



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**MDR1 GEN POLİMORFİZMİNİN KOLON KANSERİ
HASTALARINDA EKSPRESYON VE KLİNİKOPATOLOJİK
ÖZELLİKLERLE İLİŞKİSİ**

**Dr. GÜLDEN ÖZDEN
UZMANLIK TEZİ**

Danışman: Prof.Dr. CUMHUR YEĞEN

İSTANBUL 2016

ÖNSÖZ

Öncelikle tez danışmanım Prof. Dr. Ş. Cumhur YEĞEN olmak üzere, tanıştığım ilk günden beri daha iyi bir insan ve daha iyi bir doktor olmam için beni teşvik eden, yol gösteren ve emek veren, bilgi birikimini benimle paylaşan, ben ve arkadaşlarıma her zaman sevgi ve saygıyla yaklaşan tüm hocalarıma;

Günümü gecemi birlikte geçirdiğim, her zaman en iyisini yapmaya çalışan, insanlık ve vicdanı her şeyin önüne koyan, sevdiklerimi gözümü kırpmadan emanet edebileceğim harika sağlıkçılar olan çok sevgili ekip arkadaşlarıma;

Hayatım boyunca tüm kararlarıma saygı duyan ve destekleyen, beni bugüne ulaştıran canım aileme;

Bir kadının cerrah olabileceğine inanan ve olabilmesi için elinden geleni yapan biricik eşime;

Uzmanlık eğitimim boyunca bana destek olan tüm sevdiklerime teşekkür ederim.

Dr. Gülden ÖZDEN

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda MDR1 gen ekspresyonu ve C3435T, G2677T/A, C1236T polimorfizmlerinin kolon kanseri riski ve tümör agresifliği ile kıyaslanması hedeflendi.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza 110 kolon kanseri hastası ve 119 sağlıklı birey dahil edildi. Hastaların rezeksiyon spesmeninden tümöral ve sağlam dokudan örnekler ve periferik kan örneği alındı. Kontrol grubundan sadece kan örneği alındı. Dokularda MDR1 ekspresyonu bakılırken periferik kan örneklerinden genetik materyal elde edildi. Hastaların demografik özellikleri ve resmi patoloji raporlarından tümör özellikleri kaydedildi. Tümöral doku ve sağlam doku arasında ekspresyon farkı değerlendirildi. Her bir polimorfizmin genotipleri ve haplotipleri ile doku ekspresyonu, kanser sıklığı ve tümör agresiflik kriterleri karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışmamızda tümöral doku P-glikoprotein ekspresyonu normal dokuya göre azalmış olarak bulundu. Tümöral doku ekspresyon değeri ile tümör agresifliği arasında ilişki bulunmadı. Genotip ve haplotiplerle kanser sıklığı arasında anlamlı ilişki görülmedi ancak lojistik regresyon analizinde G2677T/A polimorfizminde GG genotipi ve C3435T polimorfizminde CC genotipi varlığının kolon kanseri için arttırıcı risk faktörü olduğu görüldü. Genotiplerle MDR1 ekspresyonu arasında ilişki bulunmazken 3435TT-1236TT ve 3435TT-2677TT-1236TT haplotiplerinde tümöral dokuda ekspresyonun azaldığı belirlendi.

Sonuç: Bu çalışma tümöral dokuda MDR1 ekspresyonunun normal dokuya göre daha düşük olduğunu ve bazı haplotiplerin düşük ekspresyonla ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca G2677T/A polimorfizminde GG genotipi ve C3435T polimorfizminde CC genotipinin kolon kanserine yatkınlığı artırdığı görülmekle birlikte bulgularımızın daha geniş kapsamlı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: Kolon kanseri, MDR1, polimorfizm, SNP, P-glikoprotein

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to detect the incidence of MDR1 gene expression and C3435T, G2677T/A and C1236T SNPs in colon cancer and assess the relation between tumor aggressiveness.

Material and Methods: One hundred and ten patients with colon cancer and 119 healthy individuals were included in our study. Tumoral and healthy tissue samples were collected from the resection material and also peripheric blood samples were obtained. Only blood samples were collected from the control group. MDR1 gene expression was measured in the tissue samples and genetic material was extracted from the blood samples. Patients' demographics and tumoral features from the official pathology reports were recorded. Expression difference between healthy and tumoral tissue was evaluated. Genotypes and haplotypes of each polymorphism were analysed in cancerous and healthy tissue samples and results were compared with tumor aggressiveness.

Results: P-gp expression in the tumoral tissue was found to be lower when compared to the normal tissue. There was no association between tumoral tissue expression and tumor aggressiveness. There was no association between genotypes and haplotypes and cancer incidence but in logistic regression analysis GG genotype in G2677T/A polymorphism and CC genotype in C3435T polymorphism was found to be effective on the increased risk of colon cancer. Although there was no association between genotypes and expression, 3435TT-1236TT and 3435TT-2677TT-1236TT haplotypes seemed to be associated with decreased expression levels in tumoral tissue.

Discussion: This study shows that MDR1 expression in tumoral tissue is lower than normal tissue and some of the haplotypes are associated with decreased expression. Our study also shows that GG genotype in G2677T/A and CC genotype in C3435T increases colon cancer incidence but further studies are needed to generalize these findings.

Key Words: Colon cancer, MDR1, polymorphism, SNP, P-glycoprotein

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLO VE ŞEKİLLER	6
KISALTMALAR.....	7
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kolon Kanseri	3
2.1.1. Kolon kanseri epidemiyolojik özellikler.....	4
2.1.2. Kolon kanseri etiyolojisi	5
2.1.3. Kolon kanseri patofizyolojisi	7
2.1.4. Kolon kanserinin klinik prezentasyonu ve ayırıcı tanılar.....	8
2.1.5. Kolon kanserine yaklaşım prensipleri	9
2.1.6. Kolon kanserinin moleküler değerlendirmesi	9
2.1.7. Kolon kanseri evrelemesi	10
2.1.8. Kolon kanseri histolojik subtipler ve metastatik paternler.....	14
2.1.9. Kolon kanseri tedavi yaklaşımları.....	14
2.1.10. Kolon kanseri prognoz.....	17
2.2. MDR Geni ve Klinik Önemi:	19
2.2.1. MDR1 gen ürünü P-gp ve işlevleri.....	20
2.2.2. MDR1'in genetik polimorfizmleri.....	22
2.2.3. MDR1 polimorfizmleri ve insan hastalıklarına duyarlılıkları	25
2.2.4. MDR1 polimorfizmleri üzerine güncel yayınlar.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	48
6. SONUÇLARIN ÖZETİ.....	54
7. KAYNAKLAR	55

TABLO VE ŞEKİLLER

Tablolar Dizini :

Tablo - 1 Kolon kanseri için TNM evreleme sistemi

Tablo - 2 MDR1 genetik polimorfizmleri

Tablo - 3 Çalışma ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılımı

Tablo - 4 Çalışma grubunun demografik özellikleri

Tablo - 5 Tümöral ve sağlıklı dokular arasında P-gp ekspresyonu karşılaştırılması

Tablo - 6 Tümöral doku P-Gp ekspresyonunun tümör değişkenlerine göre dağılımı

Tablo - 7 Çalışma ve kontrol gruplarında polimorfizm sıklıklarının karşılaştırılması

Tablo - 8 Çalışma grubunda polimorfizm tiplerine göre yaş ve cinsiyet dağılımı

Tablo - 9 Çalışma grubu polimorfizm tiplerinin tümöral doku P-gp ekspresyonu ile ilişkisi

Tablo - 10 C2677 polimorfizmlerinin yaş, cinsiyet ve tümöral özelliklere göre dağılımları

Tablo - 11 C3435 polimorfizmlerinin yaş, cinsiyet ve tümöral özelliklere göre dağılımları

Tablo - 12 C1236 polimorfizmlerinin yaş, cinsiyet ve tümöral özelliklere göre dağılımları

Tablo - 13 Haplotiplerin çalışma ve kontrol gruplarında dağılımları

Tablo - 14 Haplotiplerin tümöral ve sağlıklı dokudaki P-gp ekspresyonları

Tablo - 15 Haplotiplerin grade, T, N, M ile ilişkileri

Tablo - 16 Haplotiplerin intratümöral ve peritümöral crohn benzeri lenfositik yanıt ile ilişkileri

Tablo - 17 Haplotiplerin vasküler, lenfatik ve perinöral invazyon ile ilişkileri

Şekiller Dizini :

Şekil - 1 Çalışma ve kontrol gruplarında P-gp ekspresyonu dağılımı

Şekil - 2 C2677 Polimorfizminin çalışma ve kontrol gruplarında genotip dağılımı

Şekil - 3 C3435 Polimorfizminin çalışma ve kontrol gruplarında genotip dağılımı

Şekil - 4 C1236 Polimorfizminin çalışma ve kontrol gruplarında genotip dağılımı

KISALTMALAR

Adenokarsinom	AK
Adenomatous Polyposis Coli	APC
ATP Bağlayıcı Kaset (ATP Binding Cassette)	ABC
Deleted In Colon Cancer	DCC
Epidermal Growth Factor Receptor	EGFR
Familyal Adenomatöz Polipozis	FAP
Hereditör Nonpolipozis Kolon Kanseri Sendromu	HNPCC
Karsinoembriyonik Antijen	CEA
Multi Drug Resistance	MDR
Müsinöz adenokarsinoma	MK
P-glikoprotein	P-gp
Progresyon-Free Survival	PFS
Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom	TYHK
Tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)	SNP
Ülseratif Kolit	ÜK
Ulusal Kapsamlı Kanseri Ağı	NCCN
Vasküler endotel büyüme faktörü	VEGF
Vücut Kitle İndeksi	VKİ
Yetersiz hatalı eşleşme onarımı	dMMR
Yüksek Frekanslı Mikrosatellit Instabilitesi	H-MSI

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolon kanseri gelişmiş ülkelerde en çok tanı konulan kanserlerden birisidir [1, 2], ve etiolojisinde genetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı bilinmektedir [3, 4]. Yaşam tarzı karakteristikleri ve kolorektal karsinogenezi ilişkilendiren biyolojik süreçler henüz tam olarak aydınlatılamasa da, diyet ile ilişkili faktörlerin etkilerini araştıran çalışmalar, kolon kanserinin gıda ile alınan ksenobiyotiklere maruziyet sonucu ortaya çıktığını ortaya koymuştur[4, 5].

Bazı genlerin tek nükleotid polimorfizmlerinin (single nucleotide polymorphism, SNP) artmış veya azalmış kanser riskiyle birliktelik gösterdiği net bir şekilde ortaya konmuştur. Bunların arasında çoklu ilaç direnç 1 (multi drug resistance-1, MDR1) geninin tümör progresyonunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu gen ATP-bağlayıcı kaset (ABC) ailesine ait olup, 170-kDa'lık efluks pompa proteini olan P-glikoproteini (P-gp) kodlar [6]. Bu ABC taşıyıcıları çoğunlukla enterositlerin apikal membranlarında eksprese olurlar ve burada (şeker, aminoasit, nükleotid, steroid, inorganik iyonlar) gibi farklı endojen substratların membran transportuna aracılık ederler. Ek olarak, ABC taşıyıcılarının büyük bir bölümü ksenobiyotikler tarafından oluşturulan çevresel tehditlere karşı hücrel savunmada rol oynarlar[7].

İnsan barsak sisteminde MDR1 ekspresyonu proksimalden distale doğru artarak kolon seviyesinde en yoğun ekspresyon seviyelerine ulaşır[8], ve bu bölgede bir takım karsinojenlerin barsaktan lümene ekskresyonunda rol oynar[9].

MDR1 taşıyıcılarının aktivitesi ve ekspresyonu, gerek polimorfizmler gerek patolojik durumlara bağlı olarak her bireyde farklıdır[10], bu da farklı toksinlerin, karsinojenlerin ve ilaçların biyoyararlanımında farklılıklar olarak kendini gösterecektir[3]. Bu hipotez, son dönemde MDR1 gen polimorfizminin işlevselliği ve belirli hastalıklar ve kanser gelişimi üzerine etkisini araştıran bir çok in vitro çalışmanın ortaya çıkmasına yol açmıştır[11-14]. Bu çalışmalarda MDR1'in fonksiyonel varyantları olduğu ortaya konulmuştur. Örneğin Hoffmeyer ve ark C3435T varyantının duodenumdaki proteinin aktivitesinde ve ekspresyonunda azalmaya neden olduğunu saptamışlardır[15]. Benzer şekilde birkaç farklı çalışma da ABC multidrug taşıyıcılarının polimorfik

varyantları ile antikanser ilaçlar arasındaki ilişkiye odaklanmıştır[16, 17]. MDR1 varyantlarının kolon kanseri üzerine etkilerini ortaya koyan birçok çalışma olsa da [14, 18-20], bu çalışmaların çoğu az sayıda genetik marker ile veya nispeten daha küçük popülasyonlarda yapıldığı için kısıtlı veri elde edilmiştir.

Kolon kanserinin ve diğer tüm kanser türlerinin mevcut tanı ve tedavi yöntemleri, genelde toplumun tamamına yönelik planlanmaktadır. Genetik araştırmalarda ise hasta seçimi, takip ve tedavi planlarının bireyselleştirilmesi asıl amaçtır. Her bir bireyin mevcut hastalığa ve uygulanacak tedaviye vereceği yanıtlar farklı olabilmektedir. Bu nedenle ortaya koyulabilecek yeni bir tarama yöntemi veya tedavide hasta seçimini etkileyecek bir yöntem değerli bir araştırma konusu olacaktır.

Günümüzde, genetik polimorfizmlerin MDR1 fonksiyonu üzerine açık etkilerini gösteren veriler ve çalışmalar hala yeterli seviyede değildir. Bu nedenle MDR1 polimorfizmleri ile P-gp farmakokinetiğindeki değişiklikler arasındaki ilişkinin altında yatan moleküler mekanizmayı açıklayabilecek, uygun deneysel klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca MDR1 haplotipi, P-gp ekspresyonu ve fonksiyonu üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler, değişken P-gp aktivitesi fenomenini anlamamıza yardımcı olacaktır.

Bireyselleştirilmiş farmakoterapi için gelişen teknoloji ile birlikte, MDR1 genetik polimorfizmleri üzerine bilgi durumu tazelemek amacıyla güncel bilgileri gözden geçirmek önemli olacaktır. Bu nedenle bu çalışma insan ilaç taşıyıcısı P-gp ve MDR1 polimorfizmleri üzerindeki son bilgilere odaklanacak; MDR1 ve onun P-gp ekspresyonu/fonksiyonu üzerine etkisi, ve MDR1 polimorfizminin kolon kanseri hastalarında tümör agresifliği ile olan ilişkisini araştıracaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon Kanseri

Kolon kanseri en sık görülen gastrointestinal sistem kanseri olup, genetik faktörler, çevresel maruziyetler (diyet dahil), sindirim sisteminin inflamatuvar durumları gibi etiyolojik nedenlere bağlı gelişen bir multifaktöriyel hastalıktır. Çoğunlukla tarama prosedürleri esnasında tanı konulmakla beraber en sık görülen klinik bulgular demir eksikliği anemisi, rektal kanama, karın ağrısı, barsak alışkanlıklarında değişiklikler, intestinal obstrüksiyon veya perforasyondur. Erken dönemde halsizlik, kilo kaybı gibi nonspesifik semptomlardan, ileri dönemde abdominal hassasiyet, makroskopik rektal kanama, abdominal kitle, hepatomegali, asit gibi geniş spektrumda bulgular saptanabilir. Cerrahi, lokalize kolon kanserleri (evre I-III) için tek küratif seçenektir.

İnvaziv kolorektal kanser önlenilebilir bir hastalıktır. Yaygın uygulanan tarama programları ile elde edilen erken tanı, gelişmiş ülkelerde son yıllarda kanser oranlarında düşüş izlenmesinin en temel nedenidir.

Tarama testlerinin tam olarak uygulanmasının, kolorektal kanser mortalitesini ABD'de tahmini %50 kadar azaltabileceği, tarama uygulanmayan ülkelerde ise mortalite oranlarında çok daha yüksek oranlarda azalma elde edilebileceği düşünülmektedir[21]. Yine de yeni ve daha kapsamlı tarama testlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Kolorektal kanserin biyolojik ve genetik özelliklerini anlamaya yönelik önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Bu bilgiler; yavaş yavaş klinik kullanıma entegre edilerek kolorektal kanser gelişiminde bireysel risklerin daha detaylı şekilde ortaya konulması, daha iyi tarama stratejilerinin bulunması, prognozun daha iyi değerlendirilmesi ve antikanser tedavilerin etkinliğinin daha efektif bir şekilde saptanabilmesi alanında rol oynamaya başlamıştır.

Son 10 yıl içinde kolorektal kanserin sistemik tedavisinde elde edilen gelişmeler sayesinde metastatik hastaların akıbetinde belirgin bir düzelleme sağlanmıştır. 1990'lı yılların ortalarına kadar kolorektal kanser tedavisinde

onaylı tek ajan 5-florourasil iken; bu dönemden sonra irinotekan ve oksaliptatin gibi sitotoksik ajanlar, kapesitabin ve tegafur gibi oral floropirimidinler, bevakizumab, setuksimab, panitumumab gibi biyolojik ajanlar ve özellikle son dönemde ziv-aflibercept, regorafenib gibi anti-anjiojenik ajanlar gibi farklı antikanser tedaviler kullanıma girmiştir[22, 23].

Her ne kadar kesin tedavi modalitesi olarak cerrahi kabul edilse de, bu yeni ajanlar erken evre kanserlerin tedavisinde artmış kür, ve evre-4 kanser hastalarında da uzamış survi oranları olarak etkilerini ortaya koymaktadır. Yeni ajanların bulunması ve sistemik tedavinin cerrahi ve radyoterapi gibi diğer tedavi modaliteleri ile entegrasyonu ile ilerleyen dönemlerde tedavide çok daha iyi sonuçların elde edilebileceği öngörülmektedir.

2.1.1. Kolon kanseri epidemiyolojik özellikler

Kolon kanseri insidansı ve mortalitesi ABD'de son 20 yılda yavaş bir artış gösteriyor olsa da tüm kanserler arasında kolorektal kanserler en sık görülen üçüncü kanser tipidir ve kanser ilişkili mortalitenin en sık üçüncü sebebinin oluşturmaktadır. Amerikan Kanser Derneği'nin verilerine göre, 2015'te 93090 kişinin kolon kanser tanısı alacağı, ve kolon ve rektal kanser nedeniyle ölümlerin sayısının 2015'te 49700 olacağı öngörülmektedir[24]. Türkiye'de ise 2014 yılında 25000 kadın ve erkek kolorektal kansere yakalanmıştır[25].

Tüm dünya genelinde kolorektal kanser, kadınlarda ikinci en sık (614000 vaka, tüm kanserlerin %9,2si) ve erkeklerde üçüncü en sık (746000, tüm kanserlerin %10'u) kanser iken Türkiye'de 2014 verilerine göre kolorektal kanser hem erkeklerde hem de kadınlarda üçüncü en sık kanser tipi olarak izlenmektedir[25]. İnsidans coğrafik olarak 10 kata kadar değişebilmekte olup, en yüksek değerler Avustralya/Yeni Zelanda'da bölgesinde (erkeklerde $44,8/10^5$ ve kadınlarda $32,2/10^5$), en düşük değerse Batı Afrika'da (erkeklerde $4,5/10^5$ ve kadınlarda $3,8/10^5$) izlenmektedir[26].

Dünyanın az gelişmiş bölgelerinde, mortalite düşük olmakla birlikte (694000 ölüm, %8,5), hastalık görülen popülasyonda ölüm oranı %52 olup bu bölgelerdeki kötü survi oranlarını göstermektedir.

Mortalite oranlarında dünya çapında daha az değişkenlik mevcut olup (erkeklerde 6 kat ve kadınlarda 4 kat), en yüksek mortalite oranları Orta ve Doğu Avrupa'da (erkeklerde $20,3/10^5$ ve kadınlarda $11,7/10^5$) görülürken, en düşük mortalite oranları ise Batı Afrika'da (erkeklerde $3,5/10^5$ ve kadınlarda $3/10^5$) görülmektedir.

İrk, cinsiyet ve yaş olarak dağılıma bakıldığında ABD'de son dönemde elde edilen veriler; Afro-amerikanlarda, beyazlara göre çok daha yüksek oranda kolorektal kansere bağlı ölüm olduğunu öne sürmektedir. Yine bu oranlarda en düşük değerler ise Hispaniklerde izlenmektedir.

Yaş da bir çok solid tümörde olduğu gibi kolorektal kanserde de iyi bilinen bir risk faktörüdür. Erken premalign lezyondan malign kansere ilerleme periyodu yaklaşık 10-20 yıl arasında değişmekle birlikte, tanı esnasında medyan yaş 68'dir[27].

2.1.2. Kolon kanseri etiyolojisi

Kolorektal kanser multifaktöriyel bir hastalık sürecidir. Genetik faktörler, diyet dahil çevresel maruziyetler, sindirim sisteminin enflamatuvar durumları kolorektal kanser gelişiminde etkisi olan faktörlerdir. Her ne kadar kolorektal kanser genetiği henüz tam olarak bilinmese de, mevcut araştırmalar göstermektedir ki; kolorektal kanser gelişimindeki en önemli etken genetik faktörlerdir. Adenomatöz polipozis koli (APC) geninin herediter mutasyonu familial adenomatöz polipozis (FAP)'in nedeni olarak bilinmektedir ve etkilenen bireylerde 40 yaşına kadar kolon kanseri gelişme riski neredeyse %100'dür.

Herediter nonpolipozis kolon kanser sendromunda (HNPCC, Lynch) hayat boyu kolorektal kanser gelişme riski %40 olup, bu sendroma sahip bireyler ayrıca ürotelyal kanser, endometrial kanser, ve daha az sıklıkta görülen diğer kanserler açısından artmış risk altındadır. Lynch sendromu; hatalı eşleşme onarım genlerindeki (hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2 ve muhtemelen henüz saptanmamış diğer genler) kalıtsal mutasyon sonucu oluşan "yetersiz hatalı eşleşme onarımı" (deficient

mismatch repair, dMMR) ile karakterize bir sendromdur.

HNPCC tüm kolon kanserlerinin yaklaşık %6'sının sebebidir. Aspirin kullanımı bazı toplumlarda kolorektal kanser insidansını düşürüyor olsa da Bum ve arkadaşlarının çalışmasında Lynch sendromu taşıyıcılarında aspirin kullanımının insidans üzerine bir etkisi olmadığı gösterilmiştir[28].

Diyetetik faktörler de devam eden çalışmalarda öne çıkan bir diğer öğedir[29]. Epidemiyolojik çalışmalar kırmızı et ve hayvansal yağdan zengin besinler, düşük lifli diyet, meyve ve sebze tüketiminin genel olarak azalması ile kolorektal kanser riskinde artış arasında bağlantı kurmuştur. Aune ve arkadaşlarının çalışmasında yüksek lif alımı, azalmış kolorektal kanser riski ile ilişkili bulunmuştur. Özellikle tahıl lifleri ve tam tahılların efektif olduğu tespit edilmiştir[30]. Pala ve arkadaşlarının çalışmasında yoğurt tüketiminin de düşük kolorektal kanser riskiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir[31].

Daha düşük riskle ilişkili faktörler; folat alımı, kalsiyum alımı ve östrojen replasman tedavisidir. Ancak konuyla ilgili çalışmalar çoğunlukla retrospektif epidemiyolojik çalışmalardır ve prospektif, plasebo kontrollü çalışmalarla güncellenmesi gerekir.

Obezite ve sigara içimi, alkol kullanımı, sedanter alışkanlıklar gibi yaşam tarzı seçimleri de artmış kolorektal kanser riski ile ilişkilendirilmiştir. Prospektif kohort çalışmaların meta analizinde sigara içenlerde, kolorektal kanser riskinde belirgin artış tespit edilmiştir. Bu risk erkeklerde ve kolon kanserinden daha çok olarak rektal kanserde görülmüştür ve sigarayı bırakmış olanlarda da risk devam etmektedir[32].

Geniş bir prospektif çalışmada Cho ve arkadaşları, ailesinde kolorektal kanser öyküsü olan bireylerde alkol alımının kolorektal kanser riskini artırdığını tespit etmiştir. İlişki sadece günlük 30 g ve üzeri alkol tüketimi olan bireylerde anlamlı olarak tespit edilmiştir ve artan miktarlarda lineer ilişki görülmemiştir. Alkol almayan ve aile öyküsü olmayan bireyler, günde 30 g ve üzerinde alkol kullanan ve ailede kolorektal kanser öyküsü olan bireylerle kıyaslandığında rölatif risk değeri 2.8'dir[33].

Son dönem tarama kılavuzları sigara içenler ve obezlerde kolorektal kanser riskinde artışa dikkat edilmesini önerirken, diyabet için aynı uyarıda

bulunmamaktadır. Ancak vaka-kontrol ve kohort çalışmalardan yapılan bir meta-analiz, diyabeti kolon ve rektal kanser için bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlamakta ve bu bilgilerin kolorektal kanser yönetimi ve risk hesaplamasında etkili olacağı düşünölmektedir[34].

Vücut kitle indeksi (VKİ) ve kolorektal adenom riski arasında bir ilişki bildirilmiştir ancak gerekli analizlerin yapılmasına olanak sağlayacak örneklem büyüklüğüne sahip çalışma sayısı azdır. Jacobs ve arkadaşları 7 çalışmadan 8213 katılımcının verilerini topladığında ve VKİ'nin metakron adenomların histolojik karakteristiklerinin çoğu ile kadınlarda değil ancak erkeklerde ilişkili olduğunu tespit etmiştir. Araştırmacılar vücut ölçülerinin özellikle erkeklerde kolorektal karsinogenezi erken evrelerde etkilediği sonucuna varmışlardır[35].

Genellikle APC kaybından kaynaklanan WNT sinyal yolunun aktivasyonu, kolorektal kanser gelişiminde önemli bir rol oynar ve CTNNB1(beta-katenin), WNT yolağının önemli bir medyatörüdür. WNT-CTNNB1 sinyal iletimi obezite , glukoz metabolizması ve tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıklarla da ilişkili bulunmuştur. Morikawa ve arkadaşları obezite ve fiziksel aktivite ile kolorektal kanser riski arasındaki ilişkinin, CTNNB1 durumuna göre tümör subtipleri arasında farklılık göstereceği hipotezini ortaya atmışlardır[36].

Moleküler patolojik epidemiyoloji veritabanı kullanan bu araştırmacılar CTNNB1-negatif kanser riskinin, daha yüksek VKİ ve daha düşük fiziksel aktivitesi olan bireylerde daha fazla olduğunu göstermişler, VKİ ya da fiziksel aktivite ile CTNNB1-pozitif kanser riski arasında ilişki tespit etmemişlerdir[36].

Ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn gibi inflamatuvar barsak hastalıkları da kolorektal adenokarsinom gelişimi açısından yükselmiş risk sebebidir. Kolorektal malignite gelişme olasılığı, inflamatuvar barsak hastalığının görülme süresi ve kolon tutulumunun yaygınlığı ile artar.

2.1.3. Kolon kanseri patofizyolojisi

Genetik olarak kolorektal kanser kompleks bir hastalık olarak bilinir ve

genetik değişiklikler çoğunlukla premalign lezyondan (adenom), invaziv adenokarsinoma dönüşümlle ilişkilendirilir. Genetik ve moleküler olaylar dizisinin adenomatöz polipten, malignensiye dönüşümü Vogelstein ve Feason tarafından 1988'de tanımlanmıştır[37].

APC mutasyonu ilk olarak FAP hastalarında saptanmıştır. APC tarafından kodlanan protein c-myc ve cyclin D1 onkojeninin aktivasyonunda rol oynamakta ve böylelikle progresyonun malign fenotipe yönelmesine neden olmaktadır. FAP, tüm kolon kanserlerinin sadece %1'inin sebebi olan nadir görülen bir sendrom olmasına rağmen, sporadik kolorektal kanser olgularında APC mutasyonları çok sık görülmektedir.

Mutasyonlara ek olarak, anormal DNA metilasyonu gibi epigenetik olaylar da tümör süpresör genlerin baskılanması veya onkogenlerin aktivasyonu yoluyla genetik dengeyi bozarak malign transformasyona yol açabilir.

Kolon karsinogenezindeki diğer önemli genler ise KRAS onkogeni, 18. kromozomda heterozigosite kaybına bağlı SMAD4'ün inaktivasyonu, DCC (*deleted in colon cancer*) genleridir.

Kolorektal kanserlerin bir kısmı ise defektif DNA hatalı eşleşme onarımı ile karakterizedir. Bu fenotip MSH2, MLH1 ve PMS2 gibi gen mutasyonları ile ilişkilidir. Bu mutasyonlar da HNPCC'in özelliklerinden biri olan yüksek frekanslı mikrosatellit instabilitesine (H-MSI) yol açar. H-MSI ayrıca sporadik kolon kanserlerinin de %20'sinde mevcuttur.

2.1.4. Kolon kanserinin klinik prezentasyonu ve ayırıcı tanılar

Tarama testlerinin önemine yapılan vurgular sonucunda, günümüzde artık kolorektal kanserler çoğunlukla semptom vermeden tanı alabilmektedirler. Ancak ilerlemiş vakalarda hastalık; demir eksikliği anemisi, rektal kanama, karın ağrısı, barsak alışkanlıklarında değişiklik, intestinal tıkanıklık veya perforasyon gibi klinik bulgularla kendisini gösterebilir. Sağ taraftan köken alan lezyonlar çoğunlukla kanama ve diyare gibi bulgular gösterirken, sol taraftan kaynaklanan lezyonlar daha geç tanı alıp barsak tıkanıklığı gibi

semptomlarla ortaya çıkarlar.

Erken dönem kolorektal kanser hastalarında fizik muayenede belirgin bulgu saptanmayabilir veya kilo kaybı ve halsizlik gibi non-spesifik bulgular ortaya çıkar. Ancak ilerlemiş vakalarda abdominal hassasiyetten, rektal kanama, palpabl kitle, assite kadar gidebilen farklı semptomlar mevcut olabilir.

Ayırıcı tanıda intestinal arteriovenöz malformasyonlar, gastrointestinal sistemin nöroendokrin/karsinoid tümörleri, iskemik barsak hastalıkları, gastrointestinal lenfoma, ÜK, crohn hastalığı, ileus, intestinal divertikülit gibi patolojiler göz önünde bulundurulmalıdır.

2.1.5. Kolon kanserine yaklaşım prensipleri

Prekanseroz lezyonların veya primer olarak kanserin saptanmasına yönelik farklı tarama testleri ve literatürde bunları destekleyen birçok araştırma mevcuttur. Amerikan Gastroenteroloji Derneği; tarama stratejisi olarak 50 yaşından itibaren her on yılda bir kolonoskopi yapılmasını önermektedir[38].

Kolorektal kanserden şüphelenilen her hastaya mutlaka rektal muayene ve kolonoskopi planlanmalı, şüpheli lezyon varlığında ise biyopsi ile patolojik tanı netleştirilmelidir. Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) 70 yaş öncesi kanser tanısı alan tüm hastaların HNPCC yönünden taranmasını; 70 yaş ve üzeri hastalarda ise bu taramanın sadece HNPCC için revize Bethesda kriterlerini karşıladığı takdirde yapılmasını önerir[39, 40].

Patolojik tanı doğrulandıktan sonra, hastanın organ fonksiyonlarının değerlendirilmesi, tümör yükünün hesaplanması ve evrelendirme amaçlı laboratuvar ve görüntüleme çalışmaları yapılmalıdır.

2.1.6. Kolon kanserinin moleküler değerlendirmesi

Tümörün moleküler değerlendirmesi, metastatik kolorektal kanser tedavisinin

şekillendirilmesinde giderek daha fazla rol oynamaktadır. 2015 yılında yayınlanan bir derlemeye göre kolorektal kanserin moleküler değerlendirmesinde şu önerilerde bulunulmuştur[41, 42]:

- Anti-Epidermal Growth Faktor Reseptor (anti-EFGR) tedavisi planlanan hastalar için kolorektal kanser dokusunda RAS mutasyonel değerlendirme yapılmalıdır. Bu analiz; ekson 2'nin 12,13 kodonları; ekson 3'ün 59, 61 kodonları; ekson 4'ün 117 ve 146 kodonlarını içerecek şekilde, KRAS ve NRAS kodonları içermelidir.
- Prognostik kategorilendirme için dMMR/MSI ile birlikte BRAF V600 mutasyon analizi yapılmalıdır.
- dMMR/MSI testi prognostik kategorilendirme ve Lynch sendromu hastalarını tanımlamak için tüm kolorektal kanser hastalarında uygulanmalıdır.
- Primer kolorektal karsinom dokusu için moleküler belirteç testi uygulanabilir (KRAS, genişletilmiş RAS, BRAF, ve dMMR/MSI); bu belirteçlerin kullanımı, metastatik doku varlığında da tercih edilmelidir.

2.1.7. Kolon kanseri evrelemesi

TNM evrelemesi kolorektal kanser evrelemesinde uluslararası standart olarak kabul edilmektedir. Bu evrelemede şu üç tanımlamaya yer verilir ve değerlendirme tablo 1'de verildiği şekilde yapılmaktadır:

- T: primer tümör
- N: lenf nodu tutulumu
- M: metastaz

Tümör kategorisi şu şekilde sınıflandırılmaktadır[43]:

- Tx: Yetersiz bilgi nedeni ile tümör yayılımının tanımlanamaması.
- Tis: In situ karsinom, tümör muskularis mukoza tabakası ile sınırlıdır.
- T1: Kanser muskularis mukoza tabakasını aşarak submukoza içerisine ilerlemiştir.

- T2: Kanser submukozayı aşarak muskularis propria içerisine ilerlemiştir.
- T3: Kanser muskularis propriayı aşarak kolonun en dış tabakasına ulaşmış, ancak aşmamıştır. Herhangi bir komşu organ tutulumu yoktur.
- T4a: kanser serozayı (viseral periton) aşmıştır.
- T4b: Kanser kolon duvarını aşmış, ve komşu doku veya organları invaze etmiştir.

Lenf nodu kategorisi şu şekilde sınıflandırılmaktadır:

- Nx: Yetersiz bilgi nedeni ile lenf nodu tutulumunun tanımlanamaması.
- N0: Lenf nodu tutulumu yoktur.
- N1a: Bir yakın lenf nodunda kanser hücresi bulunmuştur.
- N1b: İki veya üç yakın lenf nodunda kanser hücresi bulunmuştur.
- N1c: Lenf nodlarında kanser hücresi izlenmemiş, ancak lenf nodu çevresindeki yağ dokularında az miktarda kanser hücre kümeleri izlenmiştir.
- N2a: Dört ila altı yakın lenf nodunda kanser hücresi bulunmuştur.
- N2b: Yedi veya daha fazla yakın lenf nodunda kanser hücresi bulunmuştur.

Metastaz kategorisi şu şekilde sınıflandırılmaktadır:

- M0: Uzak yayılım yoktur.
- M1a: Kanser bir uzak organa yayılmış veya uzak lenf nodlarında tutulum yapmıştır.
- M1b: Kanser birden fazla uzak organa yayılmış veya uzak lenf nodlarında tutulum yapmıştır, veya peritonun distal bölümlerine yayılmıştır.

Tablo – 1 Kolon kanseri için TNM evreleme sistemi

Evre	Primer Tümör (T)	Bölgesel Lenf Nodu (N)	Uzak Metastaz (M)
Evre 0	Karsinoma In Situ (Tis)	N0	M0
Evre I	Tümör submukoza (T1) veya muskularis propriaya (T2) invaze	N0	M0
Evre II	Tümör muskuler tabakayı aşmış en dış tabakada sınırlanmış (T3) veya komşu organ veya dokuları invaze etmiştir (T4)	N0	M0
Evre IIA	T3	N0	M0
Evre IIB	T4a	N0	M0
Evre IIC	T4b	N0	M0
Evre IIIA	T1-2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Evre IIIB	T3-4a	N1	M0
	T2-3	N2a	M0
	T1-2	N2b	M0
Evre IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-4a	N2b	M0
	T4b	N1-2	M0
Evre IVA	T1-4	N1-2	M1a
Evre IVB	T1-4	N1-2	M1b

Evreleme ile ilişkili prognostik faktörler:

Tanı anında kolon kanserinin klinik ve histopatolojik evresi hastanın prognozu üzerinde çok önemli bir role sahiptir. Barsak duvar penetrasyon derinliği (T),

lenf nodu tutulumu (N), ve metastaz varlığı (M) gibi önemi iyi tanımlanmış standart patolojik özelliklere ek olarak; bazı diğer faktörlerin de önemli olduğu kanıtlanmıştır. Bu faktörler; ne kadar lenf nodu toplandığı ve ne kadarında tutulum saptandığı, histolojik grade'i ve lenfovasküler ve perinöral invazyon mevcudiyetidir.

Kötü prognoz kriteri olarak değerlendirilebilecek bulgular şunlardır:

- Tanı esnasında barsak obstrüksiyonu
- Ülseratif büyüme paterni
- Perforasyon
- Preoperatif dönemde artmış Karsinoembriyonik Antijen (CEA) seviyeleri

Prognoz ile ilişkili olduğu düşünülen ancak henüz klinik pratiğe girmemiş moleküler faktörler ise şunlardır:

- p53
- 18q heterozigotite kaybı[44]
- DCC mutasyonları
- EGFR gen amplifikasyonu

Adenokarsinomların %40'ında bulunan KRAS mutasyonları, EGFR üzerine etki eden biyolojik ajanlarla uygulanan tedaviye duyarlılığı etkilemektedir[45].

H-MSI ile ilişkili olan dMMR'ın rezektabl kolon kanseri olan hastalarda daha iyi klinik sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir[46, 47]. Buna ek olarak dMMR/H-MSI olan hastaların florourasil temelli tedavilerden fayda görmediği izlenmiştir[48]. Bundan dolayı rezektabl kolon kanseri hastalarında dMMR taraması yapmak, prognoz ve tedavi planlanması yönünden faydalı olabilir. Yine bazı araştırmalar immün regülasyonun kolorektal kanser hastalarında kanser gelişimi ve prognoz üzerindeki rolünü gösteren sonuçlar ortaya koymuştur[49].

2.1.8. Kolon kanseri histolojik subtipler ve metastatik paternler

Bin altıyüz yetmiş beş metastatik kolorektal kanser hastası üzerinde yapılan otopsi sonuçlarını inceleyen retrospektif bir çalışmaya ve Hugen ve arkadaşlarının 88 metastatik kolorektal kanser hastası üzerinde yaptığı çalışmaya göre kolorektal kanserde primer tümörün histolojik subtipi ve lokalizasyonunun, metastatik patern üzerine çok önemli bir etkisi olduğu ortaya konmuştur[50, 51].

Bu çalışmalara göre;

- Müsinöz adenokarsinomlar (MK) ve taşlı yüzük hücreli karsinomlarda (TYHK), adenokarsinomlarla (AK) karşılaştırıldığında metastatik hastalık daha sık ve daha fazla lokalizasyonda saptanmaktadır.
- Karaciğer metastazları TYHK (%31.7) ile kıyaslandığında, AK (%73) ve MK (%52.2)'da daha sık izlenmektedir.
- Peritoneal metastazlar AK (%20.1) ile kıyaslandığında, TYHK (%51.2) ve MK (%48.2)'da daha sık izlenmektedir.
- Uzak lenf nodu metastazları MK (%22.3) ve AK (%19.9) ile kıyaslandığında, TYHK (%43.9)'da daha sık izlenmektedir.

Metastaz bölgesi yönünden karşılaştırıldığında; kolon kanseri olan hastalarda abdominal metastaz oranları rektal kansere göre daha yüksek iken, ekstra abdominal metastaz oranları rektal kanserlerde daha yüksektir.

2.1.9. Kolon kanseri tedavi yaklaşımları

Lokalize kolon kanseri için (evre I-III) tek küratif tedavi modalitesi cerrahidir. Bununla birlikte akciğer ve karaciğerde sınırlı metastatik hastalıklarda da, tek küratif tedavi potansiyeli olan seçenek yine cerrahi rezeksiyondur, ancak bu elektif kolon rezeksiyonlarının obstruksiyon oluşmamış hastalarda rutin kullanımı hala bir tartışma konusudur.

Adjuvan kemoterapi evre III kolorektal kanserler için standart tedavi yaklaşımı olarak kabul edilmektedir. Bunun yanısıra, evre II hastalıkta adjuvan kemoterapinin uygulanması konusu henüz tartışmalı bir konu olup,

hangi hastaların bu tedavi için uygun olduğunu belirlemek üzerine yapılan araştırmalar hala devam etmektedir. Radyoterapinin rolü ise günümüzde sadece kemik veya beyin metastazı gibi metastatik bölgelere palyatif tedavi amaçlı kullanımla sınırlıdır.

Metastatik kolorektal kanser hastalarında cerrahiye nazaran kemoterapi standart tedavi yaklaşımı olarak kabul edilmektedir. Metastatik vakaların tedavisinde biyolojik ajanlar temel rol oynamakta, kullanılacak ajanın seçimi ise tümörün histolojik ve/veya genetik analizi sonucuna göre yapılmaktadır. Obstrüksiyon olmayan evre IV kolorektal kanser vakalarında kolon- rektum rezeksiyonu ise hala tartışmalı bir konudur.

Cerrahi, lokalize kolon kanseri (evre I-III) için tek küratif tedavi modelidir, ve karaciğer ve/veya akciğer ile kısıtlı metastatik hastalık için de muhtemel kür sağlayabilecek tek yöntemdir. Tüm operasyonlar için en temel ilke; primer tümörün lenfatik drenaj alanlarını da kapsayacak şekilde yeterli cerrahi sınır negatifliği ile kesin ve tam olarak çıkarılmasıdır.

Çekum ve sağ kolondaki lezyonlar için uygun yaklaşım sağ hemikolektomidir. Bu işlem esnasında ileokolik, sağ kolik damarlar ile orta kolik damarın sağ dalı ayrılmalı ve çıkarılmalıdır. Sağ üreter, ovaryan/testiküler damarlar ve duodenum dikkat edilmesi gereken yapılardır. Eğer omentumun tümöral ilişkisi izlenirse omentum da tümörle birlikte enblok çıkarılmalıdır.

Proksimal ve orta transvers kolondaki lezyonlar için ise, genişletilmiş sağ hemikolektomi uygulanmalı, ileokolik, sağ kolik ve orta kolik damarlar ayrılmalı, spesmen mezenteri ile birlikte çıkarılmalıdır.

Splenik fleksura ve sol kolondaki lezyonlar için sol hemikolektomi uygulanmalıdır. Orta kolik damarın sol dalı, inferior mezenterik ven ve sol kolik damarlar ve mezenter spesmene dahil edilmelidir.

Sigmoid kolon lezyonları için ise sigmoid kolektomi gerekmektedir. Inferior mezenterik arter orijininde diseke edilmeli, tümör diseksiyonu uygun cerrahi sınıra ulaşılan kadar pelvise uzatılmalıdır. Diseksiyon esnasında sol üreter ve sol ovaryan veya testiküler damarlara dikkat edilmelidir.

HNPCC, FAP veya ayrı kolon segmentlerinde izlenen metakron

kanserlerin varlığında ise total abdominal kolektomi ve ileorektal anastomoz gerekebilir. Yine akut malign kolon obstrüksiyonu durumunda proksimal barsak tutulumu bilinmiyorsa total kolektomi seçeneği düşünülebilir.

Laparoskopideki ilerlemeler kolorektal kanser cerrahisinde laparoskopik yaklaşım imkanı doğurmuştur. Yapılan geniş prospektif randomize çalışmalarda açık ve laparoskopik cerrahi karşılaştırıldığında intraoperatif ve postoperatif komplikasyonlar, perioperatif mortalite oranları, reoperasyon oranları, cerrahi yara rekürrensleri açısından belirgin bir farklılık saptanmamıştır. Survî, rekürrens, toplanan lenf nodu sayısı gibi onkolojik sonuçlar da benzer oranlarda izlenmiştir[52-57].

Metastatik kolorektal kanser için standart tedavi yönetimi cerrahi yerine kemoterapi olarak kabul edilmektedir. Obstrüksiyon olmayan evre IV kanser vakalarında kolon rezeksiyonu hala tartışılan bir konudur. Karaciğer metastazının küre yönelik rezeksiyonunun uzun dönem survide önemli ölçüde etkili olduğu ortaya konulmuştur[58]. Parsiyel hepatektomiye takiben floksüridin gibi kemoterapötik ajanlarla yapılan hepatik arter infüzyonunun sadece adjuvan kemoterapi uygulanan hastalarla karşılaştırıldığında daha iyi survî sağladığı saptanmıştır[59]. Son dönemde rezektabl olmayan karaciğer metastazlı hastalarında, barsak obstrüksiyonuna yönelik kolonik stent kullanımı önerilmiş, ancak bu alternatif yöntemin perforasyona bağlı tümör yayılımına yol açabileceği endişesi kullanımını kısıtlamıştır[60].

Evre III ve bazı evre II kanserlerin son yirmi yıldır uygulanan standart kemoterapisi levamisol ve lökovorin gibi ajanlarla kombine edilmiş 5-florourasil tedavisidir[61-63]. Yapılan geniş çaplı randomize kontrollü çalışmalarda bu yaklaşımın beş yıllık kanser rekürrensi ve ölüm oranlarını %30'a kadar azalttığı saptanmıştır.

Adjuvan kemoterapinin evre II kolon kanseri tedavisindeki rolü hala tartışmalıdır. Tek başına cerrahi, çoğunlukla evre II kanser için küratiftir ancak, %20-30 hastada tümör rekürrensi oluşup hastalar metastatik hastalık nedeniyle ölmektedir. Amerikan Klinik Onkoloji derneği evre II kolon kanseri için rutin adjuvan kemoterapi uygulamasını önermemektedir[64].

Kombine kemoterapi rejimleri metastatik kolon kanseri olan hastalarda

daha gelişmiş etki ve daha uzun progresyon-free survival (PFS) sağlar. Yeni ilaç ve biyolojik ajanların geliştirilmesi ile 20 yıl önce 12 aylık bir survi beklenirken, günümüzde metastatik hastalarda bu survi süresi yaklaşık 22 aydır.

Kolon kanseri tedavisinde kullanılan biyolojik ajanlar VEGF ve EGFR'e karşı geliştirilen antikorlar ve VEGF reseptörleri için kinaz inhibitörleridir, en sık kullanılan ajanlar:

- Bevacizumab
- Cetuximab
- Panitumumab
- Regorafenib
- Ziv-aflibercept olarak sıralanabilir.

Radyoterapi, rektal kanserde standart bir tedavi modalitesi olsa da kolon kanserinde kullanım alanı oldukça sınırlıdır. Adjuvan tedavi seçeneğinden ziyade, radyoterapi kolon kanseri hastalarında sadece beyin ve kemik metastazı gibi selektif bölgelerde palyatif tedavi amaçlı tercih edilebilir. Radyasyon tedavisinde stereotaktik radyoterapi (Cyberknife) ve tomoterapi gibi daha yeni ve selektif yöntemler üzerine çalışmalar devam etmektedir. Gelecekte bu teknikler, radyasyon tedavisinin kolon kanseri yönetimindeki rolünü artırabilir.

2.1.10. Kolon kanseri prognoz

Tüm evreler dahil edildiğinde ABD'de kolorektal kanser için beş yıllık survi oranı %65'tir[27]. Bununla birlikte survi hastalığın evresi ile yakından ilişkilidir: evre I tümörler için 5 yıllık survi yaklaşık %95 iken bu oran evre III kanser için %60, ve evre IV (metastatik) hastalıklar için %10 olarak bildirilmiştir.

Chua ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre kolorektal kanser metastazı için parsiyel karaciğer rezeksiyonu uygulanan her üç hastadan biri beş yıllık sağ kalım süresine ulaşmaktadır[65]. Bu hastaların da yaklaşık yarısında on yıllık survi izlenmekte ve kolorektal metastaz kürü sağlanmaktadır. Küratif karaciğer rezeksiyonu uygulanan 1001 hastanın dahil

edildiği multi-değişkenli bir çalışmada kötü prognozu işaret eden 5 bağımsız faktör tanımlanmıştır[66]. Bunlar:

- Tümör boyutunun 5 cm'den büyük olması
- Hastalısız dönemin (disease free interval) 1 yıldan kısa sürmesi
- Birden fazla tümör odağının varlığı
- Primer lenf nodu pozitifliği
- Karsino embriyonik antijen seviyesinin 200'den fazla olması

Çalışmalar kolorektal kanser hastalarında mevcut olan geleneksel patolojik ve moleküler belirteçlere ek olarak, intra-tümöral immün yanıtın da klinik sonuçları hesaplamada rolü olduğunu önermektedir. Katz ve arkadaşlarının çalışmasında yüksek sayıdaki T regülatuar hücrelerin kötü klinik sonuçla ilişkili olduğu ortaya konulmuştur[67].

Yother ve ark. yaptığı bir diğer çalışmada rezeksiyon yapılan evre II ve evre III kolorektal kanser olgularında genel klinik sonuçlar ve survi değerlendirildiğinde siyahi hastalarda beyaz hastalara göre daha kötü sonuçlar elde edilmiştir. Beş yıllık genel survi siyahılarda %68.2, beyazlarda %72.8 saptanırken, üç yıllık rekürrensiz survi oranları siyahilerde %68.4, beyazlarda ise %72.1 olarak saptanmıştır[68].

Campbell ve arkadaşları tanı öncesi ölçülen VKİ'nin metastatik olmayan kolorektal kanser hastalarının sağ kalımında önemli bir prediktör faktör olduğunu tespit etmiştir, ancak tanı sonrası VKİ ilgisiz bulunmuştur[69]. Yine Campbell ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada günde 6 saatten fazla oturmanın 3 saatten az oturmaya göre kansere bağlı genel mortalite oranlarını artırdığı, bu nedenle rekreasyonel fiziksel aktivitenin kolorektal kanser hastalarında prognoza olumlu etki ettiği ortaya konmuştur[70].

Bu belirtilenlerin dışında kolorektal kanser prognozu üzerine yapılan çok sayıda farklı çalışmada ise; aspirin kullanımının kansere bağlı ölümleri azalttığı[71], mental bozuklukları olan hastalarda tedavi eksikliğine bağlı daha yüksek mortalite oranları görüldüğü[72], yine sigara kullanan hastalarda [73] ve DM hastalarında [74] kolorektal kanser prognozunun daha kötü seyrettiği belirtilmiştir.

2.2. MDR Geni ve Klinik Önemi:

MDR geni, ABC taşıyıcılarının üst ailesine mensuptur. Bu genin görevi hücre ve dokuları bakterilerin, toksinlerin ve ksenobiyotiklerin zararlı etkilerinden korumaktır. Bir MDR1 gen ürünü olan P-gp ise transmembran yerleşimli, enerji bağımlı bir efluks pompasıdır ve in vitro / in-vivo çalışmalarda bir çok ilacın ADME (absorpsiyon, distribüsyon, metabolizma ve ekskresyon) süreçlerinde rol oynadığı, insanda ilaç-ilaç etkileşimine dahil olduğu gösterilmiştir[75]. Bu nedenle de son yıllarda MDR1/P-gp konulu makalelerin sayısı giderek artmaktadır[76-78].

P-gp, ilk olarak 1976'da Çin hamster overinde yoğun bir şekilde eksprese edilen 170kDa bir protein olarak tanımlanmıştır[79]. Yapısal olarak ATP bağlayan bir oyuk ve 6 transmembran parçası olan iki simetrik bölümden ibarettir. ATP bağlayabilme özelliği sayesinde, konsantrasyon farkı olsa dahi özellikle intestinal dokularda belirtilen ilaç, toksin ve ksenobiyotikleri uzaklaştırabilir.

SNP'ler insanda en sık görülen genetik varyasyonlardır. Her bir SNP, DNA'nın yapıtaşı olan nükleotidde bir değişikliği temsil eder. Örneğin bir SNP, DNA sarmalının herhangi bir yerindeki sitozin (C) nükleotidi yerine timin (T) nükleotidi getirebilir.

Bir insanın DNAsı boyunca normal olarak SNPLer olabilir. Ortalama yaklaşık 300 nükleotidde bir görülmekte, bu da insan genomunda kabaca 10 milyon SNP olduğu anlamına gelmektedir. Bu varyasyonlar çoğunlukla genler arasındaki DNA'da bulunmaktadır. Bilim insanlarının hastalıklarla ilişkili genleri işaretlemesi için biyolojik marker olarak kullanılabilirler. SNPLer bir genin içinde ya da bir gen yanındaki düzenleyici bölgede bulunuyorsa, genin fonksiyonunu değiştirerek hastalıkla ilgili daha doğrudan bir role sahip olabilir.

Çoğu SNP'nin sağlık ya da gelişimde etkisi yoktur. Yine de bu genetik değişikliklerden bazılarının insan sağlığı araştırmalarında çok önemli bir role sahip olduğu ispat edilmiştir. Araştırmacılar bir takım ilaçlara bireylerin vereceği yanıtı, toksinler gibi çevresel faktörlere duyarlılığı ve belirli hastalıklara yakalanma riskini tahmin etmeye yardım edebilecek SNPLer

tespit etmişlerdir. SNPlar ayrıca aile bireyleri arasında hastalık geninin kalıtımını takip etmekte de kullanılabilir. Gelecek çalışmalar kalp hastalıkları, diyabet ve kanser gibi kompleks hastalıklarla ilişkili SNPlar tespit edilmesine de katkıda bulunacaktır.

Bir çok farmakogenomik ve farmakogenetik çalışma, MDR1 SNP'lerinin P-gp fonksiyonu ve ekspresyonu üzerinde değişikliklerle ilişkili olduğunu öne sürmüştür[15, 80, 81]. Bireyselleştirilmiş farmakoterapi için gelişen teknoloji ile birlikte, MDR1 genetik polimorfizmlerinin klinik önemi artmaktadır.

2.2.1. MDR1 gen ürünü P-gp ve işlevleri

Geçtiğimiz 30 yılda birçok ABC taşıyıcı gen ve protein tanımlanmıştır. ABC taşıyıcısı, yüksek oranda ATP bağlayıcı kaset içeren bir protein süperailisidir. Bunların içinde, sekans benzerliklerine göre 8 farklı alt-aile (A-G) oluşumu tanımlanmıştır[82-85]. ABC süperailisi proteinleri; iyonlar, şekerler, glikanlar, fosfolipidler, amino asitler, peptidler, proteinler, ilaçlar ve toksinler gibi birçok farklı maddenin transportunda görev alır[85].

ABC süperailisinde, insan vücudundaki ksenobiyotik metabolizmasında görev alan en önemli protein, P-gp olarak görülmektedir. Amfoterik bileşenlerin atılmasında (ekstruzyon) rol oynadığından "trafik ATPaz" olarak da adlandırılır[86, 87]. Kolon ve distal ince barsağın fırçamsı kenarı, safra kanaliküllerinin kanaliküle bakan yüzü, pankreas kanalıkları, proksimal böbrek tubulusları, kan beyin bariyerini teşkil eden bölgede koroid pleksus endotelinin luminal yüzü ve periferik kan mononükleer hücreler gibi ekskretuar doku ve hücrelerde değişen miktarlarda bulunur [88, 89] ve zararlı ksenobiyotiklere karşı bir savunma mekanizması gibi hareket eder[8, 90-93].

Yüksek seviyelerde P-gp ekspresyonu hücre içi ilaç konsantrasyonunda azalmaya neden olabilir. Neoplastik hücrelerde artmış P-gp ekspresyonu, birçok farklı tümör türünde kemoterapiye azalmış cevap ve kötü prognoz ile ilişkilidir[94]. Ayrıca P-gp viral partiküllerin hücresel uptake'i

ve virüs üremesine etki ederek viral enfeksiyonlara karşı da koruyuculuk sağlar[95]. P-gp'in ekspresyon seviyesi ve fonksiyonel bütünlüğü, farmakogenetiği ve ilaçlarla etkileşimi üzerine etki eder. Bu nedenle tedavi esnasında ilaç etkileşimi ve toksisitesi üzerinde çok önemli bir rolü vardır ve bu etkiler daha sıklıkta hidrofobik ilaçların üzerinde izlenir.

P-gp; vinka alkaloidlerinden, kalsiyum kanal blokörleri, antrasiklinler, taksol, antiaritmikler, epipodofilotoksinler, antihipertansifler, antibiyotikler, B-adrenoseptor antagonistler, immünsupresorler, sitotoksik ajanlar, steroid hormonlar ve HIV proteaz inhibitörlerine kadar geniş spektrumda, yapısal olarak da birbirinden farklı bir çok substratla etkileşime girebilir[96]. P-gp'in en kafa karıştırıcı özelliklerinden biri de, bir maddenin P-gp-aracılı transportunun o maddenin kimyasal yapısına göre tahmin edilebilir olmamasıdır[97, 98].

P-gp aktivite seviyesi, ilaçların doku distrübisyonu, gastrointestinal sistemden emilimi ve üriner veya safra yolları ile atılmasına etki eder(26). Hatta karaciğerden ilk geçiş diye tarif edilen ilaç yıkımının yarıdan fazlasında barsaktaki P-gp sorumludur.

Çeşitli solid ve hematolojik tümörler bir kemoterapötikle karşılaşıncı diğer ilaçlara karşı hızla direnç geliştirirler. Çoklu ilaç direnci adıyla anılan bu fenomenin nedeni ise, tümör hücrelerinin yüzeyinde beliren P-gp'in ilacı hızla hücreden uzaklaştırmasıdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda nöroblastoma, lösemi, lenfoma, meme, pankreas, kolon, mide, adrenal korteks, karaciğer, böbrek, yumurtalık, küçük hücreli dışı akciğer tümörlerinde MDR-1 geni ve ürünü gösterilmiştir. P-gp ekspresyonu ile nötral ve anyonik organik bileşiklere (Vinca alkaloidleri, antrasiklin türevleri, epipodofilotoksinler, pacritaksel, kolşisin, aktinomisin D) direnç gelişmesi arasında ilişki bulunmuştur [88, 99, 100]. Bu nedenle P-gp'nin farmakokinetik üzerine etkisi giderek dikkat toplayan bir konu haline gelmiştir.

2.2.2. MDR1'in genetik polimorfizmleri

MDR1, 7q21.1 kromozomunda lokalizedir, 28 ekzondan oluşur ve 1280 aminoasitlik bir protein kodlayabilir[82-85]. Mutasyon analizlerine göre MDR1 oldukça polimorfik bir gen dir ve P-gp'in yapı-fonksiyon ilişkilerini araştırmada yoğun olarak kullanılmaktadır. MDR-1 gen polimorfizmi ilk defa in vitro çalışmalardaki kanserli hücrelerde gösterilmiştir [101]. Hoffmeyer ve ark. insan MDR-1 gen dizisini tarayarak dizi değişikliklerini saptamışlar, ilk kez bu çalışmada ekzon 26'da lokalize C3435T polimorfizmi mevcut olan bireylerde duodenumda P-gp miktarının azalmış olduğunu bulmuşlardır[15]. Daha sonraki dönemlerde de ekzon 21'deki G2677T/A ve ekzon 1b'de T129C polimorfizmlerinin ekspresyon veya fonksiyonu değiştirdiği ortaya konulmuştur [81].

MDR1 gen polimorfizmlerinin sıklığı çalışılan etnik gruba göre değişir. Afrika kökenli hasta popülasyonunda MDR-1 C3435T polimorfizmine ait "C" aleli daha sık ve ince barsakta P-gp ekspresyonu daha fazla iken, Japonya'da MDR-1 G2677T/A varyantlarından "T" aleli daha sık görölmektedir. Asya ve Avrupa kökenli hastalarda C1236T alelleri bakımından da farklılıklar bildirilmiştir [80, 102-109]. Bu farklılıkların klinik anlamı bakımından henüz bir konsensus oluşmamıştır. MDR1 geninin ilk sistematik SNP taraması sağlıklı Kafkas popülasyonunda yapılmış ve 15 farklı ekzonik ve intronik SNP saptanmıştır[15].

Aynı gen polimorfizmini taşıyan kimselerin etnik köken, evre şartları ve eşlik eden diğer hastalık / tedavilere göre ilaç metabolizması ya da ilaç kan seviyesi ya da ince barsakta P-gp ekspresyonu bakımından farklılıklar gösterebilmesi bu konuda daha fazla çalışma yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda MDR1 geninde toplam 50 SNP ve 3 insersiyon/delesyon polimorfizmi raporlanmıştır[82]. Ancak görölmektedir ki araştırmacılar bunların arasında sadece 27 pozisyondaki 28 SNP ile ilgilenmektedir. MDR1 genindeki bazı polimorfizmler sessizdir ve amino asit değişikliğine neden olmazlar(örn C1236T, C3396T, C3435T). Ancak

bazılarının amino asitleri değiştirdiği ortaya konmuştur(A61G, G1199A, A2956G, T3421A). İlginç olarak, aminoasit yapılarında değişikliğe yol ačan bu polimorfizmlerden bazıları P-gp'in transmembran alanında lokalize aminoasitleri kodlamaktadır (örn. Ekzon 24'deki A2956G) ve bazıları *ATP binding site*'a çok yakın yerleşimlidir (örn. Ekzon 11'deki G1199A). Tablo 2'de bugüne kadar tanımlanan bazı ekzonik ve intronik polimorfizmler özetlenmiştir.

Son yıllarda P-gp'in ekspresyon ve fonksiyonuna etki eden MDR1 SNP'lerinin çoğu tanımlanmıştır[15, 92, 93, 110]. P-gp'in N-terminaline yakın A61G mutasyonu minör fonksiyonel bozukluklara yol açaacak bir yük değişikliğine (bazikten asidiğe) neden olabilir[111]. Ayrıca promotörde (ekzon 1b) yer alan non-coding T129C mutasyonu da insan plasentasında P-gp ekspresyonunun 2 kat daha az ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir[93]. T307C (ekzon 5)'teki amino asit değişikliği Phe103Leu, P-gp'in ekstraselüler kısmında ikinci transmembran alanının yanında lokalizedir. Aromatikten lipofilik residü forma dönüşüm de P-gp'de yapısal değişiklikle sonuçlanır. Ekzon11'deki G1199A ise belirgin bir boyut değişikliğine neden olur ve proteinde yük değişikliklerine yol açar. Bu SNP de sitoplazmik tarafta ilk ATP bağlayıcı alanın baş kısmında yer alır[112]. Ekzon 12'de bulunan C1236T, sinonim polimorfizm, ensık görülen SNPlerden biridir[113]. Yine G2677T/A, G2995A ve C3435T sıklıkla P-gp fonksiyon ve ekspresyonunu etkileyebilen diğer SNPlerdendir[93, 114, 115]. Bu polimorfizmlerin potansiyel fonksiyonel önemleri, P-gp yapısının hangi bölgesinde oldukları saptanarak ortaya konulabilir.

Tablo - 2 MDR1 Genetik Polimorfizmleri

Pozisyon	Lokasyon	Etki
C-145G	İntron	Non-coding
T-129C	Exon 1a	Non-coding
C-4T	Exon 1b	Non-coding
G-1A	Exon 2	Non-coding
A61G	Exon 2	Non-coding
G5/-25T	Exon 2	Asn21Asp
G5/-35C	İntron	
T307C	İntron	
C6/+139C	Exon 5	Phe103Leu
A548G	İntron	
G1199A	Exon 7	Asn183Ser
C1236T	Exon 11	Ser400Asn
C12/+44T	Exon 12	Wobble(Gly412Gly)
C1474T	İntron	
T17/-76A	Exon 13	Arg492Cys
A17/+137Y	İntron	
C2650T	İntron	
G2677T	Exon 21	Wobble(Leu884Leu)
A2956G	Exon 21	Ala893Thr
G2995A	Exon 21	Ala893Ser
A3320C	Exon 24	Mer986Val
C3396T	Exon 24	Ala999Thr
T3421A	Exon 26	Gln1107Pro
C3435T	Exon 26	Wobble
T3421A	Exon 26	Ser1141Thr
C3435T	Exon 26	Wobble(LIc1145LIc)
G4030C	Exon 28	Silent
A4036G	Exon 26	Silent

Her ne kadar MDR1 SNPlerinin değişmiş P-gp aktivitesi ile ilişkili olduğu farklı popülasyonlarda yapılan geniş serili çalışmalarda ortaya konulmuşsa da, bu ilişkiyi açıklayan mekanizma henüz net olarak anlaşılamamıştır. Ortaya atılan birkaç teoriden en popüler, C3435T SNP ile MDR1 genindeki diğer mutasyonlar (G2677T/A, T129C gibi) arasında bir bağlantının var olmasıdır[113, 116]. Bir diğer teori de C3435T'deki bu sessiz mutasyonun

fonksiyonel sonuçları etkileyerek translasyon etkinliğini azaltabileceğidir[112]. Yine bu sessiz mutasyonun mRNA işlenmesini, translasyonunu düzenlediği veya değiştirdiği de varsayımlar arasındadır[117, 118]. Bazı SNPlerin mRNA stabilitesini arttırmak yoluyla protein ekspresyonunu da artırması ve/veya substratın P-gp taşıyıcısına afinitesini değiştirmesi de olasıdır [119, 120]. Son olarak C3435T polimorfizminin post-translasyonel modifikasyona etki edebileceği veya mRNA işlenmesinin önemli bir sekansı ile bağlantılı olabileceği belirtilmiştir[121].

2.2.3. MDR1 polimorfizmleri ve insan hastalıklarına duyarlılıkları

P-gp'in fizyolojik rolünün henüz tam olarak anlaşılamadığı gerçeğine rağmen, MDR1 genotipleri ile P-gp ekspresyonu ve fonksiyonu ve insan hastalıkları ile ilişkileri düşünüldüğünde genotip bağımlı P-gp ekspresyonunun bazı hastalıklarla ilişkili olduğunu öne sürmek makul bir hipotez olacaktır.

Alt intestinal sistemde P-gp ekspresyonu ÜK gelişimi ile ilişkilendirilmiştir[102, 122, 123]. Ayrıca şu an piyasada bulunan tüm HIV proteaz inhibitörleri P-gp substratları olduğundan, MDR1 genotip durumu AIDS için hastalık riski ve terapötik cevap üzerine etki etmektedir[124]. MDR1 SNPlerinin kan-beyin bariyerindeki beyin kapiller damar endotel hücrelerine etki ettiği ve Parkinson hastalığı için risk faktörü olduğu bildirilmiştir[125]. Bunlara ek olarak nortriptilinin indüklediği postural hipotansiyon ile MDR1^{C3435T} polimorfizmi arasında belirgin bir ilişki gözlenmiş [126], homozigot T-varyantının çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemilerinde daha sık izlendiği saptanmış [127], ve yine MDR1 SNPlerinin renal epitelyal tümörlere yatkınlığı artırdığı gösterilmiştir[128]. Bu çalışmalarda MDR1^{C3435T} polimorfizminin P-gp-bağımlı ilaçlarla yapılan tedavi rejimlerini de etkilediği öne sürülmüştür. Bazı belirli hastalıklarda kullanılan P-gp ürünü olan ilaçların farmakokinetiği ve tedaviye alınan cevaplar; diyet, ırk, hastalığın durumu, çevresel etkenler gibi birçok faktör nedeni ile kişiler arasında farklılıklar gösterse de, MDR1 gen polimorfizmi varlığı ana determinantlardan biridir[112]. Ancak yine de MDR1^{C3435T} polimorfizminin ÜK gibi bazı

hastalıklarla direk ilişkisi olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur[129, 130]. Bu nedenle MDR1 gen polimorfizmleri ile insan hastalıkları arasındaki ilişki ve etkileşimi araştırmak için çok daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2.4. MDR1 polimorfizmleri üzerine güncel yayınlar

2001'den bugüne MDR1 polimorfizmlerini inceleyen en az 20 review bulunmaktadır. Bunların büyük çoğunluğu MDR1 polimorfizmleri, etnik dağılımları ve klinik etkileri üzerine bilgi vermektedir[82, 89, 96, 97, 110, 112, 114]. MDR1 SNPLerinin farmakolojik etkilerini vurgulayan ilk çalışma Brinkmann ve arkadaşları tarafından yapılmıştır[131]. Daha sonra, Fromm mevcut verilere dayanarak MDR1 polimorfizminin, P-gp'in dokudaki ekspresyonu, ilaç dağılımı, tedaviye cevap ve hastalık riski üzerine etkilerini ortaya koymuştur[132]. 2003'te Schwab laboratuvar çalışmalarını temel alarak polimorfizmlerin klinik sonuçları ve hastalığa yatkınlık üzerine etkilerini vurgulamıştır[112]. Yine 2004'te Kelleher ve ark., MDR1 polimorfizmleri ile inflamatuvar barsak hastalığı arasındaki ilişkileri araştırmıştır[133]. Marzolini ve ark., MDR1 haptotipi, çevresel faktörler ve potansiyel karıştırıcı faktörleri tartışmıştır ve MDR1 polimorfizmlerinin potansiyel etkilerini in vivo ortamda gözlemlemiştir[89]. Ishikawa ve ark., SNPLerin P-gp aktivitesi üzerine etkilerinin, test edilen substratlara bağlı olduğuna inandıklarını, bu nedenle SNPLerin fonksiyonel analizlerinin geniş substrat gruplarında yapılması gerektiğini belirtmişlerdir[134]. Bu nedenle SNPLerin MDR1 fonksiyonlarına etkilerini ölçmek için yüksek hızlı tarama sistemi ve yapı-aktivite ilişkisi analizi için yeni bir metod geliştirmiştir.

Kolon kanserinin ve diğer tüm kanser türlerinin mevcut tanı ve tedavi yöntemleri, genelde toplumun tamamına yönelik planlanmaktadır. Genetik araştırmalarda ise tedavi planlarının bireyselleştirilmesi asıl amaçtır. Her bir bireyin mevcut hastalığa ve uygulanacak tedaviye vereceği yanıtlar farklı olabilmektedir. Bu nedenle ortaya koyulabilecek yeni bir tarama yöntemi veya tedavide hasta seçimini etkileyecek bir yöntem değerli bir araştırma konusu

olacaktır. Kişiselleştirilmiş tedavi uygulayabilmek için, farmakolojik etki ve yan etkiler de dahil olmak üzere ilaca yanıtta bireysel farklılıklara yol açabilecek moleküler mekanizmaları anlamak çok önemlidir. Mevcut kanıtlara göre ilaçların farmakokinetik profillerini etkileyen en önemli faktörlerden biri de ilaç taşıyıcılarıdır. Bu nedenle son dönemde yoğun bir şekilde araştırılan ilaç taşıyıcılarının genetik polimorfizmleri de, ilaç dengesi ve etkinliğindeki değişkenliğin potansiyel determinantı olarak ciddi şekilde dikkat çekmektedir.

Günümüzde, genetik polimorfizmlerin MDR1 fonksiyonu üzerine açık etkilerini gösteren veriler ve çalışmalar hala yeterli seviyede değildir. Bu nedenle MDR1 polimorfizmleri ile P-gp farmakokinetiğindeki değişiklikler arasındaki ilişkinin altında yatan moleküler mekanizmayı açıklayabilecek, uygun deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca MDR1 haplotipi, P-gp ekspresyonu ve fonksiyonu üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler, değişken P-gp aktivitesi fenomenini anlamamıza yardımcı olacaktır.

Biz de bu çalışmamızda MDR1 SNP'leri ve doku ekspresyonunun, kolon kanseri vakalarında insidans ve tümörün lokal agresifliği ile ilişkisini gösteren verileri sunup, aynı zamanda mevcut tartışmaları da özetlemeye çalıştık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim Araştırma Hastanesi'nde yürütülen bir vaka-kontrol çalışması olup, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nda 130001548 proje numarası ile etik kurul onayı almıştır. Ayrıca Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından SAG-C-TUP-090113-0005 proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışmamıza Şubat 2012 - Nisan 2015 tarihleri arasında opere edilen ve histopatolojik tanısı kolon kanseri olarak raporlanan 27-86 yaşları arasında bilinen genetik yatkınlığı olmayan 110 hasta ve kanser tanısı olmayan 37-85 yaşları arasında 119 sağlıklı birey dahil edildi. Kontrol grubunun seçimi yaş ve cinsiyet dağılımının çalışma grubu ile benzer dağılıma sahip olması esasına uygun olarak yapıldı. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalara aydınlatılmış onam formu okutularak yazılı izinleri alındı.

3.1. Hasta Seçimi

Çalışma grubuna 18 yaşını doldurmuş, histopatolojik olarak kolon kanseri tanısı almış ve aralarında akrabalık ilişkisi olmayan hastalar dahil edildi. 18 yaşından küçük, operasyon öncesi kemoterapi ya da radyoterapi alan hastalar çalışma dışında bırakıldı.

Kontrol grubu, polikliniklere başvuran ve biyokimya tetkiki istenen, kanser tanısı olmayan hastalardan seçildi. 18 yaş altı bireyler çalışmaya alınmadı.

3.2. Kullanılan yöntemler:

Demografik özellikler, alkol tüketimi, sigara alışkanlığı, kronik hastalıklar, ilaç kullanımı, aile öyküsü gibi veriler hastanın operasyon öncesi dönemde yüz-yüze görüşme ile standart bir form doldurularak kayıt altına alındı.

Tümörün grade'i, TNM evrelemesi, intratümöral lenfositik yanıt, crohn benzeri peritümöral lenfositik yanıt, vasküler-lenfatik-perinöral invazyon verileri patoloji raporlarından elde edildi.

Çalışmaya katılan her bireyden; polimorfizm tayininde kullanılacak DNA'nın izolasyonunun yapılması için preoperatif dönemde 2'şer ml olmak üzere toplam 6 ml kan 3 ayrı K3EDTA'lı tüpe alındı. Tüm kanlar çalışma zamanına kadar -20°C'de muhafaza edildi. Gen ekspresyonu tayini için kanserli hastaların cerrahi spesmenlerinin iki farklı bölgesinden, formaldehite koyulmadan, örnekleme yapıldı. İlk örnek kanser dokusundan alınırken, ikinci örnek tümöral alana en uzak sağlıklı dokudan alınarak, RNA later (Qiagen) solüsyonu içinde RNA izolasyonu amacıyla eksi 80°C'de saklandı.

3.3. Genomik DNA İzolasyonu

Toplanan kanlardan "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche, Mannheim, Germany) ile üretici firmanın talimatnamesine göre genomik DNA izolasyonu yapıldı.

DNA Sulandırımı ve Konsantrasyon Ölçümü: İzole edilen DNA'ların optik yoğunlukları (OD) 260 nm'de spektrofotometrede ölçülerek stoklardaki DNA miktarları tayin edildi. Elde edilen değerlere göre tüm DNA örneklerinin son konsantrasyonu 50 ng/µl olacak şekilde DNA sulandırımı hazırlandı. Böylece PZR ile çoğaltılacak tüm DNA'ların konsantrasyonları eşitlenmiş ve stoklar korunmuş oldu. DNA saflığı tayini için aynı zamanda ekstraktın protein oranı 280 nm'de ölçüldü ve 260/280 nm oranı 1,7 ve üzeri olanlar PZR (polimeraz zincir reaksiyonu)'a alındı.

3.4. Total RNA izolasyonu

Toplanan dokulardan "High Pure RNA isolation Kit" (Roche, Mannheim, Germany) ile üretici firmanın talimatnamesine göre RNA izolasyonu yapıldı.

RNA Sulandırımı ve Konsantrasyon Ölçümü: İzole edilen RNA'ların optik yoğunlukları (OD) 260 nm'de spektrofotometrede ölçülerek stoklardaki RNA miktarları tayin edildi. Elde edilen değerlere göre tüm RNA örneklerinin son konsantrasyonu 500 ng/µl olacak şekilde RNA sulandırımı hazırlandı. Böylece PZR ile çoğaltılacak tüm başlangıç konsantrasyonları eşitlenmiş ve stoklar korunmuş oldu. Ekstraksiyon saflığı tayini için aynı zamanda

ekstraktın protein oranı 280 nm’de ölçüldü ve 260/280 nm oranı 1,9-2,1 olanlar PZR (polimeraz zincir reaksiyonu)’a alındı. Ayrıca RNA ekstraksiyonu kontaminasyon varlığı ve saflık tayini için %0,5’luk standart agaroz jelde yürütüldü. Yetersiz miktarda ya da uygun olmayan RNA ekstraksiyonu durumunda tekrar dokulardan ekstraksiyon yapıldı.

3.5. Polimorfizmlerin Tayini

Çalışmamızda; MDR-1 geninde C3435T, G2677T/A ve C1236T polimorfizmleri real-time pcr melting eğri analizi ile saptandı. Polimorfizmin bulunduğu hedef bölgeye spesifik olarak dizayn edilecek uygun primer çifti ile hedef bölge amplifiye edilirken allele spesifik olarak dizayn edilen problemlerin polimorfik bölgeye hibridizasyonu sağlandı. Problemlerden biri 3’ucundan floresans boya ile işaretli (donör boya) diğeri 5’ucundan alıcı boya (acceptor boya) ile işaretlenmiştir. Problemler hedef amplikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotid uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. “Fluorescence resonance energy transfer, (FRET)” olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı ortamdaki hibridizasyon derecesine ve diğeri bir ifadeyle PZR siklusu süresince oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır. Daha sonra polimorfizmi saptamak amacıyla amplifikasyon ürünleri “melting curve” erime eğrisi analizine alınacaktır. Her çift sarmal DNA kendine özgü “melting temperature, Tm” (çift sarmal DNA’nın % 50’sinin tek sarmal hale geçmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PZR amplifikasyonundan sonra sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek elde edilen amplikonların melting dereceleri tayin edilir. Prob hangi allele spesifik ise (major veya minör allele) tam olarak o allelin bulunduğu hedef diziyeye hibridize olacak ve bu zincirin ayrılması için gereken melting ısı daha yüksek çıkacaktır. Diğeri allelin bulunduğu dizi ise proba tam komplementer olmadığından ve nispeten spesifik olan allele göre daha zayıf hibridize olacaktır. Bunun sonucunda daha önce daha düşük ısıda Tm verecektir. Tek nükleotidlik farklılık yaklaşık 5-6 derecelik bir melting ısı

varyasyonu oluşturmaktadır. Böylece polimorfizme ait allelik varyantlara ait ampliconlar farklı Tm değerlerinde pik oluşturacaklardır.

3.6. Gen ekspresyonu Tayini

İzole edilen RNA'ların ters transkripsiyonla cDNA (komplementer DNA) eldesi ise "Transcriptor cDNA sentez kit (Roche)" ile yapıldı. MDR-1 gen ekspresyonu TaqMan kimyasına dayalı real time PZR ile Light Cycler 1.5 aletinde tayin edildi. Aynı zamanda "beta aktin " internal kontrol genin ekspresyon tayini yapılarak, MDR-1 gen ekspresyonları normalize edildi. Her gene spesifik primer ve prob kullanıldı. Problar tek sarmal hale gelen hedef molekül üzerine sens ve antisens primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob ve hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz 5' → 3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen amplicon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır. Problarla ekspresyon tayininden önce primerlerin amplifikasyon optimizasyonu ise "Light Cycler RNA master SYBR Green kit, Roche" ile yapıldı.

Negatif kontrol olarak ise su kullanıldı ve her deneyde örneklerle birlikte çalışmaya dahil edildi. MDR-1 geninin kantifikasyonu; hedef örnekteki MDR-1 ekspresyonu delta-delta Ct metodu ile tayin edildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Veriler değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotlar (frekans, yüzde, ortalama, standart sapma, minimum, maksimum) kullanıldı. Farklılıklar için kıkare test, t test ve Mann Whitney U test, lojistik regresyon analizi kullanıldı. Elde edilen bulgular %95 güven aralığında ve %5 anlamlılık düzeyinde

değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olması olarak tanımlandı. Çalışmada elde edilen verilerin düzenlenmesi ve analizi değerlendirilmesi için SPSS 22.0 (trial version) ve Microsoft Excel 2007 kullanıldı.



4. BULGULAR

Bu çalışma 110 (44 kadın, 66 erkek) kolon kanseri hastası (çalışma grubu) ve 119 sağlıklı (42 kadın ve 77 erkek) bireyin (kontrol grubu) demografik ve laboratuvar verilerini temel alarak gerçekleştirildi.

Kontrol grubu yaş ve cinsiyet bire bir uyumlu olacak şekilde belirlendi ancak çalışma grubunda doku hasarı nedeniyle örnek kayıpları yaşandı. Kolon kanseri olan çalışma grubunun yaş dağılımı $61,79 \pm 11,2$ ve sağlıklı grubun yaş dağılımı $62,31 \pm 10,44$ olarak bulundu. Grupların yaşları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (t test; $p=0,72$). Grupların cinsiyetleri arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (chi-kare test; $p=0,46$).

Tablo - 3 Çalışma ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılımı

		Çalışma Grubu		Kontrol Grubu	
		Ortalama	SS	Ortalama	SS
Yaş		61,79	11,25	62,31	10,44
		Olgu Sayısı	Yüzde	Olgu Sayısı	Yüzde
Yaş	≥ 50	14	12,7	13	10,9
	> 50	96	87,3	106	89,1
Cinsiyet	Erkek	66	60	77	64,7
	Kadın	44	40	42	35,3

Çalışma grubunun demografik verileri değerlendirildiğinde; lokalizasyon dağılımı hepatic fleksura 8 (%7,27), sağ kolon 35 (%18,92), sigmoid kolon 54 (%30,51), sol kolon 3 (%1,31), splenik fleksura 8 (%3,48), transvers kolon 2 (%0,6) olarak saptandı. Sigara kullanmayan 83 (%75,45) kullanan 27 (%24,55), alkol kullanmayan 106 (%96,36) ve kullanan 4 (%3,64) hasta mevcut idi. Diabetes mellitus tanısı olan 22 (%20), olmayan 88 (%80) ve hipertansiyon olan 38 (%34,55), olmayan 72 (%65,45) katılımcı vardı. (Tablo 4).

Tablo - 4 Çalışma grubunun demografik özellikleri

		Olgu Sayısı (Yüzde)
Lokalizasyon	Hepatik Fleksura	8 (%7,27)
	Sağ Kolon	35 (%31,82)
	Sigmoid	54 (%49,09)
	Sol Kolon	3 (%2,72)
	Splenik Fleksura	8 (%7,27)
	Transvers Kolon	2 (%1,82)
Sigara	Kullanmıyor	83 (%75,45)
	Kullanıyor	27 (%24,55)
Alkol	Kullanmıyor	106 (%96,36)
	Kullanıyor	4 (%3,64)
Diabetes Mellitus		22 (%20)
Hipertansiyon		38 (%34,55)

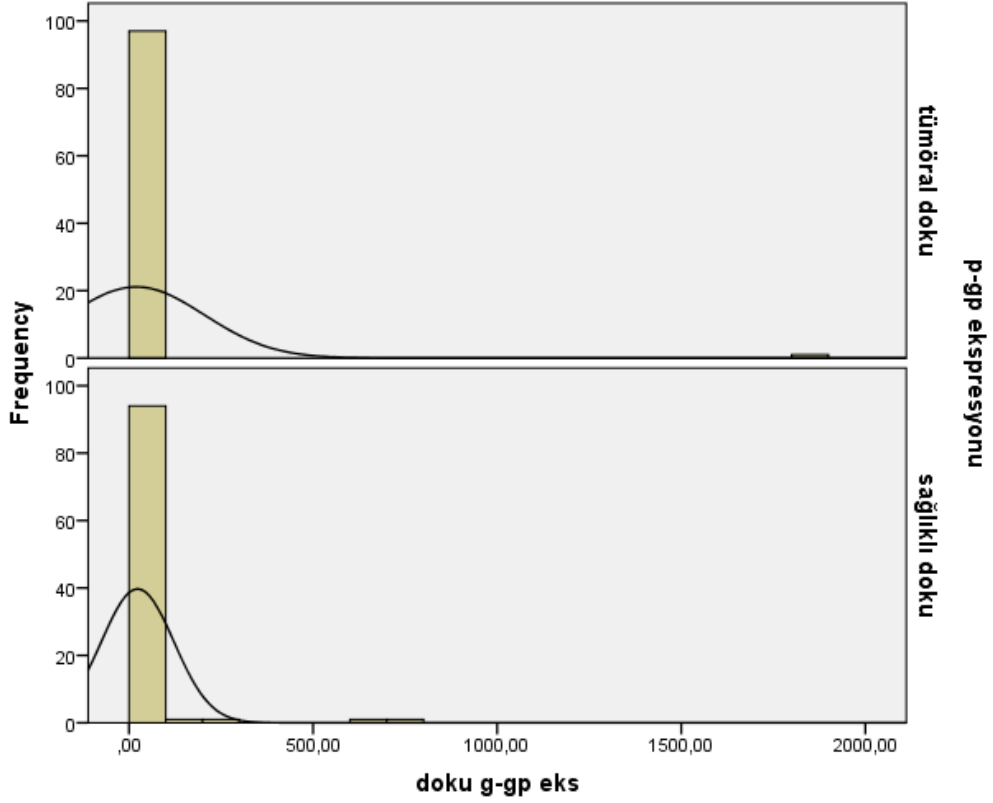
Çalışmanın ilk bölümünde çalışma grubundan elde edilen tümöral doku ile sağlıklı dokudaki P-gp ekspresyonları karşılaştırıldı. Tümöral doku P-gp ekspresyonu median değeri 0,21 iken, sağlıklı doku P-gp ekspresyonu median değeri 1,33 olarak saptandı ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,00001$). Tablo 5 ve Şekil 1’de tümöral ve sağlıklı doku arasında P-gp ekspresyonu karşılaştırılması ve bu dokulardaki P-gp dağılımları gösterilmiştir.

Tablo – 5 Tümöral ve sağlıklı dokular arasında P-gp ekspresyonu karşılaştırılması

P-gp ekspresyonu	Tümöral Doku	Sağlıklı Doku
Mean	19,57	23,29
Median	0,21	1,33
Minimum	0,00	0,00
Maximum	1833,04	711,46
Range	1833,04	711,45
P*	<0,0001	

*: Mann Whitney U Test

Şekil - 1 Çalışma ve kontrol gruplarında P-gp ekspresyonu dağılımı



Daha sonra çalışma grubunun laboratuvar bulgularına göre tümöral doku P-gp ekspresyonunun tümörün grade'i, tümör derinliği (T), lenf nodu tutulumu (N), metastaz (M), intratümöral lenfositik yanıt, peritümöral crohn benzeri lenfositik yanıt, vasküler, lenfatik ve perinöral invazyon ile ilişkisi değerlendirildi. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucu P-gp ekspresyonu ile belirtilen parametreler arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı($p>0,05$). Elde edilen değerler ve istatistiksel sonuçlar tablo 6'da belirtildiği üzere özetlendi.

Tablo – 6 Tümöral doku P-gp ekspresyonunun tümör değişkenlerine göre dağılımı

		n	Mean	Standard Deviation	Median	Range	p*
GRADE	1-2	81	26,95	219	0,27	1833,04	0,145
	3-4	21	0,71	1,47	0,11	4,78	
T	1-2	9	0,56	1,08	0,06	3,16	0,238
	3-4	101	21,26	193,13	0,24	1833,04	
N	0	46	0,66	1,07	0,27	4,9	0,957
	1-3	64	34,36	247,03	0,21	1833,04	
M	0	92	23,05	202,35	0,14	1833,04	0,079
	1	18	1,74	2,73	0,89	10,82	
İNTRATÜMÖRAL LENFOSİTİK YANIT	Yok	65	1	1,82	0,27	10,83	0,443
	Var	45	45,39	286,17	0,14	1833,03	
PERİTÜMÖRAL CROHN BENZERİ LENFOSİTİK YANIT	Yok	65	0,96	1,76	0,27	10,83	0,394
	Var	45	47,73	293,4	0,15	1833,03	
VASKÜLER İNVAZYON	Yok	51	39,05	264,46	0,15	1833,03	0,56
	Var	59	0,87	1,24	0,35	4,76	
LENFATİK İNVAZYON	Yok	45	43,54	279,4	0,15	1833,03	0,63
	Var	65	0,83	1,19	0,32	4,76	
PERİNÖRAL İNVAZYON	Yok	79	27,54	220,56	0,27	1833,03	0,16
	Var	31	0,6	0,93	0,11	4	

*: Mann Whitney U Test

Çalışmanın bir sonraki basamağında çalışma ve kontrol gruplarında her bir polimorfizm için sıklık hesaplandı. Kolon kanseri tanısı alan 110 hasta değerlendirildiğinde C3435T ve C1236T genotipleri için iki, G2677T/A için bir hastada laboratuvar sonucu elde edilemedi. Değerlendirilen hastaların G2677T/A, C3435T ve C1236T için polimorfizm sıklıkları tablo 7’de özetlendi, çalışma grubunda kontrol grubuna göre herhangi bir polimorfizm tipinin daha fazla sıklıkta izlenmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Belirtilen polimorfizmlerin çalışma ve kontrol gruplarındaki dağılımları şekil 2, 3 ve 4’te gösterildi.

Çalışma grubundaki hastaların polimorfizm tiplerine göre yaş ve cinsiyet dağılımı incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı (Tablo 8).

Tablo -7 Çalışma ve kontrol gruplarında polimorfizm sıklıklarının karşılaştırılması

		Çalışma	Kontrol	p*
G2677T/A	Homozygous T/T	25 (%22,94)	26 (%21,85)	0,50
	Heterozygous T/G	55 (%50,46)	53 (%44,54)	
	Homozygous G/G	29 (%26,61)	40 (%33,61)	
	Toplam	109	119	
C3435T	Homozygous T/T	27 (%25)	27 (%22,69)	0,38
	Heterozygous T/C	58 (%53,7)	57 (%47,9)	
	Homozygous C/C	23 (%21,3)	35 (%29,41)	
	Toplam	108	119	
C1236T	Homozygous T/T	26 (%24,07)	25 (%21,37)	0,81
	Heterozygous T/C	56 (%51,85)	60 (%51,28)	
	Homozygous C/C	26 (%24,07)	32 (%27,35)	
	Toplam	108	117	

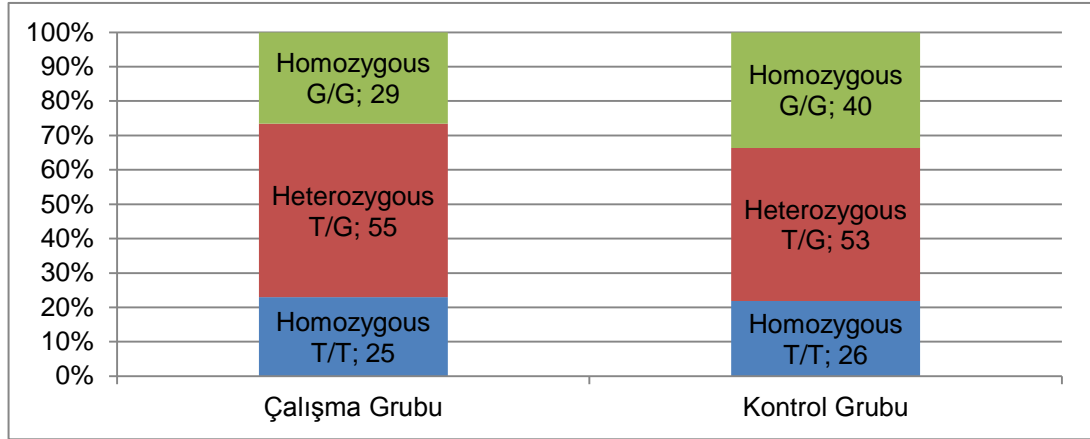
*:Chi kare test

Tablo - 8 Çalışma grubunda polimorfizm tiplerine göre yaş ve cinsiyet dağılımı

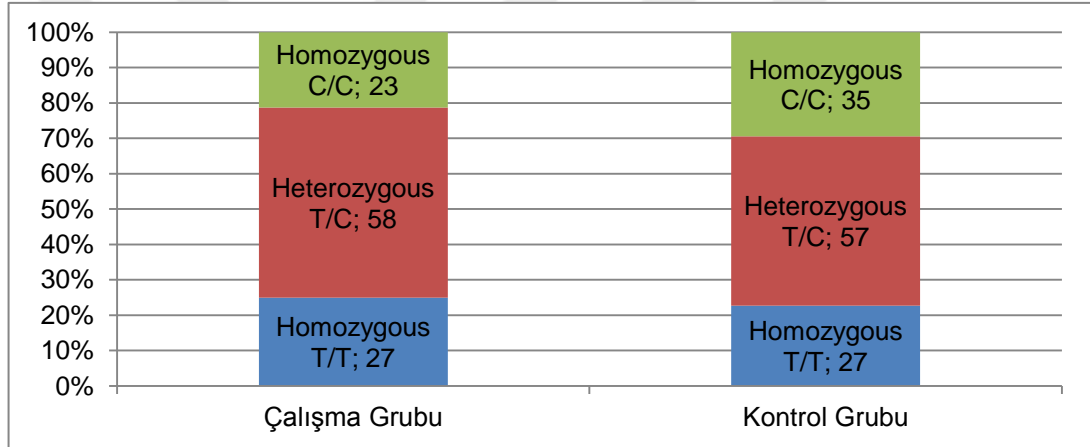
		Yaş		P*	Cinsiyet		p*
		<=50	>50		Erkek	Kadın	
G2677T/A	Homozygous T/T	3 (%21,43)	22 (%23,16)	0,71	14 (%21,21)	11 (%25,58)	0,87
	Heterozygous T/G	6 (%42,86)	49 (%51,58)		34 (%51,52)	21 (%48,84)	
	Homozygous G/G	5 (%35,71)	24 (%25,26)		18 (%27,27)	11 (%25,58)	
C3435T	Homozygous T/T	4 (%28,57)	23 (%24,47)	0,66	17 (%25,76)	10 (%23,81)	0,84
	Heterozygous T/C	6 (%42,86)	52 (%55,32)		34 (%51,52)	24 (%57,14)	
	Homozygous C/C	4 (%28,57)	19 (%20,21)		15 (%22,73)	8 (%19,05)	
C1236T	Homozygous T/T	4 (%30,77)	22 (%23,16)	0,49	15 (%23,08)	11 (%25,58)	0,56
	Heterozygous T/C	5 (%38,46)	51 (%53,68)		32 (%49,23)	24 (%55,81)	
	Homozygous C/C	4 (%30,77)	22 (%23,16)		18 (%27,69)	8 (%18,6)	

*:Chi kare test

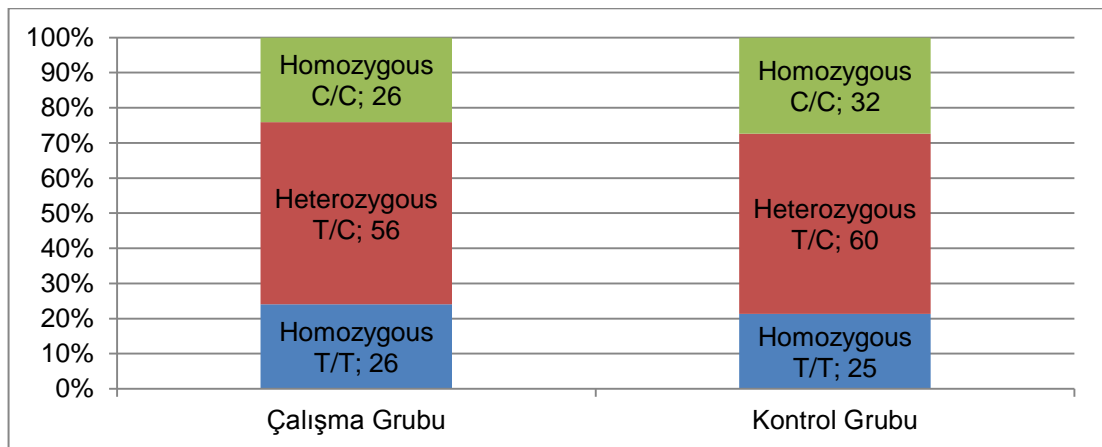
Şekil – 2 G2677T/A polimorfizminin çalışma ve kontrol gruplarında genotip dağılımı



Şekil – 3 C3435T polimorfizminin çalışma ve kontrol gruplarında genotip dağılımı



Şekil - 4 C1236T polimorfizminin çalışma ve kontrol gruplarında genotip dağılımı



Lojistik regresyon analizi ile;

Sağlıklı gruba göre kolon kanseri için G2677T/A polimorfizminde GG genotipi olması, TG ve TT genotipi olmasına göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber 1,182 kat arttırıcı risk faktörü olarak tespit edildi.

Sağlıklı gruba göre kolon kanseri için C3435T polimorfizminde CC genotipi olması, TC ve TT genotipi olmasına göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber 1,241 kat arttırıcı risk faktörü olarak görüldü.

Her bir polimorfizm türü tümöral doku p-glikoprotein (p-gp) ekspresyonu ile kıyaslandı. Çalışma (Kolon Kanseri) grubunda tümöral doku p-gp ekspresyonunun genotiplerine göre dağılımı incelendi, farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). (Tablo 9)

G2677T/A, C3435T ve C1236T polimorfizmlerinin çalışma grubunda tümörün grade'i, tümör boyutu (T), lenf nodu tutulumu (N), metastaz (M), intratümöral lenfositik yanıt, peritümöral crohn benzeri lenfositik yanıt, vasküler, lenfatik ve perinöral invazyon ile ilişkisi tablo 10, 11 ve 12'de sunuldu. Elde edilen sonuçlar ışığında genotipler ile belirtilen parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı($p>0,05$).

Tablo – 9 Çalışma grubu polimorfizm tiplerinin tümöral doku p-gp ekspresyonu ile ilişkisi

		Tümöral doku g-gp eks				p*
		Mean	Standard Dev.	Median	Range	
G2677T	Homozygous T/T	,63	1,15	,08	4,77	0,51
	Heterozygous T/G	,73	1,19	,21	4,91	
	Homozygous G/G	71,87	359,22	,38	1833,03	
C3435T	Homozygous T/T	,57	1,13	,08	4,78	0,38
	Heterozygous T/C	36,80	256,56	,43	1833,03	
	Homozygous C/C	1,28	2,53	,21	10,82	
C1236T	Homozygous T/T	,46	,67	,09	2,19	0,81
	Heterozygous T/C	,79	1,32	,21	4,91	
	Homozygous C/C	81,20	381,89	,43	1833,03	

*:Chi kare test

Tablo – 10 G2677T/A polimorfizminin yaş, cinsiyet ve tümöral özelliklere göre dağılımı

G2677T/A		Homozygous T/T	Heterozygous T/G	Homozygous G/G	P*
Yaş	<=50	3 (%21,43)	6 (%42,86)	5 (%35,71)	0,71
	>50	22 (%23,16)	49 (%51,58)	24 (%25,26)	
Cinsiyet	Erkek	14 (%21,21)	34 (%51,52)	18 (%27,27)	0,87
	Kadın	11 (%25,58)	21 (%48,84)	11 (%25,58)	
GRADE	1	18 (%22,22)	40 (%49,38)	23 (%28,4)	0,41
	2	6 (%28,57)	12 (%57,14)	3 (%14,29)	
T	1	3 (%33,33)	3 (%33,33)	3 (%33,33)	0,55
	2	22 (%22)	52 (%52)	26 (%26)	
N	0	11 (%23,91)	24 (%52,17)	11 (%23,91)	0,89
	1	14 (%22,22)	31 (%49,21)	18 (%28,57)	
M	0	20 (%21,98)	49 (%53,85)	22 (%24,18)	0,26
	1	5 (%27,78)	6 (%33,33)	7 (%38,89)	
İNTRATÜMÖRAL LENFOSİTİK YANIT	0	18 (%27,69)	29 (%44,62)	18 (%27,69)	0,25
	1	7 (%15,91)	26 (%59,09)	11 (%25)	
PERİTÜMÖRAL CROHN BENZERİ LENFOSİTİK YANIT	0	15 (%23,08)	32 (%49,23)	18 (%27,69)	0,94
	1	10 (%22,73)	23 (%52,27)	11 (%25)	
VASKÜLER İNVAZYON	0	15 (%29,41)	21 (%41,18)	15 (%29,41)	0,16
	1	10 (%17,24)	34 (%58,62)	14 (%24,14)	
LENFATİK İNVAZYON	0	12 (%26,67)	19 (%42,22)	14 (%31,11)	0,35
	1	13 (%20,31)	36 (%56,25)	15 (%23,44)	
PERİNÖRAL İNVAZYON	0	19 (%24,36)	38 (%48,72)	21 (%26,92)	0,81
	1	6 (%19,35)	17 (%54,84)	8 (%25,81)	

*:Chi-Kare test

Tablo – 11 C3435T polimorfizminin yaş, cinsiyet ve tümöral özelliklere göre dağılımı

C3435T		Homozygous T/T	Heterozygous T/C	Homozygous C/C	p*
Yaş	<=50	4 (%28,57)	6 (%42,86)	4 (%28,57)	0,66
	>50	23 (%24,47)	52 (%55,32)	19 (%20,21)	
Cinsiyet	Erkek	17 (%25,76)	34 (%51,52)	15 (%22,73)	0,84
	Kadın	10 (%23,81)	24 (%57,14)	8 (%19,05)	
GRADE	1	19 (%23,75)	45 (%56,25)	16 (%20)	0,66
	2	7 (%33,33)	10 (%47,62)	4 (%19,05)	
T	1	2 (%22,22)	5 (%55,56)	2 (%22,22)	0,98
	2	25 (%25,25)	53 (%53,54)	21 (%21,21)	
N	0	11 (%23,91)	27 (%58,7)	8 (%17,39)	0,61
	1	16 (%25,81)	31 (%50)	15 (%24,19)	
M	0	22 (%24,44)	50 (%55,56)	18 (%20)	0,66
	1	5 (%27,78)	8 (%44,44)	5 (%27,78)	
İNTRATÜMÖRAL LENFOSİTİK YANIT	0	20 (%31,25)	29 (%45,31)	15 (%23,44)	0,08
	1	7 (%15,91)	29 (%65,91)	8 (%18,18)	
PERİTÜMÖRAL CROHN BENZERİ LENFOSİTİK YANIT	0	17 (%26,56)	32 (%50)	15 (%23,44)	0,64
	1	10 (%22,73)	26 (%59,09)	8 (%18,18)	
VASKÜLER İNVAZYON	0	15 (%29,41)	26 (%50,98)	10 (%19,61)	0,60
	1	12 (%21,05)	32 (%56,14)	13 (%22,81)	
LENFATİK İNVAZYON	0	13 (%28,89)	22 (%48,89)	10 (%22,22)	0,66
	1	14 (%22,22)	36 (%57,14)	13 (%20,63)	
PERİNÖRAL İNVAZYON	0	20 (%25,64)	42 (%53,85)	16 (%20,51)	0,94
	1	7 (%23,33)	16 (%53,33)	7 (%23,33)	

*:Chi-Kare test

Tablo – 12 C1236T polimorfizminin yaş, cinsiyet ve tümöral özelliklere göre dağılımı

C1236T		Homozygous T/T	Heterozygous T/C	Homozygous C/C	p*
Yaş	<=50	4 (%30,77)	5 (%38,46)	4 (%30,77)	0,49
	>50	22 (%23,16)	51 (%53,68)	22 (%23,16)	
Cinsiyet	Erkek	15 (%23,08)	32 (%49,23)	18 (%27,69)	0,56
	Kadın	11 (%25,58)	24 (%55,81)	8 (%18,6)	
GRADE	1	20 (%24,69)	41 (%50,62)	20 (%24,69)	0,49
	2	4 (%20)	13 (%65)	3 (%15)	
T	1	2 (%22,22)	5 (%55,56)	2 (%22,22)	0,97
	2	24 (%24,24)	51 (%51,52)	24 (%24,24)	
N	0	11 (%24,44)	24 (%53,33)	10 (%22,22)	0,93
	1	15 (%23,81)	32 (%50,79)	16 (%25,4)	
M	0	21 (%23,33)	49 (%54,44)	20 (%22,22)	0,45
	1	5 (%27,78)	7 (%38,89)	6 (%33,33)	
İNTRATÜMÖRAL LENFOSİTİK YANIT	0	19 (%29,23)	31 (%47,69)	15 (%23,08)	0,30
	1	7 (%16,28)	25 (%58,14)	11 (%25,58)	
PERİTÜMÖRAL CROHN BENZERİ LENFOSİTİK YANIT	0	16 (%24,62)	33 (%50,77)	16 (%24,62)	0,96
	1	10 (%23,26)	23 (%53,49)	10 (%23,26)	
VASKÜLER İNVAZYON	0	14 (%28)	23 (%46)	13 (%26)	0,51
	1	12 (%20,69)	33 (%56,9)	13 (%22,41)	
LENFATİK İNVAZYON	0	11 (%25)	21 (%47,73)	12 (%27,27)	0,75
	1	15 (%23,44)	35 (%54,69)	14 (%21,88)	
PERİNÖRAL İNVAZYON	0	18 (%23,08)	42 (%53,85)	18 (%23,08)	0,80
	1	8 (%26,67)	14 (%46,67)	8 (%26,67)	

*:Chi-Kare test

Polimorfizmler için 20 farklı haplotip belirlendi. Bu haplotiplerin çalışma ve kontrol gruplarındaki sıklığı karşılaştırıldı, ancak herhangi bir haplotip için çalışma grubunda daha sık görülmesine yönelik istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmadı (Tablo 13). Daha sonra haplotiplerin tümöral ve sağlıklı dokudaki P-gp ekspresyon dağılımları karşılaştırıldı (Tablo 14). Bu karşılaştırmada 3435TT-1236TT ve 3435TT-2677TT-1236TT haplotiplerinde tümöral doku P-gp ekspresyonunun düşük olduğu saptandı ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Haplotiplerin tümöral özellikler ile ilişkileri de tablo 15,16 ve 17’de özetlenmiş olup, haplotipler ile tümörün grade, T, N, M, intratümöral lenfositik yanıt, peritümöral crohn benzeri lenfositik yanıt, vasküler, lenfatik ve perinöral invazyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo – 13 Haplotiplerin çalışma ve kontrol gruplarında dağılımları

	Hasta		Kontrol		p*	Odds Ratio	95% CI	
							Düşük	Yüksek
Diğer	87	80,6%	103	86,6%	0,22	1,55	0,76	3,16
3435TT-2677TT	21	19,4%	16	13,4%				
Diğer	107	99,1%	116	97,5%	0,62	0,36	0,04	3,53
3435TT-2677GG	1	,9%	3	2,5%				
Diğer	108	100,0%	117	98,3%	0,49			
3435CC-2677TT	0	0,0%	2	1,7%				
Diğer	89	82,4%	91	76,5%	0,27	0,69	0,36	1,33
3435CC-2677GG	19	17,6%	28	23,5%				
Diğer	89	82,4%	103	86,6%	0,38	1,37	0,67	2,83
3435TT-1236TT	19	17,6%	16	13,4%				
Diğer	107	99,1%	118	99,2%	0,94	1,10	0,07	17,85
3435TT-1236CC	1	,9%	1	,8%				
Diğer	107	99,1%	118	99,2%	0,94	1,10	0,07	17,85
3435CC-1236TT	1	,9%	1	,8%				
Diğer	92	85,2%	98	82,4%	0,56	0,81	0,40	1,65
3435CC-1236CC	16	14,8%	21	17,6%				
Diğer	87	79,8%	99	83,2%	0,51	1,25	0,64	2,45
2677TT-1236TT	22	20,2%	20	16,8%				
Diğer	109	100,0%	119	100,0%	-	.		
2677TT-1236CC								
Diğer	109	100,0%	117	98,3%	0,49			
2677GG-1236TT	0	0,0%	2	1,7%				
Diğer	83	76,1%	88	73,9%	0,7	0,89	0,49	1,62
2677GG-1236CC	26	23,9%	31	26,1%				
Diğer	89	82,4%	105	88,2%	0,21	1,60	0,76	3,38
3435TT-2677TT-1236TT	19	17,6%	14	11,8%				
Diğer	108	100,0%	119	100,0%	-	.		
3435TT-2677TT-1236CC								
Diğer	108	100,0%	117	98,3%	0,49			
3435TT-2677GG-1236TT	0	0,0%	2	1,7%				
Diğer	107	99,1%	118	99,2%	0,95	1,10	0,07	17,85
3435TT-2677GG-1236CC	1	,9%	1	,8%				
Diğer	108	100,0%	118	99,2%	0,95			
3435CC-2677TT-1236TT	0	0,0%	1	,8%				
Diğer	108	100,0%	119	100,0%	-			
3435CC-2677TT-1236CC								
Diğer	108	100,0%	119	100,0%	-			
3435CC-2677GG-1236TT								
Diğer	92	85,2%	98	82,4%	0,56	0,81	0,40	1,65
3435CC-2677GG-1236CC	16	14,8%	21	17,6%				

*:Chi kare test, Fisher's Exact test

Tablo – 14 Haplotiplerin tümöral ve sağlıklı dokudaki P-gp ekspresyonları

	tümöral doku p-gp ekspresyonu	p	sağlıklı doku p-gp ekspresyonu	p
Diğer	24,43±207,45	0,13	25,54±105,45	0,51
3435TT-2677TT	0,67±1,26		8,57±12,72	
Diğer	20,19±187,98	0,44	23,48±98,9	0,56
3435TT-2677GG	0,06±0		4,7±0	
Diğer	19,98±187		23,29±98,41	
3435CC-2677TT	0±0		0±0	
Diğer	24,23±207,47	0,38	16,82±75,17	0,71
3435CC-2677GG	1,55±2,74		42,19±147,27	
Diğer	24,18±206,13	0,049*	25,22±104,87	0,21
3435TT-1236TT	0,43±0,75		9,48±12,92	
Diğer	20,19±187,98	0,56	23,29±98,41	
3435TT-1236CC	0,06±0		0±0	
Diğer	20,19±187,98	0,71	23,29±98,41	
3435CC-1236TT	0,11±0		0±0	
Diğer	23,34±203,59	0,26	15,9±72,78	0,65
3435CC-1236CC	1,81±2,95		52,14±163,93	
Diğer	24,79±208,79	0,09	26,37±107,3	0,3
2677TT-1236TT	0,45±0,7		7,53±11,64	
Diğer	19,77±186,03		23,29±98,41	
2677TT-1236CC	0±0		0±0	
Diğer	19,77±186,03		23,48±98,9	
2677GG-1236TT	0±0		4,7±0	
Diğer	0,68±1,15	0,051	7,37±24,14	0,081
2677GG-1236CC	81,2±381,89		63,1±176,06	
Diğer	24,18±206,13	0,049*	24,99±104,28	0,081
3435TT-2677TT-1236TT	0,43±0,75		9,91±13,46	
Diğer	19,98±187		23,29±98,41	
3435TT-2677TT-1236CC	0±0		0±0	
Diğer	19,98±187		23,48±98,9	0,56
3435TT-2677GG-1236TT	0±0		4,7±0	
Diğer	20,19±187,98	0,44	23,29±98,41	
3435TT-2677GG-1236CC	0,06±0		0±0	
Diğer	19,98±187		23,29±98,41	
3435CC-2677TT-1236TT	0±0		0±0	
Diğer	19,98±187		23,29±98,41	
3435CC-2677TT-1236CC	0±0		0±0	
Diğer	19,98±187		23,29±98,41	
3435CC-2677GG-1236TT	0±0		0±0	
Diğer	23,34±203,59	0,26	15,9±72,78	0,65
3435CC-2677GG-1236CC	1,81±2,95		52,14±163,93	

*:İstatistiksel olarak anlamlı. Mann Whitney u test

Tablo – 15 Haplotiplerin Grade, T, N, M ile ilişkileri

	GRADE			T			N			M		
	1	2	P**	1	2	P**	0	1	P	0	1	P**
Diğer	65/81	16/76	0,61	8/89	79/80	0,51	38/83	49/79	0,64	74/82	13/72	0,33
3435TT-2677TT	15/19	5/24		1/11	20/20		8/17	13/21		16/18	5/28	
Diğer	79/99	21/100	0,79	8/89	99/100	0,08	45/98	62/100	0,43	89/99	18/100	0,99
3435TT-2677GG	1/1	00/0		1/11	00/0		1/2	00/0		1/1	00/0	
Diğer	80/100	21/100		9/100	99/100		46/100	62/100		90/100	18/100	
3435CC-2677TT	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0		0/0		
Diğer	66/83	18/86	0,51	7/78	82/83	0,65	39/85	50/81	0,58	76/84	13/72	0,21
3435CC-2677GG	14/18	3/14		2/22	17/17		7/15	12/19		14/16	5/28	
Diğer	66/83	17/81	0,87	8/89	81/82	0,6	39/85	50/81	0,58	76/84	13/72	0,21
3435TT-1236TT	14/18	4/19		1/11	18/18		7/15	12/19		14/16	5/28	
Diğer	79/99	21/100	0,79	8/89	99/100	0,08	45/98	62/100	0,43	89/99	18/100	0,99
3435TT-1236CC	1/1	00/0		1/11	00/0		1/2	00/0		1/1	00/0	
Diğer	80/100	21/100		9/100	98/99	0,99	46/100	61/98	0,99	89/99	18/100	0,99
3435CC-1236TT	00/0	00/0		00/0	1/1		00/0	1/2		1/1	00/0	
Diğer	69/86	18/86	0,95	8/89	84/85	0,75	40/87	52/84	0,79	78/87	14/78	0,33
3435CC-1236CC	11/14	3/14		1/11	15/15		6/13	10/16		12/13	4/22	
Diğer	64/79	17/81	0,85	7/78	80/80	0,87	36/78	51/81	0,73	74/81	13/72	0,38
2677TT-1236TT	17/21	4/19		2/22	20/20		10/22	12/19		17/19	5/28	
Diğer	81/100	21/100		9/100	100/100		46/100	63/100		91/100	18/100	
2677TT-1236CC	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0		0/0		
Diğer	81/100	21/100		9/100	100/100		46/100	63/100		91/100	18/100	
2677GG-1236TT	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0		0/0		
Diğer	61/75	18/86	0,39	7/78	76/76	0,91	36/78	47/75	0,66	71/78	12/67	0,3
2677GG-1236CC	20/25	3/14		2/22	24/24		10/22	16/25		20/22	6/33	
Diğer	66/83	17/81	0,87	8/89	81/82	0,59	39/85	50/81	0,57	76/84	13/72	0,21
3435TT-2677TT-1236TT	14/18	4/19		1/11	18/18		7/15	12/19		14/16	5/28	
Diğer	80/100	21/100		9/100	99/100		46/100	62/100		90/100	18/100	
3435TT-2677TT-1236CC	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0		0/0		
Diğer	80/100	21/100		9/100	99/100		46/100	62/100		90/100	18/100	
3435TT-2677GG-1236TT	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0		0/0		
Diğer	79/99	21/100	0,99	8/89	99/100	0,08	45/98	62/100	0,43	89/99	18/100	0,99
3435TT-2677GG-1236CC	1/1	00/0		1/11	00/0		1/2	00/0		1/1	00/0	
Diğer	80/100	21/100		9/100	99/100		46/100	62/100		90/100	18/100	
3435CC-2677TT-1236TT	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0		0/0		
Diğer	80/100	21/100		9/100	99/100		46/100	62/100		90/100	18/100	
3435CC-2677TT-1236CC	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0		0/0		
Diğer	80/100	21/100		9/100	99/100		46/100	62/100		90/100	18/100	
3435CC-2677GG-1236TT	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0		0/0		
Diğer	69/86	18/86	0,95	8/89	84/85	0,74	40/87	52/84	0,66	78/87	14/78	0,33
3435CC-2677GG-1236CC	11/14	3/14		1/11	15/15		6/13	10/16		12/13	4/22	

Chi kare test, Fisher's Exact test

Tablo – 16 Haplotiplerin intratümöral ve peritümöral crohn benzeri lenfositik yanıt ile ilişkileri

	İnatatümöral Lenfositik Yanıt			Peritümöral Crohn Benzeri Lenfositik Yanıt		
	0	1	p**	0	1	p**
Diğer	49/77	38/86	0,21	52/81	35/80	0,83
3435TT-2677TT	15/23	6/14		12/19	9/20	
Diğer	63/98	44/100	0,99	63/98	44/100	0,99
3435TT-2677GG	1/2	00/0		1/2	00/0	
Diğer	64/100	44/100		64/100	44/100	
3435CC-2677TT	0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	51/80	38/86	0,37	52/81	37/84	0,7
3435CC-2677GG	13/20	6/14		12/19	7/16	
Diğer	50/78	39/89	0,16	53/83	36/82	0,89
3435TT-1236TT	14/22	5/11		11/17	8/18	
Diğer	63/98	44/100	0,99	63/98	44/100	0,99
3435TT-1236CC	1/2	00/0		1/2	00/0	
Diğer	63/98	44/100	0,99	63/98	44/100	0,99
3435CC-1236TT	1/2	00/0		1/2	00/0	
Diğer	54/84	38/86	0,77	54/84	38/86	0,78
3435CC-1236CC	10/16	6/14		10/16	6/14	
Diğer	48/74	39/89	0,059	52/80	35/80	0,95
2677TT-1236TT	17/26	5/11		13/20	9/20	
Diğer	65/100	44/100		65/100	44/100	
2677TT-1236CC	0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	65/100	44/100		65/100	44/100	
2677GG-1236TT	0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	50/77	33/75	0,82	49/75	34/77	0,82
2677GG-1236CC	15/23	11/25		16/25	10/23	
Diğer	50/78	39/89	0,16	53/83	36/82	0,89
3435TT-2677TT-1236TT	14/22	5/11		11/17	8/18	
Diğer	64/100	44/100		64/100	44/100	
3435TT-2677TT-1236CC	0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	64/100	44/100		64/100	44/100	
3435TT-2677GG-1236TT	0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	63/98	44/100	0,99	63/98	44/100	0,99
3435TT-2677GG-1236CC	1/2	00/0		1/2	00/0	
Diğer	64/100	44/100		64/100	44/100	
3435CC-2677TT-1236TT	0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	64/100	44/100		64/100	44/100	
3435CC-2677TT-1236CC	0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	64/100	44/100		64/100	44/100	
3435CC-2677GG-1236TT	0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	54/84	38/86	0,78	54/84	38/86	0,78
3435CC-2677GG-1236CC	10/16	6/14		10/16	6/14	

*:Chi kare test, Fisher's Exact test

Tablo – 17 Haplotiplerin vasküler, lenfatik ve perinöral invazyon ile ilişkileri

	Vasküler İnvazyon			Lenfatik İnvazyon			Perinöral İnvazyon		
	0	1	p*	0	1	p	0	1	p*
Diğer	39/76	48/84	0,31	35/78	52/83	0,54	62/79	25/83	0,54
3435TT-2677TT	12/24	9/16		10/22	11/17		16/21	5/17	
Diğer	50/98	57/100	0,47	44/98	63/100	0,41	77/99	30/100	0,42
3435TT-2677GG	1/2	00/0		1/2	00/0		1/1	00/0	
Diğer	51/100	57/100		45/100	63/100		78/100	30/100	
3435CC-2677TT	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	42/82	47/82	0,99	36/80	53/84	0,58	64/82	25/83	0,58
3435CC-2677GG	9/18	10/18		9/20	10/16		14/18	5/17	
Diğer	40/78	49/86	0,31	36/80	53/84	0,58	64/82	25/83	0,58
3435TT-1236TT	11/22	8/14		9/20	10/16		14/18	5/17	
Diğer	50/98	57/100	0,47	44/98	63/100	0,42	77/99	30/100	0,42
3435TT-1236CC	1/2	00/0		1/2	00/0		1/1	00/0	
Diğer	51/100	56/98	0,99	45/100	62/98	0,99	78/100	29/97	0,99
3435CC-1236TT	00/0	1/2		00/0	1/2		00/0	1/3	
Diğer	44/86	48/84	0,76	38/84	54/86	0,85	67/86	25/83	0,85
3435CC-1236CC	7/14	9/16		7/16	9/14		11/14	5/17	
Diğer	37/73	50/86	0,07	34/76	53/83	0,35	61/78	26/84	0,35
2677TT-1236TT	14/27	8/14		11/24	11/17		17/22	5/16	
Diğer	51/100	58/100		45/100	64/100		78/100	31/100	
2677TT-1236CC	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	51/100	58/100		45/100	64/100		78/100	31/100	
2677GG-1236TT	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	38/75	45/78	0,71	33/73	50/78	0,56	60/77	23/74	0,56
2677GG-1236CC	13/25	13/22		12/27	14/22		18/23	8/26	
Diğer	40/78	49/86	0,31	36/80	53/84	0,58	64/82	25/83	0,58
3435TT-2677TT-1236TT	11/22	8/14		9/20	10/16		14/18	5/17	
Diğer	51/100	57/100		45/100	63/100		78/100	30/100	
3435TT-2677TT-1236CC	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	51/100	57/100		45/100	63/100		78/100	30/100	
3435TT-2677GG-1236TT	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	50/98	57/100	0,47	44/98	63/100	0,42	77/99	30/100	0,42
3435TT-2677GG-1236CC	1/2	00/0		1/2	00/0		1/1	00/0	
Diğer	51/100	57/100		45/100	63/100		78/100	30/100	
3435CC-2677TT-1236TT	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	51/100	57/100		45/100	63/100		78/100	30/100	
3435CC-2677TT-1236CC	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	51/100	57/100		45/100	63/100		78/100	30/100	
3435CC-2677GG-1236TT	0/0	0/0		0/0	0/0		0/0	0/0	
Diğer	44/86	48/84	0,76	38/84	54/86	0,85	67/86	25/83	0,85
3435CC-2677GG-1236CC	7/14	9/16		7/16	9/14		11/14	5/17	

*:Chi kare test, Fisher's Exact test

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Genetik ve translasyonel araştırmalar, karsinogenezis evrelerinde gelişen hücre içi olayların anlaşılmasını sağlayan ve bu olayların sonuçlarının kanser hastalarının klinik yönetimine yansımalarını temel alan çalışmalarlardır. Nitekim bu araştırmaların sonuçları günümüzde kolorektal kanserlerde kişiselleştirilmiş tedaviler olarak yerlerini bulmaya başlamışlardır. Kolorektal kanser tedavisinde kliniğe yansıyan moleküller, tedaviye yol gösterici olarak mutasyonu saptanan *KRAS* onkojeni ile tedavi amaçlı kullanılan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor - EGFR), Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF) ve tirozin kinaz inhibitörlerine (Tyrosine Kinase Inhibitors - TKI) karşı geliştirilen antikorlardır [135-137].

Genetik ve translasyonel araştırmaların sonuçları sadece tedavi ile sınırlı değildir. Benzer çalışmaların kolorektal karsinogenezis, kolorektal kanser riski, tanısı, prognozu, tedavisi ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde klinik önemi olduğu ve yakın gelecekte kolorektal kanserli hasta yönetiminde kararlarımızı etkileyeceği düşünülmektedir.

Çok ilaca direnç (MDR) geninin görevi hücre ve dokuları bakterilerin, toksinlerin ve ksenobiyotiklerin zararlı etkilerinden korumaktır. Bir MDR1 gen ürünü olan P-gp ise transmembran yerleşimli, enerji bağımlı bir efluks pompasıdır ve in vitro / in-vivo çalışmalarda bir çok ilacın ADME (absorpsiyon, distribüsyon, metabolizma ve ekskresyon) süreçlerinde rol oynadığı, insanda ilaç-ilaç etkileşimine dahil olduğu gösterilmiştir[75]. Bu nedenle de son yıllarda MDR1/P-gp konulu makalelerin sayısı giderek artmaktadır[76-78].

Günümüzde P-gp'nin intestinal homeostazisin korunmasında önemli bir etken olduğu kabul edilmektedir.

MDR1 geni baskılanmış farelerde antibiyotikle önlenebilen bir tür kolit

geliştiđi gözlemlenmiřtir. Bu deneysel çalıřma bakteri ya da diđer toksinler için P-gp'nin bariyer fonksiyonu sađladıđı dūřüncesini desteklemektedir [138, 139]. Őlseratif kolitin kanser için predispozan olduđu bilinen bir gerçektir. Bir çok biyolojik bariyerdeki koruyucu rolü gibi, P-gp'nin intestinal epiteldeki kanserojenlerin de temizlenmesinde etkin olduđu ve eksikliđinin inflamasyonla iliřkili kolorektal kanser için risk teřkil ettiđi dūřünölmektedir.

Bir çok farmakogenetik ve farmakogenomik alışma, MDR1 genindeki bazı SNPlerin bireyler ve ırklar arası P-gp ekspresyon ve fonksiyon farklılıklarıyla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [15, 80, 81]. Erken başlangıçlı Parkinson hastalığında 3435TT genotipinin baskınlığı tespit edilmiş [140] ve çocukluk ağı akut lenfoblastik lösemisi [18, 127] ve renal epitelyal tümörler [128] de MDR1 polimorfizmleriyle ilişkilendirilmiştir. Schwab ve arkadaşlarının alışması MDR1 3435TT genotipli bireylerde Őlseratif kolit gelişim riskini 2 kat fazla olarak tespit etmiştir.

Bir çok araştırmacı sağlam kolon mukozasına kıyasla tümöral dokuda MDR1 gen ekspresyonunun azalmış olduğunu bildirmiştir [141-143]. Andersen ve arkadaşlarının kolorektal kanser ve adenomlu hastalarla yaptığı çalışmada, aynı bireyin kanser ya da adenom dokusundan alınan örnekle, sağlam dokusundan alınan örnek kıyaslanmış ve hastalıklı dokuda ABCB1 mRNA seviyesinin yaklaşık yarısı kadar dūřük olduğu görölmüştür [144]. Benzer şekilde kolorektal kanserde ve renal cell Ca'da tümör dokusunda ABCB1 mRNA düzeyleri normal dokuya göre dūřük olarak tespit edilmiştir [145, 146].

Adenomlarda mRNA seviyesinin dūřük olması, ABCB1 aktivitesinin dūřük olduđunu ve iliřkili proteinin substratı olan çeřitli karsinojenlere maruziyetin arttıđını dūřündürmektedir. Biz de çalıřmamızda sađlıklı dokudakine kıyasla tümöral dokudaki ekspresyonu dūřük olarak bulduk ($p < 0,00001$).

Ancak Samanian ve arkadaşları, genotipten bağımsız olarak tümöral dokuda normal dokuya göre artmış ekspresyon tespit etmiştir [147]. Bu sonuç

kendilerinden önceki başka çalışmalarla da uyumludur[141-143].

P-gp doku ekspresyonunun kanserin davranış biçimine olan etkisi de bazı çalışmalarda değerlendirilmiştir. Prognozun da takip edildiği bir çalışmada tümöral dokuda P-gp ekspresyonu düşük bulunmuştur ve iyi diferansiye tümörlerde ekspresyon düzeyinin belirgin olarak yüksek olduğu da tespit edilmiştir[19]. Potocnik ve arkadaşlarının çalışması da önceki çalışmayı desteklemektedir [148].

Kanserin prognozunu belirleyen kriterler göz önüne alındığında Weinstein ve arkadaşlarının çalışması P-gp ekspresyonu arttıkça lenf nodu tutulumunda ve damar invazyonunda artış tespit etmiştir[149]. Benzer bir çalışma da P-gp ile lenf nodu metastaz varlığı, damar ve perinöral invazyon arasında pozitif bir korelasyon bulmuştur[150]. Bu iki çalışma P-gp ekspresyonu ile agresif tümör davranışı arasında ilişki kurmaktadır. Weinstein P-gp'yi tümör agresifliğinin sebebi olmak yerine bir belirteç (marker) olarak değerlendirmeyi önermektedir. Bizim çalışmamızda ekspresyonla tümör agresifliği arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir.

MDR1 geni üzerindeki SNPlerin ekspresyonu nasıl değiştirdiğine yönelik çeşitli teoriler öne sürülmüştür. Öncelikle en popüler teori herhangi bir SNP ile MDR1 geni içindeki promotor/enhancer ya da intronik veya ekzonik başka bir mutasyon arasında bir bağlantı olmasıdır [113, 116]. İkinci teoride ise sessiz bir mutasyonun translasyon etkinliğini azaltarak fonksiyonel sonuçları etkileyebileceği düşünülmektedir [112]. Üçüncü teori de sessiz mutasyonun, mRNA'nın işlenmesi ve translasyonunu azaltabileceği ya da regüle edebileceğini öne sürmektedir [117, 118]. Sonuncu olarak da SNP'nin posttranskripsiyonel modifikasyonu etkilemesi muhtemeldir [121]. Ancak bu olasılıkların her biri teoridir ve aydınlatılması için yeni çalışmalar yapılması gerekir.

SNP'ler ve ekspresyon üstüne etkileri ile ilgili araştırmalardan Hoffmeyer ve arkadaşlarının çalışması C3435T polimorfizminde homozigos CC örneklerinde, homozigos TT örneklere göre, barsaklarda iki kat fazla

ekspresyon olduğunu tespit etmiştir[15]. Benzer başka bir çalışmada duodenal enterositlerden elde edilen materyalde, MDR1 mRNA ekspresyonunun 3435TT bireylerde CT ya da CC bireylere göre yüksek olduğu tespit edilmiştir [151]. Bir başka çalışmadaysa C3435T ve C1236T polimorfizmleriyle MDR1 gen ekspresyon düzeyi arasında ilişki bulunmamıştır. Ancak G2677T/A polimorfizmi incelendiğinde GG2677 genotipinin en yüksek ve AT2677 genotipinin en düşük MDR1 ekspresyon düzeyiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [147]. Kurzawski ve arkadaşlarının 184 kolorektal kanser hastasıyla yapılan çalışmasında 3435 TT genotipli bireylerde MDR1 ekspresyonu düşük bulunmuştur. Çalışmamızda C3435T, C1236T ve G2677T/A genotiplerinin MDR1 ekspresyonunu değiştirmedini gördük.

Balcerczak ve arkadaşlarının çalışmasında [13] MDR1 geni üstünde bulunan üç SNP'nin (C1236T, G2677T/A, C3435T) bir haploblokta lokalize olduğu tespit edilmiştir. Aynı haplotip yapısı farklı yazarlar tarafından da kullanılmıştır [152]. Bireyler arası ve ırklar arası farklar araştırılırken haplotiplerin genotiplere göre daha faydalı bilgiler sağladığı düşünülmektedir [153]. Buna rağmen literatürde haplotiplerin değerlendirildiği çalışma sayısı kısıtlıdır.

Genotiplerle ekspresyon arasında ilişki bulunmayan çalışmamızda 3435TT-1236TT ve 3435TT-2677TT-1236TT haplotiplerinde tümöral doku P-gp ekspresyonunun düşük olduğu saptandı ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (tablo-15).

İnsanlarda MDR1 polimorfizmlerinin kolorektal kanserle olan ilişkisi bazı çalışmalarda anlamlı bulunurken bazı çalışmalarda fark görülmemiştir. MDR1 intron 3 C-rs3789243-T polimorfizmi, prospektif, popülasyon tabanlı bir çalışmada CRC riski ile ilişkili bulunmuştur [154]. Benzer şekilde vaka-kontrol çalışmalarından düzenlenen bir meta analizde C3435T ve G2677T/A birlikteliği incelendiğinde CRC riskinde artış tespit edilmiştir [155]. Benzer bir çalışmadaysa C3435T ve G2677T/A polimorfizmleri ile kolon kanseri sıklığı

arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır [19]. Bir başka çalışmada ise 50 yaş altı bireylerde C3435T polimorfizminde T alleli varlığı kanser ile ilişkili bulunurken çalışma genelinde anlamlı fark saptanmamıştır [20].

Khedri ve arkadaşlarının çalışması ise CC3435 genotipinin kolorektal kansere karşı koruyucu bir faktör olduğunu ileri sürmektedir [156]. Gaikovitch CC3435 genotipli bireylerde T aleli taşıyıcılarına göre kolorektal kanser gelişme riskinin 1,65 kat arttığını tespit etmiştir. Aynı çalışmada T2677 alelinin ise G2677 aleline göre kolorektal kanser gelişme riskini düşürdüğü görülmüştür [157].

Yaptığımız çalışmada SNP genotipleri ile kolon kanseri sıklığında anlamlı ilişki bulunmadı ancak lojistik regresyon analizinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan farklar görüldü. G2677T/A polimorfizminde GG genotipi olmasının T aleli taşıyanlara göre 1,182 kat arttırıcı risk faktörü olduğu tespit edildi. Aynı şekilde C3435T polimorfizminde CC genotipi olmasının T aleli taşıyanlara göre 1,241 kat arttırıcı risk faktörü olduğu görüldü.

Haplotipler tek tek kıyaslandığında kanser sıklığında anlamlı fark görülmedi.

MDR1 polimorfizmleriyle kolon kanserinde tümör agresifliğini kıyaslayan çok sayıda çalışma yoktur. Yapılan çalışmalarda genel olarak anlamlı sonuç elde edilmemiştir. Samanian ve arkadaşlarının tümör evresi, histolojik grade, lenf nodu metastazı ve tümör boyutunu değerlendirdiği çalışmasında GG2677 genotipinin iyi diferansiye tümörlerde, kötü diferansiye tümörlere göre daha sık görüldüğü tespit edilmiştir.

Balcerezak ve arkadaşlarının 95 hastayla yaptığı MDR1 gen polimorfizmiyle kolorektal kanser prognostik faktörlerini kıyasladığı çalışmasında T1/T2 tümörlerde T1236 aleli, T3/T4 tümörlere göre daha yüksek frekansta tespit edilmiştir. Lenf nodu ile SNP değerlendirilmesi yapıldığında C3435T 'de C alelinin N1/N2 grubunda N0 grubuna göre daha sık olduğu gözlemlenmiştir. Klinik evrelemeyle genotipler arasında ilişki

bulunmazken haplotipler değerlendirildiğinde, evre 1 ve 2'de T1236 alelini taşıyan haplotiplerin görölme sıklığı evre 3 ve 4'e göre daha fazla bulunmuştur. Yazarların bu çalışma sonucundaki yorumu T1236 alelini taşıyan hastaların, taşımayanlara göre sağkalım şansının daha yüksek olduğu yönündedir. Bu durumda T1236 alelinin koruyucu fonksiyonundan bahsedilmektedir [14]. Çalışmamızda genotiplerle ve haplotiplerle tümör agresifliği arasında ilişki bulunmadı.

Sonuç olarak sağlıklı dokuya göre tümöral dokudaki ekspresyonu düşük bulduk. Bu durum genotiplerden bağımsızken, 3435TT-1236TT ve 3435TT-2677TT-1236TT haplotiplerinin tümöral doku P-gp ekspresyonunu düşürdüğünü görüyoruz. Ayrıca G2677T/A polimorfizminde GG genotipi olmasının T aleli taşıyanlara göre, C3435T polimorfizminde de CC genotipi olmasının T aleli taşıyanlara göre kolon kanseri için arttırıcı risk faktörü olduğu görüldü. Bu iki polimorfizmde T alelinin kolon kanseri için koruyucu etkisi olduğu öne sürülebilir ancak net bilgilere ulaşmak için gelecek dönem çalışmalarıyla sonuçlarımızın desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇLARIN ÖZETİ

Hasta grubunda, tümöral dokudaki MDR1 gen ekspresyonu sağlıklı dokuya kıyasla düşük bulundu.

MDR1 gen ekspresyonu ile tümör agresifliği kıyaslandığında anlamlı fark görülmedi.

C3435T, C1236T ve G2677T/A polimorfizmleri ile MDR1 ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi.

Genotiplerle ekspresyon arasında ilişki bulunmadı ancak 3435TT-1236TT ve 3435TT-2677TT-1236TT haplotiplerinde tümöral doku P-gp ekspresyonunun düşük olduğu saptandı.

Genotipler ve haplotipler kolon kanseri sıklığı ile kıyaslandığında anlamlı fark görülmedi ancak lojistik regresyon analizinde G2677T/A polimorfizminde GG genotipi olmasının T aleli taşıyanlara göre 1,182 kat ve C3435T polimorfizminde CC genotipi olmasının T aleli taşıyanlara göre 1,241 kat arttırıcı risk faktörü olduğu görüldü.

Genotipler ve haplotiplerle tümör agresifliği arasında anlamlı ilişki bulunmadı.

7. KAYNAKLAR

1. Ferlay, J., D.M. Parkin, and E. Steliarova-Foucher, *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008*. Eur J Cancer, 2010. **46**(4): p. 765-81.
2. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
3. de la Chapelle, A., *Genetic predisposition to colorectal cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(10): p. 769-80.
4. Huxley, R.R., et al., *The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence*. Int J Cancer, 2009. **125**(1): p. 171-80.
5. Santarelli, R.L., F. Pierre, and D.E. Corpet, *Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence*. Nutr Cancer, 2008. **60**(2): p. 131-44.
6. Higgins, C.F., *ABC transporters: from microorganisms to man*. Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 67-113.
7. Greiner, B., et al., *The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin*. J Clin Invest, 1999. **104**(2): p. 147-53.
8. Thiebaut, F., et al., *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7735-8.
9. Dietrich, C.G., A. Geier, and R.P. Oude Elferink, *ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut*. Gut, 2003. **52**(12): p. 1788-95.
10. Mickley, L.A., et al., *Genetic polymorphism in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors*. Blood, 1998. **91**(5): p. 1749-56.
11. Campa, D., et al., *A gene-wide investigation on polymorphisms in the ABCG2/BRCP transporter and susceptibility to colorectal cancer*. Mutat Res, 2008. **645**(1-2): p. 56-60.
12. Campa, D., et al., *Association of ABCB1/MDR1 and OPRM1 gene polymorphisms with morphine pain relief*. Clin Pharmacol Ther, 2008. **83**(4): p. 559-66.
13. Panczyk, M., et al., *ABCB1 gene polymorphisms and haplotype analysis in colorectal cancer*. Int J Colorectal Dis, 2009. **24**(8): p. 895-905.

14. Balcerczak, E., et al., *ABCB1/MDR1 gene polymorphisms as a prognostic factor in colorectal cancer*. Int J Colorectal Dis, 2010. **25**(10): p. 1167-76.
15. Hoffmeyer, S., et al., *Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3473-8.
16. Buda, G., et al., *Polymorphisms in the multiple drug resistance protein 1 and in P-glycoprotein 1 are associated with time to event outcomes in patients with advanced multiple myeloma treated with bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin*. Ann Hematol, 2010. **89**(11): p. 1133-40.
17. Capron, A., et al., *CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms influence tacrolimus concentrations in peripheral blood mononuclear cells after renal transplantation*. Pharmacogenomics, 2010. **11**(5): p. 703-14.
18. Jamroziak, K., et al., *Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia*. Eur J Haematol, 2004. **72**(5): p. 314-21.
19. De Iudibus, S., et al., *ABCB1 gene polymorphisms and expression of P-glycoprotein and long-term prognosis in colorectal cancer*. Anticancer Res, 2008. **28**(6b): p. 3921-8.
20. Kurzawski, M., et al., *Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in colon cancer patients*. Eur J Clin Pharmacol, 2005. **61**(5-6): p. 389-94.
21. Desch, C.E., et al., *Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline*. J Clin Oncol, 2005. **23**(33): p. 8512-9.
22. Chu, E.a.D.V., *Physicians' cancer chemotherapy drug manual*. . Jones and Bartlett publishers., 2008.
23. Sanoff, H.K., et al., *Five-year data and prognostic factor analysis of oxaliplatin and irinotecan combinations for advanced colorectal cancer: N9741*. J Clin Oncol, 2008. **26**(35): p. 5721-7.
24. Siegel, R., et al., *Cancer statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(1): p. 9-29.
25. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, K.D.B., *Türkiye'de Kanser Önleme ve Taramaları 2014 Kısa Raporu*. Kanser.gov.tr, 2014.
26. World Health Organization, I.A.f.R.o.C., *Colorectal Cancer: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. International Agency for Research on Cancer, 2014.

27. Surveillance, E., and End Results Program, *SEER Stat Fact Sheets: Colon and Rectum Cancer*. National Cancer Institute. 2015.
28. Burn, J., et al., *Effect of aspirin or resistant starch on colorectal neoplasia in the Lynch syndrome*. N Engl J Med, 2008. **359**(24): p. 2567-78.
29. Meyerhardt, J.A., et al., *Association of dietary patterns with cancer recurrence and survival in patients with stage III colon cancer*. JAMA, 2007. **298**(7): p. 754-64.
30. Aune, D., et al., *Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies*. BMJ, 2011. **343**: p. d6617.
31. Pala, V., et al., *Yogurt consumption and risk of colorectal cancer in the Italian European prospective investigation into cancer and nutrition cohort*. Int J Cancer, 2011. **129**(11): p. 2712-9.
32. Tsoi, K.K., et al., *Cigarette smoking and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2009. **7**(6): p. 682-688 e1-5.
33. Cho, E., et al., *Alcohol consumption and the risk of colon cancer by family history of colorectal cancer*. Am J Clin Nutr, 2012. **95**(2): p. 413-9.
34. Yuhara, H., et al., *Is diabetes mellitus an independent risk factor for colon cancer and rectal cancer?* Am J Gastroenterol, 2011. **106**(11): p. 1911-21; quiz 1922.
35. Jacobs, E.T., et al., *Association between body mass index and colorectal neoplasia at follow-up colonoscopy: a pooling study*. Am J Epidemiol, 2009. **169**(6): p. 657-66.
36. Morikawa, T., et al., *Prospective analysis of body mass index, physical activity, and colorectal cancer risk associated with beta-catenin (CTNNB1) status*. Cancer Res, 2013. **73**(5): p. 1600-10.
37. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Engl J Med, 1988. **319**(9): p. 525-32.
38. Rex, D.K., et al., *American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 [corrected]*. Am J Gastroenterol, 2009. **104**(3): p. 739-50.
39. N, M., *Test all colorectal cancers for Lynch syndrome*. NCCN: Medscape Medical News. . 2014.
40. Umar, A., et al., *Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(4): p. 261-8.

41. [Guideline] American Society for Clinical Pathology, t.C.o.A.P., the Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology, *Guideline on the Evaluation of Molecular Markers for Colorectal Cancer Expert Panel Draft Recommendations*. 2015.
42. R., N., *New guidelines on colorectal cancer molecular testing*. . Medscape Medical News, 2015.
43. Greene FL, P.D., Fleming ID, et al. , *Cancer staging manual*. 6th ed. . Springer, 2002.
44. Ogino, S., et al., *18q loss of heterozygosity in microsatellite stable colorectal cancer is correlated with CpG island methylator phenotype-negative (CIMP-0) and inversely with CIMP-low and CIMP-high*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 72.
45. Jimeno, A., et al., *KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection*. J Clin Oncol, 2009. **27**(7): p. 1130-6.
46. Quasar Collaborative, G., et al., *Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study*. Lancet, 2007. **370**(9604): p. 2020-9.
47. Saltz, L.B. and D.P. Kelsen, *Adjuvant treatment of colorectal cancer*. Annu Rev Med, 1997. **48**: p. 191-202.
48. Ribic, C.M., et al., *Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer*. N Engl J Med, 2003. **349**(3): p. 247-57.
49. Mlecnik, B., et al., *Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction*. J Clin Oncol, 2011. **29**(6): p. 610-8.
50. Huguen, N., et al., *Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype*. Ann Oncol, 2014. **25**(3): p. 651-7.
51. W., B., *Histology influences colorectal cancer metastatic pattern*. . Reuters Health Information., 2014.
52. Boller, A.M. and H. Nelson, *Colon and rectal cancer: laparoscopic or open?* Clin Cancer Res, 2007. **13**(22 Pt 2): p. 6894s-6s.
53. Fleshman, J., et al., *Laparoscopic colectomy for cancer is not inferior to open surgery based on 5-year data from the COST Study Group trial*. Ann Surg, 2007. **246**(4): p. 655-62; discussion 662-4.

54. Jayne, D.G., et al., *Randomized trial of laparoscopic-assisted resection of colorectal carcinoma: 3-year results of the UK MRC CLASICC Trial Group*. J Clin Oncol, 2007. **25**(21): p. 3061-8.
55. Kuhry, E., et al., *Long-term results of laparoscopic colorectal cancer resection*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(2): p. CD003432.
56. Lacy, A.M., et al., *The long-term results of a randomized clinical trial of laparoscopy-assisted versus open surgery for colon cancer*. Ann Surg, 2008. **248**(1): p. 1-7.
57. Veldkamp, R., et al., *Laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: short-term outcomes of a randomised trial*. Lancet Oncol, 2005. **6**(7): p. 477-84.
58. Di Benedetto, F., et al., *Liver resection for colorectal metastases in older adults: a paired matched analysis*. J Am Geriatr Soc, 2011. **59**(12): p. 2282-90.
59. House, M.G., et al., *Comparison of adjuvant systemic chemotherapy with or without hepatic arterial infusional chemotherapy after hepatic resection for metastatic colorectal cancer*. Ann Surg, 2011. **254**(6): p. 851-6.
60. van Hooft, J.E., et al., *Colonic stenting versus emergency surgery for acute left-sided malignant colonic obstruction: a multicentre randomised trial*. Lancet Oncol, 2011. **12**(4): p. 344-52.
61. Goldberg, R.M., et al., *A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(1): p. 23-30.
62. Haller, D.G., et al., *Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089*. J Clin Oncol, 2005. **23**(34): p. 8671-8.
63. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
64. Benson, A.B., 3rd, et al., *American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(16): p. 3408-19.
65. Chua, T.C., et al., *Predictors of cure after hepatic resection of colorectal liver metastases: an analysis of actual 5- and 10-year survivors*. J Surg Oncol, 2011. **103**(8): p. 796-800.

66. Fong, Y., et al., *Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases*. *Ann Surg*, 1999. **230**(3): p. 309-18; discussion 318-21.
67. Katz, S.C., et al., *Regulatory T cell infiltration predicts outcome following resection of colorectal cancer liver metastases*. *Ann Surg Oncol*, 2013. **20**(3): p. 946-55.
68. Yothers, G., et al., *Outcomes among black patients with stage II and III colon cancer receiving chemotherapy: an analysis of ACCENT adjuvant trials*. *J Natl Cancer Inst*, 2011. **103**(20): p. 1498-506.
69. Campbell, P.T., et al., *Impact of body mass index on survival after colorectal cancer diagnosis: the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(1): p. 42-52.
70. Campbell, P.T., et al., *Associations of recreational physical activity and leisure time spent sitting with colorectal cancer survival*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(7): p. 876-85.
71. Rothwell, P.M., et al., *Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials*. *Lancet*, 2011. **377**(9759): p. 31-41.
72. Baillargeon, J., et al., *Effect of mental disorders on diagnosis, treatment, and survival of older adults with colon cancer*. *J Am Geriatr Soc*, 2011. **59**(7): p. 1268-73.
73. Phipps, A.I., J. Baron, and P.A. Newcomb, *Prediagnostic smoking history, alcohol consumption, and colorectal cancer survival: the Seattle Colon Cancer Family Registry*. *Cancer*, 2011. **117**(21): p. 4948-57.
74. Dehal, A.N., et al., *Impact of diabetes mellitus and insulin use on survival after colorectal cancer diagnosis: the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(1): p. 53-9.
75. Lin, J.H., *Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003. **55**(1): p. 53-81.
76. Hoffmann, U. and H.K. Kroemer, *The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance*. *Drug Metab Rev*, 2004. **36**(3-4): p. 669-701.
77. Altenberg, G.A., *Structure of multidrug-resistance proteins of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily*. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2004. **4**(1): p. 53-62.
78. Kimura, Y., et al., *ATP hydrolysis-dependent multidrug efflux transporter: MDR1/P-glycoprotein*. *Curr Drug Metab*, 2004. **5**(1): p. 1-10.

79. Juliano, R.L. and V. Ling, *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. *Biochim Biophys Acta*, 1976. **455**(1): p. 152-62.
80. Ameyaw, M.M., et al., *MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity*. *Pharmacogenetics*, 2001. **11**(3): p. 217-21.
81. Kim, R.B., et al., *Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans*. *Clin Pharmacol Ther*, 2001. **70**(2): p. 189-99.
82. Ambudkar, S.V., et al., *P-glycoprotein: from genomics to mechanism*. *Oncogene*, 2003. **22**(47): p. 7468-85.
83. Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. *Genome Res*, 2001. **11**(7): p. 1156-66.
84. Klein, I., B. Sarkadi, and A. Varadi, *An inventory of the human ABC proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1461**(2): p. 237-62.
85. Licinio J, W.M.L., *Pharmacogenomics: the search for individualized therapies*. Wiley, 2002: p. 179-213.
86. Chen, C.J., et al., *Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells*. *Cell*, 1986. **47**(3): p. 381-9.
87. Efferth, T., *The human ATP-binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside*. *Curr Mol Med*, 2001. **1**(1): p. 45-65.
88. Ho, G.T., F.M. Moodie, and J. Satsangi, *Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease?* *Gut*, 2003. **52**(5): p. 759-66.
89. Marzolini C, P.E., Buclin T, Kim RB., *Polymorphism in human MDR1 (p-glycoprotein): recent advances and clinical relevance*. *Clinical Pharmacol Therapeutic*, 2004. **75** p. 13-33.
90. Cordon-Cardo, C., et al., *Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(2): p. 695-8.
91. Klimecki, W.T., et al., *P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers*. *Blood*, 1994. **83**(9): p. 2451-8.
92. Fromm, M.F., *Genetically determined differences in P-glycoprotein function: implications for disease risk*. *Toxicology*, 2002. **181-182**: p. 299-303.

93. Tanabe, M., et al., *Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **297**(3): p. 1137-43.
94. Leith, C.P., et al., *Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study*. Blood, 1999. **94**(3): p. 1086-99.
95. Almond, L.M., et al., *Intracellular and plasma pharmacokinetics of nevirapine in human immunodeficiency virus-infected individuals*. Clin Pharmacol Ther, 2005. **78**(2): p. 132-42.
96. van Veen, H.W. and W.N. Konings, *Multidrug transporters from bacteria to man: similarities in structure and function*. Semin Cancer Biol, 1997. **8**(3): p. 183-91.
97. Sakaeda, T., T. Nakamura, and K. Okumura, *Pharmacogenetics of drug transporters and its impact on the pharmacotherapy*. Curr Top Med Chem, 2004. **4**(13): p. 1385-98.
98. Li Yan, W.Y.-H., Yang Ling, Zhang Shu-Wei, Liu and C.-H.Y. Sheng-Li, *Comparison of steroid substrates and inhibitors of P-Glycoprotein by 3D-QSAR analysis*. J Mol Struct 2005. **733**(1-3) p. 111-118.
99. Alvarez, M., et al., *Generation of a drug resistance profile by quantitation of mdr-1/P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen*. J Clin Invest, 1995. **95**(5): p. 2205-14.
100. Ueda, K., et al., *Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(9): p. 3004-8.
101. Kioka, N., et al., *P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal P-glycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **162**(1): p. 224-31.
102. Balram, C., et al., *Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in an Asian population: phenotypic-genotypic correlates*. Br J Clin Pharmacol, 2003. **56**(1): p. 78-83.
103. Bernal, M.L., et al., *Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the MDR1 gene in a Spanish population*. Ther Drug Monit, 2003. **25**(1): p. 107-11.

104. Cascorbi, I., et al., *Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects*. Clin Pharmacol Ther, 2001. **69**(3): p. 169-74.
105. Cavaco, I., et al., *CYP3A4 and MDR1 alleles in a Portuguese population*. Clin Chem Lab Med, 2003. **41**(10): p. 1345-50.
106. Houben, G.M. and R.W. Stockbrugger, *Bacteria in the aetio-pathogenesis of gastric cancer: a review*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1995. **212**: p. 13-8.
107. Kerb, R., S. Hoffmeyer, and U. Brinkmann, *ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2*. Pharmacogenomics, 2001. **2**(1): p. 51-64.
108. Turgut, S., et al., *MDR1 C3435T polymorphism in patients with breast cancer*. Arch Med Res, 2007. **38**(5): p. 539-44.
109. Verstuyft, C., et al., *Dipyridamole enhances digoxin bioavailability via P-glycoprotein inhibition*. Clin Pharmacol Ther, 2003. **73**(1): p. 51-60.
110. Sakaeda, T., T. Nakamura, and K. Okumura, *Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs*. Pharmacogenomics, 2003. **4**(4): p. 397-410.
111. Ambudkar, S.V., et al., *Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 361-98.
112. Schwab, M., M. Eichelbaum, and M.F. Fromm, *Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003 **43** p. 285-307.
113. Anglicheau, D., et al., *Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(7): p. 1889-96.
114. Ieiri, I., H. Takane, and K. Otsubo, *The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications*. Clin Pharmacokinet, 2004. **43**(9): p. 553-76.
115. Zheng, H., et al., *The MDR1 polymorphisms at exons 21 and 26 predict steroid weaning in pediatric heart transplant patients*. Hum Immunol, 2002. **63**(9): p. 765-70.
116. Saito, K., et al., *Detection of the four sequence variations of MDR1 gene using TaqMan MGB probe based real-time PCR and haplotype analysis in healthy Japanese subjects*. Clin Biochem, 2003. **36**(7): p. 511-8.

117. Allain, F.H., et al., *Specificity of ribonucleoprotein interaction determined by RNA folding during complex formulation*. Nature, 1996. **380**(6575): p. 646-50.
118. Wang, D., et al., *Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability*. Pharmacogenet Genomics, 2005. **15**(10): p. 693-704.
119. Frittitta, L., et al., *A cluster of three single nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of human glycoprotein PC-1 gene stabilizes PC-1 mRNA and is associated with increased PC-1 protein content and insulin resistance-related abnormalities*. Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1952-5.
120. Kimchi-Sarfaty, C., et al., *A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity*. Science, 2007. **315**(5811): p. 525-8.
121. Jamroziak, K., et al., *Distribution of allelic variants of functional C3435T polymorphism of drug transporter MDR1 gene in a sample of Polish population*. Pol J Pharmacol, 2002. **54**(5): p. 495-500.
122. Schaeffeler, E., et al., *Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people*. Lancet, 2001. **358**(9279): p. 383-4.
123. Potocnik, U., et al., *Polymorphisms in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis*. Genes Immun, 2004. **5**(7): p. 530-9.
124. Lee, C.G., et al., *HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter*. Biochemistry, 1998. **37**(11): p. 3594-601.
125. Maimone, D., R. Dominici, and L.M. Grimaldi, *Pharmacogenomics of neurodegenerative diseases*. Eur J Pharmacol, 2001. **413**(1): p. 11-29.
126. Shon, J.H., et al., *Effect of itraconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of fexofenadine in relation to the MDR1 genetic polymorphism*. Clin Pharmacol Ther, 2005. **78**(2): p. 191-201.
127. Stanulla, M., et al., *GSTP1 and MDR1 genotypes and central nervous system relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Int J Hematol, 2005. **81**(1): p. 39-44.
128. Siegsmond, M., et al., *Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(7): p. 1847-54.
129. Glas, J., et al., *MDR1 gene polymorphism in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2004. **126**(1): p. 367.

130. Croucher, P.J., et al., *Lack of association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and inflammatory bowel disease in two independent Northern European populations*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(6): p. 1919-20; author reply 1920-1.
131. Brinkmann, U., I. Roots, and M. Eichelbaum, *Pharmacogenetics of the human drug-transporter gene MDR1: impact of polymorphisms on pharmacotherapy*. *Drug Discov Today*, 2001. **6**(16): p. 835-839.
132. Fromm, M.F., *The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. **54**(10): p. 1295-310.
133. Kelleher, D., R. Farrell, and R. McManus, *Pharmacogenetics of inflammatory bowel disease*. *Novartis Found Symp*, 2004. **263**: p. 41-53; discussion 53-6, 211-8.
134. Ishikawa, T., et al., *Functional evaluation of ABCB1 (P-glycoprotein) polymorphisms: high-speed screening and structure-activity relationship analyses*. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2004. **19**(1): p. 1-14.
135. Murphy, J.E. and D.P. Ryan, *American Society of Clinical Oncology 2010 colorectal update*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010. **10**(9): p. 1371-3.
136. Garufi, C., et al., *Cetuximab plus chronomodulated irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin as neoadjuvant chemotherapy in colorectal liver metastases: POCHER trial*. *Br J Cancer*, 2010. **103**(10): p. 1542-7.
137. Van Meter, M.E. and E.S. Kim, *Bevacizumab: current updates in treatment*. *Curr Opin Oncol*, 2010. **22**(6): p. 586-91.
138. Maggio-Price, L., et al., *Helicobacter bilis infection accelerates and H. hepaticus infection delays the development of colitis in multiple drug resistance-deficient (mdr1a^{-/-}) mice*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(2): p. 739-51.
139. Panwala, C.M., J.C. Jones, and J.L. Viney, *A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, mdr1a, spontaneously develop colitis*. *J Immunol*, 1998. **161**(10): p. 5733-44.
140. Furuno, T., et al., *Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease*. *Pharmacogenetics*, 2002. **12**(7): p. 529-34.
141. Fojo, A.T., et al., *Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(1): p. 265-9.

142. Peters, W.H., et al., *Expression of drug-metabolizing enzymes and P-170 glycoprotein in colorectal carcinoma and normal mucosa*. *Gastroenterology*, 1992. **103**(2): p. 448-55.
143. Meijer, G.A., et al., *Increased expression of multidrug resistance related proteins Pgp, MRP1, and LRP/MVP occurs early in colorectal carcinogenesis*. *J Clin Pathol*, 1999. **52**(6): p. 450-4.
144. Andersen, V., et al., *Low ABCB1 gene expression is an early event in colorectal carcinogenesis*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e72119.
145. Shou, W., et al., *Gene-wide characterization of common quantitative trait loci for ABCB1 mRNA expression in normal liver tissues in the Chinese population*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e46295.
146. Larsen, U.L., et al., *Human intestinal P-glycoprotein activity estimated by the model substrate digoxin*. *Scand J Clin Lab Invest*, 2007. **67**(2): p. 123-34.
147. Samanian, S., et al., *MDR1 gene polymorphisms: possible association with its expression and clinicopathology characteristics in colorectal cancer patients*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011. **12**(11): p. 3141-5.
148. Potocnik, U., et al., *Naturally occurring mutations and functional polymorphisms in multidrug resistance 1 gene: correlation with microsatellite instability and lymphoid infiltration in colorectal cancers*. *J Med Genet*, 2002. **39**(5): p. 340-6.
149. Weinstein, R.S., et al., *Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis*. *Cancer Res*, 1991. **51**(10): p. 2720-6.
150. Zorzos, H.S., et al., *Multidrug resistance proteins and topoisomerase IIalpha expression in colon cancer: association with metastatic potential*. *Pathology*, 2003. **35**(4): p. 315-8.
151. Nakamura, T., et al., *Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects*. *Clin Pharmacol Ther*, 2002. **71**(4): p. 297-303.
152. Tang, K., et al., *Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations*. *Pharmacogenetics*, 2002. **12**(6): p. 437-50.

153. Colombo, S., et al., *Influence of ABCB1, ABCC1, ABCC2, and ABCG2 haplotypes on the cellular exposure of nelfinavir in vivo*. *Pharmacogenet Genomics*, 2005. **15**(9): p. 599-608.
154. Andersen, V., et al., *Polymorphisms in the xenobiotic transporter Multidrug Resistance 1 (MDR1) and interaction with meat intake in relation to risk of colorectal cancer in a Danish prospective case-cohort study*. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 407.
155. He, T., et al., *ABCB1/MDR1 gene polymorphism and colorectal cancer risk: a meta-analysis of case-control studies*. *Colorectal Dis*, 2013. **15**(1): p. 12-8.
156. Khedri, A., et al., *Association of the colorectal cancer and MDR1 gene polymorphism in an Iranian population*. *Mol Biol Rep*, 2011. **38**(5): p. 2939-43.
157. E. Gaikovitch MD, P.M.M., F. Wagner PD andl. Roots M, *Association of C3435T and G2677T/A polymorphisms of multidrug resistance (MDR1) gene with colorectal cancer risk*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2004. **75**(2): p. 17.