TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

HEREDİTER NON POLİPOZİS KOLOREKTAL KANSER, AİLESEL KOLOREKTAL KANSER VE SPORADİK KOLOREKTAL KANSER HASTALARININ SOYAĞACI, MISMATCH REPAIR GEN MUTASYONUNA BAĞLI MİKROSATELLİT İNSTABİLİTE ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Utku TANTOĞLU

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. M. Ayhan KUZU

ANKARA
2012

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

HEREDİTER NON POLİPOZİS KOLOREKTAL KANSER, AİLESEL KOLOREKTAL KANSER VE SPORADİK KOLOREKTAL KANSER HASTALARININ SOYAĞACI, MISMATCH REPAIR GEN MUTASYONUNA BAĞLI MİKROSATELLİT İNSTABİLİTE ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Utku TANTOĞLU

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. M. Ayhan KUZU

ANKARA
2012

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

HEREDİTER NON POLİPOZİS KOLOREKTAL KANSER, AİLESEL KOLOREKTAL KANSER VE SPORADİK KOLOREKTAL KANSER HASTALARININ SOYAĞACI, MISMATCH REPAIR GEN MUTASYONUNA BAĞLI MİKROSATELLİT İNSTABİLİTE ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

başlıklı,

Dr. Utku Tantoğlu'na ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05.09.2012

Prof. Dr. Semih Baskan
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Prof.Dr.İskender Alaçayır
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Jüri

Prof.Dr.Ayhan Kuzu
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Jüri/Tez Danışmanı

TEŞEKKÜR

Tezimi birçok bilim dalının ortak çalışması sonucu tamamlamış bulunuyorum. Bu nedenle tezimin hazırlanması sırasında emeği geçen tüm öğretim üyesi ve araştırma görevlilerine,

Özellikle; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Işınsu Kuzu ve Dr. Seher Yüksel'e;

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünden Doç. Dr. Hilal Özdağ ve Haldun Doğan'a,

İstatistik aşamasındaki değerli yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Derya Öztuna'ya,

Uzmanlık eğitimimi aldığım kliniğimizi daha güzel ve daha verimli hale getirmeyi kendine görev edinen, değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, akademik ve insani yönleri ile yol gösterici olan değerli hocam, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. M.Semih Baskan'a,

Eğitimime katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Beş yıllık asistanlık yaşantımı güzelleştiren, birlikte çalışmaktan zevk aldığım, tüm asistan arkadaşlarıma ve başasistanlara,

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum kliniğimiz ve ameliyathane hemşire ve tüm personeline,

Hayatım boyunca sonsuz desteklerini benden esirgemeyen, her türlü fedakarlığı ve özveriyi gösteren, varlıklarıyla bana her zaman güç veren aileme, kelebeklerden güzel sevgili eşime ve tüm dostlarıma,

ve

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, tezimin gerçekleşmesinde büyük yardım ve katkıları olan, değerli hocam Prof. Dr. M.Ayhan Kuzu'ya,

en içten teşekkürlerimle...

Dr. Utku Tantoğlu

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY i
TEŞEKKÜR ii
İÇİNDEKİLER iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ v
ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. KOLOREKTAL KANSERLER 4
2.1.1. Epidemiyoloji ve İnsidans 4
2.1.2. Etyoloji 4
2.1.3. Evreleme 5
2.1.3.1. Dukes evrelendirmesi 6
2.1.3.2. TNM klinik sınıflaması 6
2.1.4. Tanı 7
2.1.4.1. Fizik muayene 8
2.1.4.2. İnceleme yöntemleri 8
2.1.5. Tarama 10
2.1.6. Tedavi 11
2.1.6.1. Kolorektal karsinomlarda cerrahi tedavi 11
2.1.7. Kolorektal Kanser Genetik Altyapısı 12
2.1.7.1 Adenom – karsinom yolağı 13
2.1.7.2. Lynch Sendromu genetik altyapısı 14
2.1.8. Lynch Sendromu Patolojisi ve İmmünohistomkimyası 16
2.1.9. Lynch Sendromu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu 18
3. GEREÇ ve YÖNTEM 19
3.1. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME 19
3.2 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İNCELEMESİ 20

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 24
4. BULGULAR 25
5. TARTIŞMA 29
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 32
7. ÖZET 33
8. SUMMARY 35
9. KAYNAKLAR 37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: santigrad Celcius
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
APC	: adenomatöz polipozis koli
AÜTF	: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
BT	: bilgisayarlı tomografi
CEA	: Karsinoembriyonik antijen
Cox-2	: siklooksijenaz-2
DCC	: deleted in colorectal cancer
DNA	: deoksiribonükleik asit
FAP	: familyal adenomatöz polipozis
hMLH1	: mutL homolog1
hMSH2	: mutS homolog 2
hMSH6	: mutS homolog 6
HNPCC	: herediter nonpolipozis kolorektal kanserler
hPMS2	: postmeiotic segregation increased 2
IHK	: immünhistokimya
k-ras	: kirsten ras
MMR	: mismatch repair
MSI	: mikrosatellit instabilitesi
ng	: Nanogram
PCR	: polimeraz zincir reaksiyonu
rpm	: Round per minute
SD	: standart deviasyon
Sn	: Saniye
µl	: Mikrolitre

ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1. Adenom-karsinom sekansı..... 13

Şekil 2. DNA Yanlış eşleşme onarımı 15

Tablo 1. Çalışmamızda incelenen MSI lokusları 20

Tablo 2. Çalışmaya alınan hastaların demografik, PCR ve IHK sonuçları 25

Tablo 3. Gruplara göre yaş ortalamaları ve standart sapmalar..... 27

Tablo 4. Gruplara göre MSI oranı..... 27

Tablo 5. Gruplara göre MMR gen defekti oranları 28

Tablo 6. Çalışmaya alınan hastaların MSI ve MMR gen defektleri açısından karşılaştırılması..... 28

1. GİRİŞ

Kolorektal kanserler, sıklığı toplumlara göre değişen ve kansere bağlı mortalite ve morbiditenin başta gelen nedenleri arasındadır. Erkeklerde prostat ve akciğer kanserleri, kadınlarda ise meme ve akciğer kanserlerinden sonra üçüncü sıklıkta görülmektedir (1,2).

Sağlık Bakanlığının 1998 ve 1999 verilerine göre kolorektal kanserler erkeklerde en sık izlenen dördüncü, kadınlarda en sık izlenen ikinci kanser türüdür ve rektum kanseri her iki cinste de kolorektal kanserlerin yarıya yakınını oluşturmaktadır (3).

Kolorektal kanserlerin görülme sıklığı gelişmiş ülkelerde hızla artmaktadır.

Multifaktöryel nedenlerle gelişen kolorektal kanserlerin tanı yaşı ortalama 62'dir.

Ancak kolorektal kanserler için risk 50-75 yaş arasında değişir. Yaş ilerledikçe risk oranı yükselir.

Kolorektal kanserler sporadik, ailesel ve kalıtsal olarak 3 grupta incelenebilir. Kalıtsal olan kolorektal kanserlerden en sık herediter nonpolipozis kolorektal kanserler (HNPCC veya Lynch sendromu) görülmektedir (bütün kolorektal kanserlerin %3-5'i).

Lynch sendromu klinik olarak birçok kanserin erken görülmesi ile karakterizedir (ortalama yaş <45). İki ayrı klinik varyant tanımlanmıştır: tip I'de ailede sadece kolorektal kanser görülür, tip II'de ise kolon dışı tümörler görülür (özellikle endometrium ve ince barsak adenokarsinomu, renal pelvis ve üreterin transizyonel hücreli tümörü gibi).

HNPCC tanısı aile hikayesi, patolojik bulgular, mikrosatellit instabilite analizi, immünohistokimya analizi ve mismatch repair genlerindeki mutasyon analizlerinin ortak olarak değerlendirilmesi ile konur. HNPCC hastalarında aile hikayesi araştırmaları halen önemini korumaktadır. Bu nedenle Amsterdam kriterleri öne sürülmüştür. Amsterdam I, Amsterdam II ve Bethesta kriterleri bu hastalığın tanısında

kullanılmaktadır. Araştırmamızda da kulanacağımız Amsterdam II kriterleri şu şekildedir: En az üç akrabada patolojik olarak konfirme edilmiş HNPCC- ilişkili kanser bulunması (akrabalardan en az ikisi birbirinin birinci derece akrabası olmalı), en az iki takip eden jenerasyon hastalıktan etkilenmeli ,tanı alan akrabalardan en az birinin tanı yaşı elliden az olmalı ve familyal adenomatozis polipozis koli hastalığı dışlanmalıdır. Bu kriterlerin üçünüde taşıyan hastalar HNPCC grubuna dahil edilir. Bu kriterlerin üçten azını taşıyan hastalar ailesel kolorektal kanser grubuna dahil edilirler. Kriterlerin hiçbirini sağlamayan hastalar sporadik kolorektal kanserler grubuna dahil edilirler (4).

Herediter nonpolipozis kolorektal kanserlerin oluşumuna deoksiribonükleik asit (DNA) eşleşmesi sırasında oluşan yanlış eşleşmelerin onarımında (mismatch repair – MMR) oluşan bozukluğun neden olduğu gösterilmiştir. Bu sendromda kansere yatkınlık, DNA MMR genlerinin bir tanesinde silinme şeklinde germline mutasyonu oluşması ile gerçekleşmektedir. Bu hastaların bütün dokularında bu mutasyon bir allelde bulunmaktadır. Kolorektal mukoza veya diğer hücrelerde somatik mutasyon oluşması ile diğer allelinde kaybedilmesi ile DNA MMR geni işlevini kaybeder ve bu durum neoplazi gelişimiyle sonuçlanır. MMR gen mutasyonları arasında mutL homolog1 (hMLH1), mutS homolog 2 ve 6 (hMSH2, hMSH6) ve postmeiotic segregation increased 2 (hPMS2) bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu mutasyonlardan hangilerinin daha değerli olduğu araştırılmıştır ve sadece hMLH1 ve hMSH2 araştırılan çalışmalarda %85 sensitivite saptanmasının karşısında hMLH1, hMSH2, hMSH6, ve hPMS2'nin birlikte araştırıldığı çalışmalarda %92 sensitivite saptanmıştır (5). Bu nedenle çalışmamızda bu dört MMR gen mutasyonu da immünohistokimyasal (IHK) olarak araştırılacaktır.

HNPCC hastalarından alınan tümör dokularında sıklıkla mikrosatellit instabilitesi (MSI) olarak adlandırılan DNA replikasyon hatasına rastlanmaktadır. Mikrosatellitler insan genomu boyunca serpiştirilmiş şekilde dağılım gösteren ve 1-6 baz arasında, kısa ve çiftler olarak tekrar eden DNA dizileridir ve bunlar genomik instabilitenin bir formu olan mikrosatellit instabilitesinden etkilenebilirler. DNA replikasyonu sırasında tekrarlayan ünitelerin delesyon veya insersiyon ile mikrosatellit allellerinin uzunluğunun değişmesi ve DNA MMR genleri mutasyonları nedeniyle onarımın

yapılamaması durumunda MSI'den bahsedilir. MSI analizi HNPCC hastalarında tarama metodu olarak kullanılmaktadır. MSI'nin sensitivitesi %93 olarak tespit edilmiştir. MSI araştırılması için belirlenen bazı mikrosatellit lokusları polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldıktan sonra bu lokusların boyutları elektroforetik olarak analiz edilmektedir (6,7).

İki ayrı çalışmada, araştırılacak hastalarda hem MSI hem de IHK'nın germline mutasyonu açısından genetik analizinin yönlendirme taraması için yüksek oranda efektif olduğu gösterilmiştir (5).

Kolorektal kanserler önlenebilir kanserlerdir. Özellikle HNPCC hastalarında daha düşük patolojik grade saptanmasına rağmen prognoz daha iyi olmaktadır. Bu tarz hastaların takipleri önem taşımaktadır.

Bu çalışmada kliniğimizde ameliyat edilen ve tanı alan kolorektal kanserli 42 hastaya ait doku örneklerinde immunohistokimyasal yöntemlerle MMR genlerinin (hMLH1, hMSH2, hMSH6 ve hPMS2) mutasyonlarının protein seviyesinde belirlenmesi ve DNA fragment analizi yöntemi ilede mikrosatellit instabilitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KOLOREKTAL KANSERLER

2.1.1. Epidemiyoloji ve İnsidans

Kolorektal kanserler, sıklığı toplumlara göre değişen ve kansere bağlı mortalite ve morbiditenin basta gelen nedenleri arasındadır. Erkeklerde prostat ve akciger kanserleri, kadınlarda ise meme ve akciğer kanserlerinden sonra üçüncü sıklıkta görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı, gelişmekte olan ülkelerden daha fazladır (1,2).

Sağlık Bakanlığının 1998 ve 1999 verilerine göre kolorektal kanserler erkeklerde en sık izlenen dördüncü, kadınlarda en sık izlenen 2. kanser türüdür ve rektum kanseri her iki cinste de kolorektal kanserlerin yarıya yakınını oluşturmaktadır (3).

2.1.2. Etyoloji

1. Coğrafya: Hastalığın dünyadaki dağılımı bölgeler arasında farklılıklar gösterir. Kuzey Amerika ve Yeni Zelenda'da sık görülmektedir. Afrika ve Orta Amerika'da daha az görülür.

2. Yaş: Kolorektal kanser görülme sıklığı 40 yaşından itibaren artar. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de 93-95 yılları arasında yapılan bir taramada 40 yaşın altındaki hastalarda kolorektal kanser görülme oranı %0.05-0.06 iken aynı oran 40-60 yaş arası %0. 6- 0. 8 ve 60-80 yaş arasında %3-4 olarak bulunmuştur (8).

3. Aile hikayesi ve genetik: Ailede kolorektal kanser bulunması bir diğer risk faktörüdür. Birinci derece bir akrabada kolorektal kanser bulunmasıyla risk 1. 7 kat artarken, ikiden fazla kolorektal kanser bulunduğunda risk 2.7 kat ve 45 yaş altı akrabalarda kolorektal kanser varlığında 5.3 kat artar.

Kolorektal kanser gelişme riski familyal adenomatöz polipozis (FAP) ve herediter non polipozis kolorektal kanser sendromunda yüksektir (9).

HNPCC'de kolorektal kanserli hastanın en az üç akrabasında kolorektal vardır ve bu hastaların en az biri 50 yaş altında olup en az biri birinci derece akrabadır ve bu durum en az iki nesilden beri devam etmektedir (Amsterdam Kriterleri).

HNPCC'nin FAP'tan farkı polipler yoktur ya da çok azdır. %20 senkron, %35 metakron tümör vardır.

4. Şişmanlık, yağdan zengin ve posalı yiyeceklerden fakir beslenme bilinen risk faktörleridir (10,11).

5. Kolorektal kanserle ilişkili diğer durumlar:

   - Adenomatöz polipler başta olmak üzere, hamartomatöz ve jüvenil polipozis sendromlarında da kolorektal kanser riski artar (12,13).

   - İnflamatuar barsak hastalıklarında kolorektal kanser insidansı artar.

   - Meme, over ve uterus kanserlerinde kolorektal kanser gelişme riski iki kat artmıştır.

   - Üreterosigmoidostomi ve pelvik radyasyon uygulanması risk faktörleri arasındadır.

   - Kolorektal kanserlerin %75'i ise sporadik kanser olgularındandır ve hiçbir risk faktörü yoktur.

2.1.3. Evreleme

Evrelemede amaç; hastalığın yayılım derecesini saptamak, bu şekilde tedavinin planlanması ve prognoz açısından tahminde bulunabilmektir. Bu amaçla en sık kullanılan sistemler TNM ve Dukes sistemleridir.

2.1.3.1. Dukes evrelendirmesi

Evre : Yayılım

A : Sadece mukozada

B : Tüm duvar (+), lenf ganglionu (-)

C : Tüm duvar(+), lenf ganglionu (+)

D : Uzak metastaz (+)

2.1.3.2. TNM klinik sınıflaması

T- Primer tümör

Tx : Primer tümör değerlendirilemiyor.

T0 : Primer tümör yok.

Tis : Karsinoma in situ.

T1 : Tümör submukozaya yayılmış.

T2 : Tümör muskularis propria'ya yayılmış.

T3 : Tümör subserozaya veya peritonla kaplı olmayan perikolik veya perirektal dokulara geçmiş.

T4 : Tümör visseral peritonu (seroza) geçmiş ve komşuluk yoluyla diğer organları tutmuş

N- Rejyonel lenf nodülleri

Nx : Rejyonel lenf nodülleri değerlendirilemiyor.

N0 : Rejyonel lenf nodüllerine yayılım yok.

N1 : 1 -3 perirektal veya perikolik lenf nodülünde metastaz var.

N2 : 4 veya daha fazla pararektal veya perikolik lenf nodülünde metastaz var.

N3 : Vasküler yapılar boyunca herhangi bir lenf nodülünde metastaz var.

M- Uzak metastaz

Mx Uzak metastaz varlığı değerlendirilemiyor.

M0 : Uzak metastaz yok.

M1 : Uzak metastaz var.

2.1.4. Tanı

Hikaye, fizik muayene ve tanısal testlerle tanı konulur. Özellikle aile hikayesi, rektal kanama, dışkılama alışkanlığındaki değişiklikler ve kilo kaybı sorgulanmalıdır.

Kolorektal kanserlerde semptom ve bulgular tümörün lokalizasyonu, makroskopik yapısı, tümörün yayılım derecesi ve kanama, perforasyon ve tıkanma gibi komplikasyonların oluşumuna göre değişir (14).

Sağ kolonun çapının sol kolonun yaklaşık iki katından fazla olması, bu bölümdeki dışkının daha sıvı olması ve bu bölgenin tümörlerinin daha çok ülseröz ve vejetan tipte olması nedeniyle sağ kolon kanserlerinde tıkanma nadiren görülür. Sağ kolon kanserlerinde karın ağrısı, dispeptik yakınmalar, halsizlik ve karın sağ alt kadranda palpabl kitle en sık görülen yakınmalardır. Gözle görülür kanama nadiren görülür. Bu nedenle tümör belli bir çapa ulaşmadan tanı genelllikle konulamaz.

Kolorektal kanserlerde hastanın yakınmalarının başlangıcı ile definitif tedavi arasındaki süre ortalama 7-9 aydır (15,16,17).

Dışkılama güçlüğü, dışkı çapında incelme, kabızlık veya kabızlık sürecini takip eden ishal, distansiyon, kolik tarzda ağrılar ve dışkıya bulaşmış rektal kanama sol kolon kanseri hastalarında en sık görülen şikayetlerdir. Sol kolon kanserlerinde bu bölgede kolon çapının daha dar olması, dışkının daha kıvamlı olması ve bu bölümde yerleşen tümörlerin daha çok daraltıcı tipte olması nedeniyle temel yakınmalar dışkılama ile ilgili değişikliklerdir. Kanama sık olmakla birlikte nadiren masiftir. Kısmi ya da tam obstrüksiyon gelişebilir.

Rektum kanserlerinde ana semptom rektal kanamadır. Kanama dışkıyla karışık dışkının üzerine sürülmüş veya dışkı öncesinde olabilir. Sık görülen diğer bulgular kabızlık ve karın ağrısıdır. Bazen de komplikasyonlar hastalığın ilk bulgularını oluşturur: Perforasyon, intestinal obstrüksiyon ve fistül oluşumu.

2.1.4.1. Fizik muayene

Hastalığın lokal yayılım derecesi ve varsa uzak yayılım bulguları araştırılmalıdır Karın muayenesinde ve rektal tuşede kitle varlığı araştırılmalıdır.

Ayrıntılı anorektal muayene yapılmalıdır. İnspeksiyonda abse, sinüs, kondilom, eksternal hemoroid, dermatit ve cilt lezyonlarının varlığı araştırılmalıdır.

2.1.4.2. İnceleme yöntemleri

En sık başvurulan yöntemler kolon grafisi, sigmoidoskopi, kolonoskopi, transrektal ultrasonografi ve bilgisayarlı tomografi (BT)'dir.

Kolon grafileri kolorektal kanserlerde tanısında son derece önemli bilgiler verir. Ancak yalnız başına tarama için kullanılmamalıdır.

BT ile primer tümör saptanabilir ve primer tümör ile tümörün duvardaki yayılımı gösterilebilir. Ancak tanı amaçlı ilk kullanılacak yöntem BT olmamalıdır.

Transrektal ultrasonografi preoperatif evrelemede kullanılan bir diğer yöntemdir.

Sigmoidoskopi: Kolorektal kanserlerin yaklaşık 2/3'ü 60 cm'lik sigmoidoskop ile ulaşılabilecek bölgededir. Kolonun distal bölümlerinden kaynaklandığı düşünülen patolojilerin saptanmasında ve özellikle asemptomatik hastalarda tarama amacıyla kullanılabilir. Gizli veya belirgin kanama varlığında kolonoskopi tercih edilmelidir.

Kolonoskopi kaynağı bulunamayan kanamalarda, kolon grafisinde anormal bulgular saptandığında, sigmoidoskopide polip saptandığında, inflamatuar barsak hastalıklarında ve daha önceden polip veya kolorektal kanseri bulunan hastalarda tanı amaçlı olarak yapılabilir. Bunun yanısıra; kolonoskopi tedavi amacıyla polipektomide, kanama kontrolünde, yabancı cisimlerin çıkarılmasında, psödoobstrüksiyonun dekompresyonunda, sigmoid volvulusta detorsiyonda, striktürlerin dilatasyonunda, tümörlerin fulgurasyonunda kullanılabilir.

Günümüzde rektal kanamalarda artan bir oranda kolonoskopi tercih edilmektedir.

Kolonoskopi tamamlanırsa kolon grafisine gerek yoktur. Önceden hastaya kolon grafisi çekilmiş olsa bile kolon grafisiyle 5 mm'den küçük poliplerin (Dimunitif polip) %20'sinin gözden kaçırılabileceği düşünülerek kolonoskopi yapılmalıdır (16).

Polipektomi sonrası polipin bir bölümünde kanser saptanan hastalarda, polip saplıysa, tümör iyi veya orta diferansiye ise, venöz veya lenfatik invazyon yoksa, rezeksiyon sınırları negatifse, kanser muskularis mukozada sınırlı ve polipin baş veya boynunda ise polipektomi yeterlidir. Aksi durumlarda hastalar ameliyat edilerek rezeksiyon yapılır.

Laboratuvar: Laboratuar testlerinin hiçbiri kolorektal kanserlere spesifik değildir. Gaytada gizli kan tanı ve tarama amaçlı kullanılabilir. Karsinoembriyonik antijen (CEA) kolorektal kanser hastalarının yanı sıra mide, pankreas, meme, akciğer, prostat, over, safra yolları ve uterus gibi çeşitli organların benign ve malign durumlarında artabilir. Bu nedenle erken tanıdan daha çok takipte kullanılmalıdır (18).

2.1.5. Tarama

Bütün otörlerin üzerinde anlaştığı bir tarama programı yoktur, hastalar risk faktörlerine göre sınıflandırılır (16).

Düşük riskli hastalar: 50 yaşından başlanarak aşağıda belirtilen şekilde tarama yapılabilir;

1. Yıllık gaytada gizli kan tahlili: Hasta arka arkaya yaptığı üç dışkılamanın her birinden ikişer örnek verir. Eğer herhangi biri pozitif bulunursa kolonoskopi ya da kolon grafisi ile birlikte sigmoidoskopi yapılır.

2. Her 5 yılda bir sigmoidoskopi

3. Her 5 yılda bir sigmoidoskopi ve yıllık gizli kan

4. 10 yılda bir kolon grafisi (tercihen sigmoidoskopi ile birlikte)

5. Her 10 yılda bir kolonoskopi

Yüksek riskli hastalar:

a. Birinci derece akrabalarında kolorektal kanser bulunanlar, risksiz hastalar gibi takip edilir, ancak takip 40 yaşında başlar.

b. Daha önce adenomatöz polip nedeniyle polipektomi yapılan hastalara 3 yıl sonra kolonoskopi yapılır. Normalse hasta 5 yıl sonra kontrole çağrılır.

c. FAP ailesindeki bireylerde FAP geni varlığı genetik testlerle araştırılır.

   18 yaşından itibaren her yıl fleksible sigmoidoskopi yapılır.

d. HNPCC'de kesinleşmiş bir takip protokolü yoktur. Ya 18 yaşından başlanarak 1-2 yıl arayla kolonoskopiler yapılır, 40 yaşından sonra ise yılda bir kolonoskopi yapılır ya da en genç aile kolorektal kanserden 5 yıl önce takibe başlanır.

e. İnflamatuar barsak hastalıklarında pankolit varsa hastalığın başlangıcından 8 yıl sonra kolonoskopi yapılır. Hastalık sadece sol kolonu tutuyorsa başlangıçtan 15 yıl sonra kolonoskopi yapılır.

2.1.6. Tedavi

Kolorektal kanserli hastalarda tedavi modalitlerini medikal tedavi, radyoterapi ve cerrahi tedavi oluşturmaktadır. Lokorejyonel kolorektal kanserlerin ana tedavi yöntemini cerrahi oluşturmaktadır. Kolon kanserlerinde adjuvan kemoterapi rekürrens riskinin düşürülmesi için uygulanmaktadır. Rektal kanserlerde neoadjuvan kemo-radyoterapi ise rezektabilitenin arttırılması, sfinkterin korunabilmesi ve lokal-uzak metastazların engellenmesi için uygulanmaktadır. Adjuvan kemoterapi ise uzak metastazların engellenmesi için uygulanır. Evre IV hastalıklarda kemoterapi uygulanmaktadır. Karaciğer metastazları için ise rezektabl olduğu görülen bütün hastaların cerrahiye alınması gerektiği konusunda görüş birliği oluşmaktadır.

2.1.6.1. Kolorektal karsinomlarda cerrahi tedavi

Kolorektal kanserlerde cerrahi tedavinin ana hedefi, kanserli kolon kesimi ile birlikte onun lenfatik drenajını içeren mezo ve kanser ile tutulmuş civar organ ve yapılarını çıkartılması esasına dayanır. Kolonun lenfatik sistemi o kesimi besleyen arterlere eşlik ettiği için çıkartılacak segmentin boyutları onu besleyen damarlara göre ayarlanır (25). Radikal cerrahi tedavide; ana damarların bağlanması, tümörsüz rezeksiyon sınırları oluşturmak ve tümörün invaze ettiği çevre doku ve organları çıkarmayı hedeflenir.

Bugün için tümörden distal ve proksimalde 2 cm'lik sağlam kısım çıkarılması yeterli kabul edilmektedir (26).

Palyatif işlemler ise, sınırlı rezeksiyon, by-pass veya rezeksiyonsuz kalıcı stomadır.

Ameliyat sırasında karaciğer, periton gibi uzak metastazlar olsa da, obstrüksiyon ve kanama komplikasyonlarını önlemek için, mümkünse primer tümör çıkarılmalıdır.

Rektum kanserinde cerrahi tedavi: Cerrahi rezeksiyon tüm rektum kanserli hastalarda ana tedavi yöntemidir. Cerrahi tedavinin esasını tümör ve tutulmuş lenf nodlarının operasyon ile çıkarılması oluşturur. Yirminci yüzyılın erken dönemlerinde rektum kanserlerinin başarılı olarak tedavi edilmesinde Miles tarafından geliştirilen ve ilk olarak 1908'de Lancet'te yayınlanan abdominoperineal rezeksiyon ve kalıcı kolostomi kullanılmıştır. APR halen distal cerrahi sınırı yeterli olmayan hastaların tedavisinde tercih edilmektedir.

Rektum kanserli hastalarda prognozu belirleyen en önemli faktör cerrahi tedavidir.

Günümüzün standart tedavi yöntemi total mezorektal eksizyon (TME)'dur. TME öncesi yapılan künt diseksiyonda, mezorektal dokunun tam olarak çıkartılamaması ya da yırtılmasına bağlı %40'lara ulaşan lokal nüks oranları mevcuttur (19-22).

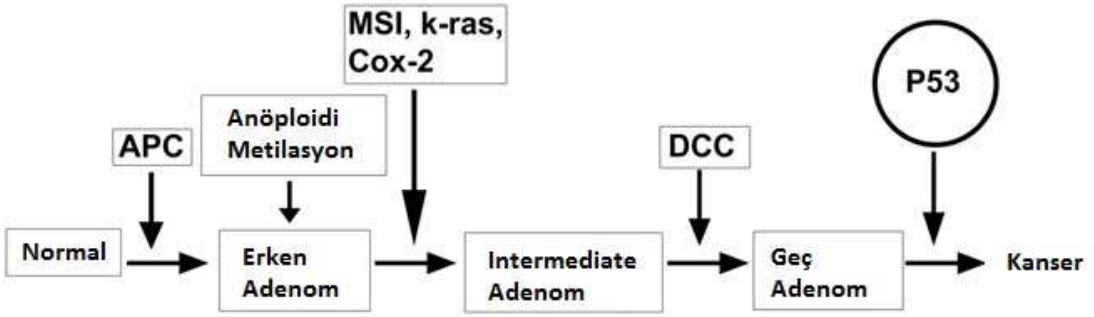
Total mezorektal eksizyon, rektumun damar ve lenfatiklerini içeren yapının bir bütün olarak çıkarılmasıdır. Bu tekniğin temel dayanağı, mezorektumun hastalığın son dönemine kadar tümör yayılımına karşı koruyucu kılıf oluşturan bir yapı olmasıdır (23,24).

2.1.7. Kolorektal Kanser Genetik Altyapısı

Tümörogenez yolağında oluşan mutasyonların çoğu onkogenlerin fonksiyon kazanmasına veya tümör supresör genlerin bloklanmasına neden olmaktadır. Hanahan ve Weinberg tümörogenezisin çok basamaklı bir oluşum olduğu hipotezini sunmuşlardır. Hipotezlerine göre en az altı basamak gereklidir (27). Bunlar ; apopitozis inhibisyonu, büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterli olma, büyüme engelleyen sinyallere yanıtsızlık, uzamış anjiogenezis, limitsiz replikatif potansiyel, doku invazyonu ve metastaz.

2.1.7.1 Adenom – karsinom yolağı

Adenom – karsinom yolağı ilk olarak Fearon ve Vogelstein tarafından hipotez olarak ortaya atılmıştır. Modellerinde normal kolonik hücreden tümör hücrelerine olan transformasyonu göstermişlerdir (Şekil -1) (28). Malign hücrelerin oluşumu için 4-5 mutasyon gerektiğini göstermişlerdir. APC, ras, DCC, ve p53 genlerinde mutasyon olduğunu göstermişlerdir. Bu transformasyonun 15-17 yıl sürdüğü saptanmıştır (29). ABD'de ortalama kolorektal kanser yaşının 65 olması nedeniyle 50 yaşından itibaren sporadik kolorektal kanser taramalarının başlatılmasını önermektedirler.



Şekil 1. Adenom-karsinom sekansı (28).

Fearon ve Vogelstein çalışmasından adapte edilmiştir Şemada benign kolon dokusundan invazif kansere kadar oluşan genetik alterasyonlar gösterilmektedir. APC, adenomatöz polipozis koli; MSI, mikrosatellit instabilitesi; Cox-2, siklooksijenaz-2; k-ras, kirsten ras; DCC, deleted in colorectal cancer.

K-RAS

KRAS guanin nükleotidi bağlayıcı proteini kodlayan bir proto-onkogendir. Bütün insan kanserlerinin yaklaşık %25'inde ve kolorektal kanserlerin %35-50'sinde bu gende mutasyon saptanır (30). Bu gen RAS ailesinin bir üyesidir ve RAF/MEK/ERK sinyal kaskadının aktifleştirilmesinde rol alır. Bu kaskad hücre büyümesi ve hücre siklusuna girilmesini sağlar. KRAS genindeki mutasyonlar GTPaz aktivasyonunu azaltırlar ve aktif konfirmasyonda kalan protein oluşumuna neden olurler. KRAS

mutasyonu mevcut olan kolorektal kanserler cetuximab gibi epidermal growth faktör reseptör ajanlarına dirençlidir (31).

DCC

Bu gen 18q21 lokasyonunda yerleşmiş olan tümör supresör gendir. DCC proteini neptin bağımlı resptördür ve apoptozis regülasyonunda rol alır. Hücre hareketliliğinde rolü olabilir. DCC mutasyonu sporadik kolorektal kanserlerin %10-15 'inde görülür ve tümörogenezis yolağında geç bir basamakta rol almaktadır (32).

p53

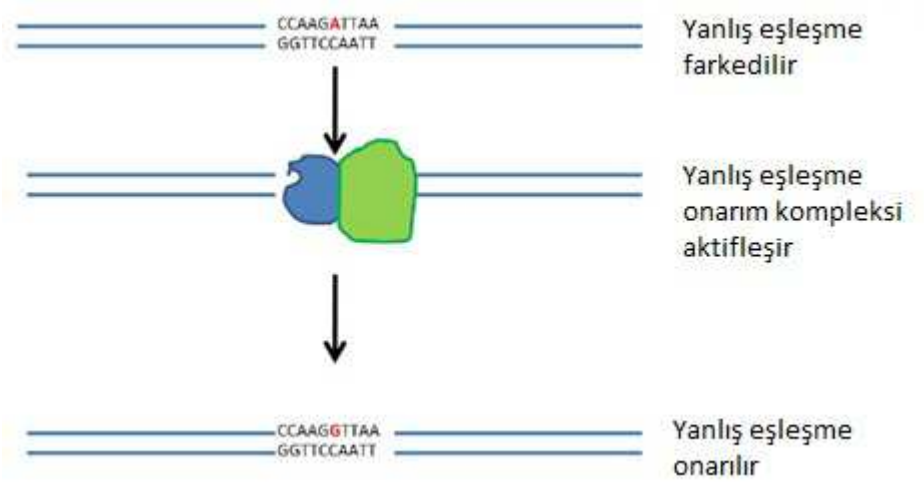
p53 geni üzerinde birçok çalışma yapılmıştır ve iyi anlaşılmış bir gendir. 17p12 lokasyonunda bulunur ve birçok malign oluşumda mutasyonu gösterilmiştir (33). P53 geni hücre bölünmesinde DNA hatalarının onarımı için bir duraklama yaratmaktadır. DNA daki hasar büyük orandaysa apoptozu indükleyebilir. Bu genin mutasyonu sporadik kolorektal kanserlerin %40-50 sinde görülmektedir ve tümörogenezis basamaklarının geç bir kısımında rol alır (33-35).

2.1.7.2. Lynch Sendromu genetik altyapısı

Lynch sendromu otozomal dominant geçiş göstermektedir ve kolorektal kanserlerin %3-4 ünü oluşturmaktadır. Bu sendrom bulunan hastalarda hayat boyu kanser gelişim riski %80'dir.

Lynch senderomu 1900'lerde patolog Warthin tarafından değerlendirilmiş ve 1974'de Henry Lynch ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (36). Lynch sendromunda klinik mismatch repair genlerindeki (MMR) değişikliklere göre oluşmaktadır. MMR gen ürünleri DNA replikasyonu sırasında oluşan baz çifleşmesi hataları ve küçük nükleotid insersiyon delesyon mutasyonlarını tanımlayıp

düzelterek genomik bütünlüğün korunmasına yardım etmektedirler (Şekil-2) (37) . MMR gen defekti bulunan hücrelerde normal hücrelere göre 100-1000 kat daha fazla mutasyon görülmektedir (38). En az 4 adet MMR geni Lynch sendromu ile ilişkilendirilmiştir. Bunlar MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2'dir. Etkilenmiş ailelerde bu genlerde mutasyon %80 oranında görülmektedir. Bu mutasyonların %90'ını MLH1 ve MSH2 mutasyonları oluşturmaktadır. Lynch sendromunda tümör dokularında yapılan DNA çalışmalarında kodlamada rol almayan mikrosatellit bölgelerinde tekrarlayan sekansları hedef alan multipl mutasyonlara bağlı genetik instabilite göstermiştir. Bu duruma mikrosatellit instabilitesi adı verilmektedir Tümörler yüksek MSI (2 ve fazla marker), düşük MSI (2'den az marker) ve MSI-stabil olarak sınıflandırılmaktadır (38). Çoğu Lynch sendromu tümörü yüksek MSI'ne sahiptir ve CpG adası metilatör fenotipi negatiftir. Sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %15'i MSI göstermektedir ve bunların çoğu CpG adası metilatör fenotip pozitiftir ve BRAF mutasyonu içermektedirler.



Şekil 2. DNA Yanlış eşleşme onarımı

Lynch sendromunda yanlış eşleşmeyi farkeden ve onaran proteinler mutasyona uğramıştır bu nedenle yanlış eşleşmeler onarılamaz.

Fenotip olarak Lynch sendromlu hastalar sağ taraf yerleşimli kolorektal kanser oluşumuna meyillidirler. Bu hastalarda ayrıca endometriyum, mide, over, hepatobiliyer, üriner, pankreas, ince barsak ve santral sinir sistemi maligniteleri görülebilir. Bu sendromun bir alt tipi olan Muir-Torre sendromunda sebase

adenomlardan oluşan cilt kanserleri, bazal hücreli kanserler ve keratoakantomalar görülür.

Lynch sendromu tanısını destekletyen 2 ayrı kriter seti tasarlanmıştır; aile hikayesi baz alınarak düzenlenmiş olan Amsterdam kriterleri ve Bethesda kriterleri (39). Revize edilmiş Bethesda kriterleri belirgin aile hikayesi olmayan kişilerde genetik araştırmanın önerilebilmesi için tasarlanmıştır. Bethesda kriterleri hasta ve tümör özelliklerini ve tümörün MSI durumunu göze almaktadır. Takip eden durumlar olası Lynch sendromu için dikkat çekmelidir; MSI yüksek histolojiye sahip tümörler, tümörü infiltre eden lenfositlerin bulunması, Crohn benzeri lenfositik reaksiyon, musinöz/yüzük hücreli diferansiasyon, medüller büyüme paterni ve 50 yaşından genç hastada bulunması (40).

2.1.8. Lynch Sendromu Patolojisi ve İmmünohistokimyası

Lynch sendromu hastalarında görülen kolorektal adenokarsinomlar genç yaşta ve sağ kolon yerleşiminde görülmeye eğilimlidirler. MSI yüksek olan Lynch sendromu ilişkili ve sporadik kolorektal adenkokarsinomlar histolojik olarak mikrosatellit stabil adenokarsinomlardan ayırt edilemeyebilir (pseudostratifiye nükleuslu iyi forme glandlar ve luminal nekroz). Bununla birlikte birçok MSI yüksek tümör karakteristik fakat spesifik olmayan farklı histolojik karakteristik taşır. Taşlı yüzük hücreler, müsinöz, kötü diferansiye veya katı tabaka (medüller) tipte morfoloji, farklı çeşitlerde morfoloji içeren ve lenfosit artışı (intratümöral lenfositler ve/veya Crohn benzeri reaksiyon) karakteristiktir (41,42,43). Taşlı yüzük hücreli tümörler tümörün çoğunu kaplayan müsin damlacıkları tarafından nükleusları itilmiş karakteristik tekli hücreler içerirler. Müsinöz (kolloid) adenokarsinomlar tümöral oluşumun çoğunun müsin adalarınından oluştuğu ve değişik derecede displazi gösteren neoplastik hücreler içeren tümörlerdir. MSI yüksek tümörlerin bir diğer özelliğide sinsitisyal yayılım (belirgin hücre sınırları olmaması) ile solid tabakalanma görülmesi ve belirgin gland formasyonunun olmamasıdır. Bazen MSI yüksek tümörler bahsedilen morfolojilerden birkaçını içerirler (konvansiyel gland olşuturan adenokarsinom dahil). Neoplastik hücrelerle yakın ilişkide bulunan ve hatta infiltre eden lenfositler

göze çarpabilir (tümör infiltre eden lenfositler). Lenfositler neoplastik olmayan tümörün genişleyen sınırında lenfositik agregatlar olarak görülebilir (Crohn benzeri rekasiyon).

Parafine gömülmüş dokularda spesifik protein hücre markerlarının tespit edilmesi için kromojenle birleştirilmiş spesifik antikor kullanılan immünhistokimya yöntemi kullanılır. İmmünohistokimyasal boyama çalışmaları Lynch sendromunda tarama testi olarak kullanılabilir. İmmün boyanmanın olmaması hedef proteinin ekspresyonunda kayıp ve MSI yüksek fenotipi gösterir. MLH1, MLH2, MSH6 ve PMS2'nin kullanıldığı çalışmalarda germ line mutasyonları gösterilemesede MSI yüksek tümörlerin tespit edilmesinde %92 sensitivite gösterilmiştir (44). MLH1 ve MLH2 enzimleri majör, PMS2 ve MSH6 enzimleri ilişkili minör enzimler olarak adlandırılmışlardır. Majör enzimlerdeki fonksiyon yokluğu ilişkili minör enzimlerde de fonksiyon yokluğu yaratmaktadır. Tersi geçerli değildir. Örnek olarak MLH1 enziminde boyanma olmaması durumunda PMS2 içinde boyanma olmamaktadır. Fakat tersi doğru değildir (PMS2'de boyanma olmaması MLH1 de boyanma varken olabilir). Muir-Torre sendromu çoğunlukla MSH2 gen mutasyonuna bağlı olarak görülür.

Lynch sendromunda daha çok MLH1 ve MSH2 mutasyonları görülmektedir (45). Sporadik MSI yüksek kolorektal kanserler çoğunluklar MLH1 metilasyonunun sonucu olarak oluşmaktadır ve bu durum MLH1 ve PMS2 ekspresyonunun kaybına yol açmaktadır. Bu nedenle ileri yardımcı moleküler çalışmalar eklenmiştir; MLH1 metilasyonu veya BRAF mutasyonu için. Bu değişiklikler sporadik kanserlerde sık görülür fakat Lynch sendromunda nadirdir. Bu durum Lynch sendromu ve sporadik kanserde ayırım sağlayabilir. Ayrıca immünohistokimyasal boyama çalışması hangi genin mutasyona uğradığını işaret eder ve teorik olarak genetik çalışmanın hangi gen üzerine yapılması gerektiğine yardımcı olur.

2.1.9. Lynch Sendromu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Mikrosatellitler insan genomu boyunca serpitirilmiş kısa ve çiftler halinde tekrarlanan DNA sekanslarıdır (46,47). Bunlar mikrosatellit instabilitesi adı verilen bir genomik instabilite formuyla etkilenebilirler (48,49,50,51). MSI, DNA replikasyonu sırasında tekrarlayan ünitelerin insersiyon veya delesyonuna bağlı mikrosatellilt alellerinin uzunluğunda değişme oluşması ve DNA MMR sisteminin bu hataları düzeltememesi nedeniyle oluşur. MSI analizi Lynch sendromu hastalarına yönelik tarama ve kolorektal kanser hastalarında ileri genetik test gerekliliğini saptamada kullanılmıştır. Revize edilmiş Bethesda kılavuzunda MLH1/MSH2 mutasyonunun saptanmasında MSI analizinin etkili olduğu gösterilmiştir (sensitivite %81.8, spesifite %98) (52).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

2006-2011 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (AÜTF) Hastanelerinde Genel Cerrahi Anabilim Dalı tarafından kolorektal kanser tanısıyla ameliyat edilen bütün hastaların daha önce çıkarılmış olan aile ağaçları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı tarafından değerlendirilerek Amsterdam II Kriterleri uygulanmıştır. Bu kriterlerin 3'ünüde sağlayan 14 hasta Lynch sendromu grubuna alınmıştır. Amsterdam II kriterlerinden 1 veya 2 kriteri taşıyan hastalardan rastgele seçilen 14 hasta Ailesel kolorektal kanser grubuna alınmıştır. Amsterdam II kriterlerinden hiçbirini sağlamayan hastalardan rastgele seçilen 14 hasta Sporadik kolorektal kanser grubuna alınarak 3 grupta 14'er hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların preparatları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından arşivden çıkartılmış ve immünohistokimya ve polimeraz zincir reaksiyonu için hazırlanmıştır.

3.1. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME

Klinik olarak ailesel, LYNCH ilişkili ve sporadik adenokarsinom olduğu düşünülen 42 hastanın kolon rezeksiyonlarına ait arşivlenen H&E boyalı patoloji preparatları yeniden değerlendirilmiş, tümör ve normal mukoza içeren alanlara ait bloklar seçilmiştir. Histopatolojik olarak tümörler WHO 2010 sınıflamasına göre sınıflandırılmıştır. Ayrıca seçilen bloklardaki nekroz oranı, tümör dokusu oranı ve preoperatif radyo kemoterapi uygulananlarda radyoterapi etkisi açısından değerlendirilmiştir. Bunlardan sadece bir hasta haricinde her hastanın tümör ve normal kolon duvarına ait blokları immünhistokimyasal ve moleküler incelemeler için seçilmiştir. Bir hastaya ait elde edilen sadece tümörlü blok değerlendirilebilmiştir. Tümörlü ve normal mukoza içeren bloklardan elde edilen 4 mikrometrelik kesitler üzerinde immünhistokimyasal inceleme için ilk aşamada primer antikor olarak MLH1 (Cellmarque clone G168-728, dilüsyon oranı: 1/50), MSH2 (Cellmarque clone G219-129, dilüsyon oranı: 1/50), MSH6 (Cellmarque clone 44, dilüsyon oranı: 1/50) ve

PMS2 (Cellmarque clone MRQ-28, dilüsyon oranı: 1/25) , monoklonal antikorları kullanılmıştır. Bu reaksiyonun görüntülenebilmesi için sekonder antikor sistemi olarak Ventana Ultraiview Kit ve DAP kromojen kullanılarak Ventana XT immunboyama cihazı ile immunhistokimyasal boyama gerçekleştirilmiştir. İmmunhistokimya değerlendirilmesinde nükleer boyanma spesifik kabul edilmiştir. Gerek normal mukozadaki epitel gerekse de tümör hücrelerinin nükleer boyanması değerlendirilmiştir. Nükleer boyanmada kayıp derecelendirilmiş, tümör hücreleri arasında %75'den daha yüksek oranda kayıp varlığı mikrosatellit instabilitesi bulunduğu şeklinde kabul edilmiştir.

3.2 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İNCELEMESİ

Tümörlü bloklardaki normal dokular mikroskopik diseksiyonla uzaklaştırılmış ve maksimum tümör içeren dokulardan hazırlanan 5 mikrometre kalınlığından 8 adet parafin kesit DNA eldesi için kullanılmıştır. Elde edilen DNA'larda, Promega MSI Analysis kiti (Version 1.2) kullanılarak incelenecek lokuslar polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) alınmıştır (57).

Çalışmada kullanılan Promega MSI Analysis kiti (Version 1.2) ile incelenen lokuslar aşağıda belirtilmiştir. Belirtilen lokuslar mikrosatellit instabilitesi için literatürün onayladığı lokuslardır (5).

Tablo 1. Çalışmamızda incelenen MSI lokusları

Lokus	Gen	Genbank Numarası	Allel Aralığı
NR-21_3	SLC7A8	XM_033393	94–101
BAT-26	hMSH2	U41210 U04045	103–115
BAT-25	c-kit	L04143 X06182	114–124
NR-24_3	Zinc finger2	X60152	130–133
MONO-27		AC007684	142–154

DNA İzolasyonu:

Doku örnekleri1,5 ml tüpler içinde parafin bloktan kesitler alınmış şekilde hazırlandı.

DNA izolasyonu :

Qiagen, QIAamp DNA FFPE Tissue kit kullanıldı.

Prosedür :

1. Seksiyonlar 1,5 ml santrifüj tüpüne konuldu ve 1 ml ksilen eklendi. 10 saniye beklendi
2. Örnekler oda sıcaklığında son hızda 2 dakika boyunca santrifüj edildi.
3. Süpernatan pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
4. 1 ml ethanol (%100) eklendi.
5. Örnekler oda sıcaklığında son hızda 2 dakika boyunca santrifüj edildi.
6. Süpernatan pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
7. Tüpler açıldı ve rezidüel ethanolün buharlaşması için 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
8. 180 mikrolitre tampon çözelti ve 20 mikrolitre proteinaz K eklendi ve karıştırıldı.
9. Örnekler lizisin tamamlanması için 56°C'de 1 saat süreyle bekletildi.
10. Örnekler 90°C'de 1 saat süreyle bekletildi.
11. Kapak kısmında kalan damlaların düşürülmesi için kısa bir süre santrifüj yapıldı.
12. 200 mikrolitre tampon çözelti ve 200 ml ethanol (%100) eklendi ve karıştırıldı.
13. Kapak kısmında kalan damlaların düşürülmesi için kısa bir süre santrifüj yapıldı.
14. Bütün lizat QIAamp Min Elute kolonuna taşındı. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolon temiz toplama tüpüne alındı.

15. Kolon açılarak 500 mikrolitre tampon çözelti kondu ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolon temiz toplama tüpüne alındı.
16. Kolon açılarak 500 mikrolitre tampon çözelti kondu ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolon temiz toplama tüpüne alındı.
17. Son hızda (14.000 rpm) 3 dakikalık santrifüj uygulandı.
18. Kolon mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 100 mikrolitre tampon çözelti eklendi.
19. Oda sıcaklığında 1 dakika beklendikten sonra son hızda 1 dakikalık santrifüj uygulandı.

DNA Kantitasyonu:

DNA kantitasyonu NanoDrop ND-1000 cihazında spektrofotometrik olarak yapıldı. DNA izolatları 20 ng/µl ye seyreltildi.

MSI Reaksiyon:

Promega, MSI Analysis System V1.2 kiti kullanıldı (57).

Amplifikasyon düzeni:

1. Gold ST★R 10X tampon ve MSI 10X Primer karışımı eritildi.
2. Her kullanımdan önce bu çözeltiler 2-10 saniye boyunca karıştırıldı.
3. Her reaksiyon için 0.2 ml mikrosantrifüj tüpü rafa yerleştirildi.
4. Reaksiyon başına komponent volümleri
   Nükleazsız su =5.85µl
   Gold ST★R 10X Tampon = 1.00µl
   MSI 10X Primer Mix = 1.00µl
   GoTaq MDx Hot Start (5u/µl) = 0.15µl
   Toplam reaksiyon volümü = 8.00µl

5. Amplifikasyon karışımı için gerekli çözeltiler 1.5 ml tüpe eklendi ve karıştırıldı.
6. 8µl amplifikasyon karışımı bütün tüplere eklendi.
7. 20 ng/µl kalıp DNA eklendi ve karıştırıldı.

Termal amplifikasyon çevirimi :

Thermal Cycler olarak DNA Engine (BioRad) kullanıldı. Kullanılan protokol:

96^0C		7 dk	
94^0C		30 sn	10 döngü
$0,5^0$C/sn	to	58^0C	
58^0C		30 sn	
$0,2^0$C/sn	to	70^0C	
70^0C		1 dk	
90^0C		30 sn	20 döngü
$0,5^0$C/sn	to	58^0C	
58^0C		30 sn	
$0,2^0$C/sn	to	70^0C	
70^0C		1 dk	
60^0C		30 dk	
4^0C		sakla	

Termal çevirim işlemi bittikten sonra örnekler -20°C'de ışık almayan ortamda saklandı.

Kapiller Elektroforez:

Kapiller elektroforez için ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) platformu kullanıldı (57). Kapiller olarak 36 cm kapiller (4333464, Applied Biosystems) ve polimer olarak da POP-7 (4352759, Applied Biosystems) kullanıldı (57).

Veri Analizi:

Elde edilen elekreoforegramlar GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) yazılımında incelendi (57).

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin analizinde SPSS 11.5 paket programı kullanılmıştır. Ölçümle elde edilen değişkenlerde ortalama (±standart sapma), sayımla elde edilen değişkenlerde frekans (yüzde) tanımlayıcı istatistik olarak sunulmuştur. Sayımla belirtilen değişkenler açısından bağımsız grupların karşılaştırılmasında ki-kare testi, ölçümle belirtilen değişkenler açısından bağımsız grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışma sporadik, Lynch ve ailesel gruplarında 14'er olmak üzere toplam 42 hasta üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2. Çalışmaya alınan hastaların demografik, PCR ve IHK sonuçları

Gruplar	Hasta No	Yaş	Cinsiyet	MSI		MMR genleri			
						MSH2	MSH6	MLH1	PMS2
Sporadik	1	69	E	a		0	0	0	0
	2	74	E	a		0	0	0	0
	3	62	E	a		0	0	0	0
	4	55	E	a		0	0	0	0
	5	59	E	a		1	0	1	0
	6	62	E	a		0	0	0	0
	7	59	E	c		0	1	0	0
	8	51	E	a		0	0	0	0
	9	83	E	a		0	0	0	0
	10	54	E	a		0	0	0	0
	11	56	E	a		0	0	0	0
	12	71	K	a		0	0	0	0
	13	65	K	a		0	0	0	0
	14	58	K	a		0	0	0	0

Gruplar	Hasta No	Yaş	Cinsiyet	MSI		MMR genleri			
						MSH2	MSH6	MLH1	PMS2
Ailesel	15	37	K	a		0	0	0	0
	16	50	E	a		0	0	0	0
	17	62	E	c		0	0	1	1
	18	43	E	c		0	0	1	1
	19	46	E	a		0	0	0	0
	20	31	E	a		0	0	0	0
	21	57	E	b		0	0	1	1
	22	62	E	a		0	0	0	0
	23	44	E	b		0	1	0	0
	24	36	E	a		0	0	0	0
	25	60	K	a		0	0	0	0
	26	42	K	a		0	0	0	0
	27	41	K	a		0	0	0	0
	28	32	K	a		0	1	0	0

Gruplar	Hasta No	Yaş	Cinsiyet	MSI		MMR genleri			
						MSH2	MSH6	MLH1	PMS2
Lynch	29	39	E	c		0	0	1	1
	30	42	E	a		0	0	0	0
	31	67	E	a		0	0	0	0
	32	49	E	c		0	0	1	1
	33	41	E	c		0	0	1	1
	34	25	E	c		0	0	1	1
	35	53	E	a		0	0	0	0
	36	74	E	c		0	0	1	1
	37	43	E	c		0	0	0	1
	38	35	E	c		0	0	1	1
	39	61	K	a		0	1	0	0
	40	41	K	c		0	0	0	0
	41	30	K	a		1	1	0	0
	42	23	K	c		1	1	0	0

E : Erkek, K: Kadın, MSI: Mikrosatellit instabilitesi, a: MSI yok, b: Düşük MSI, c: Yüksek MSI, IHK: immünhistokimya, MMR : Mismatch repair 0: MMR gen defekti yok, 1: MMR gen defekti var

Gruplar yaş ortalamaları açısından değerlendirildiğinde anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.001$). Sporadik grupta yaş ortalaması (±standart sapma) 62.71 (±8.862), Lynch grubunda 44.50 (±15.058), Ailesel grubunda 45.93 (±10.745) olarak saptanmıştır. Gruplar cinsiyet açısından değerlendirildiğinde erkek hasta oranı sporadik grubunda % 78.6 (n:11), Lynch grubunda % 71.4 (n:10), ailesel grubunda % 64.3 (n:9) idi.

Tablo 3. Gruplara göre yaş ortalamaları ve standart sapmalar

Gruplar	Yaş ortalaması	Standart Sapma
Sporadik	62.71	±8.862
Ailesel	45.93	±10.745
Lynch	44.50	±15.058

Gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.001$)

Gruplar MSI açısından değerlendirildiğinde, Sporadik grubunda hastaların %7.1(n:1)'inde yüksek MSI saptanırken; Lynch grubunda %64.3 (n:9) oranında yüksek MSI saptandı. Ailesel grubunda hastaların %14.3 (n: 2)'ünde yüksek MSI, %14.3 (n:2)'ünde düşük MSI saptandı. Gruplar MSI var/yok açısından değerlendirildiğinde Sporadik ve Lynch grubu arasında MSI varlığı açısından anlamlı fark saptanmıştır ($p=0.013$).

Tablo 4. Gruplara göre MSI oranı

Gruplar	MSI var olmayan hasta sayısı (yüzdesi)	MSI var olan hasta sayısı (yüzdesi)
Sporadik	13 (%92.9)	1 (%7.1)
Ailesel	10 (%71.4)	4 (%28.6)
Lynch	5 (%35.7)	9 (%64.3)

Gruplar MMR gen defekti açısından değerlendirildiğinde 4 MMR gen defektinden herhangi birisinin bulunma oranı Sporadik grubunda %14.3 (n:2), Lynch grubunda

%71.4 (n:10), Ailesel grubunda % 35.7 (n:5) olup, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.008). Farklılığın hangi grup(lar) arasında olduğunu belirlemek için ikişerli karşılaştırmalar yapıldığında, Sporadik ve Lynch grupları arasında (p=0.002), Ailesel ve Lynch grupları arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0.058).

Tablo 5. Gruplara göre MMR gen defekti oranları

Gruplar	MMR gen defekti bulunan hasta sayısı (yüzdesi)	MMR gen defekti bulunmayan hasta sayısı (yüzdesi)	Toplam
Sporadik	2 (%14.3)	12 (%85.7)	14
Ailesel	5 (%35.7)	9 (%64.3)	14
Lynch	10 (%71.4)	4 (%28.6)	14

Sporadik ve Lynch grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır (p=0.002).

Ailesel ve Lynch grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır. (p=0.058

Hastalar MSI ve IHC açısından karşılaştırıldığında toplamda 14 hastada MSI saptanmıştır ve bu hastaların tümünde herhangi bir MMR gen defekti saptanmıştır. MSI saptanmayan 28 hastanın 3'ünde (%10,7) MMR gen defekti saptanmıştır. Hasta sayısı yetersizliği nedeniyle p değeri verilememiştir.

Tablo 6. Çalışmaya alınan hastaların MSI ve MMR gen defektleri açısından karşılaştırılması

	MMR gen defekti bulunan hasta sayısı (yüzdesi)	MMR gen defekti bulunmayan hasta sayısı (yüzdesi)	Toplam
MSI var olan hasta sayısı (yüzdesi)	14 (%100)	0 (%0)	14 (%33.3)
MSI var olmayan hasta sayısı (yüzdesi)	3 (%13.8)	25 (%86.2)	28 (%66.6)
Toplam	17 (% 40.5)	25 (%59.5)	42

5. TARTIŞMA

Kolorektal kanserler dünya çapında görülen kanserler sıralamalarında üst sıralarda yer almaktadır. Kanserlerin genetik yatkınlıkla ilgili altyapıları birçok çalışmaya konu olmuştur ve bu çalışmalar devam etmektedir. Kolorektal kanserlerin yaklaşık %3-5 kadarı olan herediter kolorektal kanserler için tarama tetkikleri olan IHK ve PCR analizlerinin önemi dünya çapında tartışılmaktadır. Ülkemiz için de tüm kanserler arasında erkeklerde dördüncü, kadınlarda üçüncü sırada en sık görülen kolorektal kanserlerde tarama testleri önem taşımaktadır.

Lynch sendromlu hastaların erken tespit edilmesi özellikle presemptomatik mutasyon taşıyıcılarında morbitide ve mortalitenin %65-70 oranında azaltılması ve profilaktik cerrahi ile endometriyum ve over kanserlerinden efektif olarak korunulmasını sağlamaktadır (53). Bu nedenle Lynch sendromu için tarama tetkikleri oldukça önemlidir. Dünya çapında MSI'nin prognostik değerinin ve tedavi için (özellikle kemoterapötik ajanlara yanıt alınması açısından) öngörü oluşturduğu şeklinde bir düşünce bulunmaktadır. Fakat bu iki konu da günümüzde tartışılmaktadır.

Ülkemiz hastaları için her 4 MMR genini içeren ve 5 MSI markerını değerlendiren çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada amacımız bu tarama tetkiklerinin ülkemizde yapılabilirliğini göstermek, dünya literatürüne ülkemiz verilerini sunmak ve bu tetkiklerin rutin kullanıma alınması gerekliliğini göstermektir.

Daha önce bahsedildiği gibi Lynch sendromu erken yaşta görülen kanserlerle karakterize bir sendromdur. Çalışmamızda da bu bilgiyle uyumlu şekilde Lynch sendromu grubunun yaş ortalaması anlamlı olarak daha düşük çıkmıştır.

Tunca ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Lynch sendromu şüphesi taşıyan 28 hasta tarama tetkiklerine alınmış ve 10 hastada (%35,7) MSI saptanmıştır ve bu hastaların hepsinde MMR gen defekti saptanmıştır (54). 18 hasta ise MSI negatif olarak saptanmıştır ve bu hastaların hiçbirinde immünhistokimyasal olarak MMR gen defekti saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda ise Lynch sendromu şüphesi olan 14 hastanın

9’unda (%64,3) MSI saptanmıştır ve bu hastaların hepsinde MMR gen defekti saptanmıştır. Çalışmamızda bütün hastalar değerlendirildiğinde 42 hastanın 14’ünde (%33,3) MSI saptanmış ve hepsinde de MMR gen defekti saptanmıştır. MSI negatif olan hastalarda ise bizim çalışmamızda 28 hastanın 3’ünde (%10,7) MMR gen defekti saptanmıştır. Tunca ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MSI için iki marker (BAT26 ve NR24), IHK analizinde de iki marker kullanılmıştır (MLH1 ve MSH2). Çalışmamızda ise MSI için 5 marker, IHK için 4 marker kullanılmıştır. Bu yönüyle çalışmamızda daha geniş bir tarama spektrumu sağlanmıştır.

Gupta ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 96 kolorektal kanser hastası tetkik edilmiştir ve 11 hastada MSI saptanmıştır. Bu hastaların hepsinde MMR gen defekti saptamıştır (55). MSI saptanmayan 85 hastanın 3’ünde (%3,5) MMR gen defekti saptanmıştır.

Lindor ve arkadaşlarının çalışmasında hMSH1 ve hMSH2 çalışılmasının MSI saptanması açısından %92,8 sensitivite ve %100 spesifitesi olduğu saptanmıştır (56).

Sonuçlara bakıldığında MSI saptanan hastaların hepsinde MMR gen defektinin bulunması yönüyle çalışmamız bu çalışmalar ile örtüşmektedir. Gupta ve arkadaşlarının çalışmasında da MSI olmayan hastalarda MMR gen defekti saptanabileceği görülmektedir. Bunun nedeni materyalin alındığı anda hücrelerin genomunda henüz MSI oluşmamış olması olabilir.

Dünya literatüründe MSI ve IHK çalışmalarının kolorektal kanser nedeniyle cerrahi uygulanan hastaların hepsinde uygulandığı çalışmalar bulunmaktadır ve bu tetkiklerin ameliyat edilen bütün hastalarda uygulanması konusunda tartışmalar devam etmektedir. Şu anki genel düşünce sadece şüphe uyandıran olgularda kullanılması şeklindedir.

Bu tarama tetkikleri sonucunda hastalar Lynch sendromu için kesin tanı yöntemi olan genetik araştırma için yönlendirilebilirler fakat bu tetkiklerin kesin tanı yöntemi değil tarama yöntemi olduğu akılda tutulmalıdır. Şüphe devamlılığı halinde hastalar ileri tetkik için yönlendirilmelidirler. Kanser tanısı almış olan hastalar dışında risk faktörü bulunan hastalar ve Amsterdam veya Bethesda kriterlerini karşılamasa da klinik şüphe

bulunduran hastalardan alınan dokularda bu çalışmalar yapılarak ileri tetkik ve tedavi aşamaları için hastalar yönlendirilebilirler. Bunun için yeterli altyapı mevcuttur ve bu testlerin yapılabilirliği gösterilmiştir.

Çalışmamız sonucunda ülkemizde aile ağaçlarının güvenirliliğinin düzeyide tartışmaya açıktır. Ülkemizde çalışmamıza dahil edilen hastalarda da olduğu gibi çoğu hastanın aile ağacı sözel verilerle yapılmaktadır. Herhangi uygun dokümentasyon bulunmamaktadır ve hasta yakınlarının tanı yaşı, hangi organla ilişkili kanser tanısı aldığı dışında detaylı bilgi alınamamaktadır. Ülkemizde çıkarılan aile ağaçlarının güvenilirliğinin artması için daha iyileştirilmiş dokümentasyonun sağlanması ve hastaların uygun biçimde bilgilendirilmesi gerekmektedir. Sadece araştırmalar için değil; bireylerin genetik altyapıya sahip hastalıklarda kendilerinin ve yakınlarının nasıl takip edilmesi gerektiğine dair bilgileri de eşzamanlı alabilmeleri gereklidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Klinikte günümüzde IHK ve PCR gibi tarama tetkiklerinin kullanılmaması nedeniyle herediter kolorektal kanser şüphesi olan hastalar ve hasta yakınları bu modaliteler ve kesin tanı yöntemi olan genetik araştırma için bilgilendirilmelidirler.

Dünya literatüründe üzerinde geniş tartışmalar yapılan ve herediter non polipozis kolorektal kanserler için uygun tarama tetkikleri olduğu konusunda görüş birliği bulunan IHK ve PCR analizleri yapılabilirliği çalışmamızda gösterilmiştir. Bu tarama tetkileri günlük uygulamada rutin kullanıma alınmalıdır.

Hasta ve hasta yakınlarına bu hastalığın tanısının konması durumunda hastanın kendisinin ve hasta yakınlarının takibinin nasıl yapılacağı konusunda yeterli bilgi verilmeli ve istekleri doğrultusunda uygun merkezlere yönlendirilmelidirler.

Hasta ve hasta yakınlarının ileri dönemlerde medikal personel tarafından daha iyi değerlendirilebilmesi için (örneğin aile ağaçları çıkartılırken) uygun dökümentasyon sağlanmalı ve bu dokümentasyonların ulaşılabilirliği konusunda hasta ve hasta yakınlarının bilgilendirilmesi gereklidir.

7. ÖZET

HEREDİTER NON POLİPOZİS KOLOREKTAL KANSER, AİLESEL KOLOREKTAL KANSER VE SPORADİK KOLOREKTAL KANSER HASTALARININ SOYAĞACI, MISMATCH REPAIR GEN MUTASYONUNA BAĞLI MİKROSATELLİT İNSTABİLİTE ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Kolorektal kanserler dünya çapında ülkemizde de olduğu gibi sık rastlanan kanserlerdir. Kolorektal kanserlerin %3-5'i kadarını oluşturan herediter non polipozis kolorektal kanserler otozomal dominant geçiş göstermeleri nedeniyle hasta ve hasta yakınları için tanı ve takip açısından önem göstermektedirler. Herediter non polipozis kolorektal kanserler (Lynch Sendromu) için önerilmiş olan tarama tetkikleri ; immünhistokimyasal olarak mismatch repair gen (MMR) defektlerinin gösterilmesi ve polimeraz zincir reaksiyonu ile mikrosatellit instabilitesinin gösterilmesidir. Bu çalışmanın amacı geçmişte kliniğimizde opere edilen ve tanı konan kalıtımsal veya sporadik kanserli hastalara ait tümör dokularında MMR defektlerinin ve mikrosatellit instabilitesinin araştırılmasıdır.

Bu çalışma için Ankara Üniversitesi Etik Kurul Komitesinden onay alınmıştır.

AÜTF genel cerrahi servisinde 2006-2011 yılları arasında kolorektal kanser nedeniyle ameliyat edilmiş olan 512 hastanın daha önceden kaydedilmiş olan aile ağaçları Amsterdam kriterleri uygulanarak tekrar değerlendirilmiştir. Her üç kriteride sağlayan 14 hasta Lynch sendromu grubuna alınmıştır. Amsterdam II kriterlerinden 1 veya 2 kriteri taşıyan hastalardan rastgele seçilen 14 hasta Ailesel kolorektal kanser grubuna alınmıştır. Amsterdam II kriterlerinden hiçbirini sağlamayan hastalardan rastgele seçilen 14 hasta Sporadik kolorektal kanser grubuna alınarak 3 grupta 14'er hasta çalışmaya dahil edilmiştir ve dokular IHK ve PCR ile değerlendirilmiştir.

Gruplar yaş ortalamaları açısından değerlendirildiğinde anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.001$). Sporadik grupta yaş ortalaması (±standart sapma) 62.71 (±8.862), Lynch grubunda 44.50 (±15.058), Ailesel grubunda 45.93 (±10.745) olarak saptanmıştır. Gruplar cinsiyet açısından değerlendirildiğinde erkek hasta oranı sporadik grubunda % 78.6 (n:11), Lynch grubunda % 71.4 (n:10), ailesel grubunda % 64.3 (n:9) idi.

Gruplar MSI açısından değerlendirildiğinde, Sporadik grubunda hastaların %7.1(n:1)'inde yüksek MSI saptanırken; Lynch grubunda %64.3 (n:9) oranında yüksek MSI saptandı. Ailesel grubunda hastaların %14.3 (n: 2)'ünde yüksek MSI, %14.3 (n:2)'ünde düşük MSI saptandı. Gruplar MSI var/yok açısından değerlendirildiğinde Sporadik ve Lynch grubu arasında MSI varlığı açısından anlamlı fark saptanmıştır (p=0.013).

Gruplar MMR gen defekti açısından değerlendirildiğinde 4 MMR gen defektinden herhangi birisinin bulunma oranı Sporadik grubunda %14.3 (n:2), Lynch grubunda %71.4 (n:10), Ailesel grubunda % 35.7 (n:5) olup, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.008). Farklılığın hangi grup(lar) arasında olduğunu belirlemek için ikişerli karşılaştırmalar yapıldığında, Sporadik ve Lynch grupları arasında (p=0.002), Ailesel ve Lynch grupları arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0.058).

Hastalar MSI ve IHC açısından karşılaştırıldığında toplamda 14 hastada MSI saptanmıştır ve bu hastaların tümünde herhangi bir MMR gen defekti saptanmıştır. MSI saptanmayan 28 hastanın 3'ünde (%10,7) MMR gen defekti saptanmıştır.

Çalışmamızda tespit edildiği üzere az denek sayısıyla çalışılmasına rağmen dünya literatürüne benzer anlamlılıkta sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmalar sonucunda hastalar Lynch sendromu için kesin tanı yöntemi olan genetik araştırma için yönlendirilebilirler.

Sonuç olarak IHK ve PCR analizleri yapılabilirliği çalışmamızda gösterilmiştir. Bu tarama tetkileri günlük uygulamada rutin kullanıma alınmalıdır.

Hasta ve hasta yakınlarına bu hastalığın tanısının konulması durumunda hastanın kendisinin ve hasta yakınlarının takibinin nasıl yapılacağı konusunda yeterli bilgi verilmeli ve istekleri doğrultusunda uygun merkezlere yönlendirilmelidirler.

Hasta ve hasta yakınlarının ileri dönemlerde medikal personel tarafından daha iyi değerlendirilebilmesi için (örneğin aile ağaçları çıkartılırken) uygun dökümentasyon sağlanmalı ve bu dokümentasyonların ulaşılabilirliği konusunda hasta ve hasta yakınlarının bilgilendirilmesi gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, herediter non polipozis kolorektal kanser, Lynch sendromu, mismatch repair gen defekti, mikrosatellit instabilitesi

8. SUMMARY

PEDIGREE, MISMATCH REPAIR GENE DEFECT RATIO and MICROSATELLITE INSTABILITY RATIO COMPARISON of HEREDITARY NON POLIPOSIS COLORECTAL CANCER, FAMILIAL COLORECTAL CANCER and SPORADIC COLORECTAL CANCER PATIENTS

Colorectal cancers are common in our country like it is seen worldwide. Hereditary nonpoliposis colorectal cancers (Lynch syndorme) are responsible for 3-5% of all colorectal cancers and it has an importance for patients and relatives due to its inheritance in autosomal dominant fashion. Recomended screening tests for Lynch syndrome are; detecting mismatch repair gene (MMR) defects by immunohistochemistry (IHC) and detecting microsatellite instability (MSI) by polimerase chain reaction (PCR). Our purpose in this study is to detect MMR gene defects and MSI in the tumor tissue of the patients that operated in our department and diagnosed as hereditary or sporadic kolorectal cancer.

The Ankara University Ethics Committee approved this study.

Pedigrees of the 512 patient that has been operated between 2006 and 2012 at Ankara University School of Medicine General Surgery Department and diagnosed as colon cancer or rectal cancer are evaluated by using Amsterdam II criterias. 14 patient that matched three criterias grouped as Lynch syndrome. 14 pateint that has one or two criterias choosen randomly and grouped as familial cancer and 14 patitent that matched no criteria are choosen randomly and gropuped as sporadic colorectal cancer. Tumoral tissues evaluated by IHC and PCR.

Regarding of age, statistically significant differance detected between groups ($p < 0.001$). In sporadic colorectal cancer group main age (±standart deviation) was 62.71 (±8.862), in Lynch syndrome group main age was 44.50 (±15,058), in familial colorectal cancer group main age was 45.93 (±10.745).

In sporadic colorectal cancer group 78.6% (n:11) of patients was male, in Lynch syndrome group 71.4% (n:10) of patients was male, in familal colorectal cancer group 64,3% (n:9) of patients was male.

Regarding of MSI, in sporadic colorectal cancer group 7,1% (n:1) of the patients has high-MSI. In Lynch syndorme group that ratio was 64.3% (n:9). In familial colorectal cancer group 14,3% (n: 2) of the patients has low-MSI and 14,3% (n: 2) of the patients has high-MSI. Statistically significant differance detected between sporadic colorectal cancer group and Lynch syndrome group regarding of presence of MSI (p=0.013).

In sporadic colorectal cancer group 14.3% (n:2) of the patients has MMR gene defect of at least 1 marker, in Lynch syndrome group this ratio was 71.4% (n:10), in familial colorectal cancer group this ratio was 35.7% (n :5). Statistically significant differance detected in this comparison (p=0.008). In dual comparisons there was statistically significant differance between Lynch syndorme group and sporadic colorectal cancer group ($p<0.002$). Similarly statistically significant differance detected between familial colorectal cancer and Lynch syndorme groups (p=0.058).

Regarding of MSI and IHC, 14 patient has MSI and all of that patients has MMR gene deficiency. 28 of the patients were MSI negative and 10.7% (n:3) of these patients has MMR gene deficiency.

Despite studying with limited number of pateint, study results showed similar significancy with literature. After this tests pateints can offered to the genetic tests for the absolute diagnosis.

As a result we showed the feasibility of the IHC and PCR. These screening tests should be done in medical practice.

Adequate information must be given to the patients and relatives for this disease and appropiate refferance to the other departments for diagnosis and follow-up is essential.

Appropiate documentation and information of the patients and relatives is necessary for possible medical assessments in the future.

Key Words: Colorectal cancer, hereditary non poliposis colorectal cancer, Lynch syndrome, mismatch repair gene defect, microsatellite instability

9. KAYNAKLAR

1. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. CA Cancer J Clin. 2003 Jan-feb;53(1):5-26.

2. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2001 Cancer J Clin.2001 Jan-feb;51(1):15-36.

3. Kanser istatistikleri 29 Kasım 2004. www.sağlık.gov.tr/exras/istatistikler/apk 2001/092.html

4. Kohlmann W, Gruber SB: Lynch Syndrome In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2004 Feb 05 [updated 2011 Aug 11]. 2004

5. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, Markowitz AJ, Gerald WL, Ellis NA : Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. Am J Surg Pathol. 2005 Jan;29(1):96-104

6. Goel A, Boland RC : Microsatellite instability in colorectal cancer. Gastroenterology. 2010 June ; 138(6): 2073–2087

7. Poulogiannis G, Frayling IM, Arends MJ : DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. Histopathology 2010 Jan;56(2):167-79

8. Çakmak A. , Aylaz G. , Kuzu M. A. Permanent Stoma Not Only Affects Patients' Quality of Life but also That of Their Spouses World J Surg 2010 ; 4:2872– 2876

9. Vasen HFA, Wijnen JT, Menko FH, et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. Gastroenterology 1996; 110:1020-7

10. Willet WC. Goals for nutrition in the year 2000. CA Cancer J Clin 1999; 49: 331-52

11. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, et al. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in man. Ann Intern Med 1995; 122:327-34.

12. Desai DC, Neale KF, Talbot IC, et al. Juvenile polyposis. Br J Surg 1995; 82: 14-7

13. Spigelman A, Murray V, Phillips R. Cancer and the Peutz-Jeghers Syndrome. Gut 1989; 30: 1588

14. Corman ML, Veidenheimer MC, Coller JA. Colorectal carcinoma: a decade of experience at the Lahey Clinic. Dis Colon Rectum 1979; 22: 477-9.

15. Steele GD, Mayer RJ. Adenocarcinoma of the colon and rectum. In Surgery of the Alimentary Tract, Zuidema GD. (ed). WB Saunders Company, 1991; vol 4,Chapter 11: 118-132.

16. Schrock TR. Large intestine. In Surgical Diagnosis and Treatment. Way LL (ed). Connecticut, Appleton&Lange.1994; 644-692.

17. Williams NS. Colorectal cancer: Epidemiology, Aetiology, Pathology, Clinical Features and Diagnosis. In Surgery of the Anus, Rectum and Colon, Williams NS, Keighley MR(Eds), WB Saunderss Company, 1993; Vol 1,Chapter 29: 830-886.

18. Go VLW. Carcinoembryonic antigen: clinical application. Cancer 1976; 37: 562-6.

19. Kapiteijn E, Marijnen CA, Colenbrander AC, Klein Kranenbarg E, Steup WH, van Krieken JH, van Houwelingen JC, Leer JW, van de Velde CJ. Local recurrence in patients with rectal cancer diagnosed between 1988 and 1992: a population-based study in the west Netherlands. Eur J Surg Oncol. 1998 Dec;24(6):528-35.

20. Phillips RK, Hittinger R, Blesovsky L, Fry JS, Fielding LP. Local recurrence following'curative'surgery for large bowel cancer: II. The rectum and rectosigmoid. Br J Surg. 1984 Jan;71(1):17-20.

21. Van Driel MF, Weymar Schultz WC, van de Wiel HB, Hahn DE, Mensink HJ. Female sexual functioning after radical surgical treatment of rectal and bladder cancer. Eur J Surg Oncol. 1993;19(2):183-7.

22. Petrelli NJ, Nagel S, Rodriguez-Bigas M, Piedmonte M, Herrera L. Morbidity and mortality following abdominoperineal resection for rectal adenocarcinoma. Am Surg.1993; 59(7) : 400-4.

23. Moynihan BG. The surgical treatment of cancer of the sigmoid flexura and rectum: with special reference to the principles to be observed. Surg Gynecol obstet 1908; 6: 436-438.

24. Heald RJ, Husband EM, Ryall RD. The mesorectum in rectal cancer surgery-the clue to pelvic recurrence? Br J Surg. 1982; 69: 613-6

25. Kalaycı G. Kolon Kanserleri, Genel Cerrahi, Nobel Tıp Kitabevi İstanbul 2002;2: 1343-59

26. Füzün M; Rektum kanserinde lokorejyonel rekürrense yaklaşım. Kolon, rektum ve anüs hastalıkları 2002, 27-29.

27. Hanahan D, Weingberg RA : The hallmarks of cancer. Cell 2000, 100:57-70

28. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990, 61:759-767

29. Wood LD, Parsons DW, Jones S, et al: The gemomic landscapes of human breast and colorectal cancers. Science 2007, 318:1108-1113

30. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al: Prevalance of ras gene mutations in human colorectal cancers. Nature 1987, 327:293-297

31. Kranenburg O: The KRAS oncogene : past, present and future. Biochim Biophys Acta 2005, 1756:81-82

32. Grady WM: Making the case for DCC and UNC5C as tumor supressor genes in the colon. Gastroenterology 2007, 133:2045-2049

33. Baker SJ, Fearon ER, NigroJM, et al : Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. Science 1989, 244:217-221

34. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, et al : Colorectal cancer : genetics of development and metastasis. J Gastroenterol 2006, 41:185-192

35. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, et al : p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late evence in colorectal tumorigenesis. Cancer Res 1990, 50:7717-7722

36. Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF : Molecular genetics and clinical – pathology features of Hereditary nonpoliposis colorectal syndrome (Lynch syndrome) : Historical journey from pedigree anecdote to molecular genetic comfirmation. Oncology 1998, 55: 103-108

37. Fishel R, Wilson T: MutS: Homologs in mammalian cells. Curr Opin Genet Dev 1997, 7:105-113

38. Hughes MR, Hoang EH. Molecular Basis of hereditary Colorectal Cancer. Semin Colan Rectal Surg. 2011, Jun 1; 22 (2): 65 – 70

39. NCCN. Clinical practice guidelines in oncology: colorectal cancer screening. NCCN 2010, 1: LS-B, LS-C

40. Gruber SB: New developments in Lynch syndrome (Hereditary nonpoliposis colorectal cancer) and mismatch repair gene testing. Gastroenterology 2006, 130:577-587

41. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, et al : Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: A population based study. Gastroenterology 2007, 133: 48-56

42. Alexander J, Watanabe T, Wu TT, et al : Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. Am J Pathol 2001, 158: 527-535

43. Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, et al : Pathology of hereditary non-poliposis colorectal cancer. Anticancer Res 1994, 14:1631-1634

44. Shia J, Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpoliposis colorectal cacer syndrome. Part 1. The utility of immunohistochemistry. J Mol Diagn 2008, 10:293-300

45. Lynch HT, de la Chapelle A : genetic susceptibility to nonpoliposis colorectal cancer. J Med Gene 1999, 36: 801-818

46. Tautz D : Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res 1989, 17:6463-6471

47. Weber JL, May PE : Abundant class of Human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet 1989, 44:388-396

48. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al : Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. Science 1993, 260:812-816

49. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M : Ubiquitous somatic mutations in simple repated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature 1993, 363:558-561

50. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science 1993, 260:816-819

51. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R, David L, Holm R, Ryberk D, Haugen A, et al : Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary nonpoliposis colorectal carcinoma syndrome. Cancer Res 1993, 53:5853-5855

52. Pinol V, Castells A, Andreu M, Castellvi-Bel S, Alenda C, Llor X, Xicola RM, Rodrigues-Moranta F, Paya A, Jover R, Bessa X : Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpoliposis colorectal cancer. JAMA 2005, 293:1986-1994

53. Dinjens WN, van Leerdam ME, Wagner A. On the advent of MSI testing of all colorectal cancers and a substantial part of other Lynch syndrome-related neoplasms. Expert Rev Mol Diagn. 2010 May;10(4):381-4.

54. Tunca B, Pedroni M, Cecener G, Egeli U, Borsi E, Zorluoglu A, Di Gregorio C, Yilmazlar T, Yerci O, de Leon MP. Analysis of mismatch repair gene mutations in Turkish HNPCC patients. Fam Cancer. 2010 Sep;9(3):365-76.

55. Gupta S, Ashfaq R, Kapur P, Afonso BB, Nguyen TP, Ansari F, Boland CR, Goel A, Rockey DC. Microsatellite instability among individuals of Hispanic origin with colorectal cancer. Cancer. 2010 Nov 1;116(21):4965-72.

56. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. J Clin Oncol. 2002;20(4):1043–1048.

57. Murphy KM, Zhang S, Geiger T, Hafez MJ, Bacher J, Berg KD, Eshleman JR. Comparison of the microsatellite instability analysis system and he Bethesda panel for thedetermination of microsatellite instability in colorectal cancers. J Mol Diagn. 2006 Jul;8(3):305-11.