

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

METASTATİK KOLOREKTAL KANSERDE YENİ NESİL
SEKANSLAMA TEKNİĞİYLE SAPTANAN GEN
MUTASYONLARININ PROGNOZA VE SAĞ KALIMA ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. AHMET ÜNLÜ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ ATİKE GÖKÇEN DEMİRAY

DENİZLİ-2022

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

METASTATİK KOLOREKTAL KANSERDE YENİ NESİL
SEKANSLAMA TEKNİĞİYLE SAPTANAN GEN
MUTASYONLARININ PROGNOZA VE SAĞ KALIMA ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. AHMET ÜNLÜ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ ATİKE GÖKÇEN DEMİRAY

DENİZLİ-2022

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında desteğini ve ilgisini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çok değerli hocam ve tez danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Atike Gökçen DEMİRAY'a sonsuz teşekkür ederim.

Yoğun programına rağmen istatistiksel analizlerin yapılmasında vermiş olduğu destek için Dr. Öğr. Üyesi Hande ŞENOL'a,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, üzerimde büyük emekleri olan saygıdeğer hocalarıma ve yandal asistanlarımıza,

Birlikte çalışmaktan onur ve zevk duyduğum tüm değerli asistan arkadaşlarıma,

Desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve bana her zaman güç veren biricik eşime,

Beni hayatım boyunca sevgi, huzur ve güven ortamında yetiştiren; bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan canım anneme, babama ve ablalarıma,

Bana onkolojiyi sevdiren, hayata ve mesleğe bakış açımı değiştiren, üzerimde çok emeği olan, hayatımdaki yeri bir hocadan çok daha öte olan, değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Özdoğan'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ahmet Ünlü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KOLOREKTAL KANSERLER	3
2.1.1. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi	3
2.1.2. Kolorektal Kanser Evrelemesi	6
2.1.3.1. Patolojik Evre	7
2.1.3.2. Lenfovasküler İnvazyon	8
2.1.3.3. Perinöral İnvazyon	9
2.1.3.4. Histolojik Tip, Farklılaşma Derecesi	9
2.1.3.5. Anatomik Lokalizasyon	11
2.1.3.6. Moleküler Faktörler	12
2.1.4. Kolorektal Kanser Tedavisi	12
2.1.4.1. Lokalize, Bölgesel CRC Tedavisi	12
2.1.4.2. Metastatik CRC Tedavisi	13
2.2. METASTATİK KOLOREKTAL KANSERDE BİYOBELİRTEÇLER VE YENİ NESİL SEKANSLAMA	14
2.2.1. Metastatik CRC’de Sistemik Tedaviler İçin Biyobelirteçler	14
2.2.1.1. KRAS ve NRAS Mutasyonu	14
2.2.1.2. BRAF Mutasyonu	16
2.2.1.3. HER2 Amplifikasyonu/Overekspresyonu	17
2.2.1.4. PIK3CA Mutasyonu	18
2.2.1.5. dMMR/MSI-H Durumu	18
2.2.2. Yeni Nesil Sekanslama	18
2.2.2.1. Periferik Kandan NGS Analizi: Likit Biyopsi	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21

3.1. KATILIMCILAR, PROSEDÜRLER VE ÖRNEKLEM ÖZELLİKLERİ	21
3.2. MOLEKÜLER ANALİZ	22
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	22
4. BULGULAR	23
4.1. ÖRNEKLEM ÖZELLİKLERİ	23
4.1.1. Demografik Özellikler	23
4.1.2. Klinik Özellikler	24
4.2. NGS ANALİZ SONUÇLARI	28
4.3. LİKİT BİYOPSİ-DOKU BİYOPSİSİ UYUM ANALİZLERİ	36
4.4. SAĞ KALIM ANALİZLERİ	41
4.4.1. Genel Sağ Kalım	42
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR	69
7. KAYNAKLAR	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

NGS	: Yeni nesil sekanslama
CRC	: Kolorektal kanser
mCRC	: Metastatik kolorektal kanser
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
ACS	: Amerikan Kanser Derneği
AJCC	: Amerikan Kanser Komitesi
UICC	: Uluslararası Kanser Kontrol Birliği
TNM	: Tümör, nod, metastaz
MSI	: Mikrosatellit instabilite
CEA	: Serum karsinoembriyonik antijen
LVİ	: Lenfovasküler invazyon
ASCO	: Amerikan Klinik Onkoloji Derneği
NCCN	: Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı
ESMO	: Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği
PNİ	: Perinöral invazyon
WT	: Vahşi tip (mutant olmayan)
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
MMR	: Yanlış eşleşme onarımı
MSI-H	: Yüksek derece MSI
5-FU	: 5-Fluourasil
FOLFOX	: 5-Fluourasil, lökovorin, oksaliplatin
CAPEOX, XELOX	: Kapesitabin, oksaliplatin
FOLFOXİRİ	: 5-Fluourasil, lökovorin, oksaliplatin, irinotekan
TAKE	: Transarteryel kemoembolizasyon
HIPEC	: Hipertermik intraperitoneal kemoterapi
HAIC	: Hepatik arter infüzyon kemoterapisi
PD-L1	: Programlı ölüm ligandı 1
PD-L2	: Programlı ölüm ligandı 2
PD-1	: Programlı hücre ölüm proteini-1

CTC	: Dolaşan tümör hücreleri
ctDNA	: Dolaşan tümör DNA'ları
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
NSCLC	: Kk hücreli dışı akciğer kanseri
CA 19-9	: Kanser antijeni 19-9
MSS	: Mikrosatellit stabil
OS	: Genel sağ kalım
PFS	: Progresyonsuz sağ kalım
VEGFR-2	: Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-2
CSF1R	: Koloni uyarıcı faktör 1 reseptörü
TCGA	: Tümör kanser genom atlası

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 ABD'de 1 Yıllık Yaş Artışlarında 100.000 Nüfus Başına Kolorektal Kanser İnsidans Oranları.....	4
Şekil 2 Kolon Kanseri Tanı Anındaki Patolojik Evreye Göre 5 Yıllık Sağ Kalım Oranları.....	8
Şekil 3 ERBB4 ekson 8 mutasyon durumuna göre genel sağ kalım eğrisi.....	44
Şekil 4 FGFR1 mutasyon durumuna göre genel sağ kalım eğrisi.....	44
Şekil 5 FGFR3 ekson 14 mutasyon durumuna göre genel sağ kalım eğrisi.....	45
Şekil 6 FLT3 ekson 11 mutasyon durumuna göre genel sağ kalım eğrisi.....	45
Şekil 7 CDH1 mutasyon durumuna göre genel sağ kalım eğrisi.....	46
Şekil 8 CSF1R ekson 22 mutasyon durumuna göre genel sağ kalım eğrisi.....	46
Şekil 9 MSH6 mutasyon durumuna göre genel sağ kalım eğrisi.....	47
Şekil 10 SMARCB1 ekson 5 mutasyon durumuna göre genel sağ kalım eğrisi.....	47
Şekil 11 PIK3CA ekson 10 mutasyon durumuna göre genel sağ kalım eğrisi.....	48
Şekil 12 NOTCH1 mutasyon durumuna göre genel sağ kalım eğrisi.....	48
Şekil 13 STK11 mutasyon durumuna göre genel sağ kalım eğrisi.....	49
Şekil 14 EGFR ekson 20 mutasyon durumuna göre progresyonsuz sağ kalım eğrisi.....	50
Şekil 15 KİT ekson 10 mutasyon durumuna göre progresyonsuz sağ kalım eğrisi.....	51
Şekil 16 PTEN ekson 8 mutasyon durumuna göre progresyonsuz sağ kalım eğrisi.....	51
Şekil 17 JAK3 mutasyon durumuna göre progresyonsuz sağ kalım eğrisi.....	52
Şekil 18 PIK3CA ekson 10 mutasyon durumuna göre progresyonsuz sağ kalım eğrisi.....	52
Şekil 19 FBXW7 mutasyon durumuna göre progresyonsuz sağ kalım eğrisi.....	53
Şekil 20 STK11 mutasyon durumuna göre progresyonsuz sağ kalım eğrisi.....	53

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1 Kolorektal kanser risk faktörleri.....	5
Tablo 2 Kolorektal Kanser TNM Evrelemesinde T,N,M tanımlaması.....	6
Tablo 3 Kolorektal Kanser TNM Evrelemesi.....	7
Tablo 4 Evre 2 Kolon Kanserinde Yüksek Risk Olarak Tanımlanan Faktörler.....	9
Tablo 5 Kolon ve rektum malign tümörlerinin Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırması...	10
Tablo 6 Demografik Özellikler.....	23
Tablo 7 Klinik Özellikler.....	25
Tablo 8 NGS Analizi ile Elde Edilen Mutant Gen Oranları.....	29
Tablo 9 Anlamli Fark Saptanan Grupların P Değerleri Tablosu.....	33
Tablo 10 KRAS Geni için NGS ve PCR Analizleri Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	37
Tablo 11 NRAS Geni için NGS ve PCR Analizleri Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	38
Tablo 12 BRAF Geni için NGS ve PCR Analizleri Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	38
Tablo 13 Likit Biyopsi-Doku Biyopsisi Uyum Analizleri Tablosu.....	39
Tablo 14 KRAS Geni için NGS ve PCR Analizleri Sonuçlarının Örneklerin Alınma Zamanları Arasındaki Süreye Göre Karşılaştırılması.....	39
Tablo 15 NRAS Geni için NGS ve PCR Analizleri Sonuçlarının Örneklerin Alınma Zamanları Arasındaki Süreye Göre Karşılaştırılması.....	40
Tablo 16 BRAF Geni için NGS ve PCR Analizleri Sonuçlarının Örneklerin Alınma Zamanları Arasındaki Süreye Göre Karşılaştırılması.....	40
Tablo 17 Likit Biyopsi ile Doku Biyopsisi Örneklerinin Alınma Zamanları Arasındaki Süreye Göre Analiz Sonuçlarının Uyum Oranları	41
Tablo 18 Tüm Hasta Grubunun Ortalama Genel Sağ Kalım (OS) ve Progresyonsuz Sağ Kalım (PFS) Süreleri.....	42
Tablo 19 Mutasyon Durumuna Göre Genel Sağ Kalım açısından Anlamli Fark Saptanan Grupların P Değerleri Tablosu.....	43
Tablo 20 Mutasyon Durumuna Göre Progresyonsuz Sağ Kalım açısından Anlamli Fark Saptanan Grupların P Değerleri Tablosu	49

ÖZET

Amaç:

Bu çalışmamızda; metastatik kolorektal kanserli hastalarda yeni nesil sekanslama (NGS) tekniğiyle çeşitli gen değişikliklerinin sıklıklarını saptamayı ve bu değişikliklerin genel sağ kalım ve progresyonsuz sağ kalıma etkisini araştırmayı planladık. Ayrıca KRAS, NRAS, BRAF gen mutasyonları için tümör dokusundan alınan örneklerden yapılan standart PCR analizi ile periferik kandan alınan örneklerden (likit biyopsi) yapılan NGS analizlerinin sonuçları arasındaki uyumu ortaya koymayı hedefledik. Tüm bu bilgilerle; metastatik kolorektal kanserli hastalar için ideal kişiselleştirilmiş tedavilerin belirlenmesi, genel sağ kalımın ve progresyonsuz sağ kalımın artırılması, ilaca bağlı toksisitelerin azaltılması noktasında literatüre katkı sağlamayı amaçladık.

Gereç ve Yöntemler:

Çalışma; metastatik kolorektal kanser tanısı ile takip edilen, kemoterapi ve/ve ya biyolojik tedavi alan, periferik kandan NGS tekniğiyle gen mutasyon analizi yapılmış olan, 18 yaş ve üzeri 48 hastaya ait anamnez, muayene, laboratuvar ve görüntüleme bilgilerinin retrospektif olarak taranması ve analiz edilmesi ile hazırlanmıştır.

Bulgular:

Genlerdeki mutasyon durumuna göre yapılan genel sağ kalım analizlerinde; ERBB4 ekson 8, FGFR1, FGFR3 ekson 14, FLT3 ekson 11, CDH1, CSF1R ekson 22, MSH6, SMARCB1 ekson 5 ve PIK3CA ekson 10 mutasyonlarının varlığı istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kötü genel sağ kalım süreleri ile ilişki iken; NOTCH1 ve STK11 mutasyonlarının varlığı istatistiksel olarak anlamlı derecede daha iyi genel sağ kalım süreleri ile ilişki bulundu. Genlerdeki mutasyon durumuna göre yapılan progresyonsuz sağ kalım analizlerinde ise; EGFR ekson 20, PTEN ekson ve PIK3CA ekson 10 mutasyonlarının varlığı istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kötü progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişki iken; KİT ekson 10, JAK3, FBXW7 ve STK11 mutasyonlarının varlığı istatistiksel olarak anlamlı derecede daha iyi progresyonsuz kalım süreleri ile ilişki bulundu. Çalışmamızda; tümör dokusundan

alınan örneklerden yapılan kantitatif PCR tabanlı altın standart genomik DNA analizleri ile periferal kandan alınan örneklerden yapılan ctDNA tabanlı NGS analizi sonuçları karşılaştırıldı ve ctDNA tabanlı NGS analizlerinin, kantitatif PCR tabanlı altın standart yöntemle kıyasla KRAS mutasyonu için %64,7 duyarlılık, %55,6 özgüllük ve %59,1 uyum oranına; NRAS mutasyonu için %100 duyarlılık, %86,7 özgüllük ve %87,1 uyum oranına; BRAF mutasyonu için %50 duyarlılık, %96,4 özgüllük ve %90,6 uyum oranına sahip olduğu gösterildi. Çalışmamızda ayrıca, likit biyopsi ile doku biyopsisi örneklerinin alınma zamanları arasındaki süreye göre uyum oranları da değerlendirildi. Sonuçta; bu süre 6 aydan kısa olanlarda uyum oranları KRAS için %60,9, NRAS için %100, BRAF için %100 olurken; bu süre 6 aydan uzun olanlarda uyum oranları KRAS için %57,1, NRAS için %78,9, BRAF için %85 olarak saptandı.

Sonuç:

Çalışmamız, mCRC'li hastalarda, ctDNA tabanlı NGS analizlerinin klinik yararını gösteren literatürdeki az sayıdaki çalışmalardan biridir. Çalışmamızda; ctDNA tabanlı NGS analizlerinin, tümör dokusundan alınan örneklerden yapılan kantitatif PCR tabanlı altın standart genomik DNA analizleri ile yüksek oranda uyumlu sonuçlar verdiği ve bu uyumun, örneklerin alınma zamanları arasındaki süre 6 aydan kısa olduğunda çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında, yapılan kapsamlı analizler sonucunda; mCRC'de birçok moleküler değişikliğin sıklığı ve bu değişikliklerin klinikopatolojik özellikler ve sağ kalım süreleriyle ilişkisi ortaya koyulmuştur. Ancak yine de, CRC'li hastalarda ctDNA tabanlı NGS analizlerinin terapötik plana entegre edilebilmesi ve potansiyel olarak hedeflenebilir moleküler değişikliklerin klinik yararlarının aydınlatılabilmesi için kabul edilebilir kanıtlar sağlayacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Yeni nesil sekanslama, NGS, likit biyopsi, kolon kanseri, kolorektal kanser, ctDNA

SUMMARY

Objective:

In this study; We planned to determine the frequencies of various gene alterations with the next generation sequencing (NGS) technique in patients with metastatic colorectal cancer and to investigate the effects of these alterations on overall survival and progression-free survival. In addition, we aimed to demonstrate the concordance between the results of standard PCR analysis from tumor tissue samples and NGS analyzes from peripheral blood samples (liquid biopsy) for KRAS, NRAS, BRAF gene mutations. With all this information; We aimed to contribute to the literature in terms of identifying ideal personalized treatments for patients with metastatic colorectal cancer, increasing overall survival and progression-free survival, and reducing drug-related toxicities.

Material and Methods:

This study was prepared by retrospectively researching and analyzing anamnesis, examination, laboratory and imaging information belonging to 48 patients aged 18 years and over, who were followed up with the diagnosis of metastatic colorectal cancer, received chemotherapy and/or biological treatment, and had gene mutation analysis from peripheral blood with NGS technique.

Results:

In the overall survival analyzes made according to the mutation status in the genes; while the presence of ERBB4 exon 8, FGFR1, FGFR3 exon 14, FLT3 exon 11, CDHI, CSF1R exon 22, MSH6, SMARCB1 exon 5 and PIK3CA exon 10 mutations was statistically significantly associated with worse overall survival; presence of NOTCH1 and STK11 mutations was found to be statistically significantly associated with better overall survival times. In the progression-free survival analyzes made according to the mutation status in the genes; while the presence of EGFR exon 20, PTEN exon and PIK3CA exon 10 mutations was statistically associated with worse progression-free survival times; presence of KIT exon 10, JAK3, FBXW7 and STK11 mutations was found to be associated with a statistically significantly better

progression-free survival time. In our study; Quantitative PCR-based gold standard genomic DNA analyzes from tumor tissue samples and ctDNA-based NGS analyzes from peripheral blood samples were compared. As a result, ctDNA-based NGS analyzes had 64.7% sensitivity, 55.6% specificity, and 59.1% concordance rate compared to the quantitative PCR-based gold standard method for KRAS mutation; 100% sensitivity, 86.7% specificity and 87.1% concordance rate for NRAS mutation; 50% sensitivity, 96.4% specificity, and 90.6% concordance for BRAF mutation. In our study, concordance rates were also evaluated according to the time between the collection of liquid biopsy and tissue biopsy samples. After all; while this period is shorter than 6 months, concordance rates are 60.9% for KRAS, 100% for NRAS and 100% for BRAF; the concordance rates were 57.1% for KRAS, 78.9% for NRAS, and 85% for BRAF in those with a duration longer than 6 months.

Conclusion:

Our study is one of the few studies in the literature showing the clinical benefit of ctDNA-based NGS analyzes in patients with mCRC. In our study; It has been shown that ctDNA-based NGS analyzes give highly consistent results with quantitative PCR-based gold-standard genomic DNA analyzes from samples taken from tumor tissue and these concordance rates are much higher when the time between the collection of liquid biopsy and tissue biopsy samples is less than 6 months. In addition, as a result of comprehensive analyzes; the frequency of many molecular changes in mCRC and the relationship of these changes with clinicopathological features and survival times have been demonstrated. However, further studies are needed to provide acceptable evidence to integrate ctDNA-based NGS assays into the therapeutic plan and to elucidate the clinical benefits of potentially targetable molecular changes in patients with CRC.

Keywords: Next generation sequencing, NGS, liquid biopsy, colon cancer, colorectal cancer, ctDNA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Her yıl 1,3 milyon yeni vaka ile kolorektal kanser, Dünya çapında en sık görülen 3, en çok ölüme neden olan 2. kanser türüdür (1). Kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %20'si tanı anında metastatik hastalığa sahip olmakta ve bu kişilerde 5 yıllık sağ kalım oranı %14 düzeyinde kalmaktadır (2,3). Bu nedenle, son yıllarda kanser araştırmalarının önemli bir kısmında metastatik kolorektal kanserlerde yeni tedavi yaklaşımlarına odaklanılmış ve son 20 yılda sağlanan gelişmelerle genel sağ kalım süreleri 10 aydan 20 ayın üzerine çıkarılmıştır (2). Bu gelişmelerin en başında, bu hastalarda saptanan çok sayıda hedeflenebilir moleküler değişiklikler ve bu hedeflere yönelik tedaviler gelmektedir.

Son yıllarda genom dizileme tekniklerinde sağlanan gelişmeler sayesinde, kanser hastalarında birçok hedeflenebilir gen mutasyonu saptanmış ve akabinde birçok hedefe yönelik ajan geliştirilmiştir. Özellikle yeni nesil sekanslama (next-generation sequencing-NGS) tekniğinin kanser hastalarında kullanıma girmesi ile bu hastalarda birçok hedeflenebilir moleküler değişiklik saptanmaya başlanmıştır. Bu teknik, birden fazla sıralı tek test yapılması yerine tek seferde çoklu gen dizileme imkanı sunarak, hastalar için gecikmeleri önleme ve hastayı en uygun klinik araştırmaya yönlendirebilme avantajlarını sağlamaktadır. 2019'un sonuna gelindiğinde, kanser hastalarında saptanmış hedeflenebilir moleküler değişiklik sayısı 24 ve bu moleküler değişikliklere karşı hedeflenen antikanser tedavisi sayısı 64 olarak kaydedilmiştir (4). Sağlanan bu gelişmeler, kanser hastalarında biyolojik ajanlarla kişiselleştirilmiş tedavilerin önünü açmakla beraber oldukça geniş bir çalışma alanını da beraberinde getirmiştir. Saptanan moleküler değişiklik ve biyolojik ajan sayısı arttıkça, bu değişikliklerin klinik olarak etkisinin belirlenmesi ve tedavilerin yönetimi noktasında daha fazla araştırma ihtiyacı doğmaktadır (5).

Biz de bu çalışmamızda; metastatik kolorektal kanserli hastalarda NGS tekniğiyle çeşitli gen değişikliklerinin sıklıklarını saptamayı ve bu değişikliklerin genel sağ kalım ve progresyonsuz sağ kalıma etkisini araştırmayı planladık. Ayrıca KRAS, NRAS, BRAF gen mutasyonları için tümör dokusundan alınan örneklerden yapılan

standart PCR analizi ile periferik kandan alınan örneklerden (likit biyopsi) yapılan NGS analizlerinin sonuçları arasındaki uyumu ortaya koymayı hedefledik.

Tüm bu bilgilerle; metastatik kolorektal kanserli hastalar için ideal kişiselleştirilmiş tedavilerin belirlenmesi, genel sağ kalımın ve progresyonsuz sağ kalımın artırılması, ilaca bağlı toksisitelerin azaltılması noktasında literatüre katkı sağlamayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KOLOREKTAL KANSERLER

2.1.1. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi

Kolorektal kanserler (CRC), 2020 yılı verilerine göre; Dünya çapında yılda 1,931,590 yeni vaka ile en sık görülen 3, yılda 935,173 ölüm ile en çok yaşam kaybına yol açan 2. kanser türüdür (6). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) ise, yılda 149,500 yeni vaka ile en sık görülen kanser türleri arasında 4; 52,980 ölüm ile en çok yaşam kaybına yol açan kanser türleri arasında 2. sırada yer almaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde, ortalama risk altındaki popülasyonda yaşam boyu CRC insidansı yaklaşık yüzde 4'tür (7).

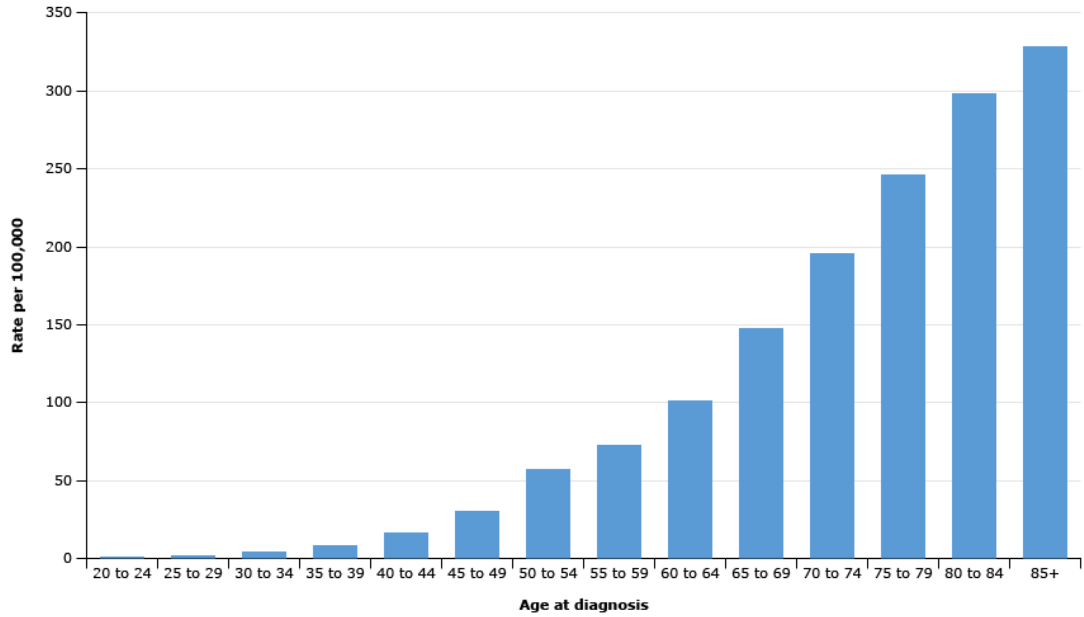
Küresel olarak, bölgesel CRC insidansı 10 kattan fazla değişmektedir. En yüksek insidans oranları Avustralya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da; en düşük oranlar ise Afrika ve Güney-Orta Asya'dadır. Bu coğrafi farklılıklar, genetik duyarlılığın yanı sıra beslenme ve çevresel maruziyetlerdeki farklılıklara bağlanmaktadır (8). Ayrıca düşük sosyoekonomik durum da, CRC gelişimi için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Yapılan bir çalışmada; CRC riski tahmini olarak, en düşük sosyoekonomik duruma sahip bölgelerde, en yüksek sosyoekonomik duruma sahip bölgelere göre %30 daha yüksek saptanmıştır (9). Fiziksel hareketsizlik, sağlıklı beslenme, sigara içme ve obezite gibi potansiyel olarak değiştirilebilir davranışların, bu sosyoekonomik eşitsizliğin önemli bir oranını açıkladığı düşünülmektedir (9,10). Ayrıca daha düşük CRC tarama oranları da düşük sosyoekonomik düzeye sahip toplumlardaki bu farklılığa önemli ölçüde katkı sağlamaktadır (11).

Amerika Birleşik Devletleri'nde, CRC insidans oranları yılda yaklaşık yüzde 2 oranında azalmaktadır (12). Buna karşılık, İspanya, Doğu Asya ve Doğu Avrupa'daki bazı ülkelerde hızla artmaktadır. Diğer batı ülkelerinin çoğunda ise, insidans oranları sabit seyretmektedir (13,14).

CRC kaynaklı ölüm oranları, 1980'lerin ortalarından bu yana ABD'de ve diğer birçok batı ülkesinde giderek azalmaktadır (7,12). Bu durum, kısmen, kolon

poliplerinin saptanması ve çıkarılmasına, CRC'lerin daha erken bir aşamada saptanmasına ve daha etkili birincil ve adjuvan tedavilere atfedilmektedir (15).

Yaş, sporadik CRC için majör bir risk faktörüdür. CRC, 40 yaşından önce nadirdir; insidans, 40 ve 50 yaşları arasında önemli ölçüde artmaya başlar ve yaşa özgü insidans oranları, sonraki her on yılda artar (Şekil 1) (16). Ancak son yıllarda genç yaş kolorektal kanser vakalarında belirgin bir artış gözlenmektedir. ABD verilerine göre; 50 yaşın altındaki erkek ve kadınlarda CRC görülme sıklığı, 1995'ten 2016'ya kadar yılda yüzde 2 oranında istikrarlı bir şekilde artış göstermiştir (17). Bunun yanı sıra, 50 yaşın altında CRC teşhisi konan hastaların yüzde 86'sından fazlasının semptomatik olması ve çoğunlukla ileri evrelerde tanı alması, bu insidans artışının gerçek olduğunu ve tamamen erken teşhise atfedilemeyeceğini göstermektedir (18,19). Diğer kolorektal kanser risk faktörleri tablo-1'de gösterilmiştir (tablo-1) (20).



Şekil 1: ABD'de 1 Yıllık Yaş Artışlarında 100.000 Nüfus Başına Kolorektal Kanser İnsidans Oranları

Relative Risks for Established Colorectal Cancer Risk Factors	
	Relative risk*
Factors that increase risk:	
Heredity and medical history	
Family history ⁴⁴	
CRC	
1 or more first-degree relatives	2.2
1 or more first-degree relatives diagnosed before age 50	3.6
2 or more first-degree relatives	4.0
1 or more second-degree relatives	1.7
Adenoma	
1 or more first-degree relatives	2.0
Inflammatory bowel disease ¹¹⁵	1.7
Type 2 diabetes ¹²⁴	
Male	1.4
Female	1.2†
Modifiable factors	
Heavy alcohol (daily average >3 drinks) ¹⁴⁶	1.3
Obesity (body mass index ≥ 30 kg/m ²) ¹⁴⁶	1.3
Colon, male	1.5
Colon, female	1.1
Rectum, male	1.3
Rectum, female	1.0†
Red meat (100 g/day) ¹⁴⁶	1.1
Processed meat (50 g/day) ¹⁴⁶	1.2
Smoking ¹⁰⁰	
Current vs. never	1.5
Former vs. never	1.2
Factors that decrease risk:	
Physical activity ¹²⁸	0.7
Dairy (400 g/day) ¹⁴⁶	0.9
*Relative risk compares the risk of disease among people with a particular "exposure" to the risk among people without that exposure. Relative risk for dietary factors compares the highest with the lowest consumption. If the relative risk is more than 1.0, then risk is higher among exposed than unexposed persons. Relative risks less than 1.0 indicate a protective effect.	
†Relative risk was not statistically significant.	
©2020, American Cancer Society, Inc., Surveillance Research	

Tablo 1: Kolorektal kanser risk faktörleri

Amerikan Kanser Derneği (American Cancer Society-ACS) 2020 yılı verilerine göre; CRC’de genel olarak tanı sonrası 5 yıllık sağ kalım oranı % 64, 10 yıllık sağ kalım oranı % 58’dir. CRC’de sağ kalımının en önemli prediktörü tanı anındaki evredir. Öyle ki; lokalize evre hastalık tanısı alan hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %90 iken, bölgesel ve ileri evre hastalık tanısı alanlarda bu oran sırasıyla %71 ve %14’tür (20).

2.1.2. Kolorektal Kanser Evrelemesi

Kolorektal kanser tanısı konulduktan sonra, hastalığın yönetimi için patoloji ve görüntüleme yöntemleri ışığında hastalığın evresinin belirlenmesi gerekir. Bu noktada, Amerikan Kanser Komitesi (AJCC) / Uluslararası Kanser Kontrol Birliği'nin (UICC) Tümör, Nod, Metastaz (TNM) evreleme sistemi, CRC için tercih edilen evreleme sistemidir. (Tablo 2, Tablo 3) (21).

Definitions for T, N, M		N	Regional Lymph Nodes
T	Primary Tumor	NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
TX	Primary tumor cannot be assessed	N0	No regional lymph node metastasis
T0	No evidence of primary tumor	N1	One to three regional lymph nodes are positive (tumor in lymph nodes measuring ≥ 0.2 mm), or any number of tumor deposits are present and all identifiable lymph nodes are negative
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intramucosal carcinoma (involvement of lamina propria with no extension through muscularis mucosae)	N1a	One regional lymph node is positive
T1	Tumor invades the submucosa (through the muscularis mucosa but not into the muscularis propria)	N1b	Two or three regional lymph nodes are positive
T2	Tumor invades the muscularis propria	N1c	No regional lymph nodes are positive, but there are tumor deposits in the subserosa, mesentery, or nonperitonealized pericolic, or perirectal/mesorectal tissues
T3	Tumor invades through the muscularis propria into pericolorectal tissues	N2	Four or more regional lymph nodes are positive
T4	Tumor invades* the visceral peritoneum or invades or adheres** to adjacent organ or structure	N2a	Four to six regional lymph nodes are positive
T4a	Tumor invades* through the visceral peritoneum (including gross perforation of the bowel through tumor and continuous invasion of tumor through areas of inflammation to the surface of the visceral peritoneum)	N2b	Seven or more regional lymph nodes are positive
T4b	Tumor directly invades* or adheres** to adjacent organs or structures	M	Distant Metastasis
		M0	No distant metastasis by imaging, etc.; no evidence of tumor in distant sites or organs. (This category is not assigned by pathologists)
		M1	Metastasis to one or more distant sites or organs or peritoneal metastasis is identified
		M1a	Metastasis to one site or organ is identified without peritoneal metastasis
		M1b	Metastasis to two or more sites or organs is identified without peritoneal metastasis
		M1c	Metastasis to the peritoneal surface is identified alone or with other site or organ metastases

Tablo 2: Kolorektal Kanser TNM Evrelemesinde T,N,M tanımlaması

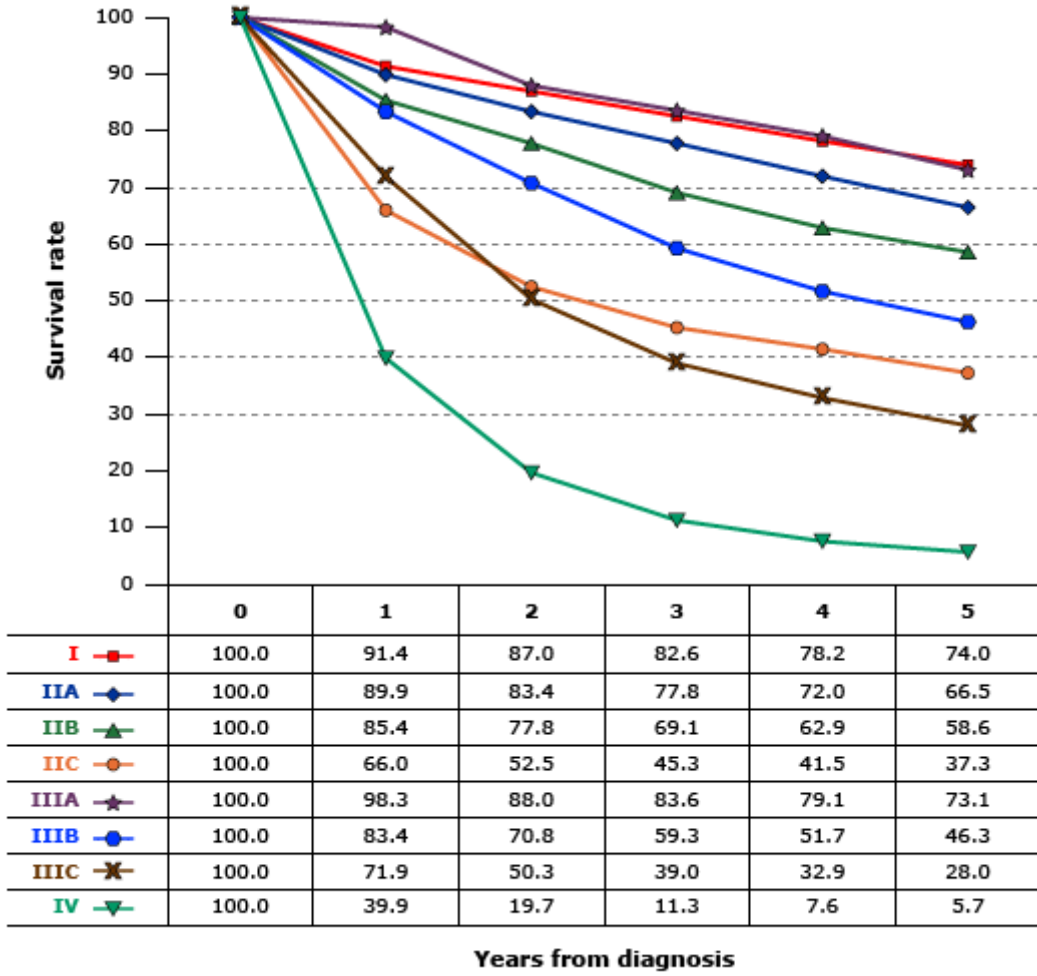
Prognostic Groups			
	T	N	M
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage I	T1, T2	N0	M0
Stage IIA	T3	N0	M0
Stage IIB	T4a	N0	M0
Stage IIC	T4b	N0	M0
Stage IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
Stage IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
Stage IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
Stage IVA	Any T	Any N	M1a
Stage IVB	Any T	Any N	M1b
Stage IVC	Any T	Any N	M1c

Tablo 3: Kolorektal Kanser TNM Evrelemesi

2.1.3. Kolorektal Kanserde Prognostik Faktörler

2.1.3.1. Patolojik Evre

Kolorektal kanser (CRC) rezeksiyonu sonrası prognozun en önemli göstergesi başvuru sırasındaki patolojik evredir (22). Grafikte, Teşhis anındaki patolojik evreye göre beş yıllık sağ kalım eğrileri gösterilmektedir (Şekil 2) (23).



Şekil 2:Kolon Kanserinde Tanı Anındaki Patolojik Evreye Göre 5 Yıllık Sağ Kalım Oranları

Başvuru sırasındaki patolojik evrenin dışında CRC için en önemli prognostik belirleyiciler; lenfovasküler ve perinöral invazyon, histolojik tip, histolojik farklılaşma derecesi, tümör lokalizasyonu, preoperatif serum karsinoembriyonik antijen (CEA) seviyesi, mikrosatellit instabilite (MSI) ve RAS, BRAF mutasyonlarıdır (21).

2.1.3.2. Lenfovasküler İnvazyon

Kolorektal kanserlerde damarlara, postkapiller lenfatiklere ve ya venüllere tümör invazyonu önemli bir prognostik faktördür (24). Hem venöz invazyon (özellikle

ekstramural venlere) hem de lenfatik invazyon, bağımsız kötü prognostik faktörlerdir (25,26). Prognostik önemi göz önüne alındığında lenfovasküler invazyon (LVI); American Society of Clinical Oncology (ASCO), National Comprehensive Cancer Network (NCCN) ve European Society for Medical Oncology (ESMO) tarafından "yüksek riskli" evre II kolon kanseri tanımına dahil edilen klinikopatolojik faktörlerden biridir (Tablo 4) . Bu faktörler, bu hasta grubunda, adjuvan kemoterapi kararını etkileyen faktörlerdir (27–29).

Definitions of "high risk" stage II colon cancer from expert groups

	ASCO (2004)	NCCN	ESMO (2020)
T4 primary tumor	+	+	+ (major)
Inadequately sampled nodes	+ (<13)	+ (<12)	+ (major) (<12)
Poorly differentiated tumor	+	+	+ (minor)
Perforation	+	+ (localized)	+ (major)
Obstruction		+	+ (minor)
LVI	+	+	+ (minor)
PNI	+	+	+ (minor)
Close/indeterminate or positive margins		+	
High preoperative levels of serum CEA			+ (minor)

ASCO: American Society of Clinical Oncology; NCCN: National Comprehensive Cancer Network; ESMO: European Society for Medical Oncology; LVI: lymphovascular invasion; PNI: perineural invasion; CEA: carcinoembryonic antigen.

Tablo 4: Evre 2 Kolon Kanserinde Yüksek Risk Olarak Tanımlanan Faktörler

2.1.3.3. Perinöral İnvazyon

Kolorektal kanserde kötü prognozla ilişkili bir diğer faktör perinöral invazyon (PNI)'dur. Prognostik önemi göz önüne alındığında PNI; ASCO, NCCN ve ESMO tarafından "yüksek riskli" evre II kolon kanseri tanımına dahil edilen ve bu durumda adjuvan kemoterapi kararını etkileyebilecek klinikopatolojik faktörlerden bir diğeridir (27–29).

2.1.3.4. Histolojik Tip, Farklılaşma Derecesi

Kolon ve rektum tümörlerinin büyük çoğunluğu karsinomlardır. Diğer histolojik tipler (nöroendokrin neoplazmlar, hamartomlar, mezenkimal tümörler, lenfomalar)

nispeten nadirdir. Karsinomların ise, yüzde 90'ından fazlası adenokarsinomlardır. Kolon ve rektum malign tümörlerinin Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan histolojik sınıflandırılması tabloda gösterilmiştir (tablo 5) (30). Bu morfolojik varyantlardan bazıları prognostik önem taşır. Örneğin, tüm CRC'lerin %1-2'sini oluşturan taşlı yüzük hücreli karsinomlar; yaygın intramural yayılım ve peritoneal karsinomatozis eğilimi olan, kötü prognozlu, agresif bir adenokarsinom alt tipidir (31). Tüm kolorektal kanserlerin %11-17'sini oluşturan müsinöz karsinomlar ise; neoadjuvan ve adjuvan kemoterapiye zayıf yanıt ile ilişkilidir (32,33).

Malignant epithelial tumors
Adenocarcinoma NOS
Serrated adenocarcinoma
Adenoma-like adenocarcinoma
Micropapillary adenocarcinoma
Mucinous adenocarcinoma
Poorly cohesive carcinoma
Signet ring cell carcinoma
Medullary adenocarcinoma
Adenosquamous carcinoma
Carcinoma, undifferentiated, NOS
Carcinoma with sarcomatoid component
Neuroendocrine tumor NOS
Neuroendocrine tumor, grade 1
Neuroendocrine tumor, grade 2
Neuroendocrine tumor, grade 3
L cell tumor
Glucagon-like peptide-producing tumor
PP/PPY-producing tumor
Enterochromaffin cell carcinoid
Serotonin-producing tumor
Neuroendocrine carcinoma NOS
Large cell neuroendocrine carcinoma
Small cell neuroendocrine carcinoma
Mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine neoplasm (MINEN)

NOS: not otherwise specified; PP: pancreatic polypeptide; PYY: peptide YY.

Tablo 5: Kolon ve Rektum Malign Tümörlerinin Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Sınıflandırması

Histolojik derece, tümör farklılaşmasının derecesini yansıtır ve evreden bağımsız bir prognostik faktördür. Ancak histolojik derecelendirme öznel, gözlemciler arasında önemli değişkenlik gösterir ve yaygın olarak kabul edilen tek bir sistem mevcut değildir (34,35).

2.1.3.5. Anatomik Lokalizasyon

Primer tümör yerleşimi, CRC'lerde önemli prognostik faktörlerden biridir (36). Sol taraf (distal) kolon kanserleri, sağ taraf (proksimal) kolon kanserlerine göre daha sık gözlenmektedir. Ancak son yıllarda, insidans noktasında kademeli olarak sağ taraf kolon kanserlerine doğru bir kayma söz konusudur (37,38). CRC'lerin anatomik dağılımındaki bu değişiklik, muhtemelen artan erken teşhis, tedavi imkanları ve kolonoskopiyle artan taramalarla distal kolondan adenomatöz poliplerin çıkarılmasının bir sonucu olabilir. Artan kolonoskopik tarama sıklığı, sağ taraf tümörlerinden çok sol taraf tümörlerini daha fazla etkilemektedir, çünkü gerek biyolojik nedenlerden gerekse teknik nedenlerden dolayı kolonoskopi sol taraf tümörlerini saptamada sağ taraf tümörlerine göre daha başarılıdır. Örneğin, daha düz ve endoskopik olarak görselleştirilmesi daha zor olan, karakteristik olarak BRAF V600E mutasyonları taşıyan ve mikrosatellit kararsız CRC'lere yol açan serrated adenomlar, sağ kolonda daha yaygındır ve bu da kolonoskopik taramalar arttıkça insidans açısından sağ kolon tümörlerine bir kayma olmasına neden olmaktadır (39,40). Ayrıca yapılan çalışmalara göre; evreden bağımsız olarak sol kolon kanserlerinde mortalite, sağ kolon kanserlerinden genel olarak daha düşüktür. Bu durumun altında yatan neden ise moleküler farklılıklar olabilir (41). Bunun yanı sıra, yapılan çalışmalardan elde edilen veriler; tümör lokasyonunun, RAS-WT (wild-type) metastatik CRC'li (mCRC) hastalarda epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) hedefleyen tedavilere yanıt için prediktif bir faktör olabileceğini göstermiştir. Buna göre sol taraflı RAS-WT mCRC'nin tedavisinde birinci basamak kemoterapi ile birlikte biyolojik bir ajan seçilecekse, bevacizumab yerine bir anti-EGFR ajan tercih edilmesi, sağ taraflı RAS-WT mCRC'li hastalarda ise bevacizumab tercih edilmesi önerilmektedir (21,42).

2020 yılında yayımlanan, mCRC'li 577 hastanın değerlendirildiği bir prospektif kohort çalışmasında; primer tümör lokalizasyonuna göre mutasyon analizi yapılmış ve anti-EGFR tedavisine yanıt durumu değerlendirilmiştir. Çalışmada hastalar, primer tümör lokalizasyonuna göre sağ taraflı (çekumdan splenik fleksuraya kadar) ve sol taraflı (inen kolondan rektuma kadar) olmak üzere 2 gruba ayrılmış ve

sonuçta; sağ taraflı tümörü olan hastalarda, sol taraflı olanlara göre BRAF V600E ve PIK3CA mutasyonlarının anlamlı derecede daha sık olduğu görülmüştür (Sırasıyla % 32.3'e karşılık % 4.8 ve % 17.2'ye karşılık % 3.6). Bu durumun, sağ taraf tümörlü hastalarda anti-EGFR direncinin daha yüksek oranda görülmesini açıklayabileceği sonucuna ulaşılmıştır (43).

2.1.3.6. Moleküler Faktörler

Kolorektal kanserlerde, çok sayıda moleküler belirtecin prognostik değeri üzerinde birçok çalışma yürütülmüş ve bu çalışmalardan elde edilen veriler ışığında bazı moleküler biyobelirteçler, klinik karar verme süreçlerine dahil edilmiştir. Bu belirteçler içerisinde rutin olarak kullanılan faktör, mikrosatellit instabiliteye (MSI) yol açan yanlış eşleşme onarımı (mismatch repair=MMR) eksikliğidir. Prediktif kapasitesi nedeniyle kullanılan bir başka belirteç; EGFR'yi hedefleyen ajanlar için etkinlik eksikliğini öngören RAS mutasyonlarıdır (44). Kodon 12 veya 13'ü içeren KRAS mutasyonları, CRC'lerin %12-75'inde tanımlanabilir ve çoğu çalışmada bağımsız olarak kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (45–47). KRAS'a kıyasla literatürde hakkında daha az bilgi mevcut olmasına karşın, NRAS mutasyonları da kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (48). Yine, prognostik ve prediktif bir faktör olarak potansiyel kullanıma sahip üçüncü bir belirteç de BRAF mutasyonlarıdır (44). Çoğu kodon 600'de (V600E) meydana gelen BRAF aktive edici mutasyonlar, sporadik CRC'lerin yüzde 10'undan daha azında meydana gelir ve MSI-H (yüksek derece MSI) olmayan tümörler için güçlü bir negatif prognostik belirteçtir (49–51). Bunların dışında; CRC'de HER2, ARAF1, Bcl2, VEGF, TP53, RB1, APC gibi birçok ümit verici ve klinik olarak hedeflenebilir moleküler belirtecin prognostik değeri üzerine çalışmalar yürütülmektedir (52,53).

2.1.4. Kolorektal Kanser Tedavisi

2.1.4.1. Lokalize, Bölgesel CRC Tedavisi

CRC'lerde tedavi yönetimi, hastalığın tanı anındaki evresine göre değişiklik

göstermektedir. CRC'lerin yaklaşık yüzde 80'i tanı anında lokalize ya da bölgesel (lokal ileri) evrededir. Lokalize kolorektal kanser; kolon duvarına nüfuz eden (ancak tamamen geçmeyen) invaziv kanseri tanımlarken, bölgesel kolorektal kanser tüm bağırsak duvarını aşan ve / ve ya çevre dokulara, bölgesel lenf düğümlerine yayılan kanseri ifade eder. Lokalize CRC'lerde standart tedavi cerrahi rezeksiyondur. Lokal ileri evre (bölgesel) CRC'lerde; cerrahi olarak negatif sınırlara sahip olması beklenen, rezektable tümörlerde ilk tercih cerrahi iken; lokal olarak unrezektabl ya da medikal olarak inoperable vakalarda lezyonun operable duruma gelmesi hedefiyle sistemik tedavi ya da kemoradyoterapi önerilir. Rezeksiyon sonrasında ise, evre 1 ve MSI-H evre 2 hastalarda adjuvan tedavi önerilmezken; diğer durumlarda adjuvan tedavi kararı, risk durumuna ve prognostik faktörlere göre verilir (21).

2.1.4.2. Metastatik CRC Tedavisi

CRC'lerin yaklaşık yüzde 20'si metastatik evrede tanı alırken, genel olarak CRC teşhisi koyulan hastaların %50-60'ında metastaz gelişmektedir ve metastaz gelişen bu hastaların %80-90'ı unrezektabl metastatik karaciğer hastalığına sahip olmaktadır (54,55). CRC'den ölen hastaların yarısından fazlasında otopside karaciğer metastazı olduğu ve bu hastaların çoğunda ölüm nedeninin metastatik karaciğer hastalığı olduğu tahmin edilmektedir (56). Unrezektabl hastaların çoğunda amaç, sistemik tedavilerle genel sağ kalımı ve yaşam kalitesini mümkün olduğunca artırmaktır. Ancak bu hastaların bazıları (özellikle de metastazı karaciğere sınırlı olanlar) sistemik tedaviler sonrası rezektabl duruma gelebilmekte ve bu kişilerde küratif cerrahi uygulanabilmektedir. Küratif cerrahi uygulanan hastalarda daha sonrasında ise nüks riskini azaltmak için adjuvan kemoterapi uygulanmaktadır. Bu hastalarda; FOLFOX [Oksaliplatin, 5-Fluourasil (5-FU), Lökovorin], CAPEOX (Kapesitabin, Oksaliplatin), Kapesitabin, 5-FU/Lökovorin adjuvan tedavi olarak önerilen kemoterapi protokolleridir. Daha sonraki takiplerinde nüks gelişen ya da rezektabl olmayan ileri evre metastatik hastalarda ise; ilk sıra tedavi olarak FOLFOX, CAPEOX, FOLFOXİRİ (Oksaliplatin, 5-FU, Lökovorin, İrinotekan), Kapesitabin, 5-FU/Lökovorin protokolleri tek başına ve ya hastalığın moleküler özelliklerine göre bevacizumab, cetuksimab, panitumumab gibi hedefe yönelik ajanlarla birlikte

kullanılmaktadır (21).

Uygun hasta gruplarında, CRC’de metastazlara yönelik gerek sağ kalımı uzatma gerekse palyatif amaçla lokal tedaviler de uygulanabilmektedir. Uygun hastalarda, özellikle karaciğer metastazektomilerinin genel sağ kalım oranlarına belirgin katkı sağlayabildiği gösterilmiştir (57–59). Bu hastalarda metastazektomi dışında başarıyla uygulanabilen diğer lokal tedaviler; tümör ablasyonu (radyofrekans ablasyon, mikrodalga ablasyon, kriyoablasyon, elektrokoagülasyon), radyoterapi, radyoembolizasyon, TAKE (Transarteryel kemoembolizasyon), HIPEC (Hipertermik İntraperitoneal Kemoterapi), HAIC (Hepatik Arter İnfüzyon Kemoterapisi)’dir (21).

2.2. METASTATİK KOLOREKTAL KANSERDE BİYOBELİRTEÇLER VE YENİ NESİL SEKANSLAMA

2.2.1. Metastatik CRC’de Sistemik Tedaviler İçin Biyobelirteçler

Metastatik CRC yönetiminde; hedefe yönelik tedaviler, önemi gün geçtikçe artan bir yer edinmektedir. Bu noktada, hedeflenebilir biyobelirteçler üzerine çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. 2019’un sonuna gelindiğinde, kanser hastalarında saptanmış hedeflenebilir moleküler değişiklik sayısı 24 ve bu moleküler değişikliklere karşı hedeflenen antikanser tedavisi sayısı 64 olarak kaydedilmiştir (4).

Metastatik CRC’li hastalarda üzerinde yaygın olarak çalışılan moleküler biyobelirteçler KRAS/NRAS, BRAF, PIK3CA mutasyonu; HER2 amplifikasyonu/overekspresyonu ve MSI durumudur (60). Bu belirteçlere tek tek gen bazında bakılabileceği gibi bir NGS paneliyle toplu olarak da bakılabileceği belirtilmektedir (21).

2.2.1.1. KRAS ve NRAS Mutasyonu

KRAS ve NRAS, EGFR'nin indüklendiği RASMAPK yolağında görevli olan, RAS ailesi üyesi genlerdir. Tüm kanserlerin %17-25'inde ve CRC'lerin %35-45'inde KRAS geninde mutasyon saptanmaktadır (61). KRAS genindeki mutasyonlar sıklıkla

12, 13, 59, 61 ve 146 kodonlarında gerçekleşmektedir. NRAS geninde ise, tüm kanserlerin %15'inde ve tüm CRC'lerin %5'inde mutasyon saptanmaktadır (62). Yapılan çalışmalarda; anti-EGFR ajanların RAS-WT mCRC'li hastalarda prognozu iyileştirdiği, ancak KRAS ve/ve ya NRAS mutasyonu olan hastalarda belirgin yarar sağlamadığı saptanmıştır (63,64). Dahası, 2013 yılında yayımlanan PRIME çalışmasında; KRAS ve ya NRAS mutant hastalardan standart FOLFOX rejimiyle birlikte panitumumab alanlarda, progresyonsuz sağ kalım ve genel sağ kalım sürelerinin yalnızca FOLFOX tedavisi alanlara kıyasla anlamlı derecede daha düşük olduğu gözlenmiştir (65). Benzer şekilde, FIRE-3 çalışmasında da; KRAS ve ya NRAS mutant hastalardan FOLFOX rejimiyle birlikte cetuksimab alanlarda, progresyonsuz sağ kalım sürelerinin FOLFOX ile birlikte bevacizumab alanlara kıyasla anlamlı derecede daha düşük olduğu görülmüştür (6,1 aya karşılık 12,2 ay, $p=0.004$) (66). ASCO ve NCCN de bu doğrultuda; Evre 4 CRC'li hastalarda RAS mutasyon durumuna bakılmasını ve KRAS ve/ve ya NRAS mutasyonu olan hastaların tedavisinde cetuksimab ve ya panitumumab kullanımından kaçınılmasını önermektedir (21,67).

Bunun yanı sıra, yapılan bir çalışmada; KRAS ekson 2 mutasyonu olan hastalarda hastaliksız sağ kalım sürelerinin, mutasyon olmayan hastalara göre daha kısa olduğu gözlenmiştir (45). Çalışmalarda; NRAS mutasyonunun da mCRC'li hastalarda kötü prognozla ilişkili olduğu ve NRAS mutant hastaların RAS-WT hastalara göre genel sağ kalım sürelerinin anlamlı derecede daha düşük olduğu belirlenmiştir (64). mCRC'li hastalarda anti-EGFR tedavilerine yanıtın değerlendirildiği bir çalışmada; NGS tekniğiyle saptanan mutasyonlara göre, birinci sıra tedavide standart kemoterapi rejimi FOLFİRİ ile birlikte verilen cetuksimaba yanıt oranları karşılaştırılmıştır. Sonuçta genel yanıt oranının KRAS ve/ve ya NRAS mutant hastalarda %46,6, RAS-WT hastalarda %62 olduğu görülmüştür. Medyan progresyonsuz sağ kalım süreleri ise sırasıyla 8,9 ve 11,1 ay olarak hesaplanmıştır (68).

2.2.1.2. BRAF Mutasyonu

Metastatik CRC’de anti-EGFR tedavilerine karşı yanıtızsızlığa RAS genindeki mutasyonların neden olduğu bilinmesine rağmen, çok sayıda RAS-WT tümörün de bu tedavilere yanıt vermediğinin gözlenmesi üzerine, anti-EGFR tedavilerine yanıtızsızlıkla ilişkili başka gen mutasyonları üzerine yoğunlaşmıştır (69). BRAF, serin/treonin kinaz aktivitesi olan bir protein kodlayan ve MAPK sinyal yolunda görevli olan, RAF ailesi üyesi bir gendir (70). mCRC'lerin yaklaşık %8-12’sinde BRAF geninde mutasyon saptanmakta ve bu mutasyonların yaklaşık dörtte üçü V600 aminoasidinde meydana gelmektedir (71).

Yapılan bazı çalışmalar; BRAF V600E mutasyonunun anti-EGFR tedavisine yanıtızsızlık ile ilişkili olduğunu göstermiştir (72,73). Kemoterapiye dirençli, mCRC'li 773 hastaya ait tümör örneklerinin retrospektif olarak incelendiğı bir çalışmada; BRAF mutasyonunun cetuksimaba anlamlı derecede daha düşük yanıt ile ilişkili olduğu görülmüştür (74). Dahası, çok merkezli randomize kontrollü PICCOLA çalışmasında; BRAF mutant mCRC'li hastalarda, birinci sıra olmayan tedavide irinotekana panitumumab eklenmesinin yarar sağlamadığı, aksine zararlı olabileceğı bildirilmiştir (72). 2015 yılında yayımlanan 2 ayrı meta-analizde de BRAF mutant mCRC'li hastalarda standart tedaviye cetuksimab ve ya panitumumab eklenmesinin progresyonsuz sağ kalım ve genel sağ kalım süreleri açısından yarar sağlamadığı gösterilmiştir (75,76).

BRAF gen mutasyonları, mCRC'de anti-EGFR tedavilerine yanıt için prediktif değer taşımasının yanında prognostik öneme de sahiptir. CRYSTAL çalışmasında; mCRC'de BRAF mutasyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (77). COIN çalışmasında ise, genel sağ kalım süreleri BRAF mutasyonu olanlarda ortalama 8,8 ay, KRAS ekson 2 mutasyonu olanlarda 14.4 ay ve RAS/BRAF-WT olanlarda 20.1 ay olarak saptanmıştır (78).

2.2.1.3. HER2 Amplifikasyonu/Overekspresyonu

HER2, MAPK ve PI3K/AKT sinyal yolunda görevli olan, tirozin kinaz ailesine üye bir onkogendir. CRC'de HER amplifikasyonu/overekspresyonu yaklaşık %3 görülme oranı ile oldukça nadirdir, ancak RAS/BRAF-WT CRC'de %5-14 düzeyinde raporlanmıştır (79,80). Buna göre, NCCN kılavuzları; mCRC'de KRAS/NRAS ya da BRAF mutasyonu olanlarda HER2 testlerinin rutin olarak yapılmasını önermemekte, RAS/BRAF-WT olanlarda yapılmasını önermektedir. Bu testlerin sonucunda HER2 overekspresyonu olanlarda, HER2 hedefli tedavilerin kullanılabilmesini bildirmektedir (21).

Bazı çalışmalara göre; HER2 amplifikasyonu/overekspresyonunun mCRC'de anti-EGFR tedavilere direnç için prediktif bir faktör olabileceği düşünülmektedir (80,81). RAS/BRAF-WT mCRC'li 98 hastanın katılımıyla yürütülen bir kohort çalışmasında medyan progresyonsuz sağ kalım süreleri; EGFR inhibitörü kullanılmayan hastalarda HER2 durumuna göre değişkenlik göstermezken, EGFR inhibitörü kullanılan hastalardan HER2 amplifikasyonu olanlarda anlamlı derecede daha kısa saptanmıştır (81).

CRC'de HER2 amplifikasyonu/overekspresyonunun prognostik değerinin olup olmadığı net olarak ortaya konulabilmiş değildir. 2016 yılında Annals of Oncology dergisinde yayımlanan bir çalışmada; CRC'li 1795 hastaya NGS tekniğiyle gen analizi yapılmış ve sonuçta HER2 amplifikasyonu saptanan hastalarda, saptanmayanlara kıyasla hem rekürrens süresi hem de genel sağ kalım süresi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha kısa saptanmıştır (82). Yapılan birkaç çalışmada da mCRC'li hastalarda HER2 amplifikasyonunun agresif tümör davranışı ile ilişkili olduğu bildirilse de başka çalışmalarda bu bulgular doğrulanmamış ve mCRC'li hastalarda HER2'nun prognostik rolünün net olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (83).

2.2.1.4. PIK3CA Mutasyonu

PIK3CA geni, hücre bölünmesinde görevli fosfatidilinositol 3-kinaz enziminin bir subuniti olan p110 α proteininin üretiminde görevli olan bir genidir. Bu gen, CRC'lerin yaklaşık %80'inde mutasyona uğramış olarak bulunur ve bu mutasyonların yaklaşık %80'i ekson 9 ve/veya ekson 20'de görülür (62). Yapılan bazı çalışmalarda, PIK3CA mutasyonunun anti-EGFR tedavisine dirençle ilişkili olabileceğine dair birtakım sonuçlar elde edilse de net bir kanıya varmak için yeterli veri mevcut değildir (84).

2.2.1.5. dMMR/MSI-H Durumu

Metastatik CRC'de MSI-H (dMMR), %3,5-5 görülme oranı ile nadir bir durumdur (85). dMMR tümörler, immün sistem tarafından tanınıp hedeflenebilen hatalı proteinler kodlayan binlerce mutasyon taşır. Ancak bazı tümör hücrelerindeki programlı ölüm ligandı 1 ve 2 (PD-L1, PD-L2), efektör T hücrelerindeki programlı hücre ölüm proteini-1 (PD-1) reseptörüne bağlanarak immün sistemi baskılar ve immün sistemin tümör hücrelerini etkisiz hale getirmesini önler. Bundan hareketle, dMMR tümörlerin PD-1 inhibitörlerine duyarlı olabileceği düşünülmüş ve bu hipotez, yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır (21,86). NCCN kılavuzları da mCRC'li hastalarda MSI durumunun test edilmesini ve immünoterapi yanıtı için prediktif bir faktör olarak kullanılmasını önermektedir (21).

2.2.2. Yeni Nesil Sekanslama

Son yıllarda genom dizileme tekniklerinde sağlanan gelişmeler sayesinde, kanser hastalarında birçok hedeflenebilir gen mutasyonu saptanmış ve akabinde birçok hedefe yönelik ajan geliştirilmiştir. Özellikle NGS tekniğinin kanser hastalarında kullanıma girmesi ile bu hastalarda birçok hedeflenebilir moleküler değişiklik saptanmaya başlamıştır. Bu teknik, birden fazla sıralı tek test yapılması yerine tek seferde çoklu gen dizileme imkanı sunarak, hastalar için gecikmeleri önleme ve hastayı en uygun klinik araştırmaya yönlendirebilme avantajlarını sağlamaktadır (4).

NCCN kılavuzlarında; bu belirteçlere NGS paneliyle bakılmasının, daha nadir görülen ve potansiyel olarak hedeflenebilir genetik değişikliklerin de saptanabilmesi nedeniyle daha avantajlı olabileceği bildirilmiştir (21).

2.2.2.1. Periferik Kandan NGS Analizi: Likit Biyopsi

Noninvaziv kan örnekleme yoluyla hematolojik olmayan kanserleri inceleme yeteneği, kanser teşhisinde en heyecan verici ve hızla gelişen alanlardan biridir. Hem kan örneklerinden sağlam kanser hücrelerinin izolasyonu ve kanser hücresinden türetilen DNA'nın kan örneklerinden analizi dahil olmak üzere önemli teknolojik ilerlemeler hem de hedeflenebilir moleküler biyobelirteçler ve hedefe yönelik ajanların artan kullanımı bu alanın hızla gelişmesinin önünü açmıştır (87).

Periferik kan, primer tümör dokusundan ya da metastatik tümör depositlerinden dökülen tümör hücrelerini (CTC) ve tümör hücresi kökenli molekülleri içerir. Kandaki kanser hücresi kökenli moleküller; karsinoembriyonik antijen (CEA) ve ya prostata özgü antijen (PSA) gibi iyi bilinen protein markerlerinin yanı sıra, ayrıntılı moleküler tekniklerin uygulanması için en büyük fırsatı sunan hücresiz tümör DNA'ları (ctDNA) içermektedir. İşte basit bir noninvaziv periferik kan örnekleme yoluyla, dolaşımdaki bu tümör hücreleri ve tümör DNA parçalarının tespit edilmesi ve analiz edilmesi yöntemine likit biyopsi denilmektedir. Likit biyopsi ile elde edilen bu materyaller üzerinde, çeşitli teknikler kullanılarak moleküler analizler yapılabilmektedir. Son yıllarda, gelişmiş hesaplama yöntemleriyle birlikte kullanılan NGS tekniği, ctDNA tabanlı moleküler analizlerin önünü açmıştır (87).

Kanser hücreleri, tümöre özgü (somatik) genetik değişiklikler içerir. Tümör hücrelerinin klonal doğası gereği, sürekli salınan ve dolaşımda tespit edilebilen birçok kopyada da bu somatik değişiklikler mevcuttur. Yapılan bazı çalışmalarda; ctDNA'daki mutasyonların, birincil tümörden gelen mutasyonlara tam olarak karşılık geldiği gösterilmiştir. Bu analizler, ctDNA'da tespit edilen somatik değişikliklerin doğrudan tek bir tümörden kaynaklandığını göstermektedir. Bu noktada, ctDNA tabanlı moleküler analizlerin hedeflenebilir moleküler değişikliklerin saptanmasında

kullanılabileceği bildirilmiştir (87,88). Nitekim Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), ilk kez 7 Ağustos 2020’de yeni nesil sekanslama tabanlı Guardant360CDx testini plazma örneklerinden izole edilmiş ctDNA’larda birden fazla ek biyobelirteç tespit eden bir tanı aracı olarak; osimertinib ile tedaviye uygun metastatik NSCLC’li hastalarda EGFR genindeki mutasyonları belirleme endikasyonu ile onaylamıştır (89). Ardından 26 Ekim 2020 ve 6 Kasım 2020’de yine aynı prensipte çalışan FoundationOne Liquid CDx testini de onaylamıştır. FoundationOne Liquid CDx; 26 Ekim 2020’de rucaparib ile tedaviye uygun over kanserli hastalarda BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonları belirleme, alektinib ile tedaviye uygun küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalarda ALK genindeki değişiklikleri belirleme ve alpelisib ile tedaviye uygun meme kanserli hastalarda PIK3CA genindeki mutasyonları belirleme endikasyonları ile onaylanmıştır. 6 Kasım 2020 tarihinde ise; olaparib ile tedaviye uygun metastatik kastrasyon dirençli prostat kanserli hastalarda BRCA1, BRCA2 ve ATM genlerindeki mutasyonları belirleme endikasyonu ile onaylanmıştır (90). mCRC’li hastalarda ise, likit biyopsi tabanlı NGS panellerinin kullanımına ilişkin FDA tarafından verilen bir onay olmasa da şu ana kadar yapılan çalışmalardan elde edilen veriler; bu hastalarda da tedavi planlama aşamasında bu panellerin kullanımının yarar sağlayabileceğini göstermektedir (91).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KATILIMCILAR, PROSEDÜRLER VE ÖRNEKLEM ÖZELLİKLERİ

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi 12.11.2020 tarih ve 21 sayılı Tıbbi Etik Kurul onayı ile yürütülen ‘‘Metastatik Kolorektal Kanserde Yeni Nesil Sekanslama Tekniğiyle Saptanan Gen Mutasyonlarının Prognoza ve Sağ Kalıma Etkisi’’ konulu retrospektif araştırma çalışmamız; Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Kliniği’nde metastatik kolorektal kanser tanısı ile takip edilen, kemoterapi ve/ve ya biyolojik tedavi alan, periferik kandan NGS tekniğiyle gen mutasyon analizi yapılmış olan, 18 yaş ve üzeri 48 hastaya ait anamnez, muayene, laboratuvar ve görüntüleme bilgilerinin retrospektif olarak taranması ve analiz edilmesi ile hazırlanmıştır. Çalışmada; tanı anında metastatik evrede olan ya da takipleri süresince metastaz gelişen hastalara ait veriler ele alınmıştır. NGS tekniğiyle mutasyon analizi yapılmamış olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Hastaların demografik özelliklerinden; yaş, cinsiyet, aile öyküsü, sigara kullanımı, alkol kullanımı ele alınmıştır. Yaş değişkeni 65 yaş altı, 65 yaş ve üzeri şeklinde gruplandırılmıştır. Aile öyküsü olarak; birinci derece akrabalarda solid kanser öyküsünün olup olmaması sorgulanmıştır. Sigara kullanımı olarak; hastalar, sigara kullanma öyküsü olmayanlar ve olanlar (halen aktif içici ve ya kullanıp bırakmış) şeklinde gruplandırılmıştır. Hastalar, alkol kullanımı olarak ise miktar belirtilmeksizin kullanmış olanlar ve olmayan şeklinde gruplandırılmıştır. Çalışmada hastaların klinik özelliklerinden; tümör histolojik alt tipi, tümör lokalizasyonu, lenfovasküler invazyon durumu, perinöral invazyon durumu, mikrosatellit instabilite durumu, primer tümör operasyon durumu, adjuvan tedavi durumu, adjuvan tedavi rejimi, lokal tedavi durumu, lokal tedavi türü, karaciğer metastazı durumu, akciğer metastazı durumu, periton metastazı durumu, kemik metastazı durumu, metastaz zamanındaki CEA düzeyi, metastaz zamanındaki CA 19-9 düzeyi, verilen ilk sıra tedavi, verilen ilk sıra biyolojik ajan ele alınmıştır.

3.2. MOLEKÜLER ANALİZ

Çalışmamızdaki hasta örnekleri Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı moleküler laboratuvarında çalışılmıştır. Hastalardan alınan 7 ml periferik kan örnekleri pax gene tüplerde toplanmıştır. Daha sonra 1600 xg'de 20 dakika ve 4000 xg'de 20 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrılmıştır. Yaklaşık 5 ml plazma örneklerinden Qiagen Qiap Circulating Nucleic Acid Kit (kat:55114 Germany) kullanılarak cfDNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Nanodrop'ta ölçümlenerek çalışmaya alınmıştır. Elde edilen cfDNA'lardan Accel-Amplicon 56 G Oncology Panel Kit kullanılarak yeni nesil DNA dizileme için kütüphane hazırlanmıştır. Hazırlanan kütüphanelerin İllumina MiSeq platformunda koşulları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen Fastq dosyaları Sophia DDM platformunda analiz edilmiştir.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler SPSS 25.0 [IBM SPSS Statistics 25 software (Armonk, NY: IBM Corp.)] paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma; kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkilerin analizinde Pearson ki-kare Testi kullanılmıştır. Sağ kalım eğrileri Kaplan-Meier yöntemi ile hesaplanmış, log rank testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. ÖRNEKLEM ÖZELLİKLERİ

4.1.1. Demografik Özellikler

Çalışmada; Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Kliniği'nce takip ve tedavisi yapılan ve dahil edilme kriterlerini taşıyan, metastatik kolorektal kanser tanılı toplam 48 hastaya ait veriler ele alındı. Hastaların yaş ortalaması 58,2 ($\pm 11,9$) iken; 34 hasta (%70,8) 65 yaş altı, 14 hasta (%29,2) 65 yaş ve üzeriydi. Hastaların 12'si (%25) kadın, 36'sı (%75) erkekti. 11 hastanın (%22,9) birinci derece yakınlarında kanser öyküsü mevcutken, 37 hastanın (%77,1) yakınlarında böyle bir durum mevcut değildi. Ayrıca 13 hastanın (%37,1) sigara; 3 hastanın (%8,6) alkol kullanım öyküsü mevcuttu (Tablo 6).

TABLO 6: DEMOGRAFİK ÖZELLİKLER (N=48)

	N (%)
YAŞ (YIL)	58,2 \pm 11,9
<65 YAŞ	34 (70,8)
\geq 65 YAŞ	14 (29,2)
CİNSİYET	
KADIN	12 (25)
ERKEK	36 (75)
AİLEDE KANSER ÖYKÜSÜ	
VAR	11 (22,9)
YOK	37 (77,1)
SİGARA KULLANIMI	
VAR	13 (37,1)
YOK	22 (62,9)
ALKOL KULLANIMI	
VAR	3 (8,6)
YOK	32 (91,4)

4.1.2. Klinik Özellikler

Çalışmaya dahil edilen hastaların 38'inde (%79,2) tümörün histolojik alt tipi adenokarsinom, 10'unda (%20,8) müsinöz karsinomdu. Primer tümör 13 hastada (%27,1) sağ kolon, 15 hastada (%31,3) sol kolon, 20 hastada (%41,7) rektumda yer almaktaydı. 35 hastada (%72,9) primer tümör opere edilmişti. Operasyonda alınan tümör materyali üzerinde yapılan patolojik incelemede; 20 hastada (%64,5) lenfovasküler invazyon, 13 hastada (%43,3) perinöral invazyon, 6 hastada (%26,1) mikrosatellit instabilite mevcuttu. Hastaların 25'ine (%52,1) operasyon sonrası adjuvan tedavi verilmiş; verilen tedavi rejimi 20 hastada (%80) Xelox, 3 hastada (%12) Folfox, 1 hastada (%4) De Gramont (lökovorin, 5-FU), 1 hastada (%4) kapesitabin olmuştu. Çalışmada ele alınan hastaların 29'una (%60,4) lokal tedaviler de uygulanmıştı. Bu tedavilerden radyoterapi 14 hastaya (%29,2), metastazektomi 9 hastaya (%18,8), TAKE 8 hastaya (%16,7), radyofrekans ablasyon 3 hastaya (%6,3), HIPEC 3 hastaya (%6,3) uygulanmıştı. İlk sıra biyolojik ajan olarak; 19 hastaya (%51,4) bevacizumab, 10 hastaya (27) cetuksimab, 8 hastaya (21,6) panitumumab verilmişti. İlk sıra tedavi rejimi olarak ise; 1 hastaya (%2,6) kapesitabin, 13 hastaya (%34,2) xelox+bevacizumab, 1 hastaya (%2,6) xelox+cetuksimab, 3 hastaya (%7,9) folfox+bevacizumab, 4 hastaya (%10,5) folfox+cetuksimab, 5 hastaya (%13,2) folfox+panitumumab, 3 hastaya (%7,9) folfiri+bevacizumab, 4 hastaya (%10,5) folfiri+cetuksimab, 2 hastaya (%5,3) folfiri+panitumumab, 1 hastaya (%2,6) irinotekan+cetuksimab, 1 hastaya (%2,6) oxaliplatin+panitumumab verilmişti. 26 hastada (%54,2) tanı anında olan ve ya sonradan gelişen karaciğer metastazı, 23 hastada (%47,9) akciğer metastazı, 7 hastada (%14,6) periton metastazı, 3 hastada (%6,3) kemik metastazı mevcuttu. 28 hastanın (%59,6) periferik kan örneğinden çalışılan CEA düzeyi normalin üzerinde (>4.7 ug/L), 20 hastanın (%42,6) da CA 19-9 (kanseri antijeni 19-9) düzeyi normalin üzerinde (>27 U/ml) idi (Tablo 7).

TABLO 7: KLİNİK ÖZELLİKLER (N=48)**N (%)**

TÜMÖR HİSTOLOJİK ALT TİPİ	
ADENOKARSİNOM	38 (79,2)
MÜSİNÖZ KARSİNOM	10 (20,8)
TÜMÖR LOKALİZASYONU	
SAĞ KOLON	13 (27,1)
SOL KOLON	15 (31,3)
REKTUM	20 (41,7)
LENFOVASKÜLER İNVAZYON	
VAR	20 (64,5)
YOK	11 (35,5)
PERİNÖRAL İNVAZYON	
VAR	13 (43,3)
YOK	17 (56,7)
MİKROSATELLİT İNSTABİLİTE	
VAR	6 (26,1)
YOK	17 (73,9)
PRİMER TÜMÖR OPERASYON DURUMU	
EVET	35 (72,9)
HAYIR	13 (27,1)
ADJUVAN TEDAVİ	
EVET	25 (52,1)
HAYIR	23 (47,9)
ADJUVAN TEDAVİ REJİMİ	

XELOX	20 (80)
FOLFOX	3 (12)
DE GRAMONT	1 (4)
KAPESİTABİN	1 (4)
LOKAL TEDAVİ	
EVET	29 (60,4)
HAYIR	19 (39,6)
RADYOTERAPİ	
EVET	14 (29,2)
HAYIR	34 (70,8)
METASTAZEKTOMİ	
EVET	9 (18,8)
HAYIR	39 (81,3)
RADYOFREKANS ABLASYON	
EVET	3 (6,3)
HAYIR	45 (93,8)
TAKE	
EVET	8 (16,7)
HAYIR	40 (83,3)
HIPEC	
EVET	3 (6,3)
HAYIR	45 (93,8)
KARACİĞER METASTAZI	
EVET	26 (54,2)
HAYIR	22 (45,8)

AKCİĞER METASTAZI**EVET**

23 (47,9)

HAYIR

25 (52,1)

PERİTON METASTAZI**EVET**

7 (14,6)

HAYIR

41 (85,4)

KEMİK METASTAZI**EVET**

3 (6,3)

HAYIR

45 (93,8)

CEA DÜZEYİ**NORMAL**

19 (40,4)

YÜKSEK (>4.7 UG/L)

28 (59,6)

CA 19-9 DÜZEYİ**NORMAL**

27 (57,4)

YÜKSEK (>27 U/ML)

20 (42,6)

İLK SIRA TEDAVİ**KAPESİTABİN**

1 (2,6)

XELOX+BEVACİZUMAB

13 (34,2)

XELOX+CETUKSİMAB

1 (2,6)

FOLFOX+BEVACİZUMAB

3 (7,9)

FOLFOX+CETUKSİMAB

4 (10,5)

FOLFOX+PANİTUMUMAB

5 (13,2)

FOLFİRİ+BEVACİZUMAB

3 (7,9)

FOLFİRİ+CETUKSİMAB

4 (10,5)

FOLFİRİ+PANİTUMUMAB

2 (5,3)

İRİNOTEKAN+CETUKSİMAB

1 (2,6)

OXALİPLATİN+PANİTUMUMAB	1 (2,6)
İLK SIRA BİYOLOJİK AJAN	
BEVACİZUMAB	19 (51,4)
CETUKSİMAB	10 (27,0)
PANİTUMUMAB	8 (21,6)

4.2. NGS ANALİZ SONUÇLARI

Çalışmamızda; periferik kan örneğinden izole edilen ctDNA materyalinden 56 gen için en az 1 primer çifti kullanılarak elde edilen 263 amplikondan, yeni nesil DNA dizi analizi yöntemi ile mutasyon taraması yapıp, 16000 COSMIC mutasyon tarandı. Yapılan taramalar sonucunda en sık mutasyon saptanan genler sırasıyla; TP53 (%95,8), KDR (%79,2), RET (%79,2), EGFR (%77,1), PIK3CA (%77,1), VHL (%72,9), NOTCH1 (%70,8), CSF1R (%66,7), FGFR2 (%64,6), FGFR3 (%62,5), SMAD4 (%60,4), AKT1 (%60,4), ERBB4 (%60,4), APC (%56,3), KRAS (%54,2), JAK3 (%54,2), RB1 (%52,1), FBXW7 (%52,1) oldu. Ayrıca metastatik kolorektal kanserlerin yönetiminde önemli rol oynayan genlerden; BRAF 4 hastada (%8,3), NRAS 6 hastada (%12,5), KRAS 26 hastada (%54,2) mutant saptandı (tablo 8).

TABLO 8: NGS ANALİZİ İLE ELDE EDİLEN MUTANT GEN N (%) ORANLARI (N=48)

ALK	0 (0)
ATM	8 (16,7)
BRAF	4 (8,3)
EGFR	37 (77,1)
ERBB2	11 (22,9)
HRAS	17 (35,4)
IDH1	0 (0)
IDH2	2 (4,2)

KDR	38 (79,2)
KIT	18 (37,5)
KRAS	26 (54,2)
MAP2K1	20 (41,7)
MET	9 (18,8)
NRAS	6 (12,5)
PTEN	11 (22,9)
RB1	25 (52,1)
RET	38 (79,2)
TP53	46 (95,8)
APC	27 (56,3)
CDH1	5 (10,4)
CDKN2A	9 (18,8)
DNMT3A	10 (20,8)
ERBB4	29 (60,4)
FGFR1	2 (4,2)
FGFR2	31 (64,6)
FGFR3	30 (62,5)
FLT3	18 (37,5)
GNA11	17 (35,4)
GNAQ	1 (2,1)
GNAS	4 (8,3)
JAK2	1 (2,1)
JAK3	26 (54,2)
NOTCH1	34 (70,8)
NPM1	0 (0)
PIK3CA	37 (77,1)
SMAD4	29 (60,4)
ABL1	16 (33,3)
AKT1	29 (60,4)
CDH1	3 (6,3)
CSF1R	32 (66,7)

CTNNB1	1 (2,1)
DDR2	0 (0)
EZH2	6 (12,5)
FBXW7	25 (52,1)
FOXL2	8 (16,7)
HNF1A	4 (8,3)
MLH1	2 (4,2)
MPL	4 (8,3)
MSH6	8 (16,7)
PDGFRA	16 (33,3)
SMARCB1	15 (31,3)
SMO	4 (8,3)
SRC	0 (0)
STK11	22 (45,8)
TSCI	0 (0)
VHL	35 (72,9)

Yaş, cinsiyet, ailede kanser öyküsü, sigara kullanımı, alkol kullanımı, tümör histolojik alt tipi, tümör lokalizasyonu, LVI, PNI, MSI, CEA yüksekliği, CA19-9 yüksekliği, karaciğer metastazı, akciğer metastazı, periton metastazı, kemik metastazı durumlarına göre tek tek gen mutasyon sıklıkları arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı incelendi. Yaşa göre bakıldığında; 65 yaş ve üzeri hastalarda, KDR ekson 30 mutasyonunun 65 yaş altı hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı (%42,9'a karşılık %5,9). ERBB4 ekson 8 mutasyonunun da benzer şekilde 65 yaş ve üzeri hastalarda anlamlı derecede daha sık olduğu gözlemlendi (%21,4'e karşılık %0). Yine STK11 ekson 1 mutasyonu da 65 yaş ve üzeri hastalarda anlamlı derecede daha sık saptandı (%35,7'ye karşılık %8,8). Sigara kullanımına göre bakıldığında; sigara kullanma öyküsü olanlarda EGFR ekson 20 (%23,1'e karşılık %0), TP53 ekson 7 (%23,1'e karşılık %0), HNF1A (%23,1'e karşılık %0) ve MET (%38,5'e karşılık %4,5) mutasyonları sigara kullanma öyküsü olmayanlara kıyasla anlamlı derecede daha sık saptandı. RET ekson 11 mutasyonunun ise, sigara kullanma öyküsü olmayanlarda anlamlı derecede daha fazla olduğu gözlemlendi

(%77,3'e karşılık %38,5). Aile öyküsüne göre bakıldığında; birinci derecede akrabalarında kanser öyküsü olmayanlarda olanlara kıyasla TP53 (%100'e karşılık %81,8), TP53 ekson 5 (%32,4'e karşılık %0), ERBB4 (%70,3'e karşılık %27,3), ERBB4 ekson 9 (%45,9'a karşılık %9,1) mutasyonları anlamlı derecede daha sık saptandı (Tablo 9). Cinsiyet ve alkol kullanımına göre bakıldığında ise; gruplar arasında mutasyon sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Tümör histolojik alt tipine göre mutasyon sıklıkları analiz edildiğinde; müsinöz karsinomlu hastalarda adenokarsinomlu hastalara kıyasla DNMT3A mutasyonu istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha sık saptandı (%50'ye karşılık %13,2). Buna karşın, TP53 ekson 5 mutasyonu ise adenokarsinomlu hastalarda anlamlı derecede daha sıklı (%31,6'ya karşılık %0). Primer tümör lokalizasyonuna göre değerlendirildiğinde; primer tümörü sol kolonda olan hastalarda, sağ kolonda ve rektumda olan hastalara kıyasla KRAS mutasyonunun anlamlı derecede daha sık olduğu gözlemlendi (%80'e karşılık %38,5 ve %45). Yine benzer şekilde ERBB4 mutasyonunun da primer tümörü sol kolonda olan hastalarda, sağ kolonda olan hastalara kıyasla anlamlı derecede daha sık olduğu belirlendi (%73,3'e karşılık %30,8). RET ekson 10 mutasyonu ise, primer tümörü rektumda olanlarda anlamlı ölçüde daha sıklı (%75'e karşılık %61,5 ve %26,7). Lenfovasküler invazyon durumuna göre bakıldığında; lenfovasküler invazyonu olan tümöre sahip hastalarda CDKN2A (%45'e karşılık %0), PIK3CA (%80'e karşılık %36,4) ve PIK3CA ekson 14 (%40'a karşılık %0) mutasyonlarının anlamlı ölçüde daha sık gözlemlendiği belirlendi. Perinöral invazyon durumuna göre değerlendirildiğinde ise; perinöral invazyonu olan tümöre sahip hastalarda MAP2K1 (%76,9'a karşılık %35,3), JAK3 (%84,6'ya karşılık %35,3) ve SMO (%30,8'e karşılık %0) mutasyonlarının anlamlı ölçüde daha sık olduğu görüldü. Mikrosatellit instabilite durumuna göre bakıldığında; MSI olanlarda MSS olanlara kıyasla PDGFR (%83,3'e karşılık %17,6) ve EGFR ekson 21 (%66,7'ye karşılık %17,6) mutasyonları; MSS olanlarda ise MSI olanlara kıyasla KDR (%94,1'e karşılık %50) mutasyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla saptandı (Tablo 9).

Çalışmada; metastaz yerine göre mutasyon sıklıkları da değerlendirildi. Buna göre; karaciğer metastazı olan hastalarda olmayan hastalara kıyasla KDR ekson 11 (%61,5'e karşılık %31,8) mutasyonunun; karaciğer metastazı olmayan hastalarda ise olan hastalara kıyasla EGFR (%90,9'a karşılık %65,4), EGFR ekson 7 (%59,1'e karşılık %19,2), ERBB4 ekson 9 (%59,1'e karşılık %19,2), FBXW7 (%81,8'e karşılık %26,9), VHL ekson 2 (%50'ye karşılık %19,2) mutasyonlarının istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha sık olduğu belirlendi. Akciğer metastazı olmayan hastalarda olan hastalara kıyasla MAP2K1 (%56'ya karşılık %26,1) ve MAP2K1 ekson 6 (%32'ye karşılık %4,3) mutasyonları; akciğer metastazı olan hastalarda ise olmayan hastalara kıyasla PTEN ekson 2 (%17,4'e karşılık %0), TP53 ekson 5 (%39,1'e karşılık %12), ERBB4 ekson 9 (%52,5'ye karşılık %24), FGFR3 (%82,6'ya karşılık %44), FGFR3 ekson 9 (%39,1'e karşılık %12), FBXW7 (%69,6'ya karşılık %36), FBXW7 ekson 9 (%60,9'a karşılık %32) mutasyonları istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sık saptandı. Periton metastazı olmayan hastalarda olan hastalara kıyasla KDR ekson 11 (%56,1'e karşılık %0) mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha sık olduğu görüldü. Kemik metastazı durumuna göre incelendiğinde ise; kemik metastazı olmayan hastalarda olan hastalara kıyasla VHL (%77,8'e karşılık %0) mutasyonu; kemik metastazı olan hastalarda olmayan hastalara kıyasla KRAS ekson 2 (%100'e karşılık %13,3), PTEN ekson 8 (%66,7'ye karşılık %2,2), APC ekson 16 (%100'e karşılık %33,3) mutasyonları istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sıklı (Tablo 9).

Çalışmada ayrıca, metastaz saptandığı dönemde periferik kandan çalışılan CEA ve CA19-9 düzeyleri ile mutasyon sıklıkları arasındaki ilişki de araştırıldı. Sonuçta; CEA düzeyi normalden yüksek olan (>4.7 ug/L) hastalarda, normal olan hastalara kıyasla KRAS (%67,9'a karşılık %31,6) mutasyonunun; CEA düzeyi normal olan hastalarda yüksek olan hastalara kıyasla RB1 (%73,7'ye karşılık %39,3) mutasyonunun anlamlı derecede daha sık olduğu görüldü. CA 19-9 düzeyi normalden yüksek olan (>27 U/ml) hastalarda ise, normal olan hastalara kıyasla FLT3 ekson 11 (%20'ye karşılık %0) mutasyonu anlamlı derecede daha sık saptandı (Tablo 9).

Tablo 9: Anlamlı Fark Saptanan Grupların P Değerleri Tablosu

Yaş					
Mutasyon	<65 yaş		≥65 yaş		P Değeri
	n	%	n	%	
KDR ekson 30	2	5,9	6	42,9	0,005
ERBB4 ekson 8	0	0	3	21,4	0,021
STK11 ekson 1	3	8,8	5	35,7	0,037
Sigara Kullanımı					
Mutasyon	Yok		Var		P Değeri
	n	%	n	%	
EGFR ekson 20	0	0	3	23,1	0,044
MET	1	4,5	5	38,5	0,019
RET ekson 11	17	77,3	5	38,5	0,033
TP53 ekson 7	0	0	3	23,1	0,044
HNF1A	0	0	3	23,1	0,044
Ailede Kanser Öyküsü					
Mutasyon	Yok		Var		P Değeri
	n	%	n	%	
TP53	37	100	9	81,8	0,049
TP53 ekson 5	12	32,4	0	0	0,044
ERBB4	26	70,3	3	27,3	0,016
ERBB4 ekson 9	17	45,9	1	9,1	0,035
Tümör Histolojik Alt Tipi					
Mutasyon	Adenokarsinom		Müsinöz Karsinom		P Değeri
	n	%	n	%	

DNMT3A	5	13,2	5	50	<i>0,022</i>		
TP53 ekson 5	12	31,6	0	0	<i>0,039</i>		
Tümör Lokalizasyonu							
Mutasyon	Sağ Kolon		Sol Kolon		Rektum		P Değeri
	n	%	n	%	n	%	
KRAS	5	38,5	12	80	9	45	<i>0,050</i>
ERBB4	4	30,8	11	73,3	14	70	<i>0,037</i>
RET ekson 10	8	61,5	4	26,7	15	75	<i>0,015</i>
Lenfovasküler İnvazyon							
Mutasyon	Yok		Var		P Değeri		
	n	%	n	%			
CDKN2A	0	0	9	45	<i>0,012</i>		
PIK3CA	4	36,4	16	80	<i>0,023</i>		
PIK3CA ekson 14	0	0	8	40	<i>0,028</i>		
Perinöral İnvazyon							
Mutasyon	Yok		Var		P Değeri		
	n	%	n	%			
MAP2K1	6	35,3	10	76,9	<i>0,024</i>		
JAK3	6	35,3	11	84,6	<i>0,007</i>		
SMO	0	0	4	30,8	<i>0,026</i>		
Mikrosatellit İnstabilite							
Mutasyon	Yok		Var		P Değeri		
	n	%	n	%			
KDR	16	94,1	3	50	<i>0,040</i>		
PDGFRA	3	17,6	5	83,3	<i>0,009</i>		

EGFR ekson 21	3	17,6	4	66,7	0,045
Karaciğer Metastazı					
Mutasyon	Yok		Var		P Değeri
	n	%	n	%	
EGFR	20	90,9	17	65,4	0,036
EGFR ekson 7	13	59,1	5	19,2	0,004
KDR ekson 11	7	31,8	16	61,5	0,040
ERBB4 ekson 9	13	59,1	5	19,2	0,004
FBXW7	18	81,8	7	26,9	0,000
VHL ekson 2	11	50	5	19,2	0,024
Akciğer Metastazı					
Mutasyon	Yok		Var		P Değeri
	n	%	n	%	
MAP2K1	14	56	6	26,1	0,036
MAP2K1 ekson 6	8	32	1	4,3	0,024
PTEN ekson 2	0	0	4	17,4	0,046
TP53 ekson 5	3	12	9	39,1	0,030
ERBB4 ekson 9	6	24	12	52,2	0,044
FGFR3	11	44	19	82,6	0,006
FGFR3 ekson 9	3	12	9	39,1	0,030
FBXW7	9	36	16	69,6	0,020

FBXW7 ekson 9	8	32	14	60,9	0,045
Periton Metastazı					
Mutasyon	Yok		Var		P Değeri
	n	%	n	%	
KDR ekson 11	23	56,1	0	0	0,010
Kemik Metastazı					
Mutasyon	Yok		Var		P Değeri
	n	%	n	%	
KRAS ekson 2	6	13,3	3	100	0,005
PTEN ekson 8	1	2,2	2	66,7	0,008
APC ekson 16	15	33,3	3	100	0,047
VHL	35	77,8	0	0	0,017
CEA Düzeyi					
Mutasyon	Normal		Yüksek		P Değeri
	n	%	n	%	
KRAS	6	31,6	19	67,9	0,014
RB1	14	73,7	11	39,3	0,020
CA 19-9 Düzeyi					
Mutasyon	Normal		Yüksek		P Değeri
	n	%	n	%	
FLT3 ekson 11	0	0	4	20	0,027

4.3. LİKİT BİYOPSİ-DOKU BİYOPSİSİ UYUM ANALİZLERİ

Çalışmamızda; tümör dokusundan alınan örneklerden yapılan kantitatif PCR tabanlı altın standart genomik DNA analizleri ile periferal kandan alınan örneklerden (likit biyopsi) yapılan ctDNA tabanlı NGS analizi sonuçları karşılaştırıldı. Kliniğimizde mCRC'li uygun hasta grubunda, kantitatif PCR tabanlı genomik DNA analizleri rutin

olarak KRAS, NRAS, BRAF genleri için yapıldığından; karşılaştırma da bu genlerdeki mutasyon oranları üzerinden yapıldı. Tümör dokusu örnekleri üzerinden yapılan standart analizlerde; KRAS mutasyonu 17 hastada (%38,6), NRAS mutasyonu 1 hastada (%3,2); BRAF mutasyonu 4 hastada (%12,5) saptandı. Periferik kandan alınan örneklerden yapılan ctDNA tabanlı NGS analizlerinde ise; KRAS mutasyonu 26 hastada (%54,2), NRAS mutasyonu 6 hastada (%12,5); BRAF mutasyonu 4 hastada (%8,3) saptandı. Her iki analizdeki sonuçlar birbiri ile karşılaştırıldığında; NGS analizi, PCR analizinde KRAS mutasyonu saptanan 17 hastanın 11'inde "KRAS mutasyonu var" şeklinde sonuç verirken, 6'sında "KRAS mutasyonu yok" şeklinde sonuç verdi (%64,7 duyarlılık). PCR analizinde KRAS mutasyonu saptanmayan 27 hastanın ise; 15'inde "KRAS mutasyonu yok" şeklinde sonuç verirken, 12'sinde "KRAS mutasyonu var" şeklinde sonuç verdi (%55,6 özgüllük). Genel olarak ise; KRAS geni için yapılan NGS analizleri, 44 hastanın 26'sında PCR analizleri ile uyumlu sonuç gösterdi (%59,1 uyum oranı) (Tablo 10).

Tablo 10: KRAS Geni için NGS ve PCR Analizleri Sonuçlarının Karşılaştırılması

			NGS KRAS		Total
			yok	var	
PCR KRAS	yok	Count	15	12	27
		% within P_KRAS	55,6%	44,4%	100,0%
	var	Count	6	11	17
		% within P_KRAS	35,3%	64,7%	100,0%
Total	Count	21	23	44	
	% within P_KRAS	47,7%	52,3%	100,0%	

NRAS için bakıldığında; PCR analizi NRAS mutasyonunu sadece 1 hastada saptarken, bu hastada NGS analizi de "NRAS mutasyonu var" şeklinde sonuç verdi (%100 duyarlılık). NGS analizi, PCR analizinde NRAS mutasyonu saptanmayan 30 hastanın ise; 26'sında "NRAS mutasyonu yok" şeklinde sonuç verirken, 4'ünde "NRAS mutasyonu var" şeklinde sonuç verdi (%86,7 özgüllük). Genel olarak ise; NRAS geni için yapılan NGS analizleri, 31 hastanın 27'sinde PCR analizleri ile uyumlu sonuç gösterdi (%87,1 uyum oranı) (Tablo 11).

Tablo 11: NRAS Geni için NGS ve PCR Analizleri Sonuçlarının Karşılaştırılması

			NGS NRAS		Total
			yok	var	
PCR NRAS	yok	Count	26	4	30
		% within P_NRAS	86,7%	13,3%	100,0%
	var	Count	0	1	1
		% within P_NRAS	,0%	100,0%	100,0%
Total	Count	26	5	31	
	% within P_NRAS	83,9%	16,1%	100,0%	

BRAF için bakıldığında; NGS analizi, PCR analizinde BRAF mutasyonu saptanan 4 hastanın 2'sinde "BRAF mutasyonu var" şeklinde sonuç verirken, 2'sinde "BRAF mutasyonu yok" şeklinde sonuç verdi (%50 duyarlılık). PCR analizinde BRAF mutasyonu saptanmayan 28 hastanın ise; 27'inde "BRAF mutasyonu yok" şeklinde sonuç verirken, 1'inde "BRAF mutasyonu var" şeklinde sonuç verdi (%96,4 özgüllük). Genel olarak ise; BRAF geni için yapılan NGS analizleri, 32 hastanın 29'unda PCR analizleri ile uyumlu sonuç gösterdi (%90,6 uyum oranı) (Tablo 12).

Tablo 12: BRAF Geni için NGS ve PCR Analizleri Sonuçlarının Karşılaştırılması

			NGS BRAF		Total
			yok	var	
PCR BRAF	yok	Count	27	1	28
		% within P_BRAF	96,4%	3,6%	100,0%
	var	Count	2	2	4
		% within P_BRAF	50,0%	50,0%	100,0%
Total	Count	29	3	32	
	% within P_BRAF	90,6%	9,4%	100,0%	

Sonuçta; periferik kandan alınan örneklerden yapılan ctDNA tabanlı NGS analizlerinin, doku örnekleriyle yapılan kantitatif PCR tabanlı altın standart yöntemle kıyasla KRAS mutasyonu için %64,7 duyarlılık, %55,6 özgüllük ve %59,1 uyum oranına; NRAS mutasyonu için %100 duyarlılık, %86,7 özgüllük ve %87,1 uyum oranına; BRAF mutasyonu için %50 duyarlılık, %96,4 özgüllük ve %90,6 uyum oranına sahip olduğu gösterildi (Tablo 13).

Tablo 13: Likit Biyopsi-Doku Biyopsisi Uyum Analizleri Tablosu

Gen	Uyum Oranı	Duyarlılık	Özgüllük	Kappa	P değeri
KRAS	%59,1	%64,7	%55,6	0,190	0,190
NRAS	%87,1	%100	%86,7	0,295	0,020
BRAF	%90,6	%50	%96,4	0,520	0,003

Çalışmamızda ayrıca, likit biyopsi ile doku biyopsisi örneklerinin alınma zamanları arasındaki süreye göre uyum oranları da değerlendirildi. KRAS için bakıldığında; süre 6 aydan kısa olanlarda NGS analizi, 23 hastanın 14'ünde (%60,9) PCR analiziyle uyumlu sonuç verirken; süre 6 aydan uzun olanlarda 21 hastanın 12'sinde (%57,1) PCR analiziyle uyumlu sonuç verdi (Tablo 14).

Tablo 14: KRAS Geni için NGS ve PCR Analizleri Sonuçlarının Örneklerin Alınma Zamanları Arasındaki Süreye Göre Karşılaştırılması

Süre				NGS KRAS		Total
				yok	var	
<6 ay	PCR KRAS	yok	Count	7	5	12
			% of Total	30,4%	21,7%	52,2%
	var	Count	4	7	11	
		% of Total	17,4%	30,4%	47,8%	
	Total	Count	11	12	23	
		% of Total	47,8%	52,2%	100,0%	
>6 ay	PCR KRAS	yok	Count	8	7	15
			% of Total	38,1%	33,3%	71,4%
	var	Count	2	4	6	
		% of Total	9,5%	19,0%	28,6%	
	Total	Count	10	11	21	
		% of Total	47,6%	52,4%	100,0%	

NRAS için bakıldığında; süre 6 aydan kısa olanlarda NGS analizi, 12 hastanın 12'sinde (%100) PCR analiziyle uyumlu sonuç verirken; süre 6 aydan uzun olanlarda 19 hastanın 15'inde (%78,9) PCR analiziyle uyumlu sonuç verdi (Tablo 15).

Tablo 15: NRAS Geni İçin NGS ve PCR Analizleri Sonuçlarının Örneklerin Alınma Zamanları Arasındaki Süreye Göre Karşılaştırılması

Süre				NGS NRAS		Total
				yok	var	
<6 ay	PCR NRAS	yok	Count	11	0	11
			% of Total	91,7%	,0%	91,7%
	var	Count	0	1	1	
		% of Total	,0%	8,3%	8,3%	
	Total	Count	11	1	12	
		% of Total	91,7%	8,3%	100,0%	
>6 ay	PCR NRAS	yok	Count	15	4	19
			% of Total	78,9%	21,1%	100,0%
	var	Count	0	1	1	
		% of Total	,0%	8,3%	8,3%	
	Total	Count	15	4	19	
		% of Total	78,9%	21,1%	100,0%	

BRAF için bakıldığında; süre 6 aydan kısa olanlarda NGS analizi, 15 hastanın 15'inde (%100) PCR analiziyle uyumlu sonuç verirken; süre 6 aydan uzun olanlarda 20 hastanın 17'sinde (%85) PCR analiziyle uyumlu sonuç verdi (Tablo 16).

Tablo 16: BRAF Geni İçin NGS ve PCR Analizleri Sonuçlarının Örneklerin Alınma Zamanları Arasındaki Süreye Göre Karşılaştırılması

Süre				NGS BRAF		Total
				yok	var	
<6 ay	PCR BRAF	yok	Count	11	0	11
			% of Total	91,7%	,0%	91,7%
	var	Count	0	1	1	
		% of Total	,0%	8,3%	8,3%	
	Total	Count	11	1	12	
		% of Total	91,7%	8,3%	100,0%	
>6 ay	PCR BRAF	yok	Count	16	1	17
			% of Total	80,0%	5,0%	85,0%
	var	Count	2	1	3	
		% of Total	10,0%	5,0%	15,0%	
	Total	Count	18	2	20	
		% of Total	90,0%	10,0%	100,0%	

Sonuçta; bu süre 6 aydan kısa olanlarda uyum oranları KRAS için %60,9, NRAS için %100, BRAF için %100 olurken; bu süre 6 aydan uzun olanlarda uyum oranları KRAS için %57,1, NRAS için %78,9, BRAF için %85 olarak saptandı (Tablo 17).

Tablo 17: Likit Biyopsi ile Doku Biyopsisi Örneklerinin Alınma Zamanları Arasındaki Süreye Göre Analiz Sonuçlarının Uyum Oranları

Gen	Süre	Uyum Oranı	Kappa	P değeri
KRAS	<6 ay	%60,9	0,219	0,292
	>6 ay	%57,1	0,160	0,407
NRAS	<6 ay	%100	1,000	0,001
	>6 ay	%78,9	-	-
BRAF	<6 ay	%100	1,000	0,001
	>6 ay	%85	0,318	0,144

4.4. SAĞ KALIM ANALİZLERİ

Çalışmamızda; hastaların progresyonsuz sağ kalım ve genel sağ kalım süreleri hesaplanarak, mutasyon durumlarına göre sağ kalım süreleri arasındaki farklar istatistiksel olarak analiz edildi. Tüm hasta grubunun ortalama genel sağ kalım süresi 59,3 ay; progresyonsuz sağ kalım süresi 18,8 ay olarak hesaplandı (Tablo 18).

Tablo 18: Tüm Hasta Grubunun Ortalama Genel Sağ Kalım (OS) ve Progresyonsuz Sağ Kalım (PFS) Süreleri

OS (mean)				PFS (mean)			
Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
59,339	11,023	37,733	80,945	18,863	3,505	11,993	25,733

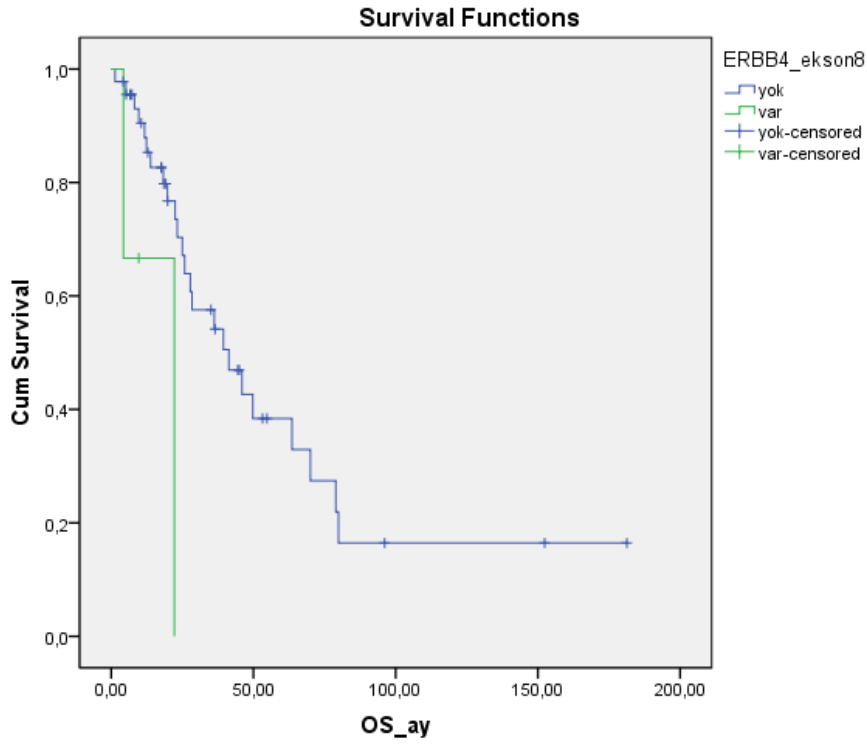
4.4.1. Genel Sağ Kalım

Genlerdeki mutasyon durumuna göre yapılan genel sağ kalım analizlerinde; ERBB4 ekson 8 (61,7 aya karşılık 16,2 ay), FGFR1 (61,9 aya karşılık 18 ay), FGFR3 ekson 14 (62,9 aya karşılık 11,5 ay), FLT3 ekson 11 (64,3 aya karşılık 15,8 ay), CDH1 (61,6 aya karşılık 11,9 ay), CSF1R ekson 22 (62,9 aya karşılık 16,5 ay), MSH6 (66,6 aya karşılık 22,6 ay), SMARCB1 ekson 5 (67 aya karşılık 25 ay) ve PIK3CA ekson 10 (65,7 aya karşılık 18,8 ay) mutasyonlarının varlığı istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kötü genel sağ kalım süreleri ile ilişki iken; NOTCH1 (25,3 aya karşılık 71,5 ay) ve STK11 (38,3 aya karşılık 80,5 ay) mutasyonlarının varlığı istatistiksel olarak anlamlı derecede daha iyi genel sağ kalım süreleri ile ilişki bulundu (Tablo 19). ERBB4 ekson 8, FGFR1, FGFR3 ekson 14, FLT3 ekson 11, CDH1, CSF1R ekson 22, MSH6, SMARCB1 ekson 5, PIK3CA ekson 10, NOTCH1, STK11 gen mutasyon durumlarına göre genel sağ kalım eğrileri sırası ile Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5, Şekil 6, Şekil 7, Şekil 8, Şekil 9, Şekil 10, Şekil 11, Şekil 12 ve Şekil 13’de gösterilmiştir.

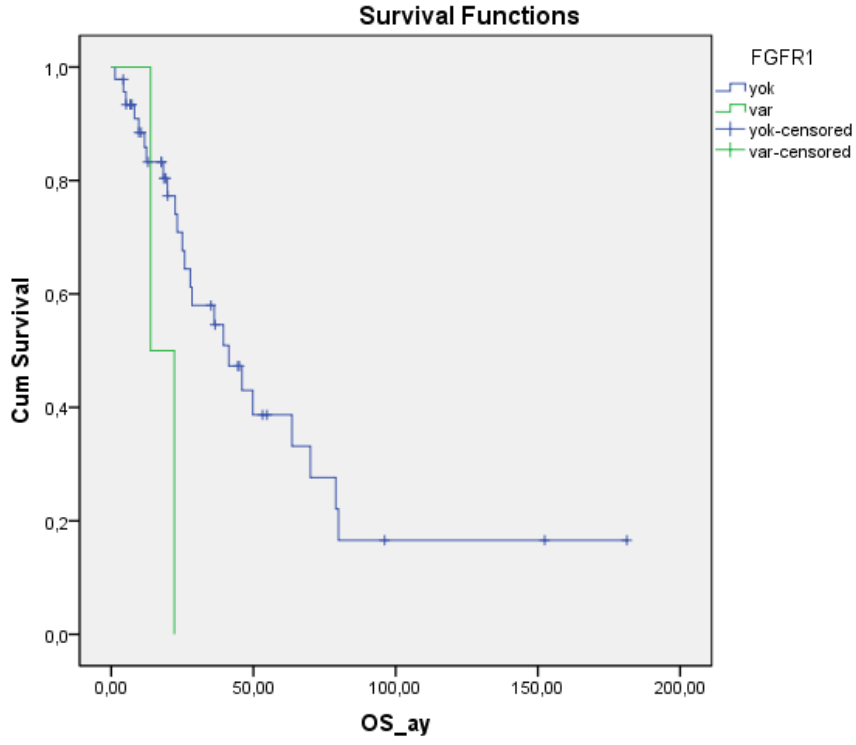
Tablo 19: Mutasyon Durumuna Göre Genel Sağ Kalım Açısından Anlamlı Fark Saptanan Grupların P Değerleri Tablosu

Gen	Mutasyon	Ortalama	S. Hata	%95 G. Aralığı	P değeri
ERBB4 ekson8	Yok	61,714	11,475	39,224-84,204	0,022
	Var	16,233	6,890	2,729-29,737	
FGFR1	Yok	61,882	11,537	39,269-84,496	0,034
	Var	18,017	4,183	9,817-26,216	
FGFR3 ekson 14	Yok	62,941	11,619	40,166-85,715	0,001
	Var	11,542	3,240	5,191-17,892	
FLT3 ekson 11	Yok	64,297	12,018	40,742-87,852	0,002
	Var	15,800	7,346	1,401-30,199	
NOTCH1	Yok	25,290	3,711	18,017-32,562	0,012
	Var	71,545	14,016	44,075-99,016	
CDH1	Yok	61,581	11,407	39,223-83,938	0,017
	Var	11,889	3,219	5,581-18,197	

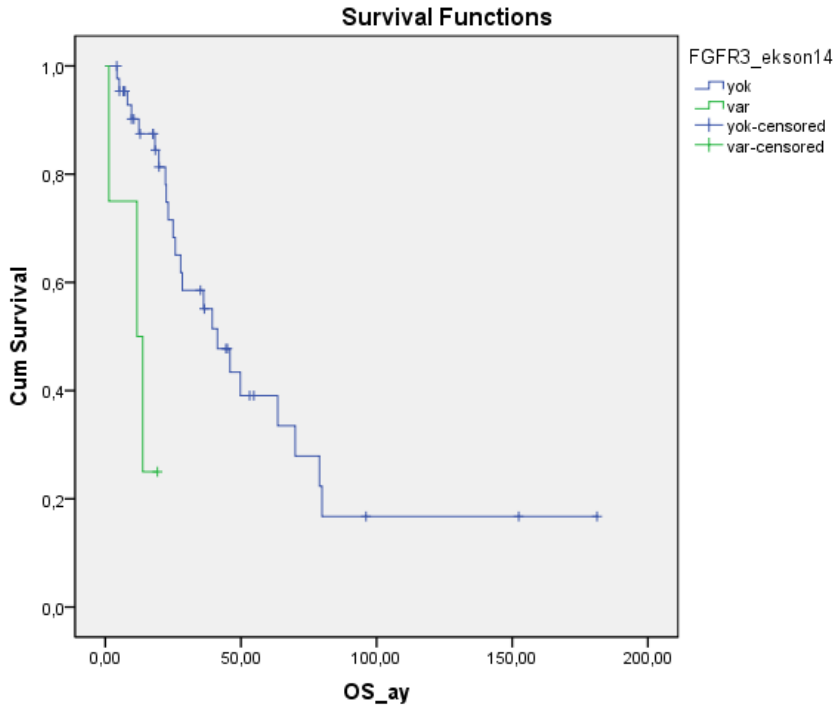
CSF1R ekson 22	Yok	62,890	11,768	39,824-85,956	0,013
	Var	16,456	10,348	0,000-36,737	
MSH6	Yok	66,624	12,715	41,702-91,547	0,011
	Var	22,610	6,062	10,729-34,491	
SMARCB1 ekson 5	Yok	67,046	12,963	41,638-92,454	0,032
	Var	25,045	4,990	15,264-34,826	
STK11	Yok	38,268	9,354	19,933-56,602	0,009
	Var	80,539	16,472	48,254-112,825	
PIK3CA ekson 10	Yok	65,711	12,327	41,550-89,872	0,005
	Var	18,817	3,393	12,166-25,468	



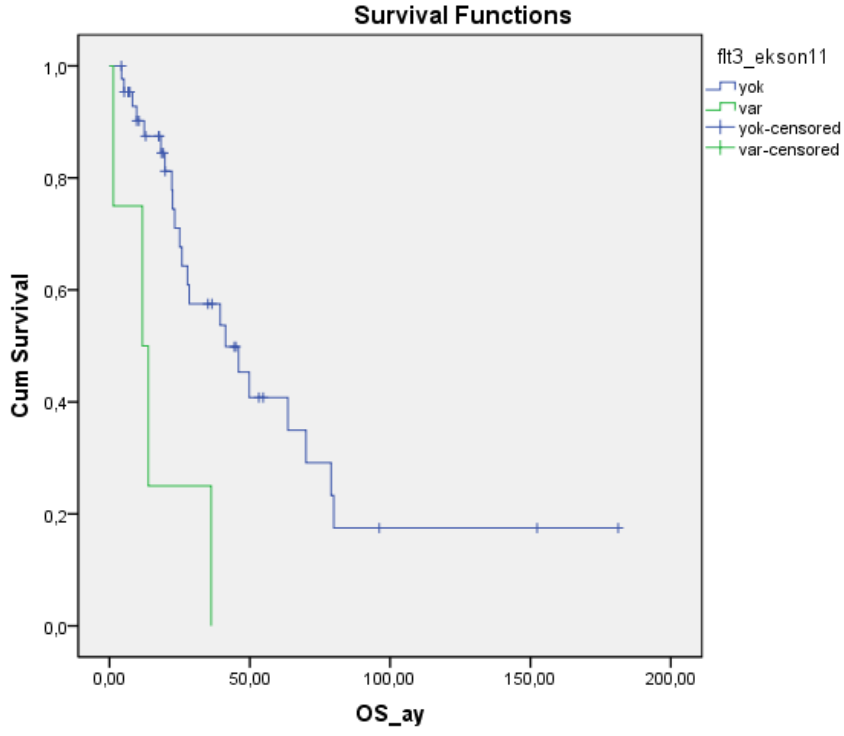
Şekil 3: ERBB4 Ekson 8 Mutasyon Durumuna Göre Genel Sağ Kalım Eğrisi



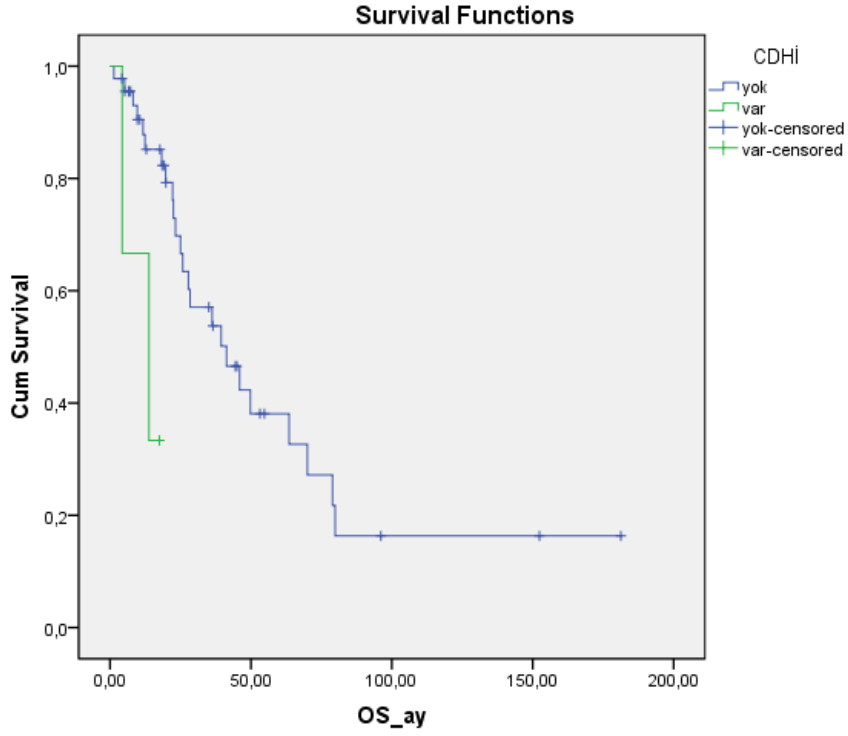
Şekil 4: FGFR1 Mutasyon Durumuna Göre Genel Sağ Kalım Eğrisi



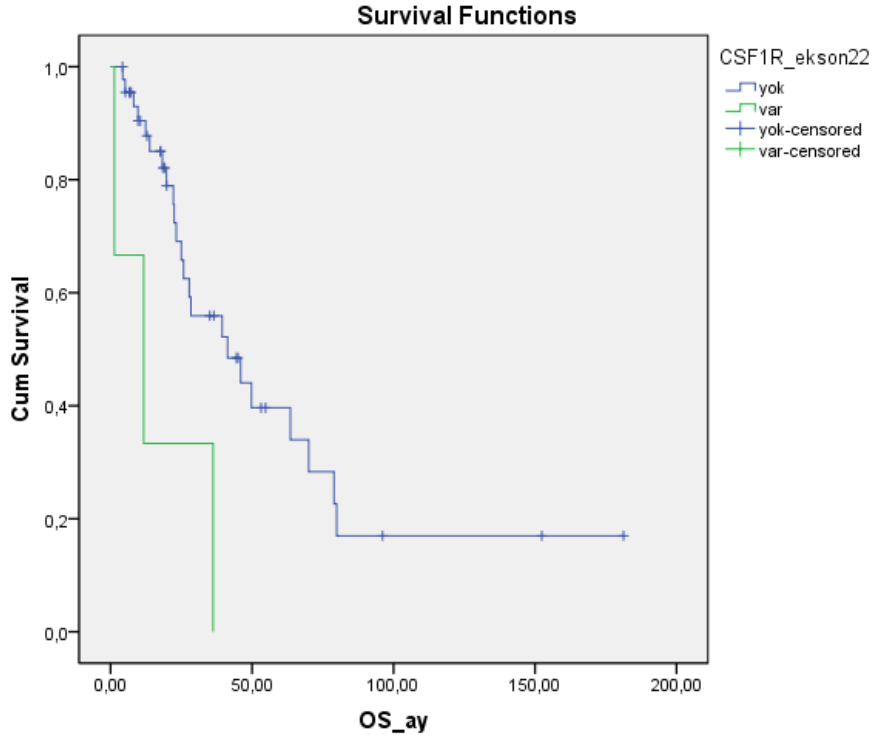
Şekil 5: FGFR3 ekson 14 Mutasyon Durumuna Göre Genel Sağ Kalım Eğrisi



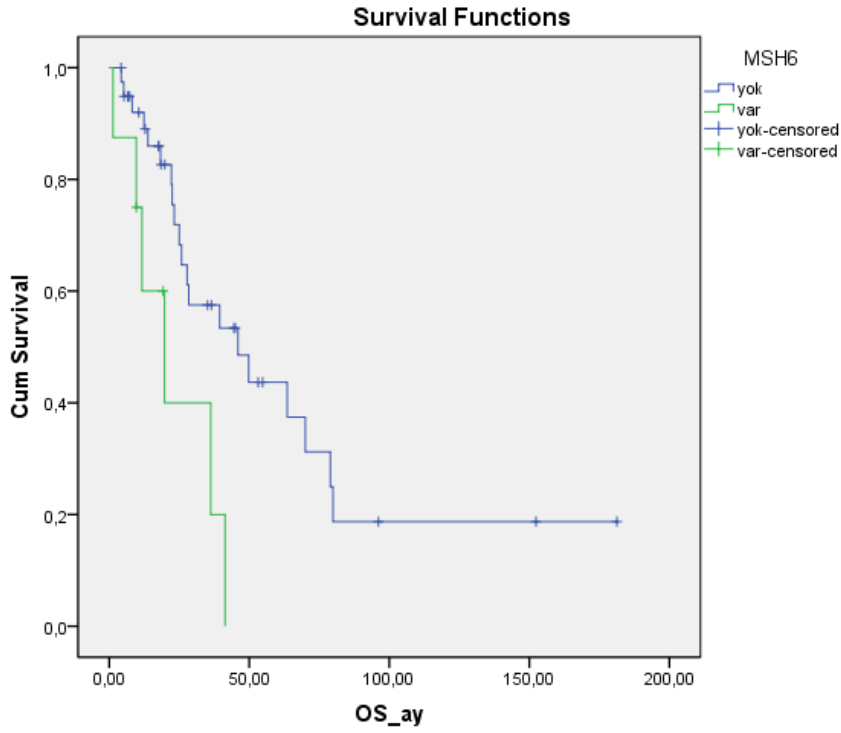
Şekil 6: FLT3 ekson 11 Mutasyon Durumuna Göre Genel Sağ Kalım Eğrisi



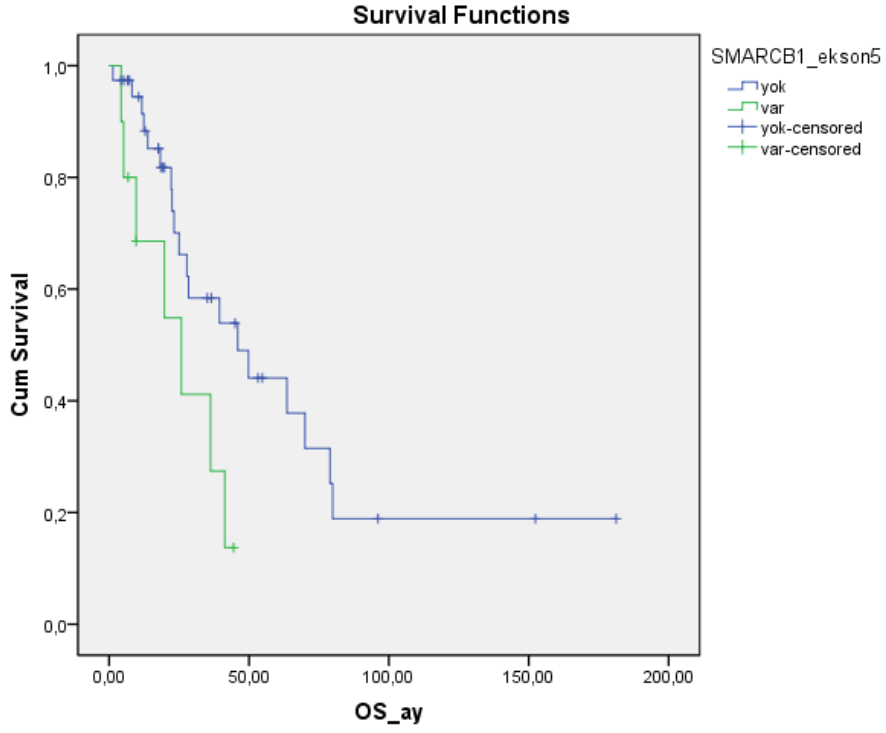
Şekil 7: CDH1 Mutasyon Durumuna Göre Genel Sağ Kalım Eğrisi



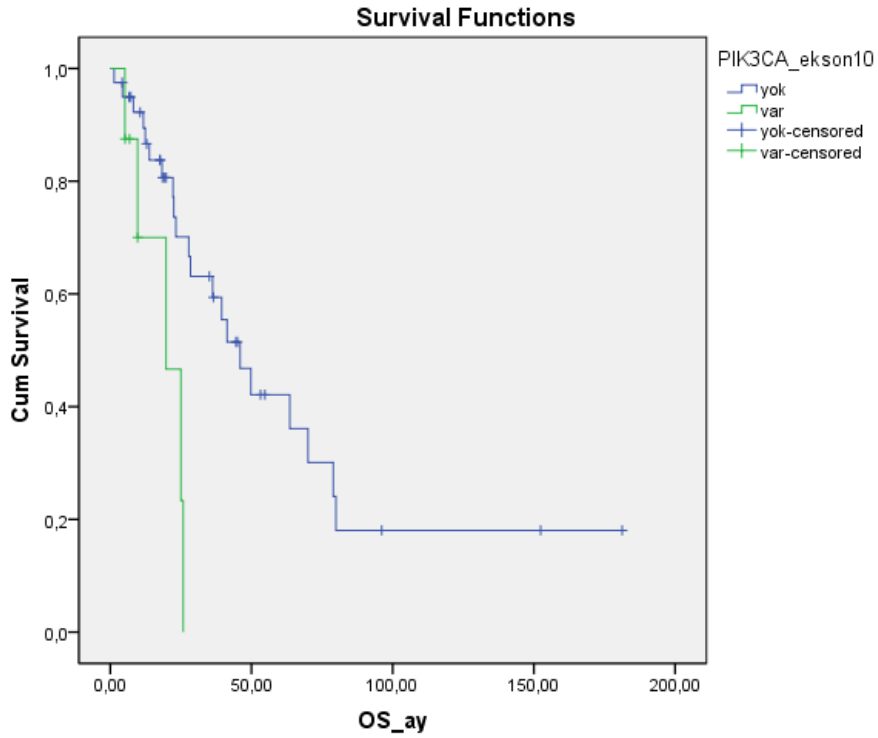
Şekil 8: CSF1R ekson 22 Mutasyon Durumuna Göre Genel Sağ Kalım Eğrisi



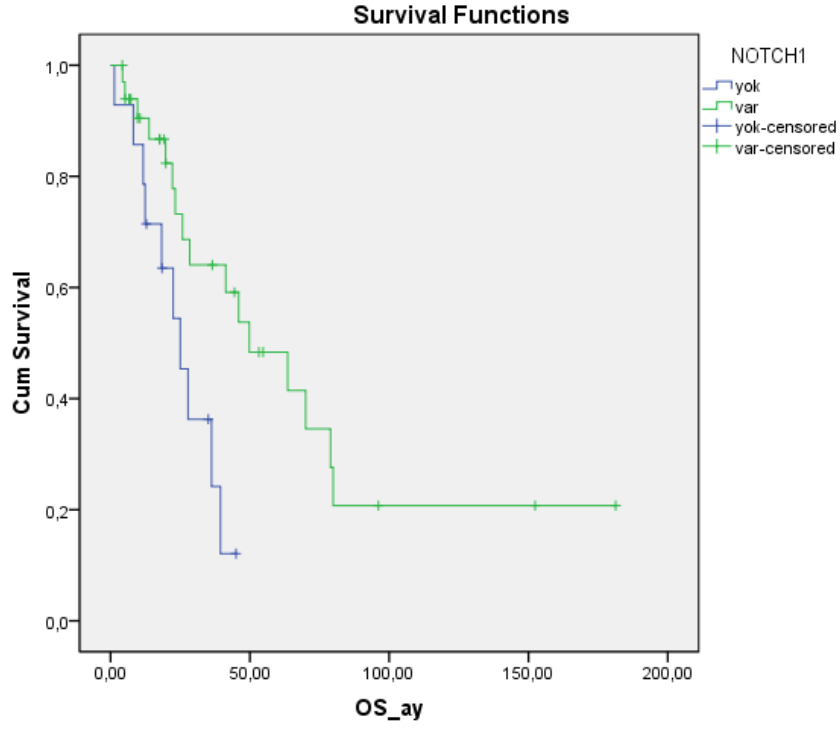
Şekil 9: MSH6 Mutasyon Durumuna Göre Genel Sağ Kalım Eğrisi



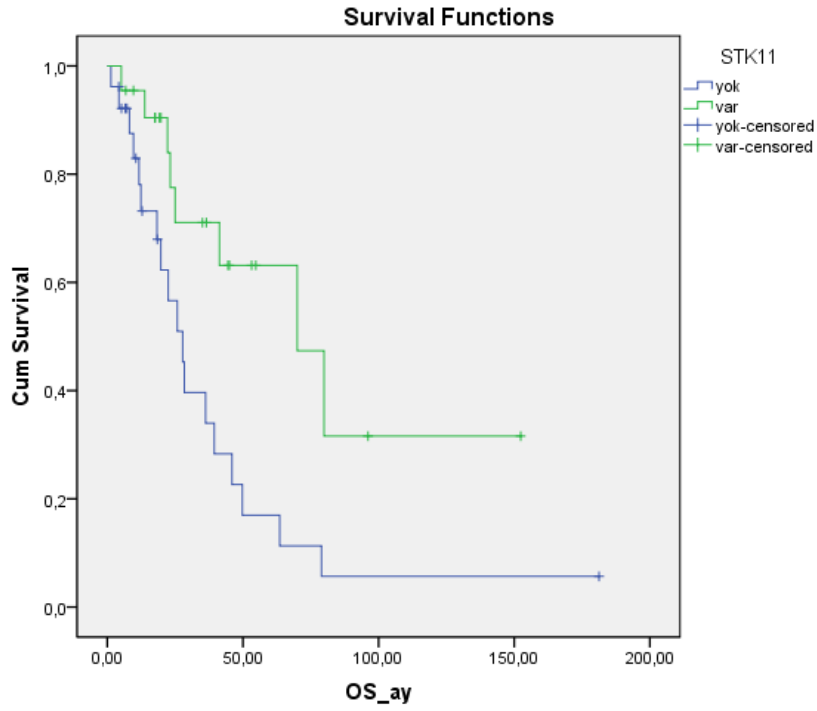
Şekil 10: SMARCB1 ekson 5 Mutasyon Durumuna Göre Genel Sağ Kalım Eğrisi



Şekil 11: PIK3CA ekson 10 Mutasyon Durumuna Göre Genel Sağ Kalım Eğrisi



Şekil 12: NOTCH1 Mutasyon Durumuna Göre Genel Sağ Kalım Eğrisi



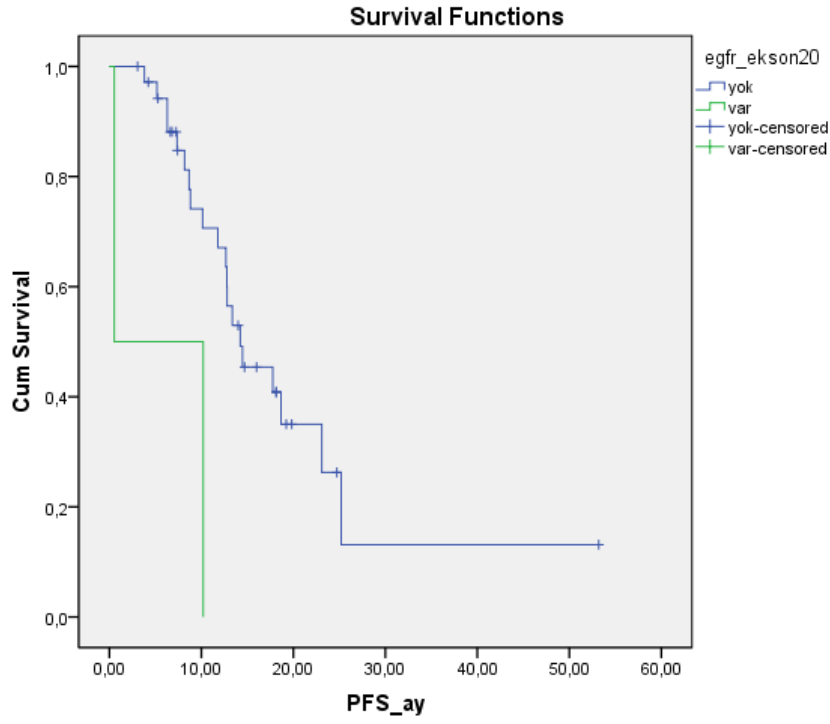
Şekil 13: STK11 Mutasyon Durumuna Göre Genel Sağ Kalım Eğrisi

4.4.2. Progresyonsuz Sağ Kalım

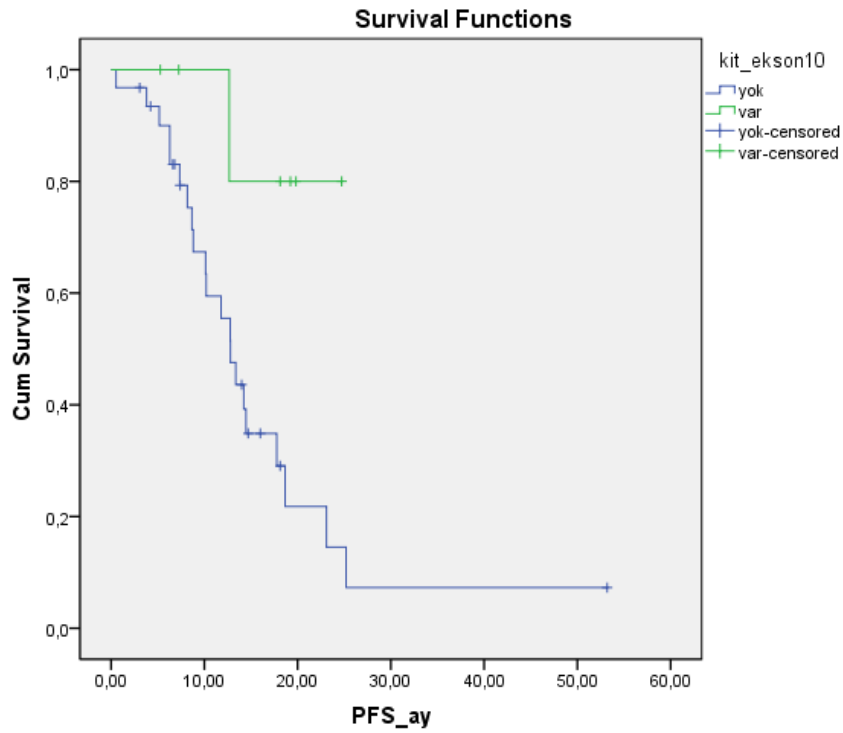
Genlerdeki mutasyon durumuna göre yapılan progresyonsuz sağ kalım analizlerinde; EGFR ekson 20 (19,7 aya karşılık 5,4 ay), PTEN ekson 8 (19,7 aya karşılık 6 ay) ve PIK3CA ekson 10 (20 aya karşılık 7 ay) mutasyonlarının varlığı istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kötü progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişki iken; KİT ekson 10 (15,9 aya karşılık 22,3 ay), JAK3 (11,8 aya karşılık 26,3 ay), FBXW7 (13 aya karşılık 25,7 ay) ve STK11 (11 aya karşılık 27,2 ay) mutasyonlarının varlığı istatistiksel olarak anlamlı derecede daha iyi progresyonsuz kalım süreleri ile ilişki bulundu (Tablo 20). EGFR ekson 20, KİT ekson 10, PTEN ekson 8, JAK3, PIK3CA ekson 10, FBXW7, STK11 gen mutasyon durumlarına göre progresyonsuz sağ kalım eğrileri sırası ile Şekil 14, Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18, Şekil 19 ve Şekil 20’de gösterilmiştir.

Tablo 20: Mutasyon Durumuna Göre Progresyonsuz Sağ Kalım Açısından Anlamlı Fark Saptanan Grupların P Değerleri Tablosu

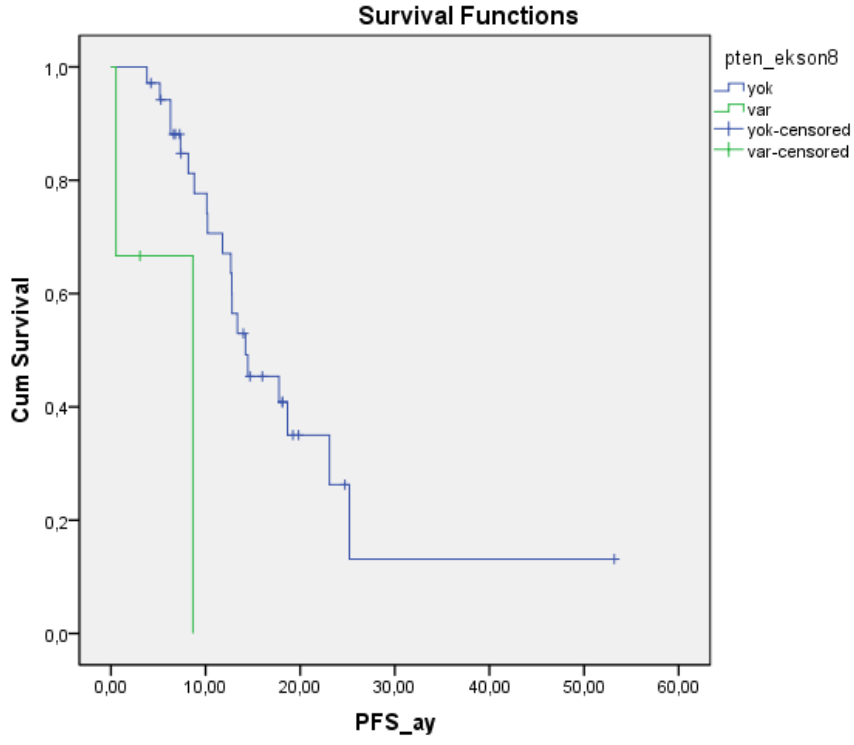
Gen	Mutasyon	Ortalama	S. Sapma	%95 G. Aralığı	P değeri
EGFR ekson 20	Yok	19,693	3,676	12,488-26,898	0,014
	Var	5,367	4,833	0,000-14,840	
KIT ekson 10	Yok	15,887	2,770	10,459-21,316	0,034
	Var	22,320	2,159	18,089-26,551	
PTEN ekson 8	Yok	19,747	3,671	12,553-26,942	0,002
	Var	5,956	3,131	0,000-12,091	
JAK3	Yok	11,815	1,941	8,010-15,621	0,017
	Var	26,340	5,402	15,751-36,929	
PIK3CA ekson 10	Yok	20,044	3,763	12,667-27,420	0,002
	Var	6,993	1,147	4,745-9,242	
FBXW7	Yok	13,030	1,704	9,689-16,370	0,042
	Var	25,710	6,924	12,138-39,282	
STK11	Yok	10,907	1,261	8,436-13,378	0,001
	Var	27,207	6,252	14,954-39,460	



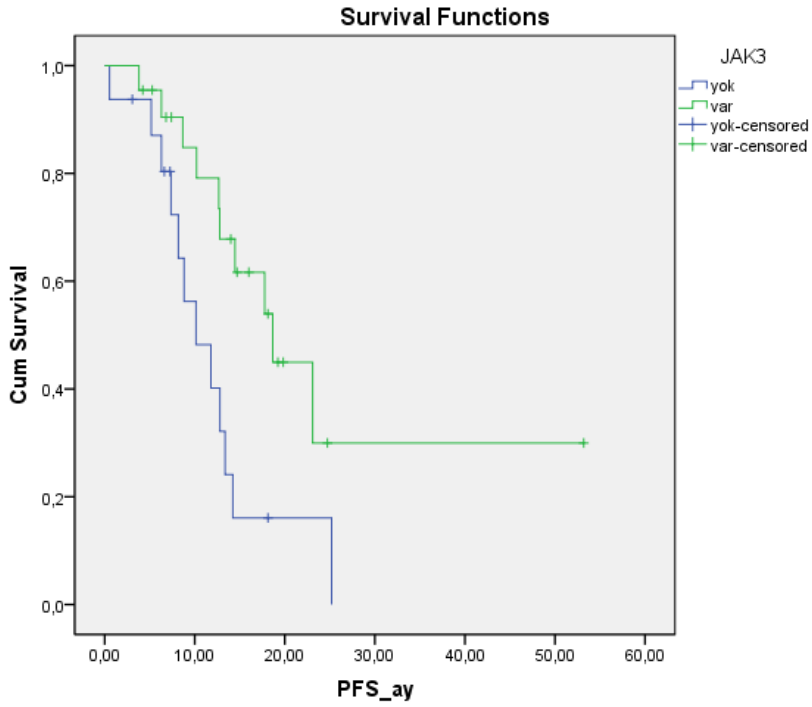
Şekil 14: EGFR ekson 20 Mutasyon Durumuna Göre Progresyonsuz Sağ Kalım Eğrisi



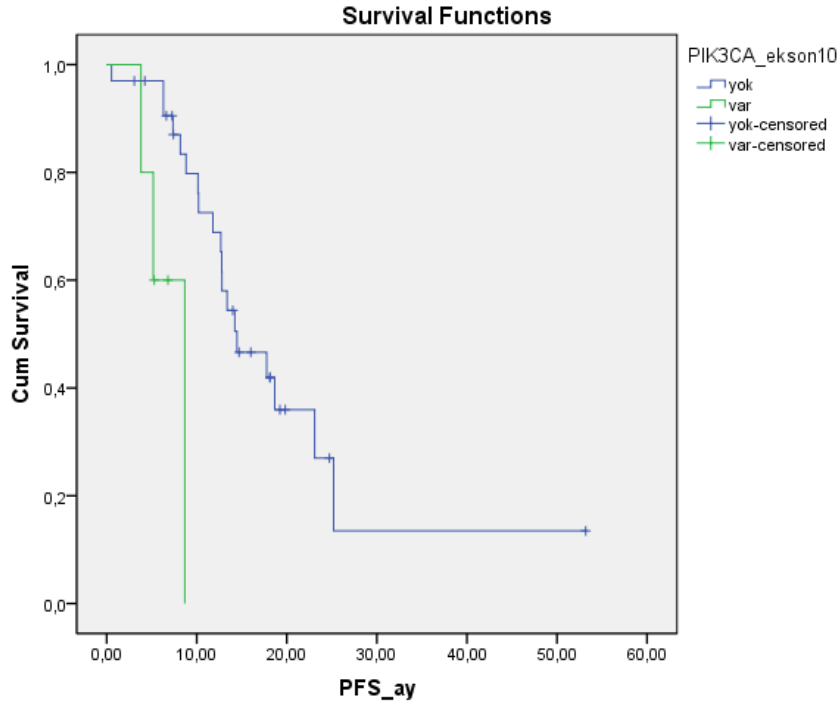
Şekil 15: KIT ekson 10 Mutasyon Durumuna Göre Progresyonsuz Sağ Kalım Eğrisi



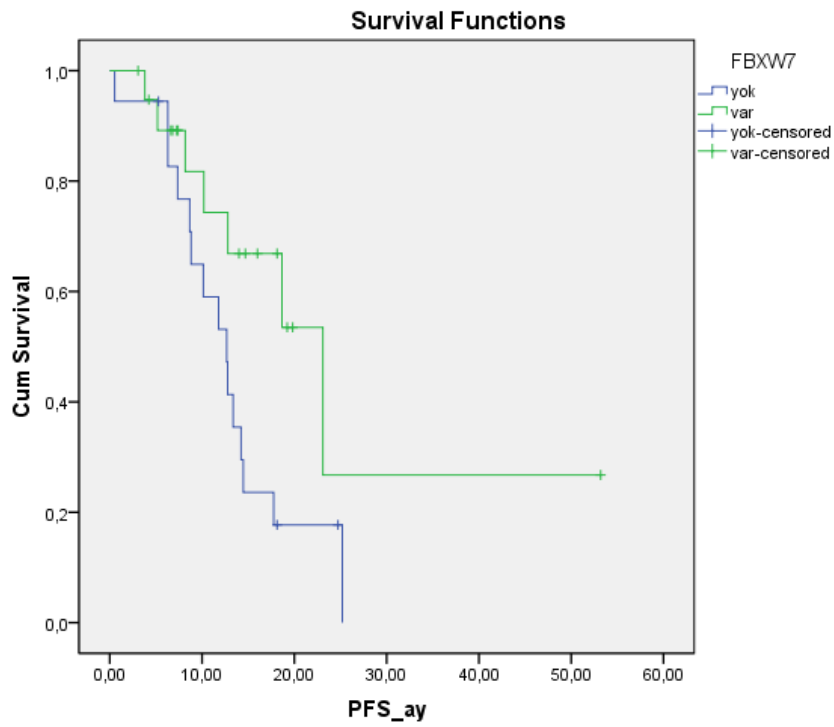
Şekil 16: PTEN ekson 8 Mutasyon Durumuna Göre Progresyonsuz Sağ Kalım Eğrisi



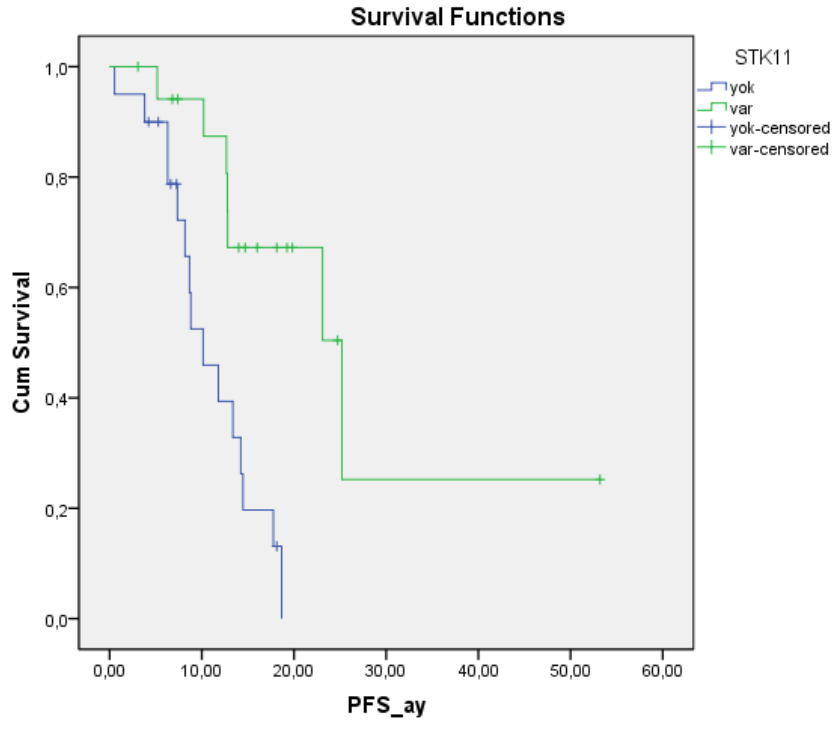
Şekil 17: JAK3 Mutasyon Durumuna Göre Progresyonsuz Sağ Kalım Eğrisi



Şekil 18: PIK3CA ekson 10 Mutasyon Durumuna Göre Progresyonsuz Sağ Kalım Eğrisi



Şekil 19: FBXW7 Mutasyon Durumuna Göre Progresyonsuz Sağ Kalım Eğrisi



Şekil 20: STK11 Mutasyon Durumuna Göre Progresyonsuz Sağ Kalım Eğrisi

5. TARTIŞMA

Kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %20'si tanı anında metastatik hastalığa sahip olmakta, genel olarak ise CRC teşhisi koyulan hastaların %50-60'ında metastaz gelişmektedir ve metastatik hastalığa sahip olanların 5 yıllık sağ kalım oranı %14 düzeyinde kalmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda kanser araştırmalarının önemli bir kısmında mCRC'de yeni tanı ve tedavi yaklaşımlarına odaklanılmış (2,54). Bu yaklaşımların başında, hedeflenebilir gen değişikliklerinin tespit edilmesi ve bu hedeflere yönelik uygun biyolojik ajanların kullanılması gelmektedir. mCRC'de anti-EGFR ajanlarla tedavi için uygun hastaların seçiminde RAS analizi rutin olarak kullanılmaktadır. Ancak bu tedaviler, RAS analizi sonuçlarına göre verilmesine rağmen, rutin klinik uygulamada cetuksimab ve ya panitumumabın etkinliğinin değişken olduğu gözlenmektedir. Bu nedenle, mCRC'lerin yönetiminde, RAS dışında diğer moleküler biyobelirteçlerin de potansiyel rolünün ortaya konması ve bu hastalarda tedavi kararlarına rehberlik etmesi için kullanılması büyük önem arz etmektedir (91). Bu noktada, şu ana kadar yapılan çalışmalar; çoklu gen dizileme imkanı sunan NGS analizlerinin bu hastalarda yarar sağlayabileceğini gösterse de mevcut veriler sınırlıdır. Bu yüzden biz de bu çalışmamızda; mCRC'li hastalarda ctDNA tabanlı NGS analizleriyle çeşitli gen değişikliklerinin sıklıklarını saptamayı, bu sonuçları standart PCR analizlerindeki sonuçlarla karşılaştırarak uyum oranlarını değerlendirmeyi ve saptanan değişikliklerin genel sağ kalım ve progresyonsuz sağ kalıma etkisini araştırmayı planladık.

KRAS ve NRAS, EGFR'nin indüklendiği RASMAPK yolağında görevli olan, RAS ailesi üyesi genlerdir. Tüm kanserlerin %17-25'inde ve CRC'lerin %35-45'inde KRAS geninde mutasyon saptanmaktadır (61). Yapılan bir çalışmada; KRAS ekson 2 mutasyonu olan hastalarda hastaliksız sağ kalım sürelerinin, mutasyon olmayan hastalara göre daha kısa olduğu gözlenmiştir (45). Bizim çalışmamızda ise; KRAS geninde mutasyon sıklığı %54,2 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda; CEA düzeyi normalden yüksek olan hastalarda, normal olan hastalara kıyasla ve primer tümörü sol kolonda olan hastalarda, sağ kolonda ve rektumda olan hastalara kıyasla KRAS mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sık olduğu gözlenmiştir. Ayrıca kemik metastazı olan hastalarda olmayan hastalara kıyasla KRAS ekson 2

mutasyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sık saptanmıştır. Ancak KRAS mutasyon durumuna göre, OS ve PFS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. NRAS geninde ise, tüm kanserlerin %15'inde ve tüm CRC'lerin %5'inde mutasyon saptanmaktadır (62). Çalışmalarda; NRAS mutasyonunun mCRC'li hastalarda kötü prognozla ilişkili olduğu ve NRAS mutant hastaların RAS-WT hastalara göre genel sağ kalım sürelerinin anlamlı derecede daha düşük olduğu belirlenmiştir (64). Bizim çalışmamızda da NRAS mutasyonu nispeten nadir olarak, hastaların %12,5'inde saptanmıştır. Ancak NRAS mutasyon durumuna göre, OS ve PFS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir.

BRAF, serin/treonin kinaz aktivitesi olan bir protein kodlayan ve MAPK sinyal yolunda görevli olan, RAF ailesi üyesi bir gendir (70). mCRC'lerin yaklaşık %8-12'sinde BRAF geninde mutasyon saptanmakta ve bu mutasyonların yaklaşık dörtte üçü V600 aminoasidinde meydana gelmektedir (71). CRYSTAL çalışmasında; mCRC'de BRAF mutasyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (77). Bizim çalışmamızda da BRAF geni literatürle uyumlu olarak hastaların %8,3'ünde mutant saptanmıştır. Ancak BRAF mutasyon durumuna göre, OS ve PFS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir.

PIK3CA geni, hücre bölünmesinde görevli fosfatidilinositol 3-kinaz enziminin bir subuniti olan p110 α proteininin üretiminde görevli olan bir gendir. Bu gen, CRC'lerin yaklaşık %80'inde mutasyona uğramış olarak bulunur (62). Yapılan bazı çalışmalarda, PIK3CA mutasyonunun anti-EGFR tedavisine dirençle ilişkili olabileceğine dair birtakım sonuçlar elde edilse de net bir kanıya varmak için yeterli veri mevcut değildir (84). Bizim çalışmamızda da PIK3CA geni literatürle uyumlu olarak hastaların %77,1'inde mutant saptanmıştır. Lenfovasküler invazyonu olan tümöre sahip hastalarda PIK3CA ve PIK3CA ekson 14 mutasyonlarının anlamlı ölçüde daha sık gözlemlendiği belirlenmiştir. Çalışmamızda ayrıca; PIK3CA ekson 10 mutasyonunun varlığı istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kötü genel sağ kalım ve progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişki bulunmuştur.

Bir tümör baskılayıcı gen olan PTEN, CRC'lerin yaklaşık %5'inde mutant saptanmaktadır (92). 2013 yılında yapılan bir çalışmada; 43'ünde PTEN mutasyonu saptanan 744 CRC'li hasta değerlendirilmiş ve PTEN mutasyonu varlığının sağ taraflı tümör, müsinöz histoloji, yüksek MSI durumu ile önemli ölçüde ilişkili olduğu görülmüştür (93). Bunun dışında başka çalışmalarda da PTEN mutasyonunun CRC'deki prediktif, prognostik ve klinikopatolojik rolü aydınlatılmaya çalışılsa da PTEN mutasyonunun bu rolü halen belirsizdir (94). Bizim çalışmamızda ise; PTEN geninde mutasyon sıklığı %22,9 olarak hesaplanmıştır. Kemik metastazı olan hastalarda olmayan hastalara kıyasla PTEN ekson 8 mutasyonu; akciğer metastazı olan hastalarda olmayan hastalara kıyasla PTEN ekson 2 mutasyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sık saptanmıştır. Çalışmamızda ayrıca; PTEN ekson 8 mutasyonunun varlığı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha kötü progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişki bulunmuştur.

Bir başka tümör baskılayıcı gen olan RB1 geni mutasyonunun ise CRC'deki rolü belirsizdir (95). Çalışmamızda RB1 gen mutasyonu sıklığı %52,1 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca CEA düzeyi normal olan hastalarda yüksek olan hastalara kıyasla RB1 mutasyonunun anlamlı derecede daha sık olduğu görülmüştür. RB1 mutasyon durumuna göre, OS ve PFS açısından ise istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir.

SMARCB1, INI1 proteinini kodlayan bir tümör süpresör genidir. SMARCB1 mutasyonlarının CRC ile ilişkisi net olarak bilinmemekle birlikte, Wang ve arkadaşları 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada; INI1 ekspresyon kaybının CRC'de daha yüksek histolojik derece, daha büyük tümör boyutu ve daha düşük genel sağ kalım süresi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (96). Bizim çalışmamızda; SMARCB1 gen mutasyonu sıklığı %31,3 olarak hesaplanmış, ayrıca SMARCB1 ekson 5 mutasyonu varlığının istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kötü genel sağ kalım süreleri ile ilişki olduğu gösterilmiştir.

Bir onkogen olan FGFR3 geni, bir transmembran tirozin kinaz reseptörünü kodlar (95). Yapılan laboratuvar çalışmalarında; FGFR3c'nin, kolorektal kanser büyümesi ve migrasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (97). Çalışmamızda; FGFR3 gen mutasyonu sıklığı %62,5 olarak hesaplanmıştır. Akciğer metastazı olan hastalarda olmayan hastalara kıyasla, FGFR3 ve FGFR3 ekson 9 mutasyonları istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sık saptanmıştır. Çalışmamızda ayrıca; FGFR3 ekson 14 mutasyonunun varlığı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha kötü genel sağ kalım süreleri ile ilişki bulunmuştur.

FGFR1 mutasyonu tüm CRC'lerin yaklaşık %1,4'inde, FGFR2 mutasyonu %1,5'inde saptanmaktadır (95). Ancak literatürde FGFR1, FGFR2 mutasyonlarının CRC'deki rolüne ilişkin kapsamlı çalışmalar mevcut değildir. Çalışmamızda; FGFR1 gen mutasyonu sıklığı %4,2, FGFR2 gen mutasyonu sıklığı %64,6 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda ayrıca; FGFR1 mutasyonunun varlığı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha kötü genel sağ kalım süreleri ile ilişki bulunmuştur.

2019 yılında Nature'da yayımlanan çok merkezli prospektif bir çalışmada; mCRC'li 227 hastaya ait tümör dokusu örneklerinden NGS tekniği ile mutasyon profili analizi yapılmış ve hastaların %15'inde ATM mutasyonu saptanmıştır. Çalışmada; ATM mutant tümörleri olan hastalar, ATM-WT olanlara kıyasla anlamlı ölçüde daha uzun medyan genel sağ kalım göstermiştir (98). Bizim çalışmamızda da ATM geni literatürle uyumlu olarak hastaların %16,7'sinde mutant saptanmıştır. Ancak ATM mutasyon durumuna göre, OS ve PFS açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

2012'de yayımlanan TCGA (Tumor Cancer Genome Atlas) veri setinde; epidermal büyüme faktörü ailesindeki bir reseptör tirozin kinazı kodlayan ERBB4 genindeki mutasyonların, CRC'de sağ kalım dezavantajı yarattığına dair bulgular elde edilmiştir (99). Çalışmamızda; ERBB4 gen mutasyonu sıklığı %60,4 olarak hesaplanmıştır. ERBB4 ekson 8 mutasyonunun 65 yaş ve üzeri hastalarda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sık olduğu gözlenmiştir. ERBB4 ve ERBB4 ekson 9 mutasyonları, birinci derecede akrabalarında kanser öyküsü olmayanlarda olanlara

kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha sık saptanmıştır. Yine ERBB4 ekson 9 mutasyonunun karaciğer metastazı olmayan hastalarda olan hastalara kıyasla ve akciğer metastazı olan hastalarda olmayan hastalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha sık olduğu gözlenmiştir. Ayrıca ERBB4 mutasyonunun primer tümörü sol kolonda olan hastalarda, sağ kolonda olan hastalara kıyasla anlamlı derecede daha sık görüldüğü belirlenmiştir. Çalışmamızda ayrıca; ERBB4 ekson 8 mutasyonunun varlığı, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha kötü genel sağ kalım süreleri ile ilişki bulunmuştur.

2019 yılında yayımlanan bir çalışmada; FLT3 amplifikasyonunun mCRC'de daha kötü genel sağ kalım süreleriyle ilişkili olduğu ve FLT3 amplifikasyonu olan mCRC'li hastalarda regorafenib ile daha yüksek hastalık kontrol oranı elde edildiği bildirilmiştir (100). Ancak FLT3 mutasyonunun CRC patogenezi ve prognozundaki yerine ilişkin yeterli veri mevcut değildir. Çalışmamızda; FLT3 gen mutasyonu sıklığı %37,5 olarak hesaplanmıştır. Periferik kanda CA 19-9 düzeyi normalden yüksek olan hastalarda normal olan hastalara kıyasla, FLT3 ekson 11 mutasyonu anlamlı derecede daha sık saptanmıştır. Çalışmamızda ayrıca; FLT3 ekson 11 mutasyonunun varlığı, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha kötü genel sağ kalım süreleri ile ilişki bulunmuştur.

Hücre adezyonunda görevli E-cadherin proteinini kodlayan CDH1 geninde mutasyon, CRC'lerde nadir görülmektedir. 2020 yılında yapılan bir çalışmada; CDH1 mutasyonunun, CRC'in kötü prognozlu taşlı yüzük hücreli alt tipinin gelişiminde rol oynadığına dair bulgular elde edilmiştir (101). Çalışmamızda; CDH1 gen mutasyonu sıklığı %10,4 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda ayrıca; hastaların %6,3'ünde CDHI mutasyonu saptanmış ve CDHI mutasyonu, istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kötü genel sağ kalım süreleri ile ilişki bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda; koloni uyarıcı faktör 1 reseptörü (CSF1R) sinyalinin, kolon homeostazında rolü olduğuna dair bulgular elde edilmiştir (102). Ancak CSF1R gen mutasyonunun CRC patogenezi ve prognozundaki yeri bilinmemektedir. Çalışmamızda CSF1R gen mutasyonu sıklığı %66,7 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca,

CSF1R ekson 22 mutasyonunun, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha kötü genel sağ kalım süreleri ile ilişki olduğu belirlenmiştir.

Tamir genlerinde (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) germline mutasyon sonucu meydana gelen Lynch Sendromu'nun kolorektal kansere neden olduğu bilinmektedir (103). Ancak bu genlerdeki somatik mutasyonların CRC'deki rolü bilinmemektedir. Çalışmamızda; hastaların %4,2'sinde MLH1, %16,7'sinde MSH6 geninde mutasyon saptanmış ve MSH6 mutasyonu olanlarda genel sağ kalım sürelerinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha düşük olduğu belirlenmiştir.

CRC'li hastalardan alınan örnekler üzerinde yapılan bir laboratuvar çalışmasında; NOTCH1 reseptörü ve sinyal yolunun CRC'de metastik süreçlerde rol oynadığı ve NOTCH1 sinyalinin hedeflenmesinin CRC'de terapötik değerinin olabileceği gösterilmiştir (104). 2020 yılında yayımlanan bir başka laboratuvar çalışmasında da NOTCH sinyal yolu mutasyonlarının CRC'de anti-tümör immüniteyi artırabileceği ve CRC hastaları için immün kontrol noktası blokaj tedavileri için umut verici biyobelirteçler olabileceği belirtilmiştir (105). Çalışmamızda; hastaların %70,8'inde NOTCH1 geninde mutasyon saptanmış ve NOTCH1 mutasyonunun varlığı istatistiksel olarak anlamlı derecede daha iyi genel sağ kalım süreleri ile ilişki bulunmuştur.

STK11, LKB1 olarak da adlandırılan; hücre polaritesi, hareketliliği, farklılaşması ve metabolizmasında görev alan kritik bir tümör süpresör gendir. Yapılan bir laboratuvar çalışmasında; STK11 mutasyonunun CRC'de invazyon ve metastazda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (106). Çalışmamızda; STK11 mutasyonu sıklığı %45,8 olarak hesaplanmıştır. STK11 ekson 1 mutasyonu, 65 yaş ve üzeri hastalarda anlamlı derecede daha sık saptanmıştır. Çalışmamızda ayrıca; STK11 mutasyonunun, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha iyi genel sağ kalım ve progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişki olduğu gösterilmiştir.

Hücre bölünmesinde görevli bir proteini kodlayan EGFR genindeki mutasyonların CRC'deki rolü bilinmemektedir. Ancak New England Journal of Medicine

dergisinde yayımlanan bir çalışmada; EGFR gen mutasyonunun CRC'de anti-EGFR ajanların tedavi başarısı ile ilgili olmadığı gösterilmiştir (107). Çalışmamızda; EGFR gen mutasyonu sıklığı %77,1 olarak hesaplanmıştır. EGFR ekson 20 mutasyonu, sigara kullanma öyküsü olanlarda olmayanlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha sık saptanmıştır. MSI olanlarda MSS olanlara kıyasla ise; EGFR ekson 21 mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sık olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında, karaciğer metastazı olmayan hastalarda olan hastalara kıyasla EGFR ve EGFR ekson 7 mutasyonları istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha sık saptanmıştır. Çalışmamızda ayrıca; EGFR ekson 20 mutasyonunun, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha kötü progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişki olduğu gösterilmiştir.

Bir proto-onkojen olan KIT genindeki mutasyonların CRC patogenezi ve prognozundaki rolüne ilişkin yeterli veri mevcut değildir. Çalışmamızda; hastaların %37,5'inde KIT geninde mutasyon saptanmış ve KIT ekson 10 mutasyonu olan hastalarda progresyonsuz sağ kalım sürelerinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha uzun olduğu gösterilmiştir.

2017 yılında Cancer Research dergisinde yayımlanan bir laboratuvar çalışmasında; JAK3 mutasyonunun kolorektal neoplazilerin gelişiminde rol oynadığı saptanmıştır (108). Ancak bu sonuçlar, kapsamlı klinik çalışmalarla doğrulanmamıştır ve CRC'de JAK3 mutasyonunun rolü net olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda; JAK3 gen mutasyonu sıklığı %54,2 olarak hesaplanmıştır. Bunun yanı sıra, perinöral invazyonu olan tümöre sahip hastalarda JAK3 mutasyonu anlamlı ölçüde daha sık saptanmıştır. Çalışmamızda ayrıca; JAK3 mutasyonunun, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha iyi progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişki olduğu gösterilmiştir.

İnsan CRC hücre serilerinde yapılan bir prelinik çalışmada; FBXW7 genini inaktive edici mutasyonların, CRC hücrelerinde metastatik süreçlerde rol oynadığı gösterilse de klinik çalışmalarla FBXW7 gen mutasyonunun CRC patogenezi ve prognozundaki rolü net olarak aydınlatılamamıştır (109). Çalışmamızda; hastaların %52,1'inde FBXW7 geninde mutasyon tespit edilmiş ve karaciğer metastazı

olmayan hastalarda olan hastalara kıyasla FBXW7 gen mutasyonu anlamlı ölçüde daha sık saptanmıştır. Akciğer metastazı olan hastalarda ise; olmayan hastalara kıyasla FBXW7 ve FBXW7 ekson 9 mutasyonları istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sık gözlenmiştir. Çalışmamızda ayrıca; FBXW7 mutasyonunun, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha iyi progresyonsuz sağ kalım süreleri ile ilişki olduğu gösterilmiştir.

Anjiogenezde rol oynayan VEGFR-2 (vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-2)'yi kodlayan KDR geninin; kolon kanserinde vaskülarite, metastaz, apoptoz ve proliferasyonun indüklenmesi yoluyla kanser gelişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Ancak KDR mutasyonunun CRC'de prediktif ya da prognostik bir değer taşıdığına dair net bir bulgu elde edilememiştir (110). 2017 yılında yapılan bir çalışmada; CRC'li 112 hastadan alınan doku örneklerinden yapılan NGS analizleri sonucunda; 22 hastada KDR mutasyonu saptanmış, ancak KDR mutasyonu ile klinik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir ilişki bulunamamıştır (111). Bizim çalışmamızda ise; hastaların %79,2'sinde KDR geninde mutasyon tespit edilmiş ve MSS olanlarda MSI olanlara kıyasla KDR mutasyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sık saptanmış. Ayrıca KDR ekson 30 mutasyonu, 65 yaş ve üzeri hastalarda 65 yaş altı hastalara göre anlamlı ölçüde daha sık gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, karaciğer metastazı olan hastalarda olmayan hastalara kıyasla ve periton metastazı olmayan hastalarda olan hastalara kıyasla KDR ekson 11 mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha sık olduğu belirlenmiştir.

Reseptör tirozin kinaz c-MET'i kodlayan bir proto-onkogen olan MET mutasyonunun, CRC'deki prediktif ve prognostik değerine ilişkin yeterli veri mevcut değildir (112). Çalışmamızda; hastaların %18,8'inde MET geninde mutasyon saptanmış ve sigara kullanma öyküsü olanlarda olmayanlara kıyasla MET mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sık olduğu gözlenmiştir.

2018 yılında yayımlanan bir çalışmada; RET G533C aktive edici mutasyonunun onkojenik olduğu ve RET inhibitörü vandetanabin hücre serileri üzerinde bu etkiyi ortadan kaldırdığına ilişkin bildirilmiştir (113). Çalışmamızda; hastaların

%79,2'sinde RET geninde mutasyon saptanmıştır. Ayrıca sigara kullanma öyküsü olmayanlarda olanlara kıyasla RET ekson 11 mutasyonunun, primer tümörü rektumda olan hastalarda sağ ve ya sol kolonda olan hastalara kıyasla RET ekson 10 mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sık olduğu belirlenmiştir.

DNA onarım mekanizmasını ve apoptozu düzenleyen tümör baskılayıcı TP53 geninde mutasyon, CRC'lerde oldukça sık görülse de bu hastalardaki prognoza etkisi net değildir (62). Çalışmamızda; TP53 gen mutasyonu sıklığı %95,8 olarak hesaplanmıştır. Sigara kullanma öyküsü olanlarda olmayanlara kıyasla TP53 ekson 7 mutasyonu; birinci derecede akrabalarında kanser öyküsü olmayanlarda olanlara kıyasla TP53 ve TP53 ekson 5 mutasyonları anlamlı derecede daha sık saptanmıştır. Ayrıca TP53 ekson 5 mutasyonunun, adenokarsinomlu hastalarda müsinöz karsinomlu hastalara kıyasla ve akciğer metastazı olan hastalarda olmayan hastalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sık görüldüğü belirlenmiştir.

HNF1A, 12. kromozom üzerinde bulunan ve POU protein ailesine ait bir transkripsiyon faktörünü kodlayan bir genidir. CRC'de MSI-H tümörlerde HNF1A mutasyonu sık görülse de genel olarak tüm CRC'ler içerisinde HNF1A mutasyonu görülme oranı %2 düzeyindedir. 2021 yılında yayımlanan bir çalışmada; HNF1A aşırı ekspresyonunun CRC'de kötü prognozla ilişkili olduğu, genel sağ kalım ve hastaliksız sağ kalım sürelerini azalttığı, antikanser ilaçlara direnci artırdığı raporlansa da HNF1A mutasyonunun CRC'deki rolü net olarak bilinmemektedir (114). Çalışmamızda; HNF1A gen mutasyonu sıklığı %8,3 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca sigara kullanma öyküsü olanlarda olmayanlara kıyasla HNF1A mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha sık olduğu gösterilmiştir.

DNA metilasyonunda görevli DNMT3A genindeki mutasyonların hematolojik malignitelerle ilişkisi iyi bilinmektedir. Ancak CRC patogenezi ve prognozundaki yeri bilinmemektedir (115). Çalışmamızda; hastaların %20,8'inde DNMT3A geninde mutasyon saptanmış ve müsinöz karsinomlu hastalarda adenokarsinomlu hastalara kıyasla DNMT3A mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha sık olduğu gösterilmiştir.

Bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev gören CDKN2A genindeki metilasyonların, yapılan bazı çalışmalarda CRC’de kötü prognozla ilişki olduğuna dair bulgular elde edilse de CDKN2A mutasyonunun CRC’deki rolü belirsizdir (116). Çalışmamızda; hastaların %18,8’inde CDKN2A geninde mutasyon saptanmış ve lenfovasküler invazyonu olan tümöre sahip hastalarda CDKN2A mutasyonunun anlamlı ölçüde daha sık gözlemlendiği belirlenmiştir.

MAP2K1, hücrel proliferasyon ve farklılaşmada önemli rol oynayan sinyalleme kaskadında yer alan bir protein kinazı kodlar. MAP2K1 genindeki değişikliklerin karsinogeneze katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, ileri evre küçük hücreli dışı akciğer kanserinde kötü prognozla ilişkili olduğu da ortaya konulmuştur. Ancak CRC’de prognoz veya tedavi yanıtı üzerindeki etkileri net olarak karakterize edilememiştir. 2021’de yayımlanan sınırlı bir vaka serisinde; CRC’de MAP2K1 mutasyonunun, anti-EGFR tedavilerine zayıf yanıt ile ilişkili olabileceğine dair bulgular elde edilse de bu sonuçlar kapsamlı klinik çalışmalarla doğrulanmış değildir (117). Çalışmamızda; hastaların %41,7’sinde MAP2K1 geninde mutasyon saptanmış ve perinöral invazyonu olan tümöre sahip hastalarda MAP2K1 mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha sık olduğu görülmüştür. Ayrıca, akciğer metastazı olmayan hastalarda olan hastalara kıyasla MAP2K1 ve MAP2K1 ekson 6 mutasyonlarının istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sık görüldüğü belirlenmiştir.

SMO; Hedgehod sinyal yolağında görevli, bir protein kodlayan gendir. 2015 yılında yayımlanan bir çalışmada; CRC’de daha yüksek SMO ekspresyonu, daha uzun CRC-spesifik sağ kalım süresi ile ilişkili bulunsa da SMO mutasyonunun CRC’deki rolüne ilişkin kapsamlı çalışmalar mevcut değildir (118). Çalışmamızda; SMO gen mutasyonu sıklığı %8,3 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca perinöral invazyonu olan tümöre sahip hastalarda SMO mutasyonu, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha sık saptanmıştır.

2020 yılında yayımlanan bir çalışmada; PDGFRA ekson 18 mutasyonunun, CRC RAS-WT alt grubunda hastalığın ilerlemesinde etkili olan bir faktör olabileceği

bildirilmiş (119). Çalışmamızda; hastaların %33,3'ünde PDGFRA geninde mutasyon saptanmış ve MSİ olan hastalarda MSS olanlara kıyasla PDGFRA mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha sık olduğu görülmüştür. Ancak PDGFRA mutasyon durumuna göre, OS ve PFS açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

2004 yılında yayımlanan bir çalışmada; CRC'li 88 hastanın 10'unda VHL geninde mutasyon saptanmış, ancak VHL mutasyonları ile klinikopatolojik bulgular arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (120). Bizim çalışmamızda ise; hastaların %72,9'unda VHL geninde mutasyon saptanmış ve kemik metastazı olmayan hastalarda olan hastalara kıyasla VHL mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede daha sık olduğu görülmüştür. Ayrıca, karaciğer metastazı olmayan hastalarda olan hastalara kıyasla VHL ekson 2 mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha sık görüldüğü belirlenmiştir.

APC, β -katenin fosforilasyonunu düzenleyerek Wnt/ β -katenin yolunun kapı bekçisi olarak görev yapan tümör baskılayıcı bir genidir. Somatik APC mutasyonları sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %75'inde meydana gelir ve adenom-karsinom yolunun başlamasında çok önemli bir rol oynar. Yapılan çalışmalarda; APC mutasyonu olan CRC'li hastaların APC-WT olanlara göre daha iyi prognoza sahip olduğu, ayrıca anti-EGFR ajanlarla tedavi edildiklerinde APC mutant hastalarda APC-WT hastalara göre daha iyi genel sağ kalım elde edildiği gösterilmiştir. Bu veriler; anti-EGFR ajanlarla tedavi için uygun hasta seçiminde, APC mutasyon değerlendirmesinin RAS/BRAF testine ek olarak tedavi kılavuzlarına dahil edilebileceğini düşündürmektedir (121). 2020 yılında ASCO'nun Journal of Clinical Oncology dergisinde yayımlanan bir çalışmada; MSS mCRC'li 331 hastadan alınan örneklerden NGS analizi yapılarak, APC mutasyon durumuna göre genel sağ kalım süreleri değerlendirilmiştir. Sonuçta; APC mutasyonu olanlarda olmayanlara kıyasla, RAS/BRAF mutasyon durumundan bağımsız olarak, genel sağ kalım süreleri anlamlı derecede daha uzun bulunmuştur (122). Bizim çalışmamızda ise; hastaların %56,3'ünde APC geninde mutasyon saptanmış ve kemik metastazı olan hastalarda olmayan hastalara kıyasla APC ekson 16 mutasyonunun istatistiksel olarak anlamlı

derecede daha sık görüldüğü belirlenmiştir. Ancak APC mutasyon durumuna göre, OS ve PFS açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

CTNNB1 mutasyonu CRC’de oldukça nadirdir ve CRC’deki rolü üzerine yapılan çalışmalar kısıtlıdır. 2005 yılında Hollanda’da yapılan bir kohort çalışmasında, CRC’li hastalarda CTNNB1 mutasyonu yaklaşık %1 oranında saptanmıştır (123). Bizim çalışmamızda ise; hastaların %2,1’inde CTNNB1 geninde mutasyon saptanmış ve CTNNB1 mutasyon durumuna göre, OS ve PFS açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

2020 yılında yayımlanan FIRE-3 çalışmasında mCRC’li 373 hastaya ait örnekler üzerinde yapılan NGS analizlerinden elde edilen sonuçlara göre; SMAD4 mutasyonu, cetuksimaba daha düşük duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir. Çalışmada ayrıca SMAD4 mutasyonu, kötü prognostik bir faktör olarak tanımlanmıştır (124). Çalışmamızda; SMAD4 gen mutasyonu sıklığı %60,4 olarak hesaplanmıştır. Ancak SMAD4 mutasyonu ile klinikopatolojik bulgular arasında anlamlı bir ilişki gözlenmediği gibi; SMAD4 mutasyon durumuna göre, OS ve PFS açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark da gözlenmemiştir.

Yapılan bir çalışmada; AKT1 mutasyonları, anti-EGFR tedavilerine birincil dirençle ilişkilendirilmiştir (125). Bizim çalışmamızda ise; hastaların %60,4’ünde AKT1 geninde mutasyon saptansa da AKT1 mutasyonu ile klinikopatolojik bulgular arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

Bir c-Abl proto-onkogeni olan ABL1, reseptör olmayan bir tirozin kinazı kodlar ve hücre yapışmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını ve apoptozu düzenleyerek karsinogenezde önemli rol oynar. 2020 yılında yayımlanan bir çalışmada; ABL1 ekson 8 mutasyonunun CRC karsinogenezinde önemli rol oynadığı ve CRC tedavisinde potansiyel bir moleküler hedef olabileceği bildirilmiştir (126). Çalışmamızda hastaların %33,3’ünde ABL1 geninde mutasyon saptanmış ancak ABL1 mutasyonu ile klinikopatolojik bulgular arasında anlamlı bir ilişki gözlenmediği gibi; ABL1 mutasyon durumuna göre, OS ve PFS açısından

istatistiksel olarak anlamlı bir fark da gözlenmemiştir.

JAK2 gen mutasyonu CRC'de oldukça nadir görülmektedir. 2018 yılında yayımlanan bir çalışmada; JAK2 V617F mutasyonunun CRC gelişiminden sorumlu olmadığı ve RAS/BRAF-WT hastalarda anti-EGFR tedavisinin etkinliğini etkilemediği; dolayısıyla JAK2'nin CRC hastalarında umut verici bir hedef olmadığı gösterilmiştir (127). Nitekim bizim çalışmamızda da JAK2 gen mutasyonu sıklığı %2,1 olarak hesaplanmış ve JAK2 mutasyonu ile klinikopatolojik bulgular arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

2016 yılında yayımlanan, CRC'li 1519 hastanın değerlendirildiği kapsamlı bir çalışmada; hastaların 26'sında (%1,7) HRAS mutasyonu belirlenmiştir. Ancak HRAS mutasyon durumu ile klinikopatolojik özellikler (cinsiyet, yaş, tümör yerleşimi, tedavi öncesi CEA seviyesi, TNM evrelemesi, tümör farklılaşması, müsin bileşeni, lenfovasküler invazyon), genel sağ kalım ve hastalıksız sağ kalım süreleri açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (128). Bizim çalışmamızda ise; HRAS mutasyonu sıklığı %35,4 olarak görülse de benzer şekilde HRAS mutasyon durumu ile klinikopatolojik özellikler ve sağ kalım süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Periferik kan, primer tümör dokusundan ya da metastatik tümör depositlerinden dökülen, ayrıntılı moleküler tekniklerin uygulanması için fırsat sunan, hücresiz tümör DNA'ları (ctDNA) içermektedir (87). Yapılan bazı çalışmalarda; ctDNA'daki mutasyonların, birincil tümörden gelen mutasyonlara tam olarak karşılık geldiği gösterilmiştir. Bu noktada, ctDNA tabanlı moleküler analizlerin hedeflenebilir moleküler değişikliklerin saptanmasında kullanılabileceği bildirilmiştir (87,88). Nitekim ctDNA tabanlı NGS panellerinden Guardant360CDx'in NSCLC'de; FoundationOne Liquid CDx'in NSCLC, over kanseri, meme kanseri ve prostat kanserinde kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır (89,90). mCRC'li hastalarda ise, ctDNA tabanlı NGS panellerinin kullanımına ilişkin FDA tarafından verilen bir onay olmasa da şu ana kadar yapılan çalışmalardan elde edilen veriler; bu hastalarda da tedavi planlama aşamasında, bu panellerin kullanımının yarar sağlayabileceğini

göstermektedir (91). Biz de bu çalışmamızda; tümör dokusundan alınan örneklerden yapılan kantitatif PCR tabanlı altın standart genomik DNA analizleri ile periferal kandan alınan örneklerden yapılan ctDNA tabanlı NGS analizi sonuçlarını karşılaştırılarak, sonuçlar arasındaki uyumu ortaya koymayı hedefledik.

2019'da yayımlanan, ileri evre CRC'li 152 hastadan alınan kan örneklerinden NGS tekniğiyle ctDNA analizleri yapılarak hedeflenebilir mutasyonların tespit edilmeye çalışıldığı bir çalışmada; aynı hastaların doku örneklerinden klasik yöntemlerle tespit edilen mutasyonların %88.14'ü ctDNA analizlerinde de tespit edilmiştir. Dolayısıyla NGS tekniği ile kapsamlı ctDNA genotiplemesinin, ileri evre kolorektal kanserde tedaviye yol gösterecek hedeflenebilir mutasyonların tespitinde umut vadeden bir yöntem olduğu vurgulanmıştır (129). 2014 yılında yayımlanan bir çalışmada; 106 hastadan alınan doku örnekleri kantitatif PCR tabanlı altın standart yöntemle, kan örnekleri ctDNA tabanlı NGS tekniğiyle analiz edilmiş ve ctDNA analizinde BRAF V600E mutasyonu için %100 özgüllük, %100 duyarlılık, %100 uyum oranı; KRAS mutasyonu için %98 özgüllük, %92 duyarlılık, %96 uyum oranı elde edilmiştir (130). 61 CRC'li hastaya ait örneklerin analiz edildiği benzer bir başka çalışmada ise; uyum oranları TP53 için %70.5, KRAS için %77.0, APC için %62.3, PIK3CA için %80.3, BRAF için %86.9, MYC için %83.6 olarak hesaplanmıştır (131). 2018'de yapılan benzer bir başka çalışmada da KRAS mutasyonu için %67 duyarlılık, %90 özgüllük ve %81 uyum oranı elde edilmiştir (132). 2019'da Cancer Medicine'da yayımlanan, mCRC'li 101 hastanın değerlendirildiği bir çalışmada ise; RAS mutasyon durumu açısından ctDNA ve doku analizleri arasındaki genel uyum oranı %77,2 olarak hesaplanmıştır (133). Yine 2019'da yayımlanan bir başka çalışmada da; 184 mCRC'li kanserli hastadan alınan doku örneklerinden yapılan ARMS tabanlı PCR testleri ile plazma örneklerinden yapılan Firefly isimli amplikon tabanlı NGS testleri karşılaştırılmış ve iki platform arasında genel olarak %80 uyum oranı saptanmıştır. KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA mutasyonlarının tespiti açısından uyum oranı ise %93,3 olarak hesaplanmıştır (134). 2016 yılında yayımlanan bir başka çalışmada ise; KRAS/NRAS/BRAF mutasyonlarının tespiti açısından %86 uyum oranı bildirilmiştir (135). Bizim çalışmamızda ise; periferal kandan alınan örneklerden yapılan ctDNA tabanlı NGS analizlerinin, doku örnekleriyle yapılan

kantitatif PCR tabanlı altın standart yöntemle kıyasla KRAS mutasyonu için %64,7 duyarlılık, %55,6 özgüllük ve %59,1 uyum oranına; NRAS mutasyonu için %100 duyarlılık, %86,7 özgüllük ve %87,1 uyum oranına; BRAF mutasyonu için %50 duyarlılık, %96,4 özgüllük ve %90,6 uyum oranına sahip olduğu görülmüştür. Sonuçta mCRC'li hastalarda, moleküler değişikliklerin saptanmasında ctDNA tabanlı NGS analizlerinin iyi bir seçenek olduğu ortaya koyulmuştur.

Literatürde, yapılan az sayıdaki çalışmada; likit biyopsi ile doku biyopsisi örneklerinin alınma zamanları arasındaki sürenin, örneklerden yapılan moleküler analiz sonuçları arasındaki uyumu etkilediğine dair bulgular elde edilmiştir. 2020 yılında yayımlanan, mCRC'li 54 hastanın katılımıyla yapılan bir çalışmada, periferal kandan alınan örneklerden yapılan ctDNA analizleri ile tümör dokusundan alınan örneklerden yapılan genomik DNA analizleri arasında uyum oranı TP53 geni için % 100; APC geni için % 91,3, KRAS geni için % 78,3, genel olarak ise %93 olarak saptanmıştır. Çalışmada, analizler arasındaki uyum oranını etkileyen faktörler de araştırılmış ve likit biyopsi ile doku biyopsisi örneklerinin alınma zamanları arasındaki süre 6 aydan uzun olanlarda uyum oranı %50 olarak saptanırken, 6 aydan kısa olanlarda %83,1 olarak hesaplanmıştır (136). 101 hastaya ait periferal kandan alınan örneklerden yapılan ctDNA analizleri ile tümör dokusundan alınan örneklerden yapılan genomik DNA analizlerinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada ise; örneklerin alınma zamanları arasındaki süre 6 aydan uzun olanlarda uyum oranları TP53 için %63, EGFR için %69, PIK3CA için %85, ERBB2 için %87 olurken; bu süre 6 aydan kısa olanlarda uyum oranları TP53 için %82,1, EGFR için %71, PIK3CA için %90, ERBB2 için %97 olarak saptanmıştır (137). Bu veriler ışığında bizim çalışmamızda da likit biyopsi ile doku biyopsisi örneklerinin alınma zamanları arasındaki süreye göre uyum oranları da değerlendirilmiştir. Bu süre 6 aydan kısa olanlarda uyum oranları KRAS için %60,9, NRAS için %100, BRAF için %100 olurken; bu süre 6 aydan uzun olanlarda uyum oranları KRAS için %57,1, NRAS için %78,9, BRAF için %85 olarak saptanmıştır. Sonuçta; likit biyopsi ile doku biyopsisi örneklerinin alınma zamanları arasındaki sürenin, örneklerden yapılan moleküler analiz sonuçları arasındaki uyumu etkilediği; bu sürenin kısa olmasının daha sağlıklı sonuçlar alınmasına katkı sağlayacağı ortaya koyulmuştur.

6. SONUÇLAR

Basit bir periferik kan örneğiyle yapılan ctDNA tabanlı NGS analizleri, hem örneğin alınış şekli itibari ile daha az invaziv olması hem tek seferde çoklu gen dizileme imkanı sunarak hastalar için gecikmeleri önlemesi hem de daha nadir görülen ve potansiyel olarak hedeflenebilir genetik değişiklikleri saptayabilmesi avantajları ile mCRC'lerin yönetiminde oldukça yararlı olabilecek bir tekniktir. Çalışmamız, mCRC'li hastalarda, ctDNA tabanlı NGS analizlerinin klinik yararını gösteren literatürdeki az sayıdaki çalışmalardan biridir. Çalışmamızda; ctDNA tabanlı NGS analizlerinin, tümör dokusundan alınan örneklerden yapılan kantitatif PCR tabanlı altın standart genomik DNA analizleri ile yüksek oranda uyumlu sonuçlar verdiği ve bu uyumun, örneklerin alınma zamanları arasındaki süre 6 aydan kısa olduğunda çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında, yapılan kapsamlı analizler sonucunda; mCRC'de birçok moleküler değişikliğin sıklığı ve bu değişikliklerin klinikopatolojik özellikler ve sağ kalım süreleriyle ilişkisi ortaya koyulmuştur. Ancak yine de, CRC'li hastalarda ctDNA tabanlı NGS analizlerinin terapötik plana entegre edilebilmesi ve potansiyel olarak hedeflenebilir moleküler değişikliklerin klinik yararlarının aydınlatılabilmesi için kabul edilebilir kanıtlar sağlayacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Reinert T, Henriksen TV, Christensen E, Sharma S, Salari R, Sethi H, et al. Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients with Stages i to III Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* 2019; 5:1124–31.
2. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic Treatment of Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2008; 134:1296–310.
3. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2020.* Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2020. Available from: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2020.html> (Accessed 9 May 2021)
4. Colomer R, Mondejar R, Romero-Laorden N, Alfranca A, Sanchez-Madrid F, Quintela-Fandino M. When should we order a next generation sequencing test in a patient with cancer? *EClinicalMedicine.* 2020; 25:100487.
5. García-Alfonso P, García-González G, Gallego I, Peligros MI, Ortega L, Torres Pérez-Solero G, et al. Prognostic value of molecular biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer: a real-world study. *Clin Transl Oncol.* 2021; 23:122–9.
6. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal Cancer. *Lancet.* 2019; 394:1467-1480.
7. Siegel RL, Miller KD. *Cancer Statistics, 2021.* 2021; 71:7–33.
8. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study Global Burden. *JAMA Oncol.* 2017; 3:524–48.
9. Doubeni C. Socioeconomic Status And The Risk Of Colorectal Cancer: An Analysis Of Over One-half Million Adults In The NIH-AARP Diet And Health Study. *Cancer.* 2012; 118:3636–3644.
10. Doubeni CA, Major JM, Laiyemo AO, Schootman M, Zuber AG, Hollenbeck AR, et al. Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence. *J Natl Cancer Inst.* 2012; 104:1353–62.

11. Klabunde CN, Cronin KA, Breen N, Waldron WR, Ambs AH, Nadel MR. Trends in colorectal cancer test use among vulnerable populations in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011; 20:1611–21.
12. Henley SJ, Ward EM, Scott S, Ma J, Anderson RN, Firth AU, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer.* 2020; 126:2225–49.
13. Jemal A, Bray F, Ferlay J. Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin.* 1999; 49:1,33-64.
14. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18:1688–94.
15. Lee BY, Sonnenberg A. Time trends of mortality from colorectal cancer in the United States: A birth-cohort analysis. *JAMA Intern Med.* 2013; 173:1148–50.
16. Abualkhair WH, Zhou M, Ahnen D, Yu Q, Wu XC, Karlitz JJ. Trends in Incidence of Early-Onset Colorectal Cancer in the United States among Those Approaching Screening Age. *JAMA Netw Open.* 2020; 3:1–12.
17. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020; 70:145–64.
18. Willauer AN, Liu Y, Pereira AAL, Lam M, Morris JS, Raghav KPS, et al. Clinical and molecular characterization of early-onset colorectal cancer. *Cancer.* 2019; 125:2002–10.
19. Dozois EJ, Boardman LA, Suwanthanma W, Limburg PJ, Cima RR, Bakken JL, et al. Young-onset colorectal cancer in patients with no known genetic predisposition: Can we increase early recognition and improve outcome? *Medicine (Baltimore).* 2008; 87:259–63.
20. American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2020-2022. Atlanta: American Cancer Society; 2020. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/colorectal-cancer-facts-and-figures/colorectal-cancer-facts-and-figures-2020-2022.pdf> (Accessed 9 May 2021)
21. Al B. Benson, Venook AP, Al-Hawary MM, Mwanzi SA, Al EN et. Colon

- Cancer. NCCN Harmon Guidel Sub-Saharan Africa - Colon Cancer. 2018; Version 2.(Colon Cancer):1–5.
22. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene F, Trotti A. AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual, 7th ed. Springer. 2010;133.
 23. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene F, Trotti A. AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual, 7th ed. Springer. 2010;143.
 24. 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; 118:628–38.
 25. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer: College of American Pathologists consensus statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000; 124:979–94.
 26. Lim SB, Yu CS, Jang SJ, Kim TW, Kim JH, Kim JC. Prognostic significance of lymphovascular invasion in sporadic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2010; 53:377–84.
 27. Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol*. 2004; 22:3408–19.
 28. Argilés G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2020; 31:1291–305.
 29. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN clinical practice guidelines in oncology. 2021; Version 3.(Colon Cancer). Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf (Accessed 10 May 2021)
 30. Nagtegaal ID, Arends MJ, Odze RD LA. WHO Classification of Tumours. Digestive System Tumours, 5th ed. In: *Tumours of the colon and rectum*. p. 183.
 31. Hyngstrom JR, Hu C, Xing Y, You YN, Chang GJ. Clinicopathology and

- Outcomes for Mucinous and Signet Ring Colorectal Adenocarcinoma: Analysis from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol.* 2013; 19:2814–21.
32. Shin US, Yu CS, Kim JH, Kim TW, Lim SB, Yoon SN, et al. Mucinous rectal cancer: Effectiveness of preoperative chemoradiotherapy and prognosis. *Ann Surg Oncol.* 2011; 18:2232–9.
 33. Lee DW, Han SW, Lee HJ, Rhee YY, Bae JM, Cho NY, et al. Prognostic implication of mucinous histology in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy. *Br J Cancer.* 2013; 108:1978–84.
 34. Blenkinsopp WK, Stewart-Brown S, Blesovsky L, Kearney G, Fielding LP. Histopathology reporting in large bowel cancer. *J Clin Pathol.* 1981; 34:509–13.
 35. 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; 72:698–702.
 36. Holch JW, Ricard I, Stintzing S, Modest DP, Heinemann V. The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials. *Eur J Cancer.* 2017; 70:87–98.
 37. Wu X, Cokkinides V, Chen VW, Nadel M, Ren Y, Martin J, et al. Associations of subsite-specific colorectal cancer incidence rates and stage of disease at diagnosis with county-level poverty, by race and sex. *Cancer.* 2006; 107:1121–7.
 38. Thörn M, Bergström R, Kressner U, Sparén P, Zack M, Ekblom A. Trends in colorectal cancer incidence in Sweden 1959-93 by gender, localization, time period, and birth cohort. *Cancer Causes Control.* 1998; 9:145–52.
 39. Schub R SF. Rightward shift of colon cancer. A feature of the aging gut. *J Clin Gastroenterol.* 1986; 8:630.
 40. Stewart RJ, Stewart AW, Turnbull PRG, Isbister WH. Sex differences in subsite incidence of large-bowel cancer. *Dis Colon Rectum.* 1983; 26:658–60.
 41. 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; 3:211–9.

42. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016; 27:1386–422.
43. Taniguchi H, Uehara K, Nakayama G, Nakayama H, Aiba T, Hattori N, et al. Tumor Location Is Associated With the Prevalence of Braf And Pik3ca Mutations in Patients with Wild-Type Ras Colorectal Cancer: A Prospective Multi-Center Cohort Study in Japan. *Transl Oncol*. 2020; 13:100786.
44. 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; 35:1453–96.
45. Yoon HH, Tougeron D, Shi Q, Alberts SR, Mahoney MR, Nelson GD, et al. KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild-type stage III colon cancers from an adjuvant chemotherapy trial (N0147 alliance). *Clin Cancer Res*. 2014; 20:3033–43.
46. Cerottini JP, Caplin S, Saraga E, Givel JC, Benhattar J. The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg*. 1998; 175:198–202.
47. Taieb J, Zaanani A, Le Malicot K, Julié C, Blons H, Mineur L, et al. Prognostic effect of BRAF and KRAS mutations in patients with stage III colon cancer treated with leucovorin, fluorouracil, and oxaliplatin with or without cetuximab. *JAMA Oncol*. 2016; 2:643–53.
48. Cercek A, Braghiroli MI, Chou JF, Hechtman JF, Saltz L, Capanu M, et al. Clinical features and outcomes of patients with colorectal cancers harboring NRAS mutations. 2018; 23:4753–60.
49. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, Hegewisch-Becker S, Schmiegel W, Porschen R, et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: Pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol*. 2016; 27:1746–53.
50. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA,

- et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res.* 2005; 65:6063–70.
51. Yokota T, Ura T, Shibata N, Takahari D, Shitara K, Nomura M, et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2011; 104:856–62.
 52. Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: A systematic review. *Br J Cancer.* 2005; 92:434–44.
 53. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, et al. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97:1180–4.
 54. Cutsem E Van, Nordlinger B, Adam R, Ko C. Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *Eur J Cancer.* 2006; 2:2212–21.
 55. Alberts SR, Horvath WL, Sternfeld WC, Goldberg RM, Mahoney MR, Dakhil SR, et al. Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin for Patients With Unresectable Liver-Only Metastases From Colorectal Cancer: A North Central Cancer Treatment Group Phase II Study. *J Clin Oncol.* 2005; 23:9243–9.
 56. Foster JH. Treatment of Metastatic Disease of the Liver: A Skeptic's View. 1984; 4:170–9.
 57. Hur H, Ko YT, Min BS, Kim KS, Choi JS, Sohn SK, et al. Comparative study of resection and radiofrequency ablation in the treatment of solitary colorectal liver metastases. *Am J Surg.* 2009; 197:728–36.
 58. Aloia TA. Solitary Colorectal Liver Metastasis. *Arch Surg.* 2006; 141:460.
 59. Salah S, Watanabe K, Park JS, Addasi A, Park JW, Zabaleta J, et al. Repeated resection of colorectal cancer pulmonary oligometastases: Pooled analysis and prognostic assessment. *Ann Surg Oncol.* 2013; 20:1955–61.
 60. Zarkavelis G, Boussios S, Papadaki A, Katsanos KH, Christodoulou DK, Pentheroudakis G. Current and future biomarkers in colorectal cancer. *Ann Gastroenterol.* 2017; 30:613–21.
 61. Dinu D, Dobre M, Panaitescu E, Bîrl R, Iosif C, Hoara P, et al. Prognostic significance of KRAS gene mutations in colorectal cancer - preliminary study.

- 2014; 7:581–7.
62. Jauhri M, Bhatnagar A, Gupta S, Bp M, Minhas S, Shokeen Y, et al. Prevalence and coexistence of KRAS, APC mutations in Indian colorectal cancer patients: Next-generation sequencing – based cohort study. 2017; 39:1–11.
 63. Pentheroudakis G, Kotoula V, De Roock W, Kouvatses G, Papakostas P, Makatsoris T, et al. Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: Interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes. *BMC Cancer*. 2013; 13:1–12.
 64. Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, Morvillo M, Bergamo F, Zoratto F, et al. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2015; 136:83–90.
 65. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013; 369:1023–34.
 66. Heinemann V, Weikersthal LF Von, Decker T, Kiani A, Vehling-kaiser U, Scholz M, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014; 15:1065–75.
 67. Allegra CJ, Rumble RB, Hamilton SR, Mangu PB, Roach N, Hantel A, et al. Extended RAS gene mutation testing in metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy: American society of clinical oncology provisional clinical opinion update 2015. *J Clin Oncol*. 2016; 34:179–85.
 68. Ciardiello F, Normanno N, Maiello E, Martinelli E, Troiani T, Pisconti S, et al. Clinical activity of FOLFIRI plus cetuximab according to extended gene mutation status by next-generation sequencing: Findings from the CAPRI-GOIM trial. *Ann Oncol*. 2014; 25:1756–61.
 69. Harofeh A. BRAF Mutation in Metastatic Colorectal Cancer. 2009; 98–9.
 70. Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nature Reviews Cancer*. 2014; 14:455–67.

71. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417:949–54.
72. Seymour MT, Brown SR, Middleton G, Maughan T, Richman S, Gwyther S, et al. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): A prospectively stratified randomised trial. *Lancet Oncol*. 2013; 14:749–59.
73. Peeters M, Oliner KS, Parker A, Siena S, Van Cutsem E, Huang J, et al. Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:1902–12.
74. 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; 11:753–62.
75. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: A meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2015; 51:587–94.
76. Rowland A, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS, et al. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;112:1888–94.
77. 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; 29:2011–9.
78. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, Meade AM, Seymour MT, Wilson RH, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: Results of the

- randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet*. 2011;377:2103–14.
79. Sartore-bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016;2045:1–9.
 80. Sartore-Bianchi A, Amatu A, Porcu L, Ghezzi S, Lonardi S, Leone F, et al. HER2 Positivity Predicts Unresponsiveness to EGFR-Targeted Treatment in Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist*. 2019; 24:1395–402.
 81. Raghav K, Loree JM, Morris JS, Overman MJ, Yu R, Meric-Bernstam F, et al. Validation of HER2 Amplification as a Predictive Biomarker for Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *JCO Precis Oncol*. 2019; 3:1–13.
 82. Laurent-Puig P, Balogoun R, Cayre A, Le Malicot K, Tabernero J, Mini E, et al. ERBB2 alterations a new prognostic biomarker in stage III colon cancer from a FOLFOX based adjuvant trial (PETACC8). *Ann Oncol*. 2016; 27:VI151.
 83. Afrăsânie VA, Vasile Marinca M, Alexa-Stratulat T, Gafton B, Păduraru M, Maria Adavidoaiei A, et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer-practical implications for the clinician. *Radiol Oncol*. 2019; 53:265–74.
 84. Li W, Qiu T, Guo L, Ying J, Zhou A. NGS-based oncogenic mutations analysis in advanced colorectal cancer patients improves targeted therapy prediction. *Pathol Res Pract*. 2019; 215:483–9.
 85. Koopman M, Kortman GAM, Mekenkamp L, Ligtenberg MJL, Hoogerbrugge N, Antonini NF, et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009; 100:266–73.
 86. Topalian SL, Stephen Hodi F, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *n engl j med*. 2012; 26:2443–54.
 87. Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov*. 2014; 4:650–61.
 88. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr KK.

- Cancer Genome Landscapes. *Science* (80-). 2013; 339:1546–58.
89. U.S. Food and Drug Administration. FDA Approves First Liquid Biopsy Next-Generation Sequencing Companion Diagnostic Test. 2020. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-liquid-biopsy-next-generation-sequencing-companion-diagnostic-test> (Accessed 24 May 2021)
 90. U.S. Food and Drug Administration. FDA approves liquid biopsy NGS companion diagnostic test for multiple cancers and biomarkers. 2020. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-liquid-biopsy-ngs-companion-diagnostic-test-multiple-cancers-and-biomarkers> (Accessed 24 May 2021)
 91. Innocenti F, Rashid N, Wancen M, Ou F-S, Qu X, Denning S, et al. Next-generation sequencing (NGS) in metastatic colorectal cancer (mCRC): Novel mutated genes and their effect on response to therapy (Alliance). *Ann Oncol*. 2019; 30:v198–9.
 92. Kotelevets L, Scott M, Chastre E, Kotelevets L, Scott M, Chastre E, et al. Targeting PTEN in Colorectal Cancers. *Target Ther Color Cancer Subtypes*. 2018; 55–73.
 93. Day FL, Jorissen RN, Lipton L, Mouradov D, Sakthianandeswaren A, Christie M, et al. PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in Colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:3285–96.
 94. Roock W De, Vriendt V De, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: Implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011; 12:594–603.
 95. Sweeney SM, Cerami E, Baras A, Pugh TJ, Schultz N, Stricker T, et al. AACR project genie: Powering precision medicine through an international consortium. *Cancer Discov*. 2017; 7:818–31.
 96. Wang J, Andrici J, Sioson L, Clarkson A, Sheen A, Farzin M, et al. Loss of INI1 expression in colorectal carcinoma is associated with high tumor grade, poor survival, BRAFV600E mutation, and mismatch repair deficiency. *Hum Pathol*. 2016; 55:83–90.

97. Sonvilla G, Allerstorfer S, Heinzle C, Stättner S, Karner J, Klimpfinger M, et al. Fibroblast growth factor receptor 3-IIIc mediates colorectal cancer growth and migration. *Br J Cancer*. 2010; 102:1145–56.
98. Randon G, Fucà G, Rossini D, Raimondi A, Pagani F, Perrone F, et al. Prognostic impact of ATM mutations in patients with metastatic colorectal cancer. *Nature*. 2019; 9:1–7.
99. Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, Fowler G, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012; 487:330–7.
100. Hasegawa H, Taniguchi H, Kato T, Fujii S, Ebi H, Shiozawa M, et al. Prognostic and predictive impact on FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) amplification in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2019; 30:v240.
101. Aitchison A, Hakkaart C, Whitehead M, Khan S, Siddique S, Ahmed R, et al. CDH1 gene mutation in early-onset, colorectal signet-ring cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2020; 216:152912.
102. Huynh D, Akçora D, Malaterre J, Chan CK, Dai XM, Bertoncetto I, et al. CSF-1 Receptor-Dependent Colon Development, Homeostasis and Inflammatory Stress Response. *PLoS One*. 2013;8.
103. Lawes DA, Pearson T, SenGupta S, Boulos PB. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. *Br J Cancer*. 2005; 93:472–7.
104. Fender AW, Nutter JM, Fitzgerald TL, Bertrand FE, Sigounas G. Notch-1 Promotes Stemness and Epithelial to Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer. *J Cell Biochem*. 2015; 116:2517–27.
105. Wang F, Long J, Li L, Zhao Z bin, Wei F, Yao Y, et al. Mutations in the notch signalling pathway are associated with enhanced anti-tumour immunity in colorectal cancer. *J Cell Mol Med*. 2020; 24:12176–87.
106. Chen Y, Liu Y, Zhou Y, You H. Molecular mechanism of LKB1 in the invasion and metastasis of colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2019; 41:1035–44.
107. Barber TD; Vogelstein B; Kinzler KW; Velculescu VE. Somatic Mutations of EGFR in Colorectal Cancers and Glioblastomas. *N Engl J Med*. 2004;

- 351:2883.
108. Martin Tobi, Xiaoping Zhao, Darshana Jhala, Rebecca Rodriguez, Fadi Antaki, Edi Levi, Paula Sochacki, John Lieb, MaryAnn Rambus, Tapan Ganguly MB and MJL. Abstract 3689: Jak3 mutations in colorectal neoplasia- Preliminary data on a not so silent minority. *Cancer Res.* 2017; 77:3689–3689.
 109. Wang Y, Liu Y, Lu J, Zhang P, Wang Y, Xu Y, et al. Rapamycin inhibits FBXW7 loss-induced epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like characteristics in colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 434:352–6.
 110. Y Takahashi, Y Kitadai, C D Bucana, K R Cleary LME. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.* 1995; 55:3964–8.
 111. Jauhri M, Gupta V, Shokeen Y, Minhas S, Bhalla S, Aggarwal S. KDR Mutation: A High-Frequency Rare Mutation and its Correlation with other Somatic Mutations in Indian Colorectal Cancer Patients. *J Next Gener Seq Appl.* 2017;4.
 112. Zhang M, Li G, Sun X, Ni S, Tan C, Xu M, et al. MET amplification, expression, and exon 14 mutations in colorectal adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2018; 77:108–15.
 113. Mendes Oliveira D, Grillone K, Mignogna C, De Falco V, Laudanna C, Biamonte F, et al. Next-generation sequencing analysis of receptor-type tyrosine kinase genes in surgically resected colon cancer: Identification of gain-of-function mutations in the RET proto-oncogene. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018; 37:1–12.
 114. Fujino S, Miyoshi N, Ito A, Yasui M, Matsuda C, Ohue M, et al. HNF1A regulates colorectal cancer progression and drug resistance as a downstream of POU5F1. *Sci Rep.* 2021; 11:1–15.
 115. Zhang J, Yang C, Wu C, Cui W, Wang L. DNA methyltransferases in cancer: Biology, paradox, aberrations, and targeted therapy. *Cancers (Basel).* 2020; 12:1–22.
 116. Zhao R, Choi BY, Lee MH, Bode AM, Dong Z. Implications of Genetic and

- Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16INK4a) in Cancer. *EBioMedicine*. 2016; 8:30–9.
117. Chuang J, Wang C, Guo Y, Valenzuela V, Wu J, Fakih M. MAP2K1 Mutations in Advanced Colorectal Cancer Predict Poor Response to Anti-EGFR Therapy and to Vertical Targeting of MAPK Pathway. *Clin Colorectal Cancer*. 2021;20:72–8.
 118. Li T, Liao X, Lochhead P, Morikawa T, Yamauchi M, Nishihara R, et al. SMO Expression in Colorectal Cancer: Associations with Clinical, Pathological, and Molecular Features. *Ann Surg Oncol*. 2014; 21:4164–73.
 119. Ben Jemii N, Tounsi-Kettiti H, Yaiche H, Mezghanni N, Jaballah Gabteni A, Fehri E, et al. Dysregulated PDGFR alpha expression and novel somatic mutations in colorectal cancer: association to RAS wild type status and tumor size. *J Transl Med*. 2020; 18:1–20.
 120. Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Hiyama T, Tanimoto K, Chayama K. Mutation of the von Hippel-Lindau (VHL) gene in human colorectal carcinoma: Association with cytoplasmic accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *Cancer Sci*. 2004; 95:149–53.
 121. Wang C, Ouyang C, Cho M, Ji J, Sandhu J, Goel A, et al. Wild-type APC Is Associated with Poor Survival in Metastatic Microsatellite Stable Colorectal Cancer. *Oncologist*. 2021; 26:208–14.
 122. Wang C, Ouyang C, Sandhu JS, Kahn M, Fakih M. Wild-type APC and prognosis in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2020; 38:223–223.
 123. Lüchtenborg M, Weijenberg MP, Wark PA, Saritas M, Roemen GMJM, Muijen GNP Van, et al. Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*. 2005; 5:160.
 124. Arndt Stahler, Sebastian Stintzing, Jobst C von Einem, Christoph B Westphalen, Kathrin Heinrich, Nicole Krämer, Marlies Michl, Dominik P Modest, Ludwig Fischer von Weikersthal, Thomas Decker, Alexander Kiani, Tobias Heintges, Christoph Kahl, Frank Kullman VH. Single-nucleotide variants, tumour mutational burden and microsatellite instability in patients with metastatic colorectal cancer: Next-generation sequencing results of the

- FIRE-3 trial. *Eur J Cancer*. 2020; 137:250-259.
125. Hechtman JF, Sadowska J, Huse JT, Borsu L, Yaeger R, Shia J, et al. AKT1 E17K in colorectal carcinoma is associated with BRAF V600E but not MSI-H status: A clinicopathologic comparison to PIK3CA helical and kinase domain mutants. *Mol Cancer Res*. 2015; 13:1003–8.
 126. Liu Y, Cao J, Zhu YN, Ma Y, Murtaza G, Li Y, et al. C1222C Deletion in Exon 8 of ABL1 Is Involved in Carcinogenesis and Cell Cycle Control of Colorectal Cancer Through IRS1/PI3K/Akt Pathway. *Front Oncol*. 2020; 10:1–12.
 127. Herreros Villanueva M, Garcia-Girón C, Er TK. No evidence for JAK2 V617F mutation in colorectal cancer. *Br J Biomed Sci*. 2010; 67:220–2.
 128. Chang YY, Lin PC, Lin HH, Lin JK, Chen WS, Jiang JK, et al. Mutation spectra of RAS gene family in colorectal cancer. *Am J Surg*. 2016; 212:537-544.
 129. Cao W, Xu Y, Chang L, Gong Y, Li L, Mo X, et al. Genotyping of circulating tumor DNA reveals the clinically actionable mutation landscape of advanced colorectal cancer. *Mol Cancer Ther*. 2019; 18:1158–67.
 130. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med*. 2014; 20:430–5.
 131. Choi IS, Kato S, Fanta PT, Leichman L, Okamura R, Raymond VM, et al. Genomic profiling of blood-derived circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer: Implications for response and resistance to targeted therapeutics. *Mol Cancer Ther*. 2019; 18:1852–62.
 132. Yao J, Zang W, Ge Y, Weygant N, Yu P, Li L, et al. RAS/BRAF Circulating Tumor DNA Mutations as a Predictor of Response to First-Line Chemotherapy in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018; 4248971.
 133. Osumi H, Shinozaki E, Takeda Y, Wakatsuki T, Ichimura T, Saiura A, et al. Clinical relevance of circulating tumor DNA assessed through deep sequencing in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Med*. 2019; 8:408–17.

134. Wang B, Wu S, Huang F, Shen M, Jiang H, Yu Y, et al. Analytical and clinical validation of a novel amplicon-based NGS assay for the evaluation of circulating tumor DNA in metastatic colorectal cancer patients. *Clin Chem Lab Med.* 2019; 57:1501–10.
135. Beránek M, Sirák I, Vošmik M, Petera J, Drastíková M, Palička V. Carrier molecules and extraction of circulating tumor DNA for next generation sequencing in colorectal cancer. *Acta medica.* 2016; 59:54–8.
136. Kang J, Heo S, Kim H, Song S. Liquid biopsy-based tumor profiling for metastatic colorectal cancer patients with ultra-deep targeted sequencing. *PLoS One.* 2020; 15:1–14.
137. Schwaederle M, Husain H, Fanta PT, Piccioni DE, Kesari S, Schwab RB, et al. Use of liquid biopsies in clinical oncology: Pilot experience in 168 patients. *Clin Cancer Res.* 2016; 22:5497–505.