hasta grubu ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,517). GSTT1 null, GSTM1 null, GSTP1 Val (Ile/Val, Val/Val) kombine genotipi hastalarda saptanmazken, kontrollerin 7'sinde (%6,4) saptanmış olup hasta grubu ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0,018) (Tablo-15).

Tablo-15: Kolorektal kanser ve kontrol grubu arasında GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 üçlü kombine genotip dağılımları açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması

Kombine Genotip			Hasta (n=87) n(%)	Kontrol (n=109) n(%)	p Değeri
GSTM1	GSTT1	GSTP1			
(+)	(+)	Ile/Ile	24 (%27,6)	26 (%23,9)	0,551
(+)	(+)	Val*	8 (%9,2)	26 (%23,9)	0,012
(+)	(0)	Ile/Ile	19 (%21,8)	6 (%5,5)	0,001
(+)	(0)	Val*	10 (%11,5)	5 (%4,6)	0,124
(0)	(+)	Ile/Ile	12 (%13,8)	19 (%17,4)	0,620
(0)	(+)	Val*	11(%12,6)	13 (%11,9)	1,000
(0)	(0)	Ile/Ile	3 (%3,4)	7 (%6,4)	0,517
(0)	(0)	Val*	0	7 (%6,4)	0,018

*Ile/Val veya Val/Val

50 yaş üstü ve altı KRK hastaları GSTT1 geni ve GSTM1 geni açısından değerlendirildiğinde 50 yaş üstü hastaların 23'ü (%32,4), 50 yaş ve altı hastaların 4'ü (%19) GSTM1 null genotipi taşıırken, 50 yaş üstü hastaların 48'i (%67,6), 50 yaş ve altı hastaların 17'si (%81) GSTM1 pozitif genotipi taşımaktaydı. GSTM1 genotip dağılımı açısından 50 yaş üstü ve altı hastalar

arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,364$). 50 yaş üstü hastaların 26'sı (%36,6), 50 yaş ve altı hastaların 8'i (%38,1) GSTT1 null genotipi taşıırken, 50 yaş üstü hastaların 45'i (%63,4), 50 yaş ve altı hastaların 13'ü (%61,9) GSTT1 pozitif genotip taşımaktaydı. GSTT1 genotip dağılımı açısından 50 yaş üstü ve altı hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=1,000$). 50 yaş üstü ve altı KRK hastaları GSTP1 (Ile105Val) açısından değerlendirildiğinde 50 yaş üstü hastaların 58'i (%69), 50 yaş ve altı hastaların 18'i (%66,7) Ile/Ile genotipi bulunmuştur. 50 yaş altı ve üstü hastalar arasında Ile/Ile genotipi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,999$). 50 yaş üstü hastaların 22'si (%26,2), 50 yaş ve altı hastaların 6'sı (%22,2) Ile/Val genotipi bulunmuştur. 50 yaş altı ve üstü hastalar arasında Ile/Val genotipi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,878$). 50 yaş üstü hastaların 4'ü (%4,8), 50 yaş ve altı hastaların 3'ü (%11,1), Val/Val genotipi bulunmuştur. 50 yaş altı ve üstü hastalar arasında Val/Val genotipi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,358$). Allel frekansları açısından değerlendirildiğinde 50 yaş üstü hastaların %82,1'inde, 50 yaş ve altı hastaların %77,8'inde Ile alleli bulunmuştur. 50 yaş üstü hastaların %17,9'unda, 50 yaş ve altı hastaların %22,2'sinde Val alleli bulunmuştur. 50 yaş altı ve 50 yaş üstü hastalar arasında allel frekansı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,608$) (Tablo-16).

Tablo-16: 50 yaş altı ve üstü kolorektal kanser hasta grubu arasında GSTT1, GSTM1 ve GSTP1 genotip ve allel frekanslarının dağılımı açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması

Genotip	Hasta Yaşı >50 n(%)	Hasta Yaşı ≤50 n(%)	p değeri
GSTM1			0,364
(+)	48 (%67,6)	17(%81)	
(0)	23 (%32,4)	4(%19)	
GSTT1			1.000
(+)	45(%63,4)	13(%61,9)	
(0)	26(%36,6)	8(%38,1)	
GSTP1 Ile105Val			
Ile/Ile	58(%69)	18(%66,7)	0,999
Ile/Val	22(%26,2)	6(%22,2)	0,874
Val/Val	4(%4,8)	3(%11,1)	0,358
Ile*	82,1	77,8	0,608
Val *	17, ²	22,2	

* (%) allel sıklığı

Hasta grubuna ait patolojik parametreler genotip dağılımı açısından değerlendirildi. GSTM1 null ve GSTM1 pozitif genotipleri arasında tümör histolojik tipi, grade, ve lokalizasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo-17). GSTT1 null ve GSTT1 pozitif genotipleri arasında tümör histolojik tipi, grade ve lokalizasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo-18). GSTP1 Ile/Ile, Ile/Val ve Val/Val genotipleri ile tümör histolojik tipi, grade ve

lokalisasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo-19).

Tablo-17: Hastaların tümör lokalizasyonu, histolojik tip, diferansiyasyon ve GSTM1 genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak karşılaştırılması.

	GSTM1 (0) n(%)	GSTM1 (+) n(%)	p-değeri
Tümör lokalizasyonu			0,833
Çekum	1 (3,7)	4 (6,3)	
Çıkan Kolon	3 (11,1)	14 (21,9)	
Transves Kolon	2 (7,4)	3 (4,7)	
İnen Kolon	3 (11,1)	7 (10,9)	
Sigmoid Kolon	4 (14,8)	11 (17,2)	
Rektosigmoid Kolon	4 (14,8)	5 (7,8)	
Rektum	10 (37)	20 (31,3)	
Histolojik Tip			0,924
Adenokarsinom	21 (77,8)	47 (72,3)	
Müsinöz Adenokarsinom	5 (18,5)	13 (20)	
Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom	1 (3,7)	5 (7,7)	
Grade			0,264
Orta Diferansiye	24 (96)	49 (86)	
Kötü Diferansiye	1 (4)	8 (14)	

Tablo-18: Hastaların tümör lokalizasyonu, histolojik tip, diferansiyasyon ve GSTT1 genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak karşılaştırılması.

	GSTT1 (0) n(%)	GSTT1 (+) n(%)	p-değeri
Tümör lokalizasyonu			0,879
Çekum	3 (9,1)	2 (3,2)	
Çıkan Kolon	7 (21,2)	10 (17,2)	
Transves Kolon	1 (3)	4 (6,9)	
İnen Kolon	3 (9,1)	7 (12,1)	
Sigmoid Kolon	5 (15,2)	10 (17,2)	
Rektosigmoid Kolon	4 (12,1)	5 (8,6)	
Rektum	10 (30,3)	20 (34,5)	
Histolojik Tip			0,930
Adenokarsinom	26 (76,5)	42 (72,4)	
Müsinöz Adenokarsinom	6 (17,6)	12 (20,7)	
Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom	3 (5,9)	4 (6,9)	
Grade			1,000
Orta Diferansiye	24 (88,9)	49 (89,1)	
Kötü Diferansiye	3 (11,1)	6 (10,9)	

Tablo-19: Hastaların tümör lokalizasyonu, histolojik tip, diferansiyasyon ve GSTP1 genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak karşılaştırılması.

	GSTP1 Ile/Ile n(%)	GSTP1 Ile/Val n(%)	GSTP1 Val/Val n(%)	p-değeri
Tümör lokalizasyonu				0,478
Çekum	4 (5,3)	1 (3,7)	2 (28,6)	
Çıkan Kolon	12 (15,8)	6 (22,2)	1 (14,3)	
Transves Kolon	3 (3,9)	2 (7,4)	0	
İnen Kolon	7 (9,2)	1 (3,7)	2 (28,6)	
Sigmoid Kolon	15 (18,4)	4 (14,8)	0	
Rektosigmoid Kolon	9 (11,8)	2 (7,4)	0	
Rektum	27 (35,5)	11 (40,7)	2 (28,6)	
Histolojik Tip				0,428
Adenokarsinom	58 (76,3)	18 (64,3)	7 (100)	
Müsinöz Adenokarsinom	13 (17,1)	8 (28,6)	0	
Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom	5 (6,6)	2 (7,1)	0	
Grade				0,216
Orta Diferansiye	59 (89,4)	22 (91,7)	4 (66,7)	
Kötü Diferansiye	7 (10,6)	2 (8,3)	2 (33,3)	

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolorektal kanserler (KRK) gastrointesinal sistemin en çok rastlanan kanseridir. Erkeklerde prostat ve akciğer kanserinden sonra üçüncü sıklıkta, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sıklıkta görülmektedir (1). Dünya çapında her sene 1 milyondan fazla kişide KRK gelişmekte ve gelişmiş dünyada hastalığa spesifik mortalite oranı yaklaşık olarak %33'tür. Bu da hastalığı toplumda önemli bir sağlık sorunu ve ekonomik yük haline getirmektedir (109). Sporadik KRK genetik altyapı, diyet ve yaşam tarzı gibi belli çevresel faktörlerin etkileşimi sonucunda meydana gelen tipik bir multifaktöriyel hastalıktır. Fakat sporadik KRK'lerdeki genetik altyapının rolü tam olarak açıklanamamıştır. Glutasyon S-transferazlar (GST) faz II metabolik enzimlerin süperfamilyasını temsil ederler ve glutasyon ile kemoteropatik ilaçlar, karsinojenler, çevresel kirlenici maddeler ve ksenobiyotiklerin geniş spektrumu arasındaki konjugasyonu katalize ederler. GST izoenzimleri farklı gelişimsel orijinleri olan üç ayrı gen (sitozolik, mikrozomal ve mitokondrial transferazlar) ailesi tarafından kodlanmıştır ve bu da memeli türü için elektrofollere ve oksidatif strese karşı koruma sağlar (10). Heterosiklik aminler insanlarda KRK'nin potansiyel sebebi olan karsinojenlerdir ve aynı zamanda GST'ler tarafından detoksifiye edildiği gösterilmiştir (110). Buna ek olarak GST'nin ekspresyonunu tetikleyen gıdaların KRK'ye karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir (111). GST'lerin KRK'lere karşı koruyucu olduğu doğrulanabilirse bu hastalık için yüksek riske sahip olan bireyler tanımlanabilir veya GST'lerin ekspresyonları diyet veya farmakolojik anlamda manupule edilerek KRK önlenir. GST'nin koruyucu rolünü araştırmanın bir yolu GST gen polimorfizminin KRK yatkınlığındaki etkisini çalışmaktır. İnsan genlerindeki üç bilinen fonksiyonel polimorfizimler GSTM1, T1 ve P1 olarak adlandırılır (102,112-114). GSTM1 ve GSTT1'in her ikisi için varyant allel, genin delesyonudur ve homozigot allel delesyonu olan bireyler null genotip olarak adlandırılır, enzim ekspresyonu görülmez. GSTP1 için iki genetik polimorfizm bilinmektedir ve Ile-105-Val, baz 1578'deki A>G yer değiştirmesinden kaynaklanır, Ala-114-Val, baz 2293'deki C>T yer

değiştirmesinden kaynaklanır. Ile-105-Val polimorfizminin fonksiyonel anlamını göstermekte hedefe yönelik mutagenезler kullanılmıştır. Ile-105 alleli 3,4-dikloro-1-nitrobenzen ile daha büyük aktiviteye sahipken, Val-105 alleli etakrinik asid ve bromosulfofitaein ile daha büyük aktiviteye sahiptir (102,105). GSTP1'in fonksiyonel polimorfizmi (rs1695, Ile105Val) daha düşük enzim aktivitesi ile sonuçlanır. GSTM1 genindeki enzimatik aktivite göstermeyen null genotipi beyaz ırkın %40-60'ında rapor edilmiştir ve GSTT1 null genotipi beyaz ırkın %10-20'sinde görülür (10). Ateş ve ark. (115) 2005 yılında Türkiye'de yaptıkları çalışmada kontrol grubunda GSTM1 ve T1 null genotiplerini sırasıyla %42, %23 oranında, GSTP1 Ile allel frekansını %75, Val allel frekansını %25 oranında saptamışlardır. Kıran ve ark. (108) 2010 yılında yaptıkları çalışmada kontrol grubunda GSTM1 ve T1 null genotiplerini sırası ile %57,7, %30,8 oranlarında saptamışlardır. Bizim çalışmamızda GSTM1 ve T1 null genotipini kontrol grubunda sırasıyla %42,2 ve %21,6 oranlarında, GSTP1 Ile allel frekansını %73,8 Val allel frekansını %26,2 oranında saptadık ve bu sonuçlar Türkiye'de yapılan diğer çalışmalar ve literatür ile uyumludur. Biz çalışmamızda KRK hasta grubu ve kontrol grubu arasında GSTT1 ve M1 delesyon polimorfizimleri açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamazken, GSTP1 (Ile105Val) gen polimorfizmi genotip dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptadık. KRK hasta grubunda Ile/Ile genotipini kontrol grubunda ise Ile/Val veya Val/Val genotipini istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptadık. Allel frekansları açısından değerlendirdiğimizde Ile allelini hasta grubunda, Val allelini ise kontrol grubunda yüksek saptadık ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. KRK hastalarının tümör lokalizasyonu, tümör diferansiasyonu, histolojik tipi içeren klinikopatolojik özellikleri ile GSTT1 ve M1 delesyon polimorfizimleri ve GSTP1 (Ile105Val) gen polimorfizmi genotip dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamadık.

Hezova ve ark. 2012 yılında 197 kolorektal kanser hastası ve 218 kontrol üzerinde yaptıkları çalışmada GSTM1, GSTT1, GSTP1 (Ile105Val), GSTA1 polimorfizimlerini incelemişlerdir. Yalnızca GSTP1 polimorfizmi Ile/Val genotipini azalmış KRK riskiyle ilişkili bulmuşlardır, diğer

polimorfizimlerle ise anlamlı ilişki saptamamışlardır (10). Khabaz (116) 2012 yılında KRK tanılı 90 hastanın doku örneğinde ve KRK olmayan 56 kolon doku örneğinde GSTP1 Ile105Val polimorfizmi genotip dağılımı açısından anlamlı fark bulmamıştır. Ayrıca çalışmalarında GSTP1 Ile105Val polimorfizmi ile hastaların yaşı, cinsiyeti, tümörün yerleşim yeri, grade ve evresi arasında ilişki saptamamışlardır. Konstantinos ve ark. (117) KRK ile GSTM1, T1 delesyon polimorfizimleri ve GSTP1 (Ile105Val) polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla meta analiz çalışması yapmışlardır. GSTM1 için 44 çalışma (11.998 KRK ve 17.552 kontrol), GSTT1 için 34 çalışma (8596 vaka, 13598 kontrol), GSTP1 için 19 çalışma (5421 vaka, 7671 kontrol), GSTA1 için 4 çalışma (1648 vaka, 2039 kontrol) incelemişlerdir. Beyaz ırk ve Çin popülasyonu için ayrı analizler yapmışlar ve GSTM1 ve T1 null alel taşıyıcılarında KRK için Beyaz ırkda artmış risk saptamışlardır. Ancak Çin popülasyonu için anlamlı ilişki saptamamışlardır. GSTP1 Ile105Val polimorfizmi için her iki ırkta KRK ile ilişki saptamamışlardır. Yong Gao ve ark. (118) KRK ile GSTM1 delesyon polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla 36 vaka kontrol çalışmasını içeren meta analiz çalışması sonucunda GSTM1 null genotipi ve KRK riski arasında anlamlı ilişki saptamışlardır. Ayrıca çalışmada tümör yerleşimi (distal kolon, proksimal kolon) ve etnisiteye (Beyaz ırk, Asya, Afrikan Amerikan) göre sınıflandırıldığında GSTM1 null genotipi ile sadece Beyaz ırkda ve tümörün proksimal yerleşimlilerde anlamlı ilişki saptamışlardır. Yong Gao ve ark. (119) KRK ile GSTP1 (Ile105Val) polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla 16 vaka kontrol çalışmasını içeren meta analiz çalışması sonucunda GSTP1 (Ile105Val) polimorfizmi ve KRK riski arasında anlamlı ilişki saptamamışlardır. Deakin ve ark. (107) yaptıkları çalışmada GSTT1 ve GSTM1 genotipleri ile oral kanser (40 vaka), akciğer kanseri (108 vaka), mide kanseri (136 vaka) ile aralarında anlamlı ilişki saptamamışlardır. Ancak GSTT1 null genotipiyle KRK (252 vaka) arasında anlamlı ilişki saptamışlardır. Ayrıca GSTT1 ve M1 genotip dağılımı açısından kadın/erkek cinsiyet, 65 yaş altı ve üstündeki hastalar, tümörün yerleşimi (sağ, sol, rektum), Dukes sınıflaması ve diferansiasyonu

açısından anlamlı ilişki saptamamışlardır. Aynı çalışmada GST1 null genotipin artmış ülseratif kolit riskiyle ilişkili olduğunu göstermişlerdir ve kalın barsakta tanımlanmamış ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda genin önemini desteklemekte olduğunu belirtmişlerdir. GSTT1'in halojenize organik bileşikler metabolize etme yeteneğine bakıldığında epidemiyolojik çalışmalar KRK ve ürünler aracılığı ile klorünasyon ürünlerinin tüketimi arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Kloroform ve diğer halojenize bileşikler suyun potansiyel kirlenici maddeleridir. Fakat bazı halojenize hidrokarbonlar GSTT1 aracılı konjugasyon ile detoksifiye edilebilse de diğerleri aktive edilebileceği için gen çevre etkileşimini göstermede detaylı kimyasal özel maruz kalma verilerine ihtiyaç vardır. Koh ve ark. (120) 480 KRK hastası, 1167 kontrol üzerinde yaptıkları çalışmada kontrol hastaları ve KRK hastaları arasında GSTT1, M1 ve GSTP1 (Ile105Val) polimorfizmi arasında anlamlı ilişki saptamamışlardır. Aynı çalışmada sigara kullanımı ile KRK arasında ilişkiyi incelemişlerdir. GST null veya düşük enzim aktivitesi gösteren (GSTP1 Ile/Val, Val/Val) genotipe sahip olmayan ağır sigara içicileri ile sigara içmeyenler arasında KRK riski açısından fark saptamamışlardır. Ancak en az iki GST null / düşük enzim aktivitesi gösteren genotipe sahip ağır sigara içicilerinde istatistiksel olarak yüksek anlamlı artmış KRK riski saptamışlardır (OR, 5,43; 95% CI, 2,22–13,23). Bir GST null / düşük enzim aktivitesi gösteren genotipe sahip ağır sigara içicilerinde istatistiksel olarak daha düşük anlamlı artmış KRK riski saptamışlardır (OR, 2,43; 95% CI, 1,01–5,86). Bu bulguların sonucunda bireyler arası sigara ile ilişkili KRK yatkınlığını GST gen polimorfizimlerinin etkileyebileceğini öne sürmüşlerdir. Sigaradaki kolorektal karsinojenlerin detoksifikasyonunda GST enzimlerinin önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Lai ve ark. (121) 491 KRK hastası ve GSTT1, M1 ve GSTP1 (Ile105Val) polimorfizimleri arasında anlamlı ilişki saptamamışlardır. Tümör yerleşim yerini kolon ve rektum olarak sınıflamışlar ve GSTT1, M1 ve GSTP1 (Ile105Val) polimorfizmi arasında anlamlı ilişki saptamamışlardır. Yine aynı çalışmada genel sağkalım ile GSTT1, M1 ve GSTP1 (Ile105Val) polimorfizmi arasında anlamlı ilişki saptamamışlardır.

Sporadik KRK yatkınlığı multifaktöriyeldir ve düşük penetranslı genlerin allelik varyantları ile diyet, yaşam alışkanlıkları gibi çevresel faktörlerin karşılıklı etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Özellikle her düşük penetranslı allelin KRK gelişiminde az etkisi vardır, ancak diğer olası allellerle ve çevresel risk faktörleriyle etkileşimi kolorektal kanser riskinde önemli artışla sonuçlanır (122). Bizim çalışmamızda GSTT1 null, GSTM1 null kombine genotipi hastaların 3'ünde (%3,3), kontrollerin 14'ünde (%12,1) saptanmış olup kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır. Ayrıca GSTT1 null, GSTM1 null, GSTP1 Val (Ile/Val, Val/Val) üçlü kombine genotipi hastalarda saptanmazken, kontrollerin 7'sinde (%6,4) saptanmış olup kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır. GSTT1 null, GSTM1 pozitif, GSTP1 Ile/Ile kombine genotipi hastaların 19'unda (%21,8), kontrollerin 6'sında (%5,5) saptanmış olup hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır. Wang ve ark. (122) 302 KRK hastasında yaptığı çalışmada GSTM1 null genotipini anlamlı artmış rektal kanser riskiyle, GSTT1 null genotipini ise anlamlı artmış kolon kanser riskiyle ilişkili bulmuşlardır. Aynı çalışmada ikili kombine GSTM1 null, T1 null, ikili kombine GSTM1 null, P1 Ile/Val/Val/Val ve ikili kombine GSTT1 null, P1 Ile/Val/Val/Val, üçlü kombine GSTM1 null, GSTT1 null, P1 Ile/Val/Val/Val genotipleri ile KRK arasında anlamlı artmış ilişki saptamışlardır. GST polimorfizmlerinin etkisi ikili ve ya üçlü GSTT1, M1, P1 Ile105Val kombinasyonları ile artmakta olduğunu belirtmişlerdir. Piao ve ark. (123) GSTT1, M1 genotipleri ve kombine GSTT1 ve M1 null genotipleriyle KRK arasında anlamlı ilişki saptamamışlardır. Ayrıca KRK hastalarında sigara, alkol kullanımı, tümörün evresi, yerleşim yeri ile GSTT1 null ve GSTM1 null genotipleri arasında anlamlı ilişki saptamamışlardır. Welfare ve ark. (124) 178 KRK hastasında GSTT1 null ve GSTM1 null genotipleri ile hastalık arasında anlamlı ilişki saptamamışlardır. Yine aynı çalışmada GSTT1 null ve NAT2 yavaş kombine genotiplerini KRK için risk faktörü olarak bulmuşlardır. GSTT1 ve GSTM1 null genotipleri, GSTP1 Ile105Val polimorfizmi KRK riski arasındaki tartışmalı sonuçlar sınırlı örnek sayısı veya etnisite farklılıkları

veya çalışma düzeni farklılıkları ve aynı zamanda farklı çevresel faktörlere maruz kalmaya dayandırılabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda KRK ve GSTT1 ve M1 delesyon polimorfizimleri arasında ilişki saptamazken, GSTP1 gen polimorfizi Ile/Ile genotipini hasta grubunda yüksek saptadık. Ayrıca KRK hastalarının klinikopatolojik özellikleri ile GSTT1, M1 ve P1 gen polimorfizimleri arasında ilişki saptamadık. Gelecekte daha büyük hasta grupları üzerinde yapılacak çalışmalar KRK hastalarında GST gen polimorfizimleri ve klinikopatolojik ilişkilerin ortaya konulmasında daha sağlıklı verilerin elde edilmesini sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011;61:69-90.
2. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx Erişim: 01.04.2014
3. Ghazi S, Lindforss U, Lindberg G, Berg E, Lindblom A, Papadogiannakis N; Low-Risk Colorectal Cancer Study Group. Analysis of colorectal cancer morphology in relation to sex, age, location, and family history. J Gastroenterol 2012;47:619-34.
4. Turkiewicz D, Miller B, Schache D, et al. Young patients with colorectal cancer: how do they fare? ANZ J Surg 2001;12: 707-10.
5. Houlston SR, Tomlinson PM. Polymorphisms and Colorectal tumor risk. Gastroenterology 2001;121:282-301.
6. Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. Gastroenterology 2010;138:2029-43.
7. Libutti SK, Saltz LB, Rustgi AK, Teper JE. Cancer of Colon. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). Principles and Practice of Oncology. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005:1060-109.
8. Bertram JS. The molecular biology of cancer. Mol Aspects Med 2000;21:167-223.
9. Ekmekçi A, Konaç E, Önen Hİ. Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık. Marmara Medical Journal 2008;21:282-95.
10. Hezova R, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, et al. Common polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and susceptibility to colorectal cancer in the Central European population. Eur J Med Res 2012;17:17.
11. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 2009;59:225-49.
12. <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html> Erişim: 01.04.2014
13. Soytürk M. Risk Temelli Tarama Önerileri ve Cerrahi Yaklaşımlar. Türkiye Klinikleri Türkiye Klinikleri J Med Oncol 2013;6:14-9.
14. Parramore JB, Wei JP, Yeh KA. Colorectal cancer in patients under forty:presentation and outcome. Am Surg 1998; 6:563-8.
15. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/browse_csr.php?sectionSEL=6&pageSEL=sect_06_table.10.html Erişim: 01.05.2014
16. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. Orphanet J Rare Dis 2009;4:22.
17. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med 1988;319:525–32.

18. Welfare MR, Cooper J, Bassendine MF, et al. Relationship between acetylator status, smoking, and diet and colorectal cancer risk in the north-east of England. *Carcinogenesis* 1997;18:1351–4
19. Labianca R, Beretta GD, Kildani B, et al. Colon Cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2010;74:106-33.
20. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, et al. Primary Colon Cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010;21:70-7.
21. Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH (eds). *Sleisenger & Fordteran's Gastrointestinal and liver disease Pathophysiology/ Diagnosis/Management*. 7th ed. Philadelphia: Saunders;2002.
22. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386:623-7.
23. Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthews JB, Pollock RE. Colon, Rectum and Anus. In: Brunicaardi FC (Ed.). *Textbook of Schwarz's Principles of Surgery*. 9th edition, Newyork: McGraw-Hill, 2010;29:1013-73.
24. Knudsen AL, Bisgaard ML, Bülow S. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer* 2003;2:43-55.
25. Meydan N. Moleküler patogenetik mekanizmalar ve kalıtsal kolorektal kanser sendromları. *Turkiye Klinikleri J Med Oncol* 2013;6:6-13.
26. Benchabane H, Ahmed Y. The adenomatous polyposis coli tumor suppressor and Wnt signaling in the regulation of apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2009;656:75–84.
27. Goldman L, Ausiello DA. Small and large bowel tumors. In: DuBois RN (ed). *Cecil textbook of medicine*. 23rd edition. Philadelphia: Saunders; 2008. 355-63.
28. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germline mutations in MYH. *N Engl J Med* 2003;348:791-9.
29. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: An updated review. *Gastroenterology* 1993;104:1535-49.
30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/> Erişim 01.05.2014
31. Karlén P, Löfberg R, Broström O, et al. Increased risk of cancer in ulcerative colitis:a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:1047–52.
32. Bedeir A, Krasinskas AM. Molecular diagnostics of colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:578-87.
33. Snover D, Jass, J, Fenoglio-Preiser C, Batts, P. Serrated polyps of the large intestine: A morphologic and molecular review of an evolving concept. *Am J Clin Pathol* 2005;124:380-91.
34. El Tayeb AA, Ibrahim NH, EITayeb AA, Essa AE. Peutz-Jeghers Syndrome in Children and Adolescents. *Annals of Pediatric Surgery*, 2008;4:37-41.

35. Jenne DE, Reimann H, Nezu JI, et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nature Genetics* 1988;18:38–43.
36. Çevikbaş U (çeviren). Robbins temel patoloji. 7. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2003.
37. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:792362.
38. Schreiberman IR, Baker M, Amos C, et al. The hamartomatous polyposis syndrome: clinical and molecular review. *Am J Gastroenterol* 2005;100:476-90.
39. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:217-21.
40. <http://www.minnesotamedicine.com/Portals/mnmed/October%202012/Kunz-Table3.PNG>). Erişim: 01.05.2014
41. Büyükdoğan M. Kolorektal kanserde genetik ve etyolojik faktörler. *Selçuk Tıp Dergisi* 2009;25:171–80.
42. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Listrom MB, Rilke FO. Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine. In: Rosai J (ed). *Gastrointestinal pathology an atlas and text*. 2nd edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1999. 909-1068.
43. Silverberg SG, De Lellis RA, Frable WJ. Gastrointestinal Tract. In: Silverberg (ed) *Silverberg Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology*; 3rd edition. Newyork: Churchill Livingstone; 2004. 1395-407.
44. Sokmen S. Kolorektal kanserde prognoz, kolorektal özel sayısı. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery* 2004; 9:57-65.
45. Kupelioglu AA. Kolorektal kanserde histopatoloji. *Türkiye Klinikleri J Surg* 2004; 9:25-7.
46. Sarıoğlu S. Kolorektal Karsinogenezis. *Türkiye Klinikleri J Surgery* 2004;9:20-4.
47. Değerli Ü, Erbil Y (editörler). *Cerrahi gastroenteroloji*. 7. Baskı. İstanbul; Nobel tıp kitabevleri: 2005.
48. Sağlıker Y (editör). *Harrison iç hastalıkları prensipleri*. 15. baskı. İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri: 2004.
49. Bosman FT, Carnerio F, Hruban HR (eds). *World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System*. 4th edition. France: IARC Press; 2010.
50. Galon J, Costes A, Sanchez- Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960-4.
51. Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depisch D. Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *BMJ* 1993;306:752-5.

52. Burns JL, Blackwell SJ. Plastic surgery. In: Townsend CM, Beauchamp RD (eds). Sabiston Textbook of Surgery. 18th edition. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2008. chap 73.
53. Leonard DF, Dozois EJ, Smyrk TC, et al. Endoscopic and surgical management of serrated colonic polyps. *Br J Surg* 2011;98:1685-94.
54. Lieberman DA, Rex DK, Winawer SJ, Giardiello FM, Johnson DA, Levin TR. United States Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. Guidelines for colonoscopy surveillance after screening and polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2012;143:844-57.
55. Friedman SL, McQuaid KR, Grendell JH. Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology. 2nd edition. McGraw-Hill: Lange medical books; 2007.
56. Sağıroğlu M. Kolorektal kanser evrelemesi. *Turkiye Klinikleri J Med Oncol* 2013;6:26-8.
57. Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC (eds). Principles of Surgery. 5 th edition. New York: McGraw Hill Book Co; 1988.
58. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotty A (eds). Cancer Staging Manual. 7th ed. New York: Springer; 2010.
59. Anne BB, Clive A. Colorectal cancer. Clinical review *BMJ* 2007;335:715-8.
60. Keđer M. Kolon Kanserleri. Kalaycı G (editör). Genel Cerrahi. 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. 1343-59.
61. Shelton AA, Wong WD. Colorectal cancer. In Cameron SL (ed). Current Surgical Therapy. St Louis: Mosby; 1999. 217-28.
62. Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, et al. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:519-27.
63. Zaanan A, Cuilliere-Dartigues P, Guilloux A, et al. Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann Oncol* 2010;21:772-80.
64. Nelson RL, Dollear T, Freels S, Persky V. The relation of age, race and gender to the subsite location of colorectal carcinoma. *Cancer* 1998;82:1408-10.
65. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3:153-73.
66. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (eds). WHO Classification of Tumours of the Digestive System. 4th edition. Lyon: IARC Press; 2010. 132-73.
67. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007;50:113-30.
68. Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2011;42:1-10.

69. Bakhoun SF, Compton DA. Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential. *J Clin Invest* 2012;122:1138-43.
70. Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S, et al. Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1992;52:3965-71.
71. Strate L, Syngal S. Hereditary colon cancer syndromes. *Cancer Cause and Control*. 2005;16:201-13.
72. Leslie A, Carey FA, Partt NR, Steele RJC. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *British Journal of Surgery* 2002;89:845-60.
73. Brrueta L, Kraeft SK, Tirnauer JS, Schuyler SC, Chen LB. The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules. *Cell Bio* 1998;95:10596-601.
74. Yang WV. APC as a Checkpoint Gene: The Beginning or the End? *Gastroenterology* 2002;123:935-9.
75. 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.
76. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer. *Cancer RES* 1989;49:4682-9.
77. Jiang Y, Mackley H, Cheng H, Ajani JA. Use of K-Ras as a predictive biomarker for selecting anti-EGF receptor/pathway treatment. *Biomark Med* 2010;4:535-41.
78. Fong KM, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implication. *Clinics In Chest Medicine* 2002; 23:83-101
79. Bamford S, Dawson E, Forbes S, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer* 2004;91:355–8.
80. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.
81. Vakiani, E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol* 2011;223:219-29.
82. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418:934.
83. Minoo P, Moyer MP, Jass JR. Role of BRAF-V600E in the serrated pathway of colorectal tumourigenesis. *J Pathol* 2007;212:124-33.
84. Fearon ER, Jones P. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB Journal* 1992;6:2783-90.
85. Houlston RS. What we could do now:molecular pathology of colorectal cancer. *J Clin Mol Pathol* 2001;54:206-14.
86. Zauber P, Solitare MS, Marotta SP, Bishop T. Loss of heterozygosity for chromosome 18q and microsatellite instability are highly consistent across the region of the DCC and SMAD4 genes in colorectal carcinomas and adenomas. *The J Applied Res* 2008;8:14-23.

87. Kim SK, Fan Y, Papadimitrakopoulou V, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene, is altered infrequently in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:2519-21.
88. Soyöz M, Özçelik N. TGF beta (transforming growth factor beta) ve sinyal iletimi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007;27:426-33.
89. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38:787-93.
90. Mutch MG. Molecular profiling and risk stratification of adenocarcinoma of the colon. *J Surg Oncol* 2007;96:693-703.
91. Messerini L, Mori S, Zampi G. Pathologic features of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Tumori* 1996;82:114-6.
92. Auclair J, Vaissiere T, Desseigne F, et al. Intensity dependent constitutional MLH1 promoter methylation leads to early onset of colorectal cancer by affecting both alleles. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:178-85.
93. Esteller M, Sparks A, Toyota M, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000;60: 4366-71.
94. <http://www.hindawi.com/journals/pri/2012/509348/fig1/> Erişim: 01.04.2014
95. Board P, Coggan M, Johnston P, Ross V, Suzuki T, Webb G. Genetic Heterogeneity Of The Human Glutathione Transferases: A Complex of Gene Families. *Phar Ther* 1990;48:357-69.
96. Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, et al. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochemical Journal* 1992;15:305–6.
97. Ruddon RW (ed). *Cancer Biology*. 4th edition. New York: Oxford; 2007.
98. Polat M. Akciğer kanseri hastalarında ve sağlıklı bireylerde gstm1 gen delesyonunun polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Isparta. Suleyman Demirel Üniversitesi;2005.
99. Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013;1830:3267–88.
100. La Torre G, Boccia S, Ricciardi G. Glutathione S-transferase M1 status and gastric cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Lett* 2005;217:53-60.
101. Board PG, Webb GC, Coggan M. Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. *Ann Hum Genet* 1989;53:205–13.
102. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem* 1997;272:10004-12.

103. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 2003;22:7369–75.
104. Hu X, Xia H, Srivastava SK, Pal A, Awasthi YC, Zimniak P, Singh SV. Catalytic efficiencies of allelic variants of human glutathione S-transferase P1-1 toward carcinogenic anti-diol epoxides of benzo[c]phenanthrene and benzo[g]chrysene. *Cancer Res* 1998;58:5340–3.
105. Zimniak P, Nanduri B, Pikula S. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem* 1994;224:893–9.
106. Johansson AS, Stenberg G, Widersten M, Mannervik B. Structure–activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105. *J Mol Biol* 1998;278:687–98.
107. Deakin M, Elder J, Hendrickse C, et al. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis* 1996;17:881-4.
108. Kiran B, Karkucak M, Ozan H, et al. GST (GSTM1, GSTT1, and GSTP1) polymorphisms in the genetic susceptibility of Turkish patients to cervical cancer. *J Gynecol Oncol* 2010;21:169-73.
109. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, et al. Colorectal cancer. *Lancet* 2010;375:1030–47.
110. Lin D, Meyer DJ, Ketterer B, Lang N P, Kadlubar FF. Effects of human and rat glutathione S-transferases on the covalent bonding of the N-acetoxy derivatives of heterocyclic amine carcinogens in vitro: a possible mechanism of organ specificity in their carcinogenesis. *Cancer Res* 1994;54: 4920–6.
111. Boone CW, Kelloff GJ, Malone WE. Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer Res* 1990;50:2–9.
112. Board PG. Gene deletion and partial deficiency of the glutathione S-transferase (ligandin) system in man. *FEBS Lett* 1981;135:12-4.
113. Peter H, Deutschmann S, Reichel C, Hallier E. Metabolism of methyl chloride by human erythrocytes. *Arch Toxicol* 1989;63:351–5.
114. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SS, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM. Human glutathione S-transferase u (GSTT1): cDNA cloning and the characterisation of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994;300:271–6.
115. Ates NA, Unal M, Tamer L, et al. Glutathione S-transferase gene polymorphisms in presbycusis. *Otol Neurotol* 2005;26:392-7.
116. Khabaz MN. The GSTP1 Ile105Val polymorphism is not associated with susceptibility to colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:2949-53.
117. Economopoulos KP, Sergentanis TN. GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: A comprehensive meta-analysis. *European Journal of Cancer* 2010;46:1617–31.

118. Gao Y, Cao Y, Tan A, Liao C, Mo Z, Gao F. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and sporadic colorectal cancer risk: An updating meta-analysis and HuGE review of 36 case-control studies. *Ann Epidemiol* 2010;20:108-21.
119. Gao Y, Pan X, Su T, Mo Z, Cao Y, Gao F. Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism and colorectal cancer risk: a meta-analysis and HuGE review. *Eur J Cancer* 2009;45:3303-14.
120. Koh WP, Nelson HH, Yuan JM, et al. Glutathione S-transferase (GST) gene polymorphisms, cigarette smoking and colorectal cancer risk among Chinese in Singapore. *Carcinogenesis* 2011;32:1507-11.
121. Lai CY, Hsieh LL, Sung FC, et al. Tumor Site- and Stage-Specific Associations between Allelic Variants of Glutathione S-Transferase and DNARepair Genes and Overall Survival in Colorectal Cancer Patients Receiving 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy. *PLoS One* 2013;8:69039.
122. Wang J, Jiang J, Zhao Y, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes and susceptibility to colorectal cancer: a case-control study in an Indian population. *Cancer Epidemiol* 2011;35:66-72.
123. Piao JM, Shin MH, Kweon SS, et al. Glutathione-S-transferase (GSTM1, GSTT1) and the risk of gastrointestinal cancer in a Korean population. *World J Gastroenterol* 2009;15:5716-21
124. Welfare M, Monesola Adeokun A, Bassendine MF, Daly AK. Polymorphisms in GSTP1, GSTM1, and GSTT1 and susceptibility to colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:289-92.

TEŞEKKÜR

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

ÖZGEÇMİŞ

AD,SOYAD: Özlem GÖRÜKMEZ

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

DOĞUM TARİHİ: 08 Ocak 1984

DOĞUM YERİ: Ankara

MEDENİ HALİ: Evli

TELEFON : +90224 2954398

E-mail: auf@mynet.com

DİPLOMA NO: 3859

YABANCI DİLİ: İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU:

1989-1994 Şafaktepe İlkokulu, Ankara. 1994-

1997 Cebeci Ortaokulu, Ankara. 1997-2001

Ayrancı Lisesi, Ankara

2001-2007 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

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