

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Ebru TAŞTEKİN

**KOLOREKTAL KARSİNOMLARDA KRAS, NRAS,
BRAF, PIK3CA MUTASYONLARININ
KLİNİKOPATOLOJİK BULGULARLA İLİŞKİSİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Elif MERCAN DEMİRTAŞ

EDİRNE-2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile beni yetiştiren, tez çalışmamızın tüm aşamalarında özveriyle beni yönlendiren değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Ebru TAŞTEKİN'e, mesleki bilgi, görgü ve beceri kazanmamda katkıları olan kıymetli hocalarım Prof. Dr. A. Kemal KUTLU, Prof. Dr. Filiz ÖZYILMAZ, Prof. Dr. Ufuk USTA, Prof. Dr. Tülin Deniz YALTA, Prof. Dr. Fulya ÖZ PUYAN, Doç. Dr. Nuray CAN, Dr. Öğr. Üyesi Fatma Elif USTURALI KESKİN'e ve tezin teknik çalışmalarını yürüten patoloji laboratuvar teknisyeni arkadaşlarımıza, tezin arşiv çalışanlarımıza, istatistiksel değerlendirme aşamasında büyük emeği olan Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Necdet SÜT'e ve asistanlık sürecim boyunca zorlukları birlikte aşımız güzellikleri paylaştığımız, birlikte olmaktan mutluluk duyduğum, değerli asistan arkadaşlarıma, her konuda yanımda olup, beni bugünlere getiren aileme ve bu süreçte sonsuz sabır ve ilgisini esirgemeyen, hayatı paylaştığım sevgili eşime tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	5
EMBRYOLOJİ	5
ANATOMİ	6
HİSTOLOJİ	8
KOLOREKTAL KARSİNOM	9
KOLOREKTAL KARSİNOGENEZ VE MOLEKÜLER SINIFLAMA	20
TÜMÖR TOMURCUĞU (BUDDİNG)	27
AZ DİFERANSİYE KÜMELER	28
TÜMÖR STROMA ORANI	29
İNFLAMATUAR HÜCRE REAKSİYONU	29
YENİ NESİL DİZİLEME (NEXT GENERATION SEQUANCING)	29
GEREÇ VE YÖNTEMLER	32
BULGULAR	37
TARTIŞMA	58
SONUÇLAR	69
ÖZET	71
SUMMARY	73
KAYNAKLAR	75
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

- AJCC:** American Joint Committee on Cancer
- AKT:** Protein Kinase B
- APC:** Adenomatous Polyposis Coli
- BRAF:** V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
- CIMP:** CpG Island Methylator Phenotype
- CIN:** Chromosomal Instability
- CMS:** Consensus Molecular Subtypes
- CRC:** Colorectal Carcinoma
- CRCSC:** The Colorectal Cancer Subtyping Consortium
- dMMR:** Mismatch Repair Deficient
- DNA:** Deoksiribonükleik Asit
- DSÖ:** Dünya Sağlık Örgütü
- EGFR:** Epidermal Growth Factor Reseptor
- EPCAM:** Epithelial Cell Adhesion Molecule
- ERK:** Extracellular Regulated MAP Kinase
- FAP:** Familial Adenomatous Polyposis
- GDP:** Guanozin Difosfat
- GTP:** Guanozin Trifosfat
- GTPaz:** Guanozin Trifosfataz
- HNPCC:** Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
- H&E:** Hematoksilen Eozin

ITBCC: International Tumor Budding Consensus Conference

JPS: Juvenile Polyposis Syndrome

KRAS: Kirsten Ras Oncogen Homolog Gene

KRK: Kolorektal Karsinom

MAP: MUTYH Associated Polyposis Syndrome

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinaz

MEK: MAP kinase-ERK kinase

MLH-1: MutL Homolog 1

MMR: Mismatch Repair

MSH-2: MutS Homolog 2

MSH-6: MutS Homolog 6

MSI: Mikrosatellit İnstability

MSI-H: Mikrosatellit İnstability-High

MSI-L: Mikrosatellit İnstability-Low

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

NF-κB: Nükleer Faktör- Kappa B

NGS: Next Generation Sequencing

NRAS: Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homologue

ÖÖT: Özel Olmayan Tip

PCR: Polimeraze chain reaction

PI3K: Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz

PIK3CA: Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subunit alfa

PJS: Peutz-Jeghers Syndrome

RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

RAS: Rat Sarcoma Viral Oncogene

RNA: Ribonükleik Asit

TGF- β: Transforming Growth Factor β

TNM: Tümör-Nod-Metastaz

WHO: World Health Organization

WNT: Wingless/Integrated

GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal karsinomlar (KRK), kanser ilişkili ölümlerin en önemli nedenlerinden biridir. Kolorektal kanser tüm dünyada akciğer, meme kanserinden sonra sıklık olarak üçüncü sırada görülmekte olup, kansere bağlı ölümlerde ikinci sıradadır. Kolorektal adenokarsinom, gastrointestinal kanalın en sık rastlanan kanseridir. 2020 yılında dünyada 1.880.725 kolorektal karsinom tanısı alan hasta tespit edilmiştir (1). Türkiye’de ise, 2017 yılı kanser istatistiklerine göre KRK’lar erkeklerde akciğer ve prostat kanserinden sonra üçüncü, kadınlarda meme ve tiroid kanserinden sonra üçüncü sırada görülmekte olup, bir yıl içinde 19.430 yeni tanı mevcuttur (2).

Kolorektal kanser olgularının çoğu, ailesinde kolorektal kanser hikâyesi bulunmayan veya kalıtsal sendromlarla ilişkisiz, sporadik olarak görülür. Buna ek olarak, KRK tanısı alan birinci derece akrabaları (anne, baba, kardeş, çocuk) olanlarda KRK gelişme riski iki kat artmıştır (3).

Kolorektal karsinogenez çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi ile karakterize olup patogenezinde yer alan üç ana yol vardır; kromozomal instabilite (chromosomal instability-CIN), “microsatellite” instabilite (MSI) ve CpG ada metilatör fenotipi (CpG Island Methylator Phenotype-CIMP) yolları (4). Sağ kolon kanserleri yüksek MSI, yüksek CIMP ve MLH-1 metilasyon değişikliklerini, sol kolon kanserine göre daha sık gösterir. Sağ kolon kanserleri ise, daha fazla yüksek CIN değişiklikleri gösterirler (5).

Amerikan Ortak Kanser Komitesi ve Uluslararası Kanser Kontrol Birliği (AJCC) tarafından tasarlanan TNM evresi, tanı anında hastaları sınıflandırmada en güvenilir prognostik parametredir (6). Buna rağmen, aynı TNM evresine sahip hastalarda bile hastalığın prognozu

farklı seyredabilmektedir. Tümöre ait histopatolojik parametreler, tümörün biyolojik davranışını tahmin etmede, klinisyenler tarafından olguların, hastalık progresyonu açısından yüksek risk altında olup olmadığını öngörmeye ve özellikle lokal hastalıkta adjuvan tedaviye aday olup olmadığını belirlemek için kullanılabilir (7).

Tümör tomurcuğu (budding), invaziv tümör çevresi stromada bulunan izole tümör hücreleri veya en fazla dört hücrenin bir araya geldiği gruplar olarak tanımlanır. Tümör tomurcuğu oluşumunun, KRK olgularının seyrinde bağımsız bir prognostik faktör olup, pT1 olgularda lenf nodu metastazının yararlı bir ön görürücüsüdür ve bu olgularda rezeksiyon kararını gündeme getirebilir. Evre 2 olgularda, yüksek dereceli tümör tomurcuğu daha kısa hastaliksız sağkalım ile ilişkili olup bu hastalarda adjuvan tedavi düşünülebilir (8).

Az diferansiye kümeler invaziv tümör çevresi stromada, glandüler yapılanma oluşturmadan beş ve üzeri tümör hücresinden oluşan gruplar olarak tanımlanmaktadır. KRK'larda umut verici bir olumsuz prognostik parametre olarak görülmekte, agresif histolojik özellikler ve kötü klinik seyir ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (9).

Tümörlü dokularda, tümör hücrelerine eşlik eden farklı birçok hücre bulunmaktadır. Hücre dışı matriks proteinlerine gömülü fibroblastlar, bağışıklık hücreleri ve endotelial hücreler de dahil olmak üzere neoplastik olmayan bu hücreler tümör mikroçevresi olarak adlandırılmaktadır. Tümör mikroçevresinin komponentlerinden biri olan stromayı yüksek oranda bulduran tümörlerin, bir çok organ tümöründe kötü prognozla ilişkili olduğunun gösterilmesi ile tümör stroma oranının olumsuz prognostik bir parametre olabileceği bildirilmektedir (10). Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda, tümör mikroçevresinin komponentlerinden, tümöre karşı gelişen inflamatuvar yanıtın prognozla ilişkisi gösterilmiştir (11). Tümörün invaziv sınırında, yüksek dereceli inflamatuvar hücre reaksiyonu varlığı hem sağ kalım; hem de hastaliksız sağ kalımda bağımsız olumlu bir prognostik faktör olarak saptanmıştır (12).

Perinöral invazyon KRK'larda yaklaşık %10 oranında görülmekle birlikte, bölgesel lenf nodu metastazları ve azalmış sağkalım ile bağımsız olarak ilişkili olan kötü bir prognostik göstergedir ve ayrıca lokal hastalık nüksü riskini 2.5 kattan fazla arttırmaktadır (7).

Lenfovasküler invazyon, pek çok malignitede kötü prognozla ilişkilendirilmiş olup, KRK'larda önemli bir olumsuz prognostik parametre olarak kabul edilmektedir (13). Elastik lamina ve/veya düz kas tabakasına sahip endotelle döşeli boşluklarla çevrelenmiş tümör nodülleri de vasküler invazyon olarak kabul edilir ve ektramural (muskularis propria dışında) veya intramural (submukoza veya muskularis propriada) olabilir. Ektramural vasküler

invazyonun birçok çalışmada bağımsız bir olumsuz prognostik faktör olduğunu ve karaciğer metastazı için bir risk faktörü olduğunu gösterilmiştir (14). İntramural vasküler invazyonun insidansı ve olumsuz prognostik etkisinin, ektramural vasküler invazyondan daha az olduğu bildirilse de, bu parametrenin etkisi henüz netlik kazanamamıştır (13, 15).

Kolorektal karsinogenezde, mitojenle aktive olan protein kinaz MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK) ve phosphoinositide 3-kinase (PI3K) yolları gibi anahtar sinyal yollarında ortaya çıkan mutasyonlar önemli rol oynamaktadır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) aracılığıyla olan sinyal yolağı, KRK'da önemli bir rol oynar. Bu yolağı inhibe etmek için kullanılan anti-EGFR monoklonal antikorkarın, EGFR'nin hücre dışı kısmına bağlandığı ve aşağı akış sinyalini, yani RAS/MRAF/MEK/ERK yolağını bloke ettiği ve metastatik KRK'lu hastalarda önemli bir klinik yararı olduğu gösterilmiştir (16). Bu yolakta yer alan bir aşağı akış sinyal molekülü mutasyona uğrarsa, anti-EGFR antikoru yolağı bloke edemez ve bu da dirençle sonuçlanır.

RAS, GTPaz adı verilen bir protein sınıfına ait tüm hücre organlarında eksprese edilen bir protein ailesidir ve rolü hücreler içinde sinyalleri ileterek, bu sinyaller sonunda hücre proliferasyonunu uyarmaktır. RAS ailesinin ana üyeleri KRAS (Kristen rat sarcoma virüs) ve NRAS (Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homologue) mutasyonlarıdır (17). KRAS ve NRAS proto-onkogenlerinde gelişen mutasyonlar sonucu, anti-EGFR monoklonal antikor tedavisine direnç gelişir. Amerikan Klinik Onkoloji Topluluğunun (ASCO) yayınladığı çalışmaya göre, bu tedaviye başlanacak hastalara KRAS ve NRAS, ekzon 2 (kodon 12 ve 13), ekzon 3 (kodon 59 ve 61) ve ekzon 4 (kodon 117 ve 146) bölgelerinde yer alan mutasyonların bakılması önerilmektedir (18). Bununla birlikte, literatürde KRAS wild tip KRK hasta grubunun %10-20 oranında tek ajan anti-EGFR tedavisine yanıt verdiği bildirilmektedir (19). Bu durumun muhtemel nedenlerinden biri, KRK'larda RAS-MAPK ile PI3KCA-AKT yollarında yer alan diğer gen mutasyonlarıdır.

BRAF, MAPK yolu aktivasyonunda rol oynar ve hücrel büyüme, çoğalma ve farklılaşmanın yanı sıra göç, apoptoz gibi diğer önemli hücrel süreçlere katkıda bulunur (17). BRAF mutasyonlarının yaklaşık %90'ı, ekzon 15'te T1799 transversiyonu seviyesinde meydana gelir ve bu da glutamik asit (V600E) yerine valinin geçmesine yol açar. KRK'larda BRAF p.V600 mutasyonunun prognostik anlamı olmakla birlikte Lynch Sendromu olgularının saptanmasına katkıda bulunur (18). BRAF mutasyonu, anti-EGFR tedavisi için prediktif belirteç değildir.

Ayrıca, PI3K ailesi üyesi PIK3CA üzerindeki mutasyonlar, kolorektal kanserlerin yaklaşık %10-18'inde, sıklıkla ekzon 9 ve 20'de bulunmaktadır (18). Günümüzde yer alan klavuzlarda, anti-EGFR tedavisi için PIK3CA mutasyonu prediktif belirteç değildir. Ancak yapılan bazı çalışmalarda KRAS wild-tip KRK olgularında ekzon 20'de PIK3CA mutasyonunun anti-EGFR tedavisine direnç oluşturduğu bildirilmektedir (20, 21). PIK3CA'daki mutasyonlar genellikle KRAS kodon 12 ve 13 mutasyonları ile pozitif korelasyon göstermektedir (21). Bu yüzden, PIK3CA mutasyonunun anti-EGFR'ye yanıtının bağımsız bir prediktif belirteç olarak rolünün doğrulanması için KRAS wild-tip olgularla yapılacak ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Bütün bu literatür bilgileri göz önüne alındığında KRK'ların farklı moleküler özelliklere ve klinik sonuçlara sahip heterojen bir hastalık grubu olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir.

Gen ifadesine dayalı KRK sınıflandırmalarındaki tutarsızlıkları çözmek ve moleküler özelliklerinin klinik yansımalarını belirlemek amacıyla 2015 yılında KRK Alt Tip Belirleme Konsorsiyumu (The CRC Subtyping Consortium-CRCSC) oluşturulmuştur. Çoklu çalışmalardan RNA ekspresyon profillemeye verilerinin değerlendirilmesi sonucu, transkriptomiklerin, hücre tümör fenotipi ve klinik davranışla en yakından bağlantılı olan veri seviyesini temsil ettiği kabul edilmiştir. Bunların sonucunda dört konsensus moleküler alt tip grubu (Consensus Molecular Subtypes -CMS) tanımlanmıştır. Bununla birlikte, tüm KRK vakalarının %13'ü sınıflandırılmaz, bu da net moleküler özelliklere sahip olmayan beşinci bir alt tipe sonuçlanır (6). Bu da KRK'ların moleküler sınıflamasının daha fazla iyileştirilmesi ve biyolojisinin anlaşılmasını artırmak için kolorektal genom ve epigenomun daha fazla analizi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Bu bağlamda, güncel yaklaşımda mutasyon analizi ve moleküler profil bakılarak hedefe yönelik tedavilerin önem kazandığı KRK'larda, intratümöral heterojenitenin yol açtığı düşünülen benzer genomik özelliklere sahip olduğu halde farklı histomorfolojik ve klinik özellikler gösteren alt grupların olduğunu düşünerek; KRK'larda Yeni Nesil Dizileme ile değerlendirilen KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA mutasyonları ile klinikopatolojik verileri karşılaştırarak farklılığı oluşturan biyolojik mekanizmaları ortaya koymayı amaçlıyoruz.

GENEL BİLGİLER

EMBRİYOLOJİ

İnsanda gastrointestinal sistem gelişimi, gestasyonel 4. Haftada embriyonun kıvrılmasıyla oluşan primitif bağırsak oluşumuyla başlar. Bu primitif bağırsak tüpü ön bağırsak (foregut), orta bağırsak (midgut) ve son bağırsak (hindgut) olarak diferansiye olur. Foregut'dan ağız boşluğu, farinks, dil, bademcikler, tükürük bezleri, üst ve alt solunum yolları, duodenumun ilk yarısı, özefagus, mide, karaciğer, safra yolları ve pankreas gelişir. Midgut'tan duodenumun distal nölümü, ince bağırsaklar ve sağ kolon (çekum, apendiks, çıkan kolon, transvers kolonun 2/3'lük proksimali) gelişir. Fetal abdominal kavitede hızla gelişen bağırsakların meydana getirdiği basınç artışı sonucu son bağırsak 6. Haftada umbilikal kord içene fıtıklaşır. (fizyolojik herniasyon) Diğer organların göreceli olarak küçülmesi ve karnın genişlemesi sonucunda bağırsaklar onuncu haftada karın boşluğuna geri döner. Bu esnada orta bağırsak peritoneal kavitede kan damarları etrafında saat yönünün tersine 270'lik rotasyon yapar. Bu rotasyon sonucu değişen mezenter lokalizasyonu ile karın boşluğunda kolon kısımları meydana gelir. Son bağırsaktan sol kolon (transvers kolonun 1/3 distali, inen kolon, sigmoid kolon, rektum) ve anal kanalın üst kısmı gelişir.

Gen ekspresyon paternlerinde önemli varyasyon, fizyolojik fonksiyon, hastalıkların dağılımı ve histolojik görünümünde değişiklikler izlenen sağ ve sol kolon, embriyolojik olarak orta bağırsak ve son bağırsaktan köken almalarıyla farklılık gösterirler(22).

Son bağırsağın terminal kısmı, ürorektal septum tarafından ikiye ayrılan kloakanın arka kısmına girerek anal kanal ve rektumu oluşturur. Ürorektal septumun ön yüzüne allontisin girmesiyle de üretra ve mesane meydana gelir (22).

ANATOMİ

Kalın bağırsak, ileoçekal valvden başlayarak anal kanalla sonlanan yaklaşık 150 cm uzunluğunda lümenli bir organdır. Terminal ileum ile çekumun birleştiği yerde, ileal içeriğin çekuma hızlı geçişini ve kolonik barsak içeriğinin ince bağırsağa reflüsünü engelleyen ileoçekal valv bulunur. Kalın bağırsak ansları ince bağırsağa göre daha geniş olmakla birlikte, çekumdan itibaren longitudinal kas liflerinin üzerinde üç uzun şerit halindeki ‘‘tenia coli’’adı verilen bantlar izlenir. Tenyaların uzunluğu bağırsağın uzunluğundan daha kısadır ve bağırsağı büzerek haustra adı verilen keseleri meydana getirir. Tenia colilerin kenarında apendiks epiptoika adı verilen periton örtülü, subserozal yağ doku kesecikleri izlenir.

Kalın bağırsak; çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum olarak bölümlere ayrılmaktadır.

Çekum, sağ fossa iliakada yer alır. Kalın bağırsağın en geniş bölümü olup ortalama 7,5 cm genişliğinde, 6 cm uzunluğundadır. Genellikle tamamen peritonla örtülüdür. Çekumun arka yüzü iliak kas ve psoas majör kası ile komşuluk göstermekte olup bu yapılardan periton ve kas fasyası aracılığıyla ayrılır. Çekum boş iken ön yüzü ince bağırsak anslarıyla, dolu iken karın duvarının iç yüzü ile komşudur. Çekumun arka yüzünün iç tarafında, tenyaların başladığı yerde apendiks vermiformis izlenir. Apendiks lümeni ileoçekal valvin biraz aşağısında çekuma açılır. Çekum, kolonun en geniş bölümü olduğu için bu segmentte izlenen malign lezyonlar nadir olarak obstrüksiyona sebep olurken, sıklıkla kanama ve anemiye bağlı halsizlik ve kilo kaybı semptomları görülür. Çekum, A. İleokolikadan, apendiks vermiformis A. Apendikularisden ve A. İleokolidan gelen bir dalla beslenir. Çekum ve apendiks vermiformisin venöz dolaşımını sağlayan V. İleokolika, V. mezenterika süperiora drene olur. Lenfatik drenajı ise ileokolik lenf bezlerine buradan da süperior mezenterik lenf bezlerine olmaktadır. Çekum ve apendiks vermiformisin sempatik innervasyonu çölyak ve süperior mezenterik pleksustan, parasempatiklerini N. Vagustan alır (23).

Çıkan kolon yaklaşık 15 cm uzunluğundadır ve çekumdan daha dardır. Çekumdan başlayarak karaciğerin sağ lobunun alt yüzünde sola ve öne doğru kıvrılarak transvers kolon olarak devam etmektedir. Gevşek bağ doku ile karın duvarına tutunan arka yüzü hariç tamamen peritonla örtülüdür. Ön yüzü ileum kıvrımları, omentum majusun sağ kesimi ve batın ön duvarı ile komşudur. Arka yüzde quadratum lumborum kası, transversus abdominalis kasının aponevrozu ve sağ böbreğin ön yüzünün alt dış kısmı ile komşudur (23). Çıkan kolonun arteryel dolaşımı, A. mezenterika süperiorun dalları olan, A. ileokolika ve A. kolika dekstra ile sağlanır. Venleri de aynı isme sahip olup arterleri takip eder, V. mesenterika süperiora drene olur. Lenf

damarları nodi lymphatici colici dextriye buradan da süperior mezenterik lenf nodlarına drene olur. İnnervasyonu çölyak ve süperior mezenterik pleksustan sağlanır (23).

Transvers kolon, ortalama 50 cm uzunluğunda olup kolonun en uzun segmentidir. Hepatik fleksuradan başlar, umblikal ve sol lateral bölgeyi geçerek, yukarı doğru uzanır, sol hipokondriyak bölgede sonlanır. Dalağın, ön alt ucu düzeyinde aşağı ve sola dönerek splenik fleksurayı oluşturur. Pankreas başından splenik fleksuraya kadar tamamen peritonla çevrilidir, transvers mezokolon ile karın arka duvarına tutunur. Transvers kolonun üst yüzü, karaciğer, safra kesesi, midenin büyük kurvaturu ve dalağın dış tarafı ile komşudur. Ön yüzde karın ön duvarı ile omentum majusun arka yüzüne komşudur. Arkada duodenumun inen kısmı, pankreas başı, transvers mezokolon, ince bağırsak anslarının bir kısmı ile komşudur. Transvers kolonun ana arteri A. kolika mediadır. Sağ tarafı A. kolika dekstradan, sol tarafı A. kolika sinistradan da dallar almaktadır. A. kolika sinistra, A. mezenterika inferiorun dalıdır. A. kolika media ve A. kolika dekstra ise A. mezenterika süperiorun dallarıdır. Transvers kolonun venöz drenajını arterlerini takip eden aynı isimli venler sağlar. Transvers kolonun lenfatikleri, nodi lymphatici colici mediiye buradan da süperior mezenterik lenf nodlarına drene olur. İnnervasyonunu süperior mezenterik pleksus ve inferior mezenterik pleksus sağlar.

İnen kolon, ortalama 25 cm uzunluğundadır. Splenik fleksuradan başlayarak sol böbreğin dış kenarı komşuluğundan quadratus lumborum ve psoas majör kası arasında crista iliyakaya kadar inerek pelvis minör girişinde sigmoid kolonla sonlanır. Ön ve yan yüzleri peritonla örtülüdür, arka yüzü ise çıkan kolona benzer şekilde gevşek bağ doku ile karın arka yüzüne tutunur. İnen kolonun arteryel dolaşımını A. mezenterika inferiorun dalları olan A. kolika sinistra (büyük kısmını) ve A. sigmoidea (son kısmındaki küçük bir alanı) sağlar. Venleri arterleriyle aynı isimlidir ve onları takip ederek V. Mezenterika inferiora drene olur. Lenfatik drenajı nodi lymphatici mezenterici aracılığı ile inferior mezenterik lenf bezlerine olur. İnnervasyonu inferior mezenterik pleksus aracılığıyla sağlanır.

Sigmoid kolon, ortalama 25-40 cm uzunluğundadır. İnen kolonun devamında minör pelvisden başlar, üçüncü sakral vertebra seviyesinde rektumla devam eder. Tamamı peritonla örtülüdür, sigmoid mezokolon vasıtasıyla pelvis duvarına tutunur. Sigmoid mezokolon, geniş bir hareket imkanı sağlarken sigmoid kolonun şeklinin, komşuluklarının da farklılıklar göstermesine neden olur. Mezoya ek olarak, kolonun içeriğinin miktarına, uterus, mesane ve rektumun boşluk, doluluk durumlarına bağlı olarak sigmoid kolonun pozisyonun pelvis ve karın boşluğu arasında değişir. Arterleri, A. Mesenterika inferior'un dalı, A. Sigmidea'dır. Venleri de V. Sigmoidea'ya, oradan V. Mezenterika inferiora drene olur. Lenfatikleri, nodi lymphatici

sigmoidei'ye oradan da inferior mezenterik lenf nodlarına açılır. İnnervasyonu inferior mezenterik pleksus aracılığıyla sağlanır.

Rektum, ortalama 12 cm uzunluğundadır. Sigmoid kolonun sonlandığı üçüncü sakral vertebra seviyesinden başlayarak sakrumun eğimine uygun olacak şekilde pelvik diyafragmadan geçer ve koksiks üst ucunun 3-4 cm altında canalis analis olarak devam eder. Rektumda kolonun diğer segmentlerinden farklı olarak haustralar, apendiks epiploikalar, tenyalar ve mezenter yoktur. Üç musküler şerit halinde uzanan tenyalar, rektosigmoid bileşkenin 5 cm üzerinde rektumun ön ve arka yüzünde birer band olarak devam eder. Rektumun, üst üçte ikisi peritonla sarılıdır, ancak alt üçte biri retroperitonealdir. Üst üçte birinin ön ve yan yüzleri, orta üçte birinin ise sadece ön yüzü peritonla örtülüdür. Rektum ön yüzde yer alan periton erkekte mesanenin üzerine geçerek rektum ve mesane arasında "excavatio rectovesicalis"i; kadınlarda uterusun üzerinde geçerek rektum ve uterus arasında "excavatio rectouterina"yı meydana getirir. Rektumun arteriyel dolaşımını internal iliak arterin arteria rektalis media dalı, internal pudental arterin arteria rektalis inferior dalı ve abdominal aortanın bifurkasyosundan çıkan süperior mezenterik arterin arteria rektalis süperior dalı sağlar Venöz drenajı vena rektalis süperior ile süperior mezenterik vene, vena rektalis media ile internal iliak vene, vena rektalis inferior ile internal pudental vene doğru olur. İnnervasyonu arterleri çevresinde buluna pleksus rektalis süperior, pleksus rektalis media ve pleksus rektalis inferior vasıtasıyla sağlanır. Lenfatik drenajı, süperior, media ve inferior rektal arter ve venlerle birlikte uzanan lenfatik damarlarla olur. Rektumun üst kısmının lenfatikleri, inferior mezenterik lenf nodlarına, lumbal paraaortik lenf nodlarına ve duktus torasikusa açılırlar. Rektumun orta kısmının lenf damarları internal iliak lenf nodlarına, buradan da lumbal paraaortik lenf nodları ve duktus torasikusa drene olurlar. Rektumun alt kısmının lenf damarları, derin pelvik lenf nodlarına ve inguinal lenf nodlarına drene olurlar (23).

HİSTOLOJİ

Erişkinde kolon, içten dışa doğru mukoza, submukoza, muskularis propria ve serozadan oluşan tüp şeklinde bir organdır.

Mukoza

Kolon mukozası, yüzey epiteli, kriptler, lamina propria ve muskularis mukozadan oluşur. Yüzey epitelinin, koruyucu, absorptif, sekretuar fonksiyonu bulunur. İnce bağırsağın aksine villuslar izlenmez. Yüzey epiteli, basit tek sıralı kolumnar ya da kübik epitel, çok sayıda

goblet hücresi ve bazal membran içerir. Eritelden muskularis mukozaya dik olarak uzanan uzanan, düzenli aralıklarla sıralanmış test tûpü rafı benzeri kriptler görülür. Bu kriptler bol miktarda goblet hücresi içerirler. Sağ kolonda kriptlerin lüminal yüzlerinde pembe, granüler görünüme sahip, immün cevapta rol oynayan paneth hücreleri izlenir. Paneth hücreleri sol kolonda metaplazi, kronik hasar durumlarında izlenir. Kript bazalinde endokrin özellikler taşıyan hücreler görülür. Lamina propriada, mikst mononükleer inflamatuvar hücreler, fibroblastlar, damarlar ve sinirler yer alır. İmmün cevapta rol oynayan, submukozaya da uzanabilen Mukoza İlişkili Lenfoid Doku (MALT) olarak isimlendirilen lenfoid agregatlar da görülebilir. Mukozanın son kısmı ince düz kas tabakasından oluşan muskularis mukozadır. Bu katman, muskularis mukozayı submukozadan ayırır (24).

Submukoza

Gevşek ödemli, fibrokollajenöz stromadan oluşur. Bu stroma, kan damarlarını, lenfatikleri, sinirleri ve Meissner pleksusu adı verilen ganglion hücrelerini barındırır.

Muskularis Propria

Muskularis propria, içte sirküler dışta longitudinal olarak yerleşen iki sıralı düz kas demetlerinden oluşur. Bu iki kas tabakası arasında ganglion hücrelerinin oluşturduğu Auerbach pleksusları, musküler kontraksiyonu sağlar. Longitudinal lifler dışta kolona paralel uzanır ve toplanarak tenia colileri oluştururlar.

Seroza

Fibroadipöz doku ve tek sıralı yassı mezotelyal hücrelerle döşeli visseral peritondan meydana gelir. Bu tabakanın bulunmadığı bölümler kolonun retroperitoneal segmentleridir. Bunlar çıkan kolon, inen kolon ve rektumun üçte bir distal bölümüdür.

KOLOREKTAL KARSİNOM

Epidemiyoloji

2020 global kanser istatistik verilerine göre kolorektal karsinomlar kadınlarda en sık görülen ikinci kanser türü, erkeklerde en sık görülen üçüncü kanser türüdür. 2020 yılında tüm dünyada 1.880.725 kolorektal karsinom tanısı alan hasta tespit edilmiştir. Tüm kanser türleri arasında en sık görülen üçüncü kanser türü olmasına rağmen kansere bağlı ölümlerde ikinci

sıradadır (1). Ülkemizde ise T.C Sağlık Bakanlığı'nın Kanser Dairesi Başkanlığının 2017 verilerine göre, KRK'lar hem erkek hem de kadınlarda en sık görülen üçüncü kanser türüdür. Ülkemizde sıklığı erkeklerde yüz binde 25,1 iken kadınlarda yüz binde 14,7' dir. En sık görülen histolojik alt tip ise vakaların %95'ini oluşturan adenokarsinomdur (2).

KRK'ların insidansı yaşla birlikte artmaktadır ve %93,1'i, 45 yaşından sonra görülmektedir. En yüksek insidansın 65-74 yaş aralığında (%24.8) görüldüğü saptanmıştır (25). Dünya genelinde, insidansı bölgeler arasında dokuz kata varan farklılık göstermekle birlikte en sık görüldüğü bölgeler Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda ve Kuzey Amerikadır. KRK insidansındaki bu farklılık ülkelerin sosyoekonomik düzeyleriyle paralellik göstermektedir ve yüksek sosyoekonomik düzeye sahip ülkelerde daha sık görülür. KRK insidansı Afrika'nın çoğu bölgesinde ve Güney Orta Asya'da düşük olma eğilimindedir (1).

Kolorektal Karsinomlarda Etiyoloji

KRK gelişimi multifaktöriyel olmakla birlikte, genetik farklılıklardan ve çevresel etmenlerden etkilenmektedir. Çevresel faktörlerin önemi, KRK görülme sıklığının coğrafik bölgeler arası belirgin farklılık göstermesi, insidansın düşük olduğu bölgelerden yüksek olduğu bölgelere göç edenlerde insidansın artmasıyla ortaya çıkmaktadır.

Diyet ve yaşam tarzı: Yüksek kalorili ve hayvansal yağdan zengin beslenme olarak bilinen batı tipi diyet ve fiziksel aktivitenin az olduğu, sosyoekonomik olarak gelişmiş ülkelerde KRK görülme sıklığı artmıştır (26).

Diyet, riski arttıran gıdalar, obezite ve kolondaki mikroorganizmalar üzerinden etki edebilmektedir. Kolon mikrobiyotasının, inflamasyon ve immün yanıt üzerinden tümör gelişiminde olumlu ve olumsuz etkileri olduğu düşünülmektedir (27). Yağdan ve kolesterolden zengin beslenmenin, karaciğerde primer safra asitlerinin yapımının ve safra yollarına geçişinin artmasına, kolonda toksik sekonder safra asitlerinin artmasına yol açarak kanserojen rol oynamaktadır (28).

Retrospektif çalışmalarda, sebze, meyve ve tahıllardan zengin yüksek lifli diyetin kolon adenomu ve KRK gelişimi üzerinde önleyici etkileri olduğu bildirilmiştir. Sebze, meyve ve tahılların biyoaktif bileşenlerinin, NF- κ B, WNT / β -catenin, PI3K / AKT / mTOR ve ERK / MAPK gibi çoklu sinyal yollarının modülasyonu yoluyla inflamasyonu, oksidatif stresi, anjiyogenezi ve proliferasyonu baskıladığı kanıtlanmıştır (28). Ancak yine de, meyve ve sebze tüketimi ile KRK riskinin azalması arasındaki ilişkide kanıtlar hala yetersizdir. Buna rağmen

Amerikan Kanser Topluluğu kanserin önlenmesi için yüksek lifli beslenmenin önemini savunmaktadır. Fiziksel aktivite ile KRK arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaların sonuçları da oldukça tutarlıdır ve artan aktivite ile daha düşük bir risk olduğunu göstermektedir (29).

Toplamda alınan alkol miktarı, artan KRK riski ile ilişkilidir. Günde 25, 50 ve 100 g alkol içen kişilerde, tahmini rölatif KRK gelişme riski sırasıyla 1.14, 1.21, 1.32'dir. Klinik çalışmalarda, sigara içenlerin içmeyenlere göre kolonda adenomatöz polip gelişme riskinin 2-3 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Amerikan çalışmaları, günde >20 sigara içenlerde KRK prevalans riskinde % 50 artış ve yılda > 35 paket olan hastalarda bu riskte % 40 artış olduğu gösterilmiştir (28).

Yapılan randomize kontrollü çalışmaların metaanalizleri, beş yıl boyunca düzenli olarak kullanılan aspirinin KRK insidans ve mortalitesini yirmi yıl süren takip sonucunda %30-40 azalttığını göstermiştir. (28).

Uzun süreli gözlemsel çalışmalarda, tüketilen kalsiyum miktarı ile KRK gelişme riski arasında ters bir ilişki olduğu bulunmuştur. Yapılan deneysel çalışmalarda kalsiyumun biyolojik rolü, kolorektal lümende sekonder safra asitlerini, iyonize yağ asitlerini ve hem demiri çökeltirerek mukoza üzerindeki kanserojen etkilerini azaltması olarak saptanmıştır (30).

Özetle, KRK'ların çoğu batı tarzı diyet ve sedanter yaşamla ilişkili bulunmuştur. Meyve, sebze, tam tahıllı gıda tüketimi, uzun süreli nonsteroid antiinflamatuvar ilaç (NSAİİ) kullanımı, kalsiyum, D vitamini, selenyum, folik asit, postmenopozal dönemde östrojen replasman tedavisi, alkol ve sigara kullanımının düzenlenmesi ve fiziksel aktivitenin artırılması KRK gelişimini azaltan değiştirilebilir faktörlerdir (28).

Genetik faktörler: KRK'ların %70'i sporadik, %20'si ailesel kümelenme, %10'u kalıtsal sendromlar ile ilişkili olarak görülmektedir. Sporadik KRK'lar ortalama 50 yaşın üzerinde görülürler, çoğunlukla çevresel faktörlerle bağlantılıdır. KRK tanısı alan birinci derece akrabaları (anne, baba, kardeş, çocuk) olanlarda yaşam boyu KRK gelişme riski 2 kat artmıştır. Bu riskin etkilenen akraba sayısının artması, görülme yaşının daha düşük olduğu durumlarda daha arttığı bildirilmiştir (3, 31). KRK' un kümelendiği ailelerin çoğunda (KRK'ların %20'sini oluşturan grup) riski belirgin arttıran ailesel kalıtsal sendrom görülmemektedir, hastalık riskini artıran faktörlerin nispeten yaygın genetik varyasyonlar ve yaşam tarzı benzerlikleri ile kümülatif etkisi olduğu bildirilmiştir (32).

Tanımlanmış spesifik gen mutasyonları içeren kalıtsal KRK'lar sıklıkla 50 yaşın altında görülürler, en yaygın olanları Ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP) ve Lynch Sendromudur

(Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Karsinom-HNPCC). Bunlar tüm KRK'ların %5'ini oluşturur (31).

Diğer Polipozis sendromlarında da gastrointestinal ve diğer organlarda kanser riski artmıştır. Bunlarda inflamatuvar, hamartomatöz, hiperplastik tipte polipler görülür, Sporadik olarak gelişen inflamatuvar, hamartomatöz, hiperplastik poliplerde displazi ve karsinom gelişimi izlenmezken, Polipozis Sendromlarında görülenlerde izlenebilir.

I. Lynch sendromu (hereditör nonpolipozis kolorektal karsinom-HNPCC):

Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Karsinom (HNPCC-Lynch Sendromu) olarak isimlendirilen, DNA MMR genlerinde defektin izlediği, tipik polipozis sendromlarından farklı olarak yaşam boyu ondan az adenomatöz polibin görüldüğü bir sendromdur. Adenomlar genellikle 40 yaşın altındaki hastalarda ve sıklıkla orta ila yüksek dereceli displazili villöz büyüme paterninde görülür. Bu bireylerdeki adenomlar, genel popülasyondaki adenomlu bireylere göre kansere daha hızlı dönüşme eğilimindedirler. KRK'lara ek olarak endometriyal, over, mesane, mide, üreter, ince bağırsak, beyin, hepatobiliyer kanalda da kanserler görülebilmektedir. KRK'ların %2-4'ünü oluşturmakla beraber ortalama görülme yaşı 44-61'dir (33). Bu bireylerde, adenomlar ve KRK'lar sağ kolon yerleşimlidir. Tümörlerin ayrıca, az diferansiye karsinom, medüller büyüme paterni ve müsinöz özellikler, tümörü infiltrasyon, lenfositler, Crohn benzeri bir reaksiyon gibi karakteristik histolojik özellikleri olduğu belirtilmiştir.

Lynch Sendromu, otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır, ancak olguların bir kısmında de novo mutasyonlar da tanımlanmıştır.

DNA replikasyonu sırasında oluşan hataların tanınmasından, eksizyonundan ve tamirinden sorumlu olan proteinleri kodlayan "mismatch" onarım genleri denilen genlerde germline mutasyonlar meydana gelir. Sendrom, DNA "mismatch" onarım genlerinden birinde (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) ya da MSH2 geninin susturulmasına yol açan epitelyal hücresel adhezyon molekülü (EPCAM) geninde epigenetik, patojenik germline mutasyondan kaynaklanır. Lynch sendromlu bireyler, kalıtsal bir mutasyon nedeniyle DNA tamir genlerinin bir işlevsel aleli ("wild") ve bir mutant bir aleli ile doğarlar. İşlevsel alelde bir mutasyon elde edildiğinde kanser riski oluşur. Nadiren de olsa, birey Lynch Sendromuyla doğmaz, ancak MMR proteinlerinin somatik kaybına yol açan her iki alleli de kaybeden bir tümör geliştirir.

DNA MMR genlerinde oluşan mutasyonlar, immünohistokimyasal ve polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction) çalışmaları sonucu gösterilebilmektedir. MMR genlerinden bir veya daha fazlasının immünoekspresyonunun kaybı, dMMR tümör olarak

değerlendirilir ve bu da genellikle MSI-H lehindedir. PCR ile genlerin normal genler ile uzunluğu Bethesda paneli kullanılarak karşılaştırılır. Bu panelde tipik olarak 5 marker bulunmaktadır: BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250. Tümörde bu belirteçlerden 2 veya daha fazlası “unstable” ise MSI-H, 1 marker “unstable” ise MSI-L, herhangi bir marker “unstable” değil ise MSS olarak adlandırılır (34).

II. Polipozis sendromları: Genetik geçiş gösteren bir grup hastalıktır.

a. Familyal adenomatöz polipozis: Familyal Adenomatöz Polipozis (FAP), 5. kromozomun uzun kolunda (5q22.2) yer alan Adenomatöz Polipozis Coli (APC) geninde patojenik germline mutasyon sonucu gelişen otozomal dominant kalıtılan bir sendromdur. Kolorektumda 100'den fazla binlerce olabilen adenomatöz polipler 20'li yaşlarda görülmeye başlar. Kolektomi uygulanmazsa ortalama 45 yaşında, neredeyse %100 KRK gelişme riski vardır. Atenu FAP, klasik FAP'a benzer şekilde APC geninde mutasyon izlenen, otozomal dominant kalıtım bulunduran, kolonda 20-100 kadar adenom ile karakterize bir sendromdur. Bu hastalarda, KRK ortalama 56 yaşında gelişir (35).

APC geni, bir tümör süpresör gen olup, WNT sinyal yolunun önemli bir bileşeni olan CTNNB1'in degradasyonuna aracılık ederek WNT sinyal yolunu negatif olarak düzenler. APC geninin non-mutant alelinde, somatik nokta mutasyonu, delesyon, heterozigosite kaybı gelişmesi ile adenomlar gelişir. Bundan sonraki aşamalarda sporadik adenomların izlediği KRAS, SMAD4, TP53 genlerinde izlenen KRK yolağı izlenir (36).

FAP olgularının görülen polipler küçük (genellikle <5 mm), sessil özelliktedir. Bu poliplerin çoğu tübüler, tübülövilöz, villöz tipte, düşük/yüksek dereceli displazi içeren özellikte olabilirler. FAP'ta görülen adenomlar ve karsinomlar histopatolojik olarak sporadik olanlarla aynıdır. FAP hastalarının normal kolorektal mukozasında tipik olarak, tekli displastik kripterler (unikriptal adenomlar) dahil olmak üzere birçok mikroskobik adenom (mikroadenomlar) gösterir. Unikriptal adenomlar, FAP için neredeyse patognomiktir. FAP'lı hastalarda standart tedavi profilaktik kolektomidir. Ancak gastrik fundik gland polipleri, duodenal ve ince bağırsak polipleri ve ekstrakolonik yerleşimli desmoid tümör, hepatoblastom, tiroid karsinomu, beyin tümörleri gibi neoplaziler de görülebildiğinden kolektomi sonrasında da olgular yakın klinik takip altında tutulmalıdırlar.

Gardner sendromu; APC mutasyonu görülen intestinal poliplere ek olarak, epidermal kistler, osteomalar, diş anomalileri, desmoid tümörler ve karakterli FAP varyantıdır (37).

Turcot Sendromu; İntestinal polipler ve primer beyin tümörlerinin birlikte görülmesi ile karakterlidir. Bu hastalarda APC mutasyonu veya MMR genlerinde defekt saptanmaktadır.

APC mutasyonunda, FAP varyantı olarak, MMR genlerinde defekt saptandığında Lynch Sendrom olarak sınıflandırılırlar (38).

Mutyh-ilişkili polipozis (MAP): Diğer kalıtsal polipozis sendromlarından farklı olarak otozomal resesif olarak kalıtılır. KRK olgularının %0,3-0,8'inin oluşturur. MUTYH geni, oksidatif strese kaynaklanan DNA hasarını onaran bir DNA bazlı eksizyon onarım genidir. Olgularda kolonda 10-100 arası adenomatöz polip bulunur (%15'inde 100'den fazla polip olduğu bildirilmiştir). Polipler mide ve duodenumda da görülebilmektedir. Poliplerin çokluğu göz önüne alındığında FAP ve AFAP'a benzeyebilir, ancak MAP olgularında bu poliplerin sesil serrated lezyon prevalansı daha yüksektir. MAP olgularında yaşam boyu KRK görülme riski %80'dir (37).

Juvenil polipozis sendromu (JPS): Otozomal dominant kalıtılan, kolorektum, ince bağırsak ve midede multiple juvenil polipler izlenen familial bir kanser sendromudur. DSÖ 2019 tanı kriterlerinde; kolorektumda 3 veya 5 adet juvenil polip bulunması veya gastrointestinal sistem boyunca juvenil poliplerin bulunması veya juvenil polipozis aile hikayesi olanlarda herhangi bir sayıda juvenil poliplerin bulunması yer almaktadır. Juvenil polipler makroskopik olarak genellikle saptır; ancak midede sesil görünümde de olabilir. 5 cm çapa kadar ulaşabilirler ve multilobe görünümündedirler. Mikroskopik olarak yüzeyi erode görünümde, inflamatuvar hücrelerin yer aldığı ödemli stroma içeren, reaktif epitelle döşeli, münin dolu kistik boşluklar, dilate glandlar yer alır. Primer etki epitelden ziyade stromal da olsa nihayetinde üstteki epitelde neoplastik dönüşüm olabilir. (15).

JPS'da yaşam boyu KRK görülme oranı %40, mide ve ince barsak kanseri görülme riski %10 olarak bildirilmektedir. JPS olgularında, gastrik, duodenal ve pankreatik kanserlerde tanımlanmıştır. Olguların %25'inde, SMAD4 veya BMPR1A genlerinde germline mutasyon tanımlanmıştır (39).

Peutz-jeghers sendromu (PJS): Mukokutanöz melanin pigmentasyonu ve gastrointestinal poliplerle karakterize, otozomal dominant kalıtılan familial kanser sendromudur. DSÖ 2019 tanı kriterleri arasında; 3 veya daha fazla histolojik olarak doğrulanmış Peutz-Jeghers polipi veya aile hikayesi varlığında herhangi bir sayıda Peutz-Jeghers polipi veya PJS aile hikayesi varlığında karakteristik mukokutanöz pigmentasyon veya herhangi bir sayıda Peutz-Jeghers polipi ile karakteristik mukokutanöz pigmentasyonun görülmesi yer almaktadır (15). PJS olguları, kolorektum, ince bağırsak, mide, pankreas, meme, uterus, over, serviks, testis ve akciğer kanserlerinde artmış riske sahiptir. Histopatolojik olarak, villöz paternde, muskularis mukoza ile devamlılık halindeki ağaç benzeri dallanana düz kas

lifleri ve bunu normal görünümde mukozanın örtmesi polipleri tanısız özellikleridir. PJS olgularının bir kısmında tümör süpresör gen olan LKB1/STK11geninde “germline” mutasyon saptanmaktadır (39).

Pten-hamartoma tümör sendromu: Cowden sendromunu ve nadir görülen Bannayan-Riley-Ruvalcaba Sendromunu da içeren, PTEN tümör baskılayıcı geninde germline mutasyon izlenen, çok sayıda hamartomatöz poliple karakterize, otozomal dominant kalıtılan bir familial kanser sendromudur. Hamartomatöz polipler kolorektum, mide, duodenum ve ince bağırsakta bulunabilir. Meme, endometriyum, tiroid ve böbrek dahil olmak üzere ekstra intestinal yerleşimli kanser riskinin de arttığı belirtilmektedir. Histopatolojik olarak, iki veya daha fazla hamartomatöz polip (inflamatuar / juvenil, adenomatöz poliplerde izlenebilir), geniş lenfoid foliküller, gangliyonöromatöz ve intramukozal lipomlar görülür (37).

Serrated polipozis: Multiple serrated kolon polipleri izlenen ve artmış KRK riski ile ilişkili, eski adı hiperplastik polipozis olan sendromdur. DSÖ 2019 tanı kriterleri, rektum proksimalinde boyutu 5 mm ve üzerinde, 5'ten fazla veya 10mm ve üzerinde 2'den fazla serrated polip/lezyon görülmesi veya kolonda, herhangi boyutta 20'den fazla (5'i rektum proksimalinde) serrated polip/lezyon görülmesidir. Mikroskopik olarak sesil serrated polip/lezyon (hiperplastik polip, sesil serrated lezyon displazili/displazisiz, traditional serrated adenom) olamakla beraber, yaklaşık %75'i 10 mm'den büyük boyuttadır. Serrated Polipozisli hastalarda gelişen KRK'ların yaklaşık% 50'sinde BRAF mutasyonu, <% 5'inde KRAS mutasyonu,% 40 MLH1 eksikliği var (15).

Kolon epitelinde ve serrated öncü neoplazilerde, anormal metilasyon regülasyonuna kalıtsal bir yatkınlık varsayılmıştır. Ancak temeli henüz tam olarak bilinmemektedir (40).

Kronik İnflamasyon: İnflamatuar bağırsak hastalıkları (İBH; Crohn hastalığı-CH ve Ülseratif kolit-ÜK) ile KRK gelişimi için bir risk faktörüdür. KRK riski, İBH'nın süresi, şiddeti ve tutulum boyutunun artması (en büyük risk pankolittir); primer sklerozan kolanjitin varlığı ve aile geçmişinde kolon kanseri varlığıyla birlikte artmaktadır. KRK riski, 8 ila 10 yıllık hastalıktan sonra önemli ölçüde artar. Yılda yaklaşık % 0,5-1 artar ve 30 yılda yaklaşık% 15-% 20 artmış olarak saptanır, bu genel popülasyondan 20 kat daha yüksektir (40).

Diğer faktörler: Kolorektal adenom veya karsinom öyküsünün bulunması, diyabet hastalığı, pelvik radyoterapi, ureterosigmoidostomi KRK için risk faktörleri arasında yer almaktadır (40).

Klinik Özellikler ve Görüntüleme

Yaygın klinik semptomlar arasında barsak alışkanlıklarında süregelen değişiklikler, anemi, hematokezya ve karın ağrısı bulunmaktadır. Bununla birlikte toplum taramalarının yaygınlaşmasıyla KRK'ların klinik spektrumunu değiştirmekte ve asemptomatik hastaların sayısı artmaktadır. Taramalar hastanın yaşı, aile hikayesi gibi faktörlere bağlı olarak gaitada gizli kan testleri veya endoskopi ile yapılmaktadır.

Kolonoskopi ile kolon mukozasında yer alan KRK ve prekürsör lezyonlar değerlendirilebilir. Ayrıca kolonoskopi ile polipektomi, endoskopik mukozal rezeksiyon gibi bazı lezyonların terapötik olarak uzaklaştırılması sağlanır. Baryum lavmanı ile yapılan bilgisayarlı tomografi (BT kolonografi), KRK'ların non-invaziv tanısında faydalı olabilecek bir teknik olsa da kesin tanı biyopsi veya rezeksiyon ile konulmaktadır. Klinik görüntülemenin ana kullanım amacı evreleme yapmaktır. Erken rektum kanserlerinde invazyon derinliğini belirlemek için endorektal ultrasonografi, daha ileri lezyonlar için, özellikle tümörün mezorektal fasya ile ilişkisinin belirlenmesinde manyetik rezonans görüntüleme (MRG) kullanılmaktadır. Kapsamlı cerrahi yapılmadan önce uzak metastazları belirlemek için BT veya PET-CT kullanılabilir. Son zamanlarda, görüntüleme yöntemleri kullanılarak tümörün tedavi yanıtının değerlendirilmesi de önemli hale gelmiştir (41).

Tedavi

Erken evre primer kolon adenokarsinomlarında, daha düşük lokal nüks oranı ve daha iyi sağkalım elde etmek için öncelikli tedavi tümörün yeri, evresi, vasküler ve lenfatik drenaja göre belirlenen cerrahi rezeksiyondur. Rektum karsinomlarında, cerrahi olarak tam mezokolik eksizyon lokal nüks ile doğrudan ilişkilidir. Bu yüzden rektal kanserlerde, mezorektum eksizyonunun tamlığı mutlaka makroskopik olarak değerlendirilmelidir (42) KRK'larda kullanılan bir diğer tedavi yöntemi kemoterapidir. Neoadjuvan kemoterapi özellikle rektal kanserlerde radyoterapi ile kombine edilerek kullanılmaktadır. Bu yaklaşımın lokal rekürrensi %30-40'lardan, %5-10'lara ve altına düşürdüğü bildirilmektedir (42).

Adjuvan kemoterapi, küratif amaçla cerrahi tedavi uygulanan ve özellikle lenf nodu metastazı bulunan hastalarda uygulanmaktadır. Bu amaçla, 5-fluorouracil (5-FU),levamisole, oxaliptatin ve irinotekan kombinasyonu kullanılmaktadır. Adjuvan kemoterapiye ek olarak tümörün moleküler karakterizasyona göre belirlenen hedefe yönelik tedavi rejimleri de uygulanmaktadır. Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) klavuzlarında, RAS vahşi tip tümörü olan metastatik hastalarda adjuvan kemoterapiye ek olarak EGFR monoklonal antibody (panitumumab, cetuximab) ile tedaviye yanıtın artmış

olduğu belirtilmiştir (43). Bu rejim KRAS/NRAS/BRAF vahşi tip ve sol kolon yerleşimli tümörlerde uygulanmaktadır.

MSI-H tümörler iyi prognoza sahip olmakla birlikte, 5-FU temelli sitotoksik tedavi ajanlara düşük yanıt verdikleri belirtilmektedir (42).

Lokalizasyon

KRK'lar lokalizasyonlarına göre üç gruba ayrılır; sağ taraf / proksimal yerleşimli kolon karsinomları (çekum, asendan kolon, transvers kolon); sol taraf yerleşimli kolon karsinomları (splenik fleksuradan sigmoide kadar herhangi bir yerde) ve rektal karsinomlar.

Sağ kolon karsinomları daha ileri yaşlarda, kadınlarda daha sık görülmekle birlikte cerrahiye bağlı komplikasyonlar da daha fazladır. . Tümör lokalizasyonu ayrıca metastatik KRK'ların sonucu ile de ilişkili bulunmuştur. Sağ kolon karsinomlarında peritoneal karsinomatozis, sol kolon karsinomlarında hepatik ve pulmoner metastazlar daha sık görülmektedir (44).

KRK'ların moleküler ve kromozomal patogenezinde de lokalizasyona bağlı spesifik özellikler görülmektedir. Sağ kolon karsinomlarında RAS ve fosfoinositid 3-kinaz yolu mutasyonları, CpG adası metilatör fenotipi (CIMP), yüksek mikrosatellit instabilite ve BRAF mutasyonları daha sık görülmektedir. Çekumdan sigmoid kolona doğru KRAS/BRAF mutasyonlarının sıklığı da azalmaktadır. APC, KRAS, SMAD4 ve TP53'teki mutasyonlar sol kolon karsinomlarında daha sıktır (45).

Farklı bir embriyolojik orijine sahip olmanın dışında, muhtemelen bağırsak mikrobiyotasındaki farklılıklardan dolayı mukozal immünolojileri de farklılıklar gösterir. Distal kolorektuma kıyasla proksimal kolonda daha yüksek konsantrasyonda eozinofiller ve intraepitelyal T hücreleri görülmüştür. Bu gözlem, artan bir bağışıklık aktivitesi ile karakterize edilen proksimal kolonda gelişen tümörlere karşı immünolojik yanıtta farklılıkları da açıklayabilir ve sırayla, KRK'ların lokalizasyona göre patogeneze ve sonuçlarındaki spesifik farklılıkları yansıtabilir (46).

Makroskopi

KRK'lar makroskopik olarak polipoid, egzofitik, diffüz infiltratif, ülser, anüler ve lümeni daraltıcı tarzda değişken görünüme sahip olabilirler Makroskopik tarifte mutlaka, tümörün lokalizasyonu, boyutları, invazyon derinliği, cerrahi sınırlarla ilişkisi, tümör perforasyonu olup-olmadığı, periton ile ilişkisi belirtilmelidir. Tümörler proksimal kolon ve

transvers kolonda daha sık olarak egzofitik görünümde iken, inen kolon ve rektumda ülsere ve anüler görünümde olma eğilimindedirler (40).

Kolon ve Rektum Tümörlerinde TNM Evrelemesi

KRK'lerde evrelemede amaç; hastalığın yayılım derecesini belirlemek, tedavinin planlanması ve prognozu değerlendirebilmektir. Bu amaçla en sık TNM (T(tümör), N(nod=lenf nodu), M(metastaz)) sınıflaması kullanılmaktadır. AJCC (American Joint Committee on Cancer) (8.baskı,2018) tümör evreleme sistemi Tablo 1'de gösterilmiştir (13).

Tablo 1. AJCC/TNM kolorektal kanser evrelemesi (13)

Primer Tümör (T)
Tx= Primer tümör değerlendirilemedi
T0= Primer tümör kanıtı yok
Tis= Karsinoma in situ, intramukozal karsinom (intraepitelyal veya lamina propria invazyonu var)
T1= Tümör submukozaya invaze ancak muskularis propriaya uzanmıyor
T2= Tümör muskularis propriaya invazedir
T3= Tümör subserozaya veya peritonla kaplı olmayan perikolik veya perirektal dokulara invazedir
T4= Tümör serozal yüzeyleri(visseral peritonu) veya komşu organ/yapıları infiltre ediyor
T4a= Tümör visseral peritonla ilişkilidir. (Tümör hücrelerinin inflamasyon yoluyla serozal yüzeyle devam ettiği perforasyon da dahil olmak üzere)
T4b= Tümör diğer organ veya yapılara direkt invazyon göstermektedir
Bölgesel Lenf Nodları (N)
Nx= Bölgesel lenf nodu değerlendirilemedi
N0= Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1= 1 -3 bölgesel lenf noduna metastaz var (lenf nodundaki tümör çapı ≥ 0.2 mm boyutunda olmalı) veya lenf nodu metastazı olmayan hastalarda herhangi bir sayıda tümör depoziti varlığı
N1a= 1 bölgesel lenf nodunda metastaz varlığı
N1b= 2 veya 3 adet bölgesel lenf nodunda metastaz varlığı
N1c= Bölgesel lenf nodu metastazı olmadan subseroza, peritonla örtülü olmayan perikolik ve perirektal yumuşak dokuda veya mezenterde tümör depozitlerinin bulunması
N2= 4 veya daha fazla bölgesel lenf nodunda metastaz varlığı
N2a= 4-6 bölgesel lenf nodunda metastaz bulunması
N2b= 7 ve daha fazla bölgesel lenf nodunda metastaz bulunması
Uzak Metastaz (M)
Mx= Uzak metastaz varlığı değerlendirilemedi
M0= Uzak metastaz yok
M1= Bir veya daha fazla uzak bölgeye/organa metastaz veya peritoneal metastaz
M1a= Peritoneal metastaz olmadan bir organ veya bölge ile sınırlı uzak metastaz bulunması
M1b= Peritoneal metastaz olmadan 2 veya daha fazla organ ile sınırlı uzak metastaz
M1c= Sadece peritoneal metastaz ya da peritoneal metastazla birlikte başka bölge ve organlarda metastaz

Histopatolojik Sınıflama

Tüm KRK'ların %90'ı adenokarsinomlardır. Adenokarsinomlar, displastik hücrelerle döşeli gland yapıları oluşturan, muskularis mukozadan submukozaya invazyon gösteren epitelial tümörlerdir. Çoğu vaka adenokarsinom özel olmayan tip (ÖOT) olarak tanısı almasına karşın spesifik klinik ve moleküler özelliklere sahip birkaç histolojik alt tip tanımlanmıştır. Bunlar; serrated adenokarsinom, adenom benzeri adenokarsinom, mikropapiller adenokarsinom, müsinöz adenokarsinom, zayıf koheziv karsinom, taşlı yüzük hücreli karsinom, medüller adenokarsinom, adenoskuamöz karsinom, özel olmayan tip andiferansiye karsinom ve sarkomatoid komponent içeren karsinomdur (15).

Müsinöz adenokarsinom; tümörün %50'sinden fazlasını tabakalar ve kümeler halinde yapılanma gösteren ya da tek tek dağılan malign epitelial hücreler içeren ekstraselüler müsin gölleri meydana getirmektedir. Bu tümörler adenokarsinom ÖOT'e göre daha fazla MSI gösterirler. MSI durumunun bağımsız prognostik değeri yoktur ve bu vakalar arasında prognostik fark izlenmemektedir. %50'den az müsinöz alan izlenen tümörler müsinöz komponente sahip adenokarsinoma olarak adlandırılır (15).

Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom; Tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasının, belirgin intrasitoplazmik müsin içererek, nükleusun kenara itildiği görünüme sebep olan hücrelerin oluşturduğu tümörlerdir. Sağ kolonda daha sık görülürler. MSI görülme sıklığı fazla olmakla birlikte bu vakaların Lynch Sendromu ile yakın ilişkisi izlenmiştir. %50'den az taşlı yüzük hücresi içeren tümörler, taşlı yüzük komponenti içeren adenokarsinoma olarak adlandırılırlar (15).

Medüller Karsinom; veziküler nükleusa sahip, belirgin nükleollü, geniş eozinofilik sitoplazmalı sitoplazmaya sahip malign tümör hücrelerinden oluşan, lenfositlerin ve nötrofilik granüositlerin eşlik ettiği tabakalar şeklinde yapılanma gösterirler. MSI sıklıkla görülür. Buna BRAF mutasyonu da çoğunlukla eşlik etmektedir. Prognozu oldukça iyidir (15).

Serrated Adenokarsinom; Yapısal olarak glandüler serrasyon gösteren müsinöz, alanlar barındırabilen, nükleus/sitoplazma oranı düşük epitelial hücrelerden oluşmuş tümörlerdir. Bu tümörlerde, MSI-H, CpG adası metilasyon fenotipi ve BRAF mutasyonunun sık görüldüğü saptanmıştır. Adenokarsinom ÖOT'e göre, bu tümörler daha infiltratif sınırlıdır, tümör tomurcuklanması daha fazla görülmektedir ve prognozları da daha kötüdür (47).

Mikropapiller Adenokarsinom; Bu karsinomlar, vasküler yapıları taklit eden stromal boşluklarda, küçük kümeler halinde tümör hücrelerinin bulunması ile karakterizedir. Bu

tümörlerde lenf nodu metastazı riski yüksek olamakla beraber lenfatik invazyon, ektramural vasküler invazyon, perinöral invazyon gibi kötü prognostik faktörler siktir (15).

Adenom Benzeri Adenokarsinom; İnvaziv alanların %50'sinden fazlasının düşük dereceli villöz yapılara sahip adenom benzeri görünümde olduğu karsinom alt tipidir. Bu tümörler biyopsilerde invaziv komponentin tanısının zor olmasıyla karakterizedir (15).

Sarkomatoid Komponent İçeren Karsinom; Andiferansiye morfoloji ve iğsi, rabdoid özellikte sarkomatoid alanlara sahip olabilen nadir bir tümördür. Tümör hücreleri sıklıkla miksoid matriks içerisinde diskoheziv olarak görülür. Rabdoid hücrelerde, belirgin intrasitoplazmik eozinofilik rabdoid cisimler görülebilir (15).

Histolojik Derecelendirme

Kolorektal adenokarsinomlarda derecelendirme; gland yapıları oluşturma oranı esas alınarak yapılmaktadır: Düşük dereceli (önceden iyi-orta derecede farklılaşmış) ve yüksek dereceli (önceden kötü farklılaşmış) tümörler. Derecelendirme, en az farklılaşan bileşene göre yapılır. Epitelyal-mezenkimal geçişin bir işareti olarak tümör tomurcuklanmasının ve az diferansiye kümelerin oluşumunun meydana geldiği tümör stroma invaziv sınırı, tümör derecelendirilirken dikkate alınmamalı, ayrı olarak bildirilmelidir (15). Kolorektal adenokarsinomlarda, diferansiyasyon ve histolojik derece DSÖ 2019 ve DSÖ 2010 kriterleri Tablo 2'de gösterilmiştir (15, 48).

Tablo 2. Kolorektal adenokarsinomlarda histolojik "Derece" kriterleri

Kriter	Diferansiyasyon kategorisi	DSÖ 2010 Derece	DSÖ 2019 Derece
>%95'ten fazla gland oluşumu	İyi diferansiye	Derece 1	Düşük derece (G1)
%50-95 oranında gland oluşumu	Orta diferansiye	Derece 2	Düşük derece (G1)
%0-49 oranında gland oluşumu	Az diferansiye	Derece 3	Yüksek derece (G2)

KOLOREKTAL KARSİNOGENEZ VE MOLEKÜLER SINIFLAMA

KRK'ların patogenezinin anlaşılması, KRK'ların tarama stratejilerinin, prognostik belirteçlerinin ve tedavi süreçlerinin gelişmesinde önemli yer tutmaktadır. Kolorektal karsinogenez; normal hücrenin malign hücreye dönüşümünde onkogenleri aktive eden veya tümör baskılayıcı genleri inaktive eden mutasyonlar dâhil olmak üzere çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi ile karakterizedir. Günümüzde KRK'ların genetik

kararsızlığı ve patogenezinde yer alan üç ana yol vardır; kromozomal instabilite (chromosomal instability-CIN), ‘‘microsatellite’’ instabilite (MSI) ve CpG ada metilatör fenotipi (CpG Island Methylator Phenotype-CIMP) yolları (4).

Kromozomal İnstabilite (Chromosomal instability-CIN)

Kromozomal instabilite (CIN); kromozomal materyalin sürekli olarak artan bir kazanç ve kayıp oranı ile karakterize, KRK'ların % 70 ila % 80'inde izlenen kolorektal karsinogenezdeki genomik instabilitenin en sık nedenidir. CIN'nin sonucunda kromozom sayısında anöploidiye varan dengesizlik, subkromozomal amplifikasyonlar ve heterozigote kaybı ile onkogenlerin aktivasyonu (KRAS ve BRAF), tümör süpresör genlerin inaktivasyonu (APC ve TP53) ve kromozom 18'in (18q LOH) uzun kolu için heterozigotluk kaybı ile karsinogenezisi etkiler (40).

CIN, geleneksel çok aşamalı adenom-karsinom sekansı olarak, Fearon ve Vogelstein'in tanımladığı modelin karşılığıdır. Bu modelde erken dönemde, adenom gelişiminde APC tümör supresör gen mutasyonu gözlenirken, daha ileri dönemde KRAS ve maligniteye geçişte p53 ve 18q delesyonu saptanmaktadır (49). Bu çalışmalara ek olarak, günümüzde, TGF- β R ve PI3KCA'daki genetik anormalliklerin de adenokarsinom sekans modelinde rol oynadığı bulunmuştur. Ayrıca, kromozomal 1p, 5q, 8p, 17p, 18p, 18q, 20p ve 22q'daki kollarında kayıpları içeren, tüm kromozomal kollarda sık sık tekrarlayan birkaç alel kaybı, kromozom 7'de ve kromozom kolları 1q, 8q, 12q, 13q ve 20q'de kromozomal kazanımlar belirlendi (4).

CIN ara yolunda dört önemli sinyal yolağı vardır; WNT, TP53, K-RAS, TGF β /SMAD.

APC Geni ve WNT Sinyal yolağı

2015'te yayınlanan Kanser Genom Atlas'a (The Cancer Genome Atlas-TCGA) göre KRK'ların % 94'ünde, özellikle APC geninde olmak üzere Wnt sinyal yolunun bir veya daha fazla üyesinde mutasyon olduğu belirtilmiştir (50).

Kromozom 5q21-q22 üzerinde bulunan APC geni, tümör süpresör genidir. APC geninin allelerinden biri erken aşamada kaybedilmiş veya kişinin mutant bir allel ile doğduğu öne sürülmektedir. Bu durum KRK'a eğilim oluşturur ve bu ‘‘ilk darbe’’dir. Devamında APC geninin ikinci alleli de kaybedilir, bu ‘‘ikinci darbe’’ olarak adlandırılır. KRAS, TP53, SMAD2, SMAD4 mutasyonlarının da dahil olduğu, ek mutasyonlar sonucu normal epitelden karsinoma giden süreç izlenir. Bu mutasyonların sırası gösterilmekle beraber toplu etkilerinin sıralanmadan daha önemli olduğu belirtilmektedir (Şekil 2).

Somatik ve germline mutasyonlarının yaklaşık %75'i ekzon 15'te görülür. APC geni, Wnt sinyal yolağının düzenlenmesinde rol oynar. Wnt sinyal yolu, farklılaşmamış kök hücreleri, kolonik kriptlerin tabanında tutar ve hem normal hem de kanser kök hücrelerinin hayatta kalmasını sağlar. "Wild" tip APC proteini, transkripsiyon faktörü beta-kateninin ubiquitin aracılı proteazomal parçalanmasını düzenleyerek, Wnt sinyallemesini negatif olarak kontrol eder. APC geninde oluşan mutasyon WNT sinyalinin aktivasyonuna neden olur ve sitoplazmik beta-katenin birikerek nükleusa geçer ve proliferasyondan sorumlu MYC ve siklin D1'i kodlayan transkripsiyon genlerini aktive eder, hücrenin apoptozdan sapmasına izin vererek neoplazinin başlamasına yol açar. Beta-katenin mutasyonları adenomlarda (% 12.5) invaziv kanserden (% 1.4) daha yaygın olmasına rağmen, KRK karsinogenezin erken aşamalarında bulunurlar (4).

APC mutasyonları, Wnt yolağını aktive eden tek tetikleyici değildir. Beta-katenini fosforile ederek bozunmasını sağlayan AXIN1,AXIN2 genlerinde meydana gelen mutasyonlar ve transkripsiyon faktörü TCF-4'teki mutasyonlarda sinyallenmeyi artırır (51).

TP53 Yolağı

P53'ü kodlayan TP53 tümör süpresör geni, bazen "genomun koruyucusu" olarak adlandırılır. 17. Kromozomun kısa kolunda yer alan TP53 geni, hücre döngüsünü, DNA onarımını, yaşlanmayı ve apoptozu düzenleyen proteinleri kodlayan tümör süpresör genidir. KRK olgularının, %50-75'inde TP53 mutasyonu veya fonksiyon kaybı bildirilmektedir (4). Düşük miktarlardaki DNA hasarı ve diğer streslerde, p21 yoluyla hücre döngüsünün arrestini indükleyerek, DNA hasarının onarımına fırsat verir. DNA hasarı daha şiddetli olduğunda BAX (ve diğer proteinler) yoluyla apoptotik hücre ölümünü indükler. Bu mutasyonel olay genellikle sporadik kanserlerde, adenom-karsinom geçişinin geç döneminde izlenirken iltihabi bağırsak hastalığı ile ilişkili karsinogenezde daha erken dönemde meydana gelir (15).

KRAS Yolağı

RAS, GTPaz adlı protein sınıfına ait, tüm hücre organlarında ifade edilen bir protein ailesidir ve rolü hücreler içinde sinyalleri iletmektir. RAS tarafından düzenlenen sinyal yolları, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hücre adezyonu, apoptoz ve hücre göçü gibi süreçleri kontrol eder. RAS ailesinin ana üyeleri, KRAS ve NRAS mutasyonlarıdır (17). KRAS mutasyonları, kendine özgü GTPaz enzimatif aktivitesini azaltarak veya inaktive ederek KRAS onkoproteini aktive eder, böylece proteini GTP'ye bağlı aktif duruma kilitler. Bunun

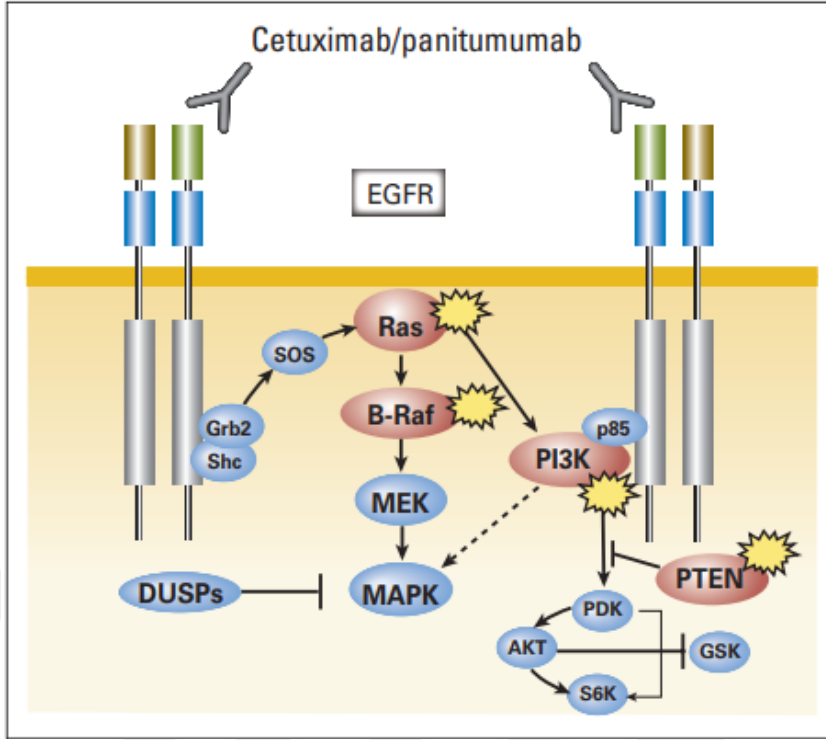
sonucunda da hücre içinde RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) kaskadları aktive olur. MAPK yolu hücre proliferasyonunu stimüle eden, apoptozu inhibe eden süreçleri içerir (15). KRAS proto-onkogenindeki mutasyonlar, KRK'ların yaklaşık% 40'ında, özellikle ekson 2'de, kodon 12 (% 70–80) ve 13'te (% 15–20) meydana gelen somatik ‘missense’ mutasyonlardır (17).

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), KRK'larda başlama ve ilerleme sürecinde önemli rol oynar. Membran bağlı bir reseptör tirozin kinazdır ve reseptörün hücre dışı alanına bağlanan monoklonal antikolar (örneğin cetuximab ya da panitumumab monoklonal antikoları) için anahtar bir hedeftir (17, 52)(Şekil 1).

EGFR sinyal yolağında bulunan KRAS, NRAS nokta mutasyonları, EGFR'yi hedefleyen ajanlara (cetuximab/panitumumab) direnç oluşturur. Bu nedenle, Amerikan Klinik Patoloji Derneği, Amerikan Patologlar Koleji, Moleküler Patoloji Derneği ve Amerikan Klinik Onkoloji Topluluğu yakın tarihli bir kılavuzu, anti-EGFR monoklonal antikor tedavileri öncesi, EGFR sinyal yolu genleri için mutasyonel test yapılmasını önermektedir (16).

RAS yolağında yer alan, PI3K ailesi üyelerinden phosphatidylinositol-4,5 –biphosphate 3-kinase catalyticsubunit alfa (PIK3CA), EGFR'nin aşağısındaki sinyal yollarını düzenleyen bir lipid kinazı kodlar. KRK'larda, PIK3CA mutasyonun %20 oranında yer aldığı bildirilmektedir (53), sıklıkla ekzon 9 (%60-65) ve ekzon 20'de (%20-25) mutasyon görülmekle beraber KRAS mutasyonları eşlik eder (54). PIK3CA mutasyonunun, anti-EGFR monoklonal antikolarla tedaviye dirençte rolü netlik kazanmamıştır (18).

MAPK yolağı aktivasyonunda yer alan BRAF mutasyonu, KRK'ların %8-12'sinde görülür. BRAF mutasyonlarının %90'ı ekzon 15, V600E (valinin glutamate ile değişimi) bölgesinde yer alır. BRAF mutant KRK'lar, sıklıkla ileri yaşta, kadınlarda, sağ kolon yerleşimli ve yüksek dereceli olarak izlenirler (17). BRAF mutasyonu kötü prognozla ve anti-EGFR tedavisine düşük yanıtla ilişkilendirilidir. MLH1 kaybı olan MSI KRK'larda, Lynch Sendromu riskini belirlemek için BRAF V600E mutasyonu değerlendirilir. BRAF mutasyonunun varlığı, sporadik bir patogenezi kuvvetle desteklemektedir, ancak mutasyon sapğtanmaması Lynch Sendromu riskini ortadan kaldırmaz (18).

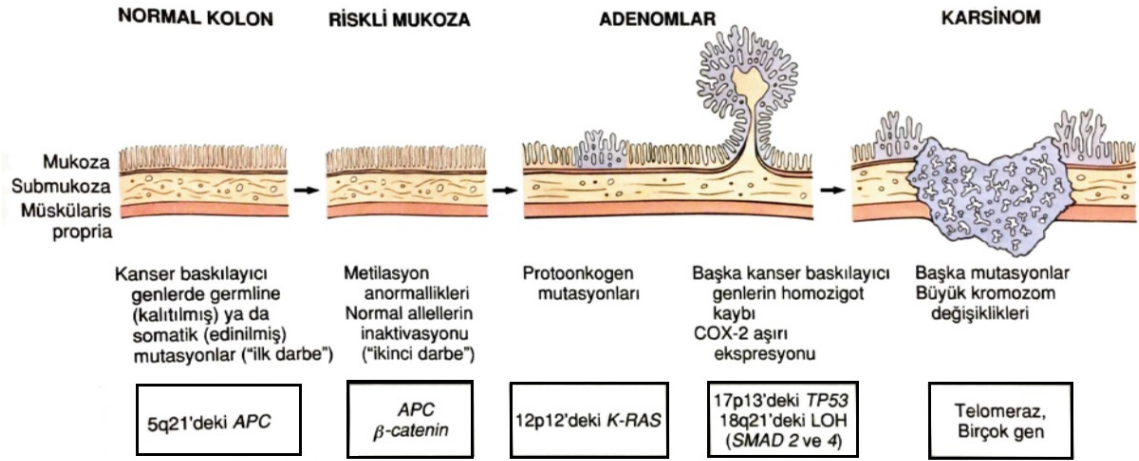


Şekil 1: Monoklonal antikorların ve EGFR aracılı hücre içi sinyal yolağı (52)

TGF β /SMAD Yolağı

18q bölgesindeki LOH, KRK'ların yaklaşık% 70'inde tümör sekansının geç aşamalarında görülür ve kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir. 18q'deki LOH; DCC, SMAD2 ve SMAD4 dahil olmak üzere birkaç tümör supresor genin KRK patogenezindeki varlığını gösterir. DCC; immünglobulin ailesinden proteini kodlar, bu protein hücre adezyonu, hücre göçünde rol oynamaktadır. DCC gen bölgesindeki LOH, CRC'lerin yaklaşık% 70'inde mevcuttur. DCC genindeki mutasyon, hücrenin anormal hayatta kalmasına yol açar.

SMAD2 ve SMAD4, kolorektal karsinogenezin ilerlemesi sırasında yaygın olarak delesyona uğrayan bölge olan 18q21.1'de mevcuttur ve transforming growth factor β (TGF-beta)'yı kodlamaktadır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar, TGF-beta inhibitör yolunun sinyal iletimini azaltır (4, 55) (Şekil 2).



Şekil 2. KRK'larda, adenom-karsinom sekansında görülen moleküler değişiklikler

(55)

Mikrosatellit İnstabilite (MSI)

Sporadik KRK'ların %15-20'sinde, HNPCC sendromu olgularının %95'inden fazlasında mikrosatellit instabilite (MSI) görülür. Mikrosatellitler, genom içinde dağılan, tekrar eden, 1-5 baz uzunluğunda, kısa DNA baz segmentleridir. Tekrarlayan birimlerin DNA replikasyonu esnasında delesyonu veya insersiyonu sonucunda segment uzunluğu değişebilmekte ve ortaya çıkan hatalar normal koşullarda DNA "mismatch" onarım genleri (MMR) tarafından düzeltilmektedir. DNA "mismatch" onarım sisteminde defekt olması sonucunda kodlanan genin ekzonunda oluşan tekrarlayan nükleotid dizileri tamir edilememekte, "frame-shift" mutasyonlar ve bunun sonucunda mikrosatellit instabilitesi (MSI) gelişmektedir (4). MSI olan çoğu KRK'de, MMR işlevinin altında yatan kusur, MLH1 geninin promoter bölgesinin epigenetik CpG ada hipermetilasyonundan kaynaklanır. MSI gösteren KRK'lar prekanseröz lezyonların geleneksel adenomlardan ziyade, serrated polipler, hiperplastik polipler, sapsız serrated lezyonlar, geleneksel serrated adenomlar olduğu alternatif yolu izler (40).

CpG Ada Metilator Fenotip (CIMP)

CpG Ada Metilatör Fenotip, promoter bölgede yer alan CpG dinükleotidlerinin yaygın hipermetilasyonudur. DNA dizisini değiştirmemesi sebebiyle, epigenetik bir değişiklik olarak tanımlanır. CpG adaları, çoğunlukla genin promoter bölgesinde bulunur ve çok sayıda CpG (sitozin-fosfoguanin) dinükleotidlerinden oluşmaktadır. İnsan genlerinin neredeyse yarısı, genin 5'ucunda promoter bölgelerinde CpG adaları bulundurmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerin

veya tümörle ilişkili genlerin promoter CpG ada hipermetilasyonu tarafından inaktivasyonu, hücre proliferasyonuna yol açarak veya hücre apoptozunu veya yaşlanmayı inhibe ederek tümör oluşumuna katkıda bulunur. ‘Mismatch’ onarım geni olan MLH1'in promoter metilasyonu ile etkisizleştirilir, bu sporadik mikrosatellit instabil kolon kanserlerinde MSI'nın moleküler temelidir. Bunu sonucunda sporadik MSI-H KRK'ların, BRAF mutasyonlu yüksek frekansta hipermetillenen CIMP sapsız serrated adenomlardan ortaya çıktığı düşünülmektedir (56).

CIMP ile ilişkili KRK'ler, farklı bir epidemiyolojiye, farklı bir histolojiye, farklı öncü lezyonlara ve farklı moleküler özelliklere sahip gibi görünmektedir. KRAS veya BRAF genlerinde yüksek mutasyon oranı, ‘Wild’ tip p53, proksimal kolon yerleşimi, az diferansiye ve müsinöz histolojik özellikler, ileri tanı yaşı ve kadın cinsiyette daha sık görülmeleri ile karakterizedirler (57).

Yaşa bağlı metilasyona sahip genlerin yaklaşık %50'si KRK patogeneğinde yer alan genlerle aynıdır, bu da yaşlanma ile birlikte artan kanser kabiliyetinde bu genlerin rol oynayabileceğini düşündürmektedir (57).

Kolorektal Kanserlerde Moleküler Sınıflandırma

Günümüzde kanserlerin, farklı moleküler özelliklere ve farklı klinik sonuçlara sahip heterojen bir hastalık grubu olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda, kanserlerin önceki 'mutasyon merkezli' sınıflandırması, zamanla bazı kanser türlerinde klinik sonuçlarla üstün ilişkiler göstermiş olan, kliniğe aktarılmaları için daha çekici hale getiren 'transkriptom bazlı' bir moleküler alt tiplere doğru kaymıştır. Örneğin, meme kanseri hastalarında, ER, PR ve HER2 markerlarına dayanan moleküler alt tiplere, artık bu hastaları uygun tedaviler için sınıflandırmak amacıyla rutin klinik uygulamada yaygın olarak kabul edilmektedir (58).

Gen ifadesine dayalı KRK sınıflandırmalardaki tutarsızlıkları çözmek ve bu grupların klinik yansımalarını belirlemek amacıyla 2015 yılında KRK Alt Tip Belirleme Konsorsiyumu (The CRC Subtyping Consortium-CRCSC) oluşturuldu. Çoklu çalışmalardan RNA ekspresyon profilleme verileri değerlendirilmesi sonucu, transkriptomiklerin, hücre / tümör fenotipi ve klinik davranışla en yakından bağlantılı olan veri seviyesini temsil ettiği kabul edildi. Çekirdek alt tiplerin temel biyolojik özelliklerini belirlemek diğer tüm mevcut veri kaynaklarının (mutasyon, kopya numarası, metilasyon, mikroRNA, proteomik) ve alt tip sınıflandırmasının klinik süreçlerle olan bağlantısı ilişkilendirildi (59). Bunların sonucunda dört konsensus moleküler alt tip grubu (Consensus Molecular Subtypes -CMS) tanımlandı.

CMS 1 (MSI-immün grup): MSI, CIMP-H, TH1 ve sitotoksik T hücrelerinden oluşan yaygın bir immün infiltrat ve BRAF V600E mutasyonları ile karakterizedir. Bu gruptaki olgular, hipermutasyona uğramıştır ve somatik kopya sayısı değişikliği (SCNA) düşük prevalansa sahiptir. Klinik olarak, sağ kolon yerleşimi ve kadınlarda daha sık görülürler. Relaps sonrası, daha kötü genel sağkalım ile ilişkilidir (%14).

CMS 2 (kanonikal grup): Epitelyal farklılaşma özellikleri, aktive WNT ve MYC sinyal yolları ve yüksek somatik kopya sayısı değişiklikleri (SCNA-H) ile karakterizedir. Bu grupta yer alan KRK'lar daha sık sol kolon yerleşimli olup, olgularda relaps sonrası ve genel sağkalım bu grupta daha yüksektir (%37).

CMS 3 (metabolik grup): Metabolik yolların "deregülasyonu", CIMP-L, düşük somatik kopya sayısı değişiklikleri (SCNA-L), KRAS mutasyonları ve karışık Mikrosatellite kararlılık durumu (stabil/instabil, MSS/MSI) karakterizedir (%13).

CMS 4 (mezenkimal grup): Epitelyal mezenkimal geçişte (EMT) yer alan genlerin belirgin "upregülasyonu", TGF β aktivasyonunun, anjiyojenezin, matriks yeniden şekillenme yollarının, stromal infiltrasyonun artmış olması ve yüksek somatik kopya sayısı değişiklikleri (SCNA-H) ile karakterizedir. Klinik olarak bu grupta, daha düşük genel sağkalım ve nüksüz sağkalım izlenmiştir (%23).

KRK olgularının ~% 13'ü, birden fazla CMS'nin veya intratümoral heterojenliğin karışık bir fenotipini sergileyerek belirli bir CMS' de sınıflandırılmamıştır. Her bir moleküler grubun gelişim aşamasında farklı morfolojik lezyonlar ön plana çıkmaktadır. CMS2 ve CMS3 tümörleri, daha çok tübüler adenomlardan gelişirken, CMS1 ve CMS4 tümörleri potansiyel olarak serrated adenomlardan (yeni adıyla sesil serrated lezyon) gelişmektedir (58).

TÜMÖR TOMURCUĞU (BUDDİNG)

Tümör tomurcuklanması (budding), invaziv tümör çevresi stromada bulunan izole tümör hücreleri ya da en fazla 4 hücreden oluşan gruplar şeklinde tanımlanır. Tümör tomurcuklanması intratümöral veya tümör peritümöral olabilmektedir. Peritümöral tomurcuklanma değerlendirilmesi için rezeksiyon materyalleri gerekli iken, intratümöral tomurcuklanma biyopsi materyallerinde de değerlendirilebilir (60). Tümör tomurcuklanması, epitelyal-mezenkimal geçişin histopatolojik yansımasıdır ve mezenkimal benzeri kanser hücrelerini temsil eder. Tümör tomurcuklarında, WNT sinyal yolu proteinleri çoğunlukla

düzensizdir ve adezyon molekülü olan E-cadherinin kaybını gösterirler (61). Aynı zamanda, CD133, LGR5 ve diğer kök hücre belirteçlerinin ekspresyonu tümör tomurcuklarına eşlik etmektedir (62). Histolojik incelemede bu hücrelerin karşılığı olan tümör tomurcuklanması, son zamanlarda tümöre ait özellikleri açıklamada ilgi çekici bir konu olmuştur ve çeşitli kanser türlerinde prognostik önemi üzerine birçok çalışma yapılmıştır (63, 64).

Tümör tomurcuklanması, KRK olgularının seyrinde bağımsız bir prognostik faktör olup, 2016 yılında Uluslararası Tümör Tomurcuklanma Konsensüs Konferansı'nda (ITBCC) kolorektal kanserlerde tümör tomurcuğu değerlendirilmesinde, H&E düzeyinde histopatolojik kriterlere dayalı bir konsensüs oluşturulmuştur (8). Tümör tomurcuklanması KRK'larda pT1 olgularda, lenf nodu metastazının yararlı bir ön görürücüsüdür ve endoskopik tanı alan olgularda tedavide rezeksiyon kararını gündeme getirebilir (65). Evre 2 KRK olgularında, yüksek dereceli tümör tomurcuğu daha kısa hastalıklı yaşam ile ilişkili olup bu hastalarda adjuvan tedavi düşünülebilir (66).

AZ DİFERANSİYE KÜMELER

Az diferansiye kümeler, invaziv tümör çevresi stromada glandüler yapılanma oluşturmada beş ve üzeri tümör hücresinden oluşan gruplar olarak tanımlanmaktadır. KRK'larda umut verici bir olumsuz prognostik parametre olarak görülmekte, agresif histolojik özellikler ve kötü klinik seyir ile ilişkili belirtilmektedir.

Az diferansiye kümeler ve tümör tomurcuklanması arasında güçlü birliktelik saptanması, benzer biyolojik süreçleri temsil ettikleri sonucunu doğurmuştur. KRK'larda yüksek dereceli az diferansiye kümelerin, artmış metastaz riski ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bu ilişki, neoplastik hücrelerin epitelyal özelliklerini kaybederek hücre dışı matriks boyunca göç etmesi ve metastaz yapmak için mezenkimal hücre potansiyelini elde ettiği bir süreç olan, epitelyal-mezenkimal geçiş ile açıklanmaktadır (67).

PDC derecesi, risk sınıflandırması ve tekrarlanabilirlik açısından sürekli olarak geleneksel histolojik dereceden daha iyi performans gösterir.

Az diferansiye kümelerin, tümör tomurcuklanması işle benzer şekilde, evre II KRK olgularında yüksek riskle ilişkili olduğu, adjuvan tedavi kararını vermede yardımcı olacağı ve endoskopik olarak rezeke edilen pT1 olgularda, lenf nodu metastaz riskinin artmasıyla ilişkili olarak radikal cerrahi ihtiyacı ile ilgili kararları vermede etkili olacağı sonucu gündeme gelmektedir (9).

Az diferansiye kümelerin KRK'larda risk sınıflandırması ve tekrarlanabilirlik açısından geleneksel histolojik dereceden daha iyi sonuçlar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İnvaziv tümör sınırında değerlendirilen tümör tomurcuklanması, perinöral invazyon, desmoplastik reaksiyon, Crohn benzeri lenfoid reaksiyon parametrelerinin karşılaştırıldığı çalışmada, az diferansiye kümeler nüksüz sağkalım ve gözlemciler arası uyum açısından diğer parametrelerden daha üstün olarak bulunmuştur (68).

TÜMÖR STROMA ORANI

Tümör mikroçevresinin yapısında, yerel yapıya ait ekstrasellüler matriks proteinlerine gömülü, non-neoplastik endotel hücreleri, fibroblastlar ve immun hücreler bulunmaktadır. Tümör mikroçevresi, tümörün davranışında aktif bir rol oynar. Mikroçevre, tümörün oluşumunda, progresyonunda, tedaviye verdiği cevapta ve metastaz geliştirmesinde önemli rol oynamaktadır (10).

KRK'larda yüksek stroma oranı, artmış bölgesel lenf nodu metastazı ile ilişkili, klinik olarak kullanılan mevcut TNM evrelemesine ek değer sağlayan bağımsız bir prognostik belirteçtir (69). Son KRK Alt Tip Belirleme Konsorsiyumu'nda tümör stromasının önemi vurgulanmıştır. Stroma oranı yüksek olan tümörlerin kötü prognoz, agresif gidişata sahip olan CMS4 kategorisinde yer aldığı görülmüştür (59). Düşük stroma oranına sahip KRK'lar, aktif bir immün mikroçevreye sahip olan MSI tümörlerde daha sık görülmektedir (70).

İNFLAMATUAR HÜCRE REAKSİYONU

KRK'larda tümör mikroçevresinin komponentlerinden, tümöre karşı gelişen inflamatuvar yanıtın prognozla ilişkisi bir çok çalışmayla ortaya konmuş olup, tümörün invaziv sınırında, yüksek dereceli inflamatuvar hücre reaksiyonu varlığı hem sağ kalım; hem de hastalısız sağ kalımda bağımsız olumlu bir prognostik faktör olarak saptanmıştır (11, 12). Evre Tümörü infiltre eden sitotoksik T lenfositlerin yoğun olduğu olguların MSI'nin daha fazla görüldüğü, CMS1 kategorisinde yer aldığı belirtilmektedir (59). MSI olgulara eşlik eden, BRAF V600E mutasyonu tümörü infiltre eden lenfositlerin yoğun olduğu olgularda daha sık görülmekle birlikte KRAS mutasyon durumu ile arasındaki ilişki net değildir (71).

YENİ NESİL DİZİLEME (NEXT GENERATION SEQUANCING)

1953 yılında deoksiribonükleik asitin (DNA'nın) üç boyutlu yapısının ortaya koyulmasıyla devam eden süreçte DNA dizi analiz çalışmaları başlamıştır. Dizileme, bir

nükleik asit molekülündeki nükleotidlerin sırasını belirlemek için tasarlanmış herhangi bir tekniğin genel terimidir (72).

1965'te Robert Holley 74 nükleotidlik taşıyıcı ribonükleik asit (tRNA) molekülünün dizi analizini gerçekleştirmiştir (73) 1977 yılında, günümüzde pek kullanımı olmayan Maxam-Gilbert'ın kimyasal kırılma yöntemi (74) ve günümüzde kullanılan otomatik cihazların temelini oluşturan Sanger'in zincir sonlanma yöntemi (75) ile DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

DNA'nın klinik bir test olarak dizilenmesi ise, 1990'ların ortalarında tanımlanan ve floresan bazlı saptama ile kapiller jel elektroforezi kullanan Sanger dizileme yöntemlerinin otomasyonundan sonra rutin olarak mümkün hale geldi (76).

2001 yılında İnsan Genom Projesi'nin tamamlanmasıyla, okumak istediğimiz alanın uzunluğu arttıkça, "birinci nesil" olarak tanımlanan bu cihazların yerine daha yüksek verimli, daha ucuz teknolojilerin gerekliliği ortaya çıkmış ve "ikinci nesil" platformların kullanımı artmıştır (77).

Yeni nesil dizileme (NGS), DNA dizilerinin eş zamanlı ve paralel okunmasını sağlayan yüksek veri çıktılı bir yöntemdir. Mevcut NGS teknolojileri, aynı anda onlarca ila yüz milyonlarca DNA şablonunu dizileme ve tek bir günde 4 gigabazın üstünde dizileme üretme yeteneğine sahiptir (78). NGS, izole edilen DNA fragmanlarının, klonal olarak amplifiye edilmesi veya tek DNA molekülünün büyük ölçüde paralel dizilimi prensibi ile çalışır. NGS'de dizileme, polimeraz aracılı nükleotit uzantılarının tekrarlanan döngüleri veya yinelemeli oligonükleotit ligasyon döngüleri ile gerçekleştirilir (79).

Günümüzde NGS teknolojileri, kalıtsal hastalıklar, solid ve hematolojik maligniteler, enfeksiyöz hastalıklar, insan lökosit antijen analizi ve fetal kromozom kusurlarını saptamak için noninvaziv prenatal tarama alanlarında kullanılmaktadır (76).

Yeni nesil dizileme yapmak amacıyla Roche/454 Life Sciences, Illumina/Solexa, Applied BioSystem SOLiD, Helios gibi farklı platformlar kullanılmaktadır (79). Bu platformlar bazı adımlarda birbirinden farklılıklar gösterebilir. NGS, temelde şu aşamalardan oluşmaktadır (76).

- 1) DNA izolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA'nın çoğaltılması
- 2) Kütüphane Hazırlığı; DNA'nın fragmente edilmesi, her iki ucuna da adaptörler bağlanması
- 3) Klonal Amplifikasyon
- 4) Dizileme
- 5) Data Analiz

Elde edilen verilerin anlamlı bilgi haline getirilmesi, biyoinformatik aşamasını oluşturur. Bu aşamada ham sinyal lineer DNA dizilerine dönüştürülür. Elde edilen diziler, tipik olarak bir insan genomu referans dizisine hizalanır. Tek nükleotid varyantları, insersiyonlar ve delesyonlar, kopya sayısı varyantları ve diğer yapısal varyasyonları (translokasyonlar, inversiyonlar, vb.) tanımlanır. Tanımlanan varyantların gen ve protein fonksiyonu üzerindeki etkileri incelenir. Saptanan yüksek popülasyon frekansına sahip varyantlar hariç tutularak ve hasta fenotipi ile ilişkili, tahmin edilen en büyük zararlı etkiye sahip nadir varyantlara odaklanılır. Burada varyant önceliklendirilmesi İnsan Gen Mutasyonu Veritabanı (HGMD)(80), İnsanda Çevrimiçi Mendel Kalıtımı (OMIM) ve diğer hastalığa/ lokusa özgü veritabanları kullanılarak yapılır (76).

DNA temelli dizilemenin tamamlayıcısı olan ribonükleik asit (RNA) bazlı transkriptom sekanslaması ise genellikle RNA-seq olarak bilinir. Gen ifadesi profili oluşturma, tek nükleotid polimorfizmi (SNP), alternatif splicing, transkriptomların haritalanması ve miktarının belirlenmesi RNA-seq ile sağlanabilmektedir. RNA-Seq için kullanılan sekanslama kütüphaneleri revers (ters) transkripte RNA'dan üretilen ve daha stabil olan komplementer DNA (cDNA)'dan üretilir. Elde edilen veriler, referans genom veya transkriptom ile hizalanan okuma dizilerine dönüştürülür ve biyoinformatik yöntemlerle analiz edilir (81).

Tıbbi onkoloji, somatik varyantları veya tümörlere özgü dizi varyantlarını belirlemek için dizilemeyi giderek daha fazla kullanmaktadır. Bu somatik varyasyonların varlığı veya yokluğu prognostik bilgi sağlayabilir, tanıya yardımcı olabilir. Ayrıca, birçok ilaç belirli varyantları, genleri veya metabolik yolları hedef aldığından, somatik varyantların belirlenmesi tedavi seçeneklerini etkiler (72).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Teze konu olan çalışmamız için alınan Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun onay yazısı ektedir (Protokol Kodu: TÜTF-GOBAEK 2021/499) (Ek 1).

VAKA SEÇİMİ

Çalışmamıza 2017 yılı nisan ayı ile 2021 yılı ekim ayı tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Moleküler Patoloji Bölümünde, Yeni Nesil Dizileme analizi ile KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA mutasyon durumları değerlendirilen, KRK tanısı alan ve tümör lokalizasyonuna göre cerrahi rezeksiyon yapılmış olan hastalar dahil edildi. Bu kriterlere sahip 112 hasta çalışmaya alındı. Laboratuvar arşivimizde rezeksiyon materyaline ait lam veya blokları bulunmayan, neoadjuvan tedavi almış olan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan ve çalışma kriterlerine uygun 112 adet olguya ait hematoksilin ve eozin (H&E) boyalı kesitler yeniden değerlendirilmiştir. Kesitlerin histopatolojik incelenmesinde tümör alt tiplendirmesi için glandüler diferansiyasyon, ekstraselüler mükün üretimi, taşlı yüzük hücre komponenti, mikropapiller yapı oluşturma özellikleri değerlendirilmiştir. Olguların tümör derece ve evreleri yeniden değerlendirilmiştir. Tümör derecelendirmesi DSÖ 2019 (15) kriterlerine göre, TNM evrelemesi ise AJCC (American Joint Committee on Cancer) 2017 (13) kriterlerine göre yapılmıştır. Her olguda H&E boyalı preparatların tümör tomurcuklanması (budding), az

diferansiye küme, tümör stroma oranı, tümör içi ve çevresi inflamatuvar hücre reaksiyonu, ekstra/intramural vasküler invazyon, lenfovasküler ve perinöral invazyon varlığı açısından değerlendirilmiştir.

Tümör Tomurcuklanması (Budding) Değerlendirilmesi

Tümör tomurcuklanması invaziv tümör çevresi stromada bulunan izole tümör hücreleri ya da en fazla 4 hücreden (gland yapmayan) oluşan gruplar olarak tanımlanmaktadır. İntratümöral veya peritümöral olabilmektedir.

Arşivden çıkarılan, H&E boyalı tümör lamaları taranıp (x20'lik objektifte) tümörün stromaya komşu invaziv kenarında, tümör tomurcuklanmasının en yoğun olduğu alana sahip lam seçilmiştir. Bu lamda invaziv kenarda x10'luk büyütmede 10 alanda "hotspot" lar seçilmiştir. Bu hotspotlar arasından en yüksek tümör tomurcuğu yoğunluğuna sahip alan, Uluslararası Tümör Tomurcuğu Konsensusunun (ITBCC) önerisi olarak , farklı mikroskoplar arasında büyük ölçüde değiştiğinden, alan boyutunun standardizasyonunu sağlamak amacıyla, x20 objektif lens alanına karşılık gelen 0,785 mm² "hotspot" boyutu olarak belirlenerek bu alanda tümör tomurcuğu sayımı yapılmıştır (8). Hesaplanan tümör tomurcuklanması miktarına göre ayrı ayrı 3 gruba ayrılmıştır:

0-4 tomurcuk: Düşük tomurcuklanma (Tt1)

5-9 tomurcuk: Orta dereceli tomurcuklanma (Tt2)

10 veya daha fazla tomurcuk: Yüksek dereceli tomurcuklanma (Tt3)

Müsinöz adenokarsinomlarda ve taşlı yüzük hücreli karsinomlarda, müsin göllerinde asılı bulunan hücreler tümör tomurcukları olarak sayılmamıştır.

Az Diferansiye Kümelerin Değerlendirilmesi

5 veya daha fazla tümör hücresinden oluşan ve gland benzeri bir yapı oluşturmayan stromadaki kümeler, az diferansiye kümeler (ADK) olarak tanımlanmaktadır (82). Az diferansiye kümelerin değerlendirilirken, tümör lamalarında peri/intratümöral alanların tümünde x4 büyütmede az diferansiye kümelerin en yoğun olduğu alan seçildi. Bu alanda, x20 büyütmede az diferansiye kümeler sayılarak, derecelendirildi:

Derece 0: ADK yok

Derece 1: 1-4 ADK

Derece 2: 5-9 ADK

Derece 3: 10 veya daha fazla ADK

Tümör Stroma Oranının Değerlendirilmesi

Tümör stroma oranı değerlendirilirken, stromanın en yüksek miktarda bulunduğu alan x4 büyütme ile seçildi. Bu alanda hem tümör hem de stromanın bulunduğu (alanın dört bir kenarında da tümör adacıkları bulunması gerekmektedir) bir alan x10 büyütme ile belirlendi. Stroma miktarı %10'luk dilimler ile belirlenmiş; değerlendirme sonucunda, stroma oranı >%50 olan olgular yüksek stroma içeren adenokarsinom; ≤%50 olan olgular da düşük stroma içeren adenokarsinom şeklinde gruplandırılmıştır (10). Değerlendirmede seçilen alanda kas dokusu, nekrotik doku, büyük damar yapıları içermeyen bir alan seçmeye özen gösterilmiş olup, müsinöz tümörlerde geniş ekstraselüler müsin gölleri, büyük gland lümenleri içeren alanlar değerlendirme dışı tutulmuştur.

İnflamatuar Hücre Reaksiyonunun Değerlendirilmesi

İnflamatuar hücre reaksiyonu, H&E boyalı kesitlerde tümörün en derin invazyon yaptığı alanda, lenfositler, nötrofiller, eozinofilik granülositlerin bulunma miktarına göre dört dereceli bir skala ile değerlendirildi. Tümörün tamamında ve invaziv sınırdaki inflammatuar hücre reaksiyonu için şu şekilde skorlama yapıldı (12):

Derece 0: İnflamatuar reaksiyon yok ve inflammatuar hücrelerde artış yok.

Derece 1: İnvaziv sınırdaki inflammatuar hücrelerde zayıf ve yamasal artış mevcut, ancak bu hücreler invaziv tümör hücre gruplarını tahrip etmiyor.

Derece 2: Orta dereceli artmış inflammatuar hücreler invaziv kenarda bant benzeri infiltrasyon oluşturuyor ve bazı tümöral glandüler yapılarda destrüksiyon yapıyor.

Derece 3: Çok belirgin artmış inflammatuar reaksiyon mevcut ve invaziv kenarda tümörde sıklıkla glandüler destrüksiyona neden oluyor.

Ekstramural Ve İntramural Vasküler İnvazyonun Değerlendirilmesi

Ekstramural/intramural vasküler invazyon (EMVİ/İMVİ) varlığı, H&E boyalı kesitlerde değerlendirildi. Endotel ile döşeli küçük damarlar lenfatik olarak kabul edilirken, duvarında belirgin muskuler tabaka içeren geniş kalibreli damarlar venöz damar olarak kabul edildi. İMVİ, submukozal ve/veya muskularis propria tabakasında büyük damar invazyonu varlığı olarak tanımlandı. Muskularis proprianın derininde yer alan venöz invazyonlar ise EMVİ olarak değerlendirildi (83).

MOLEKÜLER DEĞERLENDİRME

Olguların H&E boyalı preparatlarından tümör alanları seçildi ve bu alanlar lam üzerinde işaretlendi. Bu lamlara ait parafin blokları blok arşivinden çıkarıldı. Formolin fikse parafine gömülü hazır bloklarından bu tümör alanını içeren 5 mikron kalınlığında 2-3 kesit alınıp, bir kısım olgunun lamdan kazınan dokularından, bir kısım olgunun da direkt olarak mikrosantrifüj tüpüne kesilen dokularından DNA izolasyonu yapıldı.

75 olguya ait izole edilen DNA'ya, QIAGEN (Hilden, Germany, Seri Numarası: G1709015) Gene Reader Next Generation Sequencing sistem cihazında Gene Read DNA Sequencing Panel PCR V2 kiti (Ref. Numarası: 181940) ve GeneReadQIAact Panel, Actionable Insights Tumor Panel kiti (Ref. Numarası: 181910), (84), 27 olguya ait izole edilen DNA'ya Gene Read AIT DNA Umi kiti (Ref. Numarası: 181911) (85), kullanılarak mutasyon incelemesi yapıldı. QIAGEN Gene Reader Next Generation Sequencing System klavuzu takip edilerek, nükleik asit ekstraksiyonu, PCR zincir reaksiyonu ile hedeflenen DNA bölgelerinin çoğaltılması/genişletilmesi, kitaplık hazırlığı, sekanslama Ardından data analiz ve raporlama basamakları takip edildi.

10 olguya ait izole edilen DNA'ya ise, Illumina NextSeq 550 (seri numarası: NB552376) sistem cihazında, Qiaseq Targeted DNA Custom Panel kiti (Ref. Numarası: 333525) kullanılarak mutasyon incelemesi yapılmıştır (86). Olgulara ait elde edilen KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA mutasyon sonuçları değerlendirilmiştir.

Elde edilen mutasyon analizi sonucunda, Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji ve Moleküler Patoloji Derneğinin yayınladığı klavuzda yer alan sınıflamaya göre 1) patojenik (pathogenic), 2) muhtemel patojenik (likely pathogenic), 3) önemi belirsiz (uncertain significance) kategorilerine dahil olan mutasyonlar dikkate alındı (87). Bu sınıflamaya göre 4) muhtemel benign (likely benign) ve 5) benign sınıflarına dahil olan mutasyonlar çalışmaya alınmadı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilere ilişkin sayısal sonuçlar ortalama \pm standart sapma, minimum, maksimum, sayı ve yüzde (%) olarak hesaplandı.

Mutasyon varlığına göre tümör tomurcuğu, az diferansiye küme, tümör stroma oranı, inflamatuvar hücre reaksiyonu, ektramural vasküler invazyon, intramural vasküler invazyon, tümör lokalizasyonu, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, primer tümör evresi, primer lenf nodu evresi, histolojik tümör alt tipi, müsinoz komponent varlığı parametrelerinin

karşılaştırılmasında Pearson, Yates ya da Fisher-Ki-Kare testlerinden uygun olanı kullanıldı. Olası risk faktörlerinin değerlendirilmesinde odds ratio ve %95 güven aralığı değeri hesaplandı.

$P < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınır değeri olarak kabul edildi. İstatistiksel analizler T.Ü. Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalında SPSS 20.0 (Lisans No:10240642) paket programı kullanılarak yapıldı.



BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen kolorektal adenokarsinom tanısı almış 112 olgunun, 28'i (%25,0) kadın, 84'ü (%75,0) erkekti. Çalışmaya dahil edilen 112 olgunun yaş dağılımları incelendiğinde, en düşük yaş 25, en yüksek yaş ise 85 olarak belirlenmiştir. Ortalama yaş 63 ± 11 olarak bulundu. Olguların yaş dağılımı, 25-85 yaşları arasında olup ortalama yaş 63,4'tür. Olguların 38'i (%33,9) sağ kolon, 74'ü (%66,1) sol kolon yerleşimli tümör bulundurmaktadır. Sağ kolon yerleşimli tümörlerin 15'i (%53,7) kadın, sol kolonda yerleşimli tümörlerin 61'i (%72,6) erkek olarak saptanmış olup; sağ kolon yerleşimli tümörler kadınlarda, sol kolon yerleşimli tümörler erkeklerde istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla bulunmuştur ($p=0,020$).

Çalışmamızda 93 vaka (%83,0) adenokarsinom, ÖOT (Şekil 4), 15 vaka (%13,4) müsinöz adenokarsinom (Şekil 5), 4 vaka (%3,6) taşlı yüzük hücreli karsinom (Şekil 6) histopatolojik tanı alt gruplarına aitti (Şekil 3). Altmış dört (%58,2) olguda, tümörde müsinöz komponent görülmezken, 46 (%41,8) olguda, tümörde %50'nin altında müsinöz komponent izlendi. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) derecelendirme sitemine göre, vakaların 94'ü (%83,9) düşük dereceli, 18'i (%16,1) yüksek dereceli olarak izlendi. Olguların primer tümör evresi değerlendirildiğinde 8'i (%8,9) T2, 64'ü (%57,1) T3, 31'i (%27,7) T4a, 7'si (%6,3)'ü T4b olarak bulundu. Olguların primer nod evresi, 49'unun (%43,8) N0, 15'inin (%13,4) N1a, 11'inin (%9,8) N1b, 11'inin (%9,8) N1c, 19'unun (%17,0) N2a, 7'sinin (%6,3) N2b olarak izledi. Olguların 72'sinde (%64,3) lenfovasküler invazyon görülürken, 40'ında (%35,7) görülmedi. Otuz beş (%31,3) vakada perinöral invazyona sahipken, 77 (%68,8) vakada perinöral invazyon görülmedi (Tablo 3)(Şekil 7).

Olguların 92'sinde (%84,1) tümör tomurcuğu izlenirken, 20'sinde (17,8) tümör tomurcuğu izlenmedi. Tümör tomurcuğu izlenen olguların derecelendirilmesinde, 23'ü (%25,0) derece 1, 25'i (%27,1) derece 2, 44'ü (%47,8) derece 3 olarak saptandı. Olguların 101'inde (%90,1) az diferansiye kümeler izlenirken, 11'inde (%9,8) az diferansiye küme izlenmedi. Az diferansiye küme derece sınıflamasında, 39 vaka (%38,6) derece 1, 34 vaka (%33,6) derece 2, 28 vaka (%27,7) derece 3 olarak saptandı (Şekil 9, 10, 11). Tümör stroma oranı değerlendirilmesinde, 60 vaka (%53,5) stroma oranı düşük (Şekil 13) olup, 52 vaka (%46,4) stroma oranı yüksek (Şekil 14) bulundu. İnflamatuar hücre reaksiyonu, olguların 7'sinde (%6,2) derece 0, 32'sinde (%28,5) derece 1, 38'inde (%33,9) derece 2, 35'inde (%31,2) derece 3 olarak saptandı (Şekil 12). Olguların 85'inde (%75,8) ektramural vasküler invazyon izlenirken, 27'sinde (%24,1) izlenmedi (Şekil 8). İntramural vasküler invazyon değerlendirilmesinde 86 vakada (%76,7) saptanırken, 26 vakada (%23,2) görülmedi. (Tablo 3).

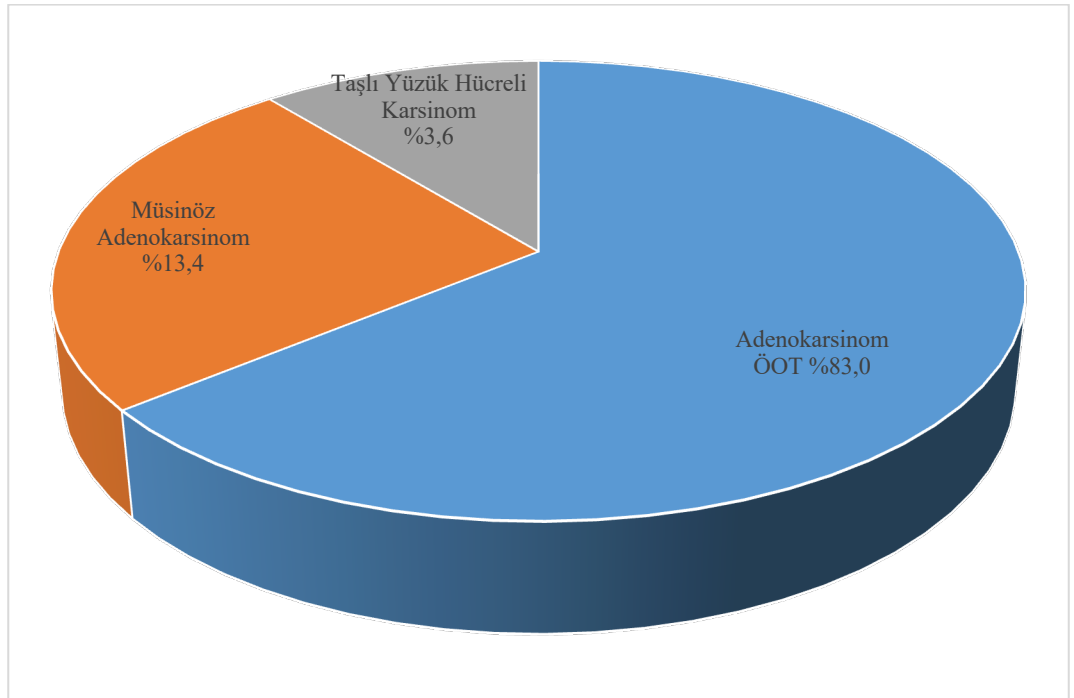
Tablo 3. Olgulara ait klinikopatolojik özellikler

Klinikopatolojik Parametre	n (%)	
Cinsiyet	Erkek	84 (%75,0)
	Kadın	28 (%25,0)
Yaş	Ortalama±Standart sapma	63±11
	Ortanca (minimum-maksimum)	64 (25-85)
Histolojik Alt Tip	Adenokarsinom, ÖOT	93 (%83,0)
	Müsinöz Adenokarsinom	15 (%13,4)
	Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom	4 (%3,6)
Tümör Lokalizasyonu	Sağ	38 (%33,9)
	Sol	74 (%66,1)
Derece	Düşük	94 (%83,9)
	Yüksek	18 (%16,1)
T evresi	T2	8 (%8,9)
	T3	64 (%57,1)
	T4a	31 (%27,7)
	T4b	7 (%6,3)
N evresi	N0	49 (%43,8)
	N1a	15 (%13,4)
	N1b	11 (%9,8)
	N1c	11 (%9,8)
	N2a	19 (%17,0)
	N2b	7 (%6,3)
Lenfovasküler invazyon	Var	72 (%64,3)
	Yok	40 (%35,7)
Perinöral inazyon	Var	35 (%31,3)

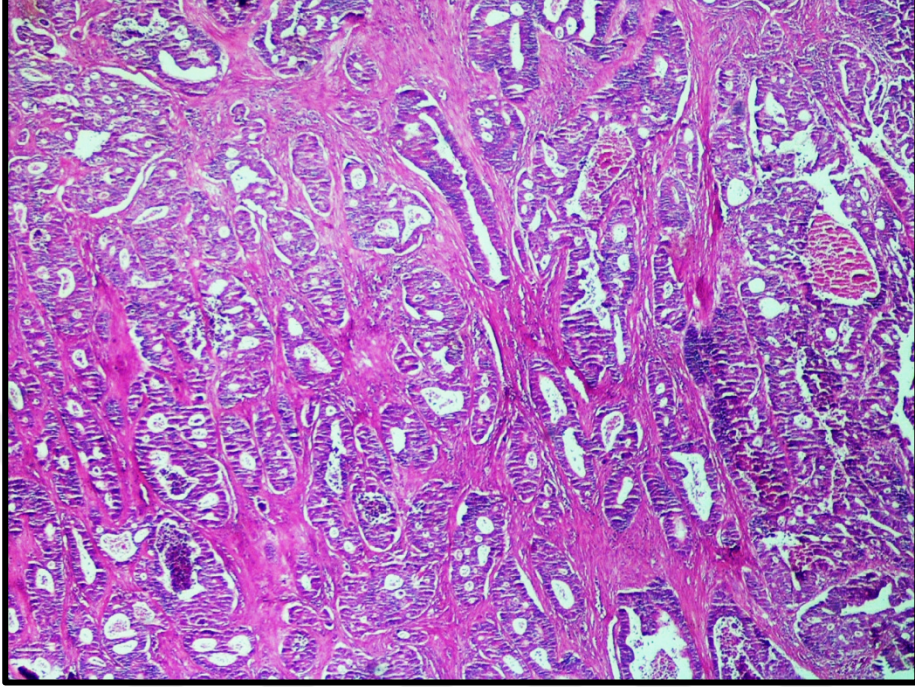
	Yok	77 (%68,8)
--	-----	------------

Tablo 3. (devamı) Olgulara ait klinikopatolojik özellikler

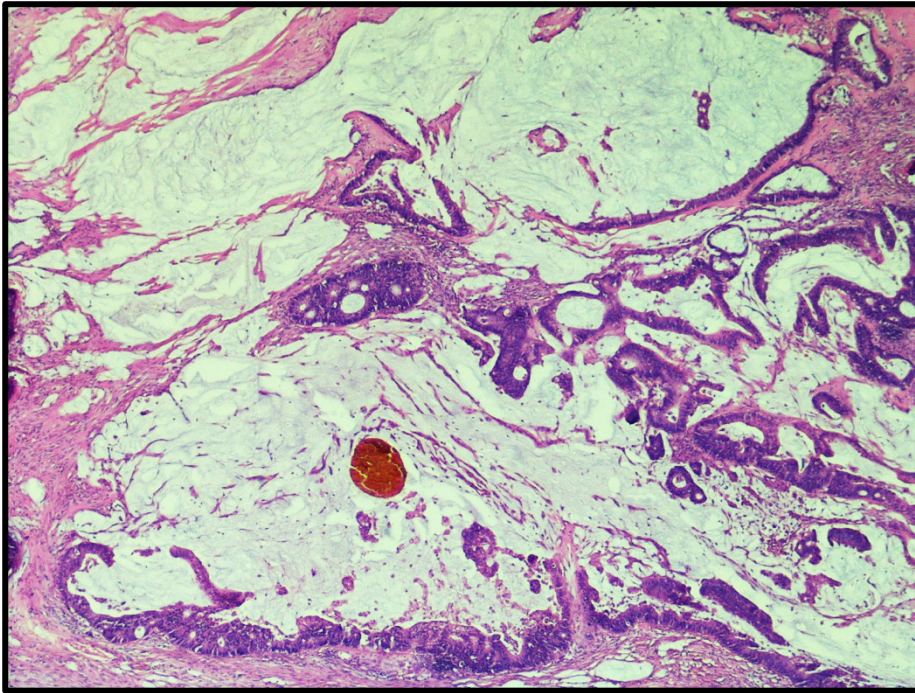
Klinikopatolojik Parametre		n (%)
Müsinöz komponent	Var (%50'nin altında)	46 (%41,8)
	Yok	64 (%58,2)
Tümör tomurcuğu	Var	92 (%84,1)
	Yok	20 (17,8)
Tümör tomurcuğu derece	Derece 1	23 (%25,0)
	Derece 2	25 (%27,1)
	Derece 3	44 (%47,8)
Az diferansiye küme	Var	101(%90,1)
	Yok	11 (%9,8)
Az diferansiye küme derece	Derece 1	39 (%38,6)
	Derece 2	34 (%33,6)
	Derece 3	28 (%27,7)
Tümör stroma oranı	Stroma düşük	60 (%53,5)
	Stroma yüksek	52 (%46,4)
İnflamatuar hücre reaksiyonu	Derece 0	7 (%6,2)
	Derece 1	32 (%28,5)
	Derece 2	38 (%33,9)
	Derece 3	35 (%31,2)
Ekstramural vasküler invazyon	Var	85 (%75,8)
	Yok	27 (%24,1)
İntramural vasküler invazyon	Var	86 (%76,7)
	Yok	26 (%23,2)



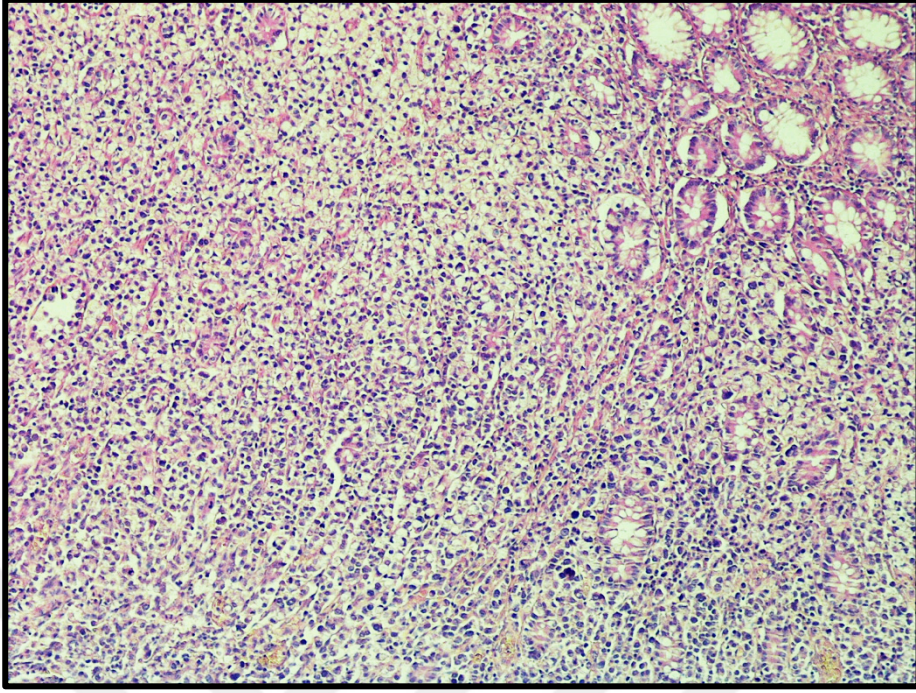
Şekil 3. Olguların histolojik alt tip dağılım durumu (%)



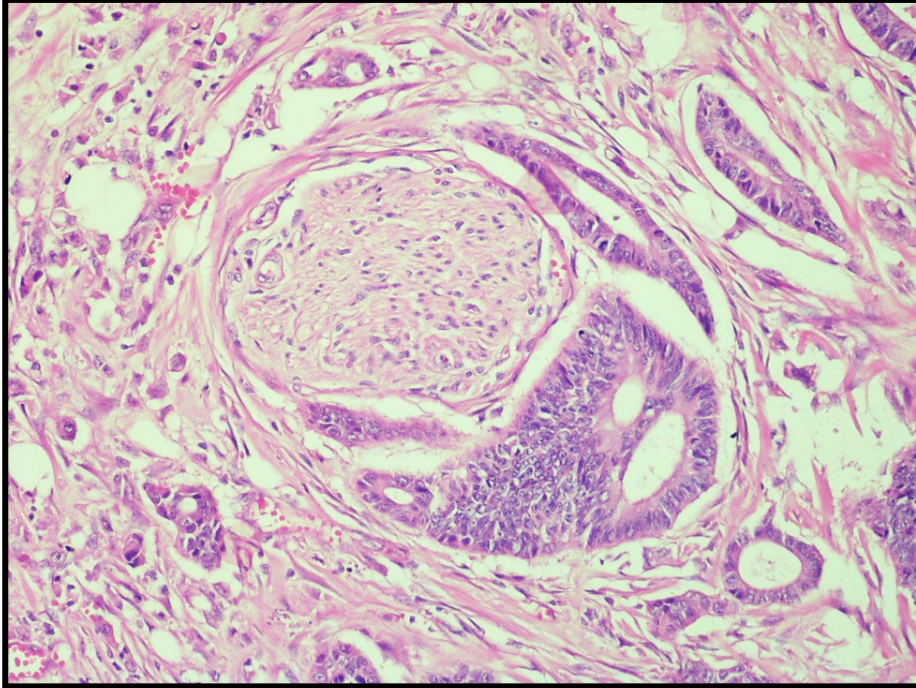
Şekil 4. Adenokarsinom özelliği olmayan tümör (ÖÖT) mikroskopik görünüm. (H&E boyama, X40)



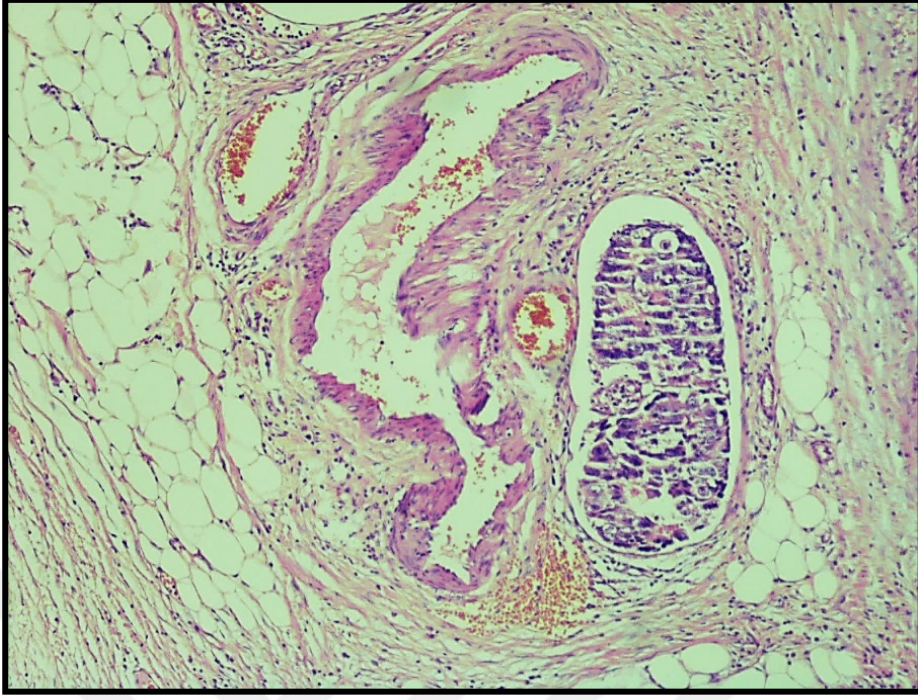
Şekil 5. Müsinöz Adenokarsinom, mikroskopik görünüm. (H&E boyama, X40)



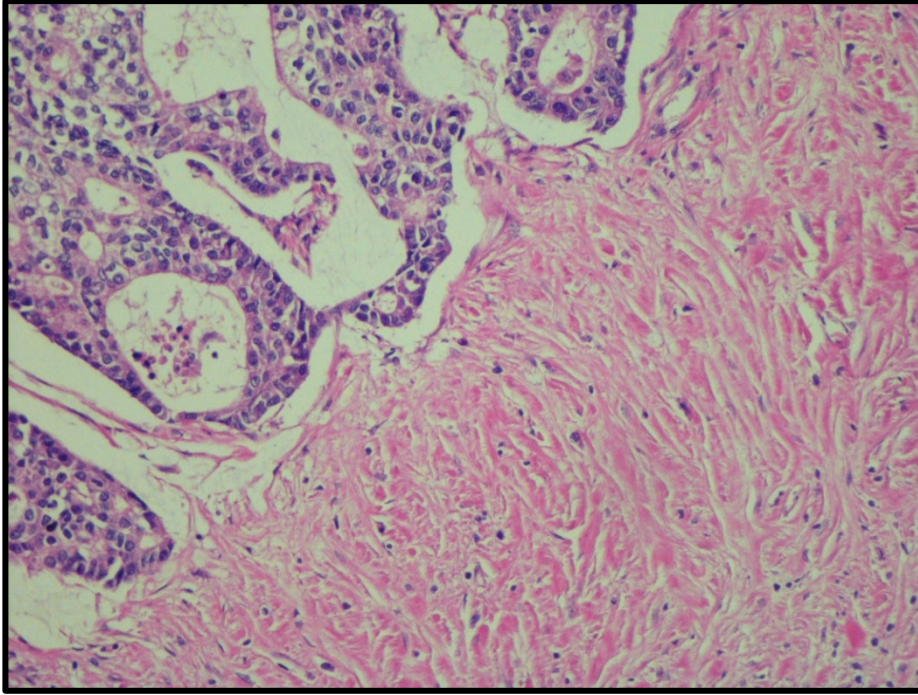
Şekil 6. Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom mikroskopik görünüm. (H&E, X40)



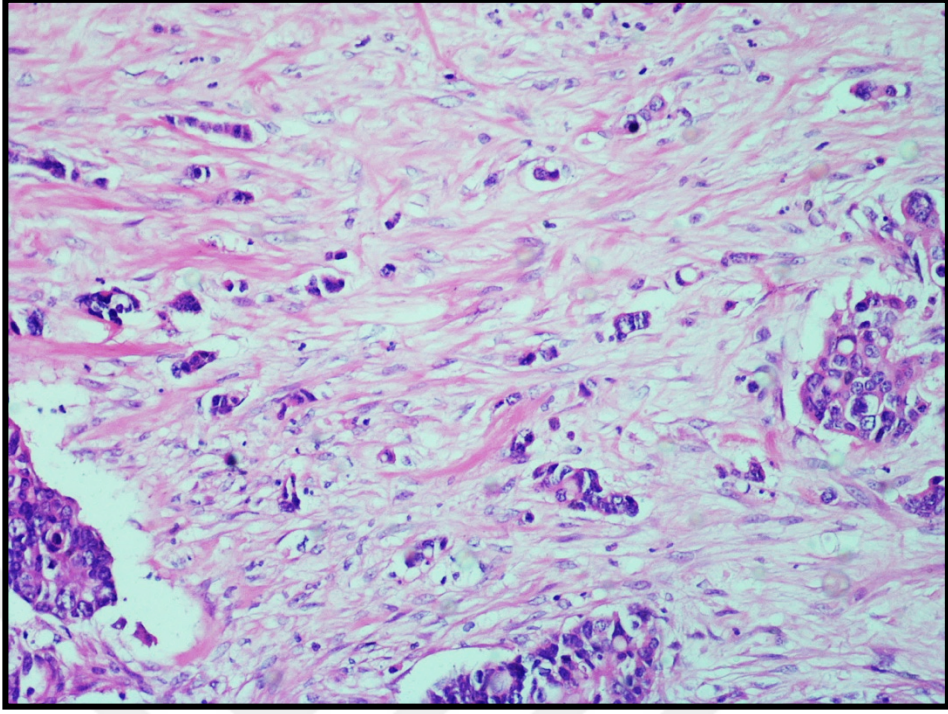
Şekil 7. Perinöral invazyon, mikroskopik görünüm. (H&E boyama, X200)



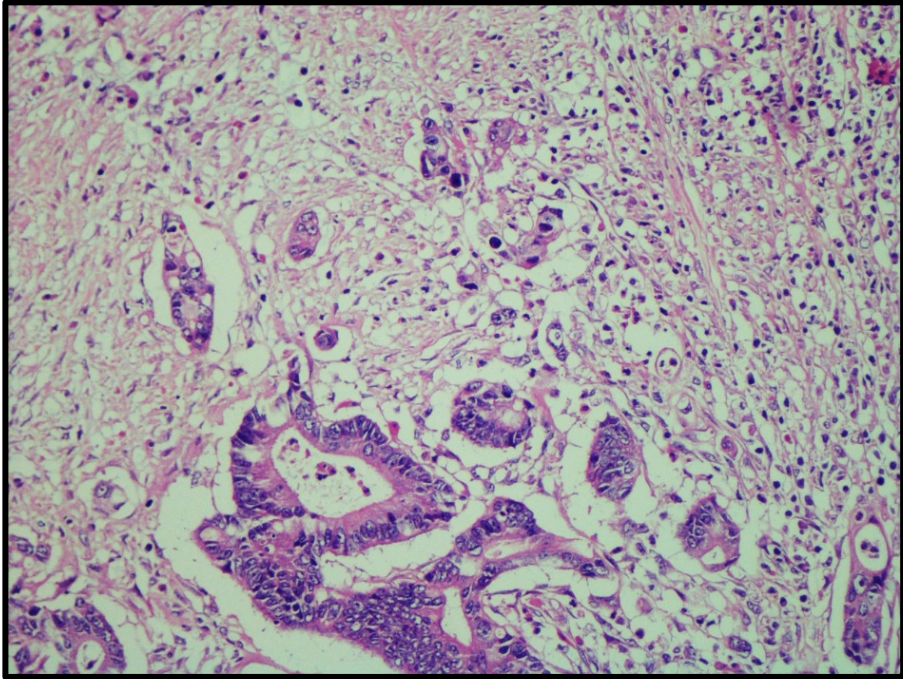
Şekil 8. Ekstramural vasküler invazyon, mikroskopik görünüm (H&E boyama, X100).



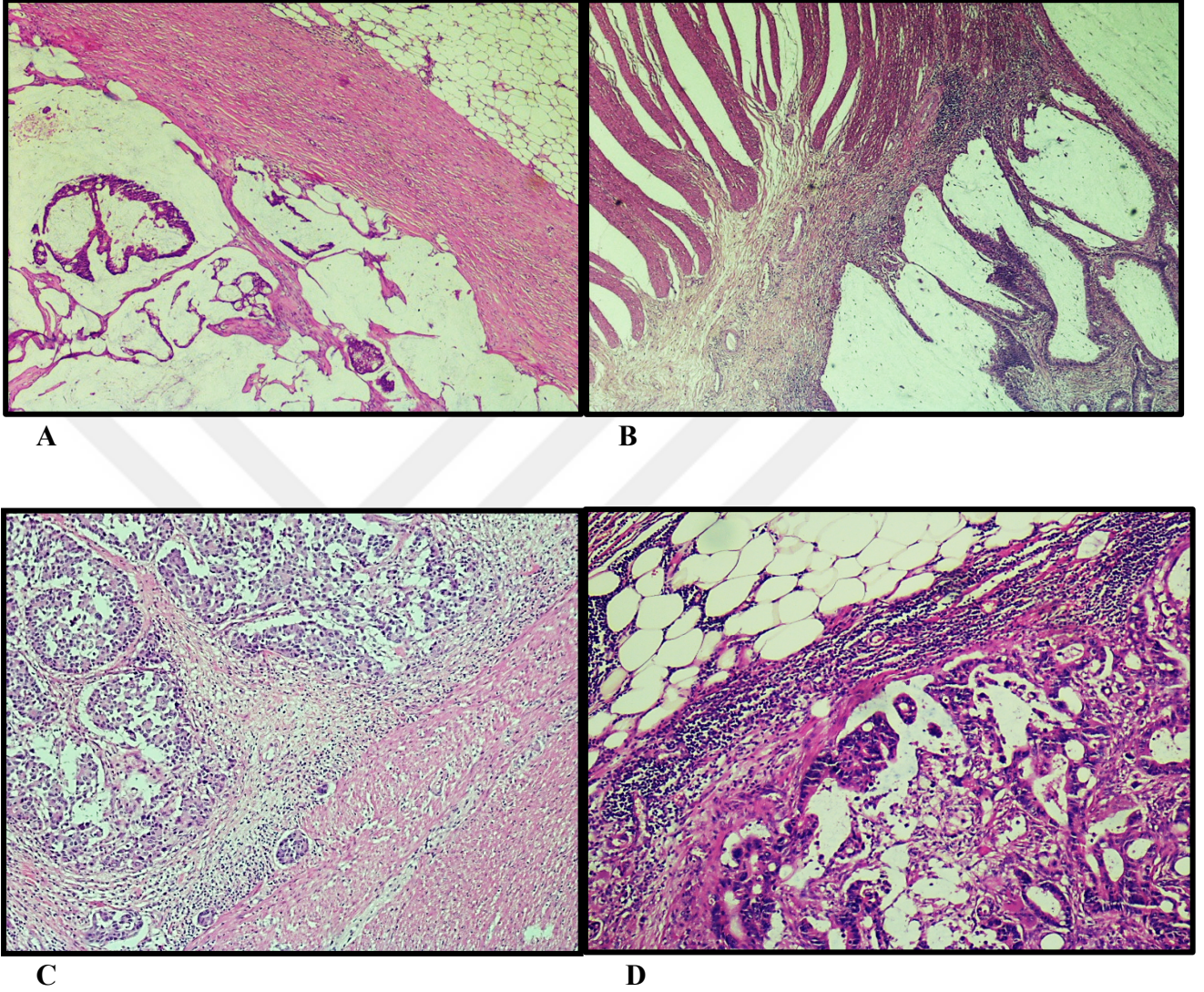
Şekil 9. Düşük dereceli, tümör tomurcuklaması ve derece 0 ADK izlenen alanların mikroskopik görünümü. (H&E boyama, X200)



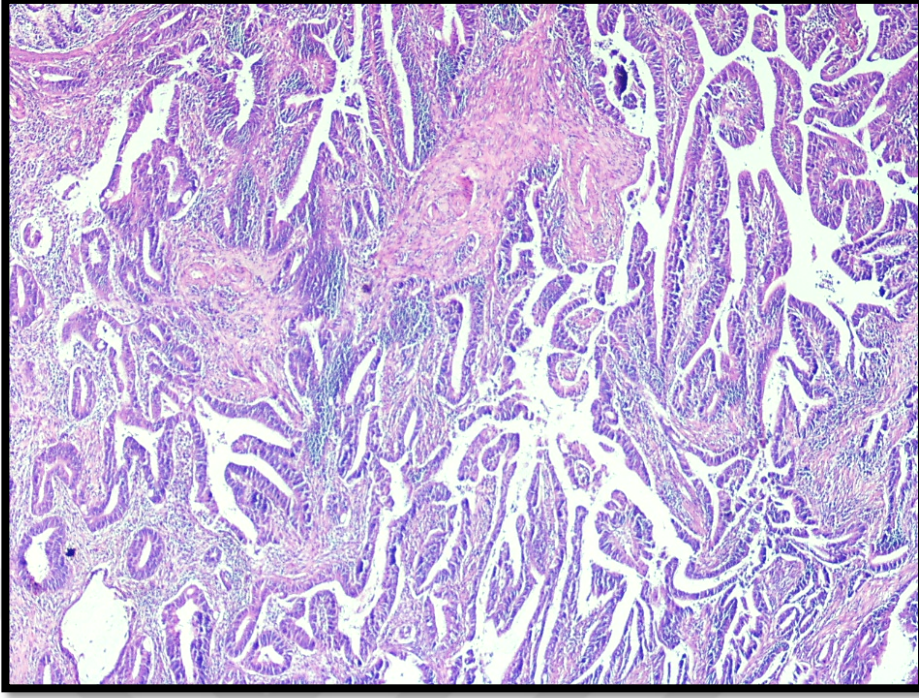
Şekil 10. Düşük dereceli, derece 0 ADK ve yüksek dereceli, derece 3 tümör tomurcuğu izlenen alanların mikroskopik görünümü. (H&E boyama, X200)



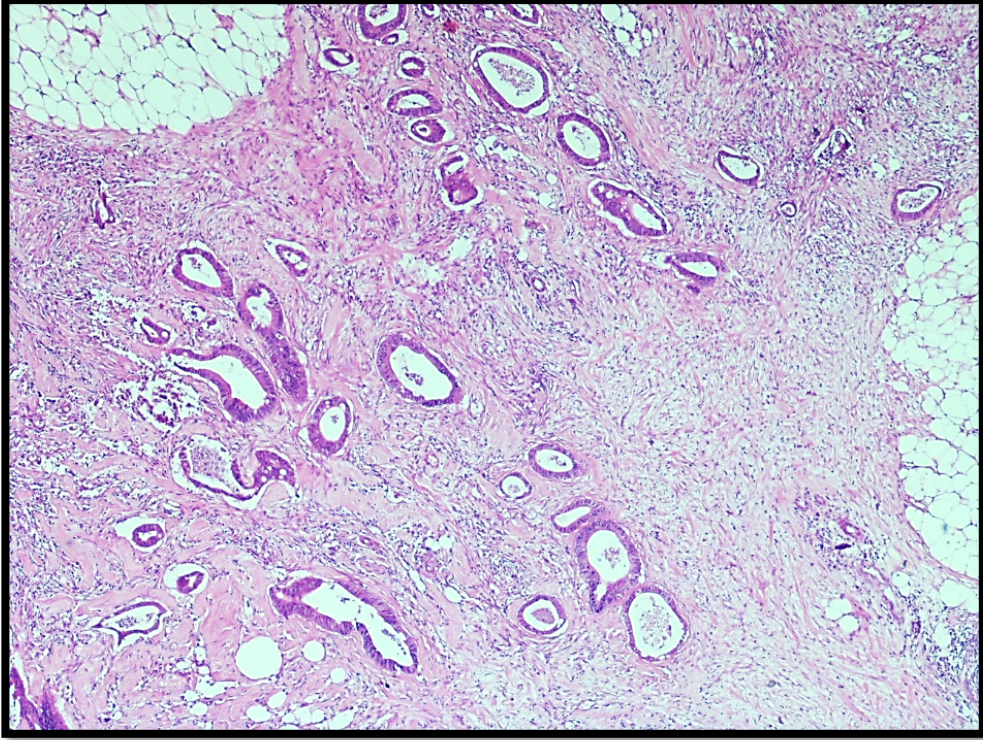
Şekil 11. Orta dereceli, derece 2 ADK ve orta dereceli, derece 2 tümör tomurcuğu izlenen alanların mikroskopik görünümü. (H&E boyama, X200)



Şekil 12. a. Grade 0 inflamasyon. K&M kriterlerine göre düşük dereceli peritümöral inflamatuvar yanıt mikroskopik görünümü. (H&E boyama, X40) b. Grade 1 inflamasyon. K&M kriterlerine göre düşük dereceli peritümöral inflamatuvar yanıt mikroskopik görünümü. (H&E boyama, X40) c. Grade 2 inflamasyon. K&M kriterlerine göre yüksek dereceli peritümöral inflamatuvar yanıt mikroskopik görünümü. (H&E boyama, X100) d. Grade 3 inflamasyon. K&M kriterlerine göre yüksek dereceli peritümöral inflamatuvar yanıt mikroskopik görünümü. (H&E boyama, X100)



Şekil 13. Tümör stroma oranı, stroma oranı düşük mikroskopik görünüm (H&E boyama, X40)



Şekil 14. Tümör stroma oranı, stroma oranı yüksek mikroskopik görünüm (H&E boyama, X40)

OLGULARIN MUTASYON PROFİLLERİ

Moleküler inceleme sonucunda, olguların 63'ü (%56,3) KRAS mutant olarak saptanırken, 49'u (%43,8) yabancıl tip (wild tip) olarak saptanmıştır. KRAS mutasyonlarının 49'u (%77,7) ekzon 2'de, 6'sı (%9,8) ekzon 3'de, 5'i (%8,2) ekzon 4'te saptanırken, 2'si (%3,3) nükleik asit değişim bölgesi protein kodlayan ekzon bölgesine denk gelmediğinden, herhangi bir ekzon bölgesinde saptanmamıştır.

KRAS ekzon 2 bölgesi mutasyonlarının, 31'i (%27,3) kodon 12, 15'i kodon 13 (%23,3), 2'si (%3,1) Q22K kodonunda, 1'i (%1,5) A18D kodonundadır. KRAS ekzon 3 mutasyonlarının, 5'i (%4,4) kodon 61'de, 1'i (1,5) kodon 59'da yer almaktadır. KRAS ekzon 4'te mutasyonlarının ise, 3'ü (%4,6) kodon 146'da, 2'si (%3,0) kodon 117'dedir. Bir olguda KRAS, ekzon 2 ve 4'te senkron mutasyon saptanmıştır (Şekil 15).

Olguların 104'ü (%92,9) NRAS wild tip, 8'i (%7,1) mutant olarak saptandı. NRAS mutasyonlarının 3'ü (%2,6) ekzon 2, kodon 12'de, 4'ü (%3,3) ekzon 3, kodon 61'de, 1'i (%0,8) ekzon 3, kodon 80 bölgesinde izlenmiştir (Şekil 16).

BRAF mutasyonu vakaların 8'inde (%7,1) izlenirken, 104'ünde (%92,9) mutasyon izlenmemiştir. BRAF mutasyonlarının 7'si (%87,5) ekzon 15, kodon 600'de, 1'i (%12,5) ekzon 11, kodon 469'da izlenmiştir (Şekil 17).

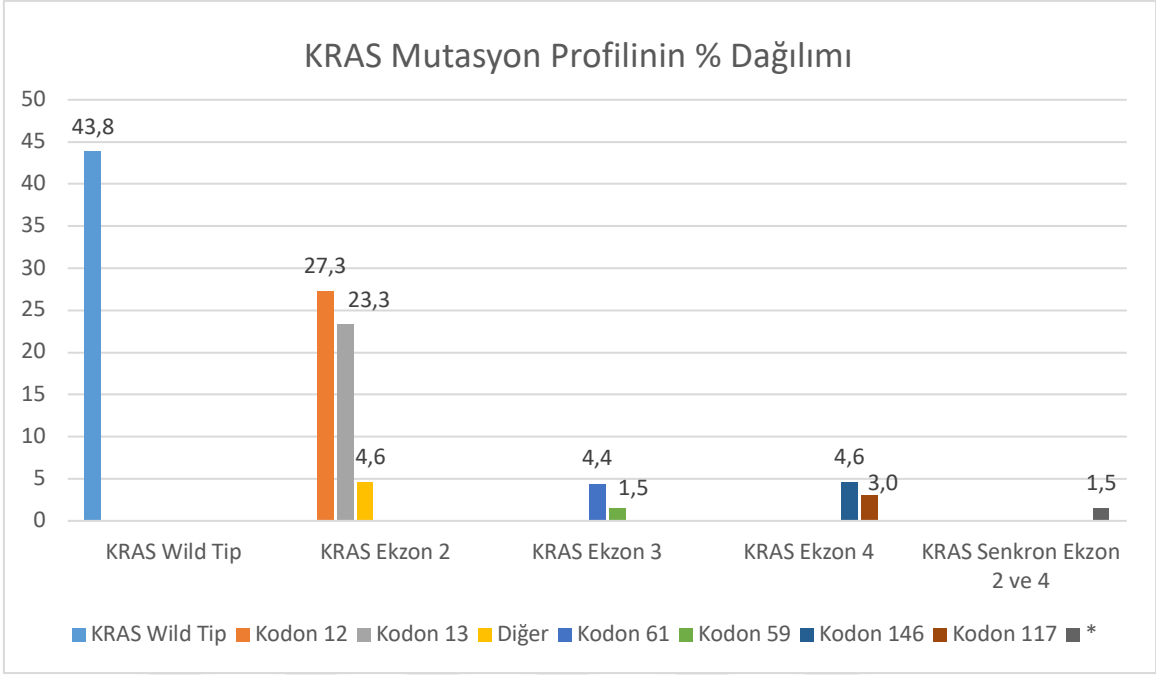
PIK3CA mutasyonu olguların 29'unda (%25,9) izlenmiş olup, olguların 83'ü (%74,1) wild tip olarak izlendi. PIK3CA mutasyonu izlenen olguların, 13'ü (%44,8) ekzon 9, 2'si (6,8) ekzon 2, 2'si (6,8) ekzon 7, 2'si (%6,8) ekzon 8, 1'i (%3,4) ekzon 14, 4'ü (%13,7) ekzon 21 bölgelerinde izlenmiştir. PIK3CA, 2'sinde ekzon 5 ve 21'de senkron olarak, 2'sinde ekzon 2 ve 9'da senkron olarak, 1'inde ekzon 20 ve 21'de senkron olarak mutant izlenmiştir (Şekil 18).

Tablo 4'e KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA genlerine ait izlenen mutasyon profilleri gösterilmektedir.

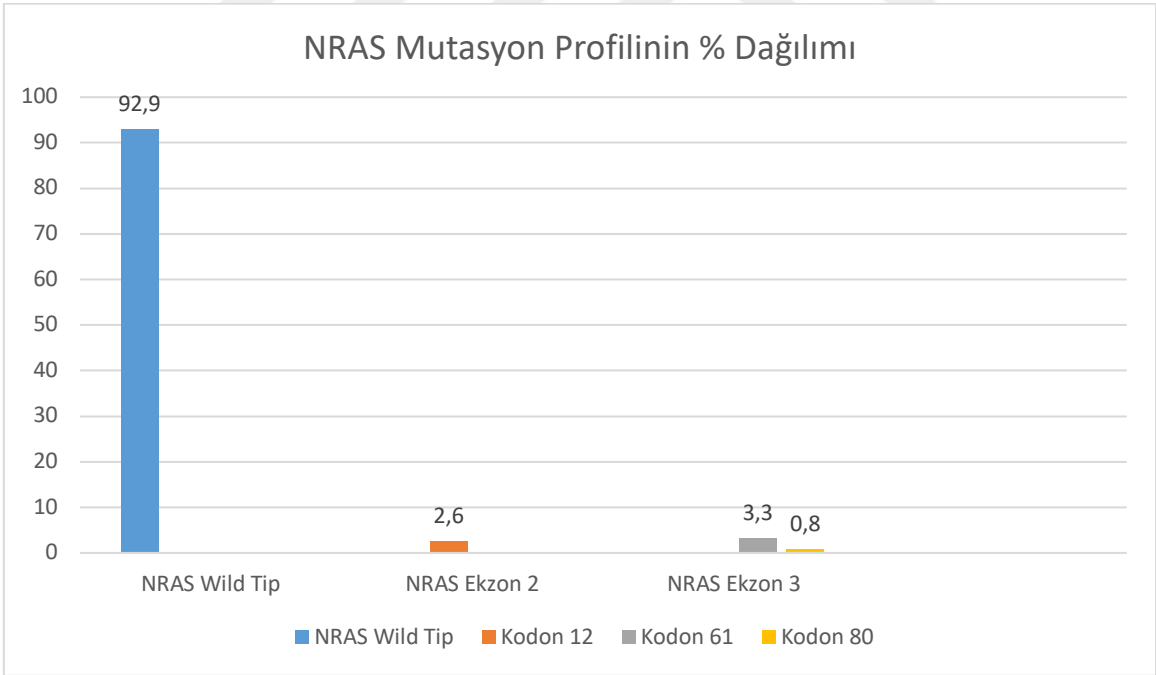
Tablo 4. KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA genlerine ait izlenen mutasyon profilleri

Mutasyon	Ekzon	Kodon	Aminoasit Değişimi	n (%)	
KRAS Wild Tip				49 (%43,8)	
KRAS mutant	Ekzon 2	Kodon 12	p.G12D	11 (%9,8)	
			p.G12V	9 (%8,0)	
			p.G12A	5 (%4,4)	
			p.G12S	3 (%2,6)	
			p.G12C	2 (%1,7)	
			p.G12R	1 (%0,8)	
		Kodon 13	p.G13D	14 (%12,5)	
			p.G13R	1 (%0,8)	
			Diğer kodonlar	p.Q22K	2 (%3,1)
	p.A18D	1 (%1,5)			
	Ekzon 3	Kodon 61	p.Q61H	5 (%4,4)	
		Kodon 59	p.A59G	1 (%1,5)	
	Ekzon 4	Kodon 146	p.A146T	2 (%3,1)	
			p.A146V	1 (%1,5)	
		Kodon 117	p.K117N	1 (%1,5)	
p.K117T			1 (%1,5)		
Ekzon 2 ve 4	Ekzon 2			1 (%1,5)	
	Ekzon 4				
-*		-*	-*	2 (%3,1)	
NRAS Wild Tip				104 (%92,9)	
NRAS mutant	Ekzon 2	Kodon 12	p.G12D	3 (%2,6)	
	Ekzon 3	Kodon 61	p.Q61K	2 (%1,7)	
			p.Q61R	1 (%0,8)	
			p.Q61H	1 (%0,8)	
		Kodon 80	p.L80W	1 (%0,8)	
BRAF Wild Tip				104 (%92,9)	
BRAF mutant	Ekzon 15	Kodon 600	p.V600E	7 (%6,2)	
	Ekzon 11	Kodon 469	p.G469A	1 (%0,8)	
PIK3CA Wild Tip				83 (%74,1)	
PIK3CA mutant	Ekzon 2	Kodon 38	p.R38L	1 (%0,8)	
		Kodon 13	p.G13D	1 (%0,8)	
	Ekzon 7	Kodon 1391	p.1391M	2 (%1,7)	
	Ekzon 8	Kodon 263	p.G263A	2 (%1,7)	
	Ekzon 9	Kodon 545	p.E545K	4 (%3,5)	
		Kodon 542	p.E542K	5 (%4,4)	
		Kodon 546	p.E546K	3 (%2,6)	
		Kodon 93	p.R93W	1 (%0,8)	
	Ekzon 14	Kodon 697	p.M697V	1 (%0,8)	
	Ekzon 21	Kodon 1047	p.H1047R	3 (%2,6)	
		Kodon 1025	p.T1025A	1 (%0,8)	
	Ekzon 5 ve 21	Ekzon 5	Kodon 334	p.V334M	2 (%1,7)
		Ekzon 21	Kodon 1047	p.H1047R	
	Ekzon 2 ve 9	Ekzon 2	Kodon 88	p.R88Q	2 (%1,7)
		Ekzon 9	Kodon 545	p.E545K	
Ekzon 20 ve 21	Ekzon 20	Kodon 974	p.T974P	1 (%0,8)	
	Ekzon 21	Kodon 1066	p.A1066V		

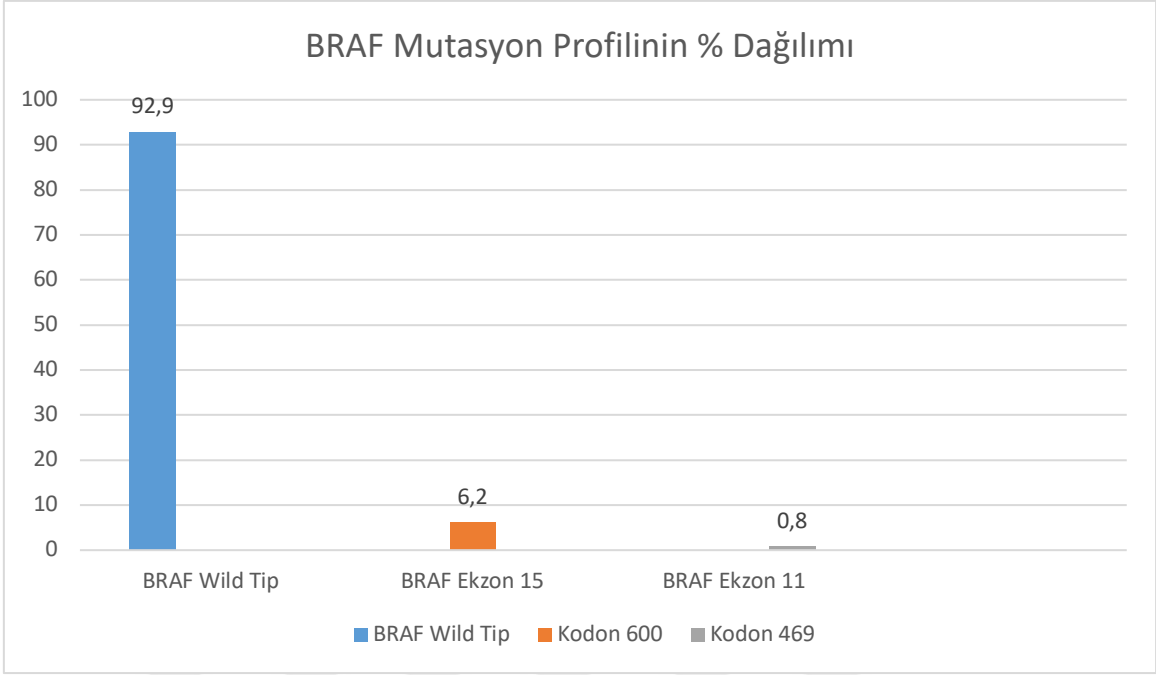
*Nükleik asit değişim bölgesi, aminoasit kodlayan ekzon bölgesine denk gelmediğinden aminoasit değişimi izlenmemiştir.



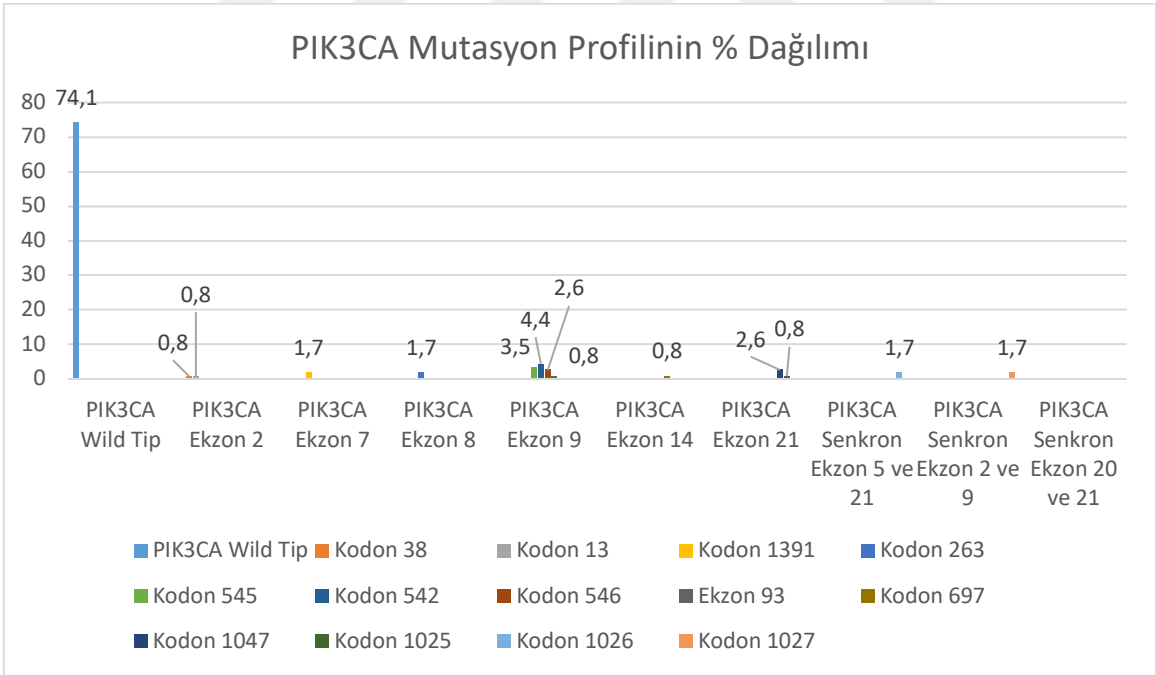
Şekil 15. Olgularda KRAS geni mutasyon profilinin dağılım durumu (%)



Şekil 16. Olgularda NRAS geni mutasyon profilinin dağılım durumu (%)



Şekil 17. Olgularda BRAF geni mutasyon profilinin dağılım durumu (%)



Şekil 18. Olgularda PIK3CA geni mutasyon profilinin dağılım durumu (%)

KRAS Gen Mutasyonu İle Klinikopatolojik Bulguların Karşılaştırılması

Çalışmaya dahil edilen 112 olgunun 63'ünde (%56,3) KRAS mutasyonu tespit edilirken, 49 (%43,8) olgu KRAS wild tip olarak bulundu. KRAS mutasyonu ile lokalizasyon (sağ kolon/sol kolon), lenfovasküler invazyon (var/yok), perinöral invazyon (var/yok), ektramural vasküler invazyon (var/yok), intramural vasküler invazyon (var/yok), müsinöz komponent (var/yok), primer tümör evresi (pT2/pT3/pT4a/pTb) arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı.

KRAS mutant olguların 55'inde (%87,3) tümör tomurcuğu izlenirken, 8'inde (%12,7) tümör tomurcuğu izlenmedi. KRAS mutasyonuna sahip tümör tomurcuğu görülen olguların 12'sinde (%21,8) derece 1 tümör tomurcuğu, 15'inde (%27,3) derece 2 tümör tomurcuğu, 28'sinde (%50,9) derece 3 tümör tomurcuğu saptandı. KRAS mutasyonu ve tümör tomurcuğu arasında istatistiksel anlamlı fark izlenmedi.

KRAS mutant olguların 60'ında (%95,2) az diferansiye küme izlenirken, 3'ünde (4,8) izlenmemekteydi. Az diferansiye küme izlenen KRAS mutant olguların, 27'sinde (%45,0) derece 1, 16'sında (%26,7) derece 2, 17'sinde (%23,3) derece 3 az diferansiye küme izlendi. KRAS mutasyonu ve az diferansiye küme arasında istatistiksel anlamlı fark görülmesede, KRAS mutant olgularda az diferansiye küme saptanması dört kat daha sık olarak bulundu (**p=0,056**).

KRAS mutasyonu gösteren olguların 33'ünün (%52,4) stroma oranı düşük, 30'unun (%47,6) stroma oranı yüksek tespit edildi. KRAS mutasyonu gösteren olgulardan 4'ünde (%6,3) derece 0, 19'unda (%30,2) derece 1, 24'ünde (%38,1) derece 2, 16 (%25,4) derece 3 inflamatuvar hücre reaksiyonu tespit edildi. KRAS gen mutasyon durumu ile tümör/stroma oranı ve inflamatuvar hücre reaksiyonu arasında istatistiksel anlamlılık bulunmadı.

KRAS mutasyonu gösteren olguların 54'ü (%58,1) adenokarsinom ÖOT, 9'u (%60,0) müsinöz adenokarsinom histopatolojik tanı kategorisinde olup, KRAS mutasyonu gösteren olgularda taşlı yüzük hücreli adenokarsinom (%0,0) tanısı izlenmedi.

Tablo 5'e KRAS mutasyon durumunun klinikopatolojik parametrelere göre dağılımı gösterilmektedir.

Tablo 5. Kolorektal Karsinom Vakalarında KRAS Gen Mutasyonu ile Klinikopatolojik Bulguların Karşılaştırılması

Klinikopatolojik Parametre		KRAS MUTASYONU		p	OR (%95 Güven Aralığı)
		Negatif (n=49)	Pozitif (n=63)		
Tümör tomurcuğu	Yok	12 (%24,5)	8 (%12,7)	0,171	2,23 (0,83-5,98)
	Var	37 (%75,5)	55 (%87,3)		
Tümör Tomurcuğu Derece	Derece 1	11 (29,7)	12 (%21,8)	0,662	-*
	Derece 2	10 (%27,0)	15 (%27,3)		
	Derece 3	16 (%43,2)	28 (%50,9)		
Az Diferansiye Küme	Yok	8 (%16,3)	3 (4,8)	0,056	3,902 (0,97-15,59)
	Var	41 (%83,7)	60 (%95,2)		
Az Diferansiye Küme Derece	Derece 1	12 (%29,3)	27 (%45)	0,155	-*
	Derece 2	18 (%43,9)	16 (%26,7)		
	Derece 3	11 (26,8)	17 (%23,3)		
Tümör/Stroma Oranı	Stroma Oranı Düşük	27 (%55,1)	33 (%52,4)	0,924	1,116 (0,52-2,36)
	Stroma Oranı Yüksek	22 (%44,9)	30 (%47,6)		
İnflamatuvar hücre reaksiyonu	Derece 0	3 (%6,1)	4 (%6,3)	0,485	-*
	Derece 1	13 (%26,5)	19 (%30,2)		
	Derece 2	14 (%28,6)	24 (%38,1)		
	Derece 3	19 (%38,8)	16 (%25,4)		
Ekstramural vasküler invazyon	Yok	39 (%79,6)	46 (%73,0)	0,559	1,44 (0,59-3,5)
	Var	10 (%20,4)	17 (%27,0)		
İntramural vasküler invazyon	Yok	41 (%83,7)	45 (%71,4)	0,195	2,05 (0,80-5,20)
	Var	8 (%16,3)	18 (%28,6)		
Lokalizasyon	Sağ Kolon	20 (%40,8)	18 (%28,6)	0,247	1,72 (0,78-3,79)
	Sol Kolon	29 (%59,2)	45 (%71,4)		
Lenfovasküler İnvazyon	Yok	21 (%52,5)	19 (%47,5)	0,233	1,73 (0,79-3,79)
	Var	28 (%38,9)	44 (%61,1)		
Perinöral İnvazyon	Yok	36 (%73,5)	41 (%65,1)	0,456	1,48 (0,65-3,37)
	Var	13 (%26,5)	22 (%34,9)		
Primer tümör evresi (pT)	pT2	5 (%10,2)	5 (%7,9)	0,494	-*
	pT3	31 (%63,3)	33 (%52,4)		
	pT4a	10 (%20,4)	21 (%33,3)		
	pT4b	3 (%6,1)	4 (%6,3)		
Primer lenf nodu evresi (pN)	pN0	25 (%51,0)	24 (%38,1)	0,538	-*
	pN1a	7 (%14,3)	8 (%12,7)		
	pN1b	4 (%8,2)	7 (%11,1)		
	pN1c	4 (%8,2)	7 (%11,1)		
	pN2a	8 (%16,3)	11 (%17,5)		
	pN2b	1 (%2,0)	6 (%9,5)		
Histolojik Tümör Tipi	Adenokarsinom ÖÖT	39 (%79,6)	54 (%85,7)	0,06	-*
	Müsinöz Adenokarsinom	6 (%12,2)	9 (%14,3)		
	Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom	4 (%8,2)	0 (%0,0)		
Müsinöz Komponent	Yok	30 (%62,5)	34 (%54,8)	0,442	1,37 (0,63-2,96)
	Var	18 (%37,5)	28 (%45,2)		

*İkili kategoriden fazla olan veri kümelerinde tahmini rölatif risk (odds ratio-OR) hesaplayamıyoruz.

NRAS Gen Mutasyonu İle Klinikopatolojik Bulguların Karşılaştırılması

Çalışmaya dahil edilen 112 olgunun 8'inde (%7,1) NRAS mutasyonu tespit edilirken, 104 (%92,8) olgu NRAS wild tip olarak bulundu. NRAS mutasyonu ile lokalizasyon (sağ kolon/sol kolon), lenfovasküler invazyon (var/yok), perinöral invazyon (var/yok), ektramural vasküler invazyon (var/yok), intramural vasküler invazyon (var/yok), müsinöz komponent (var/yok), primer tümör evresi (pT2/pT3/pT4a/pTb), primer lenf nodu evresi (pN1a/pN1b/pN1c/pN2a/pN2b), müsinöz komponent varlığı arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

NRAS mutasyonu gösteren olguların 7'sinde (%87,5) tümör tomurcuğu izlenirken, 1'inde (12,5) izlenmedi. NRAS mutant olguların 4'ünde (%50,0) derece 1 tümör tomurcuğu, 3'ünde (%37,5) derece 2 tümör tomurcuğu, 1'inde (%12,5) derece 3 tümör tomucuğu saptandı. NRAS mutasyon durumu ile tümör tomurcuğu arasında istatistiksel anlamlı fark izlenmemiştir.

NRAS mutasyonu gösteren olguların 7'sinde (%87,5) az diferansiye küme oluşumu izlenirken 1'inde (%12,5) izlenmedi. NRAS mutasyon durumu ile az diferansiye küme oluşumu arasında istatistiksel anlamlı fark izlenmedi. NRAS mutant az diferansiye küme oluşturan olguların 1'i (%12,5) derece 1, 7'si (%87,5) derece 2 olup derece 3 olgu izlenmemiştir. NRAS mutasyonu ve az diferansiye küme derece 2 arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır (**p=0,01**).

NRAS mutasyonu gösteren olguların 6'sının (%75,0) stroma oranı düşük, 2'sinin (%25,0) stroma oranı yüksek tespit edildi. NRAS mutasyonu gösteren olguların 4'ünde (%30,2) derece 1, 2'sinde (%38,1) derece 2, 2'sinde (%25,4) derece 3 inflamatuvar hücre reaksiyonu tespit edilirken, NRAS mutant olgularda derece 0 inflamatuvar hücre reaksiyonu tespit edilmedi. NRAS mutasyonu gösteren olguların 8'i (%100,0) adenokarsinom ÖOT histolojik alt tipte olup, müsinöz adenokarsinom ve taşlı yüzük hücreli adenokarsinom izlenmemiştir. NRAS gen mutasyon durumu ile tümör/stroma oranı, inflamatuvar hücre reaksiyonu, histolojik tümör tipi arasında istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır.

Tablo 6'da NRAS mutasyon durumunun klinikopatolojik parametrelere göre dağılımı gösterilmektedir.

Tablo 6. Kolorektal Karsinom Vakalarında NRAS Gen Mutasyonu ile Klinikopatolojik Bulguların Karşılaştırılması

Klinikopatolojik Parametre		NRAS MUTASYONU		p	OR (%95 Güven Aralığı)
		Negatif (n=104)	Pozitif (n=8)		
Tümör Tomurcuğu	Yok	19 (%13,8)	1 (%12,5)	1,000	1,56 (0,18-13,4)
	Var	85 (%81,7)	7 (%87,5)		
Tümör tomurcuğu Derece	Derece 1	19 (%22,4)	4 (%50,0)	0,085	-*
	Derece 2	23 (%27,1)	3 (%37,5)		
	Derece 3	43 (%50,6)	1 (%12,5)		
Az Diferansiye Küme	Yok	10 (%9,6)	1 (%12,5)	1,000	0,74 (0,08-6,68)
	Var	94 (%90,4)	7 (%87,5)		
Az Diferansiye Küme Derece	Derece 1	38 (%40,4)	1 (%12,5)	0,01	-*
	Derece 2	28 (%29,8)	7 (%87,5)		
	Derece 3	28 (%29,8)	0 (%0,0)		
Tümör/ Stroma Oranı	Stroma Oranı Düşük	54 (%51,9)	6 (%75,0)	0,281	0,36 (0,69-1,86)
	Stroma Oranı Yüksek	50 (%48,1)	2 (%25,0)		
İnflamatuar hücre reaksiyonu	Derece 0	7 (%6,7)	0 (%0,0)	0,525	-*
	Derece 1	28 (%26,9)	4 (%50,0)		
	Derece 2	36 (%34,6)	2 (%25,0)		
	Derece 3	33 (%31,7)	2 (%25,0)		
Ekstramural vasküler invazyon	Yok	78 (%75,0)	7 (%87,5)	0,713	0,429 (0,50-3,64)
	Var	26 (%25,0)	1 (%12,5)		
İntramural vasküler invazyon	Yok	79 (%76,0)	7 (%87,5)	0,756	0,45 (0,05-3,84)
	Var	25 (%24,0)	1 (%12,5)		
Lokalizasyon	Sağ Kolon	37 (%35,0)	1 (%12,5)	0,265	3,76 (0,44-31,77)
	Sol Kolon	67 (%65,0)	7 (%87,5)		
Lenfovasküler İnvazyon	Yok	36 (%34,6)	4 (%50,0)	0,453	0,52 (0,12-2,24)
	Var	68 (%65,4)	4 (%50,0)		
Perinöral İnvazyon	Yok	72 (%69,2)	5 (%62,5)	1,000	1,35 (0,30-5,99)
	Var	32 (%39,8)	3 (%37,5)		
Primer tümör evresi (pT)	pT2	9 (%8,7)	1 (%12,5)	0,700	-*
	pT3	59 (%56,7)	5 (%62,5)		
	pT4a	30 (%28,8)	1 (%12,5)		
	pT4b	6 (%5,8)	1 (%12,5)		
Primer lenf nodu evresi (pN)	pN0	45 (%43,3)	4 (%50,0)	0,818	-*
	pN1a	15 (%14,4)	0 (%0,0)		
	pN1b	10 (%9,6)	1 (%12,5)		
	pN1c	10 (%9,6)	1 (%12,5)		
	pN2a	17 (%16,3)	2 (%25,0)		
	pN2b	7 (%100,0)	0 (%0,0)		
Histolojik Tümör Tipi	Adenokarsinom ÖOT	85 (%81,7)	8 (%100,0)	0,415	-*
	Müsinöz Adenokarsinom	15 (%14,4)	0 (%0,0)		
	Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom	4 (%3,8)	0 (%0,0)		
Müsinöz Komponent	Yok	58 (%56,9)	6 (%75,0)	0,464	0,43 (0,80-2,28)
	Var	44 (%43,1)	2 (%25,0)		

*İkili kategoriden fazla olan veri kümelerinde tahmini rölatif risk (odds ratio-OR) hesaplayamıyoruz.

BRAF Gen Mutasyonu İle Klinikopatolojik Bulguların Karşılaştırılması

Çalışmaya dahil edilen 112 olgunun 8'inde (%7,14) BRAF mutasyonu tespit edilirken, 104 (%92,86) olgu BRAF wild tip olarak bulundu. BRAF mutasyonu ile lokalizasyon (sağ kolon/sol kolon), lenfovasküler invazyon (var/yok), perinöral invazyon (var/yok), ektramural vasküler invazyon (var/yok), intramural vasküler invazyon (var/yok), müsinöz komponent (var/yok), primer tümör evresi (pT2/pT3/pT4a/pTb), primer lenf nodu evresi (pN1a/pN1b/pN1c/pN2a/pN2b), müsinöz komponent varlığı arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı.

BRAF mutasyonu gösteren olguların 8'inde (%100,0) tümör tomurcuğu izlenirken, tümör tomurcuğu izlenmeyen BRAF mutant olgu görülmedi. BRAF mutant olguların 3'ünde (%37,5) derece 1, 2'sinde (%25,0) derece 2, 3'ünde (%37,5) derece 3 tümör tomurcuğu izlendi. BRAF mutasyonu ve tümör tomurcuğu arasında istatistiksel anlamlı fark görülmedi.

BRAF mutasyonu gösteren olguların 8'inde (%100,0) az diferansiye küme oluşumu izlenirken, az diferansiye oluşumu izlenmeyen BRAF mutant olgu görülmemiştir. BRAF mutant az diferansiye küme izlenenlerde derece 1 az diferansiye küme hiçbir olguda saptanmazken, 5 (%62,5) olguda derece 2, 3 (%37,5) olguda derece 3 az diferansiye küme görüldü. BRAF mutasyonu ile az diferansiye küme arasında istatistiksel anlamlı fark izlenmedi. Ancak BRAF mutant olgularda, derece 2 az diferansiye küme oluşumu 4 kat daha sık görüldü (**p=0,055**).

BRAF mutasyonu gösteren olguların 4'ünde (%50,0) stroma oranı düşük, 4'ünde (%50,0) stroma oranı yüksek tespit edildi. BRAF mutasyonu taşıyan olguların 2'sinde (%25,0) derece 1, 3'ünde (%37,5) derece 2, 3'ünde (%37,5) derece 3 inflamatuvar hücre reaksiyonu izlenirken, BRAF mutant olgularda derece 0 inflamatuvar hücre reaksiyonu görülmedi. BRAF mutasyonu gösteren olguların 7'si (%87,5) adenokarsinom ÖOT, 1'i (%12,5) müsinöz adenokarsinom histolojik alt tiplerinde olup taşlı yüzük hücreli adenokarsinom izlenmedi.

BRAF mutasyon durumu klinikopatolojik parametrelerle istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı.

Tablo 7'de BRAF mutasyon durumunun klinikopatolojik parametrelere göre dağılımı gösterilmektedir.

Tablo 7. Kolorektal Karsinom Vakalarında BRAF Gen Mutasyonu ile Klinikopatolojik Bulguların Karşılaştırılması

Klinikopatolojik Parametre		BRAF MUTASYONU		p	OR (%95 Güven Aralığı)
		Negatif (n=104)	Pozitif (n=8)		
Tümör Tomurcuğu	Yok	20 (19,2)	0 (%0,0)	0,347	0,80 (0,73-0,88)
	Var	84 (%80,8)	8 (%100,0)		
Tümör Tomurcuğu Derece	Derece 1	20 (%23,8)	3 (%37,5)	0,684	-*
	Derece 2	23 (%27,4)	2 (%25,0)		
	Derece 3	41 (%48,8)	3 (%37,5)		
Az Diferansiye Küme	Yok	11 (%10,6)	0 (%0,0)	1,000	0,89 (0,83-0,95)
	Var	93 (89,4)	8 (%100,0)		
Az Diferansiye Küme Derece	Derece 1	39 (%41,9)	0 (%0,0)	0,055	-*
	Derece 2	29 (%31,2)	5 (%62,5)		
	Derece 3	25 (%26,9)	3 (%37,5)		
Tümör/ Stroma Oranı	Stroma Oranı Düşük	56 (%53,8)	4 (%50,0)	1,000	1,16 (0,27-4,91)
	Stroma Oranı Yüksek	48 (%46,2)	4 (%50,0)		
İnflamatuar Hücre Reaksiyonu	Derece 0	7 (%6,7)	0 (%0,0)	0,869	-*
	Derece 1	30 (%28,8)	2 (%25,0)		
	Derece 2	35 (%33,7)	3 (%37,5)		
	Derece 3	32 (%30,8)	3 (%37,5)		
Ekstramural vasküler invazyon	Yok	79 (%76,0)	6 (%75,0)	1,000	1,05 (0,20-5,55)
	Var	25 (%24,0)	2 (%25,0)		
İntramural vasküler invazyon	Yok	79 (%76,0)	7 (%87,5)	0,678	0,45 (0,05-3,84)
	Var	25 (%24,0)	1 (%12,5)		
Lokalizasyon	Sağ Kolon	34 (%32,7)	4 (%50,0)	0,440	0,48 (0,11-2,06)
	Sol Kolon	70 (%67,3)	4 (%50,4)		
Lenfovasküler İnvazyon	Yok	35 (%33,7)	5 (%62,5)	0,131	0,30 (0,69-1,34)
	Var	69 (%66,3)	3 (%37,5)		
Perinöral İnvazyon	Yok	71 (%68,3)	6 (%75,0)	1,000	0,71 (0,13-3,74)
	Var	33 (%31,7)	2 (%25,0)		
Primer tümör evresi (pT)	pT2	9 (%8,7)	1 (%12,5)	0,859	-*
	pT3	60 (%57,7)	4 (%50,0)		
	pT4a	29 (%27,9)	2 (%25,0)		
	pT4b	6 (%5,8)	1 (%12,5)		
Primer lenf nodu evresi (pN)	pN0	45 (%43,3)	4 (%50,0)	0,09	-*
	pN1a	15 (%14,4)	0 (%0,0)		
	pN1b	11 (%10,6)	0 (%0,0)		
	pN1c	8 (%7,7)	3 (%37,5)		
	pN2a	18 (%17,3)	1 (%12,5)		
Histolojik Tümör Tipi	pN2b	7 (%6,7)	0 (%0,0)	0,846	-*
	Adenokarsinom ÖOT	86 (%82,7)	7 (%87,5)		
	Müsinöz Adenokarsinom	14 (%13,5)	1 (%12,5)		
Müsinöz Komponent	Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom	4 (%3,8)	0 (%0,0)	1,000	0,82 (0,18-3,63)
	Yok	59 (%57,8)	5 (%62,5)		
	Var	43 (%42,2)	3 (%37,5)		

*İkili kategoriden fazla olan veri kümelerinde tahmini rölatif risk (odds ratio-OR) hesaplayamıyoruz.

PIK3CA Gen Mutasyonu İle Klinikopatolojik Bulguların Karşılaştırılması

Çalışmaya dahil edilen 112 olgunun 29'ünde (%25,9) PIK3CA mutasyonu tespit edilirken, 83 (%74,1) olgu PIK3CA wild tip olarak bulundu. PIK3CA mutasyonu ile lokalizasyon (sağ kolon/sol kolon), lenfovasküler invazyon (var/yok), perinöral invazyon (var/yok), ektramural vasküler invazyon (var/yok), intramural vasküler invazyon (var/yok), müsinöz komponent (var/yok), primer tümör evresi (pT2/pT3/pT4a/pTb), primer lenf nodu evresi (pN1a/pN1b/pN1c/pN2a/pN2b), müsinöz komponent varlığı arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

PIK3CA mutasyonu gösteren olguların 23'ünde (%79,3) tümör tomurcuğu izlenirken, 6 'sında (%20,7) izlenmemiştir. PIK3CA mutant olguların 3'ünde (%13,0) derece 1, 10'unda (%43,5) derece 2, 10'unda (%43,5) derece 3 tümör tomurcuğu saptandı.

PIK3CA mutasyonu gösteren olguların 24'ünde (%82,8) az diferansiye küme oluşumu görülürken, 5'inde (%17,2) görülmemiştir. PIK3CA mutant olguların 12'sinde (%50,0) derece 1, 8'inde (%33,3) derece 2, 4'ünde (%16,7) derece 3 az diferansiye küme izlendi.

PIK3CA mutasyonu izlenen olguların 8'inde (%27,6) derece 1, 9'unda (%31,0) derece 2, 12'sinde (%41,4) derece 3 infalamatuar hücre reaksiyonu izlenmiş olup, PIK3CA mutant olguların hiçbirinde derece 0 inflammatuar hücre reaksiyonu izlenmemiştir. PIK3CA mutasyonu gösteren olguların 24'i (%25,8) adenokarsinom ÖOT, 4'ü (%26,7) müsinöz adenokarsinom, 1'(%25,0) taşlı yüzük hücreli karsinom histolojik alt tiplerine ait saptandı. PIK3CA gen mutasyon durumu ile tümör tomurcuğu, az diferansiye küme, inflammatuar hücre reaksiyonu, histolojik tümör alt tipi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

PIK3CA mutasyonu gösteren olguların 21'inde (%72,4) stroma oranı düşük izlenirken, 8'inde (%27,6) stroma oranı yüksek izlenmiştir. PIK3CA gen mutasyonu ile tümör/stroma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür. (**p=0,032**).

Tablo 8'de PIK3CA mutasyon durumunun klinikopatolojik parametrelere göre dağılımı gösterilmektedir.

Tablo 8. Kolorektal Karsinom Vakalarında PIK3CA Gen Mutasyonu ile Klinikopatolojik Bulguların Karşılaştırılması

Klinikopatolojik Parametre		PIK3CA MUTASYONU		p	OR (%95 Güven Aralığı)
		Negatif (n=83)	Pozitif (n=29)		
Tümör Tomurcuğu	Yok	14 (%16,9)	6 (%20,7)	0,856	0,77 (0,26-2,25)
	Var	69 (%83,1)	23 (%79,3)		
Tümör Tomurcuğu Derece	Derece 1	20 (%29,0)	3 (%13,0)	0,087	_*
	Derece 2	15 (%21,7)	10 (%43,5)		
	Derece 3	34 (%49,3)	10 (%43,3)		
Az Diferansiye Küme	Yok	6 (%7,2)	5 (%17,2)	0,149	0,37 (0,10-1,33)
	Var	77 (%92,8)	24 (%82,8)		
Az Diferansiye Küme Derece	Derece 1	27 (%35,1)	12 (%50,0)	0,294	_*
	Derece 2	26 (%33,8)	8 (%33,3)		
	Derece 3	24 (%31,2)	4 (%16,7)		
Tümör/Stroma Oranı	Stroma Oranı Düşük	39 (%47,0)	21 (%72,4)	0,032	0,33 (0,13-0,84)
	Stroma Oranı Yüksek	44b(%53,0)	8 (%27,6)		
İnflamatuar Hücre Reaksiyonu	Derece 0	7 (%8,4)	0 (%0,0)	0,279	_*
	Derece 1	24 (%28,9)	8 (%27,6)		
	Derece 2	29 (%34,9)	9 (%31,0)		
	Derece 3	23 (%27,7)	12 (41,4)		
Ekstramural vasküler invazyon	Yok	63 (%74,1)	22 (%74,1)	1,000	1,00 (0,37-2,69)
	Var	20 (%25,9)	7 (%25,9)		
İntramural vasküler invazyon	Yok	64 (%74,4)	19 (%73,1)	1,000	1,07 (0,39-2,89)
	Var	22 (%25,6)	7 (%26,9)		
Lokalizasyon	Sağ Kolon	26 (%31,3)	12 (%41,4)	0,449	0,64 (0,27-1,54)
	Sol Kolon	57 (%68,7)	17 (%58,6)		
Lenfovasküler İnvazyon	Yok	28 (%33,7)	12 (%41,4)	0,504	0,72 (0,30-1,71)
	Var	55 (%66,3)	17 (%58,6)		
Perinöral İnvazyon	Yok	55 (%66,3)	22 (%75,9)	0,485	0,62 (0,23-1,64)
	Var	28 (%33,7)	7 (%24,1)		
Primer Tümör Evresi (pT)	pT2	8 (%9,6)	2 (%6,9)	0,711	_*
	pT3	45 (%54,2)	19 (%65,5)		
	pT4a	25 (%30,1)	6 (%20,7)		
	pT4b	5 (%6,0)	2 (%6,9)		
Primer Lenf Nodu Evresi (pN)	pN0	33 (%39,8)	16 (%55,2)	0,399	_*
	pN1a	13 (%15,7)	2 (%6,9)		
	pN1b	7 (%8,4)	4 (%13,8)		
	pN1c	10 (%12,0)	1 (%3,4)		
	pN2a	14 (%16,9)	5 (%17,2)		
	pN2b	6 (%7,2)	1 (%3,4)		
Histolojik Tümör Tipi	Adenokarsinom ÖÖT	69 (%83,1)	24 (%82,8)	0,997	_*
	Müsinöz Adenokarsinom	11 (%13,3)	4 (%13,8)		
	Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom	3 (%3,6)	1 (%3,4)		
Müsinöz Komponent	Yok	49 (%60,5)	15 (%51,7)	0,511	1,42 (0,60-3,35)
	Var	32 (%39,5)	14 (%48,3)		

*İkili kategoriden fazla olan veri kümelerinde tahmini rölatif risk (odds ratio-OR) hesaplayamıyoruz.

TARTIŞMA

Kolorektal karsinomlar, gastrointestinal sistemin en sık rastlanan kanseridir ve kanser ilişkili ölümlerin en önemli nedenlerindedir. 2020 yılında tüm dünyada 1.880.725 kolorektal karsinom tanısı alan hasta tespit edilmiş olup KRK'a bağlı 915.880 kişi öldüğü bildirilmektedir, ki bu tüm kanser ölümlerinin %9,4'ünü oluşturup ikinci sırada yer alır (1). Kansere bağlı ölümlerden KRK, ikinci sırada yer almaktadır. Türkiyede de 2017 yılı Sağlık Bakanlığı kanser istatistiklerine göre kadın ve erkeklerde en sık görülen üçüncü kanser kolon kanseridir ve insidansı her geçen yıl artmaktadır (2). KRK'lar, sık görülmelerine ek olarak, sergiledikleri çeşitli morfolojik, klinik ve genetik profiller nedeniyle gastrointestinal sistem kanserleri içinde oldukça önemli bir yere sahiptir.

KRK riski yaşla birlikte artarken, Amerikan Kanser Topluluğu 2020 verilerine göre KRK tanısında median yaş erkeklerde 66, kadınlarda 69'dur. KRK insidans oranları ise, erkeklerde kadınlara göre %30 daha yüksektir (88). Çalışmamızda KRK'larda erkeklerde ve kadınlarda median yaş 63 olarak saptanmıştır. Olgularımızın 84'ü (%75,0) erkek, 28'i (%25,0) kadın olup, KRK insidansı literatür verileri ile uyumlu olarak erkeklerde daha sık görülmüş, ancak literatüre göre daha yüksek oranda, %50 oranında daha sık saptanmıştır.

Amerikan Kanser Topluluğunun verilerine göre, 2009-2013 döneminde Amerika Birleşik Devletleri'nde KRK %41 oranında proksimal (sağ) kolon, %50 oranında distal (sol kolon ve rektum) kolonda görülmektedir (89). Çalışmamızdaki olguların 38'i (%33,9) sağ kolon, 74'ü (%66,1) sol kolon yerleşimli olarak saptanmıştır.

Çoğu çalışmada, sağ kolon yerleşimli tümörlerin sol kolon yerleşimli tümörlere göre ileri yaşta, kadınlarda, müsinöz adenokarsinom histolojik alt tipinde görüldüğü bildirilmiştir

(44, 45). Çalışmamızda ise, sağ kolon yerleşimli tümörlerin 15'i (%53,7) kadın, sol kolonda yerleşimli tümörlerin 61'i (%72,6) erkek olarak saptanmış olup; literatürle uyumlu olarak sağ kolon yerleşimli tümörler kadınlarda, sol kolon yerleşimli tümörler erkeklerde istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla bulunmuştur ($p=0,020$). Çalışmamızda sağ kolon tümörlerinin ortalama görülme yaşı 60, sol kolon tümörlerinin ortalama görülme yaşı 64 olarak bulunmuştur. Literatürlerde sağ kolon yerleşimli tümörlerin sol kolona göre daha ileri yaşta görüldüğü ifade edilmekle birlikte bizim olgu grubumuzda bir fark saptanmamıştır (5, 45).

Kolorektal karsinogenezde, mitojenle aktive olan protein kinaz-MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK) ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) yolları gibi anahtar sinyal yollarında genetik anormalliklerin birikmesi önemli rol oynar. Bu yolağı aktive etmede ilk adım bir ligandın, reseptör tirozin kinaza bağlanması ile olur, bu da sıklıkla epidermal büyüme faktörünün (EGF), epidermal büyüme faktör reseptörüne (EGFR) bağlanması ile gerçekleşir (90).

Kolorektal karsinogenezde önemli rol oynayan EGFR sinyal yolağını, setuksimab ve panitumumab gibi anti-EGFR monoklonal antikorların EGFR'nin ekstraselüler bölgesine bağlanarak, yolağın aşağı akış sinyalini (yani RAS/MRAF/MEK/ERK yolunu) bloke etmelerinin metastatik KKK'lu olgularda önemli bir klinik yararı olduğu gösterilmiştir (91). ASCP, CAP ve ASCO'nun birlikte yayınladığı klavuzla göre, anti-EGFR tedavisi planan KKK olgularına, tedaviye karşı oluşacak direnci öngörebilmek amacıyla KRAS, NRAS genlerinde ekzon 2, kodon 12 ve 13; ekzon 3, kodon 59 ve 61; ekzon 4, kodon 117 ve 146 bölgelerini içerecek şekilde mutasyon analizi yapılmalıdır.

RAS wild tip tüm KKK'lar bu tedaviden fayda görmemekle birlikte (19), Tejpar S. ve ark., CRYSTAL (92) ve OPUS (93) klinik çalışmalarında yer alan 1378 KKK olgusundan oluşan çalışmalarında, KRAS G13D mutasyonu gösteren olgularda setükimab tedavisinin hastalıksız sağkalımı arttırdığı ve tümöre olumlu yanıt verme ile ilişkisini göstermişlerdir (94). KKK'larda moleküler heterojenitenin hedefe yönelik tedavilerde farklı yanıtlarla ilişkisini göstermektedir.

RAS yolağında bulunan, PI3K ailesi üyelerinden fosfatidilinositol-4,5 –biphosphate 3-kinase catalyticsubunit alfa (PIK3CA), EGFR'nin aşağısındaki sinyal yollarını düzenleyen bir lipid kinazı kodlar. KKK'larda, PIK3CA mutasyonun %20 oranında yer aldığı bildirilmektedir (53).

Günümüz tedavi klavuzlarında (18), BRAF V600E mutasyonunun, MSI gösteren vakalarda Lynch Sendromunu ön görmede ve olumsuz prognostik belirteç olması sebebiyle

klinik açıdan risklerin belirlenebilmesi amacıyla yapılması önerilmektedir. PIK3CA mutasyonlarının anti-EGFR monoklonal antikor tedavisine yanıtı etkilemedeki rolü ise belirsizdir (18).

Afrasanie V.A. ve ark., tarafından metastatik KRK'larda RAS, KRAS, NRAS, BRAF, MSI ile ilgili 89 klinik çalışma, derleme ve meta analize ait mevcut bulguları kapsayan, derleme çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada KRK'larda, RAS ailesi üyelerinden KRAS mutasyonunun %30-40, NRAS mutasyonunun %3 olarak görüldüğü bildirilmektedir. MAPK yolağını aktive eden önemli mekanizmalardan biri olan BRAF mutasyonunun ise KRK'ların %8-12'sinde izlendiği bildirilmektedir (17).

Poulsen T.S. ve ark., 1000 KRK olgusundan oluşan serilerinde, Next Generation Sequence (NGS) ile KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA genlerinde yer alan mutasyonları incelemiştir. Olguların 415'inde (41.5%) KRAS mutasyonu saptanmış olup, KRAS mutasyonlarının, %81.2'sinin ekzon 2, %8.2'sinin ekzon 3, %10.6'sının ekzon 4'te yer aldığını göstermişlerdir. NRAS mutasyonunu ise, vakaların 42'sinde (%4.2) saptanmış olup, bu mutasyonların 23'ü (%54.7) ekzon 2, 4'ü (%2.4) ekzon 4, 18'i (%42.9) ekzon 3'te yer almıştır. BRAF mutasyonu 180 (%18) olguda görülmüş, bunların 161'inin (%89.4) ekzon 15 pV600E bölgesinde, 12'sinin (%6.7) ekzon 15'te farklı bir bölgede, 39'unun (%7) ekzon 11'de yer aldığını saptamışlardır. PIK3CA mutasyonu olguların 188'inde (%18.8) saptanmış, bunların 100'ünün (%53,1) ekzon 10'da yer aldığını göstermişlerdir. Olguların 12'sinde KRAS, NRAS, BRAF mutasyonlarını çift mutasyon olarak izlemiştir (95).

Çalışmamızda olgularımızın 63'ünde (%56,2) KRAS mutasyonu saptadık. KRAS mutasyonu literatür ile uyumlu olarak diğer mutasyonlara göre daha sık saptanmıştır, fakat sıklığı literatür oranlarına göre daha yüksektir. KRAS mutasyonunu, en sık ekzon 2'de (%77,2), ardından ekzon 3 (%9.5) ve ekzon 4 (%7.9) bölgelerinde bulduk.

NRAS mutasyonu 8 (%7.1) olguda, 3'ü ekzon 2 ve 5'I ekzon 3 bölgelerinde olmak üzere görüldü. BRAF mutasyonu ise, 8 (%7.1) olguda görülmüş bunların 7'si ekzon 15 (V600E), 1'i ekzon 11 bölgelerinde izlendi. BRAF mutasyon sıklığı, literatür verileri ile uyumlu saptanmıştır. Olgularımızın 29 'u (%25.8) PIK3CA mutasyonu göstermiş olup, bu mutasyonlar en sık ekzon 9 bölgesinde görülmüş olup bunu, ekzon 21, ekzon 5, ekzon 2, ekzon 7, ekzon 8 takip etmektedir. Çalışmamızda KRAS, NRAS, PIK3CA mutasyonları literatür verilerine göre daha yüksek oranlarda bulundu.

Roock W.D.ve ark., PCR yöntemi ile 747 KRK olgusunun KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA mutasyon analizlerini gerçekleştirdikleri serilerinde, KRAS mutasyonu ile

PIK3CA'nın ekzon 9 ve 20 bölgelerinde mutasyonlarının güçlü birliktelik gösterdiklerini saptamışlardır (21). Çalışmamızda PIK3CA mutasyonu gösteren olguların 19'unda (%65.5) KRAS mutasyonu eşlik etmekte olup, en sık görülen çift mutasyon birlikteliğini oluşturmaktadır. Bulgularımız, literatür verileri ile uyumlu olarak PIK3CA mutasyonlarının KRAS mutasyonlarına eşlik ettiğini doğrulamakta olup, anti-EGFR tedavisinde henüz prediktif yeri olmamasının sebeplerinden birinin tek başına görülme sıklığının az olmasına bağlı olarak, bu konuda geniş vaka serileri ile yapılacak çalışmalar ile gösterilebileceği sonucuna vardık.

Geçmişte yapılan çalışmaların bir kısmı (17, 21), MAPK yolağında yer alan RAS ve BRAF genlerinde yer alan mutasyonların birbirini dışladığını bildirmektedir. Günümüzde, dizileme teknolojilerinin gelişmesi ve yaygınlaşması sonucu, yapılan çalışmalarda bu mutasyonların eş zamanlı birlikteliği saptanmıştır. Poulsen T.S. ve ark. (95), 1000 KRK olgusundan oluşan serilerinde, NGS ile KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA genlerinde yer alan mutasyonları incelemiş ve 12 olguda, KRAS, NRAS, BRAF mutasyonlarının birlikteliğini bildirmişlerdir. Mutasyonların aynı hücre içinde mi meydana geldiği, birkaç bağımsız klonal popülasyonla tümör heterojenliğini mi yansıttığı yoksa tümör gelişimi ve ilerlemesinin sonucu mu olduğunun araştırılması gerektiği sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda, 2 olguda BRAF ve NRAS; 1 olguda KRAS ve NRAS mutasyonlarını birlikte çift mutasyon olarak saptadık. Bulgularımızla literatüre sağladığımız katkı doğrultusunda, MAPK yolunda yer alan çift mutasyonlarının sinyal yolu üzerindeki klinik ve morfolojik etkisi, anti-EGFR monoklonal tedavisine yanıtı ne ölçüde değiştirdiği, bu anlamda yapılacak çalışmalar sonucu gösterilebilir.

Sagaert X. ve ark., KRK'larda tümör heterojenitesi hakkındaki moleküler ve histopatolojik parametreleri içeren derleme makalelerinde, intratümör heterojenitesinin, bir tümör içinde farklı morfolojik, inflamatuvar, genetik veya transkriptomik alt klonların varlığını ifade ettiğini ve bunun, hastalık sonucunu ve tedavi yanıtını etkilediğini bildirmişlerdir (6). 2015 yılında KRK Alt Tip Belirleme Konsorsiyumu, tümöre alt moleküler profillerin tümör fenotipi ve klinik davranışla en yakından bağlantılı olan verileri temsil ettiği kabul ederek KRK'larda bu parametrelere göre dört moleküler alt tip grubu tanımladı (59). Halen kabul edilmekte olan bu sınıflamaya göre, KRK'ların %13'ü bu gruplardan hiçbirine ait olmamakla birlikte kendilerine has özellikleriyle ile belirsizliğini korumaktadır.

KRK'ların gösterdiği bu heterojen moleküler profilin histopatolojik fenotipe yansımaları ve prognostik özellikler ile ilişkisi son yıllarda önemli çalışmalara konu olmuştur.

Ueno ve ark., KRK olgularında yüksek dereceli tümör tomurcuklanmasının, tümörün lokal yayılımının yanı sıra, primer kolorektal kanserli ve karaciğer metastazı olan hastalarda da

sağ kalım üzerindeki etkisini kanıtlamış, tümör agresifliğinin bir belirleyicisi olabileceğini bildirmiştir (96). Tümör tomurcuklanmasının, ITBCC tarafından bağımsız olumsuz prognostik parametre olması ve bazı hasta gruplarında klinik yönetimi belirlemede yol göstermesi amacıyla patoloji raporlarında olması gerektiği ortaya konmuştur (8).

Hatthakarnkul P. ve ark., 17 makaleden 6153 hastanın dahil edildiği sistematik derlemede yüksek dereceli tümör tomurcuğu ile KRAS mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulmuşlar, BRAF mutasyonu ile tümör tomurcuğu gelişimi arasında ise istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamamışlardır. Bu çalışmada, KRK'larda izlenen yüksek dereceli tümör tomurcuğu fenotipinin genetik değişikliklerde ön görücü rolü olabileceği belirtilmektedir (97). Çalışmamızda, KRAS mutasyonu izlenen 63 olgunun 55'inde (%83,7) tümör tomurcuğu izlenmiş olup, KRAS mutasyonu gösteren olgularda daha fazla tümör tomurcuğu görülse de, tümör tomurcuğu ile KRAS mutasyonu arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ancak yine de kötü prognostik bir faktör olan tümör tomurcuklarının ve KRAS mutasyon varlığının birlikte belirlenmesi klinisyenler için ek bir prognostik öngörü şekillendirebilir.

BRAF mutasyonu gösteren olgularımızın tümünde tümör tomurcuğu izlenmiş olsa da, BRAF mutasyonu ile tümör tomurcuğu arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır. Çalışmamızda yer alan olgulardan 8'i (%7,1) BRAF mutant ve 104'ü (%92,8) mutant olmayan olarak saptandığından, örneklem sayısının gruplar arasında belirgin farklılık göstermesi sebebiyle istatistiksel olarak anlamlılık elde edilemediği düşünüldü. KRK'larda olumsuz prognostik gösterge olan BRAF mutasyonunun, benzer şekilde bağımsız olumsuz prognostik gösterge olan tümör tomurcuğu gelişiminde rol oynamadığı sonucuna varılmıştır.

Shivji S. ve ark., KRK'larda histomorfolojik olarak izlenen, az diferansiye küme ile tümör tomurcuğu arasında güçlü bir ilişki olduğunu gözlemlemiş, muhtemelen aynı biyolojik ve morfolojik süreci temsil edebileceklerini öne sürmüştür. Bununla birlikte az diferansiye küme derecelendirmesinin, tekrarlanabilirlik ve risk sınıflaması açısından, histolojik derecelendirme sisteminden daha iyi sonuç verdiğini bildirmektedir. Az diferansiye kümelerin, kötü klinik sonuçlarla ilişkili olduğu fakat bağımsız prognostik parametre olarak kabul edilebilmesi için çok sayıda çok merkezli çalışma ile desteklenmesi, optimal eşik değerler ile değerlendirme ve raporlama yöntemlerinin standart hale getirilmesi gerektiği belirtilmektedir (9).

Baressi V. ve ark., 175 KRK olgusunda yaptıkları çalışmada, KRAS, NRAS, BRAF mutasyonları ve yüksek dereceli az diferansiye kümelerin korele olduğunu saptamıştır. KRAS

mutasyonu ile tümör tomurcuğu arasında da korelasyon saptamalarına rağmen, NRAS, BRAF mutasyonları ile tümör tomurcuğu arasında anlamlı fark bildirilmemektedir (98). Bizim çalışmamızda, KRAS mutasyonu gösteren 63 olgunun 60'ı (%95,2) az diferansiye küme içermekle birlikte, KRAS mutasyonu az diferansiye küme oluşumunu 4 kat arttırmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır. ($p=0,056$). Çalışmamızda NRAS mutasyonu izlenen olguların 1'inde (%12,5) derece 1, 7'sinde derece 2 az diferansiye küme izlenirken, derece 3 az diferansiye küme izlenen olgu görülmemiştir. NRAS mutasyonu ile derece 2 az diferansiye küme oluşumu istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($p=0,01$). BRAF mutasyonu izlenen olguların 5'inde (%62,5) derece 2, 3'ünde derece 3 az diferansiye küme izlenirken, derece 1 az diferansiye küme saptanmamıştır. BRAF mutasyonu ile az diferansiye küme arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmasada, BRAF mutasyonunun derece 2 az diferansiye küme görülme olasılığını dört kat arttırdığı saptanmıştır ($p=0,055$). Bonetti L. ve ark., KRAS mutant 25 KRK olgusundan oluşan serilerinde, az diferansiye kümelerde ve ana tümör dokusunda KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA genlerini Sequenom MassARRAY yöntemi ile dizileyerek incelediklerinde, 20 olguda az diferansiye küme ve ana tümör dokusunda aynı mutasyonlar izlenirken, ana tümörde kodon 12'de KRAS mutasyonu olan 2 olguda az diferansiye kümelerde KRAS wild tip iken, 3 vakada az diferansiye kümeler ana tümör dokusundan farklı olarak PIK3CA mutasyonları izlendiğini göstermişlerdir. Az diferansiye kümelerin, epitelyal mezenkimal geçişte rol oynayan metastaz potansiyeli en yüksek tümör hücrelerini temsil ettiği düşünüldüğünde, moleküler durumlarının, hedeflenen tedavilere yanıtın tahmini için önemli prediktif değeri olabilir (67).

Shivji S. ve ark., The PubMed elektronik veri tabanında ayrıntılı olarak yaptıkları az diferansiye küme veya solid hücre adası terimlerini içeren İngilizce literatür taramaları sonucu hazırladıkları derlemede, üç basamaklı az diferansiye küme derecelendirmesinin, tekrar edilebilirlik ve gözlemciler arası uyumunun histolojik derecelendirmeden daha iyi olduğu sonucuna varmışlardır. Tümör tomurcuğu ile güçlü bir birliktelik sergilediklerini bunun da benzer biyolojik ve morfolojik süreçlere sahip olmaları ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (9).

Tümör hücrelerine eşlik eden, farklı birçok hücre ve doku tümör hücreleri ile bir aradadır. Bunlar tümör mikroçevresi olarak adlandırılmaktadır. Tümör mikroçevresi, normal histolojik yapıda izlenen stromal hücreler (yerel stromal hücreler/ mezenkimal hücreler, endotel hücreleri, fibroblastlar ve immün hücreler), ekstrasellüler matriks ve sekresyon ürünlerinden (büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler) oluşmaktadır (10). Son yıllarda KRK'larda tümör

mikroçevresinin prognostik açısından değerli olduğu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Huijbers A. ve ark., VICTOR çalışma grubuna (99) ait, neoadjuvan radyoterapi alanları dışlayarak (preoperatif tedavinin stroma uyarıcı etkisi göz önüne alınarak rektum lokalizasyonlu olguları çalışma dışı bırakarak) geri kalan 710 kolon tümörü olgusunu, H&E boyalı doku kesitlerinde morfolojik olarak, stroma-yüksek (>%50) ve stroma-düşük (<%50) değerlendirilmiş ve 207 (29.2%) olguyu yüksek stroma oranına sahip olarak saptanmıştır. Stroma oranı ile sağ kalımı karşılaştırdıklarında, stromadan zengin grupta sağ kalım ve hastaliksız sağ kalım, stroma oranı düşük gruba göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (70). Hutchins GGA ve ark., QUASAR çalışma grubuna ait (100), H&E boyalı kesitleri elde edilebilen 1800 olguda , stroma oranı ile KRAS ve BRAF mutasyonları arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ancak KRAS mutasyonu ve yüksek stromal oranına sahip tümörlerin, KRAS wild tip ve yüksek stromal oranlara sahip tümörlere göre önemli ölçüde daha yüksek nüks riskine sahip olduğu tespit edilmiştir. RAS sinyalinin, tümör hücresi istilasını doğrudan veya stromada üretilen TGF-beta aracılığı ile hücre büyümesini inhibe edici sinyalleri baskılayarak arttırdığı bildirilmektedir. Bu nedenle KRAS mutasyonu ve stroma oranı arasındaki beklemedikleri sonucun daha fazla araştırılması gerektiğini bildirmişlerdir (101). Neoadjuvan tedavi alan olguların dahil edilmediği çalışmamızda, KRAS mutasyonu gösteren olguların 30'unda (%47,6), NRAS mutasyonu gösteren olguların 2'sinde (%25,0), BRAF mutasyonu gösteren olguların 4'ünde (%50) stroma oranı yüksek saptanmıştır. Yüksek stroma oranı ile KRAS, NRAS, BRAF mutasyonları arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Bulgularımız literatür verileri ile uyumlu olmakla birlikte, KRAS mutasyonu ve yüksek stroma oranının bilinen olumsuz prognostik parametreler olduğu halde çalışmamızda bu iki parametre arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Düşük stroma oranı ile PIK3CA mutasyonu arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmıştır (**p=0,032**). Çalışmamız PIK3CA mutasyonu ile tümör stroma oranı ilişkisini ortaya koyan ilk çalışma olması nedeniyle önem taşımaktadır. Literatürde farklı çalışmalarda yüksek stroma oranı ve PIK3CA mutasyonlarının kötü prognostik özellikler olduğuna dair yayınlar bulunmakla birlikte çalışmamızda PIK3CA mutasyonu ile düşük tümör stroma oranı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Bu parametrelerin birbirinden bağımsız yollar üzerinden etkili olduğunu desteklemektedir. Ancak bu görüşün geniş vaka sayılarının yer aldığı, çok sayıda çalışma ile desteklenmesi gerekmektedir.

Klintrup K. ve ark., 386 KRK olgusu içeren çalışmalarında, H&E boyalı kesitlerde tümörün invaziv sınırında lenfosit, nötrofil ve eozinofilik granülositleri infiltrasyon şiddetine göre 4 dereceli skorlama sistemi ile sınıflamışlardır. Çalışmada invaziv sınırdaki yüksek dereceli

inflamatuvar hücre reaksiyonu varlığının hem 5 yıllık sağ kalım; hem de 5 yıllık hastalısız sağ kalımda bağımsız olumlu bir prognostik faktör olarak tespit edilmiştir (12). Hynes S.O. ve ark., 445 KRK olgusu içeren çalışmalarında, orta/yüksek peritümöral inflamatuvar reaksiyon ve Crohn benzeri lenfoid reaksiyonun benzer şekilde KRK'a bağlı ölüm oranını azalttığını, yüksek tümör stroma oranının (stroma>%50) KRK'a bağlı ölüm oranını arttırdığını saptamışlardır. Bunun üzerine, olgularda tümör mikroçevresini peritümöral inflamatuvar reaksiyon, Crohn benzeri lenfoid reaksiyon ve tümör stroma oranını içeren kombine fibroinflamatuvar skorlama ile değerlendirmişlerdir. Yüksek fibroinflamatuvar skora sahip olgularda KRK'a bağlı ölüm artmaktadır (11).

Lee H. ve ark., 1532 KRK olgusu bulunan çalışmalarında, H&E boyalı kesitlerde tümörü infiltre eden lenfositlerin (TİL) yoğunluğu düşük ve yüksek olarak değerlendirilmiş, KRAS mutasyonu ve TİL yoğunluğu arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Ancak BRAF V600E mutasyonu ile yüksek TİL yoğunluğu ile ilişkili bulunmuştur (71). Park H.E. ve ark., 185 olgu bulunan çalışmalarında, reaksiyon materyallerine ait kesitlere CD3 ve CD4 immünohistokimyasal boyamalarını uygulayarak, dijital görüntüleme analizi ile TİL yoğunluğunu hesaplamışlardır. KRAS mutant olgularda, wild tip olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı olara daha düşük TİL bulmuşlardır (102). Çalışmamızda, Klintrup K. ve ark.'nın önerdiği metod ile inflamatuvar hücre reaksiyonunu değerlendirdiğimizde KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA mutasyonları ile inflamatuvar hücre reaksiyonu derecesi arasında fark bulmadık. Yapılan çalışmalarda KRAS, BRAF mutasyonu ile TİL yoğunluğu değerlendirilmiş olup, çalışmamızda lenfosit, nötrofil ve eozinofilik granülositleride içine alan inflamasyon değerlendirilmiştir. Literatürde KRK'larda NRAS, PIK3CA mutasyonları ile inflamatuvar reaksiyon arasında ilişkiyi ortaya koyan çalışma bulunmamaktadır. NCCN klavuzunda MSI KRK'larda immünoterapinin kullanımının önerilmesi (103) ve yapılan çalışmalarda KRK'larda immünskorun prognostik öneminin ortaya konması ile birlikte kişiselleştirilmiş tedavi protokolleri oluşturulurken KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA mutasyonları ile tümör mikroçevresinde önemli yeri olan inflamatuvar reaksiyonun ilişkisinin ortaya konması gerektiğini düşünüyoruz. Tümör mikroçevresinin seçilmiş mikroskobik özelliklerinin, patoloji raporlarında birbirinden bağımsız veya kombinasyon halinde yer alması KRK'da değerli prognostik bilgiler sağlayacaktır.

Perinöral invazyon, pek çok malignite gibi KRK'larda da azalmış sağkalım ile ilişkili bulunmuştur. Liebig C. ve ark., 269 KRK olgusu içeren serilerinde, %22 oranında perinöral invazyon bulunduğunu, 5 yıllık genel sağkalım oranını, perinöral invazyon negatif tümörler için

%72 , perinöral invazyon pozitif tümörler için %25 olarak saptayarak, bağımsız olumsuz prognostik faktör olarak raporlarda belirtilmesi gerektiğini bildirmişlerdir (104). Jang S. ve ark., 90 KRK olgusu içeren serilerinde, KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA gen mutasyonları ile perinöral invazyon arasında anlamlı fark bulmamışlar ancak, KRAS ekzon 3 ve 4'te yer alan, kodon 61, 117 ve 146 mutasyonlarının perinöral invazyon ile ilişkili olduğunu saptamışlardır (105). Bu da tümör heterojenitesinin agresif, sağ kalımı olumsuz etkileyen parametrelerin oluşumunda önemli yer aldığını göstermektedir. Bizim olgularımızın, 35'inde (%31,3) perinöral invazyon tespit edildi. KRAS mutasyonu saptanan olguların 22'sinde (%34,9), NRAS mutasyonunun saptananların 3'ünde (%37,5), BRAF mutasyonu saptananların 2'sinde (%25,0), PIK3CA mutasyonu saptananların 7'sinde (%24,1) perinöral invazyon izlenmiştir. Bu gen mutasyonları ile perinöral invazyon arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Lenfovasküler invazyon varlığının histolojik olarak belirlenmesi, uzun zamandan beri pek çok malignite için potansiyel bir prognostik gösterge olarak kullanılmaktadır. Yapılan birçok çalışma KRK'larda lenfovasküler invazyon varlığının evreden bağımsız güçlü bir prognostik belirteç olduğunu göstermiştir (106, 107). Jang S. ve ark. (105), KRAS mutasyonu ile lenfovasküler invazyon arasında anlamlı ilişki bulmuş olup, NRAS, BRAF, PIK3CA mutasyonları ile lenfovasküler invazyon arasında anlamlı ilişki saptamamışlardır. Bizim çalışmamızda ise, lenfovasküler invazyon 72 (%64,3) olguda görülmüş olup, KRAS ve PIK3CA mutasyonu gösteren olgularda daha fazla oranda lenfovasküler invazyon izlense de istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. BRAF, NRAS mutasyonları ile de istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır.

Knijn N. ve ark., 20 meta analiz içeren 1199 çalışmayı kapsayan meta analizlerinde, KRK'larda intramural vasküler invazyonun (İMVİ) görülme insidansını %12.5 olarak saptamış ve İMVİ'nun 5 yıllık genel sağ kalım ve kansere özgü sağ kalım ile ters ilişkisi anlamlı olarak saptanarak KRK'larda olumsuz prognostik belirteç olduğu belirtilmiştir. Ekstramural vasküler invazyonu (EMVİ) insidansını ise, İMVİ'nin yaklaşık iki katı %24.3 ve olumsuz prognostik parametre olarak saptamışlardır. Meta analizde yer alan 6 makale, İMVİ ve EMVİ arasındaki prognostik etkisiyi doğrudan karşılaştırdı ve en az 4 çalışma prognostik etkide anlamlı bir fark gösterememişlerdir (108). Yapılan çalışmalarda (105), KRAS mutasyonu ile lenfovasküler invazyon arasında korelasyon olduğu gösterilse de, KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA mutasyonu ve İMVİ/EMVİ arasındaki ilişki, literatür detaylıca incelenerek tarandığında, konu ile ilgili çalışmaya rastlanmadı. Çalışmamızda, KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA mutasyonları ile EMVİ/İMVİ arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Müsinöz adenokarsinomların, sistemik tedaviye yanıtlarının kötü olduğu bilinmektedir (109). Moretto R. ve ark., 2315 olguluk BRAF ve RAS wild tip anti-EGFR monoklonal antikor tedavisi alan mKRK serilerinde, müsinöz bileşeni olanlarda olmayanlara göre klinik olarak anlamlı fayda sağlanmadığı sonucuna varmışlardır (110). Müsinöz adekarsinomların sergilediği bu davranışın tümörigenenziste yer alan farklı genetik değişikliklere neden olarak gerçekleştiği sonucuna varabiliriz.

Bununla birlikte, BRAF mutasyonunun müsinöz alt tipe sahip tümörlerde daha sık görüldüğü bildirilmektedir (17, 111). Cremolini C. ve ark., BRAF 594 veya 596 kodonlarında mutasyona uğramış KKK taşıyan 10 hasta tanımlandı ve sırasıyla BRAF V600E mutant ve BRAF wild tip 77 ve 542 hasta ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, kodon 594 veya 596'da mutasyon izlenen tümörlerin non-müsinöz morfolojide olduklarını tespit etmişlerdir (112). Çalışmamızda, 8 (%7,1) olguda BRAF mutasyonu izlendi. Bunların 7'si BRAF V600E mutasyonu olup, 1'i ekzon 11, kodon 469 bölgesinde yer almaktadır. BRAF mutant olguların 5'inde müsinöz komponent izlenirken, 3'ünde müsinöz komponent görülmemiştir. BRAF mutasyonu ile müsinöz komponent arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Ekzon 11, kodon 469 bölgesinde yer alan mutasyon görülen tümörde literatürle uyumlu olarak müsinöz komponent saptamadık. Metastatik KKK'larda kullanılan BRAF inhibitörleri ile tedavi non-V600E mutasyonlarını kapsamamaktadır (113, 114). Farklı histomorfolojik ve klinik özelliklere sahip, non-V600E mutant KKK olgularının daha geniş serilerle yapılan ileri çalışmalar ile hedefe yönelik tedavide gelişme sağlayabileceğini düşünüyoruz.

Khan M. ve ark., 1877 metastatik KKK olgusundan oluşan serilerinde, KRAS ve BRAF mutasyonları ile müsinöz adenokarsinomlar arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptamışlar, NRAS ve PIK3CA ile ise bu ilişkiyi gösterememişlerdir (115). KRAS mutasyonları sıklıkla CMS3 grubunda tanımlanmış olup, müsinöz histoloji CMS1'de sık görülmektedir (59, 115). Çalışmamızda KRAS mutasyonu gösteren olguların 28'inde (%45,2), NRAS mutant olguların 2'sinde (%25,0), PIK3CA mutant olguların 14'ünde (%48,3) müsinöz komponent saptadık. KRAS, NRAS, PIK3CA mutasyonları non-müsinöz tümörlerde ve konvansiyonel adenokarsinom alt tipinde daha sık görülmüş olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Barressi V. ve ark. (98), 175 KKK olgusundan oluşan serilerinde, KRAS mutasyonu ile primer tümör 3-4 (pT3-4) evresi arasında önemli bir korelasyon gözlemlemişler ve bunun mantığı, onkojenik KRAS mutasyonlarının KKK hücrelerinin invaziv potansiyelini arttırması ile ilişkili sonucunda bulunmuşlardır. Çalışmamızda KRAS mutant olguların 58'i (%92),

NRAS mutant olguların 7'si (%87,5), BRAF mutant olguların 7'si (%87,5), PIK3CA mutant olguların 27'si (%93,1) pT3-4 izlenmekle birlikte, pT2, pT3, pT4a, pT4b evreleri arasında istatistiksel anlamlı fark izlenmemiş, ancak mutant olgularda literatürle uyumlu olarak belirgin farkla pT3-4 sıklığı yüksek olarak izlenmiştir. Bu da KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA mutasyonlarının invaziv karakterlerle ilişkili olduğu sonucunu desteklemektedir.

Özet olarak; KRK'larda, hedefe yönelik tedavilerde kullanılan ilacın hedeflediği sinyal proteinlerinde moleküler anormallikleri barındıran tümörlerde, hedefe yönelik tedavilerin olumlu klinik yanıtlarının alınabildiğine dair çok sayıda kanıt ve çalışma mevcuttur (93, 116). KRAS ve NRAS mutasyonu göstermeyen kolorektal karsinomlarda anti-EGFR tedavisi günümüzde tedavi rehberlerinde yer almaktadır (18). Ancak RAS wild tip KRK'ların tamamı bu tedaviden fayda görmemekte (19) veya mutasyonun yer aldığı farklı kodona göre yanıt alınabilmektedir (94). KRK'ların gösterdiği bu moleküler heterojenite histomorfolojik fenopine de yansımakta olup, daha ucuz ve ulaşılabilir yöntemlerle tedaviye ve prognoza yönelik verilerin elde edilebileceğini düşünüyoruz. Çalışmamızda KRAS mutant olgularda wild tip olanlara göre dört kat daha fazla az diferansiye küme izlenmekle birlikte, KRAS mutasyonu ve az diferansiye küme ilişkisi literatürle uyumludur.

AJCC/TNM evrelemesi KRK'ların tedavi ve takiplerinde altın standart olsa da, az diferansiye kümelerin tekrarlanabilirlik ve gözlemciler arası uyumunun, histolojik derecelendirmeden daha iyi olduğu bildirilmesi ve invaziv diğer komponentlerle ilişkisi göz önüne alındığında patoloji raporlarında bildirilmesi gerektiğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda, PIK3CA mutasyonu ve düşük stroma oranı arasındaki ilişki istatistiksel olarak saptanmış olup bu konuda özgün çalışma niteliğindedir. Tümöre karşı gelişen stromal yanıtın, KRK'larda sık görülen PIK3CA'nın yer aldığı MAPK/AKT yolağında yer alan sinyallerle ilişkili olmayabileceği sonucuna varılabilir, ancak bu görüşün geniş vaka sayılarının yer aldığı, çok sayıda çalışma ile desteklenmesi gerekmektedir.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda Moleküler Patoloji Bölümünde yeni nesil dizileme yöntemi ile KRAS, NRAS, BRAF ve PIK3CA gen noktalarında mutasyon analizi yapılan, KRK tanısı olan ve tedavide rezeksiyon uygulanan 112 hastada, mutasyon profilleri ile klinik ve histopatolojik bulguların karşılaştırılması amacıyla yaptığımız çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- 1) Çalışmamıza dahil olan olguların yaş aralığı ve cinsiyete göre dağılımı literatür bulguları ile uyumlu olarak saptandı.
- 2) Çalışmamıza dahil edilen olgu grubunda, sağ kolon yerleşimli tümörlerin 15'i (%53,7) kadın, sol kolonda yerleşimli tümörlerin 61'i (%72,6) erkek olarak saptanmış olup; literatürle uyumlu olarak sağ kolon yerleşimli tümörler kadınlarda, sol kolon yerleşimli tümörler erkeklerde istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla bulunmuştur (**p=0,020**).
- 3) NGS yöntemi ile çalışılan KRAS geninde, olguların 63'ünde (%56,3) mutasyon saptanmıştır. KRAS mutasyonu en sık ekzon 2 bölgesinde saptanırken onu sırasıyla ekzon 3 ve ekzon 4 bölgeleri izlemektedir.
- 4) Çalışmaya dahil edilen olguların 29'unda (%25,8) PIK3CA mutasyonu saptandı. PIK3CA mutasyonu 13 olguda ekzon 9 bölgesinde izlenirken, 4 olguda ekzon 21, 2 olguda ekzon 2, 2 olguda ekzon 7, 2 olguda ekzon 8, 1 olguda ekzon 14 bölgesinde izlendi.
- 5) Çalışmamızda dahil olan PIK3CA mutasyonu gösteren olguların 19'una (%65.5) KRAS mutasyonu eşlik etmekte olup, bu birliktelik literatür bulguları ile uyumlu olarak izlendi.

- 6) Çalışmamızda, 2 olguda BRAF ve NRAS; 1 olguda KRAS ve NRAS mutasyonlarını senkron olarak saptadık. KRK'larda görülen, RAS-BRAF mutasyonlarının birbirini dışladığı bildirilmekteydi. Ancak yakın zamanda yapılan çalışmalarda bu mutasyonların birlikte izlendiği olguların gösterildi ve bu bilginin artık kabul görmeyeceği ortaya kondu. Çalışmamızın RAS-BRAF mutasyonlarını aynı olguda senkron olarak göstererek literatüre katkı sağladığı düşünüldü.
- 7) Çalışmamızda yer alan olgularda KRAS mutasyonu izlenmesinin, az diferansiye küme sıklığını dört kat arttırdığı saptandı (**p=0,056**).
- 8) Çalışmamızda yer alan olgularda NRAS mutasyonu ile derece 2 az diferansiye küme oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır (**p=0,01**).
- 9) Çalışmamızda yer alan olgularda BRAF mutasyonu izlenmesinin, az diferansiye küme sıklığını dört kat arttırdığı saptandı (**p=0,055**).
- 10) Çalışmamızda PIK3CA mutasyonu ve düşük stroma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (**p=0,032**).
- 11) Tespit edilen KRAS, PIK3CA mutasyonları ile diğer klinikopatolojik parametreler ile karşılaştırıldığında hiçbirinde istatistiksel anlamlılık saptanmadı.
- 12) BRAF, NRAS mutasyonları ile klinikopatolojik parametreler karşılaştırıldığında hiçbirinde istatistiksel anlamlılık saptanmadı.
- 13) Çalışmamızda KRAS mutasyonu izlenen olguların 58'i (%92), NRAS mutasyonu izlenen olguların 7'si (%87,5), BRAF mutasyonu izlenen olguların 7'si (%87,5), PIK3CA mutasyonu izlenen olguların 27'si (%93,1) pT3-4 izlenmekle birlikte, pT2, pT3, pT4a, pT4b evreleri arasında istatistiksel anlamlı fark izlenmemiş, ancak mutant olgularda literatürle uyumlu olarak belirgin farkla pT3-4 sıklığı yüksek olarak izlenmiştir.

ÖZET

Kolorektal karsinomlar, gastrointestinal sistemin en sık kanseridir ve kanser ilişkili, ölümlerin en önemli nedenlerindedir. Kolorektal kanserler, kadın ve erkeklerde tüm kanser türleri arasında üçüncü sırada görülmekte olup, çoğunluğu sporadiktir. Kolorektal karsinomların çoğunu adenokarsinomlar oluşturmaktadır.

Çalışmamızda yeni nesil dizileme yöntemi ile kolorektal karsinomlarda, Kirsten Ras Onkogen Homolog Gen, V-Raf Murine Sarkom Viral Onkogen Homolog B1, Nöroblastom RAS Viral Onkogen Homolog, Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subunit alfa mutasyonları ve klinikopatolojik parametreleri karşılaştırmak amacıyla 112 olgu çalışmaya alınmıştır. Olgulara ait Hematoksilen & Eozin boyalı lamlarda, tümör tomurcuğu, az diferansiye kümeler, tümör stroma oranı, inflamatuvar hücre reaksiyonu, ekstra/intramural vasküler invazyon, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, histolojik tümör alt tipi, histolojik tümör derecesi, primer tümör ve lenf nodu evresi, müsinöz komponent varlığı değerlendirilmiştir. Olguların yaş, cinsiyet ve tümör lokalizasyonu bilgileri kaydedilmiştir.

Olguların %56,3'ünde Kirsten Ras Onkogen Homolog Gen, %7,1'inde Nöroblastom RAS Viral Onkogen Homolog, %7,1'inde V-Raf Murine Sarkom Viral Onkogen Homolog B1, %25,8'inde Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subunit alfa mutasyonu izlenmiştir. Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subunit alfa mutasyonu izlenen 19 olguda Kirsten Ras Onkogen Homolog Gen mutasyonunun saptanmıştır ve 2 olguda V-Raf Murine Sarkom Viral Onkogen Homolog B1 ve Nöroblastom RAS Viral Onkogen Homolog, 1 olguda Kirsten Ras Onkogen Homolog Gen ve Nöroblastom RAS Viral Onkogen Homolog çift

mutasyonlarının görülmüştür, bununla birlikte Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subunit alfa mutasyonu izlenen 4 olguda Kirsten Ras Onkogen Homolog Gen mutasyonu izlenen 1 olguda bu genlerde farklı ekzon bölgelerinde senkron mutasyonlar görülmüştür. Bu bulgular kolorektal karsinomların sergiledikleri heterojen moleküler özellikleri göstermiştir.

Elde edilen bulgulara göre, Kirsten Ras Onkogen Homolog Gen ve V-Raf Murine Sarkom Viral Onkogen Homolog B1 mutasyonları ile az diferansiye küme oluşumu arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmasa da, Kirsten Ras Onkogen Homolog Gen ve V-Raf Murine Sarkom Viral Onkogen Homolog B1 mutasyonlarının az diferansiye küme oluşumunu 4 kat arttırdığı bulunmuştur. Nöroblastom RAS Viral Onkogen Homolog mutasyonu ile derece 2 az diferansiye küme oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subunit alfa mutasyonu ile düşük stroma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda saptadığımız , kolorektal karsinomların sinyal yollarında yer alan birden fazla mutasyonunun, tümörün klinik ve morfolojik heterojenitesine, hedefe yönelik tedavide kullanılan ilaçlara yanıtı olan yansımalarının belirlenebilmesi için geniş vaka serileri ile yapılacak klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Az diferansiye küme, tümör tomurcuğu ve tümör mikroçevresi özellikleri gibi tümörün epitelyal mezenkimal geçiş ilişkili invaziv karakterini yansıtan fenotipik özelliklerin moleküler profilinin tanımlanmasının, hedefe yönelik tedavide inovatif gelişmeler sağlayabilmesi için moleküler yöntemlerin kullanılacağı daha geniş vaka serileri ile yapılacak klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: kolorektal kanser, sekanslama, KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, tümör tomurcuğu, az diferansiye kümeler, tümör mikroçevresi

THE RELATIONSHIP OF KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA MUTATIONS AND CLINICOPATHOLOGICAL FINDINGS IN COLORECTAL CARCINOMA

SUMMARY

Colorectal carcinomas are the most common cancer of the gastrointestinal tract and one of the most important causes of cancer-related death. Colorectal cancers are the third most common cancer among all cancer types in men and women, and most of them are sporadic. Most colorectal carcinomas are adenocarcinomas.

In our study, 112 cases were included in the study in order to compare Kirsten Ras Oncogen Homolog Gene, V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1, Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homologue, Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subunit alfa mutations and clinicopathological parameters in colorectal cancers with next generation sequancing method. In Hematoxylen & Eosin stained slides of the cases, tumor budding, poorly differentiated clusters, tumor stroma ratio, inflammatory cell reaction, extra/intramural vascular invasion, perineural invasion, lymphovascular invasion, histological tumor subtype, histological tumor grade, primary tumor and lymph node stage, mucinous component presence was evaluated. Age, gender and tumor localization information of the cases were recorded.

Kirsten Ras Oncogen Homolog Gene mutations were observed in 56.3%, Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homologue in 7.1%, V-Raf Murine Sarcoma Viral

Oncogene Homolog B1 in 7.1%, and Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subunit alfa mutations in 25.8% of cases. Kirsten Ras Oncogen Homolog Gene mutation was detected in 19 cases with PIK3CA mutation, V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1 and NRAS double mutations were observed in 2 cases, and Kirsten Ras Oncogen Homolog Gene and Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homologue double mutations were observed in 1 case. However, synchronous mutations in these genes in different exon regions were observed in 4 cases with Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subunit alfa mutation in 1 case with Kirsten Ras Oncogen Homolog Gene mutation. These findings demonstrated the heterogeneous molecular properties exhibited by colorectal cancers.

According to the findings, although no statistically significant relationship was found between Kirsten Ras Oncogen Homolog Gene and V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1 mutations and poorly differentiated cluster formation, it was found that Kirsten Ras Oncogen Homolog Gene and V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1 mutations increased poorly differentiated cluster formation 4-fold. A statistically significant correlation was found between Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homologue mutation and grade 2 poorly differentiated cluster formation. A statistically significant correlation was found between Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subunit alfa mutation and low stroma rate.

In conclusion, clinical studies with large case series are needed to determine the reflections of multiple mutations in the signal pathways of colorectal carcinomas, which we detected in our study, on the clinical and morphological heterogeneity of the tumor and the response to drugs used in targeted therapy. Clinical studies with larger case series using molecular methods are needed in order to define the molecular profile of the phenotypic features reflecting the invasive character of the tumor associated with epithelial mesenchymal transition, such as poorly differentiated cluster, tumor budding and tumor microenvironment features, to enable innovative developments in targeted therapy.

Keywords: colorectal cancer, sequencing, KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, tumor budding, poorly differentiated clusters, tumor microenvironment



KAYNAKLAR

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021.
2. 2017 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri. Available from: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2017-turkiye-kanser-i-istatistikleri.html>.
3. Park Y, Park SJ, Cheon JH, Kim WH, Kim TI. Association of Family History With Cancer Recurrence, Survival, and the Incidence of Colorectal Adenoma in Patients With Colorectal Cancer. J Cancer Prev. 2019;24(1):1-10.
4. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. Int J Mol Sci. 2020;22(1).

5. Yang SY, Cho MS, Kim NK. Difference between right-sided and left-sided colorectal cancers: from embryology to molecular subtype. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2018;18(4):351-8.
6. Sagaert X, Vanstapel A, Verbeek S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiology.* 2018;85(1-2):72-84.
7. Johncilla M, Yantiss RK. Histology of Colorectal Carcinoma: Proven and Purported Prognostic Factors. *Surg Pathol Clin* 2020;13(3):503-20.
8. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol* 2017;30(9):1299-311.
9. Shivji S, Conner JR, Barresi V, Kirsch R. Poorly differentiated clusters in colorectal cancer: a current review and implications for future practice. *Histopathology.* 2020;77(3):351-68.
10. van Pelt GW, Sandberg TP, Morreau H, Gelderblom H, van Krieken J, Tollenaar R, et al. The tumour-stroma ratio in colon cancer: the biological role and its prognostic impact. *Histopathology* 2018;73(2):197-206.
11. Hynes SO, Coleman HG, Kelly PJ, Irwin S, O'Neill RF, Gray RT, et al. Back to the future: routine morphological assessment of the tumour microenvironment is prognostic in stage II/III colon cancer in a large population-based study. *Histopathology* 2017;71(1):12-26.
12. Klintrup K, Mäkinen JM, Kauppila S, Väre PO, Melkko J, Tuominen H, et al. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2005;41(17):2645-54.
13. J. Milburn Jessup, Richard M. Goldberg. *Colon and Rectum. AJCC Cancer Staging Manual* 2017.
14. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Schlemmer A, Rehak P, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer* 2012;118(3):628-38.
15. ID N, MJ A, RD O, AK L. *Tumours of the colon and rectum. WHO Classification of tumours of digestive system.* 5 ed 2019. p. 156-88.
16. Harada S, Morlote D. *Molecular Pathology of Colorectal Cancer. Adv Anat Pathol* 2020;27(1):20-6.
17. Afrăsânie VA, Marinca MV, Alexa-Stratulat T, Gafton B, Păduraru M, Adavidoaiei AM, et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer - practical implications for the clinician. *Radiol Oncol* 2019;53(3):265-74.
18. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, et al. *Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol* 2017;35(13):1453-86.

19. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008;359(17):1757-65.
20. Yang ZY, Wu XY, Huang YF, Di MY, Zheng DY, Chen JZ, et al. Promising biomarkers for predicting the outcomes of patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies: a systematic review with meta-analysis. *Int J Cancer* 2013;133(8):1914-25.
21. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010;11(8):753-62.
22. Maria Westerhoff JKG. Colon. In: Mills SE, editor. *Histology for Pathologists*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2020. p. 1452-3.
23. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. 1. 3 ed: Güneş kitabevi; 2001. p. 251-8.
24. Matthew R. Lindberg LWL. Diagnostic pathology. Normal histology. In: Matthew R. Lindberg LWL, editor. 2 ed 2018. p. 238-9-40-41
25. Howlader N NA, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). *SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2018* [updated November 2020; cited 2020. Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/.
26. Birt DF, Phillips GJ. Diet, genes, and microbes: complexities of colon cancer prevention. *Toxicol Pathol* 2014;42(1):182-8.
27. Brennan CA, Garrett WS. Gut Microbiota, Inflammation, and Colorectal Cancer. *Annu Rev Microbiol* 2016;70:395-411.
28. Waluga M, Zorniak M, Fichna J, Kukla M, Hartleb M. Pharmacological and dietary factors in prevention of colorectal cancer. *J Physiol Pharmacol* 2018;69(3).
29. Kushi LH, Doyle C, McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, Bandera EV, et al. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin* 2012;62(1):30-67.
30. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16(12):713-32.
31. Recio-Boiles A, Cagir B. *Colon Cancer*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
32. Peters U, Hutter CM, Hsu L, Schumacher FR, Conti DV, Carlson CS, et al. Meta-analysis of new genome-wide association studies of colorectal cancer risk. *Hum Genet* 2012;131(2):217-34.

33. Bhattacharya P, McHugh TW. Lynch Syndrome. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
34. Loughrey MB, McGrath J, Coleman HG, Bankhead P, Maxwell P, McGready C, et al. Identifying mismatch repair-deficient colon cancer: near-perfect concordance between immunohistochemistry and microsatellite instability testing in a large, population-based series. *Histopathology* 2021;78(3):401-13.
35. Ma H, Brosens LAA, Offerhaus GJA, Giardiello FM, de Leng WWJ, Montgomery EA. Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. *Pathology* 2018;50(1):49-59.
36. Li J, Wang R, Zhou X, Wang W, Gao S, Mao Y, et al. Genomic and transcriptomic profiling of carcinogenesis in patients with familial adenomatous polyposis. *Gut* 2020;69(7):1283-93.
37. Kanth P, Grimmitt J, Champine M, Burt R, Samadder NJ. Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management. *Am J Gastroenterol* 2017;112(10):1509-25.
38. Khattab A, Monga DK. Turcot Syndrome. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
39. Vasen HF, Tomlinson I, Castells A. Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;12(2):88-97.
40. Mark Redston DKD. Epithelial Neoplasms of the Large Intestine. In: Robert D. Odze M, FRCP(C), John R. Goldblum, MD, editor. *Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas*. 3 ed: Elsevier; 2015. p. 737-77.
41. van der Paardt MP, Zagers MB, Beets-Tan RG, Stoker J, Bipat S. Patients who undergo preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer restaged by using diagnostic MR imaging: a systematic review and meta-analysis. *Radiology*. 2013;269(1):101-12.
42. De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, et al. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep* 2015;34(3):1087-96.
43. Messersmith WA. NCCN Guidelines Updates: Management of Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2019;17(5.5):599-601.
44. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum* 2010;53(1):57-64.
45. Stintzing S, Tejpar S, Gibbs P, Thiebach L, Lenz HJ. Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes. *Eur J Cancer* 2017;84:69-80.
46. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, et al. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2017;3(2):211-9.

47. Albuquerque-González B, López-Calderón FF, López-Abellán MD, Esteban-Gil Á, García-Solano J, Conesa-Zamora P. Biology and Therapeutic Targets of Colorectal Serrated Adenocarcinoma; Clues for a Histologically Based Treatment against an Aggressive Tumor. *Int J Mol Sci* 2020;21(6).
48. Hamilton SR, Bosman F, Boffetta P. Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise N, editors. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. 4th ed 2010. p. 134-44.
49. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
50. Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol (Pozn)* 2015;19(1a):A68-77.
51. Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 2006;25(57):7531-7.
52. Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(7):1254-61.
53. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2009;69(5):1851-7.
54. Shen Y, Wang J, Han X, Yang H, Wang S, Lin D, et al. Effectors of epidermal growth factor receptor pathway: the genetic profiling of KRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS mutations in colorectal cancer characteristics and personalized medicine. *PLoS One* 2013;8(12):e81628.
55. Jerrold R. Turner MWL. Oral Cavities and Gastrointestinal Tract. In: Vinay Kumar AKA, Jon C. Aster, editor. *Robbins Basic Pathology* 10 ed: Elsevier; 2018. p. 583-636.
56. Rhee YY, Kim KJ, Kang GH. CpG Island Methylator Phenotype-High Colorectal Cancers and Their Prognostic Implications and Relationships with the Serrated Neoplasia Pathway. *Gut Liver*. 2017;11(1):38-46.
57. Nazemalhosseini Mojarad E, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2013;6(3):120-8.
58. Wang W, Kandimalla R, Huang H, Zhu L, Li Y, Gao F, et al. Molecular subtyping of colorectal cancer: Recent progress, new challenges and emerging opportunities. *Semin Cancer Biol* 2019;55:37-52.
59. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015;21(11):1350-6.
60. Lugli A, Vlajnic T, Giger O, Karamitopoulou E, Patsouris ES, Peros G, et al. Intratumoral budding as a potential parameter of tumor progression in mismatch repair-proficient and mismatch repair-deficient colorectal cancer patients. *Hum Pathol* 2011;42(12):1833-40.

61. Dawson H, Lugli A. Molecular and pathogenetic aspects of tumor budding in colorectal cancer. *Front Med (Lausanne)*. 2015;2:11.
62. Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, Perez Alea M, et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(36):13427-32.
63. Gulluoglu M, Yegen G, Ozluk Y, Keskin M, Dogan S, Gundogdu G, et al. Tumor Budding Is Independently Predictive for Lymph Node Involvement in Early Gastric Cancer. *Int J Surg Pathol* 2015;23(5):349-58.
64. Liang F, Cao W, Wang Y, Li L, Zhang G, Wang Z. The prognostic value of tumor budding in invasive breast cancer. *Pathol Res Pract* 2013;209(5):269-75.
65. Cappellesso R, Luchini C, Veronese N, Lo Mele M, Rosa-Rizzotto E, Guido E, et al. Tumor budding as a risk factor for nodal metastasis in pT1 colorectal cancers: a meta-analysis. *Hum Pathol* 2017;65:62-70.
66. Dawson H, Blank A, Zlobec I, Lugli A. Potential clinical scenarios of tumour budding in colorectal cancer. *Acta Gastroenterol Belg* 2019;82(4):515-8.
67. Reggiani Bonetti L, Barresi V, Bettelli S, Caprera C, Manfredini S, Maiorana A. Analysis of KRAS, NRAS, PIK3CA, and BRAF mutational profile in poorly differentiated clusters of KRAS-mutated colon cancer. *Hum Pathol* 2017;62:91-8.
68. Konishi T, Shimada Y, Lee LH, Cavalcanti MS, Hsu M, Smith JJ, et al. Poorly Differentiated Clusters Predict Colon Cancer Recurrence: An In-Depth Comparative Analysis of Invasive-Front Prognostic Markers. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(6):705-14.
69. Mesker WE, Junggeburst JM, Szuhai K, de Heer P, Morreau H, Tanke HJ, et al. The carcinoma-stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for survival compared to lymph node status and tumor stage. *Cell Oncol*. 2007;29(5):387-98.
70. Huijbers A, Tollenaar RA, v Pelt GW, Zeestraten EC, Dutton S, McConkey CC, et al. The proportion of tumor-stroma as a strong prognosticator for stage II and III colon cancer patients: validation in the VICTOR trial. *Ann Oncol*. 2013;24(1):179-85.
71. Lee H, Sha D, Foster NR, Shi Q, Alberts SR, Smyrk TC, et al. Analysis of tumor microenvironmental features to refine prognosis by T, N risk group in patients with stage III colon cancer (NCCTG N0147) (Alliance). *Ann Oncol*. 2020;31(4):487-94.
72. Patel DIdanm. In: William B. Coleman GJT, editor. *Diagnostic Molecular Pathology a Guide to Applied Molecular Testing*. 1 ed2017. p. 25.
73. Holley RW, Everett GA, Madison JT, Zamir A. Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid. *J Biol Chem*. 1965;240:2122-8.
74. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(2):560-4.
75. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.

76. Aziz N, Zhao Q, Bry L, Driscoll DK, Funke B, Gibson JS, et al. College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139(4):481-93.
77. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*. 2014;30(9):418-26.
78. Yegnasubramanian S. Explanatory chapter: next generation sequencing. *Methods Enzymol*. 2013;529:201-8.
79. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem*. 2009;55(4):641-58.
80. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips A, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet*. 2014;133(1):1-9.
81. Mutz KO, Heilkenbrinker A, Lönne M, Walter JG, Stahl F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24(1):22-30.
82. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(2):193-201.
83. Leijssen LGJ, Dinaux AM, Amri R, Taylor MS, Deshpande V, Bordeianou LG, et al. Impact of intramural and extramural vascular invasion on stage II-III colon cancer outcomes. *J Surg Oncol*. 2019;119(6):749-57.
84. GeneRead QIAact Actionable Insights Tumor Panel Handbook [Available from: <https://www.qiagen.com/de/products/instruments-and-automation/genereader-system/generead-qiaact-actionable-insights-tumor-panel/>].
85. GeneRead™ QIAact AIT DNA UMI Kit Handbook [Available from: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/next-generation-sequencing/genereader-system/generead-qiaact-ait-dna-umi-panel/>].
86. QIAseq® Targeted DNA Panel Handbook [Available from: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/next-generation-sequencing/dna-sequencing/somatic-panels/qiaseq-targeted-dna-panels/>].
87. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
88. Colorectal Cancer Facts & Figures 2020-2022 [Available from: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics.html>].
89. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(3):177-93.

90. Zenonos K, Kyprianou K. RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2013;5(5):97-101.
91. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(4):337-45.
92. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):2011-9.
93. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zobel A, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol.* 2011;22(7):1535-46.
94. Tejpar S, Celik I, Schlichting M, Sartorius U, Bokemeyer C, Van Cutsem E. Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol.* 2012;30(29):3570-7.
95. Poulsen TS, de Oliveira D, Espersen MLM, Klarskov LL, Skovrider-Ruminski W, Hogdall E. Frequency and coexistence of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations and occurrence of MMR deficiency in Danish colorectal cancer patients. *Apmis.* 2021;129(2):61-9.
96. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Hatsuse K, Fujimoto H, Hase K. Predictors of extrahepatic recurrence after resection of colorectal liver metastases. *Br J Surg.* 2004;91(3):327-33.
97. Hatthakarnkul P, Quinn JA, Matly AAM, Ammar A, van Wyk HC, McMillan DC, et al. Systematic review of tumour budding and association with common mutations in patients with colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021;167:103490.
98. Barresi V, Bonetti LR, Bettelli S. KRAS, NRAS, BRAF mutations and high counts of poorly differentiated clusters of neoplastic cells in colorectal cancer: observational analysis of 175 cases. *Pathology.* 2015;47(6):551-6.
99. Midgley RS, McConkey CC, Johnstone EC, Dunn JA, Smith JL, Grumett SA, et al. Phase III randomized trial assessing rofecoxib in the adjuvant setting of colorectal cancer: final results of the VICTOR trial. *J Clin Oncol.* 2010;28(30):4575-80.
100. Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, Kerr DJ. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet.* 2007;370(9604):2020-9.
101. Hutchins GGA, Treanor D, Wright A, Handley K, Magill L, Tinkler-Hundal E, et al. Intratumoral stromal morphometry predicts disease recurrence but not response to 5-fluorouracil-results from the QUASAR trial of colorectal cancer. *Histopathology.* 2018;72(3):391-404.

102. Park HE, Yoo SY, Cho NY, Bae JM, Han SW, Lee HS, et al. Tumor microenvironment-adjusted prognostic implications of the KRAS mutation subtype in patients with stage III colorectal cancer treated with adjuvant FOLFOX. *Sci Rep.* 2021;11(1):14609.
103. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen YJ, Ciombor KK, et al. Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2021;19(3):329-59.
104. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5131-7.
105. Jang S, Hong M, Shin MK, Kim BC, Shin HS, Yu E, et al. KRAS and PIK3CA mutations in colorectal adenocarcinomas correlate with aggressive histological features and behavior. *Hum Pathol.* 2017;65:21-30.
106. Chapuis PH, Dent OF, Fisher R, Newland RC, Pheils MT, Smyth E, et al. A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *Br J Surg.* 1985;72(9):698-702.
107. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Cederquist L, Chen YJ, Ciombor KK, et al. NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018. *J Natl Compr Canc Netw.* 2018;16(4):359-69.
108. Knijn N, van Exsel UEM, de Noo ME, Nagtegaal ID. The value of intramural vascular invasion in colorectal cancer - a systematic review and meta-analysis. *Histopathology.* 2018;72(5):721-8.
109. Hugen N, Brown G, Glynne-Jones R, de Wilt JH, Nagtegaal ID. Advances in the care of patients with mucinous colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(6):361-9.
110. Moretto R, Morano F, Ongaro E, Rossini D, Pietrantonio F, Casagrande M, et al. Lack of Benefit From Anti-EGFR Treatment in RAS and BRAF Wild-type Metastatic Colorectal Cancer With Mucinous Histology or Mucinous Component. *Clin Colorectal Cancer.* 2019;18(2):116-24.
111. Reynolds IS, O'Connell E, Fichtner M, McNamara DA, Kay EW, Prehn JHM, et al. Mucinous adenocarcinoma of the colon and rectum: A genomic analysis. *J Surg Oncol.* 2019;120(8):1427-35.
112. Cremolini C, Di Bartolomeo M, Amatu A, Antoniotti C, Moretto R, Berenato R, et al. BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis. *Ann Oncol.* 2015;26(10):2092-7.
113. Kopetz S, Guthrie KA, Morris VK, Lenz HJ, Magliocco AM, Maru D, et al. Randomized Trial of Irinotecan and Cetuximab With or Without Vemurafenib in BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancer (SWOG S1406). *J Clin Oncol.* 2021;39(4):285-94.
114. Piawah S, Venook AP. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer.* 2019;125(23):4139-47.

115. Khan M, Loree JM, Advani SM, Ning J, Li W, Pereira AAL, et al. Prognostic Implications of Mucinous Differentiation in Metastatic Colorectal Carcinoma Can Be Explained by Distinct Molecular and Clinicopathologic Characteristics. *Clin Colorectal Cancer*. 2018;17(4):e699-e709.
116. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;360(14):1408-17.





EKLER

Ek 1

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
GİRİŞİMSEL OLMAYAN BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-GOBAEK 2021/499	
	PROTOKOL ADI	Kolorektal Karsinomlarda KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA Mutasyonlarının Klinikopatolojik Bulgularla İlişkisi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç. Dr. Ebru TAŞTEKİN	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:25/04		Tarih:27.12.2021
	Fakültemiz Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ebru TAŞTEKİN'in sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Araş. Gör. Dr. Elif MERCAN DEMİRTAŞ'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-GOBAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gülsüm ÖNAL Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Hakan GÜRKAN Başkan Yardımcısı	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Selçuk KORKMAZ Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Mehmet Erdal VARDAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E (H)	(E) H	
Prof. Dr. Sernaz UZUNOĞLU Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	K	E (H)	(E) H	
Dr. Öğr. Üyesi Sezgi SARIKAYA SOLAK Üye	Deri ve Zührevi Hastalıklar	T.Ü.T.F. Deri ve Zührevi Hastalıklar A.D.	K	E (H)	(E) H	
Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Galip EKUKLU Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E (H)	(E) H	
Prof. Dr. Filiz TÜTÜNCÜLER KÖKENLİ Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E (H)	(E) H	
Öğr. Gör. Dr. Sinan ATEŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E (H)	(E) H	
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E (H)	(E) H	
Dr. Öğr. Üyesi Doğan ALBAYRAK Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Burhan Can ÇANAKÇI Üye		T.Ü. Dış Hekimliği Fakültesi	E	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Hilal KEKLİCEK Üye		T.Ü. Sağlık Bilimleri Fakültesi	K	E (H)	(E) H	
Avukat Emine NURLU Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E (H)	(E) H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E (H)	(E) H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma