

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GASTROİNTESTİNAL STROMAL
TÜMÖRLERDE KİT MUTASYONLARININ
KLİNİK ÖNEMİ**

GİZEM ÇALIBAŞI

**TEMEL ONKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2011

DEU.HSI.MSC-2008970039

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GASTROİNTESTİNAL STROMAL
TÜMÖRLERDE KİT MUTASYONLARININ
KLİNİK ÖNEMİ**

**TEMEL ONKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

GİZEM ÇALIBAŞI

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. İlhan ÖZTOP

İkinci Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Yasemin BASKIN

DEU.HSI.MSc-2008970039

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2010.KB.SAG.006 sayılı proje ile desteklenmiştir.)

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Yüksek Lisans Programı öğrencisi Gizem ÇALIBAŞI'nın "Gastrointestinal Stromal Tümörlerde Kit Mutasyonlarının Klinik Önemi" isimli yüksek lisans tezi02/08/11..... tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

JÜRİ BAŞKANI



Prof.Dr. İlhan ÖZTOP

JÜRİ ÜYELERİ



Prof.Dr. Uğur YILMAZ
(ÜYE)



Prof.Dr. Nur OLGUN
(ÜYE)



Prof.Dr. Hülya ELLİDOKUZ
(ÜYE)



Prof.Dr. Özgül SAĞOL
(ÜYE)

Prof.Dr. Safiye AKTAŞ
(YEDEK ÜYE)

Prof.Dr. Erdener ÖZER
(YEDEK ÜYE)

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	xii
TEŞEKKÜR.....	xiii
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER.....	1
ABSTRACT AND KEYWORDS.....	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ	5
1.1 Problemin tanımı ve önemi.....	5
1.2 Araştırmanın amacı.....	6
1.3 Araştırmanın hipotezleri.....	6
2.GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 Gastrointestinal stromal tümörlere tarihsel bakış.....	7
2.2 Epidemiyolojisi.....	8
2.3 Semptomlar.....	8
2.4 Ailesel sendromlar ve gastrointestinal stromal tümörler.....	9
2.5 Tanı.....	9
2.6 Morfolojisi.....	10
2.7 Tümörün anatomik yerleşimi.....	11
2.8 Gastrointestinal sistem histolojisi.....	12
2.9 İmmünohistokimya.....	16
2.10 Ayırıcı tanı.....	18
2.11 Prognostik faktörler.....	21
2.12 Gastrointestinal stromal tümörlerin biyolojisi.....	23
2.13 Onkojenik KIT mutasyonları.....	30
2.15 Gastrointestinal stromal tümörlerde sağaltım.....	38
2.16 <i>KIT</i> mutasyonları ve bireyselleştirilmiş tıp.....	43

3.GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1 Araştırmanın tipi	44
3.2 Araştırmanın yeri ve zamanı	44
3.3 Araştırmanın evreni ve örnekleme/çalışma grupları	44
3.4 Çalışma materyali	44
3.5 Araştırmanın değişkenleri	45
3.6 Veri toplama araçları	45
3.6.1 İmmünohistokimyasal çalışma	45
3.6.2 Klinik değerlendirme	47
3.6.3 Moleküler analiz	47
3.6.3.1 Moleküler analiz laboratuvarı genel çalışma kuralları	47
3.6.3.2 Moleküler analiz yöntemleri	49
3.6.3.2.1 Parafin Dokudan DNA İzolasyonu (Kolon Tabanlı)	49
3.6.3.2.2 Ekzon Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Çoğaltılması	54
3.6.3.2.3 PZR Ürünlerinin 1.5%'luk Agaroze Jel Elektrophoreziyle Kalite Kontrolü	62
3.6.3.2.4 PZR Ürünlerinin Saflaştırılması	64
3.6.3.2.5 Saf PZR Ürünleriyle Sekanslama PZR	66
3.6.3.2.6 Etanol Çöktürmesi ile Sekans Ürünlerinin Saflaştırılması	72
3.6.3.2.7 Sekans Analizi	74
3.6.3.2.8 Kromatogramların Değerlendirilmesi	76
3.6.4 Yöntem optimizasyonu	78
3.6.5 Analitik validasyon	84
3.7 Araştırma planı ve takvimi	87
3.8 Verilerin değerlendirilmesi	88
3.8.1 İstatistiksel değerlendirme	88
3.8.2 Biyoinformatik analiz	89
3.9 Araştırmanın sınırlılıkları	92
3.10 Etik kurul	92
4.BULGULAR	93
4.1 Analitik validasyon	93
4.2 Demografik veriler	94

4.3 Mutasyon analizi verileri.....	103
4.3.1 <i>KİT</i> Geni Ekzon 9 Mutasyonları.....	111
4.3.2 <i>KİT</i> Geni Ekzon 11 Mutasyonları.....	113
4.3.3 <i>KİT</i> Geni Ekzon 13 Mutasyonları.....	117
4.3.4 <i>KİT</i> Geni Ekzon 17 Mutasyonları.....	119
4.4 Genotip verileri ile diğer verilerin ilişkilendirilmesi.....	122
4.5 Sağaltım verileri.....	138
4.5.1 Tam Rezeksiyon Olan Olgularda Adjuvan Sağaltım.....	138
4.5.2 Metastatik Olgularda Sağaltım.....	139
4.5.3 Sağaltıma Yanıtlı Mutasyon İlişkisi.....	140
4.6 Sağkalım analizleri.....	146
5.TARTIŞMA.....	164
5.1 Demografik bilgiler.....	164
5.2 Mutasyon analizi.....	171
5.2.1 <i>KİT</i> Geni Genel Mutasyon Oranı.....	171
5.2.2 Ekzon 9 mutasyonları	173
5.2.3 Ekzon 11 mutasyonları.....	175
5.2.4 Ekzon 13 mutasyonları.....	178
5.2.5 Ekzon 17 mutasyonları.....	180
5.3 Genotip verileri ile demografik veriler arasındaki ilişki.....	181
5.4 Sağkalım analizleri.....	184
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	190
7.KAYNAKLAR.....	193
8.EKLER	
8.1 Etik kurul raporu.....	213
8.2 Özgeçmiş ve yayınlar.....	214

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. GIS' in iğsi hücreli tümörlerinin ayırıcı tanısı için immünohistokimyasal şema.....	21
Tablo 2. Fletcher ve ark, tümör çapı ve mitoz sayısına göre hazırladığı risk sınıflaması	23
Tablo 3. <i>KIT</i> geni mutasyonları ile GİST klinikopatolojik özellikleri ve prognoz arasındaki ilişkiler.....	37
Tablo 4. Farklı <i>KIT</i> mutasyonlarının in vitro ortamda imatinibe hassasiyeti ve imatinib sağaltımı yanıtları	42
Tablo 5. <i>KIT</i> geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 bölgelerine özgü tasarlanan primerler.....	58
Tablo 6. Primer sulandırmada kullanılan hacimler ve konsantrasyonlar (Amplifikasyon PZR'si için).....	59
Tablo 7. Ana karışım-A hazırlığı.....	59
Tablo 8 . Ana karışım-B hazırlığı.....	60
Tablo 9. Amplifikasyon PZR şartları.....	61
Tablo 10. Primer sulandırmada kullanılan hacimler ve konsantrasyonlar (Dizileme PZR'si için).....	70
Tablo 11. PZR bant parlaklığının standart ile eşdeğer olduğu durumda sekans PZR işleminde kullanılan bileşen hacimleri.....	70
Tablo 12. PZR bant parlaklığının standartdan az olduğu durumda sekans PZR işleminde kullanılan bileşen hacimleri.....	71
Tablo 13. PZR bant parlaklığının standartdan fazla olduğu durumda sekans PZR işleminde kullanılan bileşen hacimleri.....	71
Tablo 14. Dizileme PZR şartları.....	71
Tablo 15. Durdurma solüsyonunun hazırlanışı.....	73
Tablo 16. Amplifikasyon PZR şartları (CK10_11F ve CK10_11R için).....	81
Tablo 17. <i>KIT</i> geni ekzon 9, 11, 13 ve 17'nin PZR işlemlerinde kullanılan primerleri (Uzman dizileme laboratuvarı).....	86
Tablo 18. <i>KIT</i> ekzon 9, 11, 13 ve 17 mutasyon analizi analitik validasyonu.....	93
Tablo 19. Olguların CD34, SMA, demsin, S-100 değerlendirmesine göre dağılımları.....	99
Tablo 20. Olguların CD117 değerlendirmesine göre dağılımları.....	100

Tablo 21. Olguların Ki-67 ekspresyon düzeyine göre dağılımları.....	102
Tablo 22. Tüm olguların <i>KIT</i> geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 bölgeleri mutasyon analizi sonucu elde edilen genotip bilgileri.....	105
Tablo 23. Cinsiyet ile <i>KIT</i> geni ekzon 11 mutasyonu arasındaki ilişki.....	122
Tablo 24. Cinsiyet ile <i>KIT</i> geni genel mutasyon durumu arasındaki ilişki.....	122
Tablo 25. Primer tümör yerleşimi ile <i>KIT</i> geni genel mutasyon durumu arasındaki ilişki...	124
Tablo 26. CD34 ekspresyonu ile <i>KIT</i> geni genel mutasyon durumu arasındaki ilişki.....	128
Tablo 27. Risk sınıflaması ile <i>KIT</i> geni ekzon 11 bölgesindeki W557-K558 numaralı kodonlardaki mutasyon durumu arasındaki ilişki.....	133
Tablo 28. Mitoz sayısı ile <i>KIT</i> geni genel mutasyon durumu arasındaki ilişki.....	136
Tablo 29. Mitoz sayısı ile <i>KIT</i> geni ekzon 11 mutasyon durumu arasındaki ilişki.....	137
Tablo 30. Mitoz sayısı ile <i>KIT</i> geni ekzon 13 mutasyon durumu arasındaki ilişki.....	137
Tablo 31. İmatinib kullanan olguların genel mutasyon durumuna göre dağılımı.....	140
Tablo 32. Sağaltıma yanıt ile <i>KIT</i> geni ekzon 9 mutasyonu ilişkisi.....	141
Tablo 33. Sağaltıma yanıt ile <i>KIT</i> geni ekzon 11 mutasyonu ilişkisi.....	141
Tablo 34. Sağaltıma yanıt ile <i>KIT</i> geni ekzon 13 mutasyon ilişkisi.....	141
Tablo 35. Sağaltıma yanıt ile <i>KIT</i> geni ekzon 17 mutasyon ilişkisi.....	142
Tablo 36. İmatinib kullanan olguların <i>KIT</i> geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 mutasyon durumuna göre dağılımı.....	142
Tablo 37. <i>KIT</i> geni mutantları ve sağaltım yanıt yüzdeleri.....	142
Tablo 38. İmatinib sağaltımı alan olguların sağaltım yanıtları ve mutasyon durumları.....	144
Tablo 39. Tüm olguların toplam yaşam süresi.....	146
Tablo 40. Tüm kadın hastaların toplam yaşam süresi.....	147
Tablo 41. Tüm erkek hastaların toplam yaşam süresi.....	148
Tablo 42. Metastaz durumuna göre olguların toplam yaşam süresi.....	149
Tablo 43. İğsi hücreli olgularda yaşam süresi.....	150
Tablo 44. Epiteloid ve mikst hücreli olgularda yaşam süresi.....	151
Tablo 45. Yaşı ≤ 60 olan olgularda yaşam süresi.....	152
Tablo 46. Yaşı > 60 olan olgularda yaşam süresi.....	152
Tablo 47. Mitoz sayısı ≤ 5 olan olgularda sağkalım.....	153
Tablo 48. Mitoz sayısı > 5 olan olgularda yaşam süresi.....	154
Tablo 49. Tümör Çapı ≤ 5 cm olan olgularda sağkalım.....	155

Tablo 50. Tümör Çapı >5 olan olgularda yaşam süresi.....	155
Tablo 51. Yabanıl tip olgularda yaşam süresi.....	156
Tablo 52. Mutant tip olgularda yaşam süresi.....	156
Tablo 53. KIT geni ekzon 9 bölgesi açısından yabanıl tip olgularda yaşam süresi.....	157
Tablo 54. <i>KIT</i> geni ekzon 11 bölgesi açısından yabanıl tip olgularda sağkalım.....	158
Tablo 55. <i>KIT</i> geni ekzon 11 bölgesinde mutasyon olan olgularda yaşam süresi.....	159
Tablo 56. <i>KIT</i> geni ekzon 13 bölgesi açısından yabanıl tip olgularda yaşam süresi.....	160
Tablo 57. <i>KIT</i> geni ekzon 13 bölgesinde mutasyon olan olgularda yaşam süresi.....	160
Tablo 58. <i>KIT</i> geni ekzon 17 bölgesi açısından yabanıl tip olan olgularda yaşam süresi.....	161
Tablo 59. Tüm olguların sağkalım süreleri.....	163
Tablo 60. Literatürde tanımlanmamış <i>KIT</i> geni ekzon 9 mutasyonularını içeren olguların klinikopatolojik bilgileri.....	175
Tablo 61. Literatürde tanımlanmamış <i>KIT</i> geni ekzon 11 mutasyonunu içeren olgunun klinikopatolojik bilgileri.....	177
Tablo 62. Literatürde tanımlanmamış <i>KIT</i> geni ekzon 13 mutasyonunu içeren olgunun klinikopatolojik bilgileri.....	179
Tablo 63. Literatürde tanımlanmamış <i>KIT</i> geni ekzon 17 mutasyonunu içeren olgunun klinikopatolojik bilgileri.....	180

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. GİST’ lerde mikroskopik hücre tipleri.....	11
Şekil 2. Gastrointestinal sistem histolojisi.....	14
Şekil 3. GİST’lerde immünhistokimyasal bulgular.....	18
Şekil 4. KİT reseptör tirozin kinaz yapısı.....	25
Şekil 5. Farklı SCF fromlarının oluşumu.....	26
Şekil 6. SCF ve KIT bağlanması.....	26
Şekil 7. KİT proteininde fosforilasyon alanları.....	27
Şekil 8. KİT ile aktiflenen sinyal ileti yolları.....	28
Şekil 9. <i>KIT</i> geni mutasyon bölgeleri.....	30
Şekil 10. PDGFRa mutasyonlarının şematik gösterimi.....	38
Şekil 11. İmatinib mezilatın kimyasal yapısı.....	39
Şekil 12. İmatinib ile KİT kinaz etkileşmesi.....	40
Şekil 13. KİT reseptörü ve imatinib etkileşmesi ile sinyal iletimi.....	40
Şekil 14. DNA izolasyonu iş akış şeması.....	51
Şekil 15. PZR iş akış şeması.....	57
Şekil 16. Agaroz jel elektroforezinde gözlenen PZR ürün bantları.....	64
Şekil 17. Deoksiribonükleotit ve dideoksiribonükleotit yapısı.....	67
Şekil 18. DNA dizilemede kapiller elektroforez işleyisi.....	68
Şekil 19. Floresans işaretli DNA fragmanlarının CE tabanlı ayrırılması.....	75
Şekil 20. GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System Software versiyon 10.2 Modülleri.....	77
Şekil 21. “Sequencing Analysis” modülünde kabul kriterlerinin incelenmesi.....	77
Şekil 22. “Sequence investigator” modülünde kromatogram incelenmesi.....	78
Şekil 23. PZR ortamına konulan kalıp DNA hacim artışının amplikon oluşumuna etkisi.....	79
Şekil 24. PZR ortamına konulan primer konsantrasyon artışının amplikon oluşumuna etkisi.....	80
Şekil 25. <i>KIT</i> geni, ekzon 11 bölgesinin PZR ile çoğaltılması için farklı primer çiftlerinin kullanılmasının amplikon oluşumuna etkisi	82

Şekil 26. <i>KIT</i> geni, ekzon 13 bölgesinin PZR ile çoğaltılması için farklı primer çiftlerinin kullanılmasının ampikon oluşumuna etkisi.....	83
Şekil 27. Kolon tabanlı saflaştırma işleminin ampikon kaybına olan etkisi.....	84
Şekil 28. Uzman DNA dizileme laboratuvarında <i>KIT</i> geni ekzon 9, ekzon 10-11, ekzon 12-13 ve ekzon 17'nin amplifikasyonu için tasarlanan primelerin <i>KIT</i> geni üzerinde gösterimi.....	85
Şekil 29. <i>KIT</i> geni ekzon 9 PZR ürünleri.....	86
Şekil 30. <i>KIT</i> geni ekzon 10-11 PZR ürünleri.....	86
Şekil 31. <i>KIT</i> geni ekzon 12-13 PZR ürünleri.....	86
Şekil 32. <i>KIT</i> geni ekzon 17 PZR ürünleri.....	87
Şekil 33. Amplifikasyon PZR'ı iyi çalışmış örneğin dizileme sonuçları.....	87
Şekil 34. Çalışma planı.....	88
Şekil 35. Kromatogram dosyalarının ChromasLite programı ile açılması.....	90
Şekil 36. NCBI veritabanı açılış sayfası ve “Blast” menüsü.....	90
Şekil 37. NCBI veritabanındaki “Blast” sonucu görüntüsü.....	90
Şekil 38. Ensemble veritabanında referans <i>KIT</i> geni bilgilerinin bulunması.....	91
Şekil 39. Chromatogram Explorer programı ile örneklerin bir arada incelenmesi.....	91
Şekil 40. COSMIC veritabanında bulunan <i>KIT</i> mutasyonları.....	91
Şekil 41. Olguların cinsiyete göre dağılımları.....	94
Şekil 42. Olguların primer tümör yerleşim yerine göre dağılımı.....	95
Şekil 43. Olguların rezeksiyon durumuna göre dağılımları.....	95
Şekil 44. Olguların metastaz durumuna göre dağılımı.....	96
Şekil 45. Metastaz gelişen olguların metastaz yerleşim yerine göre dağılımları.....	96
Şekil 46. Olguların hücre tipine göre dağılımları.....	97
Şekil 47. İğsi hücre tipi	97
Şekil 48. Epiteloid hücre tipi.....	97
Şekil 49. Mikst hücre tipi.....	98
Şekil 50. Olguların tümör boyutuna göre dağılımı.....	98
Şekil 51. Olguların mitoz sayısına göre dağılımı.....	99
Şekil 52. İmmünohistokimyasal olarak CD117 ekspresyonu.....	100
Şekil 53. İmmünohistokimyasal olarak SMA ekspresyonu.....	100
Şekil 54. İmmünohistokimyasal olarak S-100 ekspresyonu.....	101
Şekil 55. İmmünohistokimyasal olarak desmin ekspresyonu.....	101

Şekil 56. İmmünohistokimyasal olarak CD34 ekspresyonu.....	101
Şekil 57. İmmünohistokimyasal olarak Ki-67 ekspresyonu.....	102
Şekil 58. Olguların risk grubuna göre dağılımları.....	102
Şekil 59. Olguların onkolojik evreye göre dağılımları.....	103
Şekil 60. Olguların genel mutasyon durumuna göre dağılımları.....	104
Şekil 61. <i>KIT</i> geni ekzon 9 (449-514.kodonlar) yerleşimli olan mutasyonlar.....	111
Şekil 62. <i>KIT</i> geni ekzon 9 bölgesinde saptanan Y503-F504 ins AY (Het.) mutasyonunun kromatogram görüntüsü.....	111
Şekil 63. Olguların <i>KIT</i> geni ekzon 9 mutasyon durumuna göre dağılımları ve saptanan mutasyon tiplerinin dağılımları.....	112
Şekil 64. <i>KIT</i> geni ekzon 11 (550-592.kodonlar) yerleşimli olan mutasyonlar.....	113
Şekil 65. <i>KIT</i> geni ekzon 11 bölgesinde saptanan V559D (Het.) mutasyonunun kromatogram görüntüsü.....	114
Şekil 66. <i>KIT</i> geni ekzon 11 bölgesinde saptanan W557- K558 del (Het.) mutasyonunun kromatogram görüntüsü.....	115
Şekil 67. Olguların <i>KIT</i> geni ekzon 11 mutasyon durumuna göre dağılımları ve saptanan mutasyon tiplerinin dağılımları.....	116
Şekil 68. <i>KIT</i> geni ekzon 13 (627-664.kodonlar) yerleşimli olan mutasyonlar.....	117
Şekil 69. <i>KIT</i> geni ekzon 13 bölgesinde saptanan K642E (Het.) mutasyonunun kromatogram görüntüsü.....	117
Şekil 70. Olguların <i>KIT</i> geni ekzon 13 mutasyon durumuna göre dağılımları ve saptanan mutasyon tiplerinin dağılımları.....	118
Şekil 71. <i>KIT</i> geni ekzon 17 (788- 828.kodonlar) yerleşimli olan mutasyonlar.....	119
Şekil 72. <i>KIT</i> geni ekzon 17 bölgesinde saptanan A795P (Het.) ve D820A (Het.) mutasyonlarının kromatogram görüntüleri.....	120
Şekil 73. Olguların <i>KIT</i> geni ekzon 17 mutasyon durumuna göre dağılımları ve saptanan mutasyon tiplerinin dağılımları.....	121
Şekil 74. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST sağaltımı alan ve takibi süren hastaların genel sağ kalım analizi.....	146
Şekil 75. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların cinsiyete göre sağ kalım analizi.....	147

Şekil 76. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST sağaltımı alan ve takibi süren hastaların metastaza göre sağ kalım analizi.....	148
Şekil 77. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların onkolojik evresine göre sağ kalım analizi.....	149
Şekil 78. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların hücre tipine göre sağ kalım analizi.....	150
Şekil 79. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların risk grubuna göre sağ kalım analizi.....	151
Şekil 80. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların yaşa göre sağ kalım analizi.....	152
Şekil 81. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların mitoz sayısına göre sağ kalım analizi.....	153
Şekil 82. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların tümör çapına göre sağ kalım analizi.....	154
Şekil 83. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların genel mutasyon durumuna göre sağ kalım analizi.....	156
Şekil 84. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların <i>KIT</i> geni ekzon 9 mutasyon durumuna göre sağ kalım analizi.....	157
Şekil 85. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların <i>KIT</i> geni ekzon 11 mutasyon durumuna göre sağ kalım analizi.....	158

Şekil 86. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların <i>KIT</i> geni ekzon 13 mutasyon durumuna göre sağ kalım analizi.....	159
Şekil 87. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların <i>KIT</i> geni ekzon 17 mutasyon durumuna göre sağ kalım analizi.....	161

KISALTMA LİSTESİ

GİST: gastrointestinal stromal tümör
GİK: Gastrointestinal kanal
GİS: Gastrointestinal sistem
Gİ: Gastrointestinal
ICC: İnterstisiyel Cajal hücreleri
DNA: Deoksiribonükleik asit
ICC: İnterstisiyel Cajal hücreleri
SMA: Smooth muscle actin
Rpm: revolutions (or rotations) per minute
RCF (g): relative centrifugal field
dk: dakika
ml: mililitre
µl: mikrolitre
sn: saniye
°C: Celcius
nm: nanometre (Dalga boyu)
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu
dNTP: Deoksinükleotid
ddNTP: Dideoksinükleotit
H₂O: su
dH₂O: distile su
UV: ultraviyole
Bç: Baz çifti
R: reverse (geri)
F: forward (ileri)
BBA: Büyük büyütme alanı

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımız sırasında bizlere uygun ortamı sağlayıp, Onkoloji Enstitüsü üyelerini bilimsel ve hayati görüşleriyle aydınlatan Onkoloji Enstitüsü Müdürümüz Prof.Dr.Münir KINAY'a

Tez projemin planlanması, yürütülmesi ve yazım aşamalarında bilimsel görüşlerini ve desteğini esirgemeyip, doğruyu öğrenmem için bana değerli vakitlerini ayıran danışmanlarım Prof.Dr.İlhan ÖZTOP ve Doç.Dr.Yasemin BASKIN'a,

Tezimin ilk başından en sonuna kadar içinde olup desteğini vermekten çekinmeyen, her türlü konu, soru ve sorunda sabırla dinleyerek kendisine danışabileceğim hissini veren değerli hocam Prof.Dr.Uğur YILMAZ'a,

Olguların seçimi sırasında kişisel arşivlerini açıp olgu örneklerinin alınmasında gösterdiği yardımlarıyla beraber her türlü sorumu cevaplayıp beni geri çevirmeyen Prof.Dr.Özgül SAĞOL'a , Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU ve Prof.Dr.Erdener ÖZER'e,

Öğrencilerine engin bilimsel bilgi ve tecrübelerini aktarmaktan çekinmediği gibi ilgi ve sevgisininide aktarmaktan çekinmeyen Prof.Dr.Nur OLGUN'a,

Tezimin istatistiksel analizlerinin yapılmasındaki değerli katkıları için Prof.Dr.Hülya ELLİDOKUZ'a,

Olguların klinik bilgilerinin taranması sırasındaki yardımlarından dolayı tüm Tıbbi Onkoloji ABD çalışanlarına,

Çalışmalarımda ve eğitimimde, gösterdikleri yakın ilgi ve destekleri için Temel Onkoloji ABD öğretim üyelerine,

Her türlü sorumda bilgilerini ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen Onkoloji Enstitüsü İdari Personeline,

Aynı laboratuvarı paylaştığımız, desteklerini ve gülümsemelerini göstermekten hiç çekinmeyen tekniker Ayşe ÖZCAN KESKİN'e ve tekniker Nurçin KAYACIK'a,

Varlığı ve desteği için Şeniz İNANÇ'a,

Tüm çalışmalarım ve sıkıntıları boyunca her şekilde yanımda olduklarını hissettiren ve bana inanan Aileme,

Teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

Gizem ÇALIBAŞI

ÖZET

GASTROİNTESTİNAL STROMAL TÜMÖRLERDE KİT MUTASYONLARININ KLİNİK ÖNEMİ

Gizem ÇALIBAŞI

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, 35340 İnciraltı, İzmir

Yazışma adresi: gizemcalibasi@hotmail.com

Biyolojik davranışın oldukça değişken olduğu GİST'lerde, KİT geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 aktivasyon mutasyonları tümörün klinik davranışı ile ilişkilidir. Bu çalışmanın amacı Türk popülasyonunda ilk kez GİST'lerde KİT geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 mutasyonlarının histopatolojik özellikler ve sağaltım yanıtları ile ilişkilendirilmesidir.

Çalışmaya GİST tanısı alan 65 olgu alındı. Tümör dokusu DNA'sı KİT geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 mutasyonları açısından DNA dizileme ile tarandı.

Olguların %8,3'ü KİT geni ekzon 9, %47,5'si ekzon 11, %11,7'si ekzon 13 ve %1,7'si de ekzon 17 mutasyonları içermektedir. Grubumuzda literatürde daha önce yayınlanmamış mutasyonlar saptandı.

KİT geninde herhangi bir mutasyonu olanlar, mutasyonu olmayanlara göre 3,18 kat daha fazla malign potansiyel riski taşımaktadır (OR: 3,18). KİT geni ekzon 11 bölgesinde yer alan W557-K558 kodonlarında mutasyonu olan olgular, bu bölgede mutasyon taşımayan olgulara göre 11 kat daha fazla malign potansiyel riski taşımaktadır (OR: 11).

Tüm olgularda ve metastatik olup imatinib kullanan olgularda KİT geni genel mutasyon varlığı ile ekzon 11 mutasyonu varlığı sağkalımı yabancı tip olmaya oranla belirgin düzeyde uzatmıştır.

KİT geninde herhangi bir mutasyonu olanlar, mutasyonu olmayanlara göre 2 kat daha fazla imatinib sağaltımından yararlanmıştır (OR:2). Sonuçlarımız, KİT mutasyonu olan GİST'lerin, imatinib ile adjuvan tedavisi için iyi bir aday olabileceğini düşündürmektedir.

GİST'lerde tümör davranışı ile ilişkili moleküler özelliklerin tanımlanması tanı ve sağaltımda yeni biyobelirteçlerin bulunmasında önemlidir. Tümör davranışlarıyla ilişkili yeni

moleküler biyobelirteçler, hastalığın daha iyi yönetimini sağlayacak ve yeni sağaltım hedefleri yaratacaktır.

Anahtar kelimeler: Gastro İntestinal Stromal Tümörler, KİT gen mutasyonları, DNA Dizileme, Farmakogenomik, Biyobelirteç

ABSTRACT

CLINICAL IMPORTANCE OF *KIT* MUTATIONS IN GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS

Gizem ÇALIBAŞI

Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, 35340 İnciraltı İzmir/TURKEY

Correspondence address: gizemcalibasi@hotmail.com

The *KIT* gene exon 9, 11, 13 and 17 activation mutations are associated with clinical behaviour in GIST's where biological behaviour is highly variable. The purpose of this study is to associate the *KIT* gene exon 9, 11, 13 and 17 mutations in the GIST's with histopathologic features and treatment results for the first time in the Turkish population.

Sixty-five patients, who were diagnosed as GIST's, were included to the study. The tumour DNA was sequenced for *KIT* gene exons 9, 11, 13 and 17 mutations.

KIT mutations occurred 8.3% in exon 9, 47.5% in exon 11, 11.7% in exon 13 and 1,7% in exon 17. In our group, certain mutations were identified which were not published in the literature previously.

Multivariate analyses indicated an association of malignant potential with a presence of *KIT* mutations (OR:3.18). It was shown that wild-type patients had 11-fold greater risk of malignant potential when compared to those with mutations in codon W557- K558 (OR:11).

All cases and metastatic GIST's who were under imatinib treatment with exon 11 and *KIT* mutations have shown significant prolonged survival than wild type cases.

Mutant patients benefited more than two fold from imatinib treatment when compared with wild-type (OR:2). Our results suggest that localized GIST's with *KIT* mutations may be good candidates for adjuvant therapy with imatinib.

Redefining the molecular features associated with tumour behaviour is important for finding new diagnostic or predictive biomarkers in GIST's.

New molecular biomarkers associated with tumour behaviour will provide better management of disease and create new therapeutic targets.

Keywords: Gastrointestinal stromal tumors, KIT gene mutations, DNA sequencing, Pharmacogenomic, Biomarker.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 PROBLEMİN TANIMI VE ÖNEMİ

Gastrointestinal stromal tümörler (GİST), bağırsak duvarından orjinlenen ve gastrointestinal sistem peristaltizmini regüle ettiği için gastrointestinal sistemin otonom hareketleri için önemli olan intestinal pace maker hücrelerin (interstisyel Kaja hücreleri-ICC veya hız üretici hücreler) veya bu hücrelerin prekürsörlerinin neoplastik transformasyonu sonucu oluşturğu düşünölen mezenkimal tümörlerdir (1).

GİST'ler nadir görölen bir tümör grubunu oluşturmaktadır. Tüm gastrointestinal sistem tümörlerinin yaklaşık %1'ini, gastrointestinal kanaldan türevlenen tüm sarkomların ise %5'i kadarını oluşturmaktadırlar (2).

Gastrointestinal sistemin her yerinden türevlenebildikleri gibi, en yaygın olarak mide (%50-60), ince barsak (%20-30) ve kalın bağırsaktan (%10) türevlenirler. Histolojik olarak GİST'ler hücre tipi olarak iğsi tip (%70), epiteloit tip (%20) ve nadir görölen mikst tip olmak üzere 3 tiptir. (3).

GİST'lerin klinik davranışını tahmin etmek zor olduğu için tümör çapı (cm olarak maksimum tümör çapı) ve mitotik oran (mitoz sayısı/50 BBA) aracılığıyla saptanan risk sınıflaması (çok düşük risk, düşük risk, intermedier risk ve yüksek risk) kullanılmaktadır.

1990'lardan sonra yumuşak doku sarkomlarının içinde yer alan bu tümör grubu için GİST terminolojisi kullanılmaya önerildi. 1998'de Hirota ve arkadaşlarının GİST'lerdeki, CD117 (KİT) immünopozitifliğini (%98-100 oranında) ve KİT proteinlerinde ligand bağımsız aktivasyona sebep olan KİT mutasyonlarını barındırdığını göstermesiyle kuvvetlenmiştir.

CD117 veya KİT bir tür internal tyrosine kinaz altbirimi içeren transmembran reseptör proteini olan *KİT* gen ürünüdür. KİT proteini ligandı olan, kök hücre faktörü (stem cell factor-SCF) için reseptör görevi yapar. KİT ve SCF arasındaki reseptör-ligand ilişkisi hücre içindeki tyrosine kinaz altbirimlerini aktifler. Bu aktivasyon ile hücre içindeki proteinlerin fosforilasyonunu takiben, hücre sinyal yolları aktive olur.

Aktifleşen sinyal yolları GİST'lerin orjini olan ICC'lerde dahil olmak üzere birçok hücre tipinde proliferasyon, apoptosis, adezyon ve diferansiasyon düzenlenmesinde etkindir. GİST'lerin patogeneğinde yer alan *KİT* geni mutasyonları, bu sinyal yollarının liganddan bağımsız olarak aktivasyonuna ve KİT'in otofosforilasyonuna sebep olur. Böylece kontrol

edilemeyen kontrolsüz hücre büyümesi ve aktiflenemeyen apoptoz yolları GİST'lerin oluşumuna neden olur.

GİST'ler için primer tedavi tümörün cerrahi operasyon ile çıkarılmasıdır. Tümör radyoterapiye dirençli olduğu için ve etraf organların radyoterapiden olumsuz etkilenmesinden dolayı radyoterapi nadir olarak kullanılmaktadır. Konvansiyonel kemoterapide kullanılan ilaçlar, metastazlı hastalarda işe yaramamaktadır.

Son yıllarda özellikle kanser sağaltımına yoğunlaşan araştırmalar, kanser patogenezinde önemli rolü olan tirozin kinazların inhibisyonuna odaklanmıştır. Bu bağlamda GİST patogenezindeki *KIT* geni en önemli hedeflerden biri; tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib ve sunitinib de kanser yönetiminde en belirgin hedefe yönelik sağaltımlardan biri olmuştur (120, 218, 219).

Imatinib'in (Glivec, STI-571) keşfi ile metastatik GİST hastalarının prognozları dramatik olarak değişim göstermiştir. Imatinib mesylate GİST'lerde eksprese edilen ve GİST oluşumunda görev alan KİT reseptör tyrosine kinazın spesifik bir inhibitörüdür.

Yıllar içinde yapılan çalışmalarla tirozin kinaz inhibitörlerine verilecek cevabın, hedefi olan KİT proteinindeki mutasyonlarla değiştiği gözlenince KİT geni mutasyonlarının GİST'lerin klinik kontrolünde de belirleyici olacağını gösterildi.

1.2 ARAŞTIRMANIN AMACI

Bu çalışmada 2006- 2010 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gastrointestinal stromal tümör tanısı almış ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Polikliniği'nde GİST sağaltımı alan olgulardan, olgunun patoloji arşiv materyali yeterli olan 65 GİST olgusu çalışmaya alınmıştır. Olguların KİT geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 bölgelerine ait genotip bilgileri ile histopatolojik özellikleri ve klinik bilgileri arasındaki olası ilişkiler tanımlanmaya çalışılmıştır.

1.3 ARAŞTIRMANIN HİPOTEZLERİ

Bu araştırma ile “KİT geni ekzon mutasyonları, GİST'lerde histopatolojik özellikler, risk faktörleri ve klinik prognostik faktörler ile ilişkili olarak tümör davranışını ve imatinib sağaltımı yanıtlarını etkiler” hipotezi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 GASTROİNTESTİNAL STROMAL TÜMÖRLERE TARİHSEL BAKIŞ

1941 yılında Golden ve Stout bağırsak duvarında beliren bir grup mezenkimal tümör tanımladılar. Bu tümör grubunun yumuşak doku hücrelerinden türevlendiğine dair olan yanlış varsayımları ile, bunları morfolojik görünümlerine dayanarak leiomyoblastoma, leiomyom, leiomyosarkom olarak tanımladılar (1). Bu nedenle primer olarak iğsi hücrelerden oluşan bu tümörler iyi huylu ise leiomyom, habis huylu ise leiomyosarkom, primer epitelioid hücrelerden oluşmuş ise de leiomyoblastom olarak sınıflandırılmışlardır (2).

1960 sonları 70 başlarında elektron mikroskopisi ve 1980 sonlarında immünohistokimya bu tümörlerde düz kas diferensiyasyonu olduğunu ortaya çıkardı (3, 4). Bunun üzerine 1983’de Mazur and Clark daha önce leiomyom olarak tanımlanan midenin Gastro İ ntestinal (GI) mezenkimal tümörlerinde immünohistokimyasal Schwann hücre özelliklerinin (S-100 negatif) ve düz kas hücrelerinin ultrastrüktürel karakteristiklerine sahip olmadığını gösterildiğinden bu mezenkimal lezyonlar için “stromal tümör” terimini önermişlerdir (5).

1984 yılında Herrera ve ark. bir grup vakada immünohistokimyasal olarak S-100 proteini pozitifliğini, otonomik nöronal diferansiyasyonu gösterip pleksosarkom terimi kullanmışlardır. Ancak daha sonra bu vakalar gastrointestinal otonomik sinir tümörü (GANT) olarak yeniden isimlendirilmiştir (1).

Miettinen tarafından GİST’lerin %60-70’inin progenitor hücre belirteci olan CD34 açısından immünopozitifliğinin gösterilmesinden sonra, bu antikor tanıda yaygın olarak kullanılmaya başlandı. Ancak düz kas ve nöral hücre tümörleri de dahil olmak üzere geniş bir iğsi hücreli tümör grubunda CD34 pozitifliğinin bulunması Gİ mezenkimal tümörlerinin tanısında ki kullanımını tartışmalı hale getirmiştir (6).

1990’ların sonunda bu lezyonlarla ilgili iki yaklaşım türemiştir. Bunların birincisi tüm Gİ mezenkimal tümörlerinin GİST olarak sınıflandırılması, ikincisi yaklaşım ise klinikopatolojik özelliklere göre ayrı bir mezenkimal tümör alt sınıfı tanımlamaktır. İkinci yaklaşımın kabul görmüş olmasına rağmen, hassas ve spesifik bir tanı belirtecinin yokluğu sorun teşkil etmiştir (1, 6). Bu durum 1998’de Hirota ve arkadaşlarının birçok GİST’in, KİT proteinlerinde ligand bağımsız aktivasyona sebep olan *KIT* mutasyonlarını barındırdığını göstermesiyle değişmiştir. Buna ek olarak aynı araştırmacılar GİST’lerde sıklıkla karşılaşılan CD117 (KİT) immünopozitifliğini göstermiştir (7).

Bu keşifler GİST patogenezinin anlaşılmasını değiştirmiştir. Daha sonra bir grup GİST'in platelet kökenli büyüme faktör reseptörü α (platelet derived growth factor- α , PDGFRA) mutasyonlarını barındırdığı gösterildi. 2001 Nisan GİST Çalıştayı'nda ; GİST terimi genellikle CD117⁺ , *KIT* veya PDGFRA mutasyonu kökenli, içsi, epiteloid veya nadir olarak pleomorfik bir morfolojiye sahip Gİ mezenkimal tümörleri olarak Miettinen tarafından önerilmiş ve National Institutes of Health tarafından da kabul görmüştür (6).

2.2 EPİDEMİYOLOJİSİ

GİST'ler, öncül olarak gastrointestinal sistem ve abdomende yerleşen ve kendine özgü histolojik özellikleri olan mezenkimal tümörlerdir. GİST'ler primer gastrointestinal sistem tümörlerinin %1'inden azını oluşturmaktadır (7). Gastrointestinal kanalda yer alan tüm sarkomlarının ise yaklaşık %5'ini oluşturmaktadırlar (2)

GİST'in insidansı 6.8- 14.5 / milyon kişi arasında değişim göstermektedir. Yıllık GİST insidansları Tran ve ark.larının yaptığı bir çalışmaya göre USA'da 6.8/1milyon (8); Tryggvason ve ark.larının yaptığı bir çalışmaya göre İzlanda'da 11/1milyon (9); Goettsch ve ark.larının yaptığı bir çalışmaya göre Hollanda'da 12.7/1milyon (10); Tzen CY ve ark.larının yaptığı bir çalışmaya göre Tayvan'da 13.74/1milyon (11) ; Mucciarini ve ark.larının yaptığı bir çalışmaya göre İtalya'da 14.2/1milyon (12); Nillsson ve ark.larının yaptığı bir çalışmaya göre ise İsveç'te 14.5/1milyon (13) olarak bulunmuştur .

GİST'in bazı olgu gruplarında cinsiyetler arasındaki görülme sıklığının farklı olduğu (erkeklerde daha sık), ancak bazı çalışmalarda cinsiyetler arasında eşit dağılım gösterdiği bildirilmiştir (14). GİST, 40 yaş öncesinde ve çocuklarda nadir olarak görülmektedir. 50 yaş üzerinde görülme sıklığı artmaktadır (15).

GİST'ler tüm gastrointestinal sistem boyunca görülmektedir. En sık midede görülmektedir (%60-70). bunu sırasıyla ince barsak (%20-30), kalın barsak ve rektum (%5) ve özofagusta (>%5) izlemektedir. Omentum ve mezenterde ise primer GİST'ler nadir görülmektedir (16).

2.3 SEMPTOMLAR

GİST'lerde en genel semptom kanamadır. Geniş GİST'ler türevlendikleri organdan dışarı doğru çıkıntı yapıp bağırsak kıvrımları ve abdominal organlar arasında büyüme gösterirler. Bu nedenle GI sistem lümenini aşındırıp kanamaya sebep olurlar. Kanama ile

ilişkili olarak akut abdominal ağrı ve ciddi anemiler gelişir. GİST hastalarında abdominal ağrı, palpasyon ile varlığı hissedilebilen kitle, erken doyma, şişkinlik, disfaji, ateş ve anemiyle ilişkili yorgunluk tabloları gözlenir (17).

Yerleşim yerlerine göre semptom veren GİST'lerden, özofagus yerleşimli olanlarda disfaji (15); mide ve ince bağırsak yerleşimlilerde gastrointestinal kanama; kolorektal yerleşimlilerde ise alt gastrointestinal sistem kanaması, ağrı ve obstrüksiyon gibi semptomlar gözlenebilir (18).

Boyutu 2 cm veya daha küçük GİST'ler genellikle semptom göstermezler. Başka bir hastalık yüzünden yapılan araştırma veya izlem sırasında yapılan fiziksel değerlendirme, laparoskopi, cerrahi operasyon, radyogradik test veya endoskopi sırasında fark edilebilir (19).

2.4 AİLESEL SENDROMLAR VE GASTROİNTESTİNAL STROMAL TÜMÖRLER

Kalıtımsal olarak GİST olasılığı içeren ailesel sendromlarla ilişkili spesifik genetik belirteçler ailesel GİST varlığı için kanıt görevi görmektedir. Bu gibi kalıtımsal durumları içeren hastalarda çoğunlukla germline kökenli *KİT* geni ekzon 11 mutasyonu görülmektedir. Sporadik GİST'lerden farklı olarak bu hastalara ebeveynlerinden aktarılan mutant geni vücudun bütün hücrelerinde bulunur.

Ailesel GİST'ler nadir görülmektedir. Ancak literatürde germline *KİT* mutasyonları içeren ve multiple GİST'ler ile ilişkili olan sendromlar bildirilmiştir (20, 21, 22, 23).

Carney triadı olarak da bilinen ve genç kadınlarda midede GİST, akciğerde kondromlar ve sürrenal dışı paraganglionomalar ile seyreden bir hastalık tanımlanmıştır (24, 25).

Sporadik GİS'ler gibi ailesel GİST'lerde tarih boyunca leiomyosarkoma, nörofibromatozis, sarkomatozis, leiomyoma olarak sınıflandırılmış ancak KİT rolünün keşfedilmesi ile doğru tanının yolu açılmıştır. Ailesel GİST'lerde de başlangıç semptomları anemi, yorulma, abdominal şişkinlik, yutkunmada güçlülüdür. Cilt çeşitli yollarla parmak, diz, dirsek, yüz ve kasıklarda yoğun olarak görülen hiperpigmentasyondan etkilenebilir (2).

2.5 TANI

Tanıda görüntüleme yöntemlerinden endoskopik ultrasonografi (EUS), bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) oldukça önemlidir (26). Tümör varlığı ile ilişkili görülen abdominal kitle veya obstrüktif semptomlar sergileyen hastalar için BT veya MRI ilk basamaktır. EUS ise GİST tanısında destekleyici bir işlemdir (27).

GİST tanısında kaydedilen en büyük aşama, interstisiyel Cajal hücrelerinin (ICC) bir transmembran tirozin kinaz reseptörü olan KİT eksprese ettiğinin bulunması ve bu tümörlerin oluşumunda “*KİT*” veya “platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA)” genindeki mutasyonların rolünün ortaya konulmuş olmasıdır (28).

Tümörde, KİT tirozin kinaz reseptörünün, onkojenik aktivasyon sonucu artan ekspresyonunun gösterilmesi, bugün için GİST tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. KİT proteini, dokuda CD-117 antijeni kullanılarak, immunhistokimyasal yöntemle gösterilebilmektedir (29). GİST’lerin %70-80’inde CD34 ekprese edilir (30). Anormal doku veya kitleden EUS eşliğinde biyopsi ile alınan doku örneklerinde muskularis propria kokenli iğsi-epiteloid hücreler görülmesi ile immunhistokimyasal olarak KİT ve CD34 pozitif boyanması histopatolojik tanıyı kesinleştirir (31). Düz kas aktini pozitifliği, desmin ve S100 ile negatif reaksiyon da tanıyı destekler (32). Ayırıcı tanıda malign melanom, seminoma, sarkomlar ve bazı lösemilerde CD117 ekspresyonunun olması önemlidir (29).

2.6 MORFOLOJİSİ

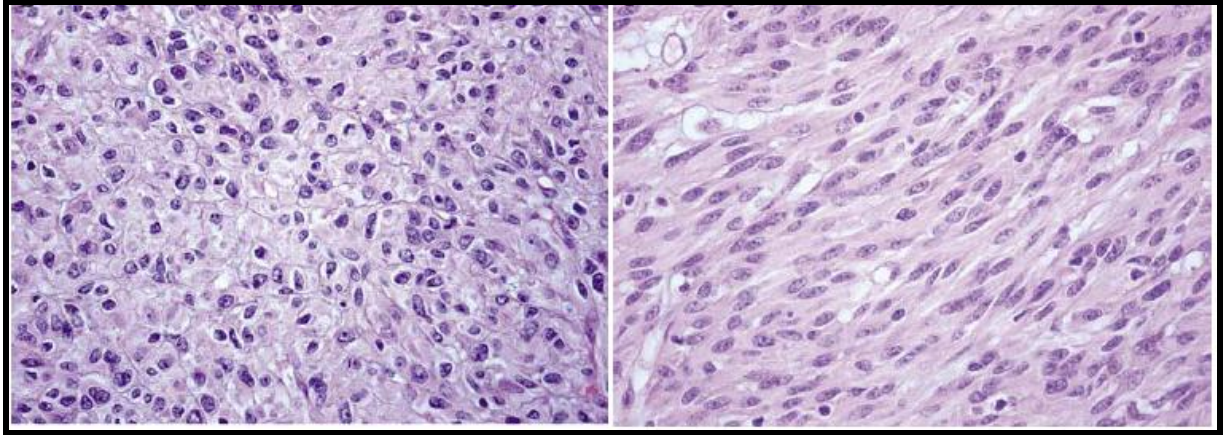
2.6.1 Makroskopik bulgular

GİST’lerin boyutu 0.3 cm ile 20cm’den daha fazla boyutlara kadar ulaşabilir. Lezyonların çoğu kas duvarından orijin alır. GİST’ler, soliter ya da multipl olabilirler. Submukozal, intramuskuler veya subserozal yerleşim gösterirler. Küçük tümörler intramuskuler; büyük tümörler ise tüm barsak duvarını tutacak şekilde ektramural gelişim gösterebilir. En sık karşılaşılan kitle görüntüsü, mide veya barsak duvarına yapışık, abdominal kaviteye doğru büyümedir. Her iki yöne doğru büyüme ile bu kum saati görüntüsü çok nadiren oluşan bir görüntüdür. Makroskopik görünümleri değişken olmakla birlikte sıklıkla iyi sınırlı ve kapsülsüzdürler. Bazen yalancı kapsül görülebilir. Tümör kıvamı, küçük ve benign tümörlerde sert iken, malign tümörlerde jelatinimsi-yumuşak olup, büyük tümörlerde de gözenekli-hemorajiktir (15, 17, 18) .

2.6.2 Mikroskopik bulgular

GİST’ler hücre tipi açısından iğsi ve epiteloid hücrelerden oluşan heterojen tümörlerdir. GİST’lerde iğsi hücreli tip %70, epiteloid hücreli tip %30 ve mikst tip %10 oranında görülmektedir (6, 15). İğsi hücreli GİST’ler, kısa girdaplar oluşturan uniform eozinofilik iğsi

hücrelerden oluşur. Neoplastik hücrelerin, açık eozinofilik sitoplazmaları vardır ve hücre sınırları belirgin değildir. Genellikle fibriler görünümündedir. Çekirdek uniform görünümde ve veziküler kromatinlidir. Epiteloid hücrelerin egemen olduğu GİST'lerde tümör hücreleri daha boldur. Epiteloid hücreli GİST'ler, eozinofilik veya berrak sitoplazmalı yuvarlak hücre topluluklarından oluşur. Epiteloid hücreler, iğsi hücreler gibi uniform, yuvarlak-oval çekirdekli ve veziküle kromatinlidir. Mikst hücreli tipte iğsi ve epiteloid alanlar arasında ani bir geçiş görülebilir (6) (Şekil 1).



Şekil 1. GİST'lerde mikroskopik hücre tipleri. Epiteloid hücreli GİST olgusu (solda), iğsi hücreli GİST olgusu (sağda) (33)

2.7 TÜMÖRÜN ANATOMİK YERLEŞİMİ

GİST'ler özofagustan rektuma kadar gastrointestinal kanalın (GİK) herhangi bir yerinden türevlenebilirler. Mezenter, omentum ve retroperiton başta olmak üzere GİK dışı lokalizasyonlarda da GİST tanımlanmıştır(16, 34, 35, 36). Bunların yanında safra kesesi, mesane, karaciğer ve pankreas gibi nadir lokalizasyonlar da bildirilmiştir (37, 38, 39). Olguların yaklaşık % 50-60'ı mide, % 20- 30'u ince barsak, %10'u kalın barsak, %5'i özofagus, %5'i batin boşluğunun herhangi bir yerinden kaynaklanmaktadır (15, 40, 41, 42, 43).

Tümörün anatomik yerleşiminin prognoza etkileri tartışılmaktadır. Bazı çalışmalarda anatomik yerleşimin prognostik önemi olduğu, bazılarında ise olmadığı yönünde söylemler bulunmaktadır (6). Örneğin tüm GİST'lerin büyük bir çoğunluğunu oluşturan mide GİST'leri aynı boyuta ve mitotik aktiviteye sahip bağırsak GİST'lerine göre daha iyi bir sağkalım çizerler (44, 45). Malign özellikli ince ve kalın bağırsak tümörlerinin oranı %50- 64 arasında

değişmektedir (40, 41, 46). Bu nedenlerle GİST'ler yerleşim yerlerine göre gruplandırılmaktadır. Mide Yerleşimli GİST'ler submukoza, intramuskuler, subserozal kitleler şeklinde görülebilirler (45).

Miettinen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre bu tümörlerin; %50 iğsi hücreli, %40 epiteloid, %10 mikst hücrelidir (17).

Nekroz ve mitoz oranı biyolojik davranışı tahmin etmek açısından kullanılabilen parametrelerdendir. Çapı 2 cm'den küçük, mitotik aktivite göstermeyen ve nekroz içermeyen mide tümörleri iyi huylu olarak değerlendirilmektedir (47).

İnce, kalın barsak ve rektum yerleşimli GİST'ler genellikle kanama ya da intestinal tıkanıklıkla ortaya çıkmaktadır (48). Kolon ve rektum orijinli GİST'ler, mide ve ince barsak orijinli olanlar ile karşılaştırıldığında daha az karşılaşılan tümörlerdir ve tüm kolorektal kanserlerin %0.1'ini oluşturmaktadır (49).

Makroskobik ve mikroskobik açıdan mide yerleşimli GİST'lerle benzerlik gösterirler. Ancak daha küçük çaplı, daha yüksek mitotik aktiviteye sahip, daha atipik olmakla birlikte belirgin bir şekilde pleomorfik ve nekrotik özellik sergilemektedir (50). Özofagektomi ve otopsilerde rastlantısal olarak saptanan ve çoğu 2 cm'den küçük olan özofagus yerleşimli GİST'lerin büyük çoğunluğu muskularis eksternada, nadir olarak submukozada görülmektedir. Özofagustaki GİST'lerde sitolojik atipi ve mitotik aktiviteye nadiren rastlanır. Kötü huylu GİST nadirdir (15).

2.8 GASTROİNTESTİNAL SİSTEMİN HİSTOLOJİSİ

GI kanal epitel adı verilen özel hücrelerle sarılı olan kas yapısında bir tüp şeklindedir. GI kanal genel olarak mukoza, submukoza, muskularis propria ve seroza olmak üzere 4 katmandan oluşmaktadır (Şekil 2).

2.8.1 Mukoza

Sindirim sisteminin en iç katmanı olan mukoza özelleşmiş epitelyum hücrelerine sahiptir. Fonksiyona bağlı olarak bu epitel basit (tek tabaka) veya tabakalaşmış (çoklu katmanlar) şeklinde olabilir. Bu epitel hücreleri lamina propria adı verilen bağ dokusundan oluşmuş bir katman ile desteklenir. Lamina propria kan damarları, sinirler, mukozayı destekleyen lenfoid doku ve bezlerden oluşur. Ek olarak mukoza tabakasının son birleşeni ince kas liflerinden oluşan muskularis mukozadır. GI sistemin yapısı bölgeden bölgeye

değişmektedir. Bu değişim daha çok mukozada yer almaktadır. Epitel hücreleri bu varyasyonun temel kaynağıdır ve her bölgede yürüttükleri göreve göre özelleşmektedirler.

2.8.2 Submukoza:

Submukoza muskularis propriayı çevreleyen yağ ve bağ dokusu katmanıdır. Kan damarları, lenfatik damarlar ve submukozal plexusunu (Meissner plexusu) içerir. Submukozanın asıl görevi kan damarları, lenfatikler ve sinirleri desteklemektir. Bunun dışında sinir ve gangliyon hücrelerini içeren özelleşmiş Meissner sinir plexusu mukoza ve submukozayı destekler.

2.8.3 Muskularis propria (Tunica muscularis, muskularis eksterna)

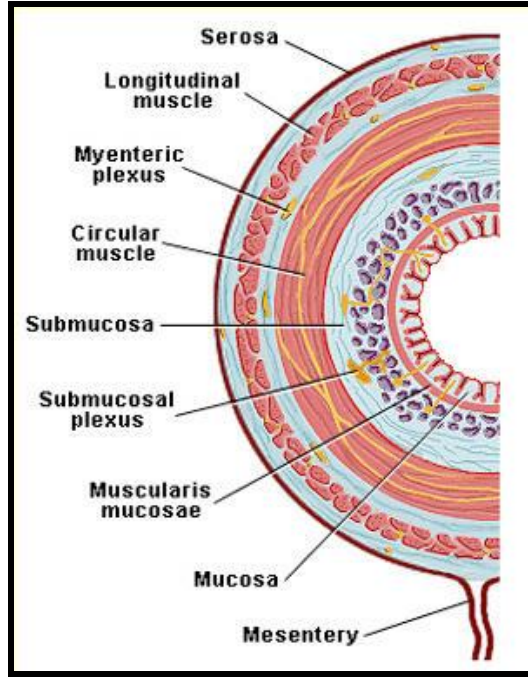
Sindirim sisteminin kalın doku katmanıdır. İçte sirküler, dışta longitudinal kas liflerine sahip iki tabakadan oluşur. Bu iç ve dış kas tabakaları arasında sinir ve gangliyon hücrelerinden oluşan myenterik plexus (Auerbach's plexus) yer almaktadır. Myenterik plexus tarafından ayrılan bu kas tabakalarının kasılması ile nöral inervasyonlar (sinirle donatma) dolayısıyla mekanik parçalanma ve lümendeki peristaltik hareketlenmeler kontrol edilir.

2.8.4 Seroza

Gı kanalın en dış tabakası olan seroza yağ ve epitel hücrelerinin oluşturduğu diğer bir katman olan mezotelyumdan oluşur.

2.8.5 Submukozal ve myenterik plexuslar

Yerleştikleri yere göre isimlendirilen bu plexuslar benzer özelliklere sahiptir. Submukozal yerleşimli olan Meissner plexusu, myenterik olan Auerbach plexusu olarak isimlendirilir. Myenterik plexus, submukozal plexusa göre daha büyüktür. Muskularis proprianın sirküler ve longitudinal kas tabakaları arasında yer alan myenterik plexus vagal parasempatik sinirden orijin alır ve bağırsak motilitesini, enzim salınımını kontrol eder. Submukozal plexus ise myenterik plexusun motor nöronları ile bağlantıya sahiptir ve bağırsak lümenine sekresyonda rol oynar. Bu iki plexus arasındaki sayısız bağlantılar ile bağırsak düz kasları, kan damarları, villus ve çeşitli bezler innerve edilir (51, 52).



Şekil 2. Gastrointestinal sistem histolojisi (53)

2.8.6 İnterstisyel Cajal Hücreleri (Interstitial cell of Cajal, ICC)

1893’de İspanyol sinir bilimci Santiago Ramon y Cajal gastrointestinal kanal sinirleri ile düz kas hücreleri arasındaki ICC hücrelerini tanımlayan ilk bilim insanıdır. Bu hücelere dokular arasındaki yerleşimlerinden dolayı “dokular arasında bulunan” anlamına gelen interstisyel (interstitial) denilmiştir (54). GI kanaldaki miyenterik ve submukozal pleksuslar arasındaki ilişkiyi ICC’ler sağlar. ICC’ler GI kanal duvarında nöronal iletimi sağlayan yavaş dalga akımları üreten pacemaker hücreleridir ve GI kanalın otonom hareketleri açısından önemlidir (55). ICC’ler kendi aralarında veya düz kaslar ile kanca ve soket benzeri yapılar veya gap junctionlar aracılığı ile iletişim halindedirler (56, 57). Daha önce Cajal hücrelerinin nöral krest kaynaklı, fibroblastik ya da düz kas kökenli olduğu düşünülmekteydi (58).

Kuş ve farelerdeki kimerik gelişim modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda hem Cajal hücrelerinin hem de düz kas hücrelerinin progenitor mezenkimal kök hücreden farklı yönlerle diferansiyasyonla oluştuğu belirtilmiştir. Cajal hücre diferansiyasyonunun enterik nöronlardan bağımsız olarak gerçekleştiği, daha sonra anatomik ve fonksiyonel olarak bu hücrelerle ilişki kurdukları bildirilmiştir(59, 60, 61).

Mezenkimal ICC prekürsörleri KİT tirozin kinaz reseptörü taşırlar ve diferansiyasyonları için sinir yada düz kas hücrelerinde bulunan KİT ligandına ihtiyaç duyarlar. Bu ligandın etkisiyle ICC progenitorleri ya myenterik ICC’lere (ICCmy), ya da

muskuler ICC'lere (ICCMus) farklılaşırlar. Sinir ya da düz kas hücrelerinin KİT ligandları ile etkileşime giremeyen mezenkimal progenitor hücreler ise başarısız bir yol izleyerek KİT (-) negatif düz kas hücrelerine dönüşürler (62, 63).

ICC hücreleri çok sayıda mitokondri, endoplazmik retikulum içerir. İnce sitoplazmalı, büyük oval çekirdekli ve dendritik benzeri uzantıları olan işsi hücrelerdir. ICC'ler tirozin kinaz reseptörü olan KİT proteinin eksprese ederler Standard HE boyalı kesitlerde dendritik bir morfolojiye sahip ICC'ler tirozin kinaz reseptörü olan KİT ile immünohistokimyasal boyama sonucu kendilerine has elektron mikroskobu görüntüleriyle belirlenir (64, 65).

Bu hücrelerin varlığı GI kanal ile sınırlı değildir. Bu hücreler alt özofagustan anüse kadar tüm barsak boyunca bulunduğu gibi prostatta, penisde, meme bezlerinde ve uterusda, pankreasda, portal ven gibi kan damarlarında ve vajinada da bulunabilmektedir (54). ICC'ler en yoğun olarak myenterik plexuslar çevresinde bir ağ şeklinde, submukozal Meissner's plexus ve 3. plexusta veya GİK'in duvarı boyunca tek tek dağılmışlardır (66).

GIST'lerin orijini tam olarak anlaşılmamış olsada ICC'lerin ve GIST'lerin immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel özellikler açısından benzerlikler göstermesi, GIST'lerin orijininin Cajal hücreleri olduğunu düşündürmektedir. İmmünohistokimyasal açıdan GIST'lerin ICC veya onların prekürsörleri olan mezenkimal kök hücrelerden türevlendiği ile ilgili kanıtlar bulunmaktadır. ICC'ler GIST hücreleri benzer şekilde CD117, CD34 ve vimentin ile pozitif boyanırken, desmin ve S-100 ile negatif boyanmaktadır (2, 14, 67).

Omentum ve mezenterdeki primer GIST'ler ile ICC'lerin immünohistokimyasal açıdan benzerlik göstermesi ancak bu lokasyonlarda ICC'lerin olmayışı da GIST'lerin multipotent mezenkimal kök hücrelerden kaynaklandığı düşüncesini arttırmaktadır (16).

GIST tümörlerindeki kinaz mutasyonlarının anatomik dağılımı sindirim sisteminin farklı bölgelerinde kinaz bağımlılığı ve biyolojisi açısından farklılık gösteren ICC popülasyonları olduğunu düşündürmektedir. Örneğin ekzon 9 mutasyonlu GIST'lerin %98'inin ince veya kalın bağırsaktan kaynaklanması, bunun yanında PDGFRA mutasyonlu GIST'lerin %98'inin mideden kaynaklanması buna örneke verilebilir (68). Ek olarak hem kinaz mutasyon tipi hem de anatomik yerleşim GIST'lerde gen ekspresyon profilini etkilemektedir (69, 70). Bu gözlemler birinde ekzon 11 mutasyonu birinde ekzon 13 mutasyonu olan iki farklı fare modeli ile desteklenmiştir. Her iki modelde özofagustan proksimal duodenuma kadar ve kolon ile rektumda diffüz hücreli ICC hiperplazisi tanımlanmış, ancak ince bağırsakta herhangi bir

hiperplazi belirlenmemiştir. Bu nedenle farelerde *KİT* mutasyonları ile ICC'ler arasında anatomik yerleşim açısından bir varyasyon olduğu söylenmektedir (71, 72).

2.9 İMMÜNHİSTOKİMYA

GİSTlerde tanı, histolojik sınıflama ve tedaviye yön vermek amacıyla immünhistokimiyadan yararlanılır. Örneğin, KİT (CD117), bu tümörlerdeki ICC kökenini desteklerken tanıya yardımcı olur ve imatinib mezilat(araştırma kodu STI-571; ürün adı Gleevec/Glivec; Novartis Pharmaceuticals Corporation) tedavisine iyi yanıt verebileceğini gösterir. CD34, SMA, desmin ve S-100 tümörün biyolojik davranışı hakkında bilgi veren diferansiasyonunu belirler.

2.9.1 KİT (CD117)

GİST'ler Gİ kanalda spesifik histolojik karakteristiklere sahip KİT pozitif mezenkimal (stromal) tümörler olarak tanımlanmaktadır (73, 74). KİT proto-onkogen proteini olan CD117, kök hücre faktörü (stem cell faktör-SCF) olarak bilinen büyüme faktörü için veya mast hücresi büyüme faktörü için, transmembran reseptörüdür ve internal tyrosine kinaz içerir. KİT, normal ICC'lerde, mast hücrelerinde, melanositlerde, ve bazı epitel hücrelerinde (meme, tükrük bezi, ter bezi, nefron), fetal endotelyal hücrelerde ve CD34 pozitif hemopoetik hücrelerin bir kısmında eksprese edilir (75).

CD117 (KİT proteini) 'nin sürekli ekspresyonu tüm histolojik varyantlarda ve farklı bölgelerin iyi huylu ve habis GİST'lerinde (%98-100) izlenir (Şekil 3). CD117 (KİT proteini) ekspresyonunun sürekli görülüyor olması, GİST'leri tanımlayan önemli özelliklerden biri haline gelmiştir ve tanı sırasında karıştırılabilecek düz kas tümörleri ve schwannomların KİT negatif olması, tanıda altın standart olarak kullanılması sağlamıştır. Tipik immünhistokimya boyama parafine gömülü tümör materyalinden alınan kesitlerle yapılır. GİST hücrelerinin çoğundaki KİT boyanma, genellikle sitoplazmada güçlü diffüz boyanma şeklinde görülür (6). GİST'lerin oldukça az bir kısmı (~%2-4) tipik klinikopatolojik ve sitogenetik bulgular taşımalarına rağmen KİT negatiftir. Bu tümörler heterojen olup genellikle platelet kökenli büyüme faktörü- α (platelet derived growth factor- α , PDGFR α) onkojenik mutasyonları içerirler ve omentum/peritoneal yüzeyde görülürler veya KİT inaktivasyonunu sağlayan mutasyonları içerebilirler (68, 76).

2.9.2 CD34

CD34, hematopoietik progenitör hücre antijenidir ve bilinmeyen fonksiyonlu bir transmembran proteinidir. Biyokimyasal olarak 110 kDa ağırlığında olup genellikle hematopoetik ve vasküler endotelial hücrelerle ilişkili olan mezenchimal orjinli bir çok tümörde pozitiftir. GİST'lerde %60-70 oranındaki kuvvetli yaygın sitoplazmik CD34 pozitifliği (Şekil 3), bu belirteci GİST tanısı açısından hassas ve spesifik yapmaktadır. Ayrıca endotelial hücrelerde, fibroblast alt tiplerinde ve bunlarla ilişkili neoplazilerde, Kaposi sarkomu, anjiosarkomların %50'sinde CD34 pozitif olabilir (6, 14, 77).

Bazı çalışmalarda tümör yerleşimine göre CD34 ekspresyonunda değişiklikler gözlenmiştir. Miettinen ve arkadaşlarının 2000 yılında 292 GİST olgusu ile yaptıkları araştırmada KİT pozitif tümörlerin özefagus yerleşimlerinde %100, rektum yerleşimlerinde %96, mide yerleşimlerinde %90, kolon yerleşimlerinde %65, ince barsak yerleşimlerinde %47 oranlarında CD34 pozitiflik saptamıştır (78). CD34 negatif GİST'lerin çoğu epiteloit tiptir (17).

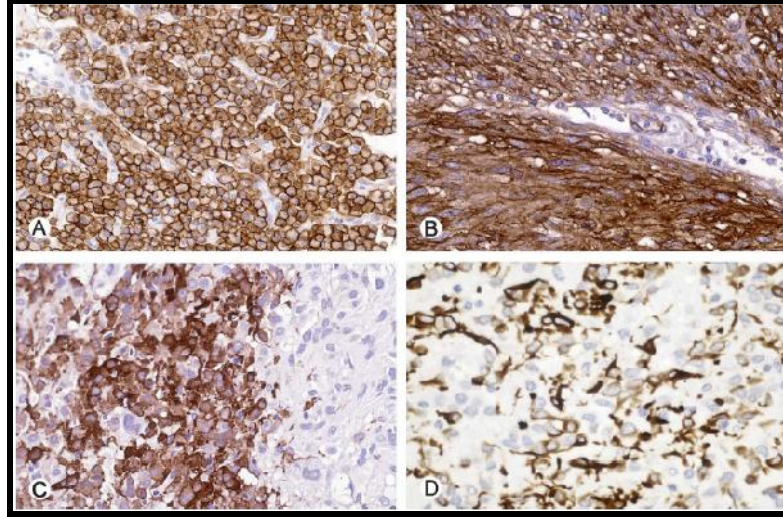
2.9.3 SMA, S-100 ve Desmin

Düz kas aktini (smooth muscle actin, SMA) hücre motilitesinden sorumlu olan bir kontraktıl proteindir. Düz kas ve myofibroblastik hücrelerin tanımlanmasında yararlı bir markerdir. Normal GI düz kas hücrelerinde eksprese olan SMA, düz kas differansiasyonuna bağlı olarak GİST'lerin %20-40'ında pozitiftir. En sık ince barsak tümörlerinde görülür (78).

Desmin, DES geni tarafından kodlanan 53kD'luk tip 3 intermediate filament olup düz kas ve çizgili kas hücrelerinde bulunduğu için primer olarak düz kas ve iskelet kası tümörlerini tanımlamak için kullanılmıştır. GİST'lerde desmin pozitifliği oldukça nadirdir (79) (Şekil 3). Desmin pozitifliği gerçek KİT pozitif GİST olgularının içinde %1-2'si oranında verilmektedir (78). GİST'lerde desmin ve S-100 pozitifliği oldukça nadir olup yaklaşık olarak %5 civarındadır. SMA pozitifliği ise daha çok ince bağırsak tümörlerinde görülür (78) (Şekil 3).

Ağır caldesmon (heavy caldesmon, h-caldesmon) düz kas hücre diferansiasyonu için oldukça spesifik bir markerdir. Ancak GİST'ler h-caldesmon açısından pozitiftir (h-caldesmon için %80 pozitiflik). GİST'lerdeki h-caldesmon pozitifliği düz kas diferansiasyonu özelliğini işaret etmektedir (80).

Rutin klinik uygulamalarda ekspresyon varyasyonları açısından sınırlılıkları bulunmaktadır. Bu nedenlerle bu antijenlerin hiç biri diyagnostik açıdan spesifik değildir.



Şekil 3. GİST’lerde immünohistokimyasal bulgular. A, güçlü KİT pozitifliği. B, şiddetli CD34 pozitifliği. C, Alandaki hücrelerin yarısında SMA pozitifliği. D, seyrek desmin pozitifliği (17)

2.9.4 Ki-67

Ki-67’nin prognoz belirlemede kesin sonuçlar vermeyen ancak nükleer proliferasyon ile ilişkilendirilmiş hücre döngüsünün büyüme ve sentez fazlarında (G1, G2, ve M) eksprese edilen, G0 fazında eksprese edilmeyen bir antijendir. Bu antijen hücre döngüsündeki aktif hücreler hakkında bilgi almayı sağlar. Neves ve arkadaşlarının 2009’da 40 GİST olgu serisi ile yaptıkları çalışmada olguların %57’sinde Ki-67 ekspresyonu gözlenmiştir (81). Meara ve arkadaşlarının 2007’de ki çalışmalarındaki GİST serisinin hepsinde Ki-67 ekspresyonu bulunmuştur (82).

2.10 AYIRICI TANI

Gastrointestinal sistemin mezenkimal tümörlerinin hepsi stromal tümör değildir. GI kanaldan türevlenen mezenkimal tümörler düz kas ve nöral neoplazmları içerir. Düz kas ve schwann hücre tümörleri GİST’lerde olduğu gibi sıklıkla iğsi hücreli morfolojiye sahiptir. GI kanalda leiomyoma, leiomyosarkoma, schwannoma ve malign schwannoma oluşumu nadirdir. Oysa GİST’ler GI kanalın mezenkimal tümörlerinin en sık karşılaşılanıdır (83). İmmunhistokimyasal boyalar her ne kadar bu tür iğsi hücreli tümörlerin tanısını koymada yardımcı olsa da, CD117 ile pozitif boyanan her tümöre GİST tanısı koymamak gerekir. KİT

pozitif bile olsa Glivec'in etki göstermediği neoplazmlarda da (liposarkomlar, anjiyosarkomlar, Ewing sarkoma, seminomalar gibi) *KIT* ekspresyonu gözlenebilir. Bu nedenle sindirim kanalındaki, retroperitonyumdaki veya peritoneal kavitedeki tüm *KIT* pozitif işi hücreli tümörlerin GİST olmayabileceği düşünülerek tanı konmalıdır (6, 14, 29). İnflamatuvar fibroid polipler, fibromatozlar, inflamatuvar mitofibroblastik tümörler, soliter fibröz tümörler, schwannomalar, leiomyomalar ve leiomyosarkomlar, dediferansiye retroperitoneal liposarkom, malign melanom ve anjiyosarkom gibi tümörler GİST'lerden ayrılma ihtiyacı olan mezenkimal tümörlerdir ve ayrımları çok dikkatli bir şekilde yapılmalıdır (31). Bu gibi durumlarda CD117'ye ek olarak çeşitli antijenik belirteçler de ayırıcı tanıda yer almaktadır. İmmünohistokimya boyamadan en uygun yararlanım Gİ kanalındaki neoplazmin doğasına uygun belirleme yaparak gerçekleşir.

2.10.1 Leiomyom ve leiomyosarkom

Düz kas tümörleri GİST'ler kadar Gİ sistemde görülmemelerine rağmen GİST'lerden ayrılanmalıdır. –Selim ve habis tüm düz kas tümörleri, morfolojik ve İHK'sal olarak GİST'lere benzer. Morfolojik olarak düz kas tümörleri daha az hücresel görünür ve bu hücreler eozinofilik sitoplazma içerir (85). Örneğin immünohistokimyasal olarak, GİST'lerde CD117 pozitif iken, düz kas tümörlerinde CD117 negatiftir. Buna benzer şekilde GİST'lerde CD34 sıklıkla eksprese edilir, ancak düz kas tümörlerinde genellikle CD34 negatif (%10-15'i CD34 pozitif) boyanır. Desmin ve SMA ekspresyonu ile düz kas diferansiyasyonu genellikle leiomyomalar ve leiomyosarkomalarda karakteristiktir. GİST'lerde SMA eksprese edilirken, desmin negatifliği karakteristiktir (85). Leiomyosarkomlar ve leiomyomlarda *KIT* mutasyonu göstermezler. Leiomyomların selülaritesi az, mitoz düşük oranda olup; GİST'lere oranla gençlerde daha çok görülürler. Leiomyosarkomlar, leiomyomlara göre daha nadirdir ve daha fazla mitotik aktivite gösterirler (6, 14).

2.10.2 Schwannomalar

Schwannomalar immünohistokimyasal olarak S-100 pozitif; SMA, desmin ve CD117 negatiftirler. Ancak bazen CD34 ile boyanabilirler (6). S-100 proteini gibi nöral belirteçlerin ekspresyonu hem iyi hem kötü huylu schwannomalarda karakteristiktir. Ancak GİST'lerde S-100 ekspresyonu genellikle yoktur (85).

2.10.3 İntra-abdominal Fibromatozis

İntra-abdominal fibromatozislerin, bölgesel olarak agresif davranış göstermelerine rağmen metastaz yapmamaları GİST'lerden ayırır. İntra-abdominal fibromatozis, CD117 eksprese edebilirler, ancak CD34 daima negatiftir. SMA %75 pozitif, desmin pozitif, S-100 negatif bir tümördür (31, 83).

2.10.4 İnflamatuar Fibroid Polipler

İnflamatuar fibroid poliplerin ayırılmasında da CD34 ve CD117 önemlidir. İnflamatuar fibroid polipler CD34 eksprese eder ancak CD117 etmezler (83).

2.10.5 Paraganglioma

Epiteloid GİST'lerin paragangliomalara benzemesinin farkındalığı ile ayırıcı tanıda CD117 kullanımı bu problemin aşılmasını sağlamıştır (83).

2.10.6 Metastatik Melanom ve Anjiyosarkom

Gastrointestinal sistemde GİST'lerden başka KİT pozitif tümörler metastatik melanom ve anjiyosarkomlardır. Bu tümörlerin kendilerine özgü histolojik ve immunhistokimyasal özellikleri ayırıcı tanıda yardımcı olur. Malign melanoma GI kanala metastaz yapma eğilimindedir ve CD117 ekprese eder. Bu nedenle GİST'lerden ayrılması gerekmektedir. Fakat S-100, HMB-45 ve MelanA ve primer tümör identifikasyonu ile GİST'lerden ayrımı yapılır (83). Anjiyosarkomlar KİT ve CD34 pozitifliği göstermelerinden dolayı GİST ile karışabilmektedirler. Ancak bu tümörlerde var olan CD31 pozitifliği tanıda ayırımı yapmayı sağlamaktadır (18).

2.10.7 Soliter Fibröz Tümör

İğsi hücreli tümör olan soliter fibröz tümör CD34 ile pozitif boyanma gösterdiklerinden, GİST'ler ile ayırıcı tanıya girerler, fakat CD117 ile boyanma göstermezler (14).

2.10.8 Dediferansiye Retroperitoneal Liposarkom

Dediferansiye retroperitoneal liposarkom, barsak duvarına yapışık olabilir ve GİST'leri taklit edebilir. Bu tümörler CD117 negatiftir ve S-100 pozitifdir (14).

GİS’de işi hücreli tümörlerin ayırıcı tanısında kullanılan immünohistokimyasal belirteçler Fletcher ve arkadaşları tarafından Tablo 1’deki gibi gösterilmiştir (6).

Tablo 1. GIS’ in işi hücreli tümörlerinin ayırıcı tanısı için immünohistokimyasal şema (6)

Tümör Grubu	KİT (CD117)	CD34	SMA	Desmin	S-100
GİST	+	%60-70	%30-40	Çok nadir	%5
Düz kas tümörü	-	%10-15	+	+	nadir
Schwannom	-	+	-	-	+
Fibromatozis	*	nadir	+	nadir	-

*Bir çok yazar fibromatozisi KİT negatif olarak kabul etmesine rağmen, buna karşı çıkan yazarlar da bulunmaktadır.

2.11 PROGNOTİK FAKTÖRLER

GİST’lerin biyolojik davranışlarıyla ilgili birbirinden farklı ve çelişkili yayınlardan anlaşıldığı gibi genelde kötü huylu olarak düşünülen bu tümör grubunun potansiyel biyolojik davranışlarını önceden tahmin etmenin zordur. Hem makroskobik hem de mikroskobik bir çok parametre, prognozu belirlemede kullanılmak için önerilmiştir. Bunlar arasında tümör yerleşim yeri, tümör çapı, çevre dokuya invazyon, büyüme paterni, mukozal invazyon, hücre tipi, hücresellik, nükleer pleomorfizm, mitoz sayısı, histolojik tipi, DNA analizi, cerrahi ameliyatın sınırları, nekroz, immünohistokimyasal profili ve proliferasyon antijenleriyle boyanması prognoz tahmininde değerlendirilmiştir (16).

İlk klinik sunumda peritoneal veya karaciğer metastaz geliştirilmiş olması kısa sağkalımı işaret eden kötü bir prognostik faktördür (86).

Metastatik GİST’li hastalarda medyan sağkalım 20 ay iken, bölgesel rekürrens olan hastalarda 9-12 aydır (87). Bunun aksine tesadüfen bulunan küçük serozal tümörler ise iyi prognozu işaret ederler (78).

Yerleşime spesifik olarak GİST’ler küçük, iyi huylu, tesadüfen keşfedilen nodüller ve büyük sarkomalar olarak çeşitlenebilir. Küçük GİST’lerde mide ve rektum yerleşimlerine göre kolon ve ince bağırsak yerleşimli sarkomalar daha ilerlemiş sarkomalardır. Çoğu özofagus yerleşimli mezenkimal tümörün iyi huylu leiomyoma olmasına rağmen, çoğu özofagus yerleşimli GİST tanı konduğu anda ileri evre olmasından dolayı kötü huylu tümörlerdir ve kötü prognoza sahiptir. Ancak tesadüfen bulunan ve küçük (tümör çapı 3cm’den küçük

olanlar) olan tümörler tam eksizyondan sonra iyi prognoza sahiptir (15, 88). Kötü huylu duodonal ve ince bağırsak GİST'lerin oranı üç olgu serisinde %50-64 arasında değişir (40, 41, 46). Duodonal tümörler için kötü huy potansiyelini işaret eden faktörler tümör çapının 4.5cm'den fazla olması , mitoz sayısının 2'den fazla olması (50 BBA'da) ve koagülatif nekroz istatistiksel olarak anlamlı kötü prognostik faktörlerdir. Kolonik GİST'ler nadir olmakla birlikte iyi huyluların kötü huylu GİST'lere oranı $\frac{1}{2}$ 'dir. Omentum kaynaklı GİST'ler mezenter kaynaklı olanlara göre daha agresiftir (88). Rektum yerleşimli GİST'lerde ise çapı 2cm'den küçük ve 50 BBA'daki mitoz sayısı 5'in altında olanlar iyi huylu davranış sergiler. Ancak tümör çapı 5cm'den büyük ve 50BBA'daki mitoz sayısı da 5'den fazla olan rektum GİST'lerinin büyük çoğunluğu kötü huylu bir davranış sergiler (36). GİST'ler bu nedenle, lokalizasyonlarına göre gruplandırılmaktadır.

Bazı çalışmalarda düşük hücresellik istenilen bir prognostik faktör olarak karşımıza çıkar. Ancak bu parametreyi standardize etmek ve olgulara uygulamak zordur. Genellikle GİST'lerde nükleer atipi göze çarpmadığı için önemi belirsizdir. Özellikle küçük GİST'lerde düz kas lifleri ile demetleri arasına invazyon karakteristik bir büyüme paternidir. Ancak bunun prognostik açıdan bir önemi bulunmamıştır.

Mukozal invazyon nadirdir. Ancak bazı yerleşim yerlerindeki GİST'lerin ayırıcı özelliğidir. Mukozal invazyon çoğunlukla kötü huylu tümörlerde görülmüş. Ancak nadir olması bu parametrenin prognoz açısından kullanımını sınırlamaktadır (88).

İyi huylu diye tanımlanabilen bir tümör tahmin edilenin aksine kötü huylu olabilir. GİST'leri rekürrens ve metastaz potansiyelinin tahminine göre iyi huylu ve kötü huylu şeklinde ayırmak için bir çok parametre önerilmiştir. Ancak çeşitli çalışmalarda tümör boyutunun metastaz riskini tahmin etmede bağımsız bir belirleyici olduğu sonucuna varılmıştır (40, 89).

Bazı çalışmalarda da kötü prognozlu olgularda mitozun $>5/50$ HPF olduğu belirtilmektedir (40). Mitotik aktivitenin yoğunluğunun ve tümör boyutunun maliniteyle ilişkili olduğu düşüncesini kabul eden nitelikte de çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (14, 45, 78, 90, 91, 92, 93). Bu nedenle bu konuda ileri gelen bilim adamları 50 HPF deki mitoz sayısı ve tümör boyutu esas alınarak GİST'leri iyi ve kötü huylu diye ayırmak yerine çok düşük, düşük, orta ve yüksek riskli diye sınıflamanın doğru olacağı yönünde karar aldılar. Bu yaklaşım Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'nce (National Institute of Health)de Nisan 2001'de kabul edilmiştir. Fletcher ve arkadaşları Nisan 2002'de GİST'leri 4 gruba ayıran

(çok düşük risk, düşük risk, intermedier risk, yüksek risk) bu risk kategorizasyon tablosunu yayınlamışlardır (6) (Tablo 2.)

Tablo 2. Fletcher ve ark.,tümör çapı ve mitoz sayısına göre hazırladığı risk sınıflaması tablosu (4)

Risk Grubu	Tümör Çapı	Mitotik oran (50BBA)
Çok düşük risk	<2cm	<5/50BBA
Düşük Risk	2-5cm	<5/50BBA
İntermediyer Risk	<5cm	6-10/50BBA
	5-10cm	<5/50BBA
Yüksek Risk	>5cm	>5/50BBA
	>10cm	Herhangi bir mitotik oran
	Herhangi bir boyut	>10/50BBA

M.D. Anderson Kanser Merkezi'nde (M.D. Anderson Cancer Center, MDACC) yapılan bir çalışmaya göre tümör büyüklüğü 5cm'den küçük olan GİST'lerde medyan hastalıksız sağkalım 36 ay; tümör boyutu 5cm ile 10cm arasında olan GİST'lerde 19 ay; tümör boyutu 10cm'den büyük olan tümörlerde ise 17 ay olarak bulunmuştur (94).

Yüksek Ki-67 indeksi ve yüksek Bcl-2, p53, vasküler endotelyal büyüme faktörü (vasculer endothelial growt factor, VEGF), p16^{INK} ve c-Myc proteinlerinin ekspresyonu sıklıkla kötü prognozla ilişkilendirilen durumlardır (90, 95, 96, 97).

2.12 GASTROİNTESTİNAL STROMAL TÜMÖRLERİN BİYOLOJİSİ

2.12.1 KİT Reseptör Tirozin Kinaz (Kök hücre faktör reseptörü)

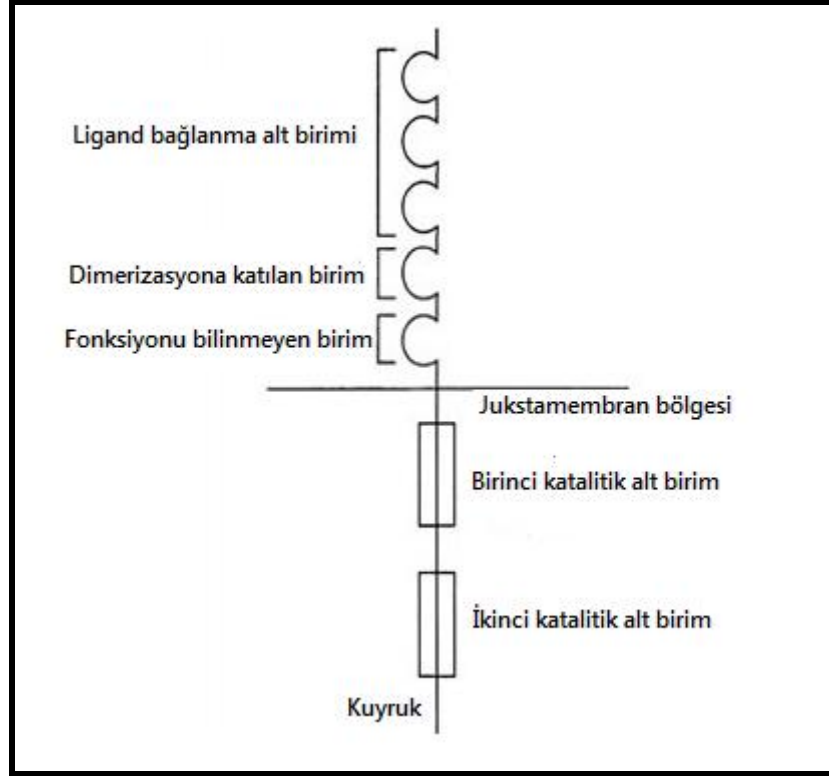
Kanser hücre döngüsü progresyonu (hücre bölünmesi), hücre büyümesi (hücre sel ağırlık) ve diğer yandan da programlanmış hücre ölümü (apoptoz) hızları arasındaki dengenin kaybından ileri gelir. Bu konuda hücre sinyal transdüksiyon yollarındaki anormalliklerin hem bu dengenin korunmasında hem de malign transformasyonda hayati rol oynadığı

bilinmektedir (98). Hücresel düzeni sağlayan sinyal molekülü gruplarının içinde tirozin kinazlar en önemli molekülledir (99).

KIT geni, PDGFR- α ve PDGFR- β , koloni stimüle edici faktör reseptörü-1(CSF1R) ve FMS ilişkili reseptör tirozin kinaz 3 (FLT3) proteinleri ile aynı reseptör tirozin kinaz ailesinde olan ve bu proteinlerle yapısal homoloji gösteren 145 kDa'luk tip 3 reseptör tirozin kinaz kodlar. Reseptör tirozin kinaz proteinin tüm üyeleri aynı topolojiye sahiptir. Ekstraselüler ligand bağlanma alt birimi, transmembran bir segment ve sitoplazmik kinaz altbirimi içerirler. Tip 3 reseptör tirozin kinaz ailesinin üyeleri ise temel olarak beş tane ekstraselüler immünglobulin benzeri tekrarlardan oluşan altbirim ve ATP bağlanma ve kinaz altbiriminin fosfotransferaz bölgeleri ile ayrılan kinaz altbiriminden oluşur (Şekil 4). KİT fonksiyonu ICC gelişiminde kritik bir öneme sahiptir. Ayrıca hematopoetik progenitor hücreleri, mast hücreleri ve germ hücrelerinin gelişiminde de önemlidir (100, 101) .

Yabancı tip KİT'in fizyolojik aktivasyonu ligandı olan kök hücre faktörü (stem cell factor, SCF) ile bağlanması sonucu oluşan KİT dimerizasyonu, kinaz aktivasyonu, tirozin çapraz fosforilasyonu ile gerçekleşir (102). Bu olaylar serisi proliferasyon, apoptoz, adezyon ve ICC gibi bazı hücrelerin diferansiyasyonunda önemli olan hücre içi sinyal kaskadını aktiveleştirir (103).

Bazı fare modellerinde KİT proteinin fonksiyonel bozukluğu, fonksiyonel ICC yokluğunu ve sindirim sisteminde peristalsis yokluğu ile sonuçlanmıştır. KİT'in sürekli aktif olmasını sağlayan mutasyonlarda mastositoz ve GİST patogenezi ile ilişkilendirilmiştir (103). KİT aktivasyonunun normal mekanizmaları, sürekli reseptör aktivasyonuna sebep olan onkojenik mutasyonlar ile tersine dönebilir (7).

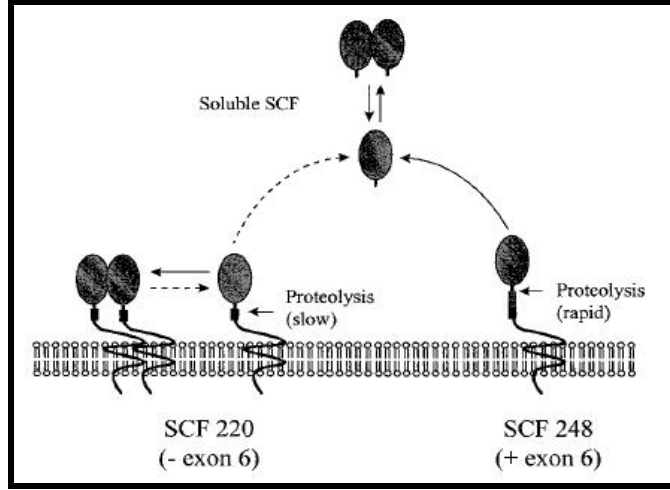


Şekil 4. KİT reseptör tirozin kinaz yapısı (104 numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.)

2.12.2 KİT Ligandı (KL) SCF

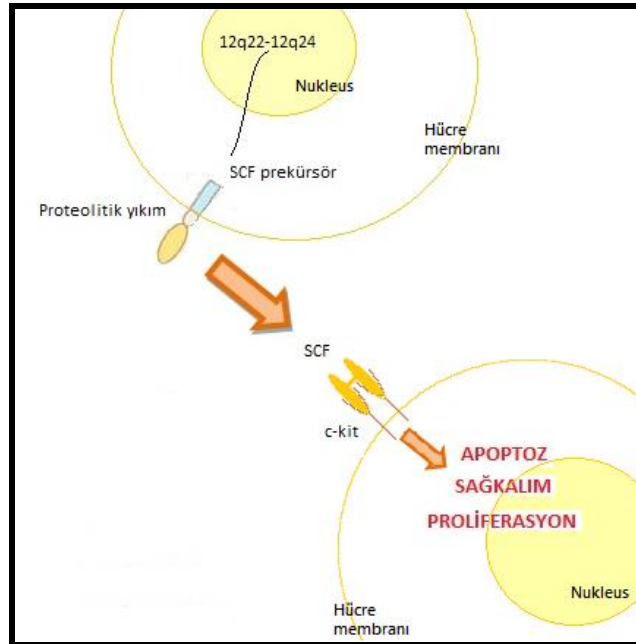
SCF insanda 12q22-12q24 bölgesindeki 9 ekzon tarafından glikoprotein yapılı bir sitokindir ve fibroblast ile endotelial hücreler tarafından üretilmektedir. Kök hücre faktörü; KİT ligand, mast hücre büyüme faktörü, steel faktör gibi değişik isimlerle kullanılmaktadır (105).

Hem membrana bağlı (membrane bound SCF, mSCF) hem de çözünür (soluble SCF, sSCF) formları bulunmaktadır (Şekil 5). Birinci SCF izoformu membranda ekprese edilen ve 45kDa, 248 aminoasitten (aa) oluşan bir glikoproteindir (SCF²⁴⁸). Bu izoformun içerdiği 6.ekzondan proteolitik kesim ile 31kDa, 163 aa'lık bir protein oluşturulur. Ekzon 6 tarafından kodlanan kesim yeri 163–166 rezidüleri arasındaki Val–Ala–Ala–Ser bölgesidir (106).



Şekil 5. Farklı SCF formlarının oluşumu. Alternatif mRNA splicing ile ekzon 6'nın silinmesi veya proteine dahil edilmesi iki farklı SCF izoformunun oluşmasına neden olur (220 ve 248 aa'lık). SCF248'in hızlı proteolitik kesimi solusyon içinde dimerler oluşturan çözünür SCF'ler oluşturur. Ekzon 7 tarafından kodlanan ikinci kesim yeri SCF220'den daha yavaş çözünür SCF salınmasını yönetir. Membran bağlı SCF'ler fonksiyonları için önemli olan dimer yapılarını oluştururlar (107).

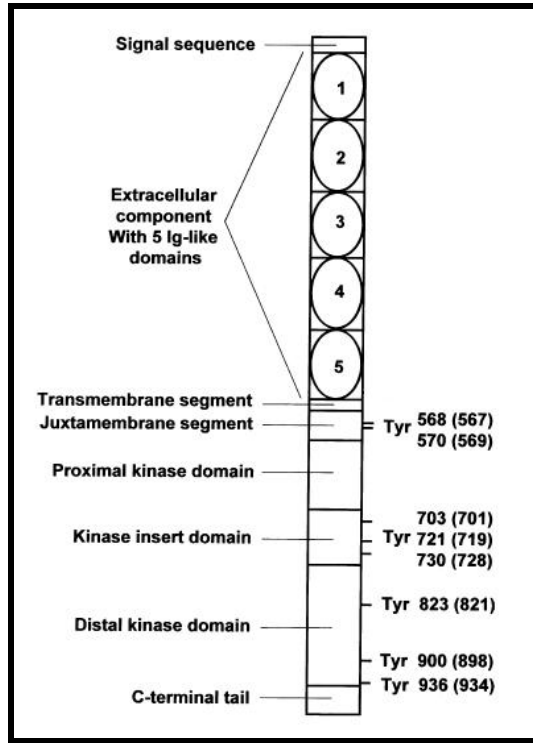
İkinci izoform alternatif splicing mekanizmaları sonucu ekzon 6'nın kesimi ile membrana bağlı kalan 32kDa, 220aa'lık formudur (SCF²²⁰). Fakat ikinci izoformdan da çözünür form elde edilir. SCF²²⁰, dende ekzon 7 bölgesinden kesim sonucu çözünür form elde edilir (108).



Şekil 6. SCF ve KİT bağlanması.

2.12.3 KİT ve SCF Aracılı Sinyal İtimi

Normal KİT aktivasyonunda KİT ligandı olan SCF homodimerlerinin (stem cell factor, SCF) reseptöre bağlanması ile reseptör dimerizasyonu (Şekil 6) ve ardından insan KİT proteininin 568, 570, 703, 721, 730, 823, 900 ve 936 numaralı tirozin (Tyr, Y) rezidülerinin (fare tirozin rezidüleri 567, 569, 701, 728, 821, 898 ve 934) hızlı bir şekilde otofosforilasyonunu indüklenir (Şekil 7). Bu fosforillenen tirozinler Src homoloji 2 (SH2) sinyaleme proteinlerine bağlanırlar. SH2 proteinleri, Src proteininde ve diğer intraselüler sinyal iletim proteinlerinde bulunan, proteinin yolunu bulmasını ve diğer proteinler üzerindeki fosforillenen tirozinlerin tanınmasını sağlayan protein alt birimidir. Bu şekilde SH2 proteinleri bir çok sinyalleme proteinine [Fosfotidil inozitol 3'kinaz (PI-3 kinaz), Shc, PLC γ , Vav, Grb2, Shp-1 ve Shp-2 ve Src ailesi kinazları gibi] bir kenetlenme istasyonu (docking station) olarak görev yapar (106, 109).



Şekil 7. KİT proteininde fosforilasyon alanları (106)

Aktif KİT potansiyel olarak çeşitli sinyalleme kaskatlarının başlatıldığı sinyalleme merkezi olarak sunum yapar. Bu nedenle KİT hücre proliferasyonu, adezyon ve apoptozda önemli bir yer teşkil eder (109) (Şekil 8). Fosforillenen KİT reseptörü hücre içi

2.12.3.2 Src Yolağı

Çoğu Src ailesi üyeleri Src, Tec, Lyn ve Fyn SCF tarafından indüklenir. b Src kinaz ailesi üyesi (Lyn) KİT'e bağlanarak PI3K'yı negatif düzenler. Bu fosforillenmiş Y721'in (PI3K'nın bağlandığı) aşırı fosforilasyonu ile desteklenir (108).

2.12.3.3 Ras/ Raf/MAP Kinaz Yolağı

Ras/ Raf/MAP kinaz yolağı bir çok büyüme faktörü ile aktiflenen bir yoldur. Kısaca aktiflenmiş reseptörün fosforillenmiş tirozin rezidüleri reseptör kompleksle çoklu SH2 taşıyıcı proteinleri toplar. Bu proteinlere örnek verecek olursak: Büyüme faktör reseptörü bağlı protein-2 (growth factor receptor bound protein-2, Grb2), SH2 taşıyan transmembran edici protein C1 (Shc) ve SH2 taşıyan fosfataz-2 (SHP2). Grb2 KİT'in fosforillenmiş Y703 ve Y936'ya bağlanan adaptör proteinidir. Bu küçük G protein Ras ile etkileşimde olan ve aktifleyen kompleks oluşumunu sağlayan guanin nükleotidi değişim faktörü (son of sevenless protein, sos) ile etkileşim içindedir. Bu Raf-1'in ve son olarak MAP kinazlar p38, ERK1/2, JNK'nın aktivasyonunu sağlar. Shc jukstamembrandaki fosforillenmiş Y568 ve Y570 rezidüleriyle etkileşir. Aktiflenmiş KİT reseptör kompleksi ile etkileşimden sonra bu tirozin kinaz rezidülerini fosforiller, rezidüler Grb2 ile etkileşime girer. SCF 145kDa'luk fosfotirozil proteini ile etkileşimi indükler. Shp-2 fosforillenmiş Y568 ile etkileşime girer ve Shp-1 Y570 ile etkileşime girer. Her ikisinde negatif KİT sinyal transdüksiyonunda önemli rol oynar (108).

2.12.3.4 JAK/STAT Yolağı

SCF Janus kinaz(JAK) / Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatör (Signal Transducers and Activators of Transcription, STAT) yollarının aktivasyonunu indükler. STAT ailesinin tanımlanmış yedi üyesi bulunmaktadır. STAT 5'in a ve b şeklinde isimlendirilen iki izoformuyla birlikte STAT1-6 olarak numaralandırılmıştır. SCF bağlanması KİT ile JAK2'nin ilişki kurmasını ve STAT1 α , 3, 5a ve 5b'nin fosforilasyonunu yönetir(108). SCF indüklenmiş JAK/STAT aktivasyonunun fetal karaciğerde hematopoetik progenitör hücre proliferasyonunda ve diferansiyasyonunda önemli olduğu düşünülür (113).

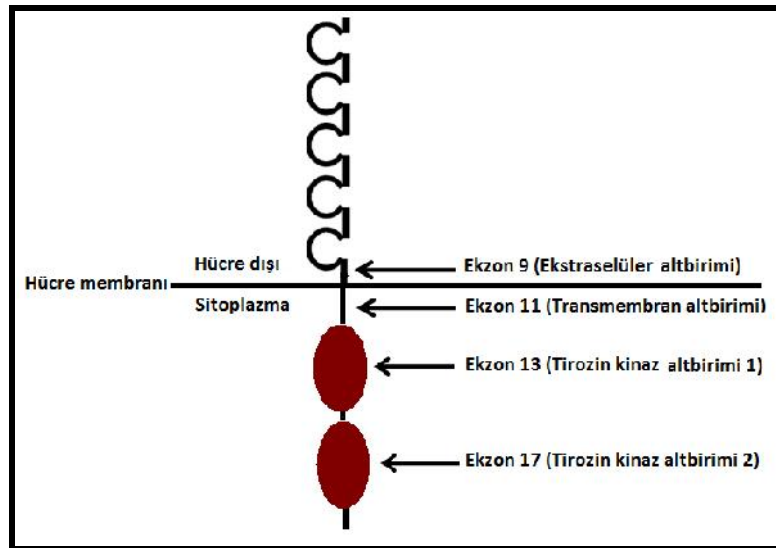
2.12.3.5 Fosfolipaz C- γ (The phospholipase C- γ , PLC- γ) Yolağı

PLC- γ aracılı sinyalleme diferansiyasyon, bölünme, adezyon, sağkalım ve immün cevap gibi bir takım hücre fonksiyonlarında yer almaktadır. PLC- γ KİT'in fosforillenmiş Y730 rezidüsü ile etkileşime girer(108).

Onkolojenik KİT sinyalleme yollarının aydınlatılması KİT inhibitör sağaltımlarına karşı dirençli GİST'lerin söz konusu olmasından dolayı klinik açıdan oldukça önemlidir. Bu nedenle önemli sinyal proteinlerinin aydınlatılması daha etkin olabilecek alternatif terapötik hedeflerin bulunması açısından önemlidir.

2.13 ONKOJENİK KİT MUTASYONLARI

1998'de KİT genindeki aktivasyon mutasyonlarının (7) ve 2003'de PDGFRa genindeki mutasyonların tanımlanmasından (114, 115) sonra GİST'lerde mutasyonlar üzerine çalışmalar devam etmiştir (116, 117, 118). GİST'lerin %65-80'inde KİT geninde aktivasyon mutasyonları tanımlanmıştır (17, 118, 119, 120). GİST'lerde tanımlanan KİT geni mutasyon oranları değişmektedir. Bu mutasyonların belirlenmesinde sorun yaratan eski arşiv materyallerinde degrade DNA veya farklı mutasyon saptama yöntemlerinin kullanılmasından ileri gelmektedir (121). KİT mutasyonlarına genellikle ekzon 11 bölgesinde delesyon ile nokta mutasyonları şeklinde rastlanmaktadır. Ekzon 11'in dışında ekzon 9 (%5-18), ekzon 13 ve 17'de de (%1.5-4.5) mutasyonlar görülmektedir (118, 120, 122, 123) (Şekil 9).



Şekil 9. KİT geni mutasyon bölgeleri (Ekzon 9, 11, 13 ve 17)

2.13.1 Ekzon 11 Bölgesi (Transmembran alt birimi)

KIT geni ekzon 11 bölgesi *KIT* kinazın otoinhibisyonunu sağlar. Ekzon 11 bölgesindeki mutasyonlar *KIT* kinazın otoinhibisyonunun yok olmasını sağlar. *KIT* ekzon 11 mutasyonlarının %60'ı 33 kodon barındıran (550-582) ekzon 11'de gerçekleşmektedir ve delesyon, substitüsyon, insersiyon şeklinde pek çok mutasyon tanımlanmıştır (124). Hirota ve arkadaşlarının 1998 yılında yayınladığı ve GİST'lerde bir dönüm noktası olarak kabul edilen makalalarında GİST'lerin sadece *KIT* eksprese etmediği aynı zamanda jukstamembran alt biriminde mutasyon içerdiği raporlanmıştır (7). Bu çalışmada değerlendirilen 6 tümörden 5'i ekzon 11 mutasyonu içeriyordu. Dördü çerçeve içi delesyonlar, beşincisinde tek aa değişimine neden olan tek nokta mutasyonudur. Mutant *KIT* izoformları sürekli kinaz aktivitesi içerirler. Bu sonuçlar onkojenik *KIT* aktivasyonunun GİST yerleşimi ve sağaltımında önemli bir rol oynadığını göstermiştir. *KIT*'in jukstamembran bölgesi SCF yokluğunda reseptör dimerizasyonunun inhibisyon işlevini görür. *KIT*'in çerçeve içi delesyonlarının, insersiyonların ve nokta mutasyonlarının gösterildiği *KIT*'in mutagenез çalışmalarında bu alt birimin bu fonksiyonunun bozulduğunun ve ligand bağımsız reseptör dimerizasyonu gösterilmiştir (125, 126, 127).

Raporlanan ekzon 11 mutasyon yüzdesi alınan tümör dokusu örneğine (dondurulmuş veya formalinde sabitlenmiş) ve kullanılan tekniğe göre %20-92 arasında değişmişlerdir (7, 17, 68, 116, 118, 128, 129, 130, 131) .

GİST'lerde en sık karşılaşılan ekzon 11 mutasyonları delesyonlarıdır. Bu delesyonlar 3 ile 30 arasında bazen daha fazla sayıda nükleotit kaybına neden olmaktadır. Delesyonlar yapısal olarak heterojen gruplar oluştursalarda, genellikle ekzon 11'in 5' ucunda 1669-1704 (Lys550-Glu561) arasında kümelenmişlerdir. 3' uçta en sık karşılaşılan mutasyon ise 1755-1759delGAT (Asp579del) olarak tanımlanmıştır (116, 118, 128, 132, 133, 134). Ekzon 11'de en yaygın olarak gözlenen mutasyon delWK557-558 (%8-25) 'dir. *KIT* geni 5' ucunda yer alan farklı boyutlardaki delesyonlar *KIT* intron 10-ekzon 11 kesim noktasını (splice-acceptor site) etkileyebilmektedir. Bu delesyonlar yeni bir intraekzonik pre-mRNA 3'kesim akseptör noktası (splice acceptor site) oluşturur ve sıklıkla protein düzeyinde Lys550-Lys558del oluşur (135, 136). Bunun gibi *KIT* ekzon 11 delesyonları sürekli *KIT* aktivasyonu oluştururlar. Ekzon 11'de en sık karşılaşılan ikinci mutasyon çeşidi nokta mutasyonlarıdır. Yapılan çalışmalar sonucu genellikle 4 kodonda kümelendikleri saptanmıştır. Bunlarda ekzon 11'in 5'

ucunda olanlar Trp557, Val559, Val560; 3'uçta ise Leu576'dır. En sık gözlenen değişimler Val559Asp, Val560Asp, Trp557Arg, Val559Ala, Val559Gly, Leu576Pro'dur (116, 118, 128, 132, 133, 134). Bu mutasyonlar sürekli KİT fosforilasyonu oluşturmaktadır. Nadir *KİT* ekzon 11 mutasyonlarının biyolojik etkisi bilinmemektedir. Ancak bir in vitro çalışmada nadir olarak gözlenen Val559Ile mutasyonunun, Val559Asp mutasyonuna zıt olarak, imatinibe karşı dirençli KİT aktivasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Bu nedenle imatinibin inhibitör etkisi aynı kodondaki mutasyonlar arasında değişim göstermektedir (137). Belirlenen ekzon 11 duplikasyonları yapısal olarak heterojendir. Boyutları 1-18 kodon arasında değişmektedir. Genellikle duplikasyonlar ekzon 11'in 3'ucunda yerleşim göstermektedir (138). *KİT* geni ekzon 11 bölgesinde insersiyonlar nadirdir. Ancak tanımlanan duplikasyonların bir kısmı ekzon 11'de 558.kodonda gözlenmektedir. Tüm ekzon 11 duplikasyonları yapısal olarak identiktir. Protein düzeyinde ise Lys558delinsAsnPro'ya yol açan 1694-1695insTCC görülmektedir. Bunun yanında Lys558delinsGlnPro ve Lys558delinsAsnGln şeklinde iki varyantı daha bulunmaktadır. Lys558AsnPro mutasyonu sürekli KİT fosforilasyonuna neden olmaktadır (139).

Mutasyonların tipi prognozla ilişkilendirilmektedir. Delesyonlar, insersiyonlar ve nokta mutasyonlarına oranla daha agresif davranmaktadır (7, 17, 135, 140, 141, 142, 143).

2.13.2 Ekzon 9 Bölgesi (Ekstraselüler Alt Birim)

KİT geni ekzon 9 bölgesi KİT proteininin reseptör-reseptör etkileşiminde rol oynayan ekstarselüler alt birimini kodlar. Ekzon 9 mutasyonlu GİST'lerde primer imatinib direnci olarak tanımlanan durum, bu hastalara imatinib dozunun artırılması ile düzeltilebilir. Ekzon 9 mutasyonları ilk olarak 6 GİST olgusunda Lux ve arkadaşları tarafından raporlanmıştır. Ala⁵⁰¹ ve Tyr⁵⁰² aminoasitlerinin duplikasyonu ile sonuçlanan altı nükleotid insersiyonu buşunmuştur. Hirota ve arkadaşları KİT proteininde aktif kinaza sahip GİST alt grubunu doğrulamışlardır (144). Bu mutasyonun gözlemlendiği diğer olgularda ince bağırsak orjini ile ilişkilendirilmiştir (117, 134, 145).

Heinrich ve arkadaşlarının analizediği 127 kötü huylu GİST olgusunun 23'ünde (%18.1) ekzon 9 mutasyonu tespit edilmiştir. Bunların hepsi AY501-502 duplikasyon/insersiyondur (120). Ancak Heinrich ve arkadaşlarının toplam 322 GİST olguluk grubunda (140'ı yayınlanmış olgu) ekzon 9 mutasyon oranı daha düşüktür (%10.2) (68). Yayınlanan olguların %95'i ince bağırsak ile ilişkilendirilmiştir. Bu mekanizma tam

anlamıyla tanımlanamamıştır. Fakat hipotezler ekzon 9 mutasyonunun ekstraselüler alt birimdeki anti dimerizasyon motifini bozduğu yönündedir (68).

GİST'lerde *KIT* geni ekzon 9'da nadir olarak Glu490Gly mutasyonu raporlanmıştır. Ancak bu mutasyonun biyolojik etkisi bilinmemektedir (143).

2.13.3 Ekzon 13 Bölgesi (Tirozin Kinaz 1 Alt Birimi- TK1)

KİT proteini tirozin kinaz alt birimi-1, *KIT* geni ekzon 13 bölgesi tarafından kodlanır. Tirozin kinaz alt birimleri fosforilasyonun ve sinyal iletiminin gerçekleşmesini sağlar. GİST'lerde primer transmembran alt birimi mutasyonlarının yanında kinaz alt birimi mutasyonları saptanmıştır. Bu durumda imatinibin bağlanmasında sorun oluşabileceğinden sekonder imatinib direnci söz konusu olmaktadır. GİST'lerde ekzon 13'de nokta mutasyonları tanımlanmıştır. Bu bölgede tanımlanan mutasyonların çoğu protein düzeyinde Lys642Glu'e yol açan 1945A → G değişimidir (123). Bu K642E nokta mutasyonu ilk kez Lux ve arkadaşları tarafından raporlanmıştır (146). Daha sonra farklı araştırmacılar tarafından da analizlenerek onaylanmıştır (117, 147). Bu bölgedeki mutasyonların yüzdesi 0,8 ile 4,1 arasında değişmekte olup oldukça düşüktür. Heinrich ve arkadaşları 322 GİST olgusunda (bunların 140'ı yayınlanmış olgudur) sadece 4 tane (%1,2) ekzon 13 mutasyonu raporlanmıştır (68, 120). Bu mutasyonun reseptörün ligand bağımsız aktivasyonu ile sonuçlandığına yönelik düşünülmektedir. Ancak kendiliğinden reseptör homodimerizasyonunun olup olmadığı belli değildir (68).

Bununla birlikte bazı çalışmalarda 642.kodonun çevresinde bulunan 6 farklı mutasyon tanımlanmıştır. Bunlar Glu635Lys, Leu641Pro, Val643Ala, Leu647Pro, Met651Val, Asn655Lys (148, 149, 150, 151)

Lys642Glu ve Asn655Lys mutasyonlarının sürekli *KIT* geni tirozin kinaz fosforilasyonunu yönettiği ve imatinibe hassas olduğu gösterilmiş (138).

2.13.4 Ekzon 17 Bölgesi (Tirozin Kinaz 2 Alt Birimi- TK2)

KİT proteini tirozin kinaz alt birimi-2, *KIT* geni ekzon 17 bölgesi tarafından kodlanır. GİST'lerde *KIT* geni aktivasyon ilmeği mutasyonları nadirdir. Çoğu ekzon 17 mutasyonu protein düzeyinde Asn822Lys ile sonuçlanan 2487T→A değişimini içermektedir. Rubin ve arkadaşları N822K ve N822H mutasyonlarını birer olguda raporlamışlardır. Bununla birlikte

bazı olgularda farklı yanlış anlam mutasyonları da tanımlanmıştır. Bunlar Asp816Phe, Asp816Tyr, Asp820Tyr, Asp820Val, Asn822His, Tyr823Asp (118, 123).

Heinrich ve arkadaşları 322 GİST olgusunda 2 tane (%0,6) N822K mutasyonu tanımlamışlardır (120).

Kinoshita ve arkadaşları 124 olguda hiç ekzon 13 mutasyonuna rastlamamışlardır (147). Ailesel GİST’lerde germline D820Y mutasyonu tanımlanmıştır (20). Bununla birlikte bu mutasyon sporadik GİST’lerde tanımlanmamıştır. N822K ve D820Y mutasyonları mekanizması belirsiz olmakla birlikte kinaz altbirimini aktifler (20, 120). Bazı çalışmalarda Asya toplumlarında ekzon 13 ve ekzon 17 mutasyonlarının az olduğu yönünde bulgular sunulmuştur (128, 147).

2.13.5 *KİT* Geni Mutasyonları ile GİST Teşhisi

Bir çok GİST mutasyon durumundan bağımsız olarak yabancı tip GİST’lerde de *KİT* (+)’dir. Bununla birlikte bazı GİST’ler (<%5) özellikle gastrik PDFGRa mutant GİST’ler, *KİT* (-) veya zayıf pozitif olabilirler. Bu olgularda mutasyon analizi GİST teşhisinin konulmasına yardımcı olabilir (152).

2.13.6 *KİT* Geni Mutasyonları ile Prognoz Arasındaki İlişki

KİT negatif tümörlerde GİST spesifik *KİT* mutasyon bulgularının potansiyeli düşüktür. GİST’lerde ekzon 11 mutasyonlarının prognostik değeri yönünde tartışmalar mevcuttur. Bazı çalışmalarda *KİT* mutasyonları, büyük mitotik açıdan aktif ve malign hastalık sonucuyla korele bulunmuştur (116, 128).

Bununla birlikte başka çalışmalarda *KİT* mutasyonlarının GİST’lerde sık rastlanan bir özellik olduğu, malign ve klinik olarak belirti vermeyen iyi huylu tümörlerde de olabileceği bulunmuş (118, 153).

Daha sonra yapılan çalışmalarda *KİT* ekzon 11 mutasyonlarının klinik sonuç ile korele olabileceği gösterilmiş (154). Ekzon 11 delesyonu olan gastrik GİST’lerde, nokta mutasyonu olanlara göre daha maligndirler (17). Ayrıca Trp557-Lys558delesyonunun varlığı malign davranış ile ilişkilidir (143).

Bununla birlikte ince bağırsak *KİT* ekzon 11 delesyonları nokta mutasyonlarına göre daha agresiftir (1119, 155).

Gastrik GİST'lerin 3'*KIT* duplikasyonları iyi huylu klinik davranış ile ilişkilendirilmiştir.

Ekzon 9 duplikasyonları kötü sonuç ile ilişkilidir (156). *KIT* ekzon 13 ve 17 mutasyonları GİST'lerde nadirdir. Çok merkezli çalışmalarda gastrik ekzon 13 mutasyonları GİST'ler gastrik ekzon 17 mutasyonu olanlara göre daha agresiftir. İyi huylu ve kötü huylu GİST'lerde ve farklı gastrointestinal bölge yerleşimli GİST'lerde *KIT* mutasyon dağılımı farklılık göstermektedir. *KIT* ekzon 11 delesyonları, delesyon-insersiyonları ve nokta mutasyonları özofagustan anüse kadar belirlenmiştir (118, 133, 134, 143, 157, 158).

Ekzon 11 mutasyon çeşitleri ile hücre morfolojisi arasında belirgin bir korelasyon gözlenmemektedir. Bununla birlikte *KIT* ekzon 11 mutasyonları daha çok iğsi fenotip göstermektedir (133). Bazı gruplar *KIT* geni ekzon 11 mutasyonları ile agresif klinik davranış arasında ilişki olduğunu raporlamışlardır (116, 128, 130, 131, 159, 160). Bu çalışmalar parafin dokudan izole edilen DNA ile tek zincir konformasyon polimorfizmleri ve/veya ekzon 11 amplifikasyonları ile direk sekanslamaya dayansa da gerçek mutasyon sıklığını eksik gösterebilir. Heinrich ve arkadaşları 1cm'den küçük olan ve mitoz görülmeyen tesadüfen fark edilmiş 13 GİST olgusunun 10'unda (%76,9) farklı araştırmacılar tarafından kötü huylu davranış ile ilişkilendirilen ekzon 11 mutasyon tipini belirlemişler. Bu bilgi *KIT* geni mutasyonlarının GİST'in ilk evrelerinde var olduğunu önermektedir (153). Bu düşünce yapılan gözlemlerde germline ekzon 11 mutasyonlarının hem insanlarda hem de hayvanlarda GİST'e sebep olduğunun gösterilmesi ile desteklenmiştir. Risk sınıflaması yapılmış 275 GİST olgusunda (140'ı yayınlamış olgu) düşük risk grubunda olanların %87,1'inde ekzon 11 mutasyonu vardır (68).

Rubin ve arkadaşları ile Wardelman ve arkadaşlarının çalışmalarında da düşük risk grubunda ekzon 11 mutasyon oranlarının sıklığı gösterilmiş (118, 133).

KIT mutasyonlarının %60'ı 33 kodon barındıran (550-582) ekzon 11'de gerçekleşmektedir (124).

Ekzon 11'de insersiyon, substitüsyon ve delesyon şeklinde pek çok mutasyon tanımlanmıştır. Ancak en yaygın olanı delWK557-558 (%8-25) 'dir. Cerrahi operasyondan sonra *KIT* geni mutasyonları relaps açısından prognostik faktör olarak değerlendirilebilir. *KIT* ekzon 11 delesyonları ve 557-558 kodonlarını etkileyen delesyonlar GİST hastaları için bağımsız kötü prognostik faktör olarak raporlanmış (142, 143, 161).

Ancak buna zıt olarak başka bir çalışmada ekzon 11'in son kısmını (552-561) içeren delesyonların, ekzon 11'in ilk kısmını içeren delesyonlara oranla daha çok malign davranış ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle ekzon 11 mutasyonlarının relaps riski hala tartışmalıdır (162, 163). Ekzon 11 delWK 557-558 genellikle mide yerleşimlidir. Fosforillenmede önemi olan ekzon 11 yerleşimli olan 568Tyr ve 570Tyr delesyonlu olgular da genellikle ince bağırsak yerleşimlidir. Bu yerleşim farklılığı onkojenik *KIT* geni mutasyonlarının GİS'in farklı yerlerinde olduğunu düşündürmektedir. DelWK557-558 mutasyonları n olduğu olgularda küratif sağaltımdan sonraki relaps riski artmıştır. DelWK557-558 ile del568Tyr ve del 557Tyr PFS ve OS açısından farklılık göstermemektedir (164).

Yapılan çalışmalar *KIT* geni mutasyonlarının tümör yerleşimi ile ilişkili olduğu gösterilmiş. Ekzon 9 mutasyonu olan olguların ince bağırsak ve kolon yerleşimli olduğu raporlanmış (164).

KIT ekzon 9 duplikasyonları bağırsaklarda gözlenir (134) ve çok az mide kökenli GİST'lerde görülür (165).

Ekzon 11 mutasyonlarına zıt olarak, Heinrich ve arkadaşlarının 275 olguluk GİST serisinde ekzon 9 mutasyonlarının kötü huylu tümörler arasında (%17,3), yüksek riskli (%3) ve düşük riskli tümörlere (%2,5) göre daha yüksek olduğu raporlanmış. Bu mutasyonların görülmesi ekzon 11 mutasyonlarıyla karşılaştırıldığında intraselüler sinyal yollarında değişim olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle ekzon 9 mutant tümörler kalıtsal olarak farklı ve belkide diğer GİST'lere göre daha agresiftirler. Teoride GİST'lerin progresyonu *KIT* geninde ikincil mutasyonların birikmesi ile ilişkilidir. Örneğin bir tümör ekzon 11 mutasyonu içeriyorsa ve arkasından ekzon 9 delesyonu kazanıyorsa bu tümöre ek bir büyüme avantajı sağlar. Ancak bu fenomen örneklerde gösterilmemiştir (120).

Ekzon 17 mutasyonuna sahip GİST'ler arasında ince barsak kökenliler mide kökenlilere oranla iki kat daha fazla sık rastlanmaktadır. Benzer şekilde ekzon 13 mutasyonu olan GİST'lerde de bağırsak kökenli olanlar çoğunluktadır. *KIT* ekzon 9, 13 ve 17 mutasyonları iğsi hücre morfolojisine sahiptir. Bununla birlikte bu mutasyonlara sahip kötü huylu ince bağırsak GİST'lerinde epiteloid hücre özellikleri sıklıkla raporlanmıştır (123).

İnce bağırsak GİST'lerinde epiteloid morfolojinin malign transformasyon içerdiği düşünülmektedir ve gastrik tümörlerle eşit olduğu düşünülmemelidir (119).

Bazı raporlar *KIT* mutasyon çeşidi ile cinsiyet ve yaş arasında bir ilişki olduğu yönündedir. Ancak bu parametreler arasında bulunan ilişkilerle büyük populasyon tabanlı çalışmalarda karşılaşılmamıştır (154).

Yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilerle *KIT* geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 bölgelerindeki mutasyonlar ile GİST kilinikopatolojik özellikleri ve prognoz arasındaki ilişkiler Lsota ve ark. tarafından tablo 3’de özetlenmiştir.

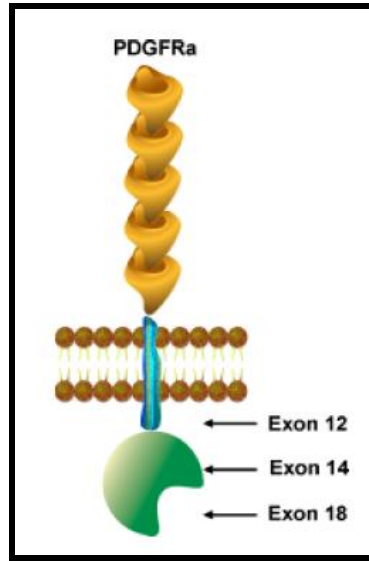
Tablo 3. *KIT* geni mutasyonları ile GİST kilinikopatolojik özellikleri ve prognoz arasındaki ilişkiler (138)

Gen	Mutasyon (Protein Düzeyinde)	Kilinikopatolojik Özellikler	Tümör Tipi	Prognostik Değer
<i>KIT</i> Ekzon 9	Ala502_Tyr503dup	Kuvvetli bir şekilde bağırsak GİST’leri ile ilişkilidir (Mutasyonların >%90 ince bağırsak tümörlerinde tanımlanmıştır.)	Genellikle işi hücreli tümörlerde	Bağırsak GİST’lerinde bir prognostik değeri yoktur.
<i>KIT</i> Ekzon 11	Trp557_Lys558del	Gİ kanalın farklı bölgelerinde oluşan GİST’lerde	İşsi ve epiteloid hücreli tümörlerde	Özellikle gastrik GİST’lerde daha fazla malign davranışı işaret eder.
	Delesyonlar Delesyon-insersiyonlar			
	Substitüsyonlar			Gastrik GİST’lerde daha az malign davranışı işaret eder.
	Duplikasyonlar	Gastrik GİST’lerle ilişkilidir.	Genelde işsi hücreli tümörlerde tanımlanmıştır.	Gastrik GİST’lerde daha az malign davranışı işaret eder.
<i>KIT</i> Ekzon 13	Lys642Glu	Gİ kanalın farklı bölgelerinde oluşan GİST’lerde tanımlanmıştır.		Gastrik GİST’lerde malign davranışı işaret eder.
<i>KIT</i> Ekzon 17	Asn822Lys	Bağırsak GİST’lerinde iki kat daha yaygındır.		Prognostik değeri yoktur.

2.14 PDGFRA Mutasyonları

Yaklaşık %10 oranında *KIT* geni mutasyonu içermeyen GİST’lerde PDGFRA mutasyonları gözlenmektedir. PDGFRA mutasyonlu tümörlerin birçoğu mide yerleşimli (165), yüksek oranda epiteloid fenotip ile ilişkili ve CD 117 ile *KIT* mutant tümörler kadar kuvvetli boyanmazlar (166, 167) .

PDGFRa mutasyonlarıyla en sık ekzon 18'de ardından ekzon 12'de, ekzon 14'de karşılaşılmaktadır (17) (Şekil 10). Bir çok GİST *KIT* VE PDGFRa mutasyonuna sahiptir ve karşılıklı olarak farklılıklar göstermektedir. *KIT* mutasyonu içermeyen tümörler PDGFRa açısından analiz edilmelidir. %10 oranında GİST olgusu CD117 ekprese etsede mutasyon içermemektedir. Bazı GİST'ler CD117 açısından negatiftir ve teşhisinde problemler yaşanmaktadır. Fakat bu tümörler *KIT* ve PDGFRa mutasyonu içerdiği analizlenebilir ve GİST tanısı doğrulanabilir (157, 168, 169) .



Şekil 10. PDGFRa mutasyonlarının şematik gösterimi. Ekzon 12 jukstamembran altbirimi, ekzon 14 ve 18 ise tirozin kinaz altbirimleri (121)

2.15 GİST'LERDE SAĞALTIM

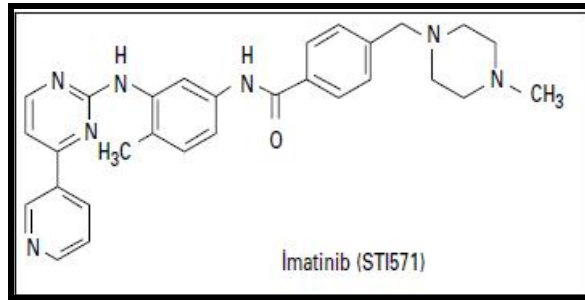
2.15.1 Primer GİST Cerrahisi

Primer GİST'ler için tümörün eksizyonu standart sağaltımdır(170). Cerrahinin ana amacı tümör rüptürüne izin vermeden tümörün tam rezeksiyondur. GİST'ler çok nadir olarak lenf nodlarına metastaz yaptıkları için lenfadenektomiye nadiren gerek duyulur. GİST'ler çok fazla infiltratif olmadıklarından, cerrahi operasyonda negatif cerrahi sınır elde edilmek zor değildir. Bu yüzden midede kısmi rezeksiyon ya da barsakta segmental rezeksiyon sağaltım için yeterli görülmektedir (170). Malign karakterli tümörün tam olarak çıkarıldığı olgularda cerrahi sınırlar mikroskopik olarak negatif olsa bile tümör rekürens olasılığı oldukça yüksektir ve ortalama 19 ay içinde bu rekürens gerçekleşmektedir. Lokal hastalıkta nuks oranı %35

iken, lokal ileri veya yaygın hastalıkta tam rezeksiyon sonrası nuks oranı %90'ı bulmaktadır. Çoğunlukla lokal ya da karaciğer metastazı şeklinde görülebilen nüksler 10-15 yıl sonra bile oluşabileceğinden, tam rezeksiyonun yapıldığı olgular bile takibe alınmaktadır (7, 171). Rezeksiyon sırasındaki ya da öncesindeki tümör rüptürü, sağaltım açısından kötü prognostik bulgudur. Rüptüre olmuş tümörü olan olgularda, multifokal peritonyal tümör pozitifliği olanlarda, yararları kesin olarak gösterilmemiş olsa da adjuvan tedavi uygulanmaktadır (170). GİST'lerde tümör çevresindeki organlar radyasyona çok duyarlı olduklarından radyoterapi seçeneği nadiren kullanılmaktadır (170). Eğer tümörler rezeke edilemiyorlarsa, ortalama sürvi çok kısadır ve 10 ile 20 ay arasında değişir (7).

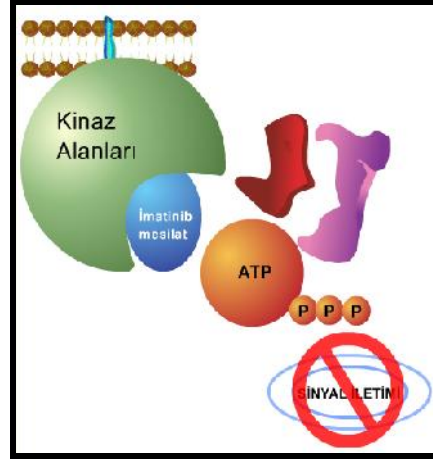
2.15.2 Hedefe Yönelik Sağaltımlar

Malign GİST'ler konvansiyonel sitotoksik tedavilere dirençlidir. 1999 yılından itibaren, sinyal ileti inhibisyonu gibi hedefe yönelik tedaviler, kanserlerin tedavisinde uygulanmaya başlamıştır. GİST'ler hedefe yönelik tedaviler konusunda iyi bir örnektir. GİST'lerin moleküler yapısının aydınlatılması ve *KİT* mutasyonlarının belirlenmesiyle, başlangıçta Bcr-Abl blokajını hedefleyerek kronik myelositik lösemi (KML) tedavisinde kullanılan tirozin kinaz inhibitörü STI-571 (Imatinib mezilat – Gleevec, Glivec (<http://www.novartis.com>)) pre-klinik çalışmalarla GİST'lerde kanser terapisi olarak sinyal iletiminin inhibisyonu üzerinde denenmeye başlanmıştır (Şekil 11).

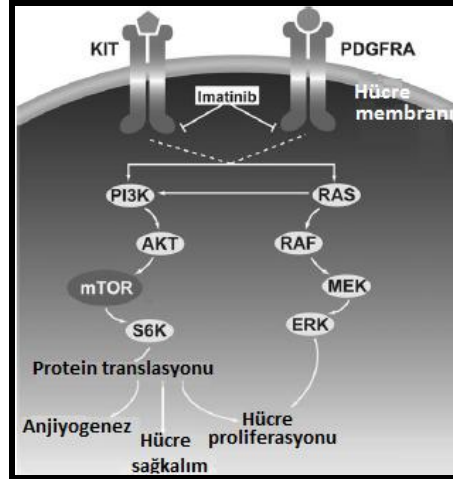


Şekil 11. İmatinib mezilatın kimyasal yapısı (171)

Bu çalışmalarda STI-571'in sadece KML'e spesifik olmadığı anlaşılmıştır. Bu molekül hücre sinyal ileti sisteminde görevli tirozin kinazlardaki (intraselüler ABL kinaz, KİT transmembran reseptörü ve PDGFR reseptörleri) ATP bağlanma bölgelerine bağlanarak KİT otofosforilasyonunu durdurup KİT'e bağımlı hücre proliferasyonu engellenmekte ve hücreleri apoptoza götürmektedir (7) (Şekil 12, 13).



Şekil 12. İmatinib ile KİT kinaz etkileşmesi. İmatinibin KİT kinaz alanının ATP’e bağlanan cebine yerleşmesiyle substratın fosforillenmesi önlenir ve sinyal iletimi durdurulur.



Şekil 13. KİT reseptörü ve imatinib etkileşmesi ile sinyal iletimi. İmatinib inhibisyonu ile azalan hücre proliferasyonu, sağkalımı ve anjiyogenezi (172 numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.)

2000 şubatında, Finlandiya’da ilk GİST hastasına tedavi verilip başarılı olmasının ardından; 2000 temmuz ayında Novartis sponsorluğunda faz-2 çok merkezli çalışmalar başlatıldı. 2002 Şubat ayında, Amerika Birleşik Devletleri “Food and Drug Administration (FDA)” tarafından onaylanan STI-571 (Imatinib mesylate – Glivec), CD117 pozitif, rezeke edilemeyen ve/veya metastatik habis GİST’lerin tedavisinde cerrahi öncesinde veya sonrasında kullanılmaya başlandı (173). Türkiye’de ise İmatinibin GİST’lerde kullanımı için 7 Ocak 2003 tarihinde Sağlık Bakanlığı tarafından ruhsat verilmiştir. İmatinib, GİST tedavisinde mikroskobik metastatik hastalığın da tedavi edileceği ve sağaltım olasılığının

arttırılacağı yönünde etkili, toksisitesi az ve oral kullanımı kolay uygulanan bir ilaç haline gelmiştir.

2.15.3 GİST sağaltımında tümör cevabının belirlenmesi

GİST’lerde sağaltımdan alınan tümör cevabı x-ışınları, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme ile ölçülerek belirlenir. RECIST (Response evaluation Criteria in Solid Tumor) olarak bilinen değerlendirmede tümörün en uzun çapı ölçülerek tümör boyutu değişiklikleri üzerinden yanıt belirlenmesi yapılır. Buna göre tümör cevabı tam yanıt, parsiyel yanıt, progresif hastalık ve stabil hastalık olarak 4 şekilde tanımlanır (174).

- Tam yanıt (TY) : Tüm lezyonların yok olması şeklinde tanımlanır.
- Parsiyel yanıt (PY): Lezyon çapında (lezyonların çaplarının ortalamalarında) %30 azalma.
- Progresif hastalık (PH) : Lezyon çapının (lezyonların çaplarının ortalamalarında) % 20 oranında artma
- Stabil hastalık (SH): Tümör çapında değişiklik olmadığı şeklinde tanımlanır

2.15.4 KİT Geni Mutasyonları ile Imatinib Cevabı Arasındaki İlişki

Bir çok hasta imatinib tedavisinden etkin yararı görmüştür. Bununla birlikte, farklı tirozin kinaz mutasyonlarının imatinib tedavisine yanıtları da farklıdır. Tablo 4’de farklı KİT mutantlarının in vitro ortamda imatinib hassasiyeti ve imatinib sağaltımına cevapları özetlenmiştir.

Tablo 4. Farklı *KIT* mutasyonlarının in vitro ortamda imatinibe hassasiyeti ve imatinib sağaltımına cevabı (138)

Gen	Primer <i>KIT</i> mutasyonu	İmatinib mezilat hassasiyeti
<i>KIT</i> Ekzon 9	Ala502-Tyr503dup	İn vitro ortamda imatinibe karşı hassas. EORT faz 3 çalışmasında %5’inde tam remisyon, %29’unda kısmi yanıt, %47’sinde stabil hastalık, %17’sinde progresif hastalık raporlanmıştır. Yüksek doz rejiminde artmış progresyonsuz sağkalım.
<i>KIT</i> Ekzon 11	Delesyon/delesyon-insersiyon Subsitüsyon Duplikasyon	Çoğu mutant in vitro ortamda imatinibe karşı hassas. Nadir Val559Ile mutasyonu in vitro ortamda imatinibe karşı dirençli. EORT faz 3 çalışmasında: %6’sında tam remisyon, %61’inde kısmi yanıt, ‘25’inde stabil hastalık, %3’ünde progresif hastalık raporlanmıştır.
<i>KIT</i> Ekzon 13	Lys642Glu Glu635Lys	İn vitro ortamda imatinibe hassas. Dokuz olguda kısmi yanıt ve stabil hastalık raporlanmıştır.
<i>KIT</i> Ekzon 17	Asp820Tyr Asn822Lys Asn822His	Asn822Lys ve Asn822His in vitro ortamda imatinibe hassas. Kısmi yanıt Asn820Tyr, Asn822Lys, Asn822His içeren dört mutantta kısmi yanıt raporlanmıştır. Asn822Lys mutantında primer direnç raporlanmıştır.

Klinik gözlemlerde *KIT* ekzon 11’deki mutasyonlarının, *KIT*-WT ya da *KIT* ekzon 9 mutasyonlarına göre, imatinib tedavisine çok daha iyi yanıt verdikleri gözlenmiştir. Bu nedenle benzer terapötik sonuçları elde etmek için *KIT* ekzon 9 mutantlarında daha yüksek imatinib mezilat dozunun kullanımı gerekebilir (175). Hastaların yaklaşık %10 kadarında *KIT* ya da PDGFRA mutasyonlarından herhangi biri yoktur ve bu hastaların imatinib tedavisine yanıtları ise ancak %32 olarak bulunmuştur (176).

İmatinib direnci primer ve sekonder olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Primer direnç imatinib tedavisine hiç yanıt vermeyen veya tedavinin ilk 6 ayında progresyon gösteren olgular için kullanılmaktadır. EORTC çalışmasında primer direnç, hastaların %12’sinde rapor edilmiştir (177).

Sekonder direnç ise, en azından ilk 6 ay tedaviye yanıt veren ancak daha sonra hastalığın progresyon göstermesi şeklinde tanımlanmaktadır. Bu duruma genellikle sonradan kazanılmış sekonder *KIT* ya da PDGFRA mutasyonları neden olmaktadır. Yapısal olarak çoğu

ikincil *KIT* mutasyonları *KIT* ekzon 13 ve 14, ekzon 15, 16 ve 17’de gerçekleşen nokta mutasyonlarıdır (177, 178, 179, 180, 181).

İmatinib tedavisine dirençli ya da imatinibi tolere edemeyen hastalar için ikinci sıra tirozin kinaz inhibitör sağaltımı olarak sunulan SU11248 (sunitinib malat, Pfizer),de multipl tirozin kinaz inhibitörüdür (KİT, PDGFR, vasküler endotelial büyüme faktör reseptörleri, FLT3 veRET reseptör tirozin kinazları) ve 2006 yılında FDA onayı almıştır (182).

2.16 *KIT* MUTASYONLARI VE BİREYSELLEŞTİRİLMİŞ TIP YAKLAŞIMI

Tümörün tam rezeksiyonundan sonra rekürrens riski, tümörün yerleşimine, boyutuna, biyolojik agresifliğine ve genotipine bağlıdır. Bu faktörlere en uygun risk sınıflamasının kullanılmasıyla gereken sağaltım tercihi yapılabilir. Hastaya kullanılacakoptimum imatinib dozunu ve genotipe en uygun ilaç çeşidi seçimini yapabiliriz. Örneğin *KIT* ekzon 9 mutasyonlu hastalar eğer tolere edebiliyorsa yüksek doz imatinib sağaltımı almalı veya *KIT* mutasyonu olmayan olgular sunitinib ile sağaltıma başlamalı. Bu şekilde farmakogenetik-genomik temelli bireye özgü sağaltım planı hastaya, hekime ve ülke ekonomisine olan avantajlarından ötürü başta onkoloji olmak üzere bir çok alanda yaygın bir hale gelmektedir. Bu uygulamalar hekime deneme-yanılma (trial and error) yaklaşımından uzaklaşarak daha net sağaltım planları yapmasını sağlar. Hastaya, maksimum en iyi ilaç cevabının alınabileceği, toksik etkinin en aza indirgendiği sağaltım planları ile zaman-nakit kaybı yaşanmadan daha iyi ve daha erken ilaç yanıtı alınması imkanını sunar. İşe yaramayan ilaçların ülke ekonomisinde oluşturduğu açık, prognostik-prediktif açıdan önem içeren farmakogenetik testler temelli bireye özgü sağaltımlarla biraz olsun kapanabilecektir. Konuyla ilgili herkese avantaj sunan farmakogenetik testlerin kullanılabilirliği her geçen gün artmaktadır. Bu amaçla hastalığa özgü prognostik, prediktif, diyagnostik temelli farmakogenetik testlerin geliştirilmesi için biyobelirteç çalışmaları hızla sürmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 ARAŞTIRMANIN TİPİ

Bu çalışma tanımlayıcı bir araştırmadır.

3.2 ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI

Tümör dokusu örneklerinin parafin bloklarından, moleküler çalışmaya uygun olacak şekilde kesitlerin alınması işlemi DEU Tıp Fakültesi Patoloji ABD’da, tümör dokusu materyalinin alınmasından sonraki tüm moleküler çalışmalar DEU Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Laboratuvarlarında yapılmıştır. Tüm bu işlemler tez önerisi ve etik kurul onayı alındıktan sonra yasal yüksek lisans eğitim süresi içinde yapılmıştır (2009-2011 yılları arasında).

3.3 ARAŞTIRMANIN EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ/ÇALIŞMA GRUPLARI

Bu araştırmanın evrenini 2006-2010 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Patoloji ABD’da GİST tanısı almış ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Onkoloji ABD’da GİST sağaltımı alan olgular oluşturmaktadır. Olguların örneklem grubuna alınma kriteri ise olguların tümör dokusu örneklerinden arşiv materyali yeterli olmasıdır. Arşiv materyali yeterli olmayan dokunun çalışmaya alınamaması dışlama kriteridir. Ancak evren olarak tanımlanan olgulardan arşiv materyali yetersiz olan örnek olmadığı için örneklemimiz 2006-2010 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Patoloji ABD’da GİST tanısı almış ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Onkoloji ABD’da GİST sağaltımı alan tüm olgulardan (65 GİST olgusu) oluşmaktadır. Çalışmamızda kontrol grubu bulunmamaktadır.

3.4 ÇALIŞMA MATERYALİ

Belirlenen kriterlere göre çalışmaya dahil edilen olguların Dokuz Eylül Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşivindeki tümörü represente eden parafin bloklarından elde edilen hematoxilen eozin boyalı peperatlardan tümör yüzdesi değerlendirildikten sonra, tümör dokusu moleküler çalışma için yeterli olan (>%75) bloklar seçilmiştir. Seçilen olguların parafin bloklarından Temel Onkoloji Anabilim Dalı tarafından sağlanan steril 1,5ml hacimli mikrosantrifüj tüplerine (Citotest, Ref.no: 34730015S, Çin) ve polilizinli lamlara (Isotherm objektträger ca.75 x 25mm/ 3x 1 inch Geputzt/Gebrauchsfertig Positive charged, Almanya) 5 mikronluk kesitler alınmıştır.

3.5 ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ

Klinik ve patolojik değerlendirme kapsamına alınan veriler; olguların yaşı, cinsiyeti, evresi, tümör yerleşimi, tümör boyutu olarak en geniş çap, immünohistokimyasal özelliği KİT (CD117), CD34, SMA, desmin, S-100, Ki-67, tümörde mitoz sayısı, hücre tipi (iğsi, epiteloid, mikst), risk grubu, patolojik tanı tarihi, metastaz durumu, metastaz yerleşimi, kemoterapi alınıp alınmama durumu, kemoterapi alındıysa başlama tarihi, kemoterapi çeşidi, tedaviye verilen en iyi yanıt, toksisite, progresyon gelişip gelişmeme durumu, progresyon görülmüşse tarihi, hastanın son izlem durumu ve tarihi, ölüm var ise ölüm tarihi bağımsız değişkenlerdir. Olgu tümör dokularının moleküler analizi sonucu elde edilecek bilgiler *KİT* geni genel mutasyon durumu, *KİT* geni ekzon 9 mutasyon durumu ve çeşidi, *KİT* geni ekzon 11 mutasyon durumu ve çeşidi, *KİT* geni ekzon 13 mutasyon durumu ve çeşidi, *KİT* geni ekzon 17 mutasyon durumu ve çeşidi ise bağımlı değişkenlerdir.

3.6 VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

3.6.1 İMMÜNHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMA

Tümör dokuları tanı sürecinde rutin olarak CD117 (KİT proto-onkogeni protein ürünü), CD34, SMA (düz kas aktini), desmin, S-100 proteini ve Ki-67 antikoru ile immünohistokimyasal olarak boyandı ve değerlendirildi. Çalışma grubundaki olguların immünohistokimyasal profil bilgileri patoloji raporlarından alınmıştır.

İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü: İmmünohistokimyasal inceleme için, her olgu için tümörü en iyi örnekleyen dokuya ait blok seçilerek, %10'luk formalin tesbitli, parafine gömülü dokulardan poly-L-lysin ile kaplı lamlara hazırlanan 5 µm kalınlıktaki kesitler kullanıldı. Hazırlanan kesitler deparafinize, rehidrate edilmiştir. Daha sonra %3'lük H₂O₂'de 15 dakika uygulanarak endojen peroksidaz aktivitesi bloke edilmiştir. Hidrojen peroksit sürecini takip eden immünohistokimyasal boyama işlemi tam otomatik immünohistokimya boyama cihazında (Thermo Scientific, Lab Vision Autostainer) gerçekleştirildi. İmmünboyama; peroksidaz ile işaretlenmiş, streptavidin-biotin yöntemi ile CD117 (Polyclonal rabbit anti-human, Dako, Danimarka, dilüsyon: 1:400), SMA (Monoclonal mouse anti-human-Clone 1A4, Dako, Danimarka, dilüsyon: 1:400), CD34 (Clone QBend/10, Neomarkers, USA, dilüsyon: 1:200), S-100 (Rabbit polyclonal, Spring Bioscience Corp.,USA, dilüsyon: 1:200), desmin (Desmin rabbit polyclonal, Spring Bioscience Corp.,USA, dilüsyon: 1:200), Ki-67 antikorları (Rabbit monoclonal antibody-

clone SP6, Neomarkers, USA, dilüsyon: 1:200) kullanılarak yapıldı. Işık mikroskobu ile olguların immünohistokimya profili belirlendi ve kamera ile görüntülendi (Işık mikroskobu: Olympus Corporation Model BX51TF, Japonya, SN:3J08677) (Kamera: Olympus Corporation Model DP70, Japonya).

İmmünohistokimyasal Değerlendirme:

CD117 için değerlendirme:

CD117 açısından boyanmanın değerlendirilmesinde boyanma yaygınlığı ve boyanma yoğunluğu göz önünde bulundurulur.

- Boyanma yaygınlığı :
- % 0 – 10
 - % 10 – 50
 - > 50

- Boyanma yoğunluğu :
- +
 - ++
 - +++

Sonuçlar :

- Yaygınlık 0-10 arasında, yoğunluk + ise negatif kabul edilir.
- Yaygınlık %50'den az ve yoğunluk + veya ++ ise fokal pozitif kabul edilir.
- Yaygınlık > % 50 ve yoğunluk ++ / +++ ise GİST tanısı alır.

CD34, S-100, Desmin, SMA için değerlendirme:

- % 0- 10 : Negatif kabul edilir.
- % 10 – 50 : Fokal pozitif kabul edilir.
- >% 50 : Pozitif kabul edilir.

Ki-67 için değerlendirme: %10' un üzerindeki yerler yüksek proliferasyon indeksi olarak kabul edilir (183, 184, 185, 186)

3.6.2 KLİNİK DEĞERLENDİRME

Tümör Yanıt Değerlendirmesi: Çalışma grubundaki sağaltım alan olguların tümör yanıt değerlendirilmesi “Response Evaluation Criteria in Solid Tumors” (RECIST) ’e göre yapıldı (187). Bu yanıt değerlendirmesine göre tam yanıt, kısmi yanıt, stabil hastalık sağaltıma yanıt veren grup içinde; progresif hastalık ise sağaltıma yanıt vermeyen grup içinde kabul edildi. Tümör toksisite değerlendirmesi ise “Common Toxicity Criteria” parametrelerine göre yapıldı. Sağkalım değerlendirmelerinde tanıdan nüks gelişinceye kadar geçen süre hastalıksız sağkalım olarak değerlendirildi. Progresyonsuz sağkalım tedavi başlangıç tarihinden progresyona kadar geçen süre olarak değerlendirildi. Tanıdan ölüme kadar geçen süre ise genel sağkalım olarak değerlendirildi.

3.6.3 MOLEKÜLER ANALİZ

3.6.3.1 MOLEKÜLER ANALİZ LABORATUVARI GENEL ÇALIŞMA KURALLARI

Moleküler analizlerin yapıldığı laboratuarlardaki çalışmalar dikkat ve temizlik gerektirmektedir. Çalışma sırasındaki temizlik kuralları, işlem basamaklarında dikkat edilecek noktalar çalışmanın verimi ve doğruluğu açısından önem taşımaktadır. Bu noktalar aşağıda açıklanmıştır.

3.6.3.1.1 Genel Çalışma Kuralları

Laboratuarda çalışmaya başlamadan önce hem örneğin bizim tarafımızdan kontamine edilmemesi, hem de bizim örnek ile kontamine olmamız açısından kişisel koruyucu donanımlarının kullanılması gerekmektedir. Bunlar; uygun bir laboratuvar önlüğü tercihen uzun kollu, tek kullanımlık pudrasız eldiven, bone, maske ve koruyucu gözlüklerdir. Her çalışmadan önce laboratuvar tezgahı %10’luk sodyum hipoklorit (NaClO) ile ardından %70’lik alkol ile silinerek temizlenir. Çalışma alanı temiz bir alüminyum folyo serilerek belirlenir. Çalışma alanına konulacak otomatik pipetlerle birlikte her türlü malzeme %70’lik alkol ile silinerek çalışma alanına konulur. Her çalışmanın bitiminde kullanılan malzemeler yine aynı şekilde temizlenerek yerine kaldırılır. En son tezgah aynı şekilde silinerek ortamdan çıkılır. Çalışma bitiminde kullanılan otomatik pipetler örneklerin bulunduğu tüplerin içine sokulup çıkarılmasından dolayı %10’luk sodyum hipoklorit ile ardından %70’lik alkol ile silinerek temizlenir ve kaldırılır. Kullanılan cihazlar çalışmaya başlanmadan önce %70’lik alkol ile silinmeli; çalışma bitiminde yine aynı şekilde silinerek temizlenir.

Çalışılan kimyasallar ve kit içeriğindeki reaktifler hakkında daha fazla bilgi almak için kullanılan kimyasalların güvenlik bilgi formları (material safety data sheet, MSDS) edinilmelidir. Bu formlar satın alınan kit veya kimyasal madde ile beraber getirilebilirken, satın alınan malzeme ile birlikte temin edilmediği durumlarda da internet ortamında kolaylıkla bulunabilir.

3.6.3.1.2 Sterilizasyon

Kullanılan mikrosantrifüj tüpleri, penset, pipet uçları, kullanılacak gazlı bez gibi malzemeler alüminyum folyo ile sarılıp otoklavda (Hirayama HMC, Japonya) 121°C’de 20 dk bekletilerek steril edilir. Steril kullanılması gereken malzemelerin sterilliğinin bozulmadığına emin olunduktan sonra kullanılmalı. Yüzey temizliği %10’luk sodyum hipoklorit ile ardından %70’lik alkol ile silinerek yapılır. Kullanılan cihazların sterilizasyonu %10’luk sodyum hipoklorit, ardından %70’lik etanol ve ardından steril dH₂O (distile su) ile silinerek yapılır. PZR için ayrılmış ortamdaki oda havası, ve çalışmada kullanılacak malzemeler çalışmadan önce ultraviyole (UV) ışık kullanılarak steril edilmelidir.

3.6.3.1.3 Atıkların Yok Edilmesi

Kullanılan pipet uçları, mikrosantrifüj tüpleri, konik tüpler..vb atıklar kırmızı renkli tıbbi atık çöp kutularına atılmalıdır. Kesici ve delici her türlü malzemeler özel plastikten yapılmış kapaklı sarı renkli çöp kutularına atılmalıdır.

3.6.3.1.4 Cam Eşyanın Yıkınması

Günlük kullanımda olan malzemeler şebeke suyu ile çalkalanır ve bulaşık makinesinde yıkanır. Ardından şebeke suyu kökenli iyonların cam malzemelerin üzerinde kalmasının önlenmesi için dH₂O ortamlarından geçirilir. Bu amaçla bulaşık makinesinden çıkan cam malzemeler bir saat dH₂O içinde bekletilir. Daha sonra tekrar bir dH₂O ortamı hazırlanır ve cam malzemeler bir saat daha yeni temiz bir dH₂O ortamında bekletilir.

3.6.3.1.5 Kontaminasyon Riskinin Bertarafı

Çalışmada örneklerin birbiri ile karışmaması ve çapraz kontaminasyon riskinin en aza indirgenmesi amacıyla mümkün olduğunca az sayıda örneklerden oluşan gruplar şeklinde çalışılması yeğlenmelidir. Çalışmaya alınan örnek tüplerinin, filtreli kolonların örnekleri

temsil edecek şekilde dikkatlice numaralandırılmasıyla örneklerin karıştırılması sorununun önüne geçilmelidir. Her çalışmada filtreli pipet uçlarının kullanılması otomatik pipet ile oluşacak kontaminasyon riskini yok edecektir. Kullanılacak tezgahın, cihazların, malzemelerin, otomatik pipetlerin çalışmadan önce alkol ile; çalışma bitiminde de sırasıyla %10'luk sodyum hipoklorit, %70'lik alkol ve steril dH₂O (cihazlar için) ile silinmesi sonucu dış çevreden kaynaklanabilecek kontaminasyon riski önlenmelidir. Çalışmada kullanılacak tezgahın temiz alüminyum folyo ile belirlenmesi ve tüm çalışma malzemelerinin, örneklerin bu alan dışına çıkarılmaması da dış çevre kaynaklı kontaminasyon açısından önemlidir. Steril olarak kullanılması gereken malzemelerin sterilizasyonunun yapılması ve kullanım sırasında bu sterilliğin kaybolmadığından emin olarak çalışılması önemlidir. Her çalışma setinde bir negatif kontrol bulunmalıdır.

3.6.3.2 MOLEKÜLER ANALİZ YÖNTEMLERİ

Klasik Sanger DNA dizileme yöntemi nükleik asit baz sırasını, kalıtsal veya rastlantısal genetik değişimlerin açığa çıkarılması için altın standarttır. Ancak bu yöntem çok basamaklı ve emek-yoğun bir süreçtir. Bu basamaklar aşağıda sıralanmıştır.

1. Parafin dokudan DNA izolasyonu (Kolon tabanlı)
2. Ekzon bölgelerinin PZR ile çoğaltılması
3. PZR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforezi ile kalite kontrolü
4. PZR ürünlerinin saflaştırılması
5. Saf PZR ürünleriyle sekanslama PZR
6. Etanol çöktürmesi ile sekans ürünlerinin saflaştırılması
7. Sekans analizi
8. Kromatogramların değerlendirilmesi

3.6.3.2.1 Parafin Dokudan DNA İzolasyonu (Kolon Tabanlı)

Kolon tabanlı nükleik asit ekstraksiyonu, nükleik asitlerin kolayca ayrılmasını sağlayan katı faz ekstraksiyon metodudur. Katı faz nükleik asit ekstraksiyonu daha çok ticari ekstraksiyon kitlerinde kullanılan bir yöntem olup spin kolon kullanılarak merkezkaç kuvveti altında uygulanır. Bu yöntem konvansiyonel nükleik asit ekstraksiyonu yöntemlerine (Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction, Alkaline Extraction Method,

Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) extraction method, Ethidium Bromide (EtBr)-Cesium Chloride (CsCl) Gradient Centrifugation, Purification of Poly (A)⁺ RNA by Oligp(dT)-Cellulose Chromatography) göre daha hızlı ve etkilidir. Bu metot hücrenin parçalanması, nükleik asitlerin kolona adsorbsiyonu, yıkama ve elüsyon olmak üzere dört basamak içerir (188).

İlk olarak hücrenin parçalanarak nükleik asit içeriğinin alınabilmesi için tümör dokusu proteinaz-k enzimi ile uygun sıcaklıkta (proteinaz-k enziminin optimum çalışma sıcaklığı 56C'dir.) muamele edilir. Protease K, endopeptidase K olarak da adlandırılan proteinaz-k enzimi (EC 3.4.21.64) geniş spektrumlu bir serin proteazdır. Alifatik ve aromatik aminoasitlerin karboksil grubunun bitişiğindeki peptit bağlarını kırarak hücre membran proteinlerinin parçalanmasını sağlayarak hücre bütünlüğünü bozar. Ayrıca proteinaz-k nükleik asitlerin ortamdaki diğer proteinlerle kontamine olmasını ve nükleazlardan korunmasını sağlar. Ardından hücre lizatının kolona aktarılmasıyla nükleik asitlerin katı faza (silika veya cam partiküllerinden oluşan bir faz gibi) geçmesi işlemi gerçekleştirilir. Üçüncü basamak olan kolonun yıkanması ile nükleik asitler ortamdaki proteinlerden arındırılır. En son işlem ise kolonda tutulan nükleik asitlerin Tris- etilen daimin tetra asit (EDTA) tamponu veya DNAaz- RNAaz'dan arındırılmış H₂O (su) ile elüe edilmesidir (189).

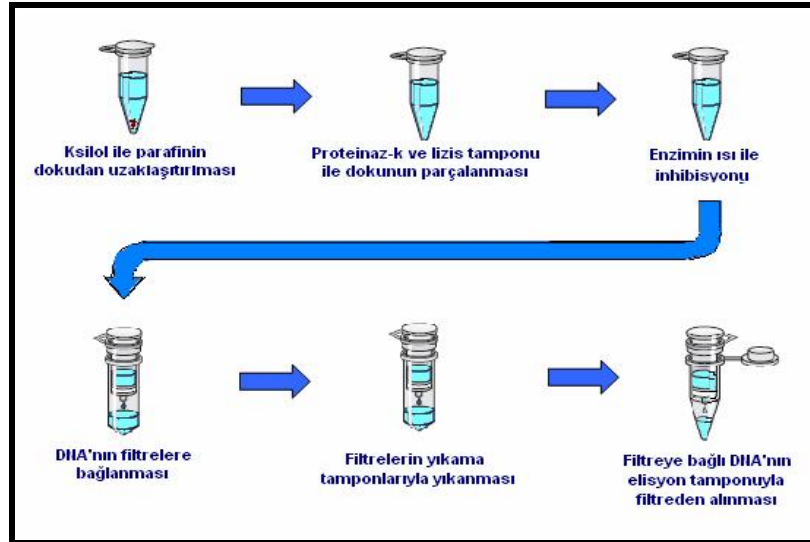
3.6.3.2.1.1 DNA İzolasyonunda Kullanılan Malzeme ve Cihazlar:

- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit [Qiagen, kat. no (katalog numarası): 56404, Hilden, Almanya]
 - Filtreli kolonlar (DNA'nın kolonda tutuklanması aşamasında)
 - Koleksiyon tüpleri (2 ml hacimli) (DNA'nın kolonda tutuklanması aşamasında)
 - ATL tamponu (Hücrenin parçalanması işleminde)
 - AL tamponu (DNA'nın kolona bağlanması aşamasında)
 - AW1 tamponu (DNA'nın safsızlıklardan arındırılması için yıkamada)
 - AW2 tamponu (DNA'nın safsızlıklardan arındırılması için yıkama işleminde)
 - ATE tamponu (DNA'nın kolondan elüsyonunda)
 - Proteinaz K (Hücrenin parçalanması işleminde)
- Ksilol (moleküler çalışmalar için) (Merck KGaA, kat no: 1.08681.2500, Almanya)
- Etanol (saf) (Sigma-Aldrich, kat. no: 32221, Almanya)

- Mikrosantrifüj tüpü (1,5 mililitre/ml hacimli) [Citotest, ref.no (referans numarası): 34730015S, Çin]
- Plastik konik tüp (12 ml hacimli) (Becton Dickinson Falcon, 4-2097-8, Amerika Birleşik Devletleri)
- Steril filtreli pipet ucu (Greiner Bio-one Filter Tip FT 1000, FT100, FT10)
- Otomatik pipetler(Eppendorf, kat. no: 022472101, GmbH Hamburg, Almanya)
- Vorteks (Heidolph Top Mix 94323, Bioblock Scientific, seri no: 54119, Almanya)
- Kuru ısı bloğu (Eppendorf Thermomixer Compact, seri no: 535YP233107, Almanya)
- Santrifüj (Eppendorf, seri no: 5452Y0451206, Almanya)
- Atık kabı

DNA izolasyonu spin kolon tabanlı nükleik asit ekstraksiyon (katı faz nükleik asit ekstraksiyonu) yöntemi esas alınarak geliştirilmiş ticari parafin dokudan DNA ekstraksiyon kiti ile yapılmıştır. (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, Qiagen, Cat. No: 56404, Hilden, Germany)

DNA izolasyonu QIAamp DNA FFPE Tissue Kitinin kullanıcı kılavuzundaki protokol esas alınarak yapılmıştır (190). DNA izolasyonu için iş akışı şekil 14'te verilmiştir.



Şekil 14. DNA izolasyonu iş akış şeması

3.6.3.2.1.2 DNA İzolasyonu İşlem Basamakları

1. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınan tümör dokusu kesitlerinin üzerine 1 ml ksilol konuldu.
2. Parafinin erimesi için tüp yaklaşık 10 saniye (sn) kadar dikkatlice vorteks ile çalkalandı.
3. Vortekslenen doku kesitleri dönme hızı 13500 rpm'e (revolutions or rotations per minute) ayarlanmış santrifüjde 2 dakika (dk) döndürüldü.
4. Santrifüj sonrası üst fazda kalan ksilol dikkatli bir şekilde çekildi ve atıldı.
5. Pelletin üzerine 1 ml etanol konuldu.
6. Dikkatlice 10 sn kadar vorteks ile çalkalandı.
7. Vortekslenen doku kesiti dönme hızı 13500 rpm'e ayarlanmış santrifüjde 2 dk döndürüldü.
8. Santrifüj sonrası üst fazda kalan etanol dikkatli bir şekilde çekildi ve atıldı.
9. Tüpün dibinde kalabilen etanol 37°C'ye ayarlanmış kuru ısı bloğunda uçuruldu.
10. Dokuların parçalanması için proteinaz-k ve ATL Tamponu karışımı hazırlandı.
11. Hazırlanacak karışıma uygun hacimde bir tüpe; her örnek tüpü için 180 µL ATL tamponu ve 20 µL proteinaz-k enzimi içerecek şekilde karışım hazırlandı.
12. Dokunun dibindeki etanolun uçtuğunu görüldükten sonra hazırlanılan proteinaz-k ve ATL tamponu karışımından 200 µL konuldu ve otomatik pipet ile çek-bırak işlemi yapılarak homojen dağılım sağlandı.
13. Örnekler proteinaz-k enziminin optimum aktivite gösterdiği 56 °C'de kuru ısı bloğunda 1saat boyunca inkübe edildi. (Parçalanmadığı gözlenen dokular için parçalanmanın olduğu gözlenenene kadar ek süre verildi.)
14. Doku parçalanması gözlendikten sonra enzimin inaktif olması için 90 °C 'ye ayarlanmış kuru ısı bloğunda 1 saat inkübe edildi.
15. Isı ile yapılan tüm inkübasyon işlemlerinden sonra santrifüj ile minik bir döndürme işlemi (8000 rpm' de 10 sn) uygulanarak tüp çeperindeki örnek damlacıkları dibe çekildi.
16. Örneklerin üzerine 200 µL AL tamponundan konuldu ve homojen dağılım için vorteks ile çalkalandı.
17. Örneklerin üzerine 200 µL etanol konuldu ve homojen dağılım için vorteks ile çalkalandı.
18. Mikrosantrifüj tüpünün içindeki örnekler QIAamp DNA FFPE Tissue Kitinin içinden çıkan filtreli koleksiyon tüplerine alındı.

19. Örneklerin konulduğu filtreli koleksiyon tüpleri dönme hızı 8000 rpm'e ayarlanmış santrifüjde 1 dk döndürüldü.
20. Santrifüj sonrası alta geçen sıvı fazın uzaklaştırılması için alttaki koleksiyon tüpleri atıldı ve filtreler yeni koleksiyon tüplerine geçirildi.
21. Filtrelerin üzerine 500 µL AW1 tamponu konuldu.
22. Örnek tüpleri dönme hızı 8000 rpm'e ayarlanmış santrifüjde 1 dk döndürüldü.
23. Santrifüj sonrası alttaki koleksiyon tüpleri atıldı ve filtreler yeni koleksiyon tüplerine geçirildi.
24. Filtrelerin üzerine 500 µL AW2 tamponu konuldu.
25. Örnek tüpleri dönme hızı 8000 rpm'e ayarlanmış santrifüjde 1 dk döndürüldü.
26. Santrifüj sonrası alttaki koleksiyon tüpleri atıldı ve filtreler yeni koleksiyon tüplerine geçirildi.
27. Örnek tüpleri dönme hızı 14000 rpm'e ayarlanmış santrifüjde 3 dk döndürüldü.
28. Alttaki koleksiyon tüpleri atıldı ve filtreler steril 1.5ml hacili mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
29. Filtrelerin tam ortasına gelecek şekilde 50 µL elüsyon tamponu konuldu.
30. Elüsyon tamponunun filtreye iyi bir şekilde nüfuz etmesi için oda ısısında 1 dk inkübe edildi.
31. Örnek tüpleri dönme hızı 14000 rpm'e ayarlanmış santrifüjde 1dk döndürüldü ve filtreler atıldı.
32. Mikrosantrifüj tüpünde toplanan DNA ile bir sonraki basamaklar yapıldı veya hemen işleme alınmayacak örnekler ısısı -20°C (Celcius)'ye ayarlanmış soğutucuda saklandı.

3.6.3.2.1.3 DNA Ekstraktının Spektrofotometrik Olarak Kalite Kontrolü

İzole edilen DNA ekstraktında DNA konsantrasyonunun miktarı ve diğer maddelerin varlığı bilinmelidir. Özellikle sonraki PZR aşamasında düzgün bir amplifikasyonun elde edilebilmesi için bu önemlidir. Çeşitli DNA ölçüm yöntemleri vardır. Spektrofotometre, slot blot, kantitatif PZR bunlardan bazılarıdır. Spektrofotometre bunlardan en yaygını ve ucuz olanıdır. Spektrofotometre ile DNA 260 nm (A260) ve 280 nm (A280) dalga boylarında ölçülür. Bu yöntemin temeli DNA'nın 260 nm UV dalga boyunda en fazla absorbanı göstermesinden ileri gelir. A280'deki ölçüm ise örneğin içindeki proteinleri, fenollerini belirler. Saf DNA örneklerinin A260 / A280 oranı 1,8 ile 2,0 arasında olmalıdır. Eğer bir protein veya

fenolden kaynaklanan bir kontaminasyonun söz konusu olması durumunda bu değerler azalacak ve doğru bir DNA kantitasyonu yapmak mümkün olmayacaktır. Elde edilen DNA ekstraktlarının konsantrasyon ölçümü bu teknikle ölçüm yapan NanoDrop2000C ile yapılmıştır (191, 192, 193).

3.6.3.2.1.4 Güçlük ve Sınırlılıklar

Parafin dokudan DNA izolasyonu ve bunun moleküler yöntemlerde kullanımı güçlükler içermektedir. Özellikle cerrahi operasyon sonucu alınan dokunun moleküler çalışmalara uygun şekilde işlem görmemesi izole edilen DNA'nın kalitesini etkilemektedir. Dokuların uygun koşullarda ve moleküler çalışmalara uygun olarak saptanmış bekleme sürelerine bağlı kalınmadan parafinlenmesi çalışmalardaki başarı oranlarını yaklaşık %50 oranında azaltmaktadır. DNA izolasyonundaki parafinsizleştirme sırasında parafinin erimemesinin gözlenmesi üzerine arttırılan alkol basamakları sonrası ksilolun uzaklaştırılamaması, PZR analiz basamaklarında inhibitör olarak görev yapmasını sağlamaktadır. Aynı durum etanol içinde geçerlidir. Tamamen uçurulmaması örnek içinde etanol kalması, sonraki PZR'nin inhibisyonuna neden olabilmektedir. Enzim basamaklarında kullanılan enzimin aktivitesini kaybetmemesi için buz/soğuk blok üzerinde çalışılmalıdır. Aktivitesi kaybolan enzim dokunun parçalanamamasını ve DNA'ya ulaşılmasını sağlamaktadır.

Parafinsizleştirme ve yıkama basamaklarında örnek kaybı kaçınılmaz olabilmektedir.

Pipetleme basamakları doğru hacimlerin reaksiyon karışımlarına eklenmesi için kalibrasyonu yapılmış pipetlerle ve kontaminasyonu önlemek amacıyla filtreli pipet uçlarıyla çok dikkatli bir şekilde yapılmalıdır. Kontaminasyonun önlenmesi açısından dikkat edilecek diğer bir nokta ise örneklerin tek tek işlenmesidir.

3.6.3.2.2 Ekzon Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle Çoğaltılması

1985'te Kary Mullis tarafından bulunan polimeraz zincir reaksiyonu herhangi bir organizmaya ait DNA molekülünde ilgilenilen gen bölgelerinin in vitro çoğaltılmasını sağlayan enzimatik DNA sentez yöntemidir. PZR reaksiyonunun gerçekleştirilmesi için kalıp DNA molekülü, DNA'da ilgilenilen bölgeyi çoğaltmaya uygun olarak tasarlanmış primerler, deoksिनükleotidler(dNTP), DNA polimeraz enzimi ve magnezyum (Mg^{2+}) gereklidir. PZR

süreci arka arkaya tekrarlanan pcr döngülerinden oluşur. Her bir PZR döngüsü denatürasyon, tavlama (bağlanma) ve uzama adı verilen 3 basamağa oluşur.

Denatürasyon, çift iplikli kalıp DNA zincirini bir arada tutan hidrojen bağlarının yüksek sıcaklıkta denatürasyonu ve primer bağlanmasına olanak veren tek iplikli kalıp DNA zincirlerinin oluşumudur.

Bağlanma, hedef bölgelere özgü primerlerin uygun bağlanma sıcaklığında DNA'ya bağlanmasıdır.

Uzama basamağı ise Taq polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık olan 72 °C'de primerlerin 5'→3' yönde uzamasıyla tek iplikli DNA'ya komplementer DNA'nın oluşması işlemidir (194).

Günümüzde PZR işlemi prenatal tanıda, organ transplantasyonu için doku tanımlanmasında, onkogen değişikliklerinin tanımlanmasında, ilaca cevabı ve prognozu öngören farmakogenetik çalışmalarında, enfeksiyöz hastalığa sebep olan organizmaların belirlenmesi ve karakterizasyonunda, adli tıpta ve çok çeşitli araştırma konularında yaygın olarak kullanılır.

3.6.3.2.2.1 PZR'de Kullanılan Malzeme ve Cihazlar:

- *KIT* geni ekson 9, 11, 13, 17 bölgelerini çoğaltmaya yönelik tasarlanan ileri (forward-F) ve geri (reverse-R) primerler (9F, 9R,10-11F, 10-11R,12-13F, 12-13R, 13F, 13R, 17F, 17R) (TIB MOLBIOL, kat no: 1199776, Berlin, Almanya)
- Tag DNA Polymerase, dNTPack 4x250U (Kat. no: 04 728 882 001)(Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya)
Kit içeriği: Taq DNA polimeraz (5 U/_l), MgCl₂ içeren pcr reaksiyon tamponu (10X konsantrasyonunda, PZR için nükleotid karışımı).
- DNAaz ve RNAaz'dan arındırılmış H₂O (Pcr grade)(Roche, kat. no: 03315843001, Indianapolis, Amerika Birleşik Devletleri)
- Mikrosantrifüj tüpü (1,5 ml hacminde) (Citotest, ref.no: 34730015S, Çin)
- Steril filtreli pipet ucu (Greiner Bio-one Filter Tip FT 1000, FT100, FT10)
- Otomatik pipetler(Eppendorf, kat. no: 022472101, GmbH Hamburg, Almanya)
- Santrifüj (Eppendorf, seri no: 5452Y0451206, Almanya)

- Vorteks (Heidolph Top Mix 94323, Bioblock Scientific, seri no:54119, Almanya)
- Isı çevrimleyici “Thermal cycler”(Techne TC-3000, kat no: FTC/02, İngiltere)
- Soğuk blok veya buz
- Atık kabı

3.6.3.2.2.2 PZR İşlem Basamakları

PZR işleminde kullanılacak Tag DNA Polymerase, dNTPack kullanıcı kılavuzundaki PZR karışımlarının hazırlık protokolü esas alınarak reaksiyon karışımları hazırlandı (195). PZR iş akışı şekil 15’de özetlenmiştir.

Çalışılacak örneklerin birden fazla olmasından ötürü bir örnek tüpünde PZR için gerekli olan tüm bileşenleri içeren reaksiyon karışımı ikiye bölünerek hazırlandı. Bu şekilde reaksiyon hazırlığı sırasında Taq DNA polimeraz enzimin primerler ve kalıp DNA ile etkileşime geçmesi ve ısıya maruz kalmaması sağlandı. Bu nedenle A ve B diye iki farklı ana karışım hazırlandı.

1. Ana karışım-A'nın hazırlanması



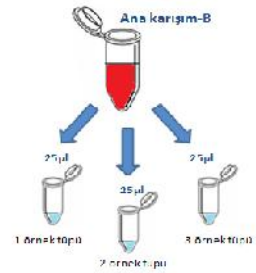
2. Ana karışım-A'nın örnek tüplerine dağıtılması



3. Ana karışım-B'nin hazırlanması



4. Ana karışım-B'nin dağıtılması



5. Örnek DNA'larının PZR tüplerine dağıtılması



6. Örneklerin PZR cihazına verilmesi



Şekil 15. PZR iş akış şeması

1. İlk olarak Ana karışım-A hazırlandı.

A) Ana Karışım-A Hazırlığı

A1. Karışım içine konulacak reaktifler buz üzerinde çözündürülür.

A2. Çoğaltılacak gen bölgesine özgü 1-6 µM konsantrasyonlarında olacak şekilde primer dilüsyonları yapıldı.

*PZR işlemlerinde kullanılan primerler *KİT* geni ekzon 9,11,13 ve 17 bölgelerini çoğaltıcak ve dizileyecek şekilde tasarlandı. İleri, geri (Forward, Reverse) primer dizileri 5'→3' yönünde aşağıda belirtilmektedir.

Tablo 5. *KİT* geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 bölgelerine özgü tasarlanan primerler (DEU) (bç: baz çifti, F: Forward, R: reverse)

Hedef Bölge	Primer	İleri (F) ve Geri (R) Primerler (5'→3')	Pcr ürün uzunluk (bç)	Erime sıcaklığı (°C)
<i>KİT</i> ekzon 9	CK9-F CK9-R	F: GACATTTTCTGTTGATTATGAACCTC R: CATGGTCAATGTTGGAATGAAC	405	55,1 54,6
<i>KİT</i> ekzon 10_11	CK10_11-F CK10_11-R	F: ACATAGCTTTGCATCCTGCC R: TGGCAAACCTATCAAAAGGG	593	56,6 56,2
<i>KİT</i> ekzon 11	CK11-F CK11-R	F: CCAGAGTGCTCTAATGACTGAGA R: AAACAAAGGAAGCCACTGGA	281	54,2 56,6
<i>KİT</i> ekzon 12_13	CK12_13-F CK12_13-R	F: CCCCTTTTGATAGGTTTGCC R: GCAAGAGAGAACAACAGTCTGG	599	57,2 55,6
<i>KİT</i> ekzon 13	CK13-F CK13-R	F: TACTGCATGCGCTTGACATC R: TAATCTAGCATTGCCAAATCA	263	56,4 52,6
<i>KİT</i> ekzon 17	CK17-F CK17-R	F: CATCATTCAAGGCGTACTTTTG R: TGCAGGACTGTCAAGCAGAG	327	55,6 56,6

*Final karışımındaki primer konsantrasyon aralığı 0,1 – 0,6 µM konsantrasyonunda olması gerektiği için; reaksiyon ana karışımına konulmak üzere hazırlanan primer solüsyonları 1-6 µM konsantrasyonlarında olacak şekilde dilüe edildi.

Primer dilüsyonlarının yapılması: Liyofilize halde alınan ileri ve geri primerler ticari firmanın güvenlik bilgi formlarındaki önerileri doğrultusunda son konsantrasyonu 50 µM (ana stok) olacak şekilde sulandırıldı. Bu 50 µM konsantrasyondaki primerlerden (CK9-F, CK9-R, CK10_11-F, CK10_11-R, CK11-F, CK11-R, CK12_13-F, CK12_13-R, CK13-F, CK13-R, CK17-F, CK17-R) yola çıkılarak 1, 2, 3, 4, 5, 6 µM'lık, son hacmi 100 µl olan primer dilüsyonları hazırlandı (Tablo 6).

Tablo 6. Primer sulandırmada kullanılan hacimler ve konsantrasyonlar

50 μM'lık Stok F/R Primerden Alınacak Hacim	Solusyona Konulacak H₂O Hacmi	İstenilen Primer Konsantrasyonu
2 μ L	98 μ L	1 μ M
4 μ L	96 μ L	2 μ M
6 μ L	94 μ L	3 μ M
8 μ L	92 μ L	4 μ M
10 μ L	90 μ L	5 μ M
12 μ L	88 μ L	6 μ M

A3. Soğuk blok üzerinde steril mikrosantrifüj tüpüne ana karışım-A için gereken tüm bileşenler konuldu (Tablo 7).

Tablo 7. Ana karışım-A hazırlığı

PZR Bileşenleri	Hacim (reaksiyon başına)	Son konsantrasyon
PZR nükleotid karışımı	1 μ l	200 μ M (her bir dNTP)
Primer İleri (Forward)	2,5 μ l	0.1 – 0.6 μ M
Primer Geri (Reverse)	2,5 μ l	0.1 – 0.6 μ M
DNAaz-RNAaz'dan arındırılmış H ₂ O	12 μ l	
Toplam reaksiyon hacmi	18 μl	

NOT: Hacimler bir örneği temsil edecek şekilde yazılmıştır. Çoklu çalışmalarda reaktif hacimleri örnek sayısı ile çarpılarak gerekli hacimler alındı.

A4. Tüm karışım iyice vorteks ile çalkalandı ve homojen bir dağılım sağlandı.

2.Çalışılacak her bir örneği temsil edecek şekilde numaralandırılmış 0,2 μ l hacimli steril PZR mikrosantrifüj tüplerine, ana karışım-A'dan 21 μ l alınarak dağıtıldı.

3. Ana karışım-B hazırlandı.

B) Ana Karışım-B Hazırlığı

B1. Karışım içine konulacak reaktifler soğuk blok üzerinde çözündürüldü.

B2. Soğuk blok üzerindeki steril mikrosantrifüj tüpüne ana karışım-B için gereken tüm bileşenler konuldu (Tablo 8).

Tablo 8 . Ana karışım-B hazırlığı

PCR Bileşenleri	Hacim	Son konsantrasyon
PZR reaksiyon tamponu	5 µl	(1,5mM MgCl ₂)
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0,25 µl	0.1 – 0.6 µM
DNAaz-RNAaz’dan arındırılmış H ₂ O	19,75 µl	
Toplam reaksiyon hacmi	25 µl	

NOT: Hacimler bir örneği temsil edecek şekilde yazılmıştır. Çoklu örnekli çalışmalarda reaktif hacimleri örnek sayısı ile çarpılarak gerekli hacimler alındı.

B3. Tüm karışım otomatik pipet ile çek-bırak işlemi uygulanarak homojen hale getirildi.

4. Çalışılacak her bir örneği temsil edecek şekilde numaralandırılmış 0,2 µl hacimli steril PZR mikrosantrifüj tüplerine, ana karışım-B’den 25 µl alınarak dağıtıldı.

5. Çalışılacak her bir örneği temsil edecek şekilde numaralandırılmış 0,2 µl hacimli steril PZR mikrosantrifüj tüplerine, 7 µl izole edilmiş DNA örneğinden konuldu ve otomatik pipet ile çek-bırak işleminin uygulanmasıyla homojen hale getirildi.

*Reaksiyon ortamına konulacak kalıp DNA’nın son konsantrasyonu 100 – 250 ng arasında olmalıdır. Eğer izole edilen DNA’nın konsantrasyonu az ise; bu durumda pzs reaksiyonunda istenilen DNA konsantrasyonu yakalamak için DNA hacmi 4 µl’den fazla konulabilir. Ancak burada unutulmaması gereken DNA miktarı arttığında, ana karışım-A’daki H₂O miktarının azalacağıdır. Son hacim 25 µl’yi tamamlayacak şekilde DNAaz-RNAaz’dan arındırılmış H₂O konulmalıdır.

6. Örnekleri içeren PZR tüpleri çalışmaya uygun PZR programının oluşturulup kaydedildiği ısı çevrilmeyici-“thermal cycler” cihazına konuldu ve belirlenen PZR şartları kullanılarak PZR işlemi başlatıldı (Tablo 9).

Tablo 9. Amplifikasyon PZR şartları

AMPLİFİKASYON PZR'İ ŞARTLARI	
94 °C'de 5 dk denaturasyon	
EVRE 1- 94°C'de → 30 sn 62°C'de→30 sn 72°C'de→1 dk	EVRE 6- 94 °C'de → 30 sn 53°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk
x2 döngü	x2 döngü
EVRE 2- 94 °C'de → 30 sn 59°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk	EVRE 7- 94 °C'de → 30 sn 52°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk
x2 döngü	x2 döngü
EVRE 3- 94 °C'de → 30 sn 57°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk	EVRE 8- 94 °C'de → 30 sn 51°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk
x2 döngü	x1 döngü
EVRE 4- 94 °C'de → 30 sn 55°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk	EVRE 9- 94 °C'de → 30 sn 50°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk
x2 döngü	x30 döngü
EVRE 5- 94 °C'de → 30 sn 54°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk	EVRE 10- 72°C'de→ 10 dk
x2 döngü	x1 döngü
4°C'de 30 dakika	
10 °C'de süresiz tutma	

PZR kontrolü aşağıdaki tabloya göre yapılmıştır.

Pozitif kontrol:

Ana karışım-A

Ana karışım-B

Human blood kontrol DNA

Negatif kontrol

Ana karışım-A

Ana karışım-B

DNAaz-RNAaz 'dan arındırılmış dH₂O

3.6.3.2.2.3 Güçlük ve Sınırlılıklar

PCR aşamasındaki bulaşlar için standart çalışma yöntemleri, UV kabinet kullanımı gibi önlemler alınmalı, uygun ayrılmış odalarda çalışma gerçekleştirilmelidir.

Pipetleme basamakları doğru hacimlerin reaksiyon karışımlarına eklenmesi için kalibrasyonu yapılmış pipetlerle ve kontaminasyonu önlemek amacıyla filtreli pipet uçlarıyla çok dikkatli bir şekilde yapılmalıdır. Kontaminasyonun önlenmesi açısından dikkat edilecek diğer bir nokta ise örneklerin tek tek işlenmesidir. PZR'de en çok karşılaşılan sorun çoğaltılacak gen bölgesine özgü olarak tasarlanmış primerlerin kalıp DNA ile tam olarak etkileşememesi ve bu nedenle çoğaltımın olmamasıdır.

3.6.3.2.3 PZR Ürünlerinin 1.5% ' luk Agaroz Jel Elektroforeziyle Kalite Kontrolü

PZR sonucu örneklerde amplifikasyon olup olmadığı, ürün elde edildiyse amplikonun hedeflenen bölgeye özgü olup olmadığının kontrolü %1.5'luk agaroz jel elektroforeziyle yapılır.

3.6.3.2.3.1 Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Malzeme ve Cihazlar:

- 10× TBE (0,89 M Tris,0,89 M Boric Acid,0,02 M EDTA Disodyum,Ph 8,4) (Cat.No.11666703001, Roche Diagnostics,Indianapolis,Amerika Birleşik Devletleri)
- Agaroz düşük elektro-endoozmaz (Kat.No. 11685660001, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya)
- Gel red (Biotium Gel-Red Nükleik Acid Stain 10,000× in DMSO) (Kat.No. 41002, Biotium, California, Amerika Birleşik Devletleri)
- DNA moleküler ağırlık belirteci (Kat. no:11721933001, Roche Diagnostics DNA molecular weight marker XIV, Indianapolis, Amerika Birleşik Devletleri)
- DNA yükleme tamponu (Fermantas, 6X DNA Loading Dye, #R0611)
- dH₂O
- Steril filtreli pipet ucu (Greiner Bio-one Filter Tip FT 1000, FT100, FT10)

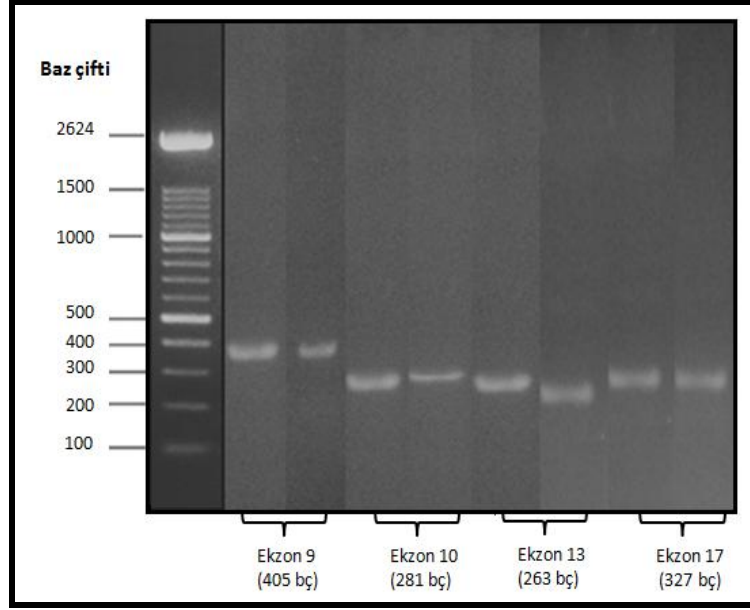
- Otomatik pipetler (Eppendorf, kat. no: 022472101, GmbH Hamburg, Almanya)
- Yatay jel elektroforezi (Cleaver Scientific, seri no: MS2010032063)
- Güç kaynağı (Consort EV 233, S/N 949666, Belçika)
- Görüntüleme cihazı (Sygene, seri no: SYGV/4850, model no: GV M20, İngiltere)
- Mikrodalga Fırın (Beko, seri no: 05 00482107, Çin)

3.6.3.2.3.2 Agaroz Jel Elektroforezi İşlem Basamakları

1. %1,5'luk agaroz jel hazırlandı.

%1,5'luk Agaroz jel hazırlama: 200ml 1X'lik TBE içinde (20ml 10X TBE, 180 ml dH₂O), 3 gr agaroz mikrodalga fırında ısıtılarak eritildi. Mikrodalga fırında kaynamanın gözlenmesi ile elde edilen agaroz jel fırından çıkartıldı ve içine 20 µl Gel red eklendi. Hazırlanan jel, jel tepsisine döküldü ve taraklar geçirildi. Jel donması için soğumaya bırakıldı.

2. PZR ürünleri ve DNA moleküler ağırlık belirteci yükleme tamponu eşliğinde agaroz jel kuyularına yüklendi
3. Yatay jel elektroforezi tankı yeterli derecede 1X'lik TBE ile dolduruldu, elektroforez işlemi için gerekli voltaj (100 Volt), akım (300 miliamper), güç (300 Watt) değerleri girildi ve 3 saat boyunca elektroforez işlemi uygulandı.
4. Elektroforez işlemi sonunda jel görüntüleme cihazına aktarıldı ve ultraviyole (UV) ışık altında PZR bantları ile DNA moleküler ağırlık belirteci bantları karşılaştırılarak, bant gözlenip gözlenmediği, gözlenen bantın istenilen ağırlıkta olup olmadığı kontrol edildi (Şekil 16). Doğru moleküler ağırlığa sahip banta sahip olan örnekler ortamdaki fazlalık primer, enzim ve tuzlardan arındırılmak için PZR sonrasındaki saflaştırma işlemine alındılar.



Şekil 16. Agaroz jel elektroforezinde gözlenen PZR ürün bantları

3.6.3.2.3.3 Güçlük ve Sınırlılıklar

Agaroz jel elektroforeziyle PZR ürünlerinin kalite kontrol basamağında örneğin jele yüklenmesi sırasında jel kuyucuğunun delinmesi yırtılması ile veya uygun elektrik akımının kullanılmaması sonucu jelin deformasyonu ile hem örneğin hem de jelin kaybı söz konusu olabilir.

3.6.3.2.4 PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

Klasik sekanslama tabanlı metotlarda iki kez PZR işlemi yapılmaktadır. Bunlardan ilki hedeflenen gen bölgesini çoğaltma amaçlı yapılan PZR'dir. Bunda kalıp olarak izole edilen DNA kullanılmaktadır. İkincisi ise dideoksinükleotitlerin (ddNTP) kullanılmasıyla yapılan sekanslama PZR'sidir. Bu PZR'de kalıp olarak birinci PZR'den elde edilen PZR ürünleri kullanılmaktadır. Ancak arka arkaya iki PZR işleminin yapılabilmesi için birinci PZR işleminin sonra ortamda kalan dNTP, primer, enzim ve tuzların PZR ürünlerinden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla birinci PZR'nin arkasından saflaştırma işlemi uygulanmaktadır.

3.6.3.2.4.1 PZR Ürünlerinin Saflaştırılmasında Kullanılan Malzeme ve Cihazlar:

- Roche Highpure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, kat no:11 732 676 001 Mannheim, Almanya)

Filtreli tüpler

Koleksiyon tüpleri

Bağlama Tamponu (binding buffer)

Yıkama tamponu (wash buffer)

Elüsyon tamponu (elution buffer)

- Mikrosantrifüj tüpü (1,5 ml hacimli) (Citotest, ref.no: 34730015S, Çin)
- Steril filtreli pipet ucu (Greiner Bio-one Filter Tip FT 1000, FT100, FT10)
- Otomatik pipetler(Eppendorf, kat. no: 022472101, GmbH Hamburg, Almanya)
- Santrifüj (Eppendorf, seri no: 5452Y0451206, Almanya)
- Atık kabı

3.6.3.2.4.2 PZR Ürünlerinin Saflaştırılması İşlem Basamakları:

1. PZR ürünü üzerine 500 µl bağlama tamponu eklendi.
2. Elde edilen PZR ürünü ve bağlama tamponu karışımı filtreli mikrosantrifüj tüpüne alındı. Filtreli tüpler 13000 RCF (relative centrifugal field)' e ayarlanmış santrifüj cihazında 1 dk döndürüldü.
3. Filtreli kısma 500 µl yıkama tamponu eklendi. 13000 RCF' e ayarlanmış santrifüj cihazında 1 dk döndürüldü.
4. Filtreli kısma 200 µl yıkama tamponu eklendi. 13000 RCF' e ayarlanmış santrifüj cihazında 1 dk döndürüldü .
5. Alttaki koleksiyon tüpleri atıldı ve filtreler 1,5ml hacimli mikrosantrifüj tüplerine geçirildi.
6. Filtrenin tam ortasına gelecek şekilde 50 µl elüsyon tamponu konuldu. 13000 RCF' e ayarlanmış santrifüj cihazında 1 dk döndürüldü.
7. Mikrosantrifüj tüpüne geçen saf DNA sekanslama PZR işlemine alındı.

3.6.3.2.4.3 Saf PZR Ürünlerinin Agaroze Jel Elektroforeziyle Kalite Kontrolü

Pürifikasyon sonrası jelde yürütmedeki amaç pürifikasyonun sürecinde ürünün kaybolup kaybolmadığını ve saflaştırma işleminin gerçekten yapıldığını anlamaktır.

1. %1,5'luk agaroz jel hazırlandı.

%1,5'luk Agaroz jel hazırlama: 200ml 1X'lik TBE içinde (20ml 10X TBE, 180 ml dH₂O), 3 gr agaroz mikrodalga fırında ısıtılarak eritildi. Mikrodalga fırında kaynamanın gözlenmesi ile elde edilen agaroz jel fırından çıkartıldı ve içine 20 µl Gel red eklendi. Hazırlanan jel, jel tepsisine döküldü ve taraklar geçirildi. Jel donması için soğumaya bırakıldı.

2. PZR ürünleri ve DNA moleküler ağırlık belirteci yükleme tamponu eşliğinde agaroz jel kuyularına yüklendi.

3. Yataj jel elektroforezi tankı yeterli derecede 1X'lik TBE ile dolduruldu, elektroforez işlemi için gerekli voltaj (100 Volt), akım (300 miliamper), güç (300 Watt) değerleri girildi ve 3 saat boyunca elektroforez işlemi uygulandı.

4. Elektroforez işlemi sonunda jel görüntüleme cihazına aktarıldı ve UV ışık tabanlı görüntüleme cihazı altında PZR bantları ile DNA moleküler ağırlık belirteci bantları karşılaştırılarak, bant gözlenip gözlenmediği, gözlenen bantın istenilen ağırlıkta olup olmadığı kontrol edildi. Doğru moleküler ağırlığa sahip banta sahip olan örnekler sekanslama PZR işlemine alındı.

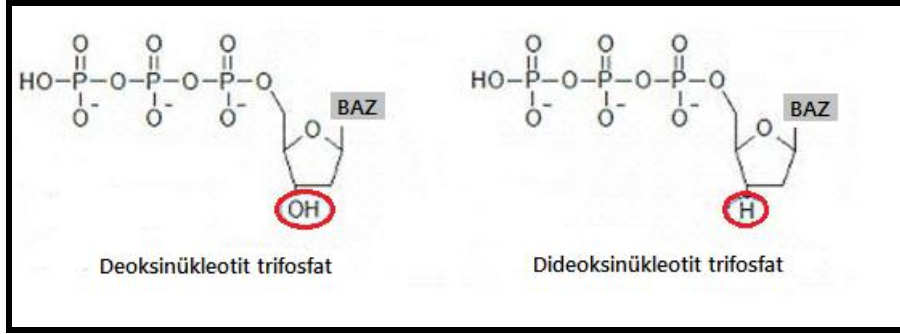
3.6.3.2.4 Güçlük ve Sınırlılıklar

PZR ürünlerinin saflaştırılması sırasında kullanılan yöntem ne olursa olsun (klasik manuel saflaştırma yöntemleri veya standardize edilmiş kolon tabanlı saflaştırma kitleri) üretilen PZR ürünleri bir miktar kaybı söz konusu olmaktadır. Bu basamakta önemli olan bu kaybın en aza indirgenmesidir. Saflaştırma işlemi sonrasında ürünün tamamen kaybolup kaybolmadığının anlaşılması için agaroz jel elektroforezi ile kaybın kontrolü yapılmalıdır.

3.6.3.2.5 Saf PZR Ürünleriyle Sekanslama PZR

Genotipleme çalışmalarındaki gelişmelerin artmasıyla yeni gen dizileme yöntemleride geliştirilmektedir. Ancak 1977'de Frederik Sanger tarafından keşfedilen Sanger sekanslama (Sanger sequencing) ile nükleik asit dizileme tekniği veya diğer ismiyle zincir sonlanma metodu ("Chain termination method", literatürde enzimatik metot veya dideoksi metot olarak da geçmektedir) bu alanda hala altın standart (Gold Standard) olarak bilinmektedir. Sanger DNA dizileme tekniği, normal deoksिनүkleotidler (dNTP) ve yeni sentezlenmekte olan DNA zincirinin sonlanmasına neden olan dideoksिनүkleotidler (ddNTP) reaksiyona beraber katılarak yeni DNA fragmanları sentezlemesi temeline dayanmaktadır (Şekil 17).

ddNTP'lerin yapılarında bulunan, deoksiribozlarda 3. pozisyonlardaki OH moleküllerindeki oksijenlerin olmaması, sadece H'nin bulunması, sentez sırasında, bu ddNTP'lerin zincire girmesi durumunda, polimerizasyonu durdurmaktadır. Çünkü ddNTP'ler OH grubunun yokluğundan dolayı yanlarına gelen başka moleküllerle fosfodiester bağları kuramamaktadırlar.



Şekil 17. Deoksiribonükleotit ve dideoksiribonükleotit yapısı

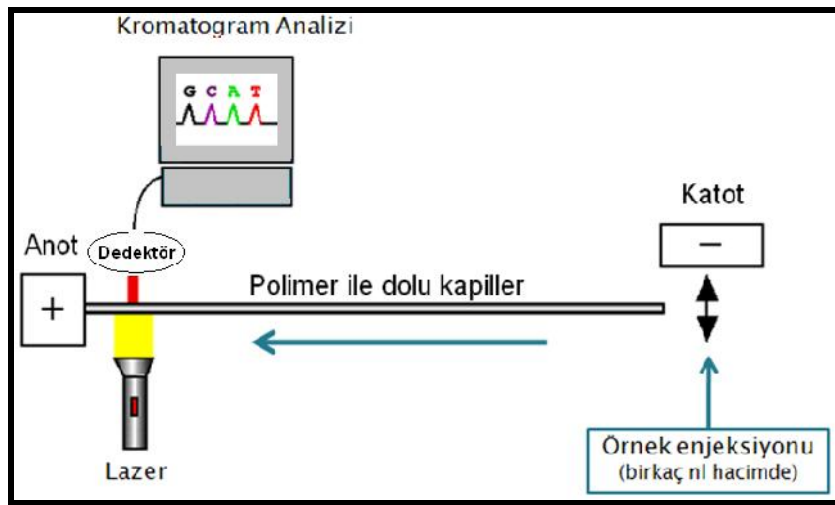
Bu yöntemde spesifik zincir terminatörleri olan 4 tür dideoksinukleotidler (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) kontrollü miktarlarda ve sürelerde sentez reaksiyonuna katılmaktadır. Yöntemin ilk geliştirildiği yıllarda, dört tür ddNTP kullanılmasından dolayı 4 ayrı reaksiyon ortamı hazırlığı söz konusuydu. Her bir reaksiyon ortamında 4 tür ddNTP, DNA polimeraz I (klenow fragmenti), 4 tür dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP: bu nukleotidler DNA polimerizasyonu için gereklidir), baz sırası tayini yapılacak olan kalıp DNA ve bunun 3'-ucundaki DNA bazlarına komplementer olan ve 5'-uçlarından ³²P ile işaretlenmiş primerler bulundurulmaktaydı. Tüm işlemler sonunda 4 tür reaksiyon ortamında oluşan farklı DNA segmentleri elektroforez ve otoradyografi teknikleri ile ayrımlanır ve baz sırası tayin edilirdi (196).

Yıllar içinde klasik sekanslamada dedeksiyon tabanlı değişiklikler yapılmıştır. Daha kolay, hızlı ve ekonomik analizin yapılabilmesi yaklaşımıyla fragmanlarının floresans boyalarla işaretlenmesine yönelik boya terminatör sekanslaması (dye terminator sequencing) geliştirilmiştir.

L.Hood ve arkadaşlarının geliştirdiği floresans işaretli ddNTP'ler ile otomatize yüksek işlem hacimli (high throughput) DNA dizilemesinde floresans işaretli DNA fragmanları oluşturulmaktadır. Kullanılan her dört dideoksinükleotit zincir sonlandırıcı farklı bir floresans boyayla işaretlenmiştir ve her bir floresans farklı bir dalga boyuna sahiptir (197, 198).

Kapiller elektroforezinde (capillary electrophoresis, CE) bu yöntem katılması yüksek voltaj altında hızlı ayırım gücü, zaman ve emek tasarrufu, az miktarda örnek ile etkin ayırım, çok sayıda örnek ile çalışabilme, otomatizasyon ve standardizasyon avantajlarını sunarak daha etkin çalışmalar yapılmasına olanak sağladı.

Floresans boyaların kaydı ile yapılan dedeksiyon sonucu ham veri olan floresans pik kromatogramları elde edilir. En son olarak DNA baz dizisine yönelik olarak elde edilmiş kromatogramların tecrübeli kişiler tarafından analizi ile DNA baz dizisi belirlenmiş olur (Şekil 18).



Şekil 18. DNA dizilemede kapiller elektroforez işleyisi (199 numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.)

3.5.3.2.5.1 Dizileme PZR İşleminde Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

Pürifikasyon sonrasında jelde yürütülüp örnek kaybı şüphesinin olmadığı örnekler bir sonraki basamak olan DNA sekanslama reaksiyonuna alındı. Burada amaç temiz pzs ürünlerinin dideoksi nükleotidlerle PZR işlemine tabi tutulup DNA fragmanlarının oluşmasını sağlamaktır.

- GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit [Beckman Coulter, parça numarası (Part number/PN): 608120, Amerika Birleşik Devletleri]

DTCS Quick Start Master Mix

pUC18 kontrol örneği (pUC18 control template) (0.25 µg/µL)

M13-47 sekanslama primeri (M13-47 sequencing primer) (1.6 pmol/µL-1.6 µM)

Glikojen (20 mg/mL)

Mineral yağı (Mineral oil)

Örnek yükleme solüsyonu (Sample loading solution)

- *KİT* geni ekson 9, 11, 13, 17 bölgelerini çoğaltmaya yönelik tasarlanan ileri (forward-F) ve geri (reverse-R) primerler (CK9-F, CK9-R, CK10_11-F, CK10_11-R, CK11-F, CK11-R, CK12_13-F, CK12_13-R, CK13-F, CK13-R, CK17-F, CK17-R) (TIB MOLBIOL, kat no: 1199776, Berlin, Almanya)
- DNAaz ve RNAaz'dan arındırılmış H₂O (Pcr grade)(Roche, kat no: 03315843001, Indianapolis, Amerika Birleşik Devletleri)
- Mikrosantrifüj tüpü (1,5 ml hacminde) (Citotest, ref.no: 34730015S, Çin)
- Steril filtreli pipet ucu (Greiner Bio-one Filter Tip FT 1000, FT100, FT10)
- Otomatik pipetler(Eppendorf, kat. no: 022472101, GmbH Hamburg, Almanya)
- Santrifüj (Eppendorf, seri no: 5452Y0451206, Almanya)
- Vorteks (Heidolph Top Mix 94323, Bioblock Scientific, seri no:54119, Almanya)
- Isı çevrilmeyici- “Thermal cycler” (Techne TC-3000, kat. no: FTC/02, İngiltere)
- Soğuk blok veya buz
- Atık kabı

3.6.3.2.5.2 Dizileme PZR İşlem Basamakları

1. Örnek tüplerine sekans PZR işlemi için konulacak reaktifler soğuk blok üzerinde çözündürüldü.

2. Çoğaltılacak gen bölgesine özgü 5pM konsantrasyonunda primer hazırlandı.

Primer dilüsyonun yapılması: Liyofilize halde alınan ileri ve geri primerler ticari firmanın güvenlik bilgi formlarındaki önerileri doğrultusunda son konsantrasyonu 50 µM (ana stok) olacak şekilde sulandırıldı. Bu 50 µM konsantrasyondaki primerlerden (9F, 9R,10-11F, 10-11R,12-13F, 12-13R, 13F, 13R, 17F, 17R) yola çıkılarak 5pM'lık, son hacmi 40 µl olan primer dilüsyonları hazırlandı (Tablo 10).

Tablo 10. Primer sulandırmada kullanılan hacimler ve konsantrasyonlar (Dizileme PZR'si için)

50 μ M'lık Stok F/R Primerden Alınacak Hacim	Solusyona Konulacak H ₂ O Hacmi	İstenilen Primer Konsantrasyonu
4 μ L	36 μ L	5 pM

3. Soğuk blok üzerindeki steril örnek tüplerine sekans PZR reaksiyonu bileşenleri olan H₂O, "master mix", primerler sırasıyla konuldu ve en son DNA'ların yüklemesi yapıldı.

*Sekans PZR reaksiyonunda belirli ekzonun ileri ya da geri primerlerinden sadece reaksiyon ortamına konuldu.

*Reaksiyon karışımına konulacak DNA hacimleri jel görüntülerindeki DNA moleküler ağırlık belirteci (standart) ve örnek DNA bant parlaklıklarından yola çıkılarak yapılan konsantrasyon hesaplarıyla belirlendi. Örnek bant parlaklığının azlığı veya çokluğu ile değişen DNA hacmiyle beraber reaksiyona konulan H₂O miktarı da son reaksiyon hacmini 20 μ l'ye tamamlayacak şekilde değişmektedir. PZR ürününün bant parlaklığı DNA moleküler ağırlık belirteciyle eşdeğer ise bu durumda reaksiyon ortamına örnek DNA'sı 5 μ l konuldu. Bu durumda hacimler aşağıdaki gibidir (Tablo 11, 12, 13).

Tablo 11. PZR bant parlaklığının standart ile eşdeğer olduğu durumda sekans PZR işleminde kullanılan bileşen hacimleri

Kullanılan Bileşen	Hacim
H ₂ O	6 μ l *
Master mix	8 μ l
Primer (5pmol/ μ l) (ileri ya da geri)	1 μ l
DNA	5 μ l *
Toplam Hacim	20 μ l

Tablo 12. PZR bant parlaklığının standartdan az olduğu durumda sekans PZR işleminde kullanılan bileşen hacimleri

Kullanılan Bileşen	Hacim
H ₂ O	4µl *
Master mix	8µl
Primer (5pmol/µl) (ileri ya da geri)	1µl
DNA	7µl *
Toplam Hacim	20µl

Tablo 13. PZR bant parlaklığının standartdan fazla olduğu durumda sekans PZR işleminde kullanılan bileşen hacimleri

Kullanılan Bileşen	Hacim
H ₂ O	8µl *
Master mix	8µl
Primer (5pmol/µl) (ileri ya da geri)	1µl
DNA	3µl *
Toplam Hacim	20µl

4.Hazırlanan karışım ısı çevrilmeyici-“thermal cycler” cihazında gerekli koşullarda PZR işlemine tabi tutuldu (Tablo 14).

Tablo 14. Dizileme PZR şartları

DİZİLEME PZR’İ ŞARTLARI	
94°C’de → 20 sn	} x 30 döngü
50°C’de → 20	
60°C’de → 4 dk	

Sekanslama reaksiyon kontrolü DTCS Quick Start Master Mix, pUC18 Control Template ve onun amplifikasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan M13 -47 Sequencing Primer ile yapıldı.

3.6.3.2.5.3 Güçlük ve Sınırlılıklar

PCR aşamasındaki bulaşlar için standart çalışma yöntemleri, UV kabinet kullanımı gibi önlemler alınmalı, uygun ayrılmış odalarda çalışma gerçekleştirilmelidir.

Pipetleme basamakları doğru hacimlerin reaksiyon karışımlarına eklenmesi için kalibrasyonu yapılmış pipetlerle ve kontaminasyonu önlemek amacıyla filtreli pipet uçlarıyla çok dikkatli bir şekilde yapılmalıdır.

Kontaminasyonun önlenmesi açısından dikkat edilecek diğer bir nokta ise örneklerin tek tek işlenmesidir.

PZR'de en çok karşılaşılan sorun çoğaltılacak gen bölgesine özgü olarak tasarlanmış primerlerin kalıp DNA ile tam olarak etkileşememesi ve bu nedenle çoğaltımın olmamasıdır.

3.6.3.2.6 Etanol Çöktürmesi ile Sekans Ürünlerinin Saflaştırılması

Sekans reaksiyonundan sonra örneğin ortamdaki fazlalık primerlerden, dNTP'lerden, ddNTP'lerden temizlenmesi için etanol çöktürülmesi ile sekans PZR ürünleri saflaştırılır. Bu amaç için ticari kitlerde kullanılmaktadır ancak sekans reaksiyonu ile elde edilen örneğin uzunluğu normal DNA'ya göre kısa olduğundan ürün kaybı söz konusu olabilmektedir. Bu nedenle saflaştırma kiti yerine manuel saflaştırma yöntemi olan etanol çöktürmesinin kullanılması önerilmektedir.

3.6.3.2.6.1 Etanol Çöktürmesinde Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- Etanol (saf) (Sigma-Aldrich, kat. no: 32221, Almanya)
- Sodyum Asetat tamponu (Molecular biology, pH 5.2,3 M) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, ürün kodu: S7899, Amerika Birleşik Devletleri)
- EDTA Disodyum (500mM) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, ürün kodu: E7889, Amerika Birleşik Devletleri)
- Mikrosantrifüj tüpü (1,5 ml hacimli) (Citotest, ref. no: 34730015S, Çin)
- Plastik konik tüp (12 ml hacimli) (Becton Dickinson Falcon, 4-2097-8, Amerika Birleşik Devletleri)
- Steril filtreli pipet ucu (Greiner Bio-one Filter Tip FT 1000, FT100, FT10)
- Otomatik pipetler (Eppendorf, kat. no: 022472101, GmbH Hamburg, Almanya)

- Vorteks (Heidolph Top Mix 94323, Bioblock Scientific, seri no:54119, Almanya)
- Santrifüj (Eppendorf, seri no: 5452Y0451206, Almanya)
- Atık kabı

3.6.3.2.6.2 Etanol Çöktürmesi İşlem basamakları

1. Sekans PZR ürün içeriği 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı.
2. Her bir örneğin üzerine 5µl durdurma solüsyonu eklenir.

Durdurma solüsyonunun hazırlanması: Durdurma solüsyonunun taze olarak hazırlanması gerekmektedir. Aşağıda yer alan tablodaki hacimler tek bir örnek için gerekli olan hacimlerdir. Çoklu örneklerle çalışıldığında örnek sayısı ile bu rakamlar çarpılarak gerekli hacimler hesaplanır (Tablo 15).

Tablo 15. Durdurma solüsyonunun hazırlanışı

Kullanılan Bileşenler	Hacim
100mM EDTA	2 µl
3M NaOAc pH 5.2	2 µl
Glikojen	1 µl

3. Ardından her bir örneğin üzerine 60µl %95'lik soğuk etanol eklendi ve 13.000xg'ye ayarlanmış santrifüj cihazında 6 dakika döndürüldü.

%95'lik etanol hazırlanması (100ml): 5 ML dH₂O ile 95 ml etanol karıştırıldı.

4. Santrifüj işlemi bittikten sonra laboratuvar tezgahına serilen havlu kağıda tek bir el hareketiyle çökelen DNA kaldırılmadan tüp içindeki alkol boşaltıldı.

5. Çökeltinin üzerine 200µl %70'lik soğuk etanol eklenir ve 13.000xg'ye ayarlanmış santrifüj cihazında 6 dakika döndürüldü.

%70'lik etanol hazırlanması (100ml): 30 ml dH₂O ile 70 ml etanol karıştırıldı.

6. Santrifüj sonrası çökelen DNA kaldırılmadan tek bir el hareketiyle tüp içindeki alkol havlu kağıda döküldü.

7. Çökeltinin üzerine 200µl %70'lik soğuk etanol eklendi ve 13.000xg'ye ayarlanmış santrifüj cihazında 6 dakika döndürüldü.

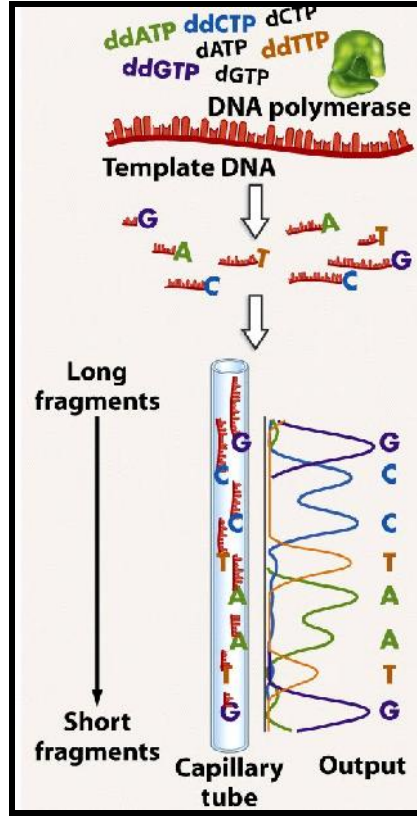
8. Santrifüj sonrası çökelen DNA kaldırılmadan tek bir el hareketiyle tüp içindeki alkol havlu kağıda döküldü.
9. Örnekler kapakları açık ve ters çevrilmiş şekilde 37°C'lik etüvde (en fazla 1 saat olacak şekilde) kurumaya bırakıldı.
10. Kuruduğu gözlenen örnekler sekans cihazına verilmek için hazırlandı.

3.6.3.2.6.3 Güçlük ve Sınırlılıklar

Bu yöntemde etanol ile elde edilen PZR ürünlerinin mikrosantrifüj tüpünün dibinde pellet halinde çöktürülerek saflaştırılması söz konusudur. PZR ürünlerinin çökerek saflaştırılması için ortama konulan etanol çözeltilerinin oldukça soğuk olması ve santrifüj ile döndürme işlemlerinde tercihen soğutmalı santrifüj kullanarak +4°C'de yapılması çok önemlidir. Tüp dibinde çöken PZR ürün pelletlerinin yıkama basamaklarında kaybı gözlenen bir durumda çok yavaş hareketlerle ancak hızlı bir şekilde yapılması gerekir.

3.6.3.2.7 Sekans Analizi

Sekanslama PZR ile floresans işaretli farklı boylara sahip DNA fragmanları oluşturulur. Bu fragmanlar kapiller elektroforez tabanlı genetik analiz sistemlerinde yüksek voltaj altında fragman boyutuna göre ayrımlanarak DNA baz dizisinin belirlenmesini sağlar (Şekil 19).



Şekil 19. Floresans işaretli DNA fragmanlarının CE tabanlı ayırılması (200)

3.6.3.2.7. 1 Sekans Analizinde Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit [Beckman Coulter, parça numarası/Part number/PN: 608120]

DTCS Quick Start Master Mix

pUC18 kontrol örneği (pUC18 control template) (0.25 µg/µL)

M13-47 sekanslama primeri (M13-47 sequencing primer) (1.6 pmol/µL-1.6 µM)

Glikojen (20 mg/mL)

Mineral yağı

Örnek yükleme solüsyonu (Sample loading solution)

- Ayırma tamponu (Beckman Coulter, GenomeLab Separation Buffer, PN: 608012, Amerika Birleşik Devletleri)
- Ayırılama jeli (Beckman Coulter, Genome Lab separation Gel-LPA-1, PN: 391438, Amerika Birleşik Devletleri)
- Kapiller (33cm) (Beckman Coulter, GenomeLab DNA Separation Capillary Array, 33 cm x 75 Åµm, PN:608087, Amerika Birleşik Devletleri)

- 96 konik kuyucuklu örnek plakaları (Beckman Coulter, Sample Microtiter Plates, PN: 609801, Amerika Birleşik Devletleri)
- 96 kuyucuklu tampon plakaları (Beckman Coulter, 96-Well Plates, PN: 609844, Amerika Birleşik Devletleri)
- Genetik analiz sistemi (Beckman Coulter, GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System, S/N: A220330222, Amerika Birleşik Devletleri)

3.6.3.2.7.2 Sekans Analizi İşlem Basamakları

1. Mikrosantrifüj tüpünün dibinde pellet halinde toplanan PZR ürünleri 40 µl örnek yükleme solüsyonu (Sample loading solution) ile çözündürüldü ve örnek plakası kuyucuklarına yerleştirildi.
2. Örnek plakasında konulan örneklerin üzerine mineral yağı damlatıldı.
3. Tampon plakasına ayırma tamponu konuldu.
4. Genetik analiz sistemine ayırlamanın yapılabilmesi için kapiller, ayırlama jeli takıldı ve cihazın çalışması başlatıldı.

3.6.3.2.7.3 Güçlük ve Sınırlılıklar

Bu yöntemin sınırlaması; kapiller elektroforez sonucu elde edilen piklerin boy ve şekillerinde meydana gelen eşitsizliklerinin oluşmasında söz sahibi boya etkinliğidir. Boya etkinliğinin kaybolması ile hiçbir pik görüntüsü elde edilemeyebilir.

3.6.3.2.8 Kromatogramların Değerlendirilmesi

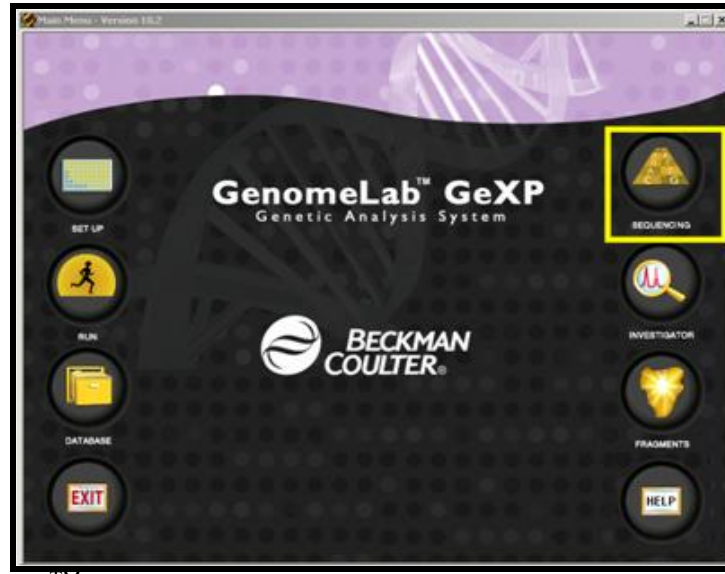
Sekans analizinin bitiminden sonra örnekle ilgili veriler kromatogram şeklinde alınır. Bu kromatogramların değerlendirilmesi için bir takım biyoinformatiksel programlar kullanılır. Bu programlar genel olarak kromatogram dosyalarının açılması ve baz değişiminin saptanması amaçlı kullanılıyorsa referans DNA dizisiyle eş zamanlı karşılaştırılmasını içerir. Bu şekilde örneğin DNA dizisi referans dizi ile birlikte incelenerek değişimler saptanabilir.

3.6.3.2.8.1 Kromatogramların Değerlendirilmesinde Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

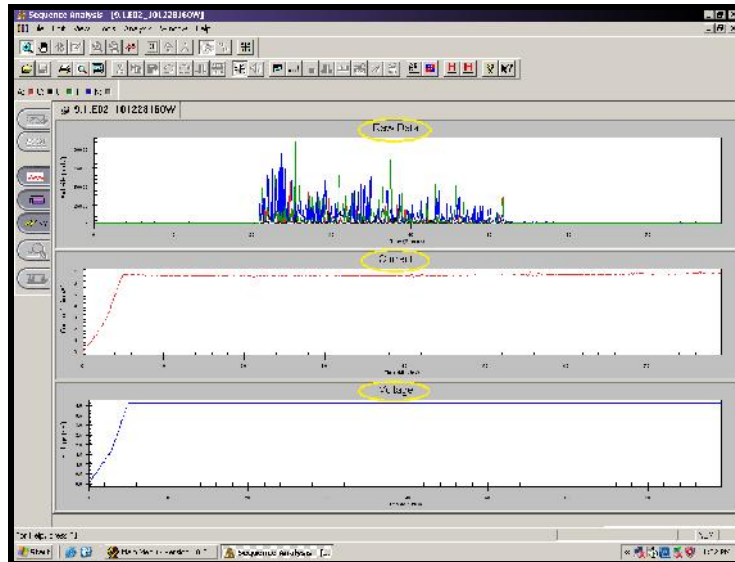
- GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System Software Versiyon 10.2
- Bilgisayar ve monitör (Lenovo Think Vision, S/N: LKPWRDM, S/N: V1ZNC76)

3.6.3.2.8.2 Kromatogramların Değerlendirilmesinde İşlem Basamakları

1.Örneklerin ayrırılmasının bitmesinin ardından GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System Software'in "sequence analysis" modülünden analizi yapılacak örnek seçilip, sonuçların kabul edilebilirliğinin göstergesi olan kabul kriterleri kontrol edilirdi (Şekil 20, 21). Kabul Kriterlerinin İncelenmesi: Kabul kriterlerinin incelendiği ekranda cihazın çalışması sırasında akım ve volt bakımından herhangi bir kesintinin söz konusu olmadığı, piklerin boyutunun aktivite-zaman grafiğinde 5000'in üzerinde olduğu kontrol edildi.

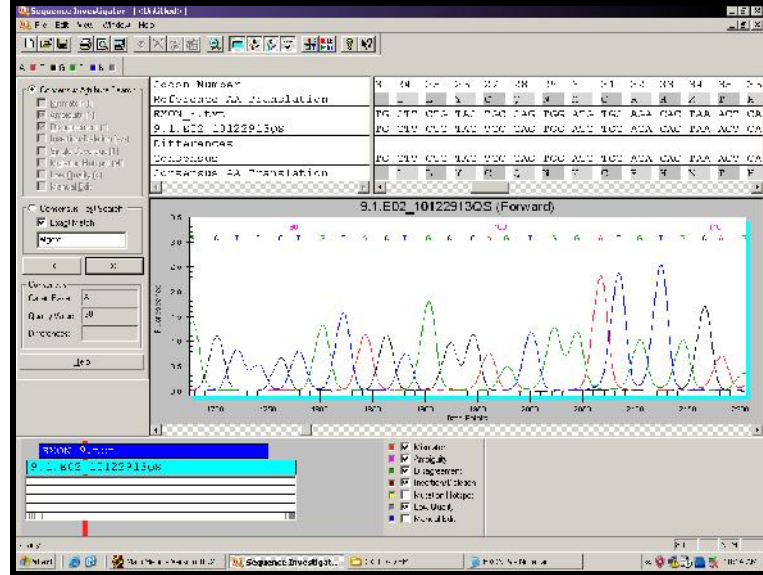


Şekil 20. GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System Software versiyon 10.2 Modülleri



Şekil 21. "Sequencing Analysis" modülünde kabul kriterlerinin incelenmesi

2.Örneğin çalışılması sırasında cihaz kökenli herhangi bir sorun yaşanmadığı ve kabul kriterlerinin kabul edilebilir olduğunun gözlenmesinin ardından, aynı örneğin kromatogramı “sequence investigator” modülünde referans dizi ile beraber incelendi (Şekil 22).



Şekil 22. “Sequence investigator” modülünde kromatogram incelenmesi

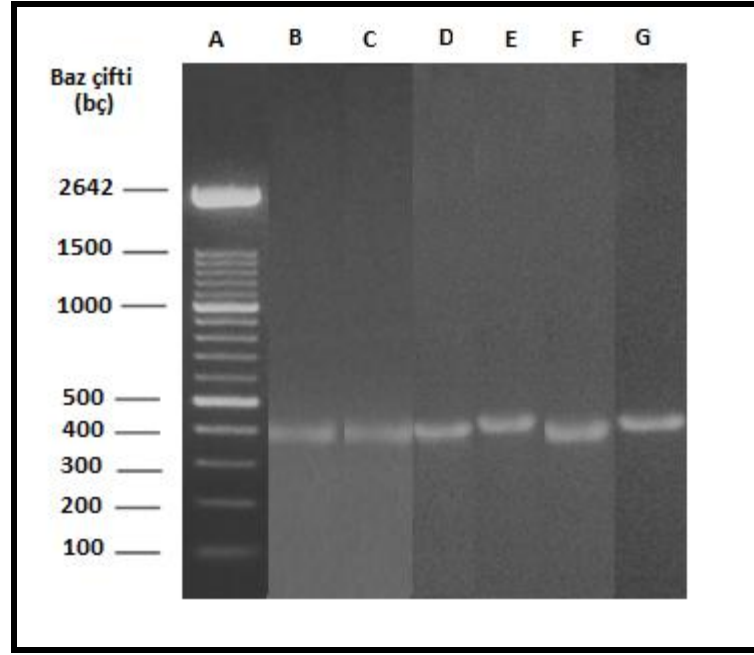
3.6.3.2.8.3 Güçlük ve Sınırlılıklar

Bu basamakta kullanılan programın referans dizi ile birlikte karşılaştırma yapılabilmesi, aynı anda birden çok örneğin incelenebilmesine olanak tanınması önemli parametrelerdir. Bu şekilde yapılan değerlendirmelerle değişimlerin örnek kaynaklı yani mutasyon veya cihaz kaynaklı bir artefakt olabilme ihtimali daha kolay ortaya konulabilir.

3.6.4 YÖNTEM OPTİMİZASYONU

3.6.4.1 Reaksiyon Ortamina Konulan DNA Hacimi

Amplifikasyon PZR'ında ortama konulacak kalıp DNA'NIN hacmi büyük önem taşımaktadır. Eğer PZR ortamında primerlerle etkileşebilecek kadar yeterli kalıp DNA bulunmuyorsa, bu durumda PZR işlemi gerçekleşemez. Bu nedenle ortamdaki kalıp DNA'nın miktarı reaksiyon için oldukça önemlidir. PZR ortamına 3-8µl arasında kalıp DNA'nın konularak yapıldığı PZR işlemleri sonrasındaki agaroz jel elektroforez görüntüleri şekil 23'de verilmiştir.

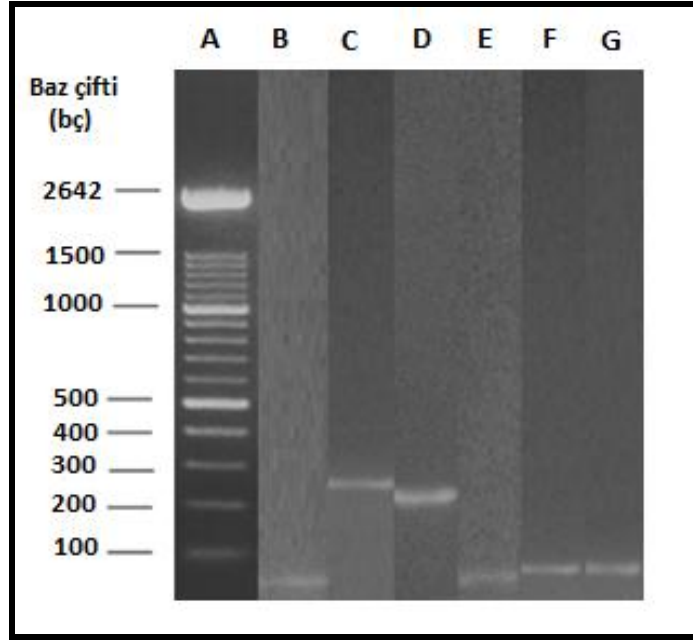


Şekil 23. PZR ortamına konulan kalıp DNA hacim artışının amplikon oluşumuna etkisi

A-DNA moleküler ağırlık belirteci, **B-** Örnek hacmi: 3 µl, Primer ismi: CK9-F , CK9-R, Primer konsantrasyonu: 0.3 µM, **C-** Örnek hacmi: 4 µl, Primer ismi: CK9-F , CK9-R, Primer konsantrasyonu: 0.3 µM, **D-** Örnek hacmi: 5 µl, Primer ismi: CK9-F , CK9-R, Primer konsantrasyonu: 0.3 µM, **E-** Örnek hacmi: 6 µl, Primer ismi: CK9-F , CK9-R, Primer konsantrasyonu: 0.3 µM, **F-** Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK9-F , CK9-R, Primer konsantrasyonu: 0.3 µM, **G-** Örnek hacmi: 8 µl, Primer ismi: CK9-F , CK9-R, Primer konsantrasyonu: 0.3 µM. B, C, D, E, F, G kuyucuklarına Tonklab 7 numaralı örneğin DNA ekstraktından konulmuştur.

3.6.4.2 Primer Konsantrasyon Dilüsyonu

Amplifikasyon PZR kiti kullanım yönergesinde hedef bölgelere özgü tasarlanan primerlerin 0,1 – 0,6 µM konsantrasyonunda olması önerilmektedir. Ancak PZR ortamında eklenen kalıp DNA'nın miktarıyla beraber kullanılan primer konsantrasyonunda önem taşımaktadır. Reaksiyon ortamına eklenen primer azlığı, kalıp DNA ile primerin etkileşemeyip amplifikasyonun başlayamamasına neden olur. Ortamdaki primer fazlalığında primerlerin kendi aralarında dimer oluşturup amplifikasyonun gerçekleşmemesine neden olur. Bu nedenle farklı primer konsantrasyonları ile PZR'nin verimi incelendi (Şekil 24).



Şekil 24. PZR ortamına konulan primer konsantrasyon artışının amplicon oluşumuna etkisi **A-**Moleküler ağırlık belirteci, **B-** Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK11-F , CK11-R, Primer konsantrasyonu: 0.1 µM, **C-** Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK11-F , CK11-R, Primer konsantrasyonu: 0.2 µM, **D-** Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK11-F , CK11-R, Primer konsantrasyonu: 0.3 µM, **E-** Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK11-F, CK11-R, Primer konsantrasyonu: 0.4 µM, **F-** Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK11-F, CK11-R, Primer konsantrasyonu: 0.5 µM, **G-** Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK11-F, CK11-R, Primer konsantrasyonu: 0.6 µM. B, C, D, E, F kuyucuklarına Tonklab 2 numaralı örneğin parafin dokusundan elde edilmiş DNA ekstraktından konulmuştur.

3.6.4.3 PZR Şartları

Primerlerin kalıba bağlanmasında yüksek spesifitenin sağlanması ve spesifik ürünlerin elde edilmesinde daha etkin amplifikasyonun eldesi için “touchdown (stepdown) pcr” yöntemiyle amplifikasyon gerçekleştirildi. Burada yöntemde PZR döngülerindeki tavlama (annealing) sıcaklığı kademeli olarak düşürülür. PZR’nin başlangıcında annealing sıcaklığı kullanılan primerlerin erime sıcaklığının (T_m) 3-5 °C üzerinde, PZR’nin son döngülerinde de annealing sıcaklığı kullanılan primerlerin T_m sıcaklığının 3-5 °C altındadır. PZR şartları tablo 16’da verilmiştir.

Farklı primer çiftlerinin kullanılmasında primer erime sıcaklıklarına dikkat edilerek PZR sıcaklık programı oluşturulur. *KİT* geni ekzon 10 ile 11’in arasındaki intronik bölgenin kısa olmasından dolayı ekzon 10-11’i kapsayacak şekilde ve buna benzer şekilde ekzon 12 ile ekzon 13 arasındaki intronik bölgenin kısa olmasından dolayı ekzon 12 -13’ü kapsayacak şekilde ekzon 11 ve 13’e alternatif primer setleri tasarlandı. Bu primer çiftlerinden ekzon 10-

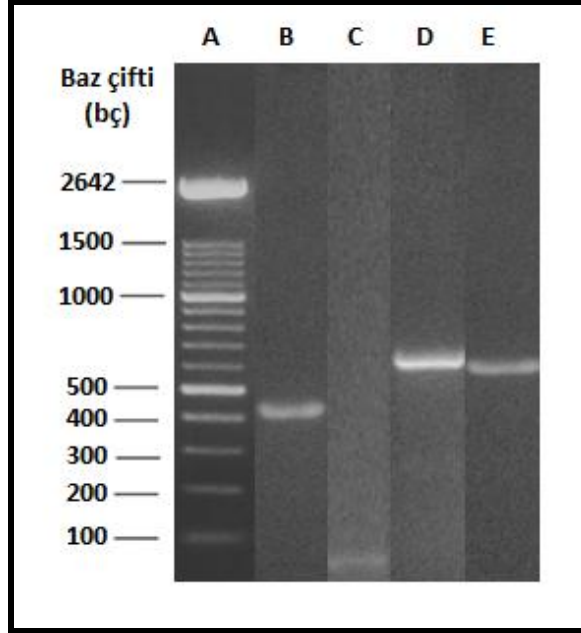
11'i kapsayan primerlerin erime sıcaklıklarından dolayı kullanılan PZR sıcaklık programı modifiye edildi. Ekzon 10-11'i kapsayan primerlerin PZR şartları tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. Amplifikasyon PZR şartları (CK10_11F ve CK10_11R için)

AMPLİFİKASYON PZR'İ ŞARTLARI (CK10_11F ve CK10_11R için)	
94 °C'de 5 dk denaturasyon	
EVRE 1- 94°C'de → 30 sn 59°C'de→30 sn 72°C'de→1 dk	EVRE 6- 94 °C'de → 30 sn 54°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk
x2 döngü	x 2 döngü
EVRE 2- 94 °C'de → 30 sn 58°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk	EVRE 7- 94 °C'de → 30 sn 53°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk
x2 döngü	x 2 döngü
EVRE 3- 94 °C'de → 30 sn 57°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk	EVRE 8- 94 °C'de → 30 sn 52°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk
x 2 döngü	x 1 döngü
EVRE 4- 94 °C'de → 30 sn 56°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk	EVRE 9- 94 °C'de → 30 sn 51°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk
x 2 döngü	x 2 döngü
EVRE 5- 94 °C'de → 30 sn 55°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk	EVRE 10- 94 °C'de → 30 sn 50°C'de→ 30 sn 72°C'de→ 1 dk
x2 döngü	x30 döngü
72°C'de 7 dakika	
10 °C'de süresiz tutma	

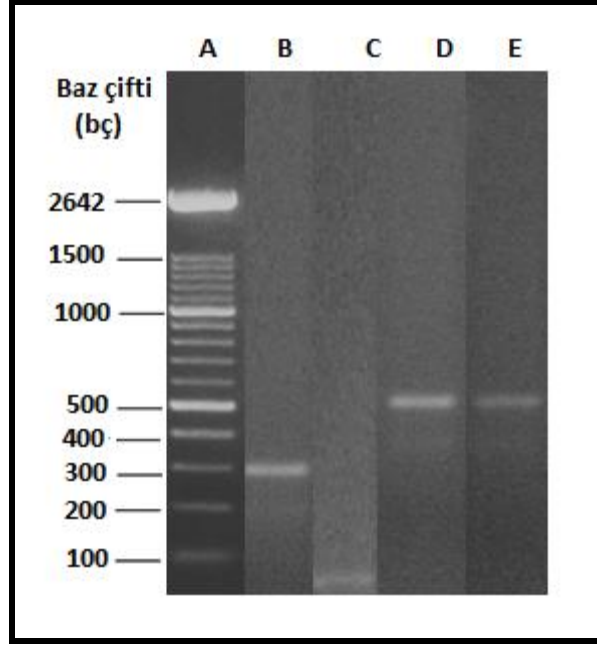
3.6.4.4 Farklı Primer Çiftlerinin Kullanımı

Amplifikasyon PZR'ı sonucu agaroz jel elektroforezinde bantların gözlemlenmediği örneklerde amplifikasyonun farklı primer çiftleriyle denendi (Şekil 25, 26).



Şekil 25. *KIT* geni, ekzon 11 bölgesinin PZR ile çoğaltılması için farklı primer çiftlerinin kullanılmasının amplicon oluşumuna etkisi

A-Moleküler ağırlık belirteci, **B-**Kandan elde edilen DNA ile yapılmış PZR reaksiyonu kontrolü(Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK11-F , CK11-R, Primer konsantrasyonu: 0.3µM), **C-**Tonklab-2 numaralı örneğin parafin blok tümör dokusundan elde edilmiş DNA ile yapılan pcr reaksiyonu kontrolü (Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK11-F , CK11-R, Primer konsantrasyonu: 0.3 µM), **D-**Kandan elde edilen DNA ile yapılmış PZR reaksiyonu kontrolü(Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK10_11-F , CK10_11-R, Primer konsantrasyonu: 0.3µM), **E-**Tonklab-2 numaralı örneğin parafin blok tümör dokusundan elde edilmiş DNA ile yapılan pcr reaksiyonu kontrolü (Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK10_11-F , CK10_11-R, Primer konsantrasyonu: 0.3 µM).

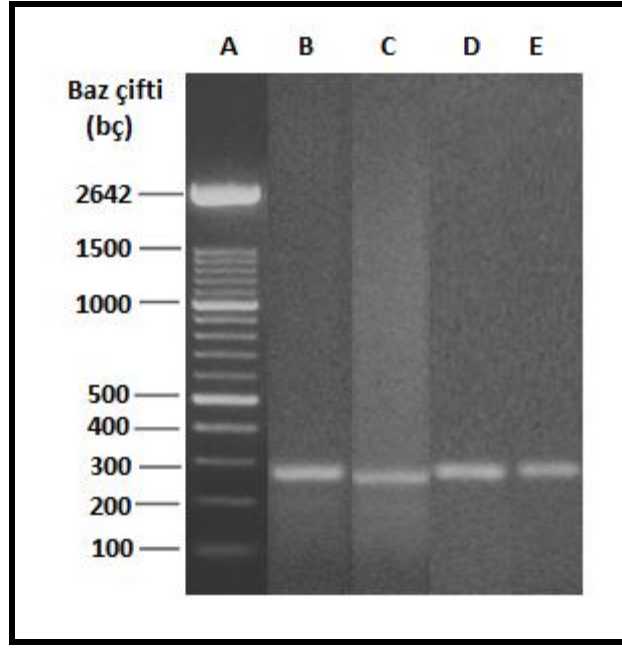


Şekil 26. *KIT* geni, ekzon 13 bölgesinin PZR ile çoğaltılması için farklı primer çiftlerinin kullanılmasının ampikon oluşumuna etkisi

A-Moleküler ağırlık belirteci, **B-**Kandan elde edilen DNA ile yapılmış PZR reaksiyonu kontrolü(Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK13-F , CK13-R, Primer konsantrasyonu: 0.3µM), **C-**Tonklab-14 numaralı örneğin parafin blok tümör dokusundan elde edilmiş DNA ile yapılan PZR reaksiyonu kontrolü (Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK13-F , CK13-R, Primer konsantrasyonu: 0.3 µM), **D-**Kandan elde edilen DNA ile yapılmış PZR reaksiyonu kontrolü(Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK12_13-F , CK12_13-R, Primer konsantrasyonu: 0.3µM), **E-**Tonklab-14 numaralı örneğin parafin blok tümör dokusundan elde edilmiş DNA ile yapılan pcr reaksiyonu kontrolü (Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK12_13-F , CK12_13-R, Primer konsantrasyonu: 0.3 µM).

3.6.4.5 PZR Sonrası Saflaştırmada Örnek Kaybının Kontrolü

Amplifikasyon PZR'sinden sonra PZR ürünleri ortamdaki fazlalık nükleotid, tuz ve enzimlerden arındırılması gerekir. Ancak bu saflaştırma basamağı kolon tabanlı bir saflaştırma yöntemi kullanıldığından PZR ürünlerinin varlığı pürifikasyondan sonra bakılarak dizileme PZR'ı adımına geçilmeli (Şekil 27).



Şekil 27. Kolon tabanlı saflaştırma işleminin amplikon kaybına olan etkisi

A-Moleküler ağırlık belirteci, B-Kandan elde edilen DNA ile yapılmış PZR reaksiyonu kontrolü (Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK11-F , CK11-R, Primer konsantrasyonu: 0.3µM), C-Kandan izole edilen DNA ile elde edilmiş PZR ürünlerinin pürifikasyon sonrası kontrolü, D-Tonklab-14 numaralı örneğin parafin blok tümör dokusundan elde edilmiş DNA ile yapılan PZR reaksiyonu kontrolü (Örnek hacmi: 7 µl, Primer ismi: CK11-F , CK11-R, Primer konsantrasyonu: 0.3 µM), E-Tonklab-14 numaralı örneğin parafin blok tümör dokusundan izole edilen DNA ile elde edilmiş PZR ürünlerinin pürifikasyon sonrası kontrolü.

3.6.5. ANALİTİK VALİDASYON

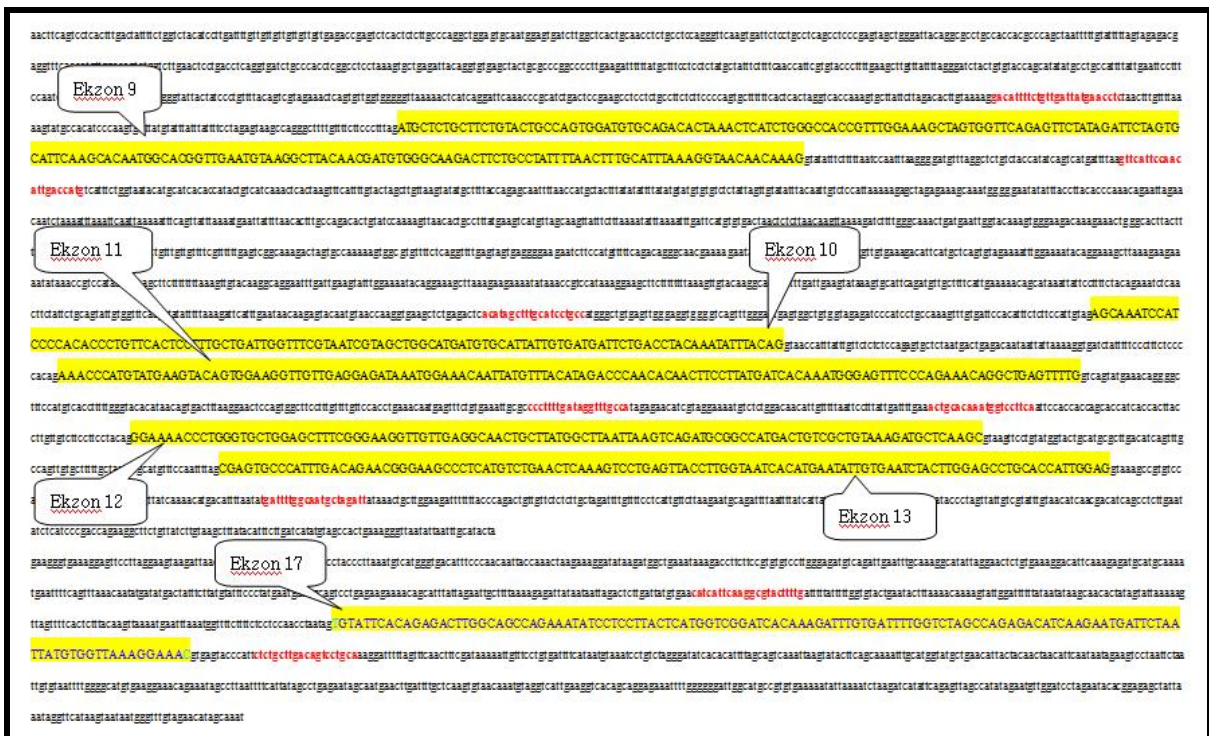
DNA tabanlı testler için, belirlenmesi planlanan dizinin (analitin) var olmasının (analytical sensitivity) veya olmama olasılığının(analytical specificity) analitik validasyon ile doğrulanması gerekmektedir. Analitik validasyonun diğer bir ölçümü aynı örneğin tekrarlayan ölçümlerinden alınan sonuçlarla, güvenilirlik saptanmasını kapsamaktadır. Analitik validasyonda aynı örneklerin test edilecek yeni metodoloji ile elde edilen sonuçları altın standart olarak onaylanan yöntemden elde edilen sonuçlarıyla karşılaştırılır.

Analitik testin klinik açıdan kullanımından önce sensitivite ve spesifitesi mutlaka belirlenmelidir.

DEU Onkoloji enstitüsü Temel Onkoloji Bilim dalında ilk kez kullanılacak olan genetik analiz sisteminin DNA sekanslama amacıyla kullanılması ve sonuçların doğruluğundan emin olabilmek amaçlı 20 olgunun izole edilmiş DNA örnekleri *KİT* geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 bölgelerinin dizi analizi için uzman dizileme laboratuvarına (Macrogen Inc., Seoul, Kore Cumhuriyeti) gönderildi. Analitik validasyon için örnek seçimi Westgard yöntem validasyonu

düzenlemelerine göre (Westgard method validation) yapılmıştır. Uzman dizileme laboratuvarı DNA dizi analizinde Sanger sekanslama yöntemini kullanmaları ve büyük örnek hacimlerinden ötürü altın standart olarak kabul edildi.

Uzman DNA dizileme laboratuvarında *KIT* geni ekzon 9, 11, 13 ve 17'ye özgü primerler tasarlandı. Ekzon 11 ile ekzon 10'un arasındaki, aynı şekilde ekzon 13 ile ekzon 12'nin arasındaki intronik bölgeler kısa olduğundan primer tasarımları ekzon 10_11 ile ekzon 12_13'ü bir arada kapsayacak şekilde gerçekleştirildi (Şekil 28). İleri, geri (sense, antisense) primer dizilerini 5'-->3' yönünde aşağıda belirtilmektedir (Tablo 18).

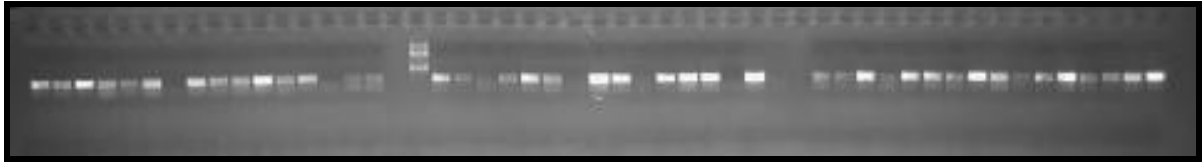


Şekil 28. Uzman DNA dizileme laboratuvarında *KIT* geni ekzon 9, ekzon 10-11, ekzon 12-13 ve ekzon 17'nin amplifikasyonu için tasarlanan primelerin KIT geni üzerinde gösterimi

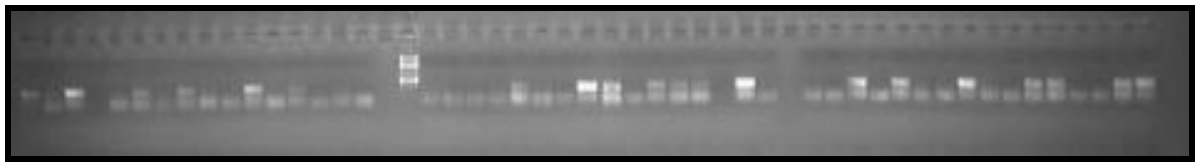
Tablo 17. *KIT* geni ekzon 9, 11, 13 ve 17'nin PZR işlemlerinde kullanılan primerleri (Uzman dizileme laboratuvarı)

Primer İsimleri <i>KIT</i> Geni	Primer Dizileri İleri Primer (5'-->3')	Primer Dizileri Geri Primer (5'-->3')
Ekzon 9	GACATTTTCTGTTGATTATGAACCTC	CATGGTCAATGTTGGAATGAAC
Ekzon 10_11	ACATAGCTTTGCATCCTGCC	TGGCAAACCTATCAAAAGGG
Ekzon 12_13	ACTGCACAAATGGTCCTTCA	AATCTAGCATTGCCAAAATCA
Ekzon 17	CATCATTCAAGGCGTACTTTTG	TGCAGGACTGTCAAGCAGAG

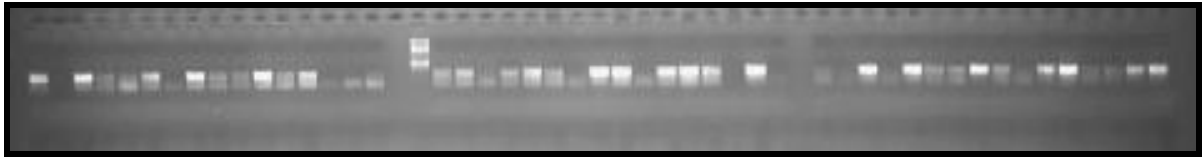
Parafin bloktan DNA elde edildi ve bu örneklerden konsantrasyonu 100ng/μl'den fazla olanlar uzman dizileme laboratuvarına gönderildi. Hedeflenen *KIT* geni eksonlarının amplifikasyon (çoğaltılma) PZR'ı, agaroz jelde PZR ürünlerinin kontrolü (Şekil 29, 30, 31, 32) PZR sonrası pürifikasyonu, dizileme PZR'ı ve sonrasında pürifikasyonu (temizleme) ile otomatik dizileyicide (96 kapilerli 3730XL, Applied Bioystems) dizinin yürütülme aşamaları, uzman dizileme laboratuvarı tarafından gerçekleştirildi (Şekil 33). Dizi sonrası kromatogram dosyaları dizilemeye uygun analiz programları ile incelenerek sonuçlar gönderildi.



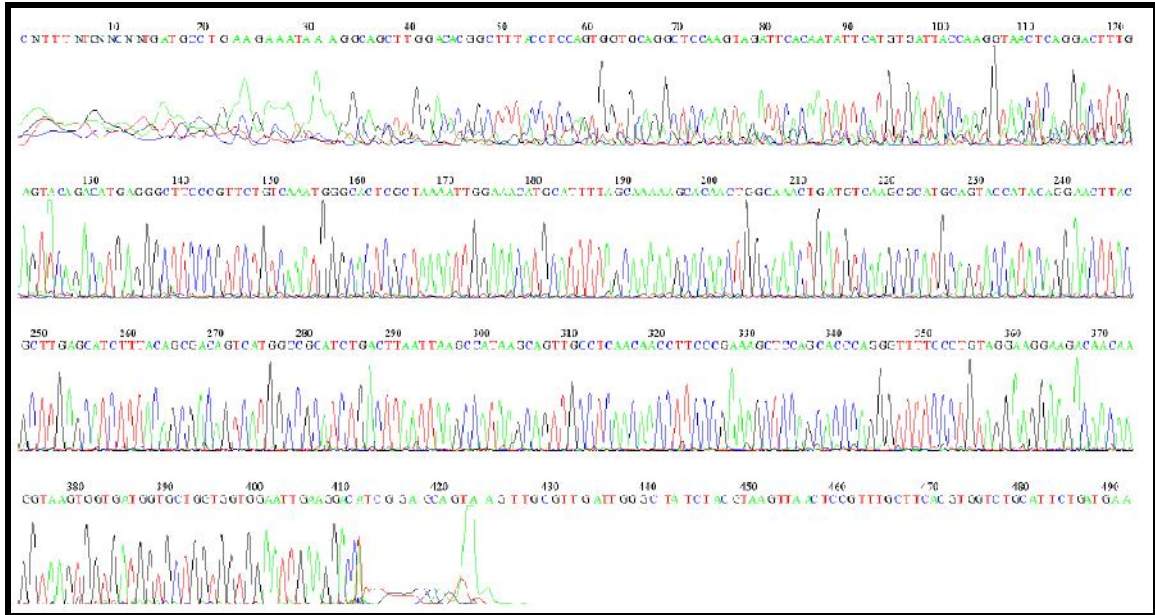
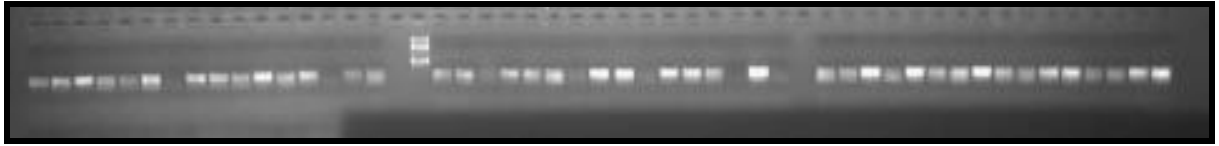
Şekil 29. *KIT* geni ekzon 9 PZR ürünleri



Şekil 30. *KIT* geni ekzon 10-11 PZR ürünleri

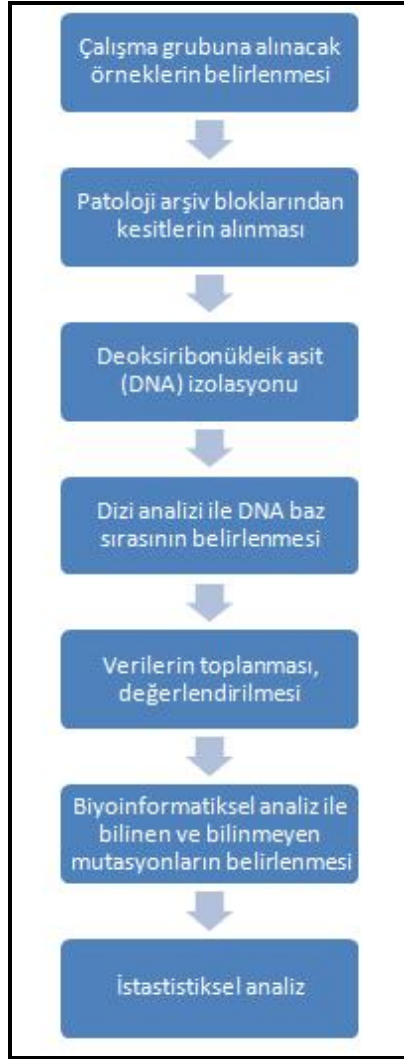


Şekil 31. *KIT* geni ekzon 12-13 PZR ürünleri



3.7 ARAŞTIRMA PLANI VE TAKVİMİ

Araştırmanın hazırlık aşamasından tamamlanana kadar yapılan çalışmalar şekil 34’de ayrıntılandırılmıştır.



Şekil 34. Çalışma planı

3.8 VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

3.8.1 İstatistiksel Değerlendirme

Metot doğrulama amaçlı yapılan analitik validasyonda sonuçlar güvenilirlik açısından Kappa ve Mc Nemar testleri ile karşılaştırıldı. Testin gerçek pozitif ve negatifleri yakalayabilmesinin gücü olarak spesifite ve sensitivite hesaplamaları yapıldı.

Çalışmada bireysel klinikopatolojik ve moleküler bulguların kendi aralarındaki etkileri ve bunların genel sağ kalıma olan etkileri araştırıldı.

Tanımlayıcı istatistikler ortalama ve yüzde şeklinde raporlanmıştır.

Klinikopatoloji ve sağaltım ile ilişkili parametreler olan yaş, cinsiyet, mitoz sayısı, tümör çapı, metastaz durumu, evre, histolojik alt tipi, risk grubu, genel *KİT* geni mutasyon

durumu, *KIT* geni ekzon 9, 11, 13, 17 mutasyon sunumları ile genel sağ kalım ilişkisi değerlendirildi. Cinsiyet, primer tümör yerleşimi, rezeksiyon durumu, uzak organ metastazı varlığı, metastaz yerleşim yeri, histolojik tipi, KİT, CD34, SMA, demsin, S-100, Ki-67 ekspresyonu, risk grubu, evre, tümör çapı, mitoz sayısı, progresyon durumu, son izlem durumu değişkenlerinin *KIT* mutasyonu varlığı ve yokluğundaki (ekzon 9 mutasyon var-yok, ekzon 11 mutasyon var-yok, ekzon 13 mutasyon var-yok, ekzon 17 mutasyon var-yok, herhangi bir mutasyon var-yok) ilişkileri Ki-Kare ve Fisher Kesin Testi kullanılarak incelenmiştir.

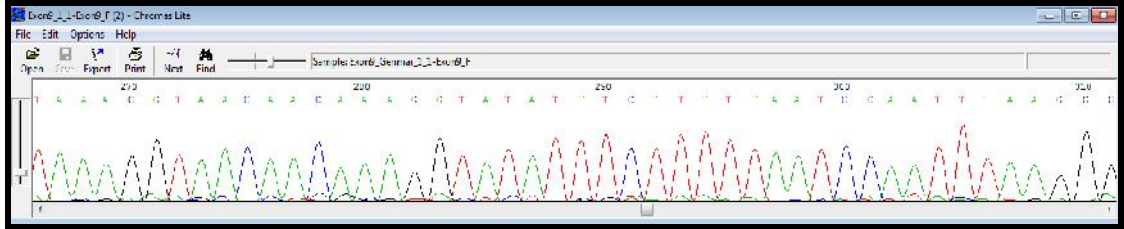
Genel sağkalım eğrileri Kaplan-Meier analizi ile yapılmıştır. Genel sağ kalım, tanı tarihi ile son izlem tarihi (olguda ölüm gerçekleşmiş ise ölüm tarihi) arasındaki zamanın ölçülmesi ile hesaplandı. Genel sağ kalım analizlerinde alt gruplar arasındaki karşılaştırmalar log-rank testi ile yapılmıştır.

İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS programı (Versiyon 15.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) kullanılarak yapılmıştır.

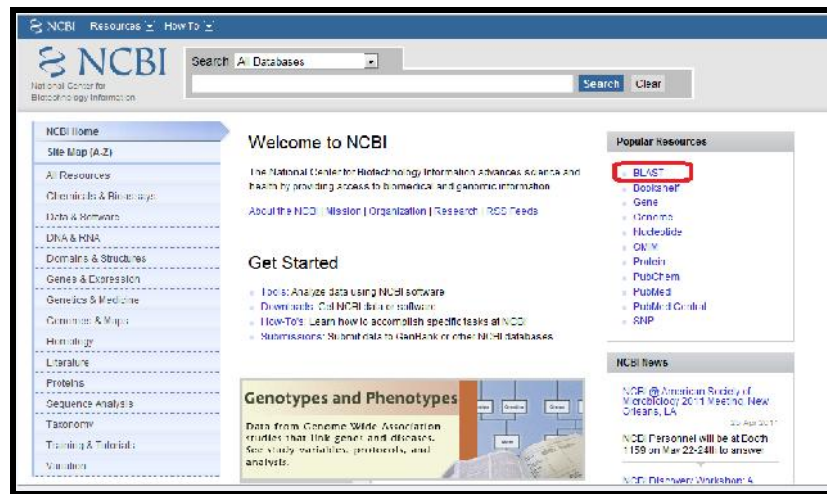
3.8.2 Biyoinformatik Analiz

Dizi analizi ile elde edilen baz dizisi verileri bir çok yönden farklı biyoinformatik programı seçenekleriyle incelenerek analiz yapıldı. Örneklerin dizi analizi sonucu elde edilen kromatogram dosyaları ChromasLite 2.01 (Copyright Technelysium Pty Ltd.) programı ile açılıp tek tek incelendi (Şekil 35) ve aynı programda kromatogram verisi FASTA formatına çevrildi. FASTA verileri ile National Center for Biotechnology Information (NCBI) resmi sitesinde “Blast” işlemi uygulandı (Şekil 36, 37). Elde edilen “blast”lama sonuçlarıyla, Ensemble veritabanındaki (<http://www.ensembl.org/index.html>) insan *KIT* geni “KIT [Ensembl/Havana merge gene: ENSG00000157404] ([ENST00000288135](http://www.ensembl.org/ENST00000288135))” cDNA sekansının ekzon 9, 11, 13 ve 17 bölgeleri referans alınarak doğru bölgenin analizlendiği kontrol edildi (Şekil 38). Yine aynı baz dizisi verileri DNASTAR Lasergene 8 programı ile referans dizi eşliğinde incelenerek mutasyonlar saptandı. Farklı örneklerin aynı bölgeye ait DNA baz dizisi verileri Chromatogram Explorer v.3.1.1 (Copyright Heracle Software 2010) programı kullanılarak birlikte incelendi bu şekilde cihaz kaynaklı pik hatalarının önüne geçilerek belirlenen mutasyonlar kontrol edildi (Şekil 38). Bulunan tüm mutasyonlar Catalogue of Somatic Mutations in Cancer- COSMIC Veritabanı (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>) kullanılarak daha önce bu konu üzerine

çalışan gruplar tarafından saptanıp saptanmadığı kontrol edildi (Şekil 40). Cosmic Veritabanında yer alan mutasyonların “mutation id” leri kaydedildi.



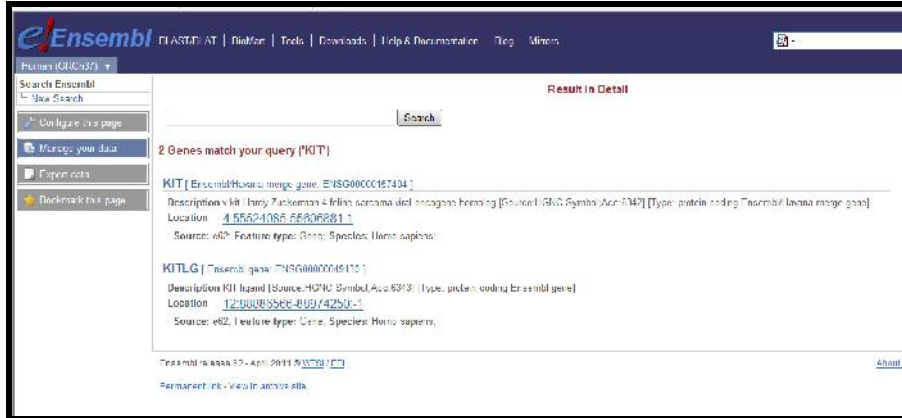
Şekil 35. Kromatogram dosyalarının ChromasLite programı ile açılması



Şekil 36. NCBI veritabanı açılış sayfası ve “Blast” menüsü



Şekil 37. NCBI veritabanındaki “Blast” sonucu görüntüsü



Şekil 38. Ensemble veritabanında referans *KIT* geni bilgilerinin bulunması



Şekil 39. Chromatogram Explorer programı ile örneklerin bir arada incelenmesi

COSMIC

FILTER
 Mutation type
 Sample Source
 Somatic Status
 Synonymous Status
 Apply
 Reset

Current Selection
 Genes Chosen
 KIT
 Tissues Chosen
 All Tissues
 Sub Tissues Chosen
 Fibroblasts, Bone and cartilage, Blood
 KIT
 Blood, Fibroblasts, Bone and cartilage, Blood
 Epithelial
 Spindle
 Spindle and epithelial
 Help

People Search
 Library Services

Distribution of somatic mutations in KIT

Position	Mutations
455	p.R455G
472	p.L472L
487	p.V487V
500	p.V500V, p.V500V, p.V500V
502	p.V502V, p.V502V, p.V502V, p.V502V, p.V502V
503	p.V503V, p.V503V, p.V503V
504	p.E504E
505	p.V505V, p.V505V
506	p.G506H, p.G506H
507	p.V507V, p.V507V, p.V507V, p.V507V, p.V507V, p.V507V, p.V507V, p.V507V, p.V507V, p.V507V
508	p.V508V, p.V508V, p.V508V, p.V508V, p.V508V, p.V508V, p.V508V, p.V508V, p.V508V, p.V508V
509	p.V509V, p.V509V, p.V509V, p.V509V, p.V509V, p.V509V, p.V509V, p.V509V, p.V509V, p.V509V
510	p.V510V, p.V510V, p.V510V, p.V510V, p.V510V, p.V510V, p.V510V, p.V510V, p.V510V, p.V510V
511	p.V511V, p.V511V, p.V511V, p.V511V, p.V511V, p.V511V, p.V511V, p.V511V, p.V511V, p.V511V
512	p.V512V, p.V512V, p.V512V, p.V512V, p.V512V, p.V512V, p.V512V, p.V512V, p.V512V, p.V512V
513	p.V513V, p.V513V, p.V513V, p.V513V, p.V513V, p.V513V, p.V513V, p.V513V, p.V513V, p.V513V
514	p.V514V, p.V514V, p.V514V, p.V514V, p.V514V, p.V514V, p.V514V, p.V514V, p.V514V, p.V514V
515	p.V515V, p.V515V, p.V515V, p.V515V, p.V515V, p.V515V, p.V515V, p.V515V, p.V515V, p.V515V
516	p.V516V, p.V516V, p.V516V, p.V516V, p.V516V, p.V516V, p.V516V, p.V516V, p.V516V, p.V516V
517	p.V517V, p.V517V, p.V517V, p.V517V, p.V517V, p.V517V, p.V517V, p.V517V, p.V517V, p.V517V
518	p.V518V, p.V518V, p.V518V, p.V518V, p.V518V, p.V518V, p.V518V, p.V518V, p.V518V, p.V518V
519	p.V519V, p.V519V, p.V519V, p.V519V, p.V519V, p.V519V, p.V519V, p.V519V, p.V519V, p.V519V
520	p.V520V, p.V520V, p.V520V, p.V520V, p.V520V, p.V520V, p.V520V, p.V520V, p.V520V, p.V520V

Şekil 40. COSMIC veritabanında bulunan *KIT* mutasyonları

3.9 ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI

Parafin dokudan DNA izolasyonu ve elde edilen nükleik asitin moleküler yöntemlerde kullanımı güçlükler içermektedir. Özellikle cerrahi operasyon ile alınan dokunun moleküler çalışmalarda kullanıma olanak verecek şekilde işlem görmesi oldukça önemlidir. Eğer bu işlem zinciri dokuların uygun koşullarda ve moleküler çalışmalara uygun olarak saptanmış bekleme sürelerine bağlı kalınmadan yapılması durumunda izole edilen DNA'nın kalitesini etkilemektedir. Bu nedenle parafin dokudan yapılan mutasyon analizlerinde DNA kalitesinden kaynaklı sıkıntılar yaşanmaktadır. DNA'nın kalitesindeki sorun PZR basamağında kendini göstererek hedeflenen bölgenin çoğaltılamamasını sağlayarak olgudan elde edilen DNA'nın moleküler analizde kullanımına izin vermemektedir. Veya buna benzer bir durum; DNA izolasyonundaki parafinsizleştirme sırasında kullanılan alkollerin PZR inhibitörü olarak görev görmesi PZR'nin başarısız olmasına ve doku kaybına neden olmaktadır. Hedeflenen gen bölgelerinin nükleotid sıralarının doğasından dolayı PZR sırasında kendi içlerinde saç tokası şeklini alması da PZR'nin başarısız olmasına neden olduğu için moleküler analizin ilk basamağında örneğin çoğaltılamaması moleküler analizdeki başarısızlık sebeplerindendir.

DNA dizileme PZR'si bittikten sonra ampikonlar kapiller elektroforez tabanlı genotiplendirme analizörleri ile analizlenir. Bu işlem sonrasında alınan kromatogram verilerinin bu yöntem açısından deneyimli kişiler tarafından yorumlanması önemli bir gerekliliktir.

3.10 ETİK KURUL ONAYI

İzmir 3 No'lu Klinik araştırmalar Etik Kurulu (Sekreteryaya Dokuz Eylül Üniversitesi)'nin 17.09.2009 tarih ve 07/01/2009 no.lu toplantısında 207/2009 protokol numaralı "Gastrointestinal stromal tümörlerde *KIT* mutasyonlarının klinik önemi isimli proje ile etik onayı alınmıştır (Ek 1).

Bu proje Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 2010.KB.SAG.006 proje numarası ile desteklenmiştir.

4.BULGULAR

4.1 ANALİTİK VALİDASYON

Uzman DNA dizileme laboratuvarına metot doğrulama amaçlı gönderilen örneklerin *KİT* geni ekzon 9 (κ_1), 11 (κ_2), , 13 (κ_3) ve 17 (κ_4) sonuçları ile bizim sonuçlarımız tutarlılık açısından Kappa ve Mc Nemar testleri ile karşılaştırıldı. Analitik validasyon Westgard yöntem validasyonu düzenlemelerine göre (Westgard method validation) yapılmıştır (201). Bu analiz ile ekzon 9 için elde edilen sonuç, uzman laboratuvar sonuçları ile kusursuz ($\kappa_1=0,857$ ($p< 0.001$); 95%CI, 0,587- 1,127), ekzon 11 için kusursuz ($\kappa_2 =0,90$ ($p< 0,001$); 95%CI, 0,710- 1,090), ekzon 13 için kusursuz ($\kappa_3 =1,00$ ($p< 0.001$); 95%CI, 1,00- 1,00) ve ekzon 17 için kusursuz ($\kappa_4 =1,00$ ($p< 0,001$); 95%CI, 1,00- 1,00) düzeyde tutarlı bulundu (Kappa için 0,40-0,75 orta derecede, 0,75+ kusursuz düzeyde tutarlılık demektir.) (202).

Biyoistatistikte bir testin altın standart olarak kabul görmüş test yöntemiyle karşılaştırılması sonucu elde edilen özgüllük (spesifite) ve duyarlılık (sensitivite) değerleriyle o testin pozitif ve negatif olarak kabul edilen olguları ayırt etme gücü hesaplanır. Bizim testimiz için özgüllüğün artması, yanlış pozitiflik oranının düşerek yabancı tip olguların hepsinin doğru bir şekilde ayırt edilmesini temsil eder. Duyarlılık ise yanlış negatiflik oranının azalarak mutant olguların doğru bir şekilde ayırt edilmesini sağlar. Duyarlılık ve özgüllük değerlerinin 1 (%100 anlamına gelir)' e yakın olması altın standartla karşılaştırılan testin pozitif ve negatif örnekleri yanlışsız ayırt edebildiği anlamına gelir (203).

Tablo 18. *KİT* ekzon 9, 11, 13 ve 17 mutasyon analizi analitik validasyonu

	Kappa değeri (κ)	Duyarlılık	Özgüllük
EKZON 9 için	$\kappa_1=0,857$	0,80	0,94
EKZON 11 için	$\kappa_2 =0,900$	0,91	0,90
EKZON 13 için	$\kappa_3 =1,00$	1	1
EKZON 17 için	$\kappa_4 =1.00$	1	1

4.2 DEMOGRAFİK VERİLER

2006-2010 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda GİST tanısı almış, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalında izlenen 65 olgu çalışmaya alındı. Altmış olgudan genotip analizine uygun miktar ve kalitede DNA elde edildi.

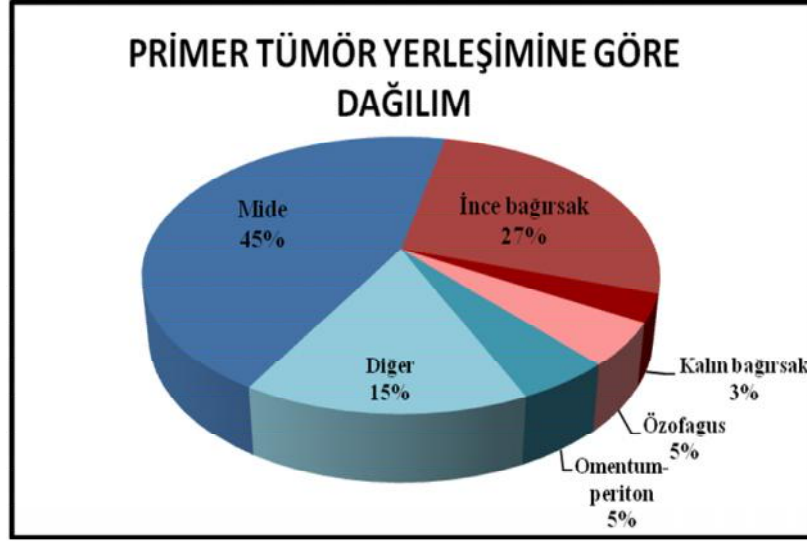
60 olgunun %53,3 (n:32)'ü kadın, %46,7 (n:28)'ü erkekti.



Şekil 41. Olguların cinsiyete göre dağılımları

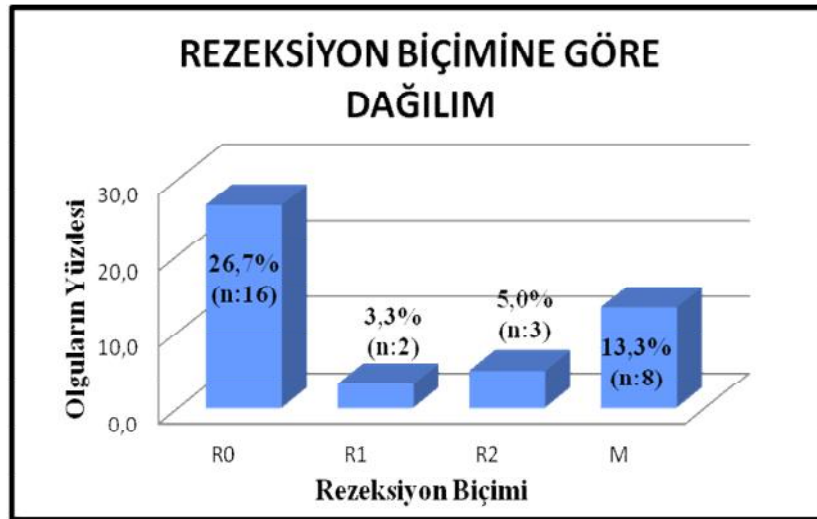
Olguların yaş ortalaması ($\pm$ SD), 60,57 ($\pm$ 12.8) ; medyan 61'dir (min-max; 20-86). Olgular yaşları 60'tan küçük olanlar, 60'tan büyük olanlar şeklinde gruplandıklarında, %50'si (n:30) 60 yaşın altında, %50'si (n:30) 60 yaşın üzerindedir.

Primer tümör yerleşimine göre sınıflama yapıldığında olguların %45 (n:27)' i mide, %26,7 (n:16)' si ince bağırsak, %3,3 (n:2)'ü kalın bağırsak, %5 (n:3)'i özofagus, %5 (n:3)'i omentum periton ve %15 (n:9)' i diğer bölge yerleşimliydi.



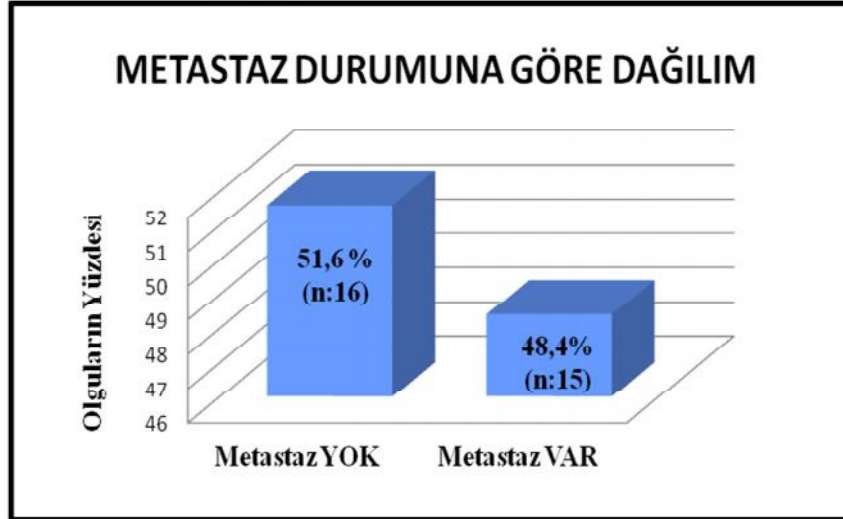
Şekil 42. Olguların primer tümör yerleşim yerine göre dağılımı

Rezeksiyon durumuna göre sınıflandırma yapıldığında olguların %26,7 (n:16)'si R0 rezeksiyon, %3,3 (n:2)' ü R1 rezeksiyon, %5 (n:3)'i R2 rezeksiyon, %13,3 (n:8)'ü M olarak sınıflandırıldı.



Şekil 43. Olguların rezeksiyon durumuna göre dağılımları

Metastaz açısından sorgulama yapıldığında olguların %51,6 (n:16)'sında metastaz gözlenmedi, %48,4 (n:15)'ünde metastaz gözlemlendi. Metastazı olan grubun %67 (n:10)'ü karaciğer, %13 (n:2)'u akciğer, %20 (n:3)'si diğer bölge yerleşimlidir.

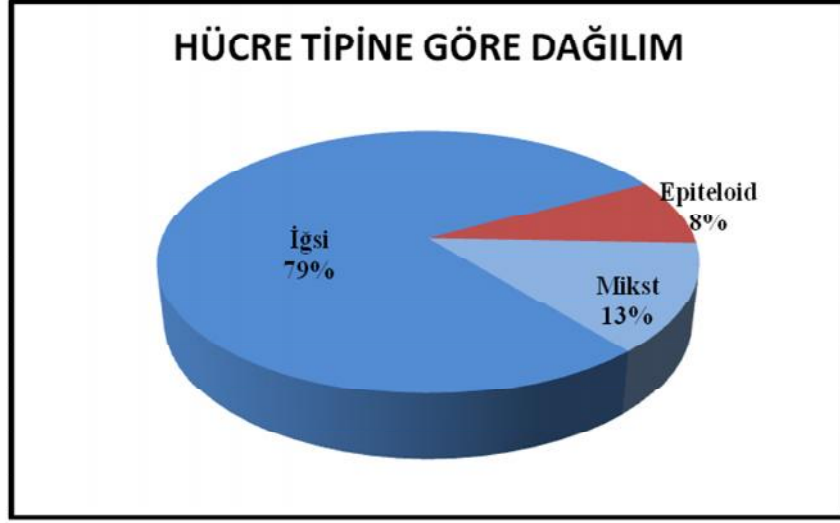


Şekil 44. Olguların metastaz durumuna göre dağılımı

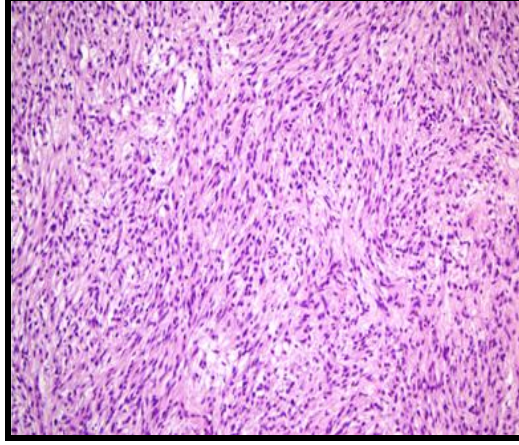


Şekil 45. Metastaz gelişen olguların metastaz yerleşim yerine göre dağılımları

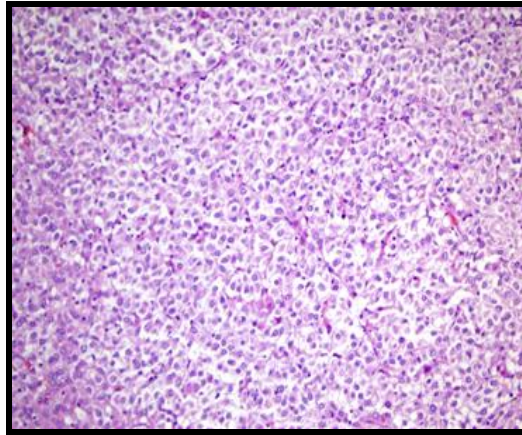
Olguların %78,3 (n:47)'sinde iğsi (Şekil 47), %8,3 (n:5)'ünde epiteloid (Şekil 48) ve %13,3 (n:8)'ünde mikst hücre tipi (Şekil 49) gözlemlendi.



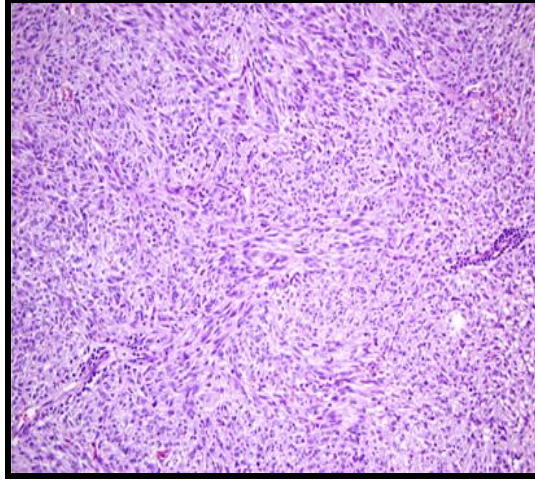
Şekil 46. Olguların hücre tipine göre dağılımları



Şekil 47. İgci hücre tipi (Tonklab 1 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x20'lik büyütme alanındaki görüntüsü)

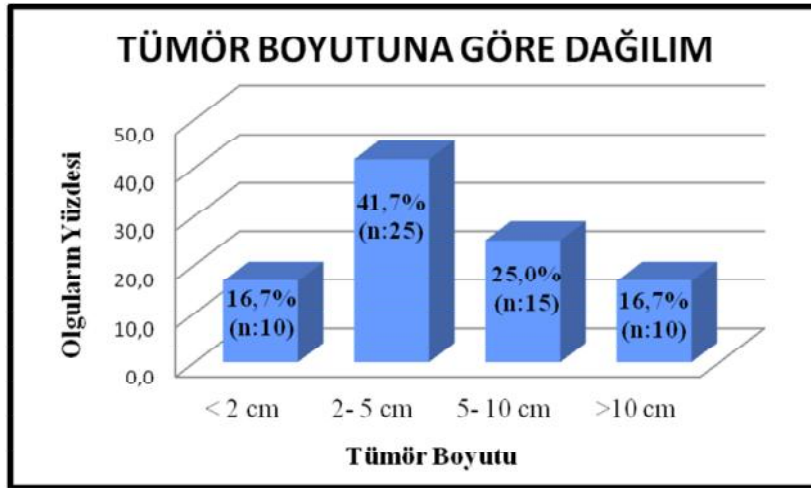


Şekil 48. Epiteloid hücre tipi (Tonklab 9 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x20'lik büyütme alanındaki görüntüsü)



Şekil 49. Mikst hücre tipi (Tonklab 15 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x20'lik büyütme alanındaki görüntüsü)

Olgularda tümörün en uzun çap ortalaması ($\pm$ SD), 6,03 ($\pm$ 5,82); medyan 5, (min-max, 0,3-35). Olguların tümör çapları 2 cm'den küçük olanlar, 2-5 cm arasında olanlar, 5-10 cm arasında olanlar ve 10 cm'den büyük olanlar şeklinde gruplandırıldı. Bu gruplamaya göre olguların %16,7'si (n:10) 2 cm'den küçük, %41,7'si (n:25) 2-5 cm arasında, %25'i (n:15) 5-10 cm arasında ve %16,7'si (n:10) 10 cm'den büyüktü.



Şekil 50. Olguların tümör boyutuna göre dağılımı

Olguların 50 BBA'da tümör mitoz sayısı ortalaması ($\pm$ SD), 7,7 ($\pm$ 16,48); medyan 2 (min-max, 0-100). Tümör dokularının 50 BBA'daki mitoz sayısı 5'ten az olanlar ve 5'ten çok olanlar şeklinde gruplanmıştır. Bu gruplamaya göre %70'inde (n:42) mitoz 5'ten küçük, %30'unda ise (n:18) mitoz 5'ten fazladır.



Şekil 51. Olguların mitoz sayısına göre dağılımı

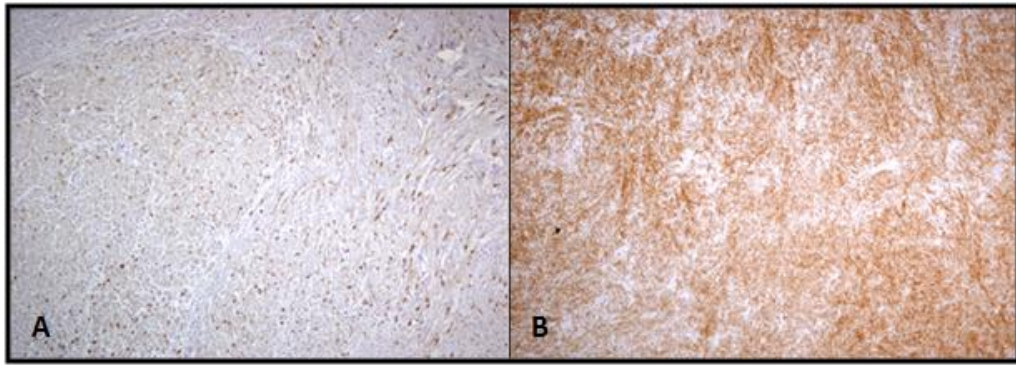
Olgular immünohistokimyasal fenotip bakımından sorgulandı. KİT, CD34, SMA, desmin, S-100 negatif (<%10 boyanma), fokal pozitif (%10-50 boyanma) ve pozitif (>%50 boyanma) şeklinde; Ki-67 parametreside <%10 boyanma ve ≥ 10 boyanma şeklinde sınıflandırıldı. KİT açısından taranan olguların %98,3 (n:59)'ü pozitif, %1,7 (n:1)'i fokal pozitif olarak saptandı. CD34 açısından taranan olguların %71,7 (n:43)'si pozitif, %28,3 (n:17)'ü negatif olarak saptandı. SMA açısından taranan olguların %41,7 (n:25)'si pozitif, %6,7 (n:4)'si fokal pozitif, %51,7 (n:31)'si negatif olarak saptandı. Desmin açısından taranan olguların %11,7 (n:7)'si pozitif, %1,7 (n:1)'i fokal pozitif, %86,7 (n:52)'i negatif olarak saptandı. S-100 açısından taranan olguların %66,7 (n:40)'si pozitif, %5 (n:3)'ü fokal pozitif ve %28,3 (n:17)'si negatif olarak saptandı. Ki-67 açısından taranan olguların %33 (n:20)'ü ≥ 10 olacak şekilde, %66,7 (n:40)'si <%10 olacak şekilde boyanma gösterdi.

Tablo 19. Olguların CD34, SMA, desmin, S-100 değerlendirmesine göre dağılımları

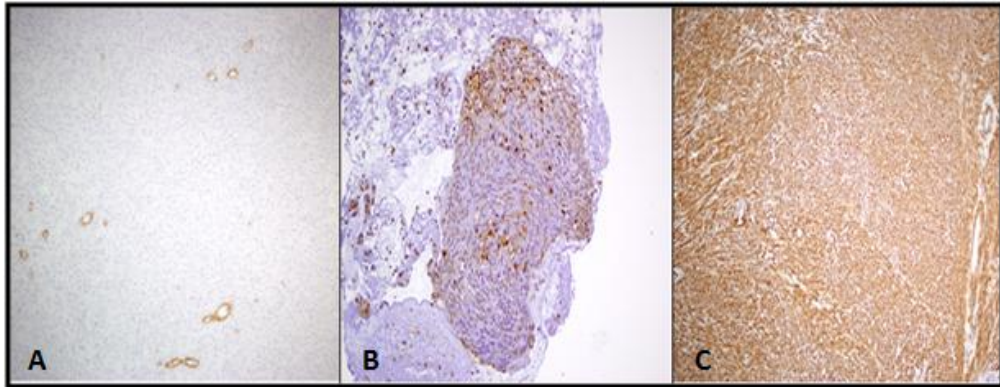
BOYANMA DERECEŚİ (Boyanma yaygınlığı)	CD34 (n)	SMA (n)	DESMİN (n)	S-100 (n)
Pozitif (>% 50)	%71,7 (n:43)	%41,7 (n:25)	%11,7 (n:7)	%66,7 (n:40)
Fokal pozitif (% 10– 50)	0	%6,7 (n:4)	%1,7 (n:1)	%5 (n:3)
Negatif (% 0- 10)	%28,3 (n:17)	%51,7 (n:31)	%86,7 (n:52)	%28,3 (n:17)

Tablo 20. Olguların CD117 değerlendirmesine göre dağılımları

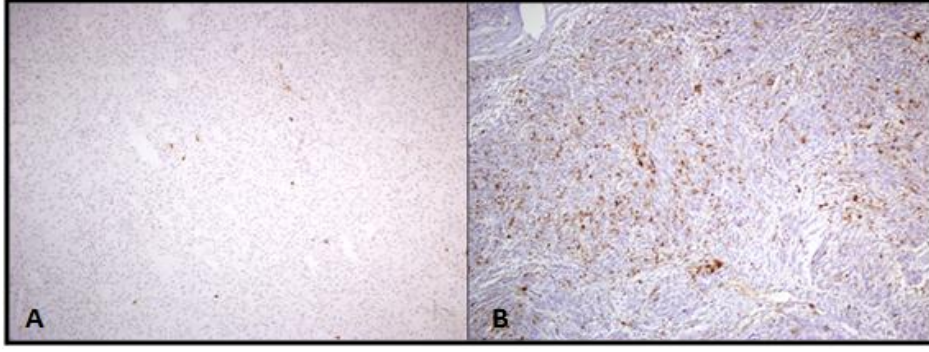
BOYANMA DERECEŚİ (Boyanma yaygınlığı; yoğunluğu)	CD117 (n)
Pozitif (>%50; ++/+++)	%98,3 (n:59)
Fokal pozitif (% 10- 50; +/-++)	%1,7 (n:1)
Negatif (% 0- 10; +)	0



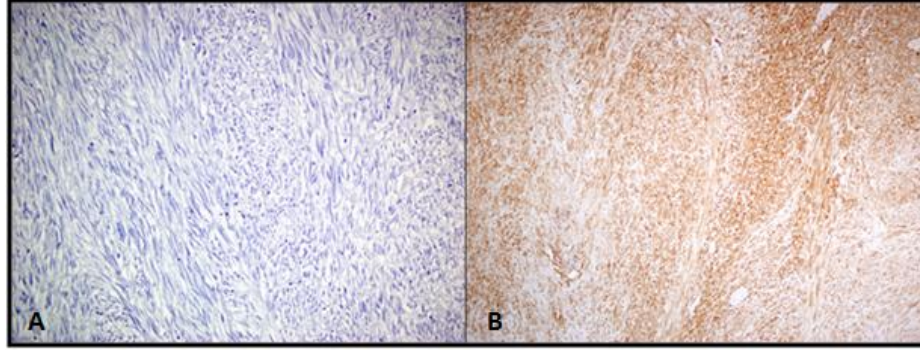
Şekil 52. İmmünohistokimyasal olarak CD117 ekspresyonu. A-Tonklab 2 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x10'lik büyütme alanındaki CD117 fokal pozitif görüntüsü, B-Tonklab 1 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x10'lik büyütme alanındaki CD117 pozitif (diffüz) görüntüsü.



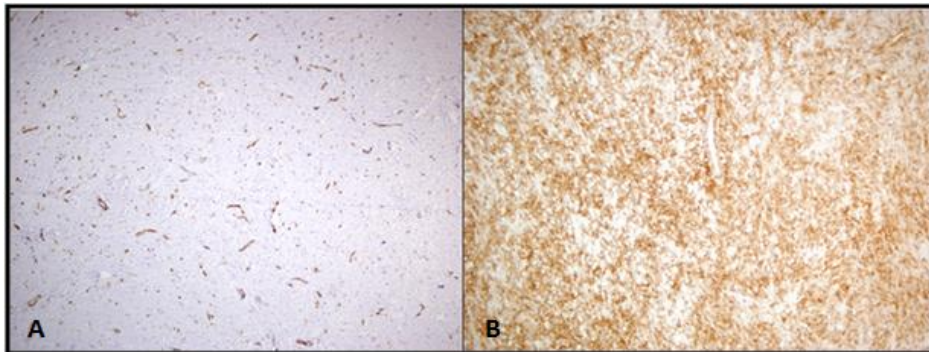
Şekil 53. İmmünohistokimyasal olarak SMA ekspresyonu. A-Tonklab 1 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x10'lik büyütme alanındaki SMA negatif görüntüsü, B- Tonklab 8 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x20'lik büyütme alanındaki SMA fokal pozitif görüntüsü, C- Tonklab 2 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x10'lik büyütme alanındaki SMA pozitif (diffüz) görüntüsü.



Şekil 54. İmmünohistokimyasal olarak S-100 ekspresyonu. A- Tonklab 1 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x10'lik büyütme alanındaki S-100 negatif görüntüsü, B- Tonklab 7 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x10'lik büyütme alanındaki S-100 fokal pozitif görüntüsü.



Şekil 55. İmmünohistokimyasal olarak desmin ekspresyonu. A- Tonklab 9 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x20'lik büyütme alanındaki desmin negatif görüntüsü, B- Tonklab 2 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x10'lik büyütme alanındaki desmin pozitif (diffüz) görüntüsü.

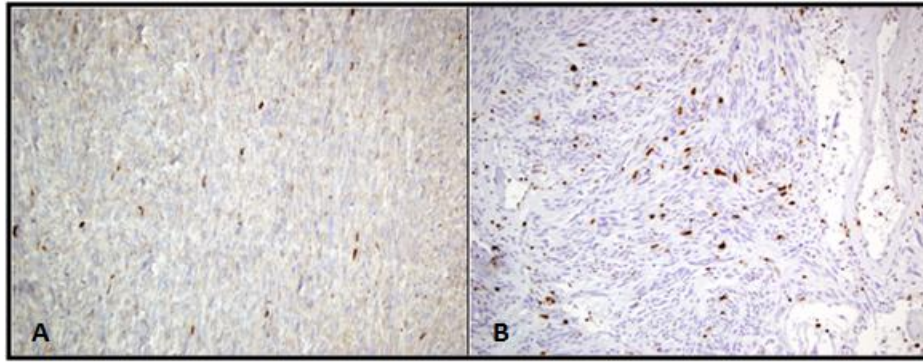


Şekil 56.İmmünohistokimyasal olarak CD34 ekspresyonu. A- Tonklab 2 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x10'lik büyütme alanındaki CD34 negatif görüntüsü, B- Tonklab 1

numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x20'lik büyütme alanındaki CD34 pozitif (diffüz) görüntüsü.

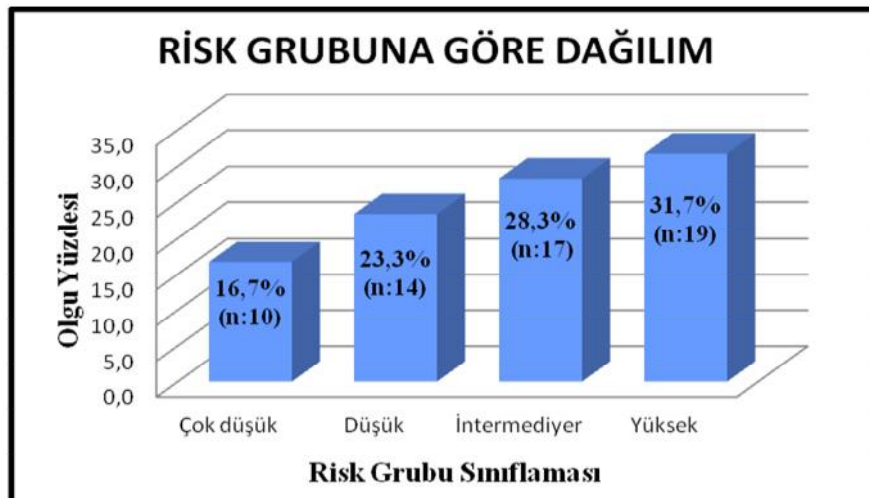
Tablo 21. Olguların Ki-67 ekspresyon düzeyine göre dağılımları

BOYANMA DERECEŚİ	Ki-67
≥ 10	%33,3 (n:20)
$< \%10$	%66,7 (n:40)



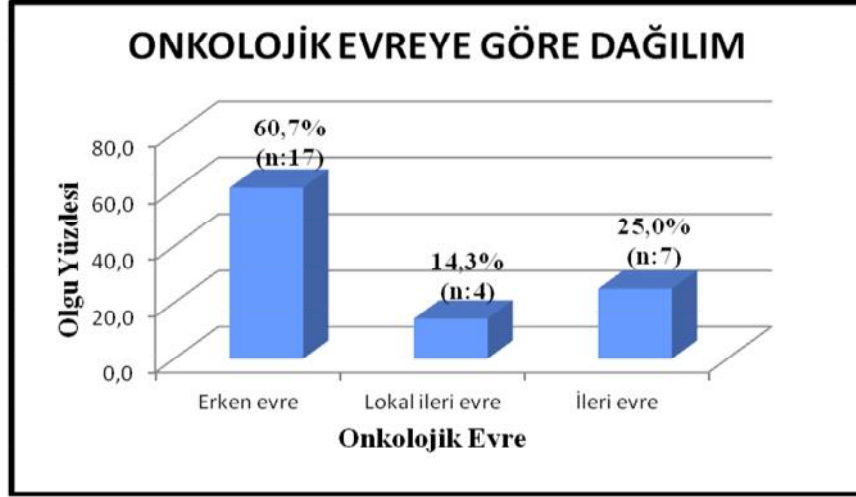
Şekil 57. İmmünohistokimyasal olarak Ki-67 ekspresyonu. A- Tonklab 9 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x20'lik büyütme alanındaki Ki-67 $< \%10$ görüntüsü, B- Tonklab 7 numaralı olgunun ışık mikroskobu ile x20'lik büyütme alanındaki Ki-67 $> \%10$ görüntüsü.

Olguların %16,7 (n:10)'si çok düşük, %23,3 (n:14)'ü düşük, %28,3 (n:17)'ü intermediyer ve %31,7 (n:19)'si yüksek risk grubundadır.



Şekil 58. Olguların risk grubuna göre dağılımları

Olguların onkolojik evreye göre sınıflandırılmasına göre erken evre olgular %60,7 (n:17), lokal ileri olgular %14,3 (n:4) ve ileri evre olgular %25 (n:7) oranındadır.



Şekil 59. Olguların onkolojik evreye göre dağılımları

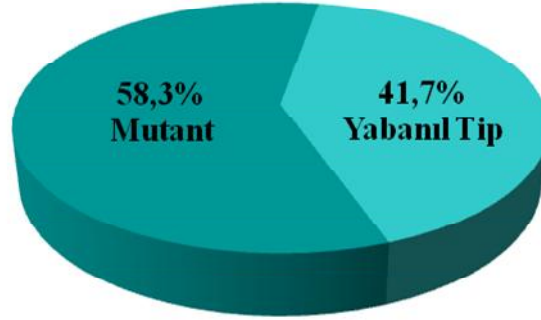
4.3 MUTASYON ANALİZİ VERİLERİ

Saptanan *KIT* geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 mutasyonları DNA düzeyinde ve protein düzeyinde saptanmıştır. Mutasyon terminolojisinde Human Genome Variation Society (HGVS) önerileri göz önünde bulundurulmuştur. Nükleotit numaralandırılması Ensemble (<http://www.ensembl.org/index.html>) insan *KIT* geni “KIT [Ensembl/Havana merge gene: ENSG00000157404] (ENST00000288135)” cDNA sekansına dayanmaktadır.

65 olgu genotip analizi çalışmasına alındı. 5 olgudan genotip analizi için yeterli DNA örneği elde edilemedi. Bir olgunun ekzon 11 amplifikasyon PZR’sinde bant gözlenemedi. Tüm genotip analizleri sonucu olgu bazında tablo 21’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Genotiplendirme çalışmaları sonucu toplamdaki 60 olgudan %58,3 (n:35)’sinin *KIT* geni ekzon 9, 11, 13,17 bölgelerinden herhangi birinde mutasyon barındırdığı belirlendi.

***KIT* GENİ MUTASYON DURUMU (Genel)**
DEU Veritabanı (n:60)



Şekil 60. Olguların genel mutasyon durumuna göre dağılımları

Tablo 22. Tüm olguların *KIT* geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 bölgeleri mutasyon analizi sonucu elde edilen genotip bilgileri

ÖRNEK KODU	EKZON 9	EKZON 11	EKZON 13	EKZON 17
TONKLAB-1	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-2	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-3	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-4	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-5	DNA yetersiz	DNA yetersiz	DNA yetersiz	DNA yetersiz
TONKLAB-6	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-7	Yabanıl tip	p.D579del, c.1735_1737del GAT (Het.) (Cosmic Database mut id:1294) ve p.V569D, c.1706T>A(Het)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-8	DNA yetersiz	DNA yetersiz	DNA yetersiz	DNA yetersiz
TONKLAB-9	Yabanıl tip	p.V559_T574del c.1676_1722del (Het.) (Cosmic Database mut.id.28480)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-10	Yabanıl tip	p.P577L, c.1676T>C (Het.) (Cosmic Database Mut id.3903)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-11	Yabanıl tip	p.M552I, c.1656G>A (Cosmic Database mut id.25058), p.K558P c.1672A>C - 1673A>C, p.F584S, c.1751T>C	Yabanıl tip	Yabanıl tip

		(Cosmic Database mut id.1297)		
TONKLAB-12	Yabanıl tip	pW557_K558del, c.1669-1674del6 (Het.) (Cosmic Database mut id:19310)	p.K642E, c.1924A>G (Het.) (Cosmic Database mut.id.1304) ve p.N649D, c.1945A>G, (Het.) *	Yabanıl tip
TONKLAB-13	Yabanıl tip	pW557_558del, c.1669-1674del6 (Het.) (Cosmic Database mut id:19310)	p.K642E, c.1924A>G (Het.) (Cosmic Database mut.id.1304) ve p.N649D, c.1945A>G, (Het.) *	Yabanıl tip
TONKLAB-14	p.Q460H, c.1380G>C (CAG>CAC) (Het.) *	p.Q556_L576del, c.1666_1728del63 (Het.) (Cosmic Database mut.id.1205)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-15	Yabanıl tip	p.Q556_L576del, c.1666_1728del63 (Het.) (Cosmic database mut.id.1205)	Yabanıl tip	p.A795P ve p.D820A *
TONKLAB-16	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-17	Yabanıl tip	Y553N 1657T>A (TAT>AAT) (het) (Cosmic Database mut id.12454), N567Y 1699A>T (AAT>TAT) (Het) *	Yabanıl tip	Yabanıl tip

TONKLAB-18	Yabanıl tip	p.K550_E554 del, 1648_1662 del15, (Cosmic Database mut id:1162)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-19	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-20	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-21	Yabanıl tip	p.V559D (het.) c.1676T>A (Cosmic Database mut id.12435)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-22	Yabanıl tip	p.Q556_L576del, c.1666_1728del (Het.) (Cosmic Database mut id.1205)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-23	Yabanıl tip	p.P551_V559 del, c.1652_1678del27 (Het.)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-24	Yabanıl tip	Yabanıl tip	p.K642E, c.1924A>G (Het.) (Cosmic database mut id.1304)	Yabanıl tip
TONKLAB-25	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-26	DNA yetersiz	DNA yetersiz	DNA yetersiz	DNA yetersiz
TONKLAB-27	p.Y503_F504insAY, c.1509_1510insGCCTAT (Het.) (Insertion-in frame) (Cosmic Database mutation id.1326)	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-28	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip

TONKLAB-29	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-30	Yabanıl tip	p.L576del, c.1726_1728del CTT (Het.) (Cosmic Database mut id.18745)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-31	Yabanıl tip	p.W557_V559del (GGAAGG del) (Het.)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-32	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-33	Yabanıl tip	Yabanıl tip	p.P627L, c.1880C>T (Het.) (Cosmic database mut id.19323)	Yabanıl tip
TONKLAB-34	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-35	DNA yetersiz	DNA yetersiz	DNA yetersiz	DNA yetersiz
TONKLAB-36	Yabanıl tip	p.D579_H580insIDPTQLPYD, c.1737_1738ins27 (Cosmic database mut.id.23417)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-37	Yabanıl tip	p. P551H, c.1651C>A (Het.) (Cosmic database mut.id.1173)	p.K642E, c.1924A>G (Het.) (Cosmic database mut.id.1304)	Yabanıl tip
TONKLAB-38	Yabanıl tip	Yabanıl tip	p.K642E, c.1924A>G (Het.) (Cosmic database mut.id.1304)	Yabanıl tip
TONKLAB-39	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-40	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip

TONKLAB-41	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-42	Yabanıl tip	p.V560G, c.1679T>G (Het.) (Cosmic database mut.id.1260)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-43	Yabanıl tip	p.K550_W557del c.1648_1671del24 (Het) (Cosmic Database mut id.6142)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-44	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-45	Yabanıl tip	p.V559D, c.1676T>A (Het.) (Cosmic Database mut id.12435)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-46	Yabanıl tip	Başarısız PZR	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-47	Yabanıl tip	p.W557R, c.1669T>A (Het.) (Cosmic Database mut id.1216)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-48	Yabanıl tip	p.F584L, c.1752T>A (Het.)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-49	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-50	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-51	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-52	Yabanıl tip	p.V559G, c.1676T>G (Het.) (Cosmic Database mut.id.1253)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-53	DNA yetersiz	DNA yetersiz	DNA yetersiz	DNA yetersiz
TONKLAB-54	Yabanıl tip	p.Y553N, c.1657T>A (Cosmic Database mut id.12454), ve p.V569D c.1706T>A	Yabanıl tip	Yabanıl tip

TONKLAB-55	p.S451C, c.1352C>T (Het.) *	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-56	Yabanıl tip	p.K550_W557del c.1648_1671del24 (Het) (Cosmic Database mut id.6142)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-57	Yabanıl tip	p.K550_W557del c.1648_1671del24 (Het) (Cosmic Database mut id.6142)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-58	Yabanıl tip	p.P551_V555del, c.1652_1663del12 (Het.)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-59	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-60	p.Q460H, c.1380G>C (CAG>CAC) (Het.) *	Yabanıl tip	p.P627L, c.1880C>T (Het) (Cosmic database mut id.19323)	Yabanıl tip
TONKLAB-61	Yabanıl tip	p.V559D, c.1676T>A (Het.) (Cosmic database mut.id.1252)	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-62	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-63	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-64	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip
TONKLAB-65	p.Y503_F504insAY, c.1509_1510insGCCTAT, (Insertion-in frame) (Het.) (Cosmic Database mut. id.1326)	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip

***Literatürde bulunmayan mutasyonlar, *Literatürde bulunan mutasyonlar**

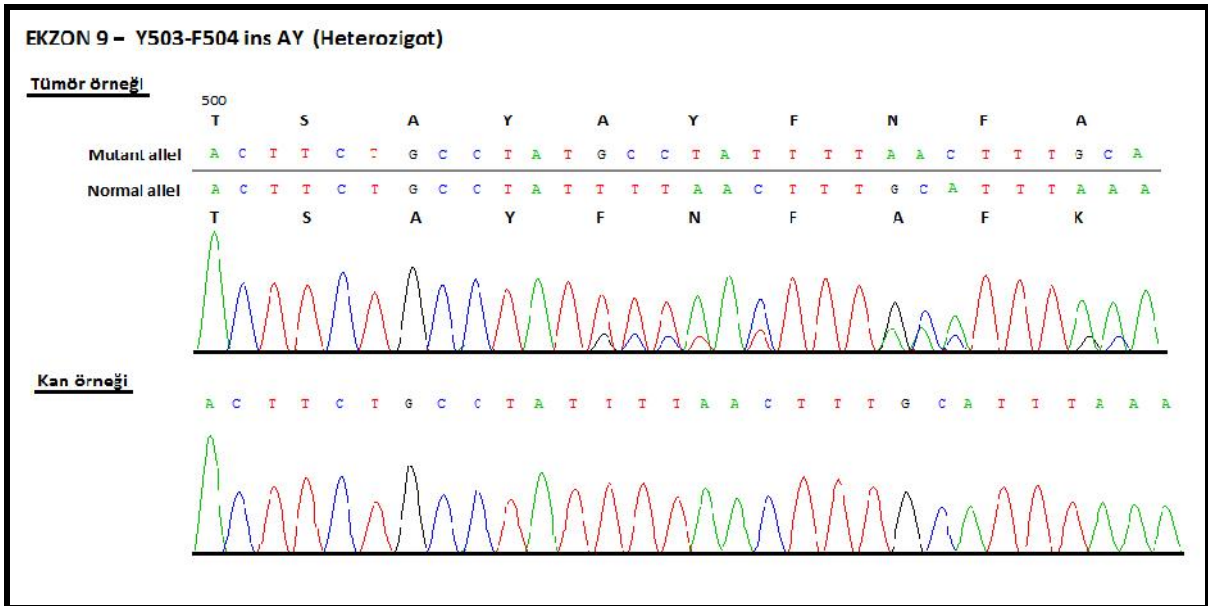
4.3.1 *KIT* Geni Ekzon 9 Mutasyonları

Olguların %8,3 (n:5)' ünün *KIT* geni ekzon 9 bölgesinde mutasyon içerdiği, %91,7 (50)'sinin ise ekzon 9 bölgesinde mutasyon içermediği belirlendi. Ekzon 9 mutasyonlarının %5 (n:3)' i tek nükleotid değişim mutasyonları (single nucleotide polymorphism: SNP), %3,3 (n:2)'ü ise insersiyonlardan oluşmaktadır.

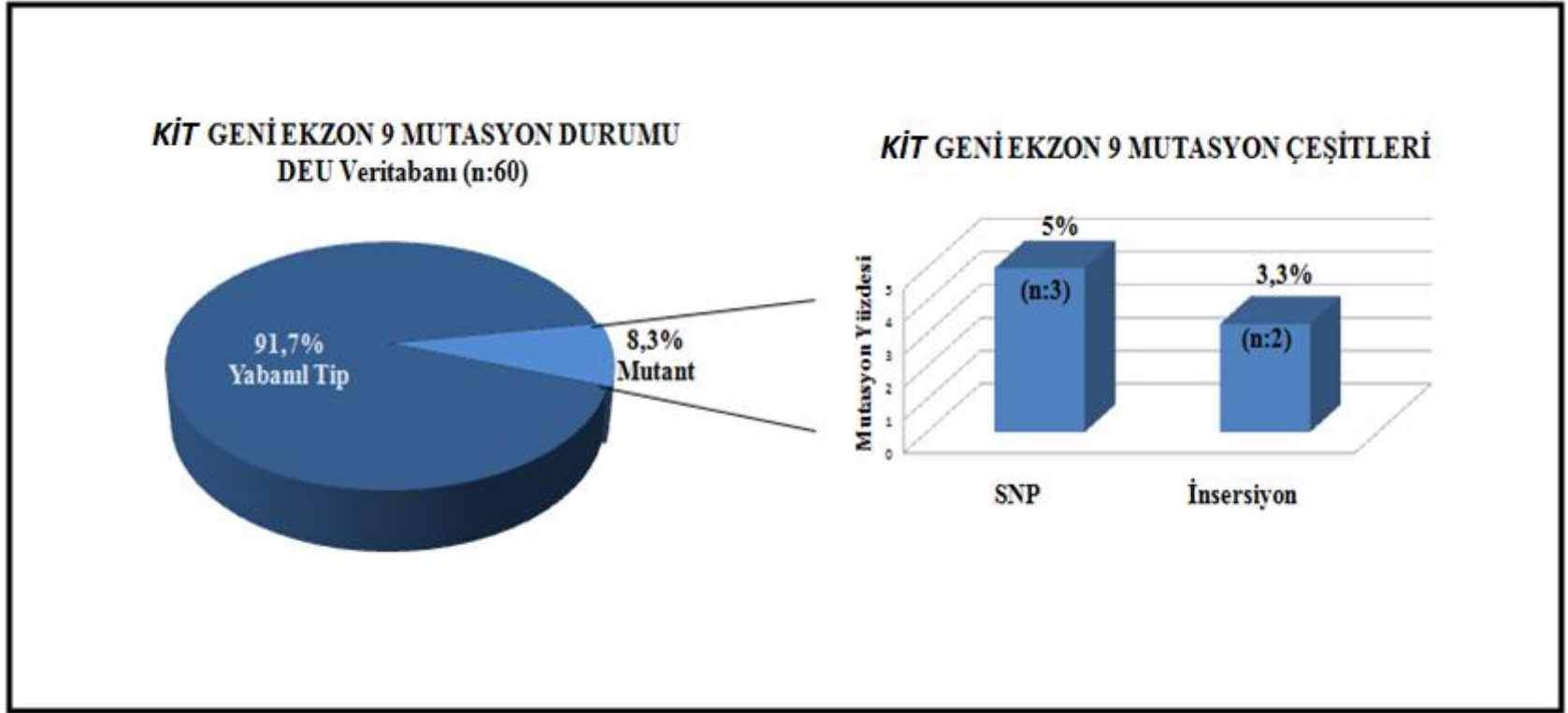
Olgu Numarası	Kodon	Mutasyon Çeşidi
	450 460 470 480 490 500 510 RCSASVLPVDVQTLNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKE	"Yabancıl Tip"
Tonklab 55	RCCASVLPVDVQTLNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKE	Nokta mutasyonu
Tonklab 14, 60	RCSASVLPVDVHTLNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKE	
Tonklab 27, 65	RCSASVLPVDVQTLNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYAYFNFAFKGNN	İnserisyon

*Literatürde bulunmayan mutasyonlar, *Literatürde bulunan mutasyonlar

Şekil 61. *KIT* geni ekzon 9 (449-514.kodonlar) yerleşimli olan mutasyonlar



Şekil 62. *KIT* geni ekzon 9 bölgesinde saptanan Y503-F504 ins AY (Het.) mutasyonunun kromatogram görüntüsü.



Şekil 63. Olguların *KIT* geni ekzon 9 mutasyon durumuna göre dağılımları ve saptanan mutasyon tiplerinin dağılımları

4.3.2 *KİT* Geni Ekzon 11 Mutasyonları

Olguların %47,5 (n:28)'inin *KİT* geni ekzon 11 bölgesinde mutasyon içerdiği, %52,5 (31)'inin ise ekzon 11 bölgesinde mutasyon içermediği belirlendi. Ekzon 11 mutasyonlarının %20,3 (n:12)'i tek nükleotid değişim mutasyonları (single nucleotide polymorphism: SNP), %23,7 (n:14)'ü delesyonlardan, %1,7 (n:1) insersiyonlardan ve %1,7 (n:1)'si kompleks mutasyonlardan oluşmaktadır.

Olgu numarası	Kodonlar	Mutasyon Cinsi
	150 200 250 300 350	
	Q K P M Y E V Q W K V V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	"Yabani Tip"
Tonklab 9	Q K P M Y E V Q W K _ _ _ _ _ Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	Delesyon
Tonklab 12,13	Q K P M Y E V Q _ _ V V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 14,15,22	Q K P M Y E V _ _ _ _ _ P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 18	Q _ _ _ _ V Q W K V V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 23	Q K _ _ _ _ V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 30	Q K P M Y E V Q W K V V E E I N G N N Y V Y I D P T Q _ P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 31	Q K P M Y E V Q _ _ _ V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 43,56,57	Q _ _ _ _ _ K V V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 58	Q K _ _ _ _ Q W K V V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 7	Q K P M Y E V Q W K V V E E I N G N N Y D Y I D P T Q L P Y _ H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 10	Q K P M Y E V Q W K V V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L L Y D H K W E F P R N R L S F G	Nokta mutasyonu
Tonklab 11	Q K P I Y E V Q W P V V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E S P R N R L S F G	
Tonklab 37	Q K H M Y E V Q W K V V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 42	Q K P M Y E V Q W K V G E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 21,45,61	Q K P M Y E V Q W K D V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 47	Q K P M Y E V Q R K V V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 48	Q K P M Y E V Q W K V V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E L P R N R L S F G	
Tonklab 52	Q K P M Y E V Q W K G V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 54	Q K P M N E V Q W K V V E E I N G N N Y D Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 17	Q K P M N E V Q W K V V E E I N G N Y Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	
Tonklab 36	Q K P M Y E V Q W K V V E E I N G N N Y V Y I D P T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G	İnsersiyon

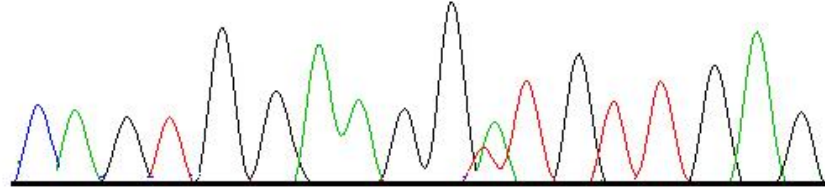
⊕ İnsersiyon (p.D579_H580insIDPTQLPYD). * Literatürde bulunmayan mutasyonlar. + Literatürde bulunan mutasyonlar

Şekil 64. *KİT* geni ekzon 11 (550-592.kodonlar) yerleşimli olan mutasyonlar

EKZON 11 - V559D (Heterozigot)

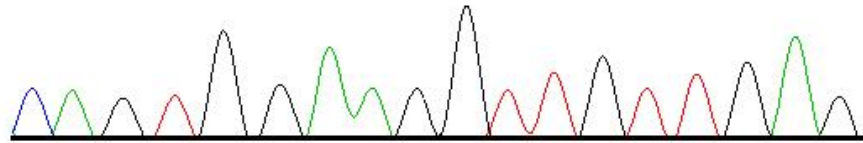
Tümör örneği

	556																	
	Q		W			K		D		V		E						
Mutant allele	C	A	G	T	G	G	A	A	G	G	A	T	G	T	T	G	A	G
Normal allele	C	A	G	T	G	G	A	A	G	G	T	T	G	T	T	G	A	G
	Q		W			K		V		V		E						

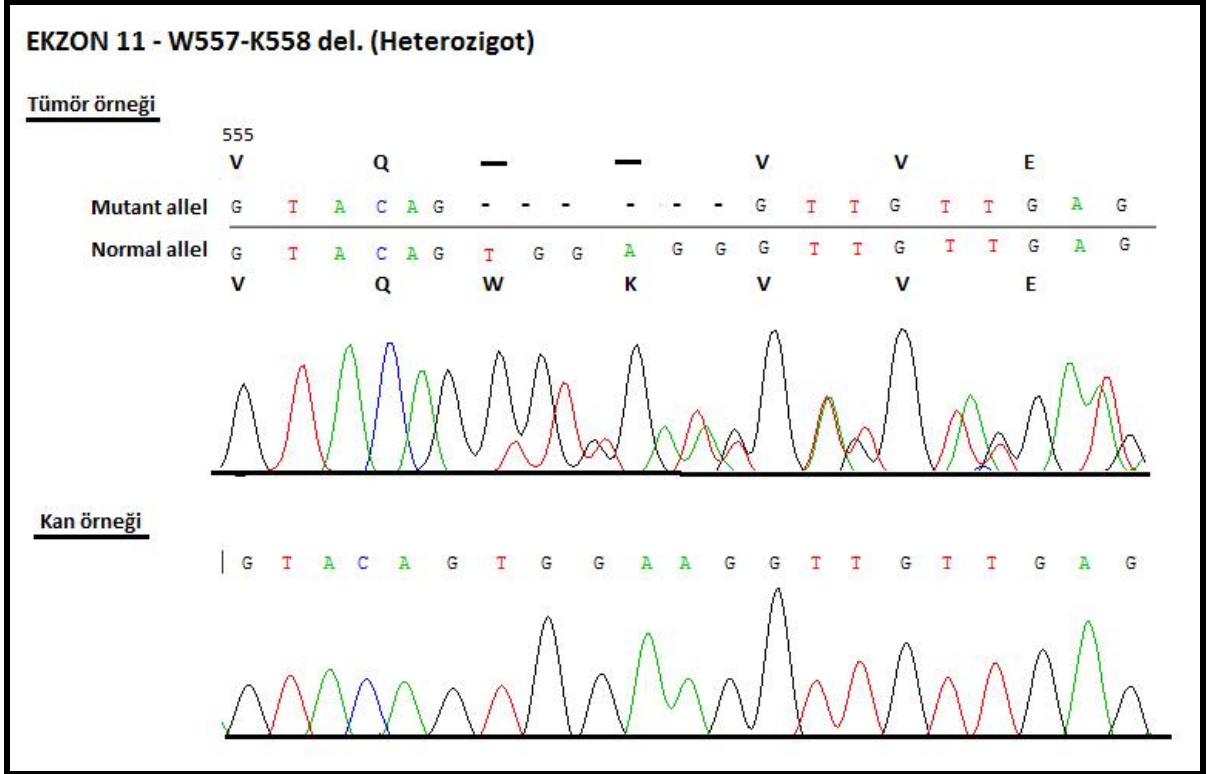


Kan örneği

C A G T G G A A G G T T G T T G A G

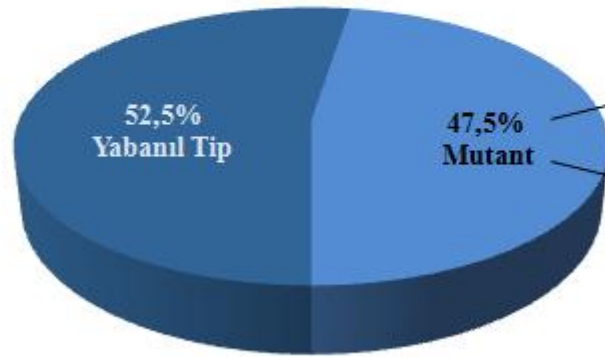


Şekil 65. *KIT* geni ekzon 11 bölgesinde saptanan V559D (Het.) mutasyonunun kromatogram görüntüsü.

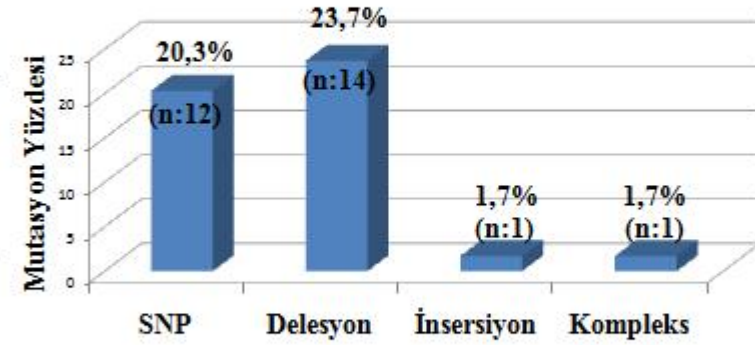


Şekil 66. *K1T* geni ekzon 11 bölgesinde saptanan W557- K558 del (Het.) mutasyonunun kromatogram görüntüsü.

KİT GENİ EKZON 11 MUTASYON DURUMU
DEU Veritabanı (n:60)



KİT GENİ EKZON 11 MUTASYON ÇEŞİTLERİ



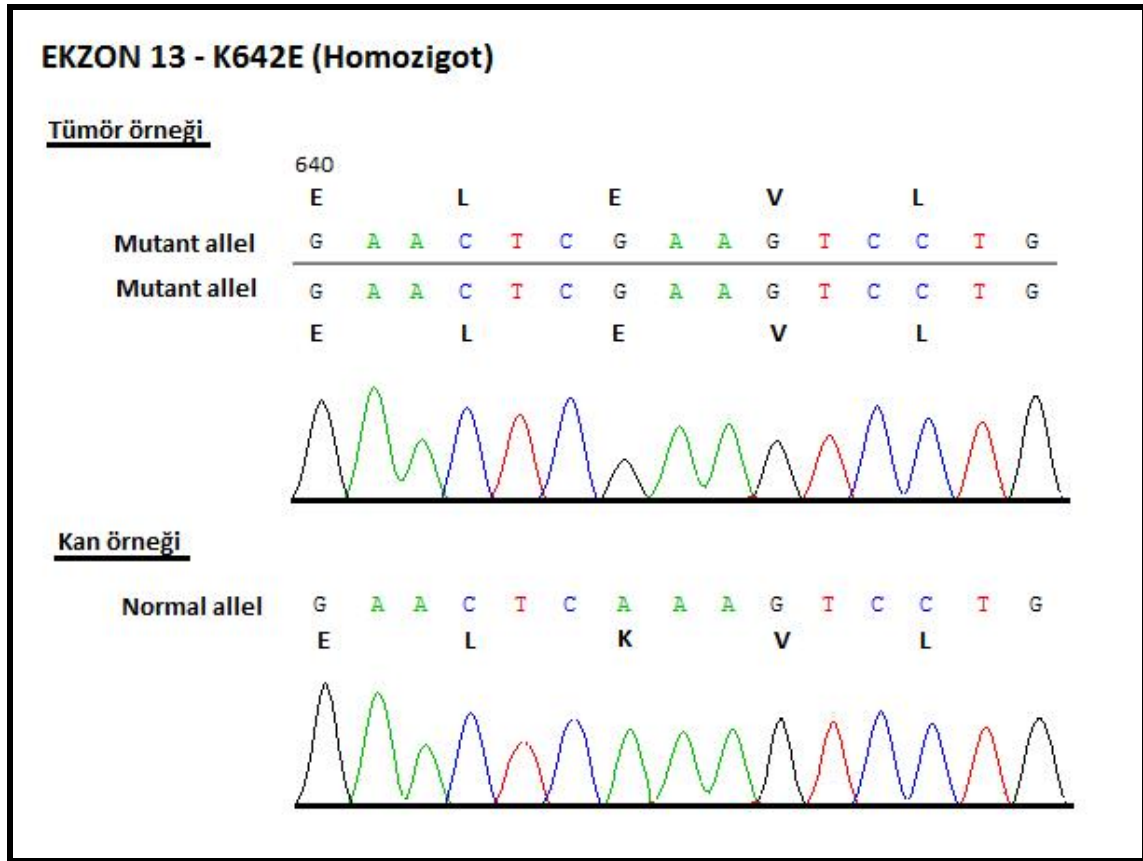
Şekil 67. Olguların *KİT* geni ekzon 11 mutasyon durumuna göre dağılımları ve saptanan mutasyon tiplerinin dağılımları

4.3.3 *KIT* Geni Ekzon 13 Mutasyonları

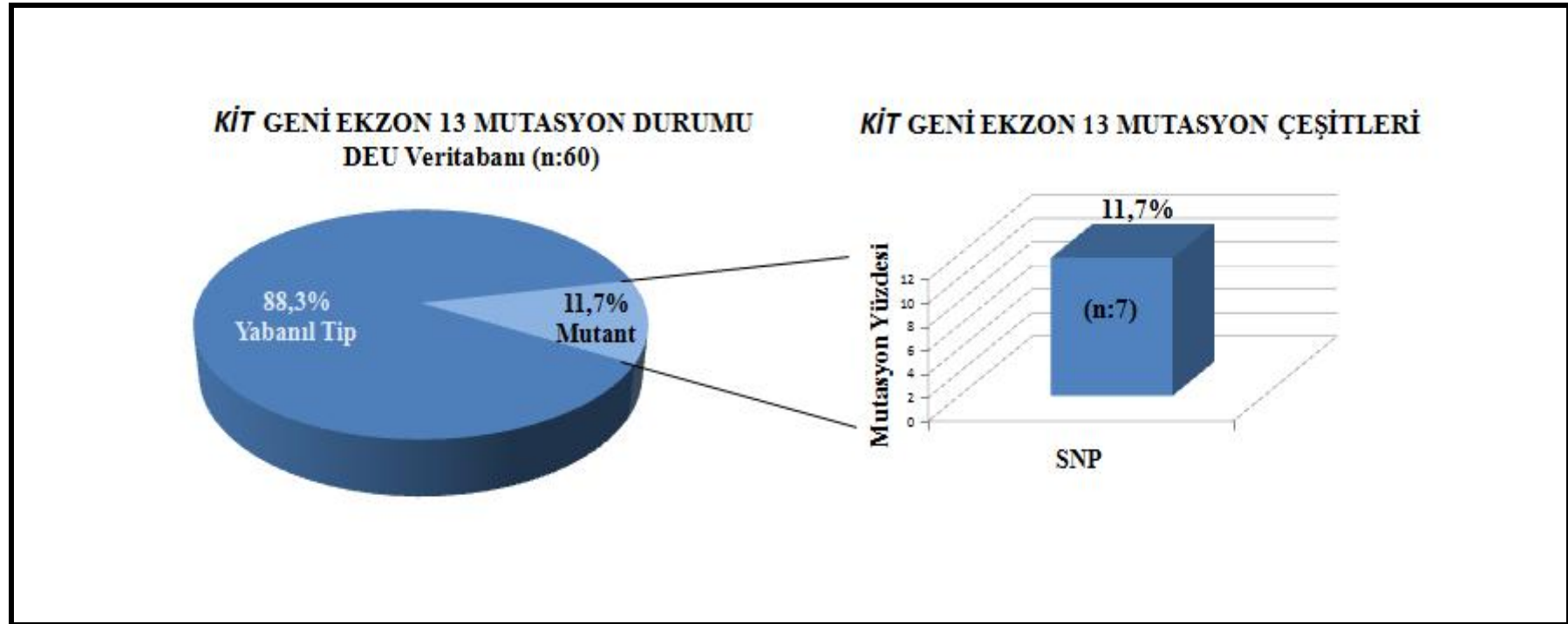
Olguların %11,7 (7)'sinin *KIT* geni ekzon 13 bölgesinde mutasyon içerdiği, %88,3 (53)'ünün ise ekzon 13 bölgesinde mutasyon içermediği belirlendi. Ekzon 13 mutasyonlarının hepsi SNP'lerden oluşmaktadır.

Olgu Numarası	Kodon	Mutasyon Çeşidi
	630640650660 P S A H L T E R E A L M S E L K V L S Y L G N H M N I V N L L G A C T I G G	"Yabancıl Tip"
Tonklab24,37,38	P S A H L T E R E A L M S E L E V L S Y L G N H M N I V N L L G A C T I G G	Nokta Mutasyonu
Tonklab 12,13	P S A H L T E R E A L M S E L E V L S Y L G D H M N I V N L L G A C T I G G	
Tonklab 33,60	L S A H L T E R E A L M S E L K V L S Y L G N H M N I V N L L G A C T I G G	
*Literatürde bulunmayan mutasyonlar , * Literatürde bulunan mutasyonlar		

Şekil 68. *KIT* geni ekzon 13 (627-664.kodonlar) yerleşimli olan mutasyonlar



Şekil 69. *KIT* geni ekzon 13 bölgesinde saptanan K642E (Het.) mutasyonunun kromatogram görüntüsü.



Şekil 70. Olguların *KİT* geni ekzon 13 mutasyon durumuna göre dağılımları ve saptanan mutasyon tiplerinin dağılımları

4.3.4 *KIT* Geni Ekzon 17 Mutasyonları

Olguların %1,7 (n:1)'sinin *KIT* geni ekzon 17 bölgesinde mutasyon içerdiği, %98,3 (n:59)'ünün ise ekzon 17 bölgesinde mutasyon içermediği belirlendi. Ekzon 17 bölgesindeki mutasyon SNP'tir.

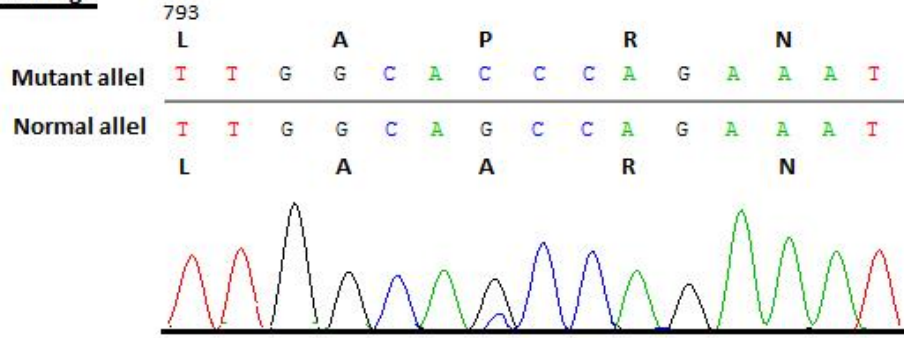
Ekzon 17 mutasyonu olan sadece 1 olgu saptanmıştır. Bu nedenle ekzon 17 mutasyon varlığı ve tipleri ile diğer parametreler arasındaki karşılaştırmalar yapılmamıştır.

Olgu Numarası	Kodon	Mutasyon Çeşidi
	790 800 810 820 C I H R D L A A R N I L L T H G R I T K I C D F G L A R D I K N D S N Y V V K G N	"Yabancıl Tip"
Tonklab 15	C I H R D L A P R N I L L T H G R I T K I C D F G L A R D I K N A S N Y V V K G N	Nokta Mutasyonu
*Literatürde bulunmayan mutasyonlar.		

Şekil 71. *KIT* geni ekzon 17 (788- 828.kodonlar) yerleşimli olan mutasyonlar

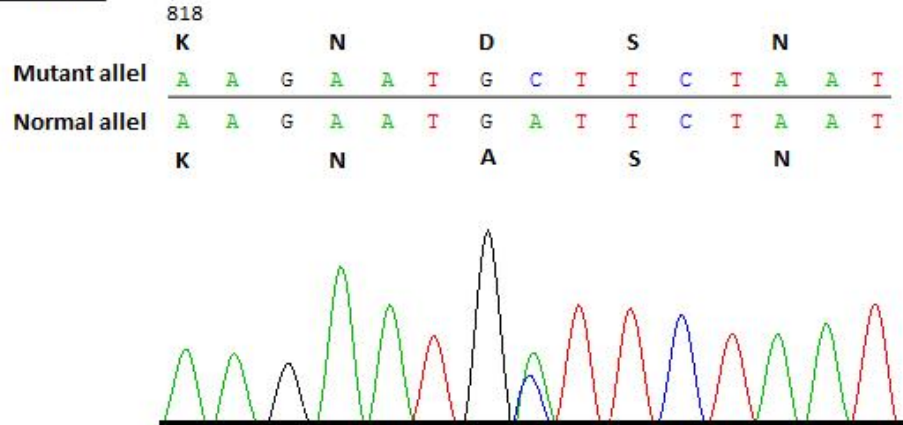
EKZON 17 - A795P (Heterozigot)

Tümör örneği

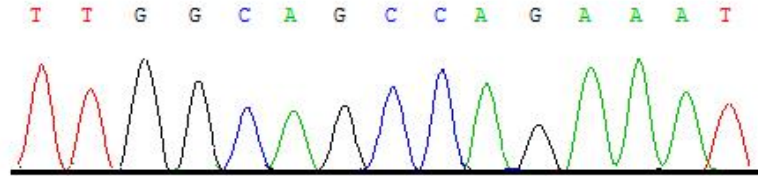


EKZON 17 - D820A (Heterozigot)

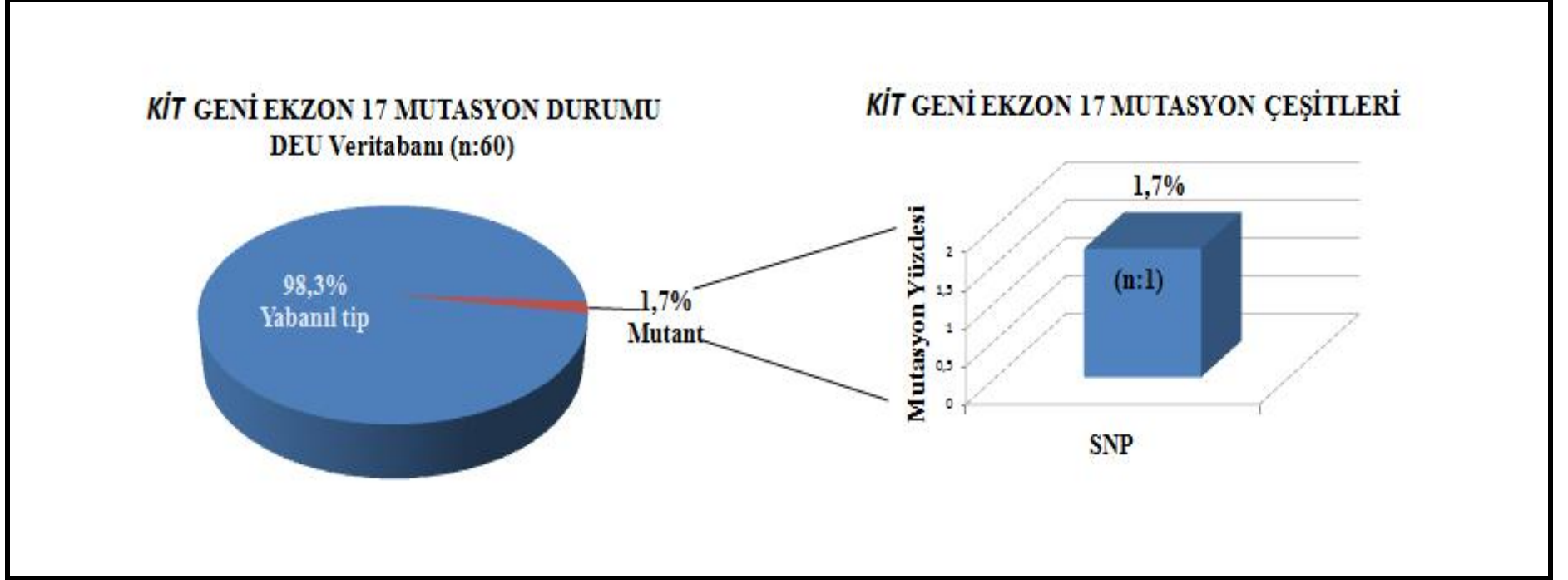
Tümör örneği



Kan örneği



Şekil 72. *KIT* geni ekzon 17 bölgesinde saptanan A795P (Het.) ve D820A (Het.) mutasyonlarının kromatogram görüntüleri.



Şekil 73. Olguların *KİT* geni ekzon 17 mutasyon durumuna göre dağılımları ve saptanan mutasyon tiplerinin dağılımları

4.4 GENOTİP VERİLERİ İLE DİĞER VERİLERİN İLİŞKİLENDİRİLMESİ

4.4.1 Cinsiyet ile *KİT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Cinsiyete göre ekzon 9 ve 13 mutasyon varlığı açısından fark yoktur. (Ekzon 9 için: Fisher kesin testi, $p=1,000$) (Ekzon 13 için: Fisher kesin testi, $p:0,695$) (Ekzon 17 için: Kikare testi, $p:0,281$)

Cinsiyete göre ekzon 11 mutasyon varlığı açısından fark vardır (Ki-kare testi, $p:0,003$). Erkeklerde ekzon 11 mutasyon varlığı daha yüksektir.

Tablo 23. Cinsiyet ile *KİT* geni ekzon 11 mutasyonu arasındaki ilişki

		EKZON 11 MUTASYON DURUMU		Toplam
CİNSİYET		Yok	Var	
	Kadın	%71,0 (n:22)	%29,0 (n:9)	%100 (n:31)
	Erkek	%32,1 (n:9)	%67,9 (n:19)	%100 (n:28)
Toplam		%52,5 (n:31)	%47,5 (n:28)	%100 (n:59)

(Kikare testi, $p:0,003$)

Cinsiyete göre genel mutasyon durumu açısından fark vardır (Ki-kare testi, $p:0,004$). Erkeklerde mutasyon varlığı daha yüksektir.

Tablo 24. Cinsiyet ile *KİT* geni genel mutasyon durumu arasındaki ilişki

		GENEL MUTASYON DURUMU		Toplam
CİNSİYET		Yok	Var	
	Kadın	%59,4 (n:19)	%40,6 (n:13)	%100 (n:32)
	Erkek	%21,4 (n:6)	%78,6 (n:22)	%100 (n:28)
Toplam		%41,7 (n:25)	%58,3 (n:35)	%100 (n:60)

(Kikare testi, $p:0,004$)

Ekzon 9 mutasyonu olan kadın olguların %66,7'si (n:2) süstitüsyon, %33,3'ü (n:1) insersiyon içermektedir. Ekzon 9 mutasyonu olan erkek olguların %50'si (n:1) süstitüsyon, %50'si (n:1) insersiyon içermektedir.

Ekzon 11 mutasyonu içeren kadın olguların %33,3'ü (n:3) sübstitüsyon, %66,7'si (n:6) delesyon içermektedir. Ekzon 11 mutasyonu olan erkek olguların %47,4'ü (n:9) sübstitüsyon, %42,1'i (n:8) delesyon, %5,3'ü (n:1) insersiyon, %5,3'ü (n:1) kompleks mutasyonlar içermektedir.

Ekzon 13 mutasyonu içeren kadın (n:3) ve erkek (n:4) olguların hepsi sübstitüsyon içermektedir.

4.4.2 Primer Tümör Yerleşimi ile *KIT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Olguların primer tümör yerleşim yerlerine göre dağılımları şekil 42'de verilmiştir.

Tüm olgular primer tümör yerleşimi ve genel mutasyon durumu (ekzon 9, 11, 13, 17) açısından tarandığında, mide yerleşimli tümörlerin %51,9'u (n:14) araştırılan dört ekzon bakımından yabanıl tip, %48,1'i (n:13) ise mutant tiptir. İnce bağırsak yerleşimli olan tümörlerin %18,3'ü (n:3) yabanıl tip, %81,3'ü (n:13) mutant tiptir. Kalın bağırsak yerleşimli olanların %50'si (n:1) yabanıl tip, %50'si (n:1) mutant tiptir. Özofagus yerleşimli olanların hepsi (n:3) yabanıl tiptir. Omentum periton yerleşimli tümörlerin %33,3'ü (n:1) yabanıl tip, %66,7'si (n:2) mutant tiptir.

Olgular primer tümör yerleşimi ve *KIT* geni ekzon 9 mutasyonları açısından incelendiğinde; mide yerleşimli tümörlerin %96,3'ünde (n:26) ekzon 9 mutasyonu saptanmamış, %3,7'sinde (n:1) ekzon mutasyonu (sübstitüsyon) saptanmıştır.

İnce bağırsak yerleşimli olan tümörlerin %81,3'ünde (n:13) ekzon 9 mutasyonu saptanmamış, %18,8'sinde (n:3) ekzon 9 mutasyonu saptanmıştır. Bunların %3,3'ü (n:1) sübstitüsyon, %66,7'si (n:2) insersiyondur.

Kalın bağırsak yerleşimli tümörlerde (n:2) ekzon 9 mutasyonuna rastlanmamıştır.

Özofagus yerleşimli tümörlerde (n:3) ekzon 9 mutasyonuna rastlanmamıştır.

Omentum periton kökenli tümörlerin %66,7'sinde (n:2) ekzon 9 mutasyonuna rastlanmamış ancak %33,3'ünde (n:1) mutasyon (sübstitüsyon) saptanmıştır.

Mide yerleşimli tümörlerin %59,3'ünde (n:16) ekzon 11 mutasyonu saptanmamış, %40,7'sinde (n:11) ekzon 11 mutasyonu saptanmıştır. Mutasyonların %27,3'ü sübstitüsyon (n:3), %54,5'i (n:6) delesyon, %9,1'i insersiyon (n:1) ve %9,1'i (n:1) kompleks mutasyonlardır.

İnce bağırsak yerleşimli olan tümörlerin %37,5'inde (n:6) ekzon 11 mutasyonu saptanmamış, %62,5'inde (n:10) ekzon 11 mutasyonu saptanmıştır. Saptanan mutasyonların %40'ı (n:4) süstitüsyon, %60'ı (n:6) delesyondur.

Kalın bağırsak yerleşimli tümörlerin %50'sinde (n:1) ekzon 11 mutasyonuna rastlanmamış, %50'sinde (n:1) ekzon 11 mutasyonu (süstitüsyon) saptanmıştır.

Özofagus yerleşimli tümörlerde (n:3) ekzon 11 mutasyonuna rastlanmamıştır.

Omentum periton kökenli tümörlerin %33,3'ünde (n:1) ekzon 11 mutasyonu saptanmamış, ancak %66,7'sinde (n:2) ekzon 11 delesyonlarına rastlanmıştır .

Mide yerleşimli tümörlerin %85,2'sinde (n:23) ekzon 13 mutasyonu saptanmamış, %14,8'sinde (n:4) ekzon 11 mutasyonu saptanmıştır.

İnce bağırsak yerleşimli olan tümörlerin %93,7'inde (n:15) ekzon 11 mutasyonu saptanmamış, %6,3'ünde (n:1) ekzon 13 mutasyonu saptanmıştır.

Kalın bağırsak yerleşimli tümörlerde (n:2), özofagus yerleşimli tümörlerde (n:3) ve omentum-periton yerleşimli tümörlerde (n:3) ekzon 13 mutasyonu saptanmamıştır.

Saptanan tüm ekzon 13 mutasyonları süstitüsyondur.

Mide ve ince bağırsak yerleşimli olgular kendi aralarında *KIT* geni genel mutasyon varlığı açısından kıyaslandığında ince bağırsak yerleşimli olan olgularda genel mutasyon varlığı anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (Fisher kesin testi, p:0,050).

Tablo 25. Primer tümör yerleşimi ile *KIT* geni genel mutasyon durumu arasındaki ilişki

		GENEL MUTASYON DURUMU		Toplam
PRİMER TÜMÖR YERLEŞİMİ		Yok	Var	
	Mide	%51,9 (n:14)	%48,1 (n:13)	%100 (n:27)
	İnce	%18,8 (n:3)	%81,3 (n:12)	%100 (n:15)
Toplam		%39,5 (n:17)	%60,5 (n:26)	%100 (n:43)

(Fisher kesin testi, p:0,050)

Mide ve ince bağırsak yerleşimli olgular kendi aralarında *KIT* ekzon 9, 11 ve 13 mutasyonlarının varlığı açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

4.4.3 Rezeksiyon Durumu ile *KIT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Olgular rezeksiyon biçimlerine göre R0, R1, R2 ve M olarak sınıflanan olgulardan R0 olanların %31,3'ü (n:5) yabancı tip, %68,8'i (n:11) mutant tiptir. R1 olanların %50'si (n:1) yabancı tip, %50'si (n:1) mutant tiptir. R2 olanlarda (n:3) mutasyon saptanmamıştır. M olanların %25'i (n:2) yabancı tip, %75'i (n:6) mutant tiptir.

Rezeksiyon grupları ile ekzon 9 mutasyonu test edildiğinde; R0 olanlarda %93,7'si (n:15) yabancı tip, %6,3'ü (n:1) insersiyon saptanan mutant tiptir. Mutant R0 grubundaki olguların %10'u (n:1) süstitüsyon, %80'i (n:8) delesyon ve %10'u (n:1) kompleks mutasyonlar içermektedir. R1 olanlar (n:2) ve R3 olanların (n:3) hepsi yabancı tiptir. M olanların %87,5'i (n:7) yabancı tip, %12,5'i (n:1) süstitüsyon saptanan mutant tiptir.

Rezeksiyon grupları ile ekzon 11 mutasyonu test edildiğinde; R0 olanlarda %37,5'i (n:6) yabancı tip, %62,5'i (n:10) mutant tiptir. Mutant R0 grubundaki olguların %10'u (n:1) süstitüsyon, %80'i (n:8) delesyon ve %10'u (n:1) kompleks mutasyonlar içermektedir. R1 olanlar (n:2) ve R3 olanların (n:3) hepsi yabancı tiptir. M olanların %37,5'i (n:3) yabancı tip, %62,5'i (n:5) mutant tiptir. Mutant olan M grubundaki olguların %60'ı (n:3) süstitüsyon, %40'ı (n:2) delesyon içermektedir.

Rezeksiyon grupları ile ekzon 13 mutasyonu test edildiğinde; R0 olanlarda %87,5'i (n:14) yabancı tip, %12,5'i (n:2) mutant tiptir. R1 olanların %50'si (n:1) yabancı tip, %50'si (n:1) mutant tiptir. (n:2) ve R3 olanların (n:3) hepsi yabancı tiptir. M olanların %87,5'i (n:7) yabancı tip, %12,5'i (n:5) mutant tiptir. Olgularda saptanan ekzon 13 mutasyonlarının hepsi süstitüsyondur.

4.4.4 Uzak Organ Metastazı ile *KIT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Uzak organ metastazına göre genel mutasyon durumu, ekzon 9, 11 ve 13 mutasyon varlığı açısından fark gözlenmemiştir (Genel mutasyon durumu için: Ki-kare testi, p:0,809), (Ekzon 9 için: Fisher kesin testi, p: 1,000), (Ekzon 11 için: Fisher kesin testi, p: 0,576), (Ekzon 13 için: Fisher kesin testi, p: 0,600).

Metastatik olmayan olguların %93,8'i (n:15) ekzon 9 mutasyonu açısından yabancı tip, %6,3'ü insersiyon içeren mutant tiptir. Metastatik olan olguların %93,3'ü (n:14) ekzon 9 mutasyonu açısından yabancı tip, %6,7'si (n:1) süstitüsyon içeren mutant tiptir.

Metastatik olmayan olguların %50'si (n:8) ekzon 11 mutasyonu açısından yabancı tip, %50'si insersiyon içeren mutant tiptir. Ekzon 11 mutasyonu olan ancak metastaz gelişmeyen olguların %12,5'i (n:1) sübstitüsyon, %75'i (n:6) delesyon, %12,5'i (n:1) kompleks mutasyonlar içermektedir. Metastatik olan olguların ise %40'ı (n:6) ekzon 11 mutasyonu açısından yabancı tip, %60'ı (n:9) mutant tiptir. Bu mutasyonların %55,6'sı (n:5) sübstitüsyon, %44,4'ü (n:4) delesyondur.

Metastatik olmayan olguların %81,3'ü (n:13) ekzon 13 mutasyonu açısından yabancı tip, %18,8'i (n:3) sübstitüsyon içeren mutant tiptir. Metastatik olan olguların %93,3'ü (n:14) ekzon 13 mutasyonu açısından yabancı tip, %6,7'si (n:1) sübstitüsyon içeren mutant tiptir.

4.4.5 Metastaz Yerleşimi ile *KIT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Metastatik olan olgular metastaz yerleşimine göre sınıflandırılıp genel mutasyon durumu açısından tarandığında karaciğer metastazlı olguların %20'si (n:2) yabancı tip, %80'i (n:8) mutant tiptir. Akciğer metastazlı olguların %50'si (n:1) yabancı tip, %50'si (n:1) mutant tiptir.

Karaciğer metastazlı olgular ekzon 9 mutasyonu açısından tarandığında, %90'ı (n:9) yabancı tip, %10'u (n:1) sübstitüsyon içeren mutant tiptir. Akciğer metastazlı olgular (n:2) ve diğer yerleşimli metastatik olguların (n:3) hepsi ekzon 9 açısından yabancı tiptir.

Karaciğer metastazlı olgular ekzon 11 mutasyonu açısından tarandığında, %30'u (n:3) yabancı tip, %70'i (n:7) mutant tiptir. Mutant olgulardaki mutasyonların %57,1'i (n:4) sübstitüsyon, %42,9'u (n:3) delesyondur. Akciğer metastazlı olguları %50'si (n:1) yabancı tip, %50'si (n:1) sübstitüsyon içeren mutant tiptir. Diğer yerleşimli metastatik olguların %66,7'si (n:2) yabancı tip, %33,3'ü (n:1) delesyon içeren mutant tiptir.

Karaciğer metastazlı olgular ekzon 13 mutasyonu açısından tarandığında, %90'ı (n:9) yabancı tip, %10'u (n:1) sübstitüsyon içeren mutant tiptir. Akciğer metastazlı olgular (n:2) ve diğer yerleşimli metastatik olguların (n:3) hepsi ekzon 11 açısından yabancı tiptir.

4.4.6 Hücre Tipi ile *KIT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Hücre tipine göre ayrıldıktan sonra genel mutasyon tipi açısından taranan olgulardan, işçi hücre tipine sahip olanların %42,6'sı (n:20) yabancı tip, %57,4'ü (n:27) mutant tip olduğu saptanmıştır. Epiteloid hücre tipine sahip hücrelerin %20'si (n:1) yabancı

tip, %80'i (n:4) mutant tiptir. Mikst hücre tipine sahip hücrelerin %50'si (n:4) yabancı tip, %50'si (n:4) mutant tiptir.

İğsi hücre tipine sahip olguların %89,4'ü (n:42) ekzon 9 açısından yabancı tip, %10,6'sı (n:5) mutant tiptir. Mutant olguların %60'ı (n:3) süstitüsyon, %40'ı (n:2) insersiyon içermektedir. Epiteloid hücre tipine (n:5) ve mikst hücre tipine sahip olgularda (n:8) ekzon 9 mutasyonu saptanmamıştır.

İğsi hücre tipine sahip olguların %57,4'ü (n:27) ekzon 11 açısından yabancı tip, %42,6'sı (n:20) mutant tiptir. Mutant iğsi hücreli olguların %45'i (n:9) süstitüsyon, %45'i (n:9) delesyon, %10'u (n:1) insersiyon, %10'u (n:1) kompleks tip mutasyon içermektedir. Epiteloid hücre tipine sahip olguların %80'inde (n:4) mutasyon saptanmıştır. Bu olguların %50'si (n:2) süstitüsyon, %50'sinde delesyon içermektedir. Epiteloid hücreli tümörlerde görülen mutasyonların hepsi *KİT* geni ekzon 11 bölgesinde saptanmıştır ve hücre tipi açısından ekzon 11 mutasyonu epiteloid hücreli tümörlerde anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Fisher kesin testi, p:0,045) Mikst hücre tipine sahip olguların %50'si (n:4) ekzon 11 mutasyonu açısından yabancı tip, %50'si (n:4) mutanttır. Mutasyonların %25'i (n:1) süstitüsyon, %75'i (n:3) delesyon içermektedir .

İğsi hücre tipine sahip olguların %85,1'i (n:40) ekzon 13 açısından yabancı tip, %14,9'u (n:7) mutant tiptir. Mutant olguların hepsi süstitüsyon içermektedir. Epiteloid hücre tipine (n:5) ve mikst hücre tipine sahip olgularda (n:8) ekzon 13 mutasyonu saptanmamıştır.

4.4.7 KİT (CD117) Ekspresyonu ile *KİT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

İmmünohistokimyasal olarak KİT ekspresyonu negatif olan hiç olgu yoktur. Fokal pozitif sadece bir olgu vardır ve yabancı tiptir. KİT pozitif olguların %40,7'si (n:24) genel mutasyon durumu açısından yabancı tip, %59,3'ü (n:35) mutanttır. KİT ekspresyonu ile genel mutasyon açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:0,417)

KİT pozitif olguların %91,5'i (n:54) ekzon 9 açısından yabancı tip, %8,5'i (n:5) mutant tiptir. Mutant olguların %60'ı (n:3) süstitüsyon, %40'ı (n:2) insersiyon içermektedir. KİT ekspresyonu ile ekzon 9 mutasyonu açısından fark yoktur. (Fisher kesin testi, p:1,000)

KİT pozitif olguların %51,7'si (n:30) ekzon 11 açısından yabancı tip, %48,3'ü (n:28) mutant tiptir. Mutasyonların %42,9'u (n:12) süstitüsyon, %50'si (n:14) delesyon, %3,6'sı (n:1) insersiyon ve %3,6'sı (n:1) kompleks mutasyon içermektedir. KİT ekspresyonu ile ekzon 11 mutasyonu açısından fark yoktur. (Fisher kesin testi, p:1,000)

KİT pozitif olguların %88,1'i (n:52) ekzon 13 açısından yabanıl tip, %11,9'u (n:7) mutant tiptir. Mutasyonların hepsi süstitüsyondur. KİT ekspresyonu ile ekzon 13 mutasyonu açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:1,000).

4.4.8 CD34 Ekspresyonu ile *KİT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

CD34 ekspresyonu negatif olan olguların %64,7'si (n:11) genel mutasyon açısından yabanıl tip, %35,3'ü (n:6) mutant tiptir. CD34 ekspresyonu açısından fokal pozitif olgu yoktur. CD34 pozitif olguların %32,6'sı (n:14) yabanıl tip, %67,4'ü (n:29) mutant tiptir. CD34 ekspresyonu ile genel mutasyon varlığı açısından fark vardır (Kikare testi, p:0,0023)

Tablo 26. CD34 ekspresyonu ile *KİT* geni genel mutasyon durumu arasındaki ilişki

		GENEL MUTASYON DURUMU		Toplam
		Yok	Var	
CD34 EKSPRESYONU	Negatif	%64,7 (n:11)	%35,3 (n:6)	%100 (n:17)
	Fokal pozitif	0	0	0
	Pozitif	%32,6 (n:14)	%67,4 (n:29)	%100 (n:43)
Toplam		%41,7 (n:25)	%58,3 (n:35)	%100 (n:60)

(Kikare testi, p:0,023)

CD34 negatif olguların %94,1'i ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %5,9'u (n:1) mutant tiptir (süstitüsyon). CD34 pozitif olguların %90,7'si (n:39) yabanıl tip, %9,3'ü (n:4) mutant tiptir. Bu mutasyonların %50'si (n:2) süstitüsyon, %50'si (n:2) insersiyon içermektedir. CD34 ekspresyonu ile ekzon 9 mutasyon varlığı açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:1,000)

CD34 ekspresyonu negatif olguların %62,5'i (n:10) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %37,5'i (n:6) mutant tiptir. Bu mutasyonların %50'si (n:3) süstitüsyon, %50'si (n:3) delesyon içermektedir. CD34 pozitif olguların %48,8'i (n:21) yabanıl tip, %51,2'si (n:22) mutant tiptir. Bu mutasyonların %40,9'u (n:9) süstitüsyon, %50'si (n:11) delesyon, %4,5'i (n:1) insersiyon, %4,5'i (n:1) kompleks mutasyonlar içermektedir. CD34 ekspresyonu ile ekzon 11 mutasyon varlığı açısından fark yoktur (Kikare testi, p:0,350)

CD34 negatif olgularda ekzon 13 mutasyonu saptanmamıştır. CD34 pozitif olgularda %83,7'si (n:36) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %16,3'ü (n:7) mutant tiptir. Bu mutasyonların hepsi süstitüsyondur.

4.4.9 SMA Ekspresyonu ile *KIT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

SMA negatif olguların %35,5'i (n:11) genel mutasyon açısından yabanıl tip, %64,5'i (n:20) mutant tiptir. SMA fokal pozitif olguların %75'i (n:3) genel mutasyon varlığı açısından yabanıl tip, %25'i (n:1) mutant tiptir. SMA pozitif olguların %44'ü (n:11) genel mutasyon varlığı açısından yabanıl tip, %56'sı (n:14) mutant tiptir.

SMA ekspresyonu negatif olan olguların %90,3'ü (n:28) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %9,7'si (n:3) mutant tiptir. Mutasyonların %33,3'ü (n:1) süstitüsyon, %66,7'si (n:2) insersiyondur. SMA fokal pozitif olguların hepsi ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tiptir. SMA pozitif olguların %92'si (n:23) yabanıl tip, %8'i (n:2) mutant tiptir. Bu mutasyonların hepsi süstitüsyondur.

SMA ekspresyonu negatif olguların %48,4'ü (n:15) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %51,6'sı (n:16) mutant tiptir. Saptanan bu mutasyonların %50'si (n:8) süstitüsyon, %37,5'i (n:6) delesyon, %6,3'ü (n:1) insersiyon, %6,3'ü (n:1) kompleks mutasyon içermektedir. SMA fokal pozitif olguların %75'i (n:3) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %25'i (n:1) mutant tiptir (delesyon). SMA pozitif olguların %54,2'si (n:13) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %45,8'i (n:11) mutant tiptir. Bu mutasyonların %36,4'ü (n:4) süstitüsyon, %63,6'sı (n:7) delesyon içermektedir.

SMA ekspresyonu negatif olguların %87,1'i (n:27) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %12,9'u (n:4) mutant tiptir. Bu mutasyonların hepsi süstitüsyondur. SMA fokal pozitif olan olgularda (n:4) mutasyon saptanmamıştır. SMA pozitif olguların %88,3'ü (n:53) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %12'si (n:3) mutant tiptir. Bu mutasyonların hepsi süstitüsyondur.

4.4.10 Desmin Ekspresyonu ile *KIT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Desmin negatif olguların %38,5'i (n:20) genel mutasyon varlığı açısından yabanıl tiptir, %61,5'i (n:32) mutant tiptir. Desmin fokal pozitif bir olgu vardır ve mutanttır. Desmin pozitif olguların %71,4'ü (n:5) yabanıl tip, %28,6'sı (n:2) mutant tiptir.

Desmin negatif olguların %90,4'ü (n:47) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %9,6'sı (n:5) mutanttır. Mutasyonların %60'ı (n:3) süstitüsyon, %40'ı (n:2) insersiyondur. Desmin fokal pozitif bir olgu vardır ve ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tiptir. Desmin pozitif olguların (n:7) hepsi ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tiptir.

Desmin negatif olguların %49'u (n:25) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %51'i (n:26) mutant tiptir. Mutasyonların %38,5'i (n:10) süstitüsyon, %53,8'i (n:14) delesyon, %3,8'i (n:1) insersiyon ve %3,8'i (n:1) kompleks mutasyondur. Desmin fokal pozitif bir olgu ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tiptir. Desmin pozitif olguların %71,4'ü (n:5) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %28,6'sı (n:2) mutant tiptir. Mutasyonların hepsi süstitüsyondur.

Desmin negatif olguların %88,5'i (n:46) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %11,5'i (n:6) mutant tiptir. Bulunan mutasyonların hepsi süstitüsyondur. Desmin fokal pozitif bir olgu ekzon 13 mutasyonu açısından mutant tiptir ve mutasyon çeşidi süstitüsyondur. Desmin pozitif olguların hepsi (n:7) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tiptir.

4.4.11 S100 Ekspresyonu ile *KIT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

S100 negatif olguların %45'i (n:18) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %55'i (n:22) mutant tiptir. S100 fokal pozitif olguların hepsi (n:3) mutant tiptir. S100 pozitif olguların %41,2'si (n:7) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %58,8'i mutant tiptir.

S100 negatif olguların %95'i (n:38) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %5'i (n:2) mutant tiptir. Mutasyonların %50'si (n:1) süstitüsyon, %50'si (n:1) insersiyondur. S100 fokal pozitif olguların %66,7'si (n:2) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %33,3'ü (n:1) mutant tiptir ve insersiyondur. S100 pozitif olguların %88,2'si (n:15) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %11,8'i (n:2) mutant tiptir ve ikisi de insersiyondur.

S100 negatif olguların %56,4'ü (n:22) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %43,6'sı (n:17) mutant tiptir. Bu mutasyonların %52,9'u (n:9) süstitüsyon, %41,2'si (n:7) delesyon, %5,9'u (n:1) insersiyon içermektedir. S100 fokal pozitif olguların %33,3'ü (n:1) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %66,7'si (n:2) mutant tiptir. Bu mutasyonların %50'si (n:1) süstitüsyon, %50'si (n:1) delesyondur. S100 pozitif olguların %47,1'i (n:8) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %52,9'u (n:9) mutant tiptir. Mutasyonların

%22,2'si (n:2) süstitüsyon, %66,7'si (n:6) delesyon, %11,1'i (n:1) kompleks mutasyonlar içermektedir.

S100 negatif olguların %85'i (n:34) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %15'i (n:6) mutant tiptir. Bu mutasyonların hepsi süstitüsyondur. S100 fokal pozitif olguların (n:3) hepsi ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tiptir. S100 pozitif olguların %94,1'i (n:16) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %5,9'u (n:1) mutant tip ve süstitüsyondur.

4.4.12 Ki-67 Ekspresyonu ile *KİT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Ki-67 ekspresyonu <10'un altında olan olguların %47,5'i (n:19) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %52,5'i (n:21) mutant tiptir. Ki-67 ekspresyonu >10'un üzerinde olan olguların %30'u (n:6) genel mutasyon durumu açısından (n:6) yabanıl tip, %70'i (n:14) mutant tiptir. Ki-67 ekspresyonu na göre genel mutasyon durumu açısından fark yoktur (Kikare testi, p:0.195).

Ki-67 ekspresyonu <10'un altında olan olguların %92,5'i (n:37) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %7,5'i (n:3) mutant tiptir. Bu mutasyonların %33,3'ü (n:1) süstitüsyon, %66,7'si (n:2) insersiyon içermektedir. Ki-67 ekspresyonu %10'un üzerinde olan olguların %90'ı (n:18) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %10'u (n:2) mutant tiptir. Bu mutasyonların hepsi (n:2) süstitüsyon içermektedir. Ki-67 ekspresyonu ile ekzon 9 mutasyonu açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:1,000).

Ki-67 ekspresyonu %10'un altında olan olguların %60'ı (n:24) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %40'ı (n:16) mutant tiptir. Bu mutasyonları %56,3'ü (n:9) süstitüsyon, %43,8'i (n:7) delesyon içermektedir. Ki-67 ekspresyonu %10'un üzerinde olan olguların %36,8'i (n:7) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %63,2'si (n:12) mutant tiptir. Bu mutasyonların %25'i (n:3) süstitüsyon, %58,3'ü (n:7) delesyon, %8,3'ü (n:1) insersiyon ve %8,3'ü (n:1) kompleks mutasyonlar içermektedir. Ki-67 ekspresyonu ile ekzon 11 mutasyonu açısından fark yoktur (Kikare testi, p:0,096).

Ki-67 ekspresyonu %10'un altında olan olguların %92,5'i (n:37) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %7,5'i (n:3) mutant tiptir. Ki-67 ekspresyonu %10'un üzerinde olan olguların %80'i (n:16) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %20'si (n:4) mutant tiptir. Saptanan tüm ekzon 13 mutasyonları süstitüsyon içermektedir. Ki-67 ekspresyonu ile ekzon 13 mutasyonu açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:0,208).

4.4.13 Risk Grubu ile *KIT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Çok düşük risk grubundaki olguların %60'ı (n:6) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %40'ı (n:4) mutant tiptir. Düşük risk grubundaki olguların %57,1'i (n:8) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %42,9'u (n:6) mutant tiptir. İntermediyer risk grubundaki olguların %35,3'ü (n:6) yabanıl tip, %64,7'si (n:11) mutant tiptir. Yüksek risk grubundaki olguların %26,3'ü (n:5) yabanıl tip, %73,7'si (n:14) mutant tiptir.

KIT geninde herhangi bir mutasyonu olanlar, mutasyonu olmayanlara göre 3,18 kat daha fazla malign potansiyel riski taşımaktadır (OR:3,18)

Çok düşük risk grubundaki olguların hepsi (n:10) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tiptir. Düşük risk grubundaki olguların %92,9'u (n:13) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %7,1'i (n:1) mutant tiptir ve süstitüsyondur. İntermediyer risk grubundaki olguların %82,4'ü (n:14) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %17,6'sı (n:3) mutant tiptir. Mutasyonların %33,3'ü (n:1) süstitüsyon, %66,7'si (n:2) insersiyon içermektedir. Yüksek risk grubundaki olguların %94,7'si (n:18) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %5,3'ü (n:1) mutant tiptir ve süstitüsyondur.

Çok düşük risk grubundaki olguların %55,6'sı (n:5) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %44'ü (n:4) mutant tiptir. Mutasyonların %75'i (n:3) süstitüsyon, %25'i (n:1) delesyon içermektedir. Düşük risk grubundaki olguların %64,3'ü (n:9) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %35,7'si (n:5) mutant tiptir. Mutasyonların %80'i (n:4) süstitüsyon, %20'si (n:1) delesyon içermektedir. İntermediyer risk grubundaki olguların %47,1'i (n:8) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %52,9'u (n:9) mutant tiptir. Bulunan mutasyonların %22,2'si (n:2) süstitüsyon, %55,6'sı (n:5) delesyon, %11,1'i (n:1) insersiyon, %11,1'i (n:1) kompleks mutasyonlar içermektedir. Yüksek risk grubundaki olguların %47,4'ü (n:9) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %52,6'sı (n:10) mutant tiptir. Mutasyonların %30'u (n:3) süstitüsyon, %70'i (n:7) delesyon içermektedir.

Çok düşük risk grubundaki olguların %90'ı (n:9) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %10'u (n:1) mutant tiptir ve süstitüsyondur. Düşük risk grubundaki olguların hepsi (n:14) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tiptir. İntermediyer risk grubundaki olguların hepsi (n:17) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tiptir. Yüksek risk grubundaki olguların %68,4'ü (n:13) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %31,6'sı (n:6) mutant tiptir ve mutasyonların hepsi süstitüsyondur.

KIT geni ekzon 11 bölgesinde yer alan W557-K558 numaralı kodonlardaki mutasyon varlığı ile olguların risk sınıfları karşılaştırıldığında W557- K558. kodonlarda mutasyon içeren olgularda risk daha yüksek bulunmuştur (Fisher kesin testi, p:0,039).

Tablo 27. Risk sınıflaması ile *KIT* geni ekzon 11 bölgesindeki W557-K558 numaralı kodonlardaki mutasyon durumu arasındaki ilişki

		<i>KIT</i> GENİ EKZON 11 W557-K558 KODONU MUTASYONU		Toplam
RİSK		Yok	Var	
SINIFLAMASI (Fletcher ve ark.)	Çok düşük/ Düşük risk	%88,9 (n:8)	%11,1 (n:1)	%100 (n:9)
	İntermediyer/ Yüksek risk	%42,1 (n:8)	%57,9 (n:11)	%100 (n:19)
Toplam		%57,1 (n:16)	%42,9 (n:12)	%100 (n:18)

(Fisher kesin testi, p:0,039)

KIT geni ekzon 11 bölgesinde yer alan W557-K558 kodonunda mutasyon olan olgular, bu bölgede mutasyon taşımayan olgulara göre 11 kat daha fazla malign potansiyel riski taşımaktadır (OR:11).

4.4.14 Onkolojik Evre ile *KIT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Erken evrede yakalanan olguların %41,7'sinde (n:7) genel mutasyon açısından yabanıl tip, %58,8'i (n:10) mutant tiptir. Lokal ileri evre olguların %50'si (n:2) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %50'si (n:2) mutant tiptir. İleri evre olguların %28,6'sı (n:2) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %71'4'ü (n:5) mutant tiptir.

Erken evre olguların (n:17) ve lokal ileri evre olguların (n:4) hepsi ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tiptir. İleri evre olguların %71,4'ü (n:5) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %28,6'sı (n:2) mutant tiptir. Bu mutasyonların %50'si (n:1) süstitüsyon, %50'si (n:1) insersiyon içermektedir.

Erken evre olguların %41,2'si (n:7) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %58,8'i (n:10) mutant tiptir. Mutasyonların %10'u (n:1) süstitüsyon, %80'i (n:8) delesyon, %10'u (n:1) kompleks mutasyonlar içermektedir. Lokal ileri evre olguların %75'i (n:3) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %25'i (n:1) mutant tiptir ve süstitüsyon içermektedir. İleri

evre olguların %42,9'u (n:3) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %57,1'i (n:4) mutant tiptir. Mutasyonların %50'si (n:2) süstitüsyon, %50'si (n:2) delesyon içermektedir.

Erken evre olguların %88,2'si (n:15) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %11,8'i (n:2) mutant tiptir ve hepsi süstitüsyon içermektedir. Lokal ileri evre olguların %75'i (n:3) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %25'i (n:1) mutant tiptir ve süstitüsyon içermektedir. İleri evre olguların hepsi (n:7) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tiptir.

4.4.15 Progresyon Durumu ile *KIT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Progresyon gözlenmeyen olguların %33,3'ü (n:4) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %66,7'si (n:8) mutant tiptir. Progresyon gelişen olguların ise %50'si (n:3) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %50'si (n:3) mutant tiptir.

Progresyon gözlenmeyen olguların %91,7'si (n:11) ekzon 9 mutasyon tipi açısından yabanıl tip, %8,3'ü (n:1) mutant tiptir ve insersiyon içermektedir. Progresyon gelişen olguların %83,3'ü (n:5) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %16,7'si (n:1) mutant tiptir ve süstitüsyon içermektedir. Progresyon durumuna göre ekzon 9 mutasyonu varlığı açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:1,000)

Progresyon gözlenmeyen olguların %50'si (n:6) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %50'si (n:6) mutant tiptir. Mutasyonların %33,3'ü (n:2) süstitüsyon, %66,7'si (n:4) delesyon içermektedir. Progresyon gelişen olguların %50'si (n:3) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %50'si (n:3) mutant tiptir. Mutasyonların %33,3'ü (n:1) süstitüsyon, %66,7'si (n:2) delesyon içermektedir. Progresyon durumuna göre ekzon 11 mutasyonu varlığı açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:1,000)

Progresyon gözlenmeyen olguların %75'i (n:9) ekzon 13 mutasyon tipi açısından yabanıl tip, %25'i (n:3) mutant tiptir ve insersiyon içermektedir. Progresyon gelişen olguların hepsi (n:6) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tiptir. Progresyon durumuna göre ekzon 13 mutasyonu varlığı açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:0,515)

4.4.16 Son İzlem Durumu ile *KIT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Yaşayan olguların %38'i (n:19) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %62'si (n:31) mutant tiptir. Ölen olguların %60'ı (n:6) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %40'ı (n:4) mutant tiptir. Olguların son izlem durumlarına göre genel mutasyon durumları açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:0,294).

Yaşayan olguların %90'ı (n:45) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %10'u (n:5) mutant tiptir. Saptanan mutasyonların %60'ı (n:3) süstitüsyon, %40'ı (n:2) insersiyon içermektedir. Ölen olguların hepsi (n:10) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tiptir. Olguların son izlem durumlarına göre ekzon 9 mutasyon varlığı açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:0,578).

Yaşayan olguların %52'si (n:26) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %48'i (n:24) mutant tiptir. Saptanan mutasyonların %33,3'ü (n:8) süstitüsyon, %58,3'ü (n:14) delesyon, %4,2'si (n:1) insersiyon, %4,2'si (n:1) kompleks mutasyonlar içermektedir. Ölen olguların %55,6'sı (n:31) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %44,4'ü (n:4) mutant tiptir ve hepsi süstitüsyon içermektedir. Olguların son izlem durumlarına göre ekzon 11 mutasyon varlığı açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:1,000).

Yaşayan olguların %88'i (n:44) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %12'si (n:6) mutant tiptir ve hepsi süstitüsyon içermektedir. Ölen olguların %90'ı (n:9) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %10'u (n:1) mutant tiptir ve hepsi süstitüsyon içermektedir. Olguların son izlem durumlarına göre ekzon 13 mutasyon varlığı açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:1,000). Olguların son izlem durumlarına göre saptanan ekzon 13 mutasyon tipleri açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:1,000).

4.4.17 Tümör Çapı ile *KİT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Olgular tümör çaplarına göre 2cm'den küçük olanlar, 2-5cm arasında olanlar, 5-10cm arasında olanlar, 10cm'den büyük olanlar şeklinde gruplanmıştır. Tümör çapı 2cm'den az olan olguların %60'ı (n:6) genel mutasyon açısından yabanıl tip, %40'ı (n:4) mutant tiptir. Tümör çapı 2-5 cm arasında olanların %36'sı (n:9) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %64'ü (n:16) mutant tiptir. Tümör çapı 5-10 cm arasında olan olguların %53,3'ü (n:8) yabanıl tip, %80'i (n:8) mutant tiptir. Tümör çapı 10 cm'den büyük olan olguların %20'si (n:20) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %80'i (n:8) mutant tiptir.

Tümör çapı 2cm'den küçük olan olguların hepsi (n:10) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tiptir. Tümör çapı 2-5 cm arasında olan olguların %88'i (n:22) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %12'si (n:3) mutant tiptir. Mutasyonların %66,7'si (n:2) süstitüsyon, %33,3'ü (n:1) insersiyon içermektedir. Tümör çapı 5-10 cm arasında olan olguların %86,7'si (n:13) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %13,3'ü (n:2) mutant tiptir. Saptanan

mutasyonların %50'si (n:1) süstitüsyon, %50'si (n:1) insersiyondur. Tümör boyutu 10cm'den büyük olan olguların (n:10) hepsi ekzon 9 mutasyonu açısından yabancı tiptir.

Tümör çapı 2cm'den küçük olan olguların %60'ı (n:6) ekzon 11 mutasyonu açısından yabancı tip, %40'ı (n:4) mutant tiptir. Mutasyonların %75'i (n:3) süstitüsyon, %25'i (n:1) delesyon içermektedir. Tümör boyutu 2-5 cm arasında olan olguların %52,4'ü (n:13) ekzon 11 mutasyonu açısından yabancı tip, %45,8'i (n:11) mutant tiptir Mutasyonların %45,5'i (n:5) süstitüsyon, %54,5'i (n:6) delesyon içermektedir. Tümör çapı 5-10 cm arasında olan olguların %60'ı (n:9) ekzon 11 mutasyonu açısından yabancı tip, %40'ı (n:6) mutant tiptir. Mutasyonların %16,7'si (n:1) süstitüsyon, %50'si (n:3) delesyon, %16,7'si (n:1) insersiyon, %16,7'si (n:1) kompleks mutasyonlar içermektedir. Tümör çapı 10cm'den büyük olan tümörlerin %30'u (n:3) ekzon 11 mutasyonu açısından yabancı tip, %70'i (n:7) mutant tiptir. Mutasyonların %42,9'u (n:3) süstitüsyon, %57,1'i (n:4) delesyon içermektedir.

Tümör çapı 2cm'den küçük olan olguların hepsi (n:10) ekzon 13 mutasyonu açısından yabancı tiptir. Tümör çapı 2-5cm arasında olan tümörlerin %80'i (n:20) ekzon 13 mutasyonu açısından yabancı tip, %20'si (n:5) mutanttır ve hepsi süstitüsyon içermektedir. Tümör çapı 5-10cm arasında olan tümörlerin hepsi (n:15) ekzon 13 mutasyonu açısından yabancı tiptir. Tümör çapı 10cm'den büyük tümörlerin %80'i (n:8) ekzon 13 mutasyonu açısından yabancı tip, %20'si (n:2) mutant tiptir ve hepsi süstitüsyon içermektedir.

4.4.18 Mitoz Sayısı ile *KIT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Mitoz sayısı ≤ 5 olan olguların %52,4'ü (n:22) genel mutasyon durumu açısından yabancı tip, %47,6'sı (n:20) mutant tiptir. Mitoz sayısı > 5 olan olguların %16,7'si (n:3) genel mutasyon durumu açısından yabancı tip, %83,3'ü (n:15) mutant tiptir. Mitoz sayısı ile genel mutasyon varlığı açısından fark vardır (Kikare testi, p:0.010).

Tablo 28. Mitoz sayısı ile *KIT* geni genel mutasyon durumu arasındaki ilişki

		GENEL MUTASYON DURUMU		Toplam
MİTOZ SAYISI		Yok	Var	
	≤ 5	%52,4 (n:22)	% 47.6 (n:20)	%100 (n:42)
	> 5	%16,7 (n:3)	%83,3 (n:15)	%100 (n:18)
Toplam		%41,7 (n:25)	%58,3 (n:35)	%100 (n:60)

(Kikare testi, p:0,010)

Mitoz sayısı ≤ 5 olan olguların %92,9'u (n:39) ekzon 9 mutasyonu açısından yabancı tip, %7,1'i (n:3) mutanttır. Saptanan mutasyonların %33,3'ü (n:1) süstitüsyon, %66,7'si (n:2) insersiyondur. Mitoz sayısı < 5 olan olguların %88,9'u (n:16) ekzon 9 mutasyonu açısından yabancı tip, %11,1'i (n:2) mutant tiptir. Saptanan mutasyonların hepsi (n:2) süstitüsyondur. Mitoz sayısı ile ekzon 9 mutasyon varlığı açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:0,631).

Mitoz sayısı ≤ 5 olan olguların %61'i (n:25) ekzon 11 mutasyonu açısından yabancı tip, %39'u (n:16) mutant tiptir. Saptanan mutasyonların %56,3'ü (n:9) süstitüsyon, %31,3'ü (n:5) delesyon, %6,3'ü (n:1) insersiyon, %6,3'ü (n:1) kompleks mutasyon içermektedir. Mitoz sayısı > 5 olan olguların %33,3'ü (n:6) ekzon 11 mutasyonu açısından yabancı tip, %66,7'si (n:12) mutant tiptir. Mutasyonların %25'i (n:3) süstitüsyon, %75'i (n:9) delesyondur. Mitoz sayısı ile ekzon 11 mutasyonu açısından fark vardır (Kikare testi, p:0,050).

Tablo 29. Mitoz sayısı ile *KİT* geni ekzon 11 mutasyon durumu arasındaki ilişki

		EKZON 11 MUTASYON DURUMU		Toplam
MİTOZ SAYISI		Yok	Var	
	≤ 5	%61 (n:25)	%,39 (n:16)	%100 (n:41)
	> 5	%,33,3 (n:6)	%,66,7 (n:12)	%100 (n:18)
Toplam		%,52,5 (n:31)	%,47,5 (n:28)	%100 (n:60)

(Kikare testi, p:0,050)

Mitoz sayısı ≤ 5 olan olguların %95,2'si (n:40) ekzon 13 mutasyonu açısından yabancı tip, %4,8'i (n:2) mutant tiptir. Saptanan mutasyonların hepsi (n:2) süstitüsyondur. Mitoz sayısı > 5 olan olguların %72,2'si (n:13) ekzon 13 mutasyonu açısından yabancı tip, %27,8'i (n:5) mutant tiptir. Saptanan mutasyonların hepsi süstitüsyon içermektedir. Mitoz sayısına göre ekzon 13 mutasyonu açısından fark vardır (Fisher kesin testi, p:0,021).

Tablo 30. Mitoz sayısı ile *KİT* geni ekzon 13 mutasyon durumu arasındaki ilişki

		EKZON 13 MUTASYON DURUMU		Toplam
MİTOZ SAYISI		Yok	Var	
	≤ 5	%,95,2 (n:40)	%,4,8 (n:2)	%100 (n:42)
	> 5	%,72,2 (n:13)	%,27,8 (n:5)	%100 (n:18)
Toplam		%,88,3 (n:53)	%,11,7 (n:7)	%100 (n:60)

(Fisher kesin testi, p:0,021)

4.4.19 Yaş ile *KIT* Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyon İlişkisi

Olgular ≤ 60 yaş ve >60 yaş olacak şekilde gruplandırıldı. ≤ 60 yaş olan olguların %46,7'si (n:14) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %53,3'ü (n:16) mutant tiptir. >60 yaş olan olguların %36,7'si (n:11) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %63,3'ü (n:19) mutant tiptir. Yaşa göre genel mutasyon durumu açısından fark yoktur (Kikare, p:0,432).

≤ 60 yaş olan olguların %86,7'si (n:26) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %13,3'ü (n:4) mutant tiptir Mutasyonların %50'si (n:2) süstitüsyon, %50'si (n:2) insersiyon içermektedir. >60 yaş olan olguların %96,7'si (n:29) ekzon 9 mutasyonu açısından yabanıl tip, %3,3'ü (n:1) mutant tiptir ve süstitüsyondur. Yaşa göre ekzon 9 mutasyon varlığı açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:0,353).

≤ 60 yaş olan olguların %60'ı (n:18) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %40'ı (n:12) mutant tiptir. Mutasyonların %25'i (n:3) süstitüsyon, %66,7'si (n:8) delesyon, %8,3'ü (n:1) insersiyon içermektedir. >60 yaş olan olguların %44,8'i (n:13) ekzon 11 mutasyonu açısından yabanıl tip, %55,2'si (n:16) mutant tiptir. Mutasyonların %56,3'ü (n:9) süstitüsyon, %37,5'i (n:6) delesyon içermektedir. Yaşa göre ekzon 11 mutasyon varlığı açısından fark yoktur (Kikare testi, p:0,243).

≤ 60 yaş olan olguların %86,7'si (n:26) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %13,3'ü (n:4) mutant tiptir. Saptanan mutasyonların hepsi (n:4) süstitüsyondur. >60 yaş olan olguların %90'ı (n:27) ekzon 13 mutasyonu açısından yabanıl tip, %10'u (n:3) mutant tiptir. Saptanan mutasyonların hepsi (n:3) süstitüsyon içermektedir. Yaşa göre ekzon 13 mutasyon varlığı açısından fark yoktur (Fisher kesin testi, p:1,000).

4.5 SAĞALTIM VERİLERİ

4.5.1 Tam Rezeksiyon Olan Olgularda Adjuvan Sağaltım

Klinik sonuçları belirlenebilen olgu grubunun (n:28), %64,3 (n:18)'ünün imatinib sağaltımını aldığı belirlendi. Tedavi almayan olguların (n:10) tedavi almama sebebi, düşük risk grubunda ya da erken evre olmasıdır. Bu nedenle izleme alınmıştır. Birinci sıra imatinib sağaltımını alanların %27,8'i (n:5) tam rezeksiyon uygulanmasını takiben yüksek riskli hastalık olması nedeniyle adjuvan imatinib tedavisi aldı. Adjuvan imatinib tedavisi alan hastalarda tahmin edilen ortalama sağ kalım ($\pm$ SH) $17,0 \pm 0,9$, %95 CI (confidence interval, güven

aralığı) 15,4 – 18,7. Bu hastalarda adjuvan imatinib tedavisi ile ilgili grade 3-4 toksisite gözlenmedi.

4.5.2 Metastatik Olgularda Sağaltım

4.5.2.1 Birinci Sıra İmatinib Sağaltımı

İmatinib tedavisi alan olguların (n:18), % 72,2'si (n:13) metastatik olup birinci sıra imatinib sağaltımı (400mg / gün) almıştır.

Etkinlik değerlendirmesinde metastatik olan ve birinci sıra tedavi olarak imatinib alan 13 olgunun %7,6 (n:1)'sinde kısmi yanıt, %46,2 (n:6)'sinde stabil hastalık, %46,2 (n:6)'sinde progresif hastalık gözlemlendi. Hiçbir olguda tam yanıt gözlenmedi.

Metastatik olup birinci sıra imatinib tedavisi alan hastalarda tahmin edilen ortalama sağ kalım ($\pm$ SH) $115,3 \pm 20,8$ %95 CI 74,5- 156,2. Bu hastalarda birinci sıra imatinib tedavisi ile ilgili grade 3-4 toksisite gözlenmedi.

4.5.2.2 İkinci Sıra Sağaltım

Sağaltım ajanı alan tüm olguların % 27,78 (n:5)'i ikinci sıra ajanı olarak imatinib ajanı (800 mg / gün)aldığı belirlendi. İkinci sıra sağaltımı alan olgularda, sağaltıma verilen en iyi yanıt olguların %20 (n:1)'sinde tam yanıt, %80 (n:4)'inde progresif hastalık olarak gözlemlendi. İkinci sıra sağaltım ajanı alan olgularda toksisite gözlenmedi.

İkinci sıra tedaviye yanıt veren grupta *KIT* geninde bir mutasyona saptanmamıştır. Buna karşın istatistiki olarak anlamlı olmasa da tedaviye yanıt vermeyen grubun %50'sinde *KIT* geninde mutasyon vardır.

4.5.2.3 Üçüncü Sıra Sağaltım

Sağaltım ajanı alan tüm olguların % 22,2 (n:4)'si üçüncü sıra sağaltım ajanı olarak sunitinib almıştır. Üçüncü sıra sağaltımı alan olgularda, sağaltıma verilen en iyi yanıt olguların %50 (n:2)'sinde stabil hastalık, %50 (n:2)'sinde progresif hastalık olarak gözlemlendi. Üçüncü sıra sağaltım ajanı alan olgularda toksisite gözlenmedi.

Üçüncü sıra tedaviye yanıt veren gruptaki bütün olgularda *KIT* geninde bir mutasyon saptanmamıştır. Buna karşın istatistiki olarak anlamlı olmasa da tedaviye yanıt vermeyen grubun hepsinde *KIT* geninde bir mutasyon saptanmamıştır.

4.5.2.4 Dördüncü Sıra Sağaltım

Sağaltım ajanı alan tüm olguların % 11,1 (n:2)'i dördüncü sıra sağaltım ajanı olarak nilotinib almıştır. Dördüncü sıra sağaltımı alan olguların hepsinde, sağaltıma verilen en iyi yanıt olarak progresif hastalık gözlemlendi. Dördüncü sıra sağaltım ajanı alan olgularda toksisite gözlemlenmedi.

Dördüncü sıra tedavide yanıt alınan yoktur. Tedavi yanıt alınamayan grupta *KIT* geninde mutasyon saptanmamıştır.

Tüm olguların %83,3 (50)'ü yaşadığı, %16,7 (n:10)'sinin öldüğü saptandı.

4.5.3 Sağaltıma Yanıtla Mutasyon İlişkisi

Sağaltım ajanı olarak imatinib kullanan (tam rezeksiyon ve metastatik) ve sağaltıma yanıt verdiği kabul edilen grubun (tam yanıt, kısmi yanıt, stabil hastalık) %66,7'si *KIT* geninde bir mutasyona sahipti. Buna karşın tedaviye yanıt vermediği kabul edilen grubun (progresif hastalık) %50'sinde mutasyon vardır.

Tablo 31. İmatinib kullanan olguların genel mutasyon durumuna göre dağılımı

	“Genotip Durumu”	
	Mutant tip	Yabanıl tip
İmatinib Sağaltımı Alan Olgular (n:18)		
Sağaltıma Yanıt Var (n:12)	%66,7 (n:8)	%33,3 (n:4)
Sağaltıma Yanıt Yok (n:6)	%50 (n:3)	%50 (n:3)

Fisher kesin testi, $p>0,05$

Mutasyon olan olgular olmayan olgulara göre karşılaştırıldığında, sağaltımdan 2 kat daha fazla yararlanır [Olasılıklar oranı (OR, odds ratio): 2].

İmatinib kullanan olgular sağaltıma verdikleri yanıtla göre sınıflandırılıp *KIT* geni ekzon 9, 11, 13, 17 mutasyon durumlarına göre tarandı. Ancak sağaltıma yanıt ile *KIT* geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Ekzon 9 için Fisher kesin testi $p: 1,000$; ekzon 11 için Fisher kesin testi $p: 1,000$; ekzon 13 için Fisher kesin testi $p: 0,515$; ekzon 17 için Fisher kesin testi $p: 0,333$)

Tablo 32. Sağaltıma yanıt ile *KIT* geni ekzon 9 mutasyonu ilişkisi

		EKZON 9 MUTASYON DURUMU		Toplam
SAĞALTIMA YANIT		Mutant	Yabanıl tip	
	Var	%50 (n:1)	%68,8 (n:11)	%66,7 (n:12)
	Yok	%50 (n:1)	%31,3 (n:5)	%33,3 (n:7)
Toplam		%100 (n:2)	%100 (n:16)	%100 (n:18)

Fisher kesin testi p: 1,000

Tablo 33. Sağaltıma yanıt ile *KIT* geni ekzon 11 mutasyonu ilişkisi

		EKZON 11 MUTASYON DURUMU		Toplam
SAĞALTIMA YANIT		Mutant	Yabanıl tip	
	Var	%66,7 (n:6)	%66,7 (n:6)	%66,7 (n:12)
	Yok	%33,3 (n:3)	%33,3 (n:3)	%33,3 (n:6)
Toplam		%100 (n:9)	%100 (n:9)	%100 (n:9)

Fisher kesin testi p: 1,000

Tablo 34. Sağaltıma yanıt ile *KIT* geni ekzon 13 mutasyon ilişkisi

		EKZON 13 MUTASYON DURUMU		Toplam
SAĞALTIMA YANIT		Mutant	Yabanıl tip	
	Var	%100 (n:3)	%60 (n:9)	%66,7 (n:12)
	Yok	%0 (n:0)	%40 (n:6)	%33,3 (n:6)
Toplam		%100 (n:3)	%100 (n:15)	%100 (n:15)

Fisher kesin testi p: 0, 515

Tablo 35. Sağaltıma yanıt ile *KİT* geni ekzon 17 mutasyon ilişkisi

		EKZON 17 MUTASYON DURUMU		Toplam
SAĞALTIMA YANIT		Mutant	Yabanıl tip	
	Var	%0 (n:0)	%70,6 (n:12)	%66,7 (n:12)
	Yok	%100(n:1)	%29,4 (n:5)	%33,3 (n:7)
Toplam		%100 (n:2)	%100 (n:16)	%100 (n:18)

Fisher kesin testi p: 0,333

Tablo 36. İmatinib kullanan olguların *KİT* geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 mutasyon durumuna göre dağılımı

	İmatinib Sağaltımı Alan Olgular Olgular (n:18)	
“Genotip Durumu”	Sağaltıma Yanıt Var (n:8)	Sağaltıma Yanıt Yok (n:3)
<i>KİT</i> Geni Ekzon 9 Mutant	%10 (n:1)	%20 (n:1)
<i>KİT</i> Geni Ekzon 11Mutant	%60 (n:6)	%60 (n:3)
<i>KİT</i> Geni Ekzon 13 Mutant	%30 (n:3)	0
<i>KİT</i> Geni Ekzon 17 Mutant	0	%20 (n:1)

*Birden fazla mutasyonu olan olgular bulunmaktadır.

Grubumuzda ekzon 9, 11, 13 ve 17 mutasyonu olan olguların, sağaltım yanıtlarına göre sınıflandırıldı ve dağılım yüzdeleri alındı. Bu dağılımlar tablo 37’de gösterilmiştir.

Tablo 37. *KİT* geni mutantları ve sağaltım yanıt yüzdeleri

Sağaltım Yanıtı	<i>KİT</i> Geni Mutantları				Yabanıl Tip
	Ekzon 9	Ekzon 11	Ekzon 13	Ekzon 17	
KY	0	0	0	0	%14,3 (n:1)
TY	0	0	0	0	0
SH	%50 (n:1)	%66,7 (n:6)	%100 (n:3)	0	%42,9 (n:3)
PH	%50 (n:1)	%33,3 (n:3)	0	%100 (n:1)	%42,9 (n:3)

*KY: Kısmi yanıt, TTY: Tam yanıt, SH: Stabil hastalık, PH: Progresif hastalık

Klinik takibi yapılan grup içinde, *KIT* geni ekzon 9 mutasyonu olan olguların %50 (n:1)'si stabil hastalık, %50 (n:1)'si progresif hastalık sınıfındadır. Ekzon 11 mutasyonu olan olguların %66,7'si (n:6) stabil hastalık, %33,3'ü (n:3) progresif hastalık sınıfındadır. Ekzon 13 mutasyonu olan olguların hepsi (n:3) stabil hastalık sınıfındadır. Ekzon 17 mutasyonu olan tek olgu vardır o da progresif hastalık sınıfındadır. Yabanıl tip olguların %14,3'ü (n:1) kısmi yanıt, %42,9'u (n:3) stabil hastalık, %42,9'u (n:3) progresif hastalık sınıfındadır.

Tablo 38. İmatinib sağaltımı alan olguların sağaltım yanıtları ve mutasyon durumları

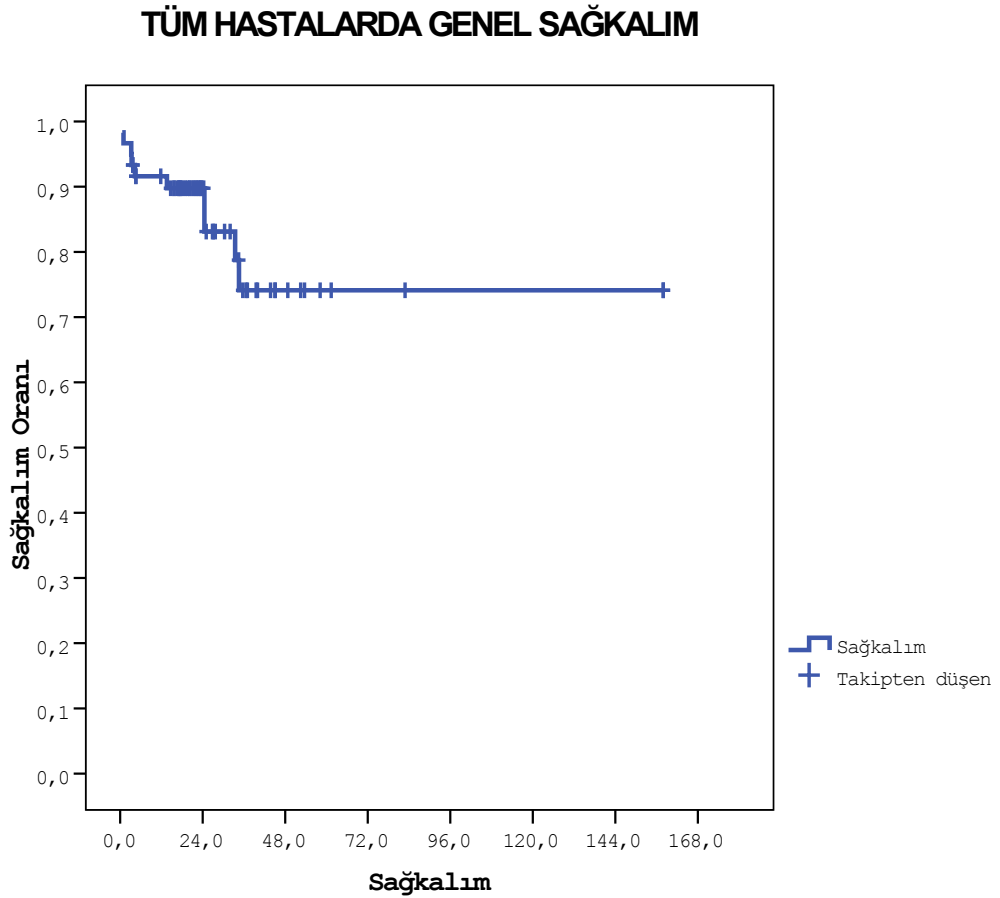
ÖRNEK KODU	EKZON 9	EKZON 11	EKZON 13	EKZON 17	SAĞALTIM YANITI
TONKLAB-2	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Stabil hastalık
TONKLAB-3	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Stabil hastalık
TONKLAB-4	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Kısmi yanıt
TONKLAB-11	Yabanıl tip	p.M552I, c.1656G>A (Cosmic Database mut id.25058), p.K558P c.1672A>C ve 1673A>C, p.F584S, c.1751T>C (Cosmic Database mut id.1297)	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Stabil hastalık
TONKLAB-12	Yabanıl tip	pW557_558del, c.1669-1674del6 (Het.)	p.K642E, c.1924A>G (Het.) (Cosmic Database mut.id.1304) ve p.N649D, c.1945A>G, (Het.)	Yabanıl tip	Stabil hastalık
TONKLAB-13	Yabanıl tip	pW557_558del, c.1669-1674del6 (Het.)	p.K642E, c.1924A>G (Het.) (Cosmic Database mut.id.1304) ve p.N649D, c.1945A>G, (Het.)	Yabanıl tip	Stabil hastalık
TONKLAB-14	p.Q460H, c.1380G>C (CAG>CAC) (Het.)	p.Q556_L576del, c.1666_1728del63 (Het.) (Cosmic Database mut.id.1205)	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Progresif hastalık
TONKLAB-15	Yabanıl tip	p.Q556_L576del, c.1666_1728del63, (Het.) (Cosmic database mut.id.1205)	Yabanıl tip	p.A795P ve p.D820A	Progresif hastalık

TONKLAB-17	Yabanıl tip	Y553N 1657T>A (TAT>AAT) (het) (mut id.12454), N567Y 1699A>T (AAT>TAT) (Het)	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Progresif hastalık
TONKLAB-19	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Progresif hastalık
TONKLAB-21	Yabanıl tip	p.V559D (het.) c.1676T>A (Cosmic Database mut id.12435)	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Stabil hastalık
TONKLAB-22	Yabanıl tip	p.Q556_L576del, c.1666_1728del (Het.) (Cosmic Database mut id.1205)	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Stabil hastalık
TONKLAB-24	Yabanıl tip	Yabanıl tip	p.K642E, c.1924A>G (Het.) (Cosmic database mut id.1304)	Yabanıl tip	Stabil hastalık
TONKLAB-25	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Stabil hastalık
TONKLAB-27	p.Y503_F504insAY, c.1509_1510insGCCTA T (Het.) (Insertion-in frame) (Cosmic Database mutation id.1326)	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Stabil hastalık
TONKLAB-28	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Progresif hastalık
TONKLAB-29	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Progresif hastalık
TONKLAB-30	Yabanıl tip	p.L576del, c.1726_1728del CTT (Het.) (Cosmic Database mut id.18745)	Yabanıl tip	Yabanıl tip	Stabil hastalık

4.6 SAĞ KALIM ANALİZLERİ

Sağ kalım analizleri, üstte sağ kalım eğrileri, altta sağ kalım için analiz edilen faktörün varlığında ve yokluğunda ortalama sağ kalım süreleri (standart hata ve güven aralığı eşliğinde) ve en altta da sağ kalım analiz sonucu açıklamaları (log rank test sonucu) ile verilmiştir.

4.6.1 Tüm Hastalarda Genel Sağkalım



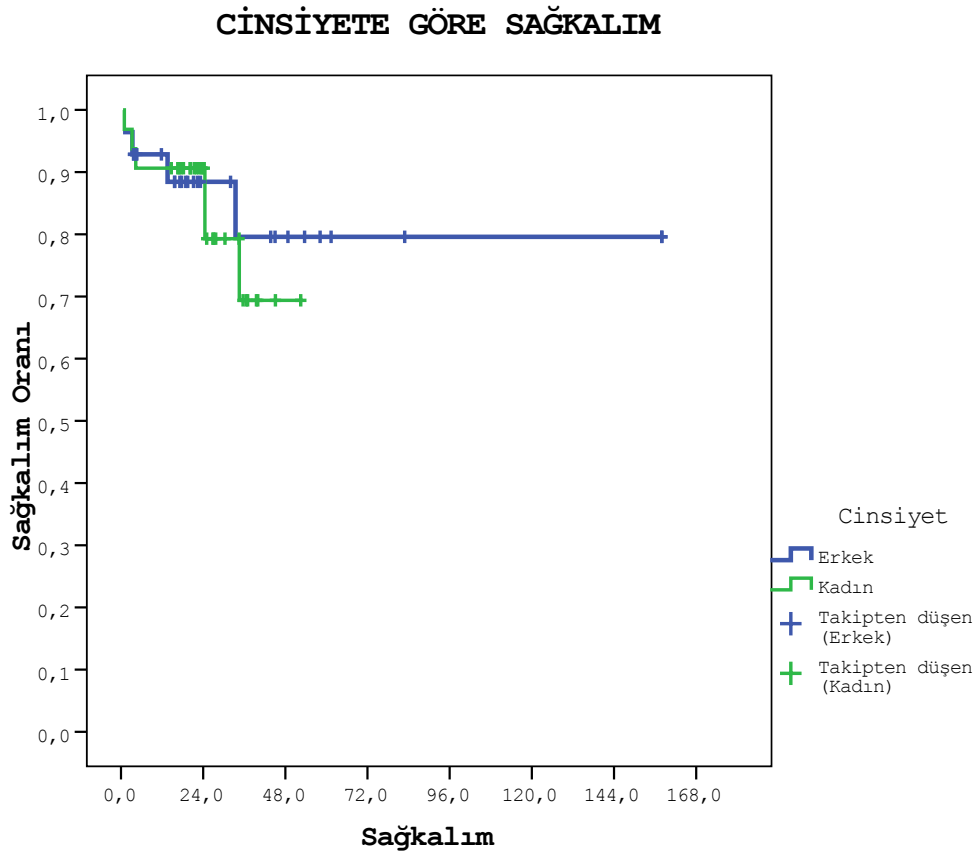
Şekil 74. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST sağaltımı alan ve takibi süren hastaların genel sağ kalım analizi

Tablo 39. Tüm olguların toplam yaşam süresi

Hastaların Toplam Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
122	10,6	101,5 - 143,0

Olguların %89,2'sinde 1 yıllık (12 ay) sağ kalım, %83'sinde 2 yıllık sağ kalım, %74,1'inde 5 yıllık sağ kalım gözlenmiştir. Hastaların %50'sine ulaşamadığı için medyan sağ kalıma ulaşamadı. Tahmin edilen ortalama sağ kalım ($\pm$ SH) 122 ay $\pm$ 10,6 , %95 CI 101,5 - 143,0'dır.

4.6.2 Cinsiyete Göre Sağkalım



Şekil 75. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların cinsiyete göre sağ kalım analizi

Tablo 40. Tüm kadın hastaların toplam yaşam süresi

Kadın Hastaların Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
42,9	3,4	36,2 – 49,6

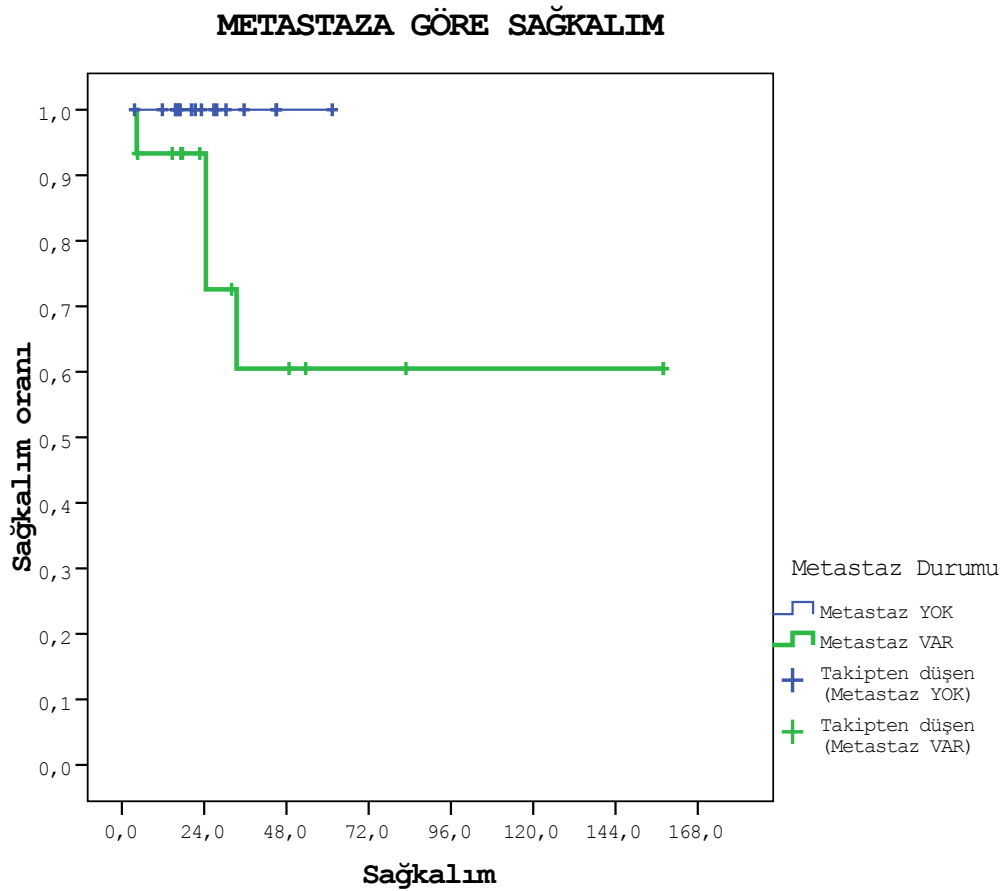
Tablo 41. Tüm erkek hastaların toplam yaşam süresi

Erkek Hastaların Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
129,4	13,6	102,7 – 156,2

Log Rank test: 0,146 , SD:1, p:0,702

Sağkalım açısından cinsiyetler arasında fark olmadığı saptanmıştır (Log Rank test: 0,146 , SD:1, p:0,702). Erkeklerde tahmin edilen ortalama sağ kalım ($\pm$ SH) 129,4 ay $\pm$ 13,6, %95 CI(confidence interval, güven aralığı) 102,7-156,2. Kadınlarda tahmin edilen ortalama sağ kalım($\pm$ SH) 42,9 ay $\pm$ 3,4, %95 CI 36,2 – 49,6'dır. Her iki grupta medyan sağ kalıma ulaşılmadı.

4.6.3 Metastaza Göre Sağkalım



Şekil 76. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST sağaltımı alan ve takibi süren hastaların metastaza göre sağ kalım analizi

Tablo 42. Metastaz durumuna göre olguların toplam yaşam süresi

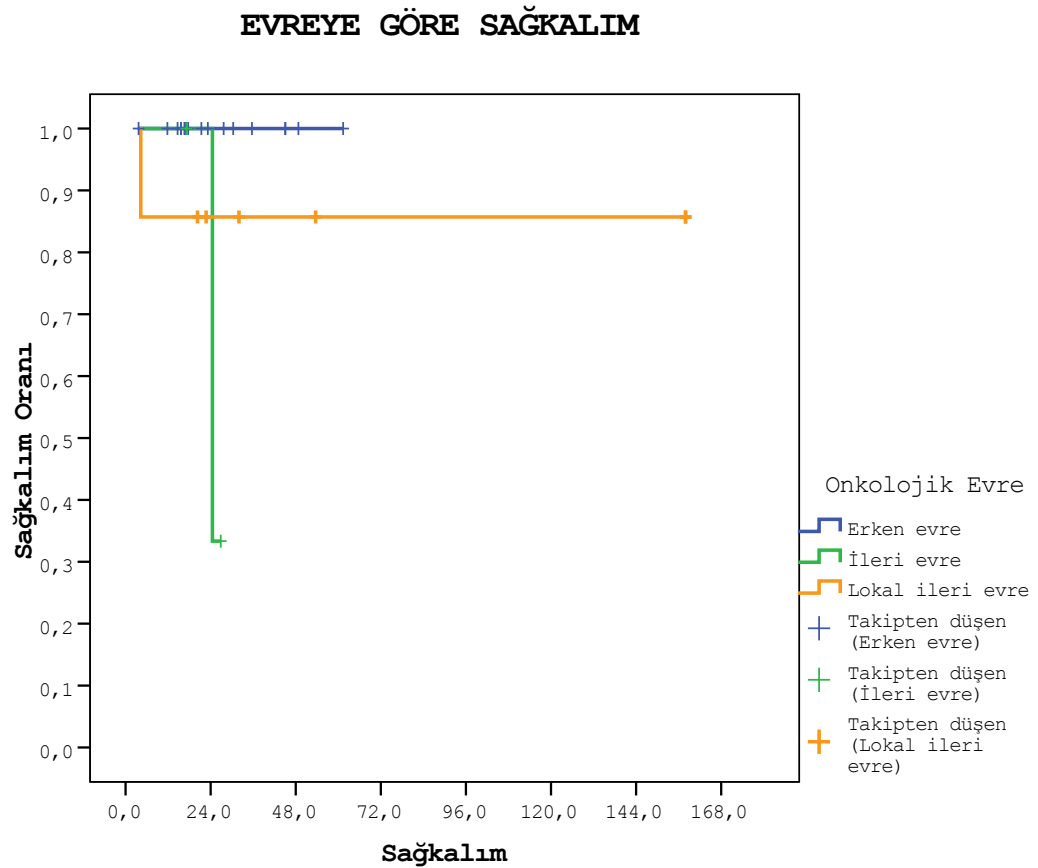
Metastaz Durumunda Durumda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
105,0	21,2	63,4 - 146,5

Log Rank Test:3,319, SD:1, p:0,068

Metastaz gözlenmeyen olgularda ölüm olmadığı için ortalama ve standart hata, güven aralığı değerlerine ulaşamamıştır.

Sağkalım açısından metastaz gelişen ve gelişmeyen olgular arasında fark gözlenmemiştir (Log Rank Test:3,319, SD:1, p:0,068).

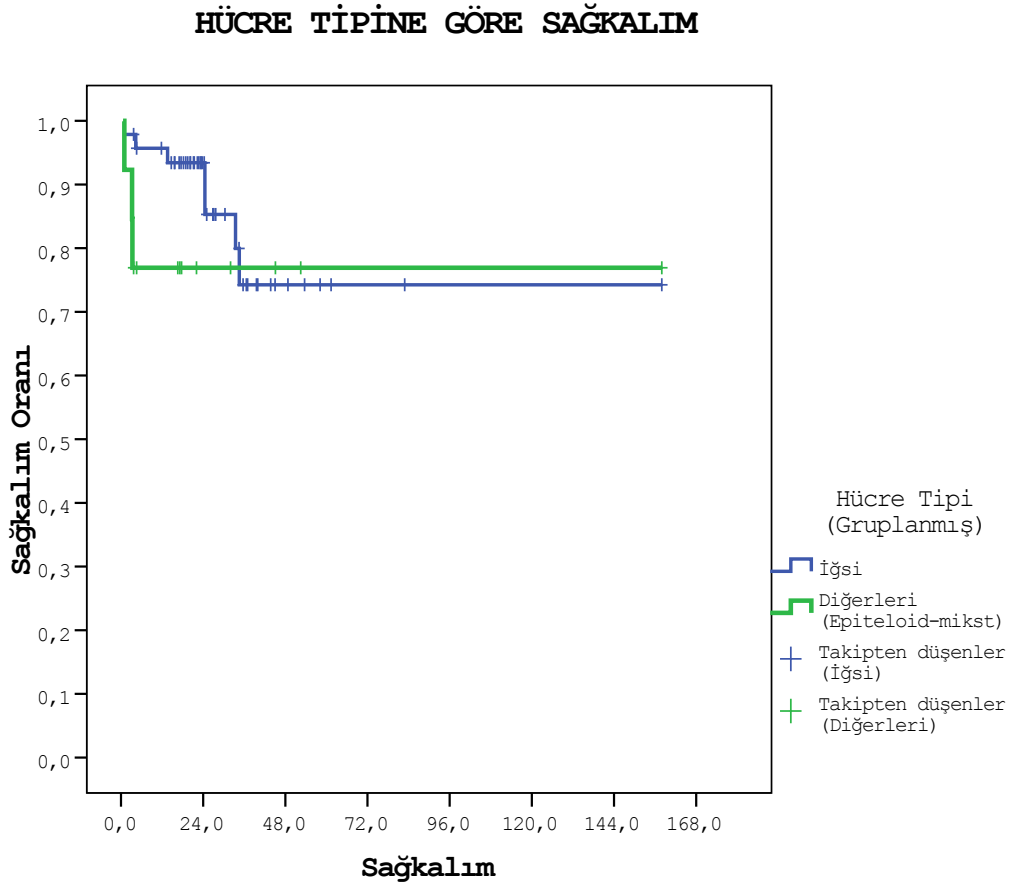
4.6.4 Evreye Göre Sağkalım



Şekil 77. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların onkolojik evresine göre sağ kalım analizi

Sağkalım açısından erken evre, lokal ileri evre ve ileri evre olgular arasında fark gözlenmemiştir (Log Rank test:5,48, SD:2, p:0,064).

4.6.5 Hücre Tipine Göre Sağkalım



Şekil 78. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların hücre tipine göre sağ kalım analizi

Tablo 43. İğsi hücreli olgularda yaşam süresi

İğsi Hücreli Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
123,45	12,02	99,89- 147,02

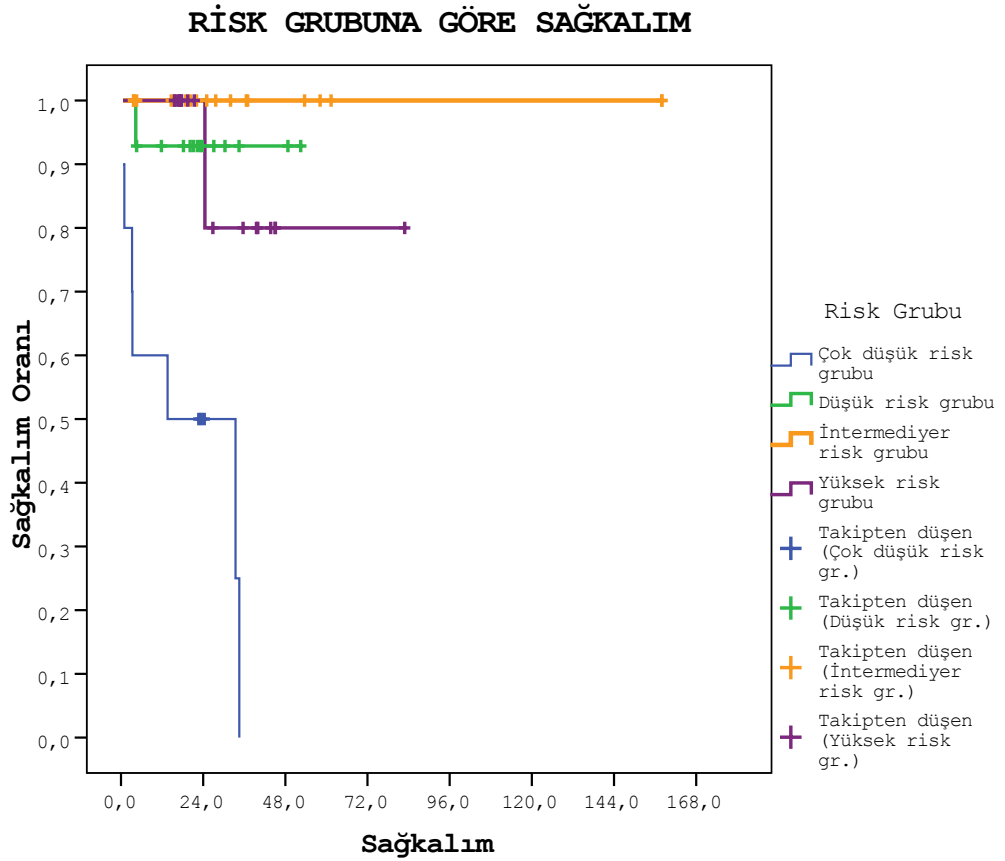
Tablo 44. Epiteloid ve mikst hücreli olgularda yaşam süresi

Epiteloid & Mikst Hücreli Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
122,08	18,17	86,48- 157,695

Log Rank test:0,999, SD:1, p:0,318

Sağkalım açısından iğsi hücreli veya diğer hücreli olgular arasında fark gözlenmemiştir (Log Rank test:0,999, SD:1, p:0,318).

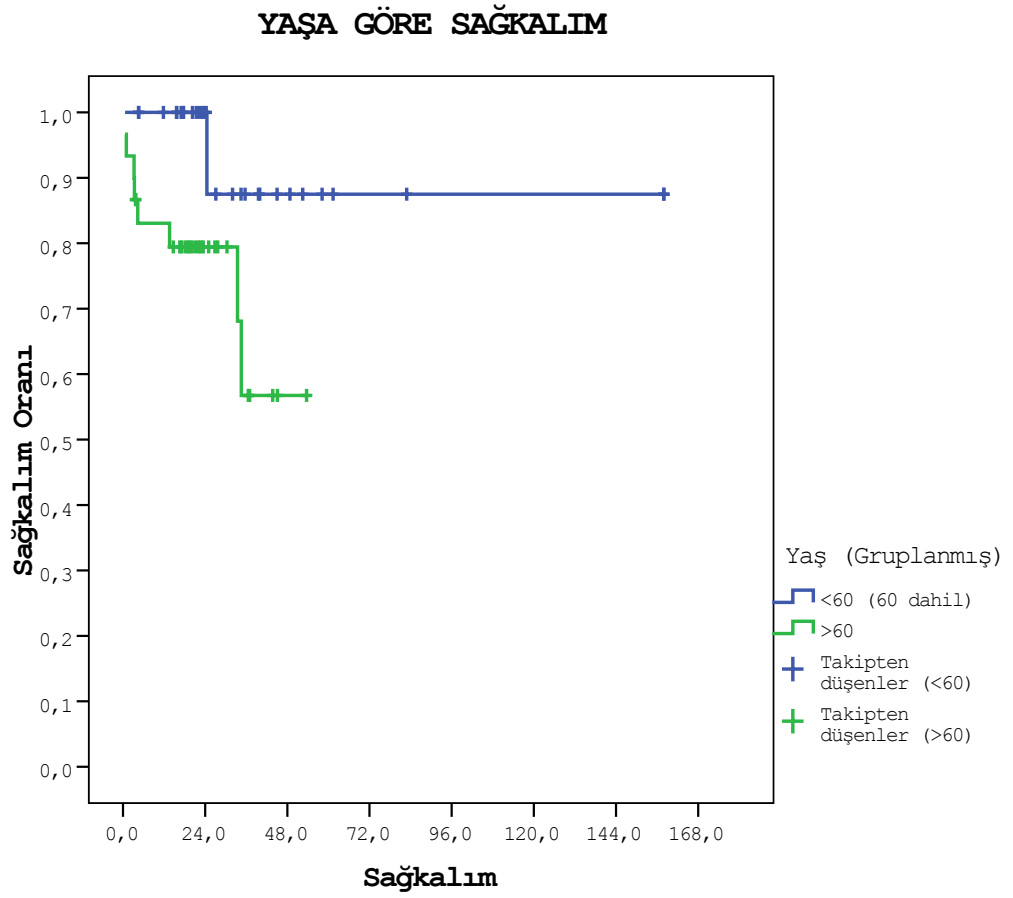
4.6.6 Risk Grubuna Göre Sağkalım



Şekil 79. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların risk grubuna göre sağ kalım analizi

Sağkalım açısından çok düşük risk, düşük risk, intermediyer risk ve yüksek risk grubundaki olgular arasında fark gözlenmiştir (Log Rank test:35,876, SD:3, p:0,000). Çok düşük risk grubunda olunması sağkalım ihtimalini azaltmaktadır.

4.6.7 Yaşa Göre Sağkalım



Şekil 80. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların yaşa göre sağ kalım analizi

Tablo 45. Yaşı ≤ 60 olan olgularda yaşam süresi

Yaşı ≤ 60 Olan Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
141,28	11,034	119,655 - 162,908

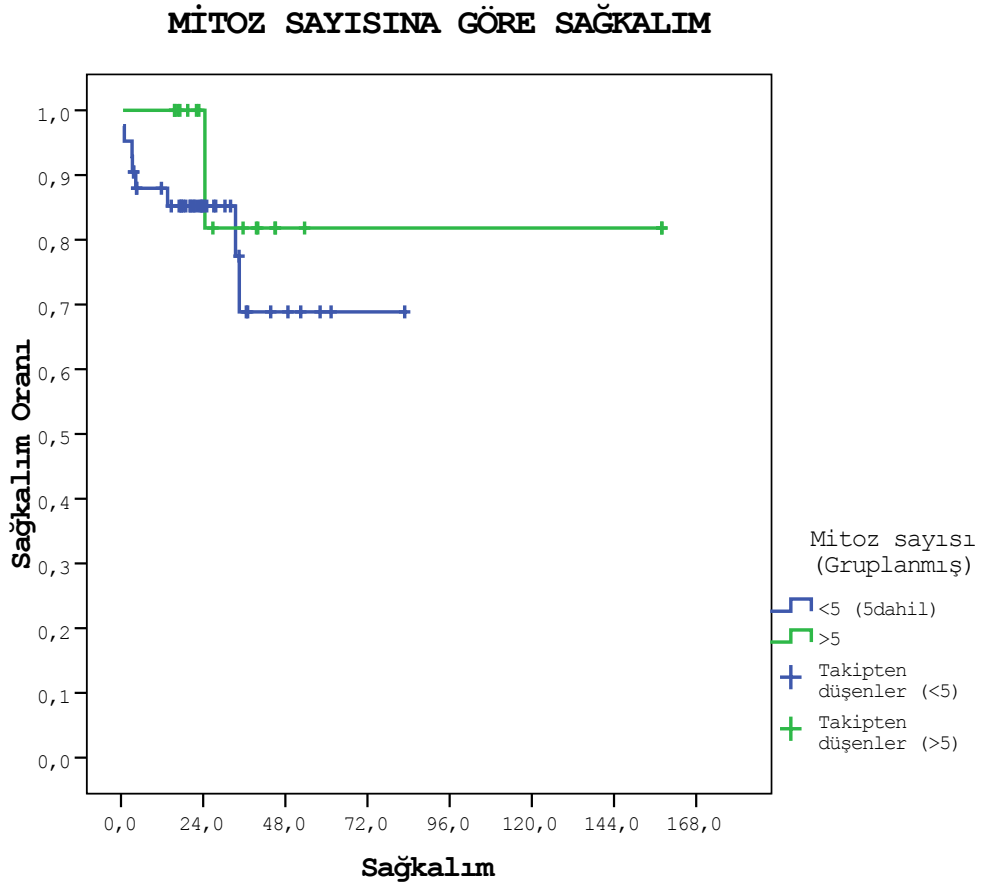
Tablo 46. Yaşı >60 olan olgularda yaşam süresi

Yaşı >60 Olan Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
39,062	4,223	30,785; 47,338

Log Rank test: 5,39, SD:1, p:0,020

Sağkalım açısından yaşı ≤ 60 ile >60 olan olgular arasında fark gözlenmiştir (Log Rank test: 5,39, SD:1, p:0,020). Bu durumda >60 yaş sağkalım ihtimalini düşüren bir faktördür.

4.6.8 Mitoz Sayısına Göre Sağkalım



Şekil 81. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların mitoz sayısına göre sağ kalım analizi

Tablo 47. Mitoz sayısı ≤ 5 olan olgularda sağkalım

Mitoz Sayısı ≤ 5 Olan Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
63,294	6,385	50,783 - 75,811

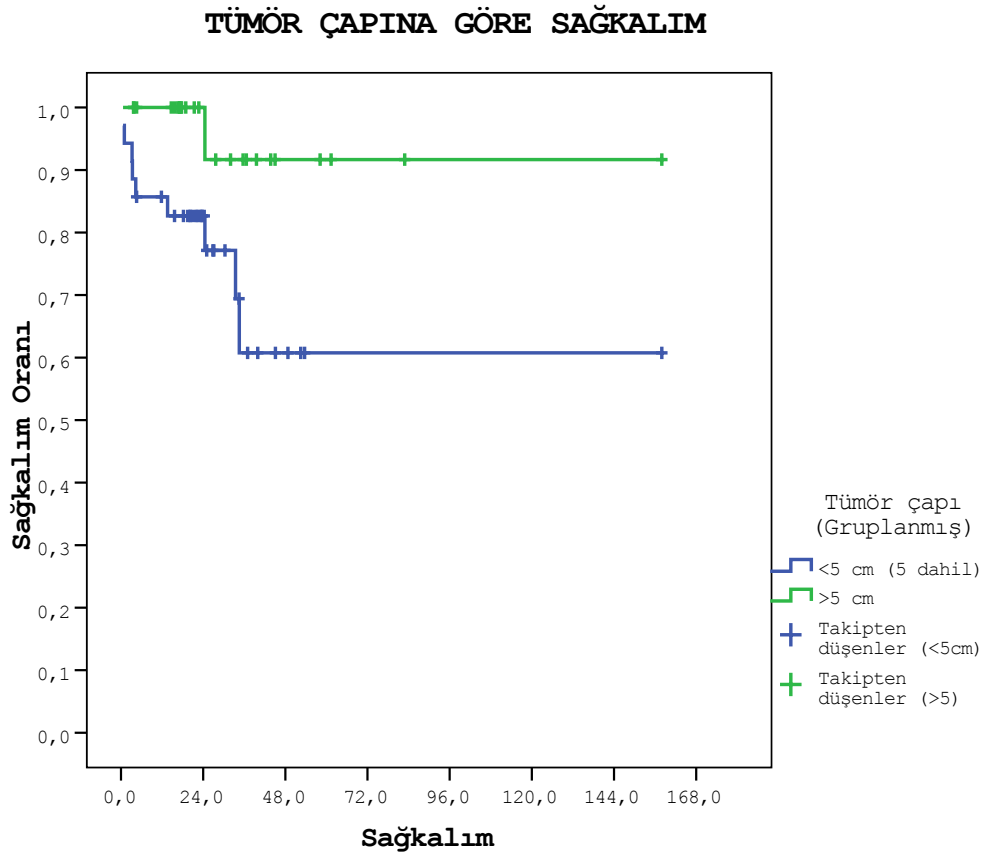
Tablo 48. Mitoz sayısı >5 olan olgularda yaşam süresi

Mitoz Sayısı >5 Olan Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
133,699	15,520	103,280 – 164,117

Log Rank test: 1,176, SD:1, p:0,278

Sağkalım açısından mitoz sayısı ≤ 5 ve >5 olan olgular arasında fark gözlenmemiştir (Log Rank test: 1.176, SD:1, p:0,278).

4.6.9 Tümör Çapına Göre Sağkalım



Şekil 82. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların tümör çapına göre sağ kalım analizi

Tablo 49. Tümör Çapı ≤ 5 cm olan olgularda sağkalım

Tümör Çapı ≤ 5 cm Olan Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
103,666	16,015	72,274 – 135,053

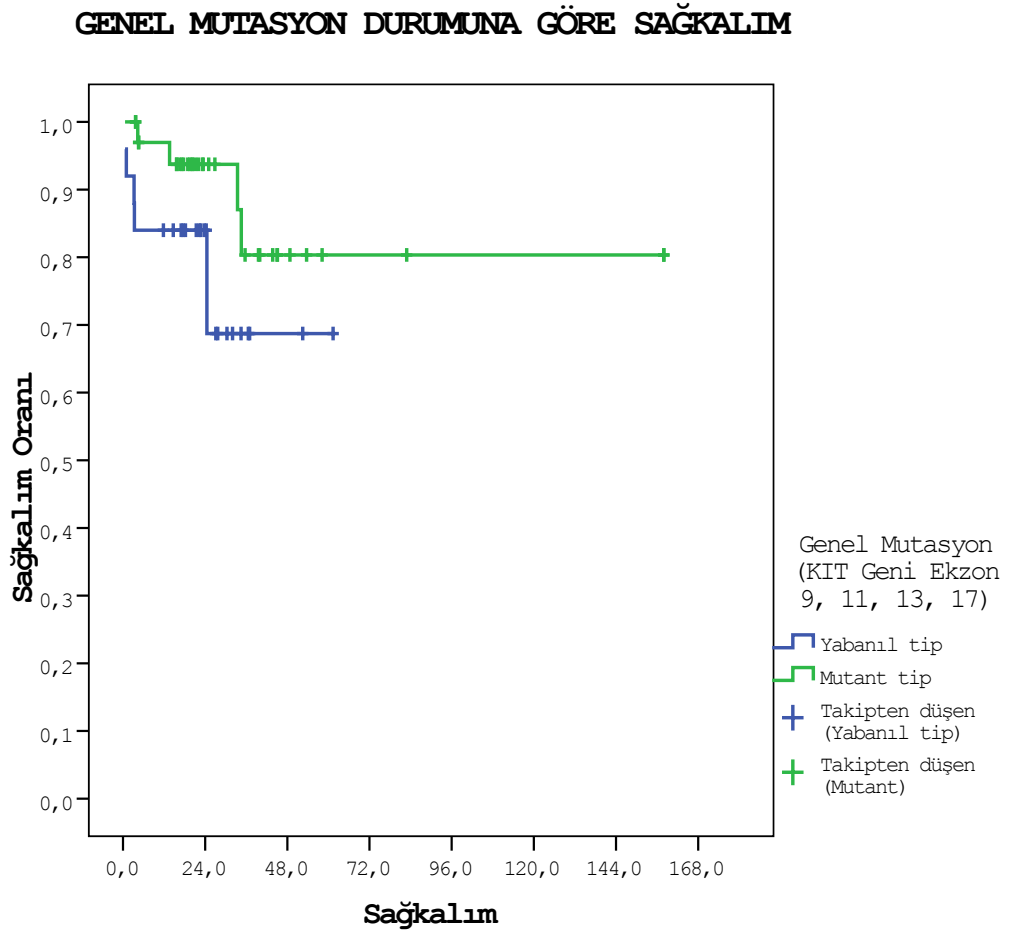
Tablo 50. Tümör Çapı > 5 cm olan olgularda yaşam süresi

Tümör Çapı > 5 cm Olan Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
146,842	10,648	125,972 – 167,711

(Log Rank test:4,923, SD:1, p:0,027)

Sağkalım açısından tümör çapı farklı olan olgular arasında fark gözlenmiştir (Log Rank test:4,923, SD:1, p:0,027). Tümör çapı < 5 cm olan olguların sağkalım ihtimali daha düşüktür.

4.6.10 Genel Mutasyon Varlığına Göre Sağkalım



Şekil 83. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların genel mutasyon durumuna göre sağ kalım analizi

Tablo 51. Yabanıl tip olgularda yaşam süresi

Yabanıl Tip Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
46,247	5,28	35,899 - 56,595

Tablo 52. Mutant tip olgularda yaşam süresi

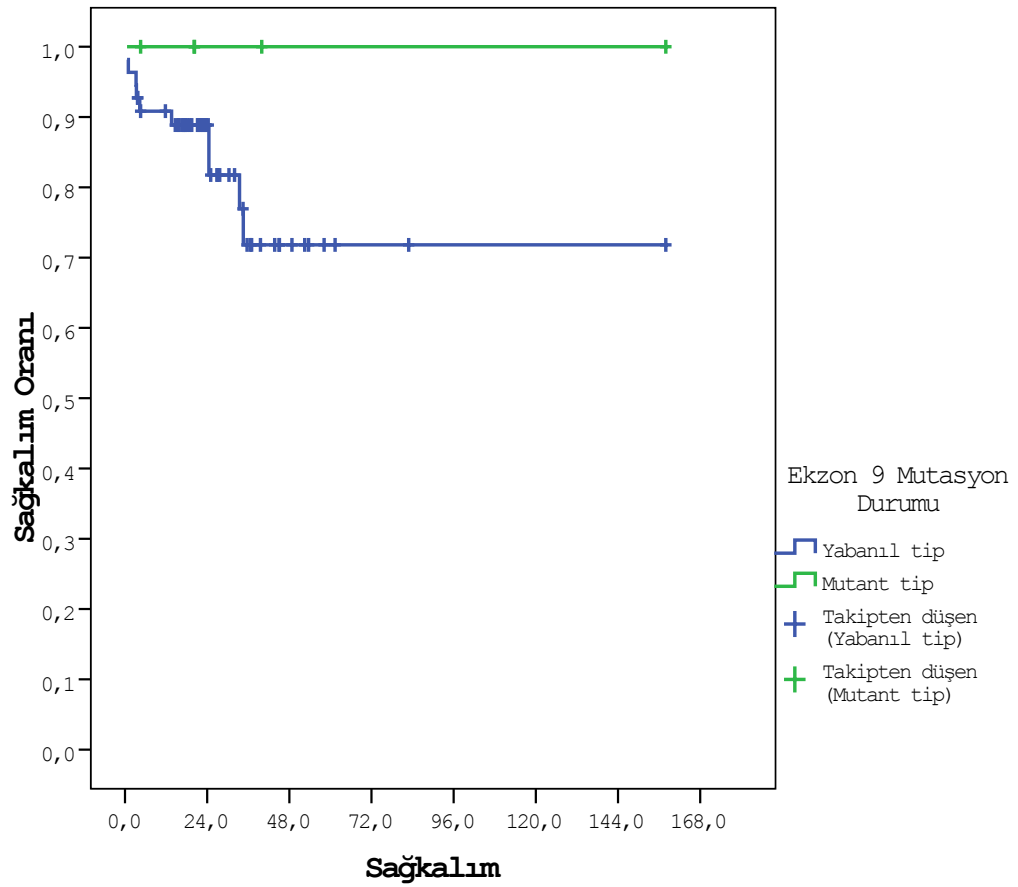
Mutant Tip Olan Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
132,041	12,237	108,057 - 156,026

Log Rank test: 2,307, SD:1, p:0,129

Sağkalım açısından mutasyonu olan ve olmayan olan olgular arasında fark gözlenmemiştir (Log Rank test: 2.307, SD:1, p:0,129).

4.6.11 *KIT* Geni Ekzon 9 Mutasyon Varlığına Göre Sağkalım

KIT GENİ EKZON 9 MUTASYON DURUMUNA GÖRE SAĞKALIM



Şekil 84. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların *KIT* geni ekzon 9 mutasyon durumuna göre sağ kalım analizi

Tablo 53. *KIT* geni ekzon 9 bölgesi açısından yabanıl tip olgularda yaşam süresi

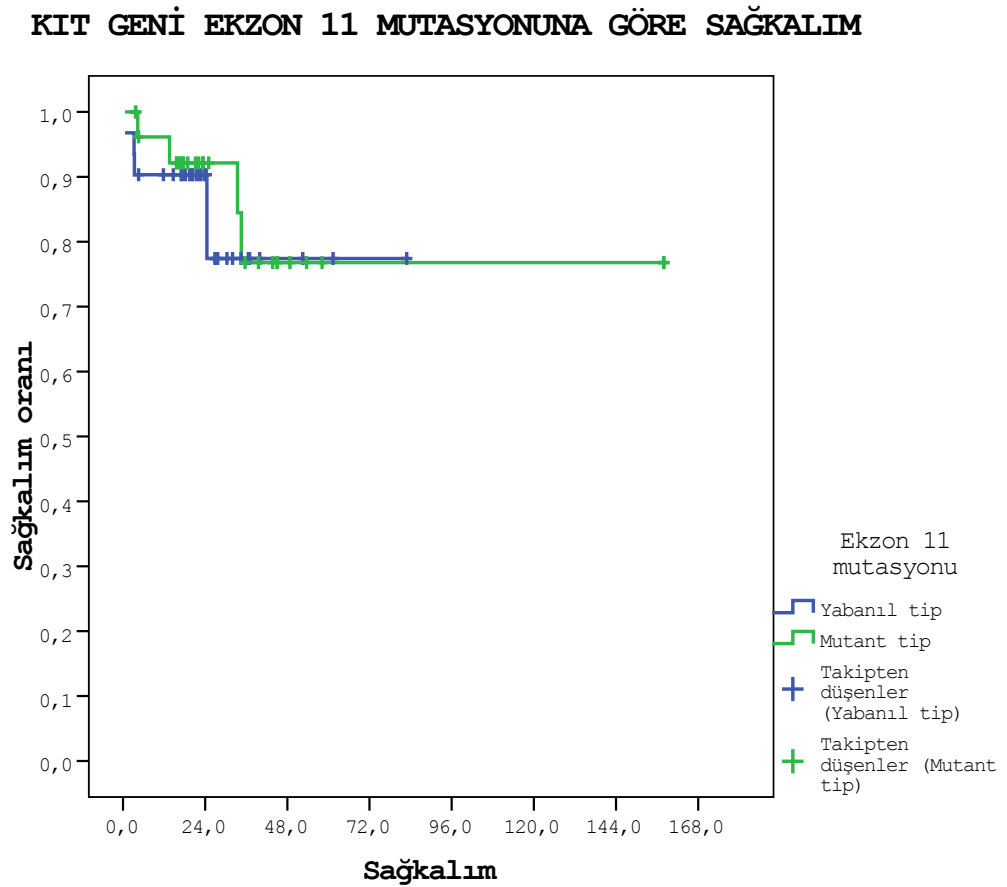
Yabanıl Tip Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
119,1	11,4	96,7 - 141,4

Log Rank test:0,98, SD:1, p:0,322

Ekzon 9 Mutasyonu olan olgular arasında ölenler olmadığı için ekzon 9 açısından mutant olguların ortalama yaşam süresi, standart hata ve güven aralığı değerlerine ulaşılamamıştır.

Sağkalım açısından ekzon 9 mutasyonu olan ve olmayan olgular arasında fark gözlenmemiştir (Log Rank test:0,98, SD:1, p:0,322)

4.6.12 *KIT* Geni Ekzon 11 Mutasyon Varlığına Göre Sağkalım



Şekil 85. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların *KIT* geni ekzon 11 mutasyon durumuna göre sağ kalım analizi

Tablo 54. *KIT* geni ekzon 11 bölgesi açısından yabanıl tip olgularda sağkalım

Yabanıl Tip Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
67,5	6,2	55,3 - 79,8

Tablo 55. *KIT* geni ekzon 11 bölgesinde mutasyon olan olgularda yaşam süresi

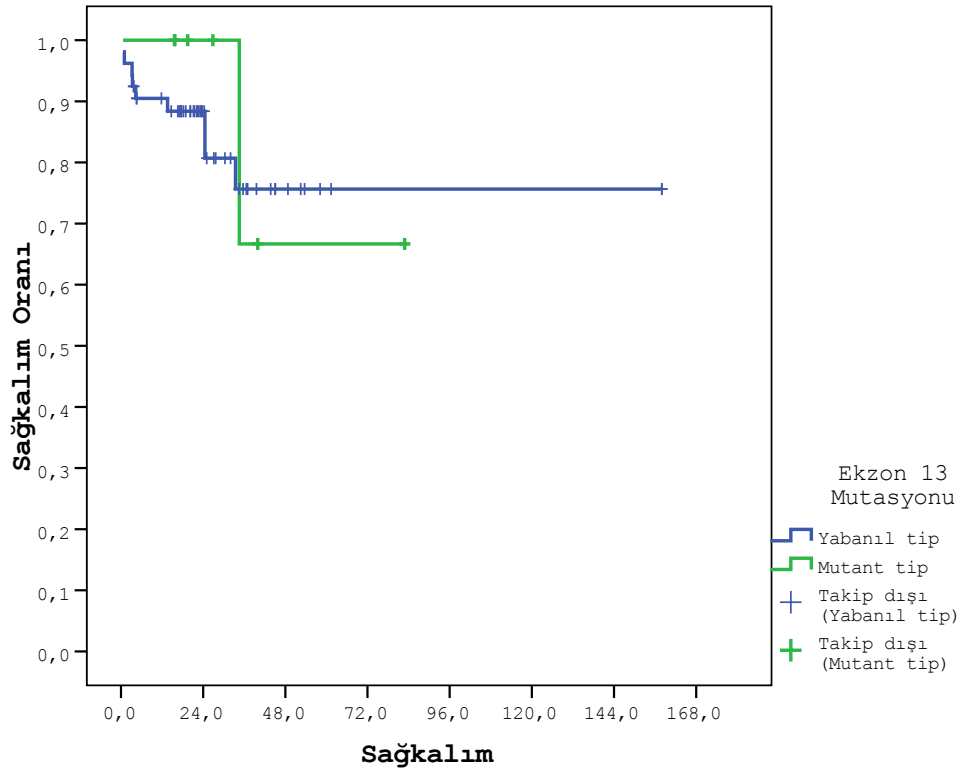
Mutant Tip Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
127,2	14,1	99,7 - 154,8

Log Rank test: 0,194, SD:1, p:0,660

Sağkalım açısından ekzon 11 mutasyonu olan ve olmayan olgular arasında fark gözlenmemiştir (Log Rank test: 0,194, SD:1, p:0,660)

4.6.13 *KIT* Geni Ekzon 13 Mutasyon Varlığına Göre Sağkalım

KIT GENİ EKZON 13 MUTASYON DURUMUNA GÖRE SAĞKALIM



Şekil 86. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların *KIT* geni ekzon 13 mutasyon durumuna göre sağ kalım analizi

Tablo 56. *KİT* geni ekzon 13 bölgesi açısından yabancı tip olgularda yaşam süresi

Yabancı Tip Olan Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
123,98	10,76	102,51 – 144,68

Tablo 57. *KİT* geni ekzon 13 bölgesinde mutasyon olan olgularda yaşam süresi

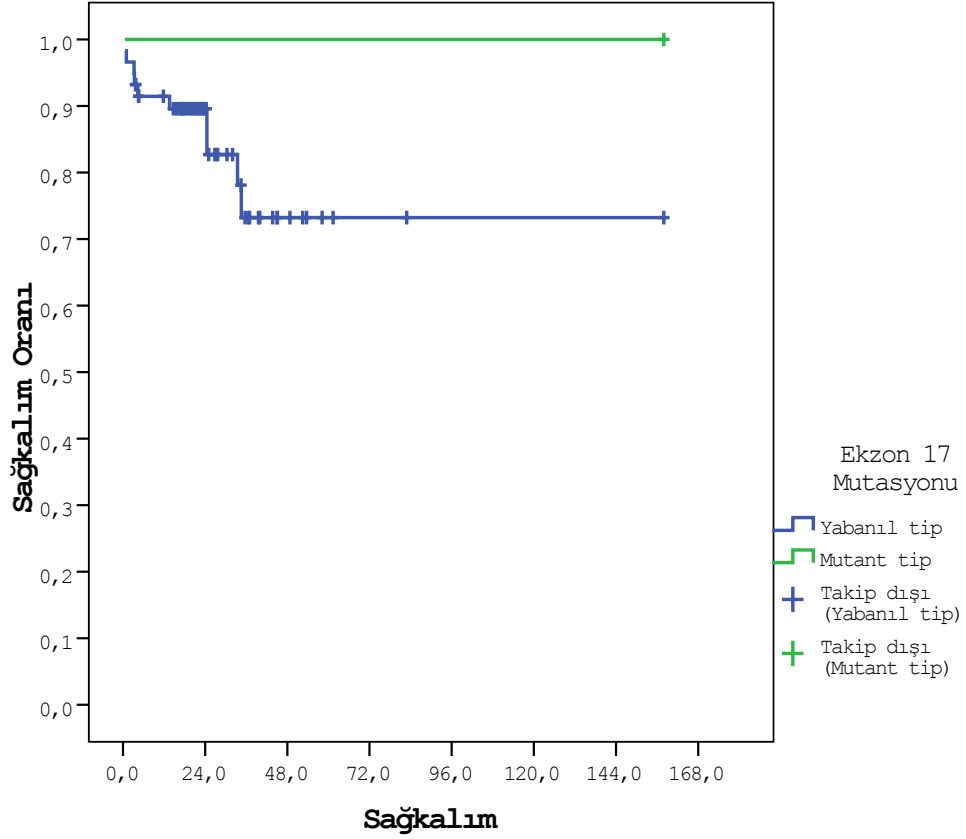
Mutant Tip Olan Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
66,76	13,14	40,99 – 92,52

Log Rank test: 0,122, SD:1, p:0,727

Sağkalım açısından ekzon 13 mutasyonu olan ve olmayan olgular arasında fark gözlenmemiştir (Log Rank test: 0,122, SD:1, p:0,727).

4.6.14 *KIT* Geni Ekzon 17 Mutasyon Varlığına Göre Sağkalım

KIT GENİ EKZON 17 MUTASYON DURUMUNA GÖRE SAĞKALIM



Şekil 87. DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğinde 2006-2010 tarihleri arasında GİST tanısı konan ve sağaltım alıp takibi süren hastaların *KIT* geni ekzon 17 mutasyon durumuna göre sağ kalım analizi

Tablo 58. *KIT* geni ekzon 17 bölgesi açısından yabanıl tip olan olgularda yaşam süresi

Yabanıl Tip Olan Olgularda Yaşam Süresi (Ay)		
Ortalama	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
121,10	10,90	99,60 - 142,50

Sağkalım açısından ekzon 17 mutasyonu olan ve olmayan olgular arasında fark gözlenmemiştir (Log Rank test: 0,307, SD:1, p:0,580). Ekzon 17 mutasyonu olan tek olgu vardır ve yaşamaktadır.

4.6.15 *KIT* Geni Mutasyonu Sağaltım İlişkisi Bağlamında Sağkalım Süreleri

Çalışmaya alınan tüm olguların ve klinik açıdan takibi yapıp adjuvan imatinib sağaltım alan ve metastatik olup imatinib sağaltımı alan olguların yaşam süreleri aşağıda tabloda hem genel olarak hemde genotip analizleri sonucu elde edilen mutasyon verilerine göre kaydedilmiştir.

Tüm olguların genel sağkalımları $122,0 \text{ ay} \pm 10,60$; $101,5 - 143,0$ 'tür. Tüm olguların içinde mutant olguların sağkalım süreleri $132,4 \text{ ay} \pm 12,23$; $108,05 - 156,03$ 'tür. Yabanıl tip olgular da sağkalım ise $46,20 \text{ ay} \pm 5,28$; $35,89 - 56,59$.

Metastatik olup imatinib kullanan olgular genel sağkalımları $115,30 \text{ ay} \pm 20,8$; $75,5 - 156,2$ 'dir. Bu olgulardan mutant olanların sağkalımları $136,0 \text{ ay} \pm 20,30$; $96,2 - 175,8$ 'dir. Yabanıl tip olguların sağkalımı ise $27,00 \text{ ay} \pm 2,0$; $23,0 - 31,0$.

Tüm olgulardaki ekzon 11 mutasyonu olan olguların sağkalımı $127,2 \text{ ay} \pm 14,1$; $99,7 - 154,8$ 'dir. Ekzon 11 açısından yabanıl tip olgularda sağkalım ise $67,5 \text{ ay} \pm 6,2$; $55,3 - 79,8$ 'dir.

Metastatik olup imatinib kullanan olgulardan ekzon 11 mutasyonu barındıranların sağkalımı $132,4 \text{ ay} \pm 23,4$; $86,5 - 178,2$ 'dir. Ekzon 11 açısından yabanıl tip olgularda sağkalım ise $28,3 \text{ ay} \pm 1,9$; $24,6 - 31,9$.

Tüm olgulardaki ekzon 11 mutasyonu olan olguların sağkalımı $66,76 \text{ ay} \pm 13,14$; $40,99 - 92,52$. Ekzon 13 açısından yabanıl tip olgularda sağkalım ise $123,98 \text{ ay} \pm 10,76$; $102,51 - 144,68$.

Metastatik olup imatinib kullanan olgulardan ekzon 13 mutasyonu barındıran tek bir olgu bulunmaktadır. Onun sağkalım süresi $26,8$ aydır. Ekzon 13 açısından yabanıl tip olgularda sağkalım ise $104,4 \text{ ay} \pm 25,1$; $55,2 - 153,6$.

Tablo 59. Tüm olguların sağkalım süreleri

	Tüm Olguların Genel Sağkalımı ± SH (%95 CI) (Ay)	Mutant Olguların Genel Sağkalımı ± SH (%95 CI) (Ay)	Yabamlı Tip Olguların Genel Sağkalımı ± SH (%95 CI) (Ay)	<i>KIT</i> Geni Ekzon 9 Açısından Genel Sağkalım ± SH (%95 CI) (Ay)		<i>KIT</i> Geni Ekzon 11 Açısından Genel Sağkalım ± SH (%95 CI) (Ay)		<i>KIT</i> Geni Ekzon 13 Açısından Genel Sağkalım ± SH (%95 CI) (Ay)		<i>KIT</i> Geni Ekzon 17 Açısından Genel Sağkalım ± SH (%95 CI) (Ay)	
				Mutant	Yabamlı Tip	Mutant	Yabamlı Tip	Mutant	Yabamlı Tip	Mutant	Yabamlı Tip
Tüm olgular (n:60)	122,0 ±10,60, (101,5 - 143,0)	132,4±12,23 (108,05–156,03)	46,20 ±5,28 (35,89–56,59)	†	119,1±11,4 (96,7-141,4)	127,2±14,1 (99,7-154,8)	67,5±6,2 (55,3-79,8)	66,76 ±13,14 (40,99-92,52)	123,98 ±10,76 (102,51-144,68)	158 *	121,1 ±10,9 (99,6-142,5)
Metastatik olup imatinib kullanan (n:13)	115,30 ±20,8 (75,5-156,2)	136,0 ±20,30 (96,2–175,8)	27,00±2,0 (23,0–31,0)	158 *	104,4 ± 25,1 (55,2 – 153,6)	132,4 ±23,4 (86,5- 178,2)	28,3 ±1,9 (24,6- 31,9)	26,8 *	104,4 ± 25,1 (55,2-153,6)	158 *	104,4 ±25,1 (55,2 –153,6)

* Tek bir olgu

† İzlem süresi içinde *KIT* geni ekzon 9 mutasyonu içeren ölüm kaydedilmemiştir. Yaşayan beş olguda izlem süresi ortalama 48,67 ±62,42 , medyan 20,3, minimum 4,6 – maksimum 158.

5. TARTIŞMA

5.1 DEMOGRAFİK BİLGİLER

Çalışmamıza 2006-2010 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda GİST tanısı almış, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalında izlenen ve patoloji tanıları Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda konulan 65 olgu alındı. Altmış olgudan genotip analizine uygun miktar ve kalitede DNA elde edildi. Çalışmanın asıl amacı genotip bilgileri ile klinikopatolojik ve klinik bilgilerin karşılaştırılması olduğundan demografik incelemeler ve sağkalım analizleri de bu 60 olgunun üzerinde yapıldı ve DNA elde edilemeyen 5 olgu çalışma dışı bırakıldı.

Bu 60 olgudan oluşan çalışma grubundaki olguların %53,3 (n:32)'ü kadın, %46,7 (n:28)'ü erkekti. Rauf F. ve arkadaşlarının Pakistan 'da gerçekleştirdiği çalışmalarında (n:37) %64,9'u erkekti (204). Ichianagui Rodriguez C ve ark.'nın Peru'da yaptıkları çalışmada (n:34) olgularının %58,8'i erkekti (205). Nilsson B. ve ark.'nın İsveç'te yürüttükleri çalışmalarında (n:288) ise erkek-kadın oranı aynı bulundu (206). Literatürde GİST olguları arasında cinsiyet yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmese de erkeklerde kadınlara göre biraz daha fazla olduğu görülmektedir (207). Doğanavşargil B. ve ark.'nın Türkiye Ege Bölgesi temelli çalışmalarında olgu grubunun (n:122) %56,6'sı erkek bulunmuştur (208). Türkiye'de, Büyükaşık O ve ark.'nın iç Anadolu bölgesinde yaptıkları araştırma çalışmasında (n:9) olguların 6'sı kadındı (209). Kang YN ve ark.'nın Kore'de yaptıkları çalışmada (n:118) olguların %61'i kadındı (210).

GİST olgu grubumuzda saptanan kadın çoğunluğu diğer bir Türk çalışması olan Büyükaşık O ve grubunun çalışmasındaki kadın hastaların fazla olmasıyla benzerlik göstermektedir. Ancak bunun yanında daha geniş bir olgu grubuna sahip Doğanavşargil B. Ve ark.'nın yaptıkları çalışmanın sonuçlarıyla benzerlik göstermemektedir. Kang YN ve arkadaşlarının Kore'de yaptıkları çalışmada da kadın olgular çoğunlukta idi (%61). Ancak bunun yanında Avrupa, Amerika ve Asya temelli diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlarla bizim sonuçlarımız arasında farklılıklar vardır. Bu konuda bölgelere göre değişim gösteren çevresel etkenlerin yanında, etnik farklılıklarda hastalığın ortaya çıktığı cinsiyet grubunda değişim gösteriyor olabilir. GİST'lerde cinsiyet prognostik faktörler arasında yer almaktadır. Cinsiyet açısından erkek olmak GİST'lerde kötü prognostik faktördür. Olgu grubumuzda kadınların çoğunlukta olması, daha iyi prognozlu bir grubu işaret etmektedir. Grubumuzun

bu dağılımı kadın olguların sağkalımlarının yüksek olması beklentisini açığa çıkarır. Ancak grubumuzda cinsiyet ile sağkalım açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir (89, 211, 212)

GİST'ler, genellikle erişkinlerde, 5-7. dekatta görülür, çocuklarda nadirdir (14). GİST olgularından oluşan çalışma grubumuzda olguların yaş ortalaması ($\pm$ SD), 60,57 ($\pm$ 12.8) ; medyan 61'dir (min-max; 20-86) ile literatürü desteklemektedir. Rauf F ve ark.'nın Pakistan'da yaptıkları çalışmada (n:37) olguların yaş ortalaması 50.0 (95% CI 45.3-54.6) olarak bulundu (204). Ichianagui Rodriguez C ve ark.'nın Peru'da yaptıkları çalışmada (n:34) yaş ortalaması 64,7 olarak saptandı (205). Nilsson B ve ark.'nın İsveç popülasyonu tabanlı çalışmasında (n:288) olguların yaş ortalaması 69 olarak saptandı (206). Kang YN ve ark.'nın Kore'de yaptıkları çalışmada (n:118) olguların yaş ortalaması 57.7 (yaş aralığı 32-83) saptandı (210). Büyükaşık O ve ark.'nın Türkiye'de yaptıkları nir araştırma çalışmasında (n:9) olgu grubunun yaş ortalaması $65,7 \pm 14,2$ olarak belirlendi (209). Doğanavşargil B ve ark.'nın Türkiye Ege Bölgesi temelli çalışmalarında olgu grubunun(n:122) yaş ortalaması 58 ± 12 (Dağılım: 25-81 yaş) idi (208).

Olgu grubumuzun yaş ortalaması diğer bir Türk çalışması olan Doğanavşargil B ve ark.'nın çalışmasından elde edilen hem yaş ortalaması hem de yaş aralığı sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Literatürde yaş ortalaması ile ilgili veriler oldukça geniş bir aralıktadır (50-70 arasında). Bu nedenle çalışmaya alınan olgu grubunun yaş aralığı da bu ortalamayı etkilemektedir. Örneğin, Rauf F ve ark.'nın yaptıkları çalışmada olguların yaş aralığının 45,3- 54,6 olmasından dolayı ortalama yaşta bu aralığa göre diğer popülasyon temelli çalışmalardaki yaş ortalamasından daha düşük bulunmuştur.

Literatürde GİST'ler en çok mide ve ince bağırsak yerleşimlidir. Bizim olgu grubumuzda primer tümör yerleşimine göre sınıflama yapıldığında olguların %45 (n:27)' i mide, %26,7 (n:16)' si ince bağırsak, %3,3 (n:2)'ü kalın bağırsak, %5 (n:3)'i özofagus, %5 (n:3)'i omentum periton ve %15 (n:9)' i diğer bölge yerleşimliyd. Rauf F ve ark.'nın Pakistan'da yaptıkları çalışmada (n:37) primer tümör yerleşim alanlarına göre sıralama yapıldığında mide (29,7%), ince bağırsak (24,3%), mezenter(10,8%), pankreas(8,1%), rektum (2,7%) ve retroperitoneum (2,7%) şeklinde sıralanmıştır. Olguların %21,6'sının orjini belirlenememiştir (204). Medina-Franco H vee ark.'nın Meksika'da yaptıkları çalışmada da (n:62) en sık gözlenen primer GİST yerleşim yeri mide (%46,8) olarak belirlenmiştir (213).

Kang YN ve ark.'nın Kore'de yaptıkları çalışmada(n:118) primer GİST yerleşimi mide (%66,1), ince bağırsak (%28,0), periton (%4,2) ve kalın bağırsak (%1,7) olarak sıralanmıştır (210). Doğanavşargil B ve ark.'nın Türkiye Ege Bölgesi temelli çalışmalarında olgu grubunda (n:122) primer tümör yerleşimi mide (%47,5), ince bağırsak (%24,6), omentum-periton (%16), kalın bağırsak (%3,3), ileum (%3,3), duodenum (%2,5), özofagus(%0,8) , özofagus-mide birleşimi (%0,8), rektum (%0,8) olarak belirtilmiştir (208). Feng Li ve ark.'nın yaptıkları çalışmada (n:229) primer GİST yerleşimi sırasıyla mide (%38,9), ince bağırsak (%24,9), kalın bağırsak (%18,3), özofagus (%6,1) ve diğerleri (%18,3) şeklinde bulunmuştur (214).

Çalışmamızda literatürde yer alan primer GİST yerleşim yerlerini destekler şekilde bulunmuştur. Bizim çalışmamızda dahil olmak üzere bütün çalışmalarda en sık karşılaşılan primer yerleşim yeri olarak mide ve ince bağırsak olarak belirlenmiştir. Yerleşim yerlerinin yüzdeler açısından farklılıklar bulunabilmektedir. Rauf F ve ark.'nın Pakistan'da yaptıkları çalışmada mide yerleşimli tümörlerin yüzdesi grubumuzun verilerine göre düşüktür (%24,3). Ancak Doganavşargil B Ve ark.'nın Türk grubu üzerinde yaptığı çalışmanın yerleşim yüzdeleriyle bizim sonuçlarımız benzerlik göstermektedir. Bu da yerleşim yeri yüzdelerinde etnik kökenin etkili olmasından ileri gelmektedir. Primer tümör yerleşimi GİST'lerdeki temel üç prognostik faktörden biridir. Literatürde ince bağırsak GİST'lerinin agresif bir davranış sergilediğine yönelik yayınlar bulunmaktadır (88). Bizim olgu grubumuzda ince bağırsak GİST'leri mide yerleşimli olanlar kadar yüksek oranda bulunmasa da en sık karşılaşılan ikinci yerleşim yeridir. Bu nedenle olgu grubunda agresifliğin göstergesi olabilir.

GİST'ler hücre tipi açısından iğsi ve epiteloid hücrelerden oluşan heterojen tümörlerdir. GİST'lerde iğsi hücreli tip %60-70, epiteloid hücreli tip %30 ve mikst tip %10 oranında görülmektedir (6, 15). Çalışmamızda en sık iğsi hücre tipine sahip tümörler gözlendi. Olguların %78,3'ünde iğsi, %8,3 'ünde epiteloid ve %13,3'ünde mikst hücre tipi gözlendi. Kang YN ve ark.'nın çalışmasında (n:118) %88,2 iğsi, %9,3 epiteloid ve %2,5 mikst hücre tipi gözlendi (210). Doğanavşargil B ve ark.'nın Türkiye Ege Bölgesi temelli çalışmalarında olgu grubunun (n:122) %55,7'sinde iğsi, %22,1'inde mikst ve %8,2'sinde epiteloid hücre tipi belirlenmiştir (208). Olgu grubumuzun hücre tipi sınıflamasına göre sıralama, Doğanavşargil B ve ark.'nın çalışmasıyla uyum göstermektedir. Grubumuzda iğsi tip oranı daha yüksek iken mikst hücre tipi daha azdır. Hücre tipi ile primer tümör yerleşimi bir arada prognostik olarak

değerlendirilebilmektedir. Bazı çalışmalarda epiteloid ve iğsi hücreli gastrik GİST'lerin metastaz yapma eğilimlerinin az olduğuna dair görüşler sunulmaktadır (215). Olgu grubumuzda mide yerleşimli tümörlerin ve iğsi, epiteloid tümörlerin yoğunlukta olduğunu düşünürsek metastaz yapma eğilimlerinin düşük olması beklenir.

GİST'lerin klinik davranışı oldukça değişkendir. Sıklıkla nüks şeklinde ve özellikle “yüksek risk” grubunda tanımlanan olgularda tam eksizyondan yıllar sonra bile metastaz şeklinde ortaya çıkabilirler. En sık intra-abdominal bölgeye ve karaciğere metastaz yaptıkları gözlenmiştir. Akciğere ve kemiğe metastaz nadirdir. Tanı anında metastaz da söz konusu olabilmektedir (86). Nilsson B ve ark.'nın yaptıkları çalışmada toplam 44 olguda (%16,9) tanı anında veya sonradan metastaz gelişmiştir. Olgu grubumuzda metastatik grubun fazla olmasının sebebi klinik takibi süren olgu grubunun az hasta içermesinden ileri gelebilir. Klinik takibi süren hasta grubu arttıkça bu oran değişebilir. Metastazı olan olgu grubumuzda (n:15), %67'si karaciğer, %13'u akciğer, %20'si diğer bölge yerleşimlidir. Nilsson B ve ark.'nın grubunda akciğer metastazı olan sadece bir olgu bulunmaktadır. Literatürde de akciğer ve kemik metastazlarının nadir olduğunu destekleyen yayınlar bulunmaktadır (14, 216). Olgu grubumuzda akciğer metastazı literatürden farklı olarak yüksektir.

GİST'lerde tümör çapı tümörün biyolojik davranışının tahmininde kullanılan prognostik faktörlerden biridir. Mitoz sayısı ile beraber değerlendirilmesi ile yapılan risk sınıflandırmasıyla tümörlerin risk gruplamasının yapılmasında oldukça önemi vardır (14). Olgu grubumuzda tümörün en uzun çap ortalaması ($\pm$ SD), 6,03 ($\pm$ 5,82); medyan 5, (min-max, 0,3-35). Olguların tümör çapları 2 cm'den küçük olanlar, 2-5 cm arasında olanlar, 5-10 cm arasında olanlar ve 10 cm'den büyük olanlar şeklinde gruplandırıldı. Bu gruplamaya göre olguların %16,7'si 2 cm'den küçük, %41,7'si (n:25) 2-5 cm arasında, %25'i (n:15) 5-10 cm arasında ve %16,7'si (n:10) 10 cm'den büyüktü. Medina-Franco H ve ark.'nın Meksika'da yaptıkları çalışmada (n:62) tümör çap ortalaması 7,5 cm olarak belirlenmiştir (213). Doğanavşargil B ve ark.'nın Türkiye'de yaptığı çalışmada (n:122) olgu grubundaki tümör çaplarının ortalaması $9,77 \pm 7,27$ cm; (min-max, 0,3 – 45 cm) arasında bulunmuştur (208). Chakrapan E ve ark.'nın Tayland'da yaptıkları çalışmada (n:22) olgu grubundaki tümör çaplarının ortalaması 5,5 cm; (min-max, 2 – 20 cm) arasında bulunmuştur (217). Chakrapan E ve ark.'nın çalışmasıyla bizim çalışmamız tümör çapı açısından benzerlik göstermektedir ancak bu

çalışmadaki tümör çapı dağılım aralığı bizim grubumuza göre daha dar bir aralıktadır ve çap açısından daha küçük tümörler mevcuttur. Medina-Franco H ve ark.'nın çalışmasında elde edilen tümör çapı ortalaması da grubumuzun tümör çapı ortalamasına yakındır. Kang YN ve ark.'nın Kore'de yaptıkları çalışmasındaki (n:118) olguların %11'inin tümör çapı < 2 cm'den küçük, %44.1'inin tümör çapı ≥ 2 cm ve < 5 cm arasındadır, %44,9'unun tümör çapı 5cm'den büyüktür (210). Bizim çalışmamızı bu çalışma ile kıyaslarsak, 2cm'den küçük tümörlerin oranı bizim çalışmamızda daha fazladır. Bu tümörün erken evrede yakalanmış olmasını desteklemektedir. Tümör çapı ≥ 2 cm ve < 5 cm arasında olanların oranı her iki grupta çok yakındır. 5cm'den büyük olanların oranı ise bizim olgu grubumuzda biraz daha düşüktür.

Literatürdeki çalışmalarda araştırmacılar tümör çaplarını sınıflandırma konusunda farklı aralıkları kullanmışlardır. Örneğin Chakrapan E ve ark. 10 cm'den küçük olanlar ve büyük olanlar şeklinde gruplama yapmıştır; Nilsson B ve ark. 7 cm'den büyük olanlar ve küçük olanlar şeklinde gruplamışlar. Bu nedenle tümör gruplaması açısından tam olarak bir karşılaştırma yapmak her zaman söz konusu olamamaktadır. Çalışmamızın yapıldığı GİST olgu grubunun tümör çapı açısından Amerika ve Uzak Doğu GİST popülasyonu ile benzerlik gösterdiğini savunabiliriz.

Doğanavşargil B ve ark.'nın çalışmasından elde edilen tümör çapı ortalama ve dağılım verileri ile bizim verilerimiz benzerlik göstermektedir. GİST'lerde en önemli prognostik faktörlerden biri olan tümör çapının, Türk popülasyonunda geniş bir aralıkta olduğunu ve oldukça büyük tümörler olabileceğini göstermektedir. Oldukça büyük tümörlerle karşılaşmanın sebebi, tümörün erken teşhisinde geç kalınarak tümörün büyümesi olasılığı düşünülebilir.

GİST'ler için diğer önemli prognostik parametre tümörün proliferasyonunu işaret eden mitoz sayısıdır (152). Grubumuzdaki olguların 50 BBA'da tümör mitoz sayısı ortalaması ($\pm$ SD), 7,7 ($\pm$ 16,48); medyan 2 (min-max, 0-100) dir. Tümör dokularının 50 BBA'daki mitoz sayısı 5'ten az olanlar ve 5'ten çok olanlar şeklinde gruplanmıştır. Bu gruplamaya göre %70'inde (n:42) mitoz 5'ten küçük, %30'unda ise (n:18) mitoz 5'ten fazladır. Doğanavşargil B ve ark.'nın Türkiye'de yaptığı çalışmada (n:122) 50 BBA'daki ortalama mitoz sayısı 10,62 $\pm$ 17,64 olup dağılım 0-120 mitoz/50 BBA arasında değişmekteydi. Bu çalışmada mitoz sayısı bizim olgularımızın mitoz sayısından daha yüksek bulunmuştur. Mitoz sayısındaki bu

yükseklik risk gruplamasında olguların yüksek risk grubunda olmasını destekleyici bir parametredir (208). Chakrapan E ve ark.'nın Tayland'da yaptıkları çalışmada (n:22) olgu grubundaki mitoz sayısı ele alındığında mitoz sayısı <5 olan olguların yüzdesi %68,2, mitoz sayısı 5'ten büyük olanların yüzdesi %31,8'dir (217). Uzak Doğu temelli bir GİST popülasyonu ile yürütülen bu çalışmadan elde edilen verilerle Uzak Doğu GİST popülasyonu ile Türkiye GİST popülasyonunda mitoz sayısı açısından benzerlik olduğu açığa çıkmaktadır. Literatürdeki bazı yayınlarda kötü prognozlu olgularda mitozun >5/50 BBA olduğu belirtilmektedir (40).

Mitotik aktivitenin yoğunluğunun ve tümör boyutunun maligniteyle ilişkili olduğu düşüncesini savunan yayınlardan yola çıkılarak (14, 45, 78, 90, 91, 92, 93) bu konuda ileri gelen bilim adamları 50 BBA' daki mitoz sayısı ve tümör boyutu esas alınarak GİST'leri çok düşük, düşük, orta ve yüksek riskli diye sınıflamışlardır (6). Olgu grubumuzda olguların %16,7'si çok düşük, %23,3'ü düşük, %28,3'ü intermediyer ve %31,7'si yüksek risk grubundadır. Doğanavşargil B ve ark.'nın Türkiye'de yaptığı çalışmada (n:122) olguların %5,7'si çok düşük, %23'ü düşük, %17,4'ü intermediyer ve %50,8'i yüksek risk grubundadır (208). Bu Türk GİST olgu grubu ile yürütülen çalışmanın sonuçları ile bizim olgu grubumuzun risk sınıflaması yüzdelerindeki farklılıkların benzer olmaması, mitoz sayısındaki farklılıklardan ileri gelmektedir. Doğanavşargil B ve ark.'nın yaptığı çalışmada ortalama mitoz sayısı ve mitoz sayısı dağılım aralığı bizim olgu grubumuzun ortalaması ve dağılım aralığından daha yüksektir. Bu da Doğanavşargil B ve ark.'nın çalışmasındaki olgu grubunda yüksek risk yüzdesinin fazla olmasını sağlamaktadır. Rauf F. ve ark.'nın Pakistan'da yaptıkları çalışmada (n:37) olguların %7,7'si çok düşük, %7,7'si düşük, %10,3'ü intermediyer ve %69,2'si yüksek risk grubundadır (204). Bu Pakistan çalışmasındaki sonuçlara bakıldığında da düşük risk gruplarının oranlarının az olduğu ve yüksek risk grubunun oranının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bizim olgu grubumuzun tam tersi olan bu durum mitoz sayısının ve tümör çaplarının fazlalığından ileri gelmektedir.

GİST'lerde tanı, histolojik sınıflama ve tedaviye yön vermek amacıyla immünohistokimiyadan yararlanılır. GİST'ler Gİ kanalda spesifik histolojik karakteristiklere sahip *KİT* pozitif mezenkimal (stromal) tümörler olarak tanımlanmaktadır (73, 74) . GİST'lerde %60-70 oranındaki kuvvetli yaygın sitoplazmik CD34 pozitifliği, bu belirteci GİST tanısı açısından hassas ve spesifik yapmaktadır (6, 14, 77). Normal Gİ düz kas

hücrelerinde eksprese olan SMA, düz kas differansiasyonuna bağlı olarak GİST'lerin %20-40'ında pozitifdir (78). Desmin pozitifliği gerçek *KİT* pozitif GİST olgularının içinde %1-2'si oranında verilmektedir (78). GİST'lerde desmin ve S-100 pozitifliği oldukça nadir olup yaklaşık olarak %5 civarındadır. SMA pozitifliği ise daha çok ince bağırsak tümörlerinde görülür (78).

Olgu grubumuzda *KİT* açısından taranan olguların %98,3'ü pozitif, %1,7'i fokal pozitif olarak saptandı. CD34 açısından taranan olguların % 71,7'si pozitif, %28,3'ü negatif olarak saptandı. SMA açısından taranan olguların %41,7'si pozitif, %6,7'si fokal pozitif, %51,7'si negatif olarak saptandı. Desmin açısından taranan olguların %11,7'si pozitif, %1,7' fokal pozitif, %86,7'i negatif olarak saptandı. S-100 açısından taranan olguların %66,7'si pozitif, %5'ü fokal pozitif ve %28,3'si negatif olarak saptandı. Ki-67 açısından taranan olguların %33'ü ≥ 10 olacak şekilde, %66,7'si < 10 olacak şekilde boyanma gösterdi.

Doğanavşargil ve ark.'nın çalışmasında (n:122) tümörlerin hepsi CD-117 (*KİT*) pozitif idi. Olguların %93,4'ünde yaygın pozitiflik, %6,6'sında fokal pozitiflik saptandı. CD34, olguların %69'unda pozitifdir. Olguların % 43,4'ünde (n:53) yaygın boyanma izlendi. Fokal olmakla birlikte olguların %35,2'sinde SMA, %3,3'ünde desmin, %4,1'inde ise S-100 ekspresyonu kaydedildi. Ki-67 proliferasyon indeksi ortalama $5,73 \pm 6,00$ (Dağılım: %0-%25) olarak değerlendirildi. Chakrapan E ve ark.'nın Tayland'da yaptıkları çalışmada (n:22) tüm olgular CD117, CD34 açısından pozitif. Olguların %11,8'i SMA pozitif olarak bulunmuştur. S-100 ve desmin açısından hiçbir olguda pozitiflik saptanmamıştır (217).

GİST'lerdeki CD117 pozitifliği çalışmamızın da içinde bulunduğu bir çok çalışmayla desteklenmektedir. CD34 açısından kıyaslama yapıldığında çalışmamızın sonuçları ile Doğanavşargil ve ark.'nın yaptıkları çalışmadaki CD34 pozitifliği yüzdeleri uyushmaktadır. Ancak Chakrapan ve ark.'nın Tayland popülasyonu temelli çalışmasında tüm olgularda gözlenen CD34 pozitifliği, Türk popülasyonu ile Tayland popülasyonu açısından CD34 pozitifliği uyumsuzluğunu düşündürmektedir. SMA açısından yapılan değerlendirme sonuçları birbirleriyle uyushmamaktadır. Çalışmamızdaki fokal SMA pozitiflik oranı ile Doğanavşargil ve ark.'nın çalışmasındaki fokal SMA pozitifliği oranı ile uyushmamaktadır. Ayrıca bu grupta yaygın SMA pozitifliği söz konusu değilken, bizim olgularımızda gözlenmiştir. Chakrapan ve ark.'nın çalışmasında ise SMA pozitifliği çalışmamıza göre oldukça düşüktür. Desmin pozitifliği oranlarımız ile Doğanavşargil ve ark.'nın yaptığı çalışmanın desmin pozitiflik oranları arasında fark bulunmaktadır. Chakrapan ve ark.'nın

yaptıkları çalışmalarda ise desmin pozitifliği gözlenmemiştir. Bu bizim çalışma grubumuzda desmin pozitifliği açısından bir artış yönünde farklılık bulunmaktadır.

Ki-67, 1983'te Gerdes tarafından bölünmekte olan hücrelerde keşfedilen nükleer antijendir. Ki-67 hücre döngüsü ve tümör büyüme belirteçidir ve karyokinez, tümör büyüklüğü ve nekroz ile ilişkilidir. Olgu grubumuzun %66,7'sinde Ki-67 ekspresyonu 10'dan küçüktür. Buradan yola çıkılırsa Ki-67 indeksinin olguların çoğunda düşük olması tümör büyüklüğünün az olması ile ilişkilidir şeklinde düşünülebilir. Ancak olgularımızın Ki-67 indeksi ile tümör büyüklüğü arasında bu açıdan istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Fisher kesin testi, p:1,000). Yine aynı mantıkla düşünüldüğünde Ki-67'nin düşüklüğü metastaz yapma olasılığını da düşürmelidir şeklinde düşünülebilir. Ancak olgularımızın Ki-67 indeksi ile metastaz arasında bu açıdan istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Fisher kesin testi, p:1,000).

5.2 MUTASYON ANALİZİ

Son yıllarda özellikle kanser sağaltımına yoğunlaşan araştırmalar, kanser patogenezinde önemli rolü olan tirozin kinazların inhibisyonuna odaklanmıştır. Bu bağlamda GİST patogenezindeki *KIT* geni en önemli hedeflerden biri; tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib ve sunitinib de kanser yönetiminde en belirgin hedefe yönelik sağaltımlardan biri olmuştur (120, 218, 219).

Ancak yıllar içindeki gözlemlerden ve yapılan çalışmalardan bu tirozin kinaz inhibitörlerine verilecek cevabın, hedefi olan *KIT* proteinindeki mutasyonlarla değiştiği gözlenmiştir. Bu nedenle GİST'lerdeki *KIT* geni aktivasyon mutasyonlarına yoğunlaşmıştır.

5.2.1 *KIT* Geni Genel Mutasyon Oranı

Yıllar içinde yapılan çalışmalarla *KIT* geninde %65-80 oranında aktivasyon mutasyonları tanımlanmıştır (17, 118, 119, 120). GİST'lerde tanımlanan *KIT* geni mutasyon oranları değişmektedir. Bu değişkenliğe sebep olan problem eski arşiv materyallerinde degrade DNA veya farklı mutasyon saptama yöntemlerinin kullanılmasından ileri gelmektedir (121). Bu nedenle literatürdeki çalışma meteryali ve yöntemsel farklılıklardan dolayı mutasyon yüzdelerindeki çelişkilerin oluşması yöntem standardizasyonu ve yöntem validasyonunun önemini göstermektedir. Bazı parafin tabanlı çalışmalarda PZR primerleri

kullanılarak bazı *KIT* geni bölgelerinin amplifikasyonu sağlanır. Ancak bu yöntem tüm ekzonların analizine olanak vermez. Ek olarak birçok grup tek zincir konformasyon polimorfizmlerinde var olan delesyon ve nokta mutasyonlarını gösteren yöntemlerle çalışmıştır. Fakat bu teknik diğer yöntemler gibi hassas değildir. Denatüre edici yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile fragman analizi hem delesyonların hem de nokta mutasyonlarının belirlenmesinde oldukça hassas bir yöntemdir. Ancak dizi analizinde altın standart klasik Sanger DNA dizilemesidir. Bu yöntem diğer yöntemlere göre daha emek yoğun, uzun ve optimizasyon-standardizasyon süreçleri daha zorlu bir yöntemdir. Ancak dizi analiz sonuçlarından en doğru sonuçların alınması bu zorluklarını kapatmaktadır. Bu nedenle bu yöntemin daha hızlı ve verimli olması için teknoloji yeni nesil DNA dizileme cihazları üzerine çalışmaya yoğunlaşmıştır.

Bireyselleştirilmiş tıbbın uygulanmasında söz sahibi olan moleküler testlerin optimizasyon ve validasyonu oldukça önemlidir. Sonuçların ve mutasyon dağılımların doğruluğu ancak optimizasyon ve validasyon basamaklarını tamamlamış bir yöntem, laboratuvar ekipmanı ve teknik personelden geçmektedir. Bu çalışmada bir grup olgu uzman DNA dizileme laboratuvarı tarafından dizilendi ve sonuçlar karşılaştırıldı. Sonuçlarımız yöntem validasyonuna yönelik yapılan istatistiksel testler ile uzman DNA dizileme laboratuvarı sonuçlarıyla kusursuz düzeyde (Kappa için mükemmel düzeyde tutarlılık > 0.75) tutarlılık elde etmiştir. Bu şekilde kullandığımız yöntemin analitik validasyonu yapıldı.

Olgu grubumuzda genotiplendirme çalışmaları sonucu 60 olgudan %58.3 (n:35)'sinin *KIT* geni ekzon 9, 11, 13,17 bölgelerinden herhangi birinde mutasyon barındırdığı belirlendi.

Heinrich MC ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (n:127) *KIT* geni mutasyonlarını %66,9 oranında bulmuşlardır (120). Christopher L ve ark.'ları yaptıkları çalışmada (n:322) *KIT* geni mutasyon oranını %66,1 bulmuşlardır (68). Battocchio A ve ark.'ları yaptıkları çalışmada (n:54) *KIT* geni mutasyon oranını %74 bulmuşlardır (220). Antonescu CR ve ark.'nın yaptıkları çalışmada (n:120) *KIT* geni mutasyon oranını %78 bulmuşlardır (134). Yukarıda sonuçları verilen çalışmalar (Heinrich MC, Christopher L, Battocchio A) parafin doku ile yapılan çalışmalardır. Olgu grubumuzun mutasyon oranı, yukarıdaki çalışmaların sonuçlarından daha düşüktür. Antonescu CR ve ark.'nın çalışması taze doku ile yapılan çalışmadır ve mutasyon oranı diğerlerine göre yüksektir. Bu da genotiplendirme çalışmalarında dokunun önemini göstermektedir. Bu nedenle yöntemsel optimizasyon, validasyon süreçlerinin yanında bunun gibi genomik çalışmalarda kullanılacak materyalinde

moleküler çalışmaya uygun olacak şekilde işlem görmesi yok sayılmaması gereken bir detaydır.

Ancak yöntem ve dokunun yanında mutasyon yüzdelerindeki değişikliklerin bir sebebi de etnik köken olabilir. GİST'lerde *KIT* geni mutasyonlarının etnik kökenler üzerindeki farklılıklarını ortaya koyan çok uluslu bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak yayınlardaki çalışmaya alınan popülasyonun tanımlandığı düzeyde kıyaslamalar yapılabilir.

Steigen SE ve ark.'nın Norveç temelli yaptıkları çalışmada (n:89) *KIT* geni mutasyon oranı %75 bulunmuştur (167). Braconi C ve ark.'nın İtalya popülasyonu temelli yaptıkları çalışmada (n:104) *KIT* geni mutasyon oranı %79 bulunmuştur (221). Gomes AL ve ark.'nın Portekizde yaptıkları çalışmada (n:78) *KIT* geni mutasyon oranı %56 bulunmuştur (222). Won Kim T ve ark.'nın Kore'de yaptıkları çalışmada (n:86) *KIT* geni mutasyon oranı %74 bulunmuştur (223).

Olgu grubumuzdan elde edilen mutasyon sonuçlarıyla Avrupa ve Asya'da yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlardan farklılık göstermektedir. Sonuçlarımız Norveç, İtalya ve Kore sonuçlarından oldukça düşüktür. Ancak Gomes ve ark.'nın Portekiz'de yaptıkları çalışmanın sonuçlarıyla benzerdir.

Çalışmamızın sonuçları, Türk popülasyonunda GİST'lerde yapılan sağaltım yanıtları ve histopatolojik tanımlamalarla eşleştirilmiş ilk mutasyon dağılım bildirimidir ve Türk popülasyonunda *KIT* geni mutasyon oranının literatüre göre düşük olduğunu göstermektedir. Literatürde GİST'lerde *KIT* geni aktivasyon mutasyonlarının yanında hücre sinyal iletiminde PDGFRA mutasyonlarının da etkili olduğu bildirilmiştir. Bu dikkate alınarak çalışma grubumuza PDGFRA mutasyon çalışması yapıp, PDGFRA mutasyon dağılımlarına bakılmalıdır.

5.2.2 Ekzon 9 mutasyonları

KIT geni ekzon 9 bölgesi KIT proteininin reseptör-reseptör etkileşiminde (dimerizasyon) rol oynayan ekstarselüler alt birimini kodlar. Literatürde GİST'lerde *KIT* geni ekzon 9 mutasyonları %5-18 oranlarında görülmektedir (118, 120, 122, 123). Olgu grubumuzda *KIT* geni ekzon 9 mutasyonları %8,3 (n:5/60) olarak saptanmıştır.

Steigen SE ve ark.'nın Norveç temelli yaptıkları çalışmada (n:89) *KIT* geni ekzon 9 mutasyon oranı %65 bulunmuştur (167). Gomes AL ve ark.'nın Portekizde yaptıkları çalışmada (n:78) *KIT* geni ekzon 9 mutasyon oranı %91 bulunmuştur (222). Braconi C ve

ark.'nın İtalya popülasyonu temelli yaptıkları çalışmada (n:104) *KIT* geni ekzon 9 mutasyon oranı %9 bulunmuştur (221). Won Kim T ve ark.'nın Kore'de yaptıkları çalışmada (n:86) *KIT* geni ekzon 9 mutasyon oranı %3,5 bulunmuştur (223). Bu anlamda çalışmamızdaki *KIT* geni ekzon 9 mutasyon oranı Akdeniz popülasyonu özelliğini göstermektedir.

GİST'lerde raporlanan *KIT* geni ekzon 9 insersiyonlarının %95'i ince bağırsak ile ilişkilendirilmiştir. Antonescu CR ve ark.'nın yaptıkları çalışmada da (n:120) *KIT* geni ekzon 9 mutasyonları (insersiyon) ince bağırsak yerleşimi ve agresif klinik davranış ile ilişkilendirilmiştir (134). Kontogianni-Katsarou K. Ve ark.'nın çalışmasında (n:30) 2 olguda Y503- F504 ins AY mutasyonu saptanmıştır. Bu çalışmada ekzon 9 insersiyonu içeren olgular iğsi hücreli, ince bağırsak yerleşimli ve malign karakterlidir (224). Olgu grubumuzda (n:60), Y503- F504 ins AY mutasyonu iki olguda saptandı ve literatürü destekler şekilde iğsi hücreli, ince bağırsak yerleşimli ve intermediyer risk grubunda bulunmuştur.

Bu mekanizmanın tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen hipotezler bu mutasyonların *KIT* geni ekstraselüler alt birimdeki anti dimerizasyon motifini bozduğu yönündedir (68).

Olgu grubumuzda *KIT* geni ekzon 9 bölgesinde, literatürde tanımlanmamış iki mutasyona saptanmıştır. Bunlar S451C (n:1) ve Q460H (n:2)' dir. Bu mutasyonlara sahip olguların klinikopatolojik bilgileri tablo 60'da verilmiştir. Bu mutasyonlar *KIT* geni ekstraselüler alt birimini kodlayan bölgede olmasından dolayı anti-dimerizasyon işlevini bozarak karsinogenez basamağında yer alacağı düşünülmektedir. Q460H mutasyonunu içeren iki olgunun iğsi hücreli olup, risk grubu açısından intermediyer ve yüksek risk grubunda olması bu mutasyonun hastalığa agresif bir karakter kazandırdığını düşündürmektedir. Ayrıca Q460H mutasyonunu içeren Tonklab 14 numaralı olgunun sağaltıma verdiği yanıtın progresif hastalık düzeyinde olması bu mutasyonun hastalığa agresif bir karakter verebileceği düşüncesini kuvvetlendirmektedir.

Tablo 60. Literatürde tanımlanmamış *KIT* geni ekzon 9 mutasyonlarını içeren olguların klinikopatolojik bilgileri

Olgu Numarası	Ekzon 9 Mutasyonu	Yaş	Cinsiyet	Tümör Yerleşimi	Mitoz	Tümör Çapı (cm)	Histoloji	Risk Grubu
Tonklab 55	S451C	66	Kadın	İnce bağırsak	1	4	İğsi	Düşük risk
Tonklab 14	Q460H	55	Erkek	Omentum-periton	6	6	İğsi	İntermediyer Risk
Tonklab 60	Q460H	56	Kadın	Mide	14	4,5	İğsi	Yüksek risk

Sağaltıma yanıtta *KIT* geni ekzon 9 mutasyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Grubumuzda *KIT* geni ekzon 9 mutasyonu olan olguların %50 (n:1)'si stabil hastalık, %50 (n:1)'si progresif hastalık sınıfındadır (Tablo 37).

Heinrich MC ve ark.'nın çalışmasında (n:127) ekzon 9 mutasyonu olan olguların %47,8'i kısmi yanıt, %26,1'i stabil hastalık, %17,4'ü progresif hastalık olarak tanımlanmıştır. Çalışmada tam yanıt alınan olgu bulunmamaktadır (120). Debiec-Rychter M ve ark.'nın yaptıkları çalışmada (n:377) ekzon 9 mutasyonu olan olguların %5,17'si tam yanıt, %5,31'i kısmi yanıt, %46,55'i stabil hastalık, %17,24'ü progresif hastalık olarak tanımlanmıştır (175).

Çalışma grubumuzda klinik takibi yapılan olgu sayısının azdır ve bu nedenle klinik takibi olan olgu sayılarının artması ile bu çalışmaya devam edilmesi önerilir.

5.2.3 Ekzon 11 mutasyonları

KIT geni ekzon 11 bölgesi *KIT* kinazın otoinhibisyonunu sağlar. Bu nedenle, Ekzon 11 bölgesindeki mutasyonlar *KIT* kinazın otoinhibisyonunun yok olmasını sağlar. Literatürde GİST'lerde, ekzon 11 mutasyon yüzdesi geniş bir dağılım göstermektedir (%20- 92). Bu çalışmalardan dondurulmuş (frozen) tümör örneklerinde elde edilen cDNA tabanlı mutasyon analizlerinde yüksek mutasyon oranları rapor edilmiştir. Örneğin Hirota ve arkadaşları ekzon 11 mutasyon oranlarını %83 (7); Rubin ve arkadaşları %71 olarak belirlemiştir (118).

Parafin dokudan elde edilen genomik DNA tabanlı çalışmalarda ise bu oranlar (%20-57) daha düşük bulunmuştur (116, 128, 130, 159, 160, 225).

Olgu grubumuzda ekzon 11 mutasyon oranı %47,5 olarak saptanmıştır. Bu sonuç parafin veya dondurulmuş tümör örneği tabanlı çalışmalarla kıyaslandığında parafin doku tabanlı çalışmalardan elde edilen mutasyon oranlarıyla benzerlik göstermektedir. Battocchio A

ve ark.'larının parafin dokularda yaptıkları çalışmada (n:54) *KIT* geni mutasyon ekzon 11 oranını %52 bulmuşlardır (220); buna karşın Braconi ve ark.'nın İtalya popülasyonunda ve taze dokularda yaptıkları çalışmada (n:104) *KIT* geni ekzon 11 mutasyon oranını %67 (221); Won Kim T ve ark.'nın Kore'de yaptıkları çalışmada (n:86) ise *KIT* geni ekzon 11 mutasyon oranı %70,9 bulmuşlardır (223). Bu hipotez için popülasyon temelli bir genetik epidemiyoloji çalışmasının daha büyük bir örneklem ile yapılmasını öneriyoruz.

Olgu grubumuzdaki ekzon 11 mutasyonları, literatürde mutasyonların yoğunlaşmasından dolayı "hot spot" bölge olarak adlandırılan 550-580 kodonları arasında yoğunlaştığı saptandı. Ekzon 11'de saptanan mutasyonların %20,3 (n:12)' i tek nükleotid değişim mutasyonlarıdır. Literatürde en çok karşılaşılan mutasyonlardan biri olan V560D mutasyonuna grubumuzda rastlanmadı. Buna karşın V560G (n:1), V559D(n:3) , V559G (n:1) mutasyonları tanımlanmıştır.

Gomes AL ve ark.'nın Portekizde yaptıkları çalışmada (n:78) *KIT* geni ekzon 11 bölgesinde V560G mutasyonu içeren bir olgu tanımlanmıştır (222).

Grubumuzda saptanan mutasyonların %23,7 (n:14)'si delesyondur. Grubumuzda en çok karşılaşılan ekzon 11 delesyonu V556-L576 delesyonudur (n:3). Literatürde en çok saptanan mutasyon olan W557- K558 delesyonunu ise 2 olguda tanımlanmıştır.

W557. ve K558. Kodonlar reseptör tirozin kinaz aktivitesi (Trp557) veya sürekli reseptör fosforilasyonu (Lys558) açısından bir önemlidir. Bu nedenle buradaki mutasyonlar karsinogenez ve malign potansiyel ile de ilişkilendirilmektedir (142, 226)

Olgu grubumuzda, tirozin kinaz aktivitesi ile ilişkilendirilen bu bölgede mutasyon oranı % 53 olarak saptanmıştır. Fletcher ve ark.'nın risk sınıflaması ile W557- K558. kodonlarda mutasyon varlığı karşılaştırıldığında (Tablo 26), W557- K558. kodonlarda mutasyon içeren olgularda risk daha yüksek bulunmuştur (Fisher kesin testi, p:0,039). Sonuçlarımız W557- K558. kodonlarda mutasyon varlığının karsinogenez ve malign potansiyel ile ilişkisini doğrular niteliktedir.

Gomes AL ve ark.'nın Portekizde yaptıkları çalışmada (n:78) *KIT* geni ekzon 11 bölgesinde V556-L576 delesyonu içeren 3 olgu tanımlanmıştır. Bu delesyon olgu grubumuzda da üç olguda saptanmıştır (222).

Grubumuzda saptanan ekzon 11 mutasyonlarının %1,7 (n:1)'si de D579_H580 ins IDPTQLPYD insersiyonudur. Gomes AL ve ark.'nın Portekizde yaptıkları çalışmada (n:78) *KIT* geni ekzon 11 bölgesinde insersiyon içeren 1 olgu tanımlanmıştır (222).

Olgu grubumuzda literatürde tanımlanmamış bir mutasyona saptanmıştır. Bu *KIT* geni ekzon 11 bölgesinde N567Y (n:1)' dir. Bu mutasyona sahip olgunun klinikopatolojik bilgileri tablo 60'da verilmiştir.

Tablo 61. Literatürde tanımlanmamış *KIT* geni ekzon 11 mutasyonunu içeren olgunun klinikopatolojik bilgileri

Olgu Numarası	Mutasyon	Yaş	Cinsiyet	Tümör Yerleşimi	Mitoz	Tümör Çapı (cm)	Histoloji	Risk Grubu
Tonklab 17	N567Y	86	Kadın	Kalınbağırsak	Saptanmamış	3	İgisi	Düşük risk

Bu mutasyonun saptandığı kodon (Tyr⁵⁶⁷) SHP-2'nin *KIT* reseptörüne selektif bağlandığı bölgedir. SHP-2 tirozin fosfataz içeren SH2 büyüme faktörü ve sitokin aracılı mitojenik sinyal yollarının negatif düzenlenmesinde görevlidir (227).

SHP-2'nin mutasyondan dolayı selektif bağlanamamasının sinyal yollarının inhibisyonunun gerçekleştirilememesini düşündürmektedir. Bu mutasyonun saptandığı olgunun sağaltımdan aldığı yanıtın progresif hastalık olması da, kanserleşen hücrelerin aktivasyonunun inhibe edilememesinin ve progresif bir şekilde hastalığın ilerlemesinin bir sonucu olabilir.

Sağaltıma yanıt ile *KIT* geni ekzon 11 mutasyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Grubumuzda ekzon 11 mutasyonu olan olguların %66,7'si (n:6) stabil hastalık, %33,3'ü (n:3) progresif hastalık sınıfındadır (Tablo 37).

Heinrich MC ve ark.'nın çalışmasında (n:127) ekzon 11 mutasyonu olan olguların % 83,5'i kısmi yanıt, %8,2 stabil hastalık, %4,7 progresif hastalık olarak tanımlanmıştır. Çalışmada tam yanıt alınan olgu bulunmamaktadır (120). Debiec-Rychter M ve ark.'nın yaptıkları çalışmada ekzon 11 mutasyonu olan olguların %6,45'i tam yanıt, %61,29'u kısmi yanıt, %25,40'ü stabil hastalık, %3,23'ü progresif hastalık olarak tanımlanmıştır (175).

Çalışmamızın daha geniş bir olgu grubuyla devam ettirilmesi durumunda literatüre daha uyumlu sonuçlar elde edilmesi söz konusu olabilir.

5.2.4 Ekzon 13 mutasyonları

KİT proteini tirozin kinaz alt birimi-1, *KİT* geni ekzon 13 bölgesi tarafından kodlanır. Tirozin kinaz alt birimleri fosforilasyonun ve sinyal iletiminin gerçekleşmesini sağlar. GİST'lerde primer transmembran alt birimi mutasyonlarının yanında kinaz alt birimi mutasyonları saptanmıştır. Bu durumda imatinibin bağlanmasında sorun oluşabileceğinden sekonder imatinib direnci söz konusu olmaktadır. GİST'lerde *KİT* geni ekzon 13 mutasyonları %1,5- 4,5 oranlarında görülmektedir (118, 120, 122, 123). Olgu grubumuzda *KİT* geni ekzon 13 mutasyonları %11,7 (n:7/60) olarak saptanmıştır.

Steigen SE ve ark.'nın Norveç temelli yaptıkları çalışmada (n:89) *KİT* geni ekzon 13 mutasyon oranı %3,4 bulunmuştur (167). Gomes AL ve ark.'nın Portekizde yaptıkları çalışmada (n:78) *KİT* geni ekzon 13 mutasyonuna rastlanmamıştır (222). Braconi C ve ark.'nın İtalya popülasyonu temelli yaptıkları çalışmada (n:104) *KİT* geni ekzon 13 mutasyonu rastlanmamıştır (221). Won Kim T ve ark.'nın Kore'de yaptıkları çalışmada (n:86) *KİT* geni ekzon 13 mutasyon oranı %3,5 bulunmuştur (223). Battocchio A ve ark.'larının yaptıkları çalışmada (n:54) ise *KİT* geni mutasyon ekzon 13 oranını %4 bulmuşlardır (220).

Olgu grubumuzda *KİT* geni ekzon 13 mutasyon oranının Avrupa popülasyonuna göre fazla olması popülasyonumuzda sekonder imatinib direnci olasılığını düşündürmektedir. Bu açıdan ekzon 13 mutasyonuna ışık tutabilecek popülasyon temelli bir klinik çalışmanın gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Kuzey Avrupa kökenli çalışmalarda *KİT* geni ekzon 9 mutasyon oranı yüksek, ekzon 13 mutasyon oranı yüksektir. Çalışmamızın sonuçları Türk GİST popülasyonu *KİT* geni ekzon 9 ve 13 mutasyonu için bunun tersini göstermektedir. Bu bağlamda Akdeniz-Asya kökenli popülasyonlar için *KİT* geni ekzon 9 mutasyon oranı düşük, ekzon 13 mutasyon oranı yüksek denilebilir. Buradan yola çıkılarak Kuzey Avrupa temelli popülasyonlarda daha agresif gidişli (ekzon 9 mutasyonlu) GİST'ler bulunurken, Asya temelinde sağaltıma sekonder direnç görülebilme (ekzon 13 mutasyonlu) ihtimali klinikte dikkat edilmesi gereken bir husustur.

Olgu grubumuzda *KİT* geni ekzon 13 bölgesinde literatürde tanımlanmamış bir mutasyona saptanmıştır. Bu N649D (n:2)' dir. Bu mutasyona sahip iki olgunun klinikopatolojik bilgileri tablo 61'de verilmiştir.

Tablo 62. Literatürde tanımlanmamış *KIT* geni ekzon 13 mutasyonunu içeren olgunun klinikopatolojik bilgileri

Olgu Numarası	Mutasyon	Yaş	Cinsiyet	Tümör Yerleşimi	Mitoz	Tümör Çapı (cm)	Histoloji	Risk Grubu
Tonklab 12	N649D	54	Erkek	Omentum-Periton	9	23	İğsi	Yüksek risk
Tonklab 13	N649D	53	Erkek	Omentum-periton	10	2	İğsi	Yüksek risk

KIT geni ekzon 13 bölgesinde en çok tanımlanan mutasyon K642E'dir. Bununla birlikte başka mutasyonlarda tanımlanmıştır (123).

Olgu grubumuzda da *KIT* geni ekzon 13 bölgesinde en çok saptanan mutasyon K642E (n:5)'dir. Bu mutasyonunu taşıyan iki olguda, K642E mutasyonuna ek olarak N649D mutasyonu saptanmıştır.

Grubumuzda saptadığımız N649D mutasyonu daha önce literatürde tanımlanmamıştır. Ancak Pera M ve ark.'nın yaptıkları çalışmada 649.kodonda bir duplikasyon (N649 dup) tanımlanmıştır ve yayınlarında daha önce bu bölgede herhangi bir mutasyonun tanımlanmadığını da sunmuşlardır (228).

Bu mutasyonun yer aldığı bölgenin proteine kattığı görevle ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Pera M ve ark.'nın yayınladığı olgu raporunda çok odaklı sporadik GİST hastası olan erkek hastada ilk kez 649 numaralı kodonda bir mutasyon tanımlanmıştır. Olgu grubumuzdaki N649D mutasyonunun saptandığı her iki olgunun da tümör yerleşimi omentum-periton olarak sınıflanmıştır ve çok odaklı tümör gelişimi söz konusu değildir. Bununla birlikte, grubumuzda saptadığımız N649D mutasyonunun iğsi ve yüksek riskli tümör dokusunda olması gibi özelliklerinin benzer olması da mutasyonun tümöre kazandırdığı özellikler olabileceğini düşündürmektedir.

Sağaltıma yanıt ile *KIT* geni ekzon 13 mutasyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Grubumuzda ekzon 13 mutasyonu olan olguların hepsi (n:3) stabil hastalık sınıfındadır (Tablo 37).

Heinrich MC ve ark.'nın çalışmasında (n:127) ekzon 13 mutasyonu olan olguların hepsi kısmi yanıt olarak olarak tanımlanmıştır (120). Debiec-Rychter M ve ark.'nın yaptıkları çalışmada (n:377) ekzon 13 mutasyonu olan olguların %66,67'si kısmi yanıt, %33,33'ü stabil hastalık olarak tanımlanmıştır (175).

Çalışmamızın daha geniş bir olgu grubuyla devam ettirilmesi durumunda literatüre daha uyumlu sonuçlar elde edilmesi söz konusu olabilir.

5.2.5 Ekzon 17 mutasyonları

KİT proteini tirozin kinaz alt birimi-1, *KIT* geni ekzon 17 bölgesi tarafından kodlanır. GİST'lerde *KIT* geni ekzon 17 mutasyonları %1,5- 4,5 oranlarında görülmektedir (118, 120, 122, 123). Olgu grubumuzda *KIT* geni ekzon 17 mutasyonları %1,7 (n:1/60) olarak saptanmıştır.

Steigen SE ve ark.'nın Norveç temelli yaptıkları çalışmada (n:89) *KIT* geni ekzon 17 mutasyonu içeren bir olgu raporlanmıştır (167). Braconi C ve ark.'nın İtalya popülasyonu temelli yaptıkları çalışmada (n:104) *KIT* geni ekzon 17 mutasyonu içeren bir olgu raporlanmıştır (221). Gomes AL ve ark.'nın Portekizde yaptıkları çalışmada (n:78) *KIT* geni ekzon 17 mutasyonuna rastlanmamıştır (222). Won Kim T ve ark.'nın Kore'de yaptıkları çalışmada (n:86) *KIT* geni ekzon 17 mutasyonu içeren olgu saptanmamıştır (223). Battocchio A ve ark.'larının yaptıkları çalışmada (n:54) ise *KIT* geni ekzon 17 mutasyonu içeren olgu saptanmamıştır (220).

Sonuçlarımız *KIT* geni ekzon 17 mutasyonu açısından literatürü desteklemektedir.

Olgu grubumuzda *KIT* geni ekzon 17 bölgesinde, literatürde tanımlanmamış iki mutasyona saptanmıştır. Bunların ikisi de aynı olguda saptanmıştır. Birisi A795P ve diğeri D820A (n:1)' dir. Bu mutasyona sahip olgunun klinikopatolojik bilgileri tablo 63'de verilmiştir.

Tablo 63. Literatürde tanımlanmamış *KIT* geni ekzon 17 mutasyonunu içeren olgunun klinikopatolojik bilgileri

Olgu Numarası	Mutasyon	Yaş	Cinsiyet	Tümör Yerleşimi	Mitoz	Tümör Çapı (cm)	Histoloji	Risk Grubu
Tonklab 15	A795P, D820A	51	Erkek	Omentum- periton	6	3	Mikst	İntermediyer risk

Sağaltıma yanıt ile *KIT* geni ekzon 17 mutasyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Grubumuzda ekzon 17 mutasyonu olan tek olgu vardır o da progresif hastalık sınıfındadır (Tablo 37).

Heinrich MC ve ark.'nın çalışmasında (n:127) ekzon 17 mutasyonu olan olguların % 50'si kısmi yanıt, %50'si progresif hastalık olarak tanımlanmıştır (120). Debiec-Rychter M ve

ark.'nın yaptıkları çalışmada (n:377) ekzon 17 mutasyonu olan olguların %66,67'si kısmi yanıt, %33,33'ü stabil hastalık olarak tanımlanmıştır (175).

Çalışmamızın daha geniş bir olgu grubuyla devam ettirilmesi durumunda literatüre daha uyumlu sonuçlar elde edilmesi söz konusu olabilir.

5.3 GENOTİP VERİLERİ İLE DEMOGRAFİK VERİLER ARASINDAKİ İLİŞKİ

Çalışmamızda olguların genotip verileri ile klinikopatolojik bilgileri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Buna göre cinsiyet, primer tümör yerleşimi, CD34 ekspresyonu, risk grubu ve mitoz sayısı ile mutasyon durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edildi.

5.3. Primer Tümör Yerleşimi ve *KIT* Geni Mutasyon İlişkisi

Primer tümör yerleşimine göre sınıflama yapıldığında olguların %45 (n:27)' i mide, %26,7 (n:16)' si ince bağırsak, %3,3 (n:2)'ü kalın bağırsak, %5 (n:3)'i özofagus, %5 (n:3)'i omentum periton ve %15 (n:9)' i diğer bölge yerleşimliydi.

Mide ve ince bağırsak yerleşimli olgular kendi aralarında *KIT* geni genel mutasyon durumu açısından karşılaştırıldığında ince bağırsak yerleşimli olan olgularda genel mutasyon varlığı anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (Fisher kesin testi, p:0,05)

Liu XH ve arkadaşları ile Du CY ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda tümör yerleşimi ile mutasyon varlığı açısından fark saptanmamıştır (229, 230). Lasota ve arkadaşlarının çalışmalarında ekzon 9 mutasyonlu olguların daha çok ince bağırsak yerleşimli oldukları çok az mide yerleşimli olgunun bulunduğu bildirilmiştir. Ekzon 17 mutasyonlu olgular içinde benzer durum söz konusudur. İnce bağırsak tümörlerinde, mide yerleşimli GİST'lere göre 2 kat daha fazla ekzon 17 mutasyonu bildirilmiştir (123).

Ekzon 11 mutasyonu, özofagustan anüse kadar olan tümörlerde raporlanmıştır (15, 17, 18, 36, 50, 116). Ancak çoğu çalışmada mide yerleşimli olgularda ekzon 11 mutasyonlarının daha sık görüldüğü bildirilmiştir (118,133, 134, 157, 158, 160, 223, 231-236). Japon popülasyonu temelli çalışmalarda *KIT* geni ekzon 11 mutasyon oranları çalışmamızdan elde edilen ekzon 11 mutasyon oranlarına göre daha yüksektir. Bu toplumlarda primer tümör yerleşiminin ve ekzon 11 mutasyonu içeren olguların çoğunluğunun mide yerleşimli olması, *KIT* geni ekzon 11 mutasyonlarının mide yerleşimli tümör karsinogenezinde popülasyon temelli veya çevre temelli bir yatkınlık unsuru görevi görüp görmediğinin ve mide yerleşimli

tümör karsinogenezinin açıklanması açısından önemli bir nokta olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle geniş bir örneklem grubunda değerlendirilmesini önermekteyiz.

GİST tümörlerindeki kinaz mutasyonlarının anatomik dağılımı sindirim sisteminin farklı bölgelerinde kinaz bağımlılığı ve biyolojisi açısından farklılık gösteren ICC popülasyonları olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda *KIT* geni genel mutasyon durumu açısından anlamlı fark saptanmıştır, ancak çalışma grubu arttırıldığında diğer mutasyonlarla primer tümör yerleşimleri arasında ilişki bulunabilir.

5.3. Metastaz Durumu-Metastaz Yerleşimi ve *KIT* Geni Mutasyon ilişkisi

Uzak organ metastazına göre genel mutasyon durumu, ekzon 9, 11 ve 13 mutasyon varlığı açısından fark gözlenmemiştir (Genel mutasyon durumu için: Ki-kare testi, p:0,809), (Ekzon 9 için: Fisher kesin testi, p: 1,000), (Ekzon 11 için: Fisher kesin testi, p: 0,576), (Ekzon 13 için: Fisher kesin testi, p: 0,600). İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da karaciğer metastazlarının %80'inde genel *KIT* mutasyonu, %70'in de de ekzon 11 mutasyonu bulunmuştur. Cho S ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da karaciğer metastazlı olgularda *KIT* geni ekzon 11 mutasyonları fazla bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0,053) (149).

Liu XH ve arkadaşlarının çalışmasında metastaz gelişen GIST olgularında *KIT* geni mutasyon oranı anlamlı derecede fazladır (p<0,050) (230). Bu ilişki yabancı tip ve mutant GİST'ler açısından, *KIT* geni aktivasyon mutasyonlarını içeren olguların uyarıdan bağımsız olarak aktiflenmesi ile malign davranış kazanması ve bu şekilde metastatik olma özelliğini kazanması şeklinde açıklanabilir.

5.3. Hücre Tipi ve *KIT* Geni Mutasyon İlişkisi

Olguların %78,3 (n:47)'sinde iğsi, %8,3 (n:5)'ünde epitelooid ve %13,3 (n:8)'ünde mikst hücre tipi gözlemlendi. Grubumuzda hücre alt tiplerine göre mutasyon varlığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bunun yanı sıra iğsi hücrelerde istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte ekzon 11 mutasyonu (%20) sık gözlenmektedir.

Wardelman ve arkadaşlarının çalışmasında iğsi hücreli tümörlerde mutasyon varlığı anlamlı derecede fazla bulunmuştur (Fisher kesin testi, p: 0,030) Ekzon 11 ile tümör morfolojisi arasında bir ilişki raporlanmamış olsa da epitelooid hücre tipine göre iğsi hücre tipine sahip tümörlerde ekzon 11 mutasyonlarının fazla olduğu bildirilmiştir (133).

Olgu grubumuzda epiteloid hücrelerin %80'inde herhangi bir *KIT* geni mutasyonu bulunmaktadır. Epiteloid hücreli tümörlerde görülen mutasyonların hepsi *KIT* geni ekzon 11 bölgesinde saptanmıştır ve hücre tipi açısından ekzon 11 mutasyonu epiteloid hücreli tümörlerde anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Fisher kesin testi, p:0.045)

KIT ekzon 9, 13 ve 17 mutasyonları sıklıkla iğsi hücreli tümörlerde gözlenmiştir. Bunun yanında bu mutasyonları içeren ince bağırsak yerleşimli epiteloid tümörler malign karakterli olarak gösterilmiştir (123).

5.3. İmmünohistokimyasal Profil ve *KIT* Geni Mutasyon İlişkisi

Çalışma grubumuzda olgularımızın %91,5'inde *KIT* ekspresyonu pozitiftir. *KIT* pozitif olguların (bir olgu dışında hepsi *KIT* pozitiftir) %40,7'si (n:24) genel mutasyon durumu açısından yabanıl tip, %59,3'ü (n:35) mutanttır. İmmünohistokimyasal olarak *KIT* ekspresyonu ve mutasyon durumu arasında ilişki saptanmamıştır (Fisher kesin testi, p:0.417). Diğer bir deyişle olguların hepsi *KIT* eksprese etmektedir ancak düşündürücü bir oranda mutasyon açısından yabanıl tiptir. Taniguchi ve arkadaşlarının çalışmasında da *KIT* ekspresyonu ile mutasyonlar arasında ilişki saptanmamıştır (Kikare testi, p:1.000) (128).

Çalışma grubumuzda immünohistokimyasal olarak CD34 ekspresyonu ve mutasyon durumu arasında ilişki saptanmıştır. CD34 ekspresyonu negatif olan olguların %64,7'si (n:11) genel mutasyon açısından yabanıl tip, %35,3'ü (n:6) mutant tiptir. CD34 ekspresyonu açısından fokal pozitif olgu yoktur. CD34 pozitif olguların %32,6'sı (n:14) yabanıl tip, %67,4'ü (n:29) mutant tiptir. CD34 pozitif olgularda anlamlı derecede mutasyon oranı daha yüksektir. (Kikare testi, p:0,002)

Taniguchi ve arkadaşlarının çalışmasında da CD34 ekspresyonu ile mutasyonlar arasında ilişki saptanmamıştır (Kikare testi, p:1.000) (128). Olgu grubumuzda CD34 pozitif olgularda ekzon 13 mutasyon varlığı istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte fazladır. Lasota ve arkadaşlarının çalışmasında ekzon 13 mutasyonu içeren olguların CD34 eksprese ettiği raporlanmıştır (123). İndiferansiyasyon belirtisi olan CD34 pozitifliği *KIT* mutasyonu ile beraber gelen undiferansiyasyonun artmasından kaynaklanabilir. Bu da Lasota ve arkadaşlarının çalışmasında belirttikleri gibi bizim olgu grubumuzda da sekonder mutasyon olasılığını düşündürmektedir.

Olgu grubumuzda SMA, desmin, S-100 ve Ki-67 açısından taranmıştır. Ancak SMA ve desmin (sarkomlardan rabdomiyosarkoma gibi tümörlerden GİST'leri ayırt etmek için

kullanılan belirteçler), S-100 (nöral krest kökenli tümörlerden GİST'leri ayırt etmek için kullanılan belirteç) ve Ki-67 (proliferasyon göstergesi) ekspresyonları ile mutasyon varlığı açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Ancak Ki-67 ekspresyonu >10'un üzerinde olan olguların %70'inin (n:14) herhangi bir *KIT* geni mutasyonu taşıması, hücrenin proliferasyonunda *KIT* geni mutasyonlarının etkili olduğunu desteklemektedir.

5.4 Risk Sınıflaması ve Mutasyon İlişkisi

KIT geninde herhangi bir mutasyonu olanlar, mutasyonu olmayanlara göre 3,18 kat daha fazla malign potansiyel riski taşımaktadır (OR:3,18). Bu da *KIT* aktivasyon mutasyonlarının hastalığın davranışı için prognostik bir faktör olabileceğini göstermektedir.

KIT geni ekzon 11 bölgesinde yer alan W557-K558 kodonunda mutasyon olan olgular, bu bölgede mutasyon taşımayan olgulara göre 11 kat daha fazla malign potansiyel riski taşımaktadır (OR:11). Çalışmamızda *KIT* geni ekzon 11 bölgesinde yer alan W557-K558 numaralı kodonlardaki mutasyon varlığı sonucu kazanılan malinite bu kodonlarda yer alan mutasyonların prognostik bir belirteç olarak karşımıza çıkmasını sağlamaktadır.

5.4 SAĞKALIM ANALİZLERİ

Olgu grubumuzda cinsiyete, metastaza, evreye, hücre tipine, risk grubuna, yaşa, mitoz sayısına, tümör çapına, genel mutasyon durumuna, *KIT* geni ekzon 9 mutasyon varlığına, *KIT* geni ekzon 11 mutasyon varlığına, *KIT* geni ekzon 13 mutasyon varlığına, *KIT* geni ekzon 17 mutasyon varlığına göre sağkalım analizleri yapıldı.

Sağkalım analizi sonuçlarına göre:

* Sağkalım açısından erkeklerde saptanan ortalama yaşam süresi ($\pm$ SH) [129,4 ay $\pm$ 13,6, %95 CI(confidence interval, güven aralığı) 102,7-156,2]; kadınlara göre ($\pm$ SH) [42,9 ay $\pm$ 3,4, %95 CI 36,2 – 49,6] belirgin oranda daha fazla olmasına rağmen, sağkalım açısından cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır (Log Rank test: 0,146, SD:1, p:0,702). Steigen SE ve ark.'nın yaptıkları çalışmada (n:89) cinsiyetler arasında sağkalım veya mutasyon varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (167). Cao H ve ark.'nın çalışmasında da (n:181) sağkalıma cinsiyetin etkisi saptanmamıştır (237).

*Çalışma grubumuzdaki metastaz gelişmeyen olgular arasında ölüm gözlenmemiştir. Bu nedenle bu olguların sağkalımı daha yüksektir. Ancak sağkalım açısından metastaz gelişen ve gelişmeyen olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır (Log Rank Test:3,319, SD:1, p:0,068).

*Onkolojik evreye göre hesaplanan sağkalım eğrisi temel alındığında; yaşama süresine göre sıralama (uzun yaşıyandan, kısa yaşayana doğru) erken evre, lokal ileri evre, ileri evredir. Ancak sağkalım açısından onkolojik evreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır (Log Rank test:5,48, SD:2, p:0,064). Singer S ve ark.'nın çalışmasında (n:48) sağkalım açısından evreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (p:0.001). Bu çalışmaya göre erken evre olma sağkalımı arttıran bir faktördür (159).

*Sağkalım açısından histopatolojik hücre tipleri (iğsi, epiteloid, mikst) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır (Log Rank test:0,999, SD:1, p:0,318). Singer S ve ark.'nın çalışmasında (n:48) sağkalım açısından hücre tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (p:0.002). Bu çalışmaya göre iğsi hücreli olma sağkalımı arttıran bir faktördür (159).

*Sağkalım açısından tümör çapı ve mitoz sayısı ile belirlenen risk grupları arasında fark saptanmıştır (Log Rank test: 35,876, SD:3, p:0,000). Buna göre çok düşük risk grubunda olunması sağkalım ihtimalini azaltmaktadır. Cao H ve ark.'nın yaptıkları çalışmada (n:181) sağkalım açısından risk grupları arasında anlamlı fark gözlenmiştir. Bu çalışmaya göre yüksek riskli tümörlerde sağkalım düşmektedir ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (237). Çalışma grubumuzda çok düşük risk grubundaki olguların sağkalımlarının beklenenin aksine düşük olması literatürle çelişmektedir. Çalışmamızda küçük çaplı ve düşük mitoz sayılı tümörleri temsil eden çok düşük risk grubundaki olguların sağkalım ihtimalini düşürmesi; gruplardaki sayının az olmasından ve bu olguların çok düşük risk grubunda olmalarından dolayı takiplerinin aksatılmış olabilme ihtimalinden kaynaklanabilir.

*Sağkalım açısından yaşı ≤ 60 (141,28 ay $\pm$ 11,034, %95 CI(confidence interval, güven aralığı) 119,655- 162,908) ile >60 (39,062 ay $\pm$ 4,223, %95 CI(confidence interval, güven aralığı) 30,785- 47,338) olan olgular arasında fark gözlenmiştir (Log Rank test: 5,39, SD:1, p:0,020). Bu durumda >60 yaş sağkalım ihtimalini düşüren bir faktördür. Cao H ve ark.'nın çalışmasında (n:181) sağkalıma yaştan etkisi incelenirken olgu grubu ≤ 50 ve >50 şeklinde sınıflandırılmıştır. Bu çalışmaya göre >50 olma sağkalımı düşüren bir faktördür (237). Cao H ve ark.'nın yaptıkları çalışmayla bizim çalışmamızda olguların yaş gruplaması aynı şekilde yapılmasa da ilerleyen yaştan sağkalımı olumsuz yönde etkileyen bir faktördür.

*Sağkalım açısından mitoz sayısı ≤ 5 (63,294 ay $\pm$ 6,385, %95 CI(confidence interval, güven aralığı) 50,783 - 75,811) ve >5 (133,699 ay $\pm$ 15,520, %95 CI(confidence interval, güven aralığı) 103,280 – 164,117) olan olgular arasında fark gözlenmemiştir (Log Rank test: 1.176, SD:1, p:0,278). Ancak olgu grubumuzda istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da beklenenin aksine mitoz sayısı <5 olan olgularda sağkalım süresi daha az görünmektedir. Steigen SE ve ark.'nın Norveç popülasyonu temelli yaptıkları çalışmada (n:89) sağkalım açısından mitoz sayısı ≤ 5 ve >5 olan olgular arasında fark gözlenmiştir. Mitoz sayısının >5 'ten fazla olması sağkalım ihtimalini düşüren bir faktördür. Tümör dokusundaki mitoz artışı ile tümörün yayılması daha çok kolaylaşacağından sağkalım ihtimali düşecektir (167).

*Sağkalım açısından tümör çapı farklı olan olgular arasında fark gözlenmiştir (Log Rank test:4,923, SD:1, p:0,027). Tümör çapı <5 cm olan olguların (103,666 ay $\pm$ 16,015, %95 CI(confidence interval, güven aralığı) 72,274 – 135,053) sağkalım ihtimali tümör çapı >5 cm olan olgulara (146,842 ay $\pm$ 10,648, %95 CI(confidence interval, güven aralığı) 125,972 – 167,711) göre daha düşüktür. Singer S ve ark.'nın çalışmasında (n:48) sağkalım açısından tümör çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (p:0.002). Bu çalışmaya göre hücre çapının <5 cm olması sağkalımı arttıran bir faktördür (159). Singer S ve ark.'nın çalışmasıyla bizim çalışmamızda tümör çaplarının sağkalıma etkisi benzer değildir. Çalışmamızda tümör çapının <5 cm olmasının sağkalımı olumsuz yönde etkilemesi, gruplardaki sayının az olmasından ve takiplerinin aksatılmış olabilme ihtimalinden kaynaklanabilir. Buna çalışmamızdan elde edilen diğer bir sonuç olan çok düşük risk grubunun sağkalımı olumsuz yönde etkilediği yönündeki sonucunu da eklersek yapılan yorum daha da kuvvetlenmektedir.

*Sağkalım açısından *KIT* geni mutasyonu olan (132,041 ay $\pm$ 12,237, %95 CI (confidence interval, güven aralığı) 108,057; 156,026) ve mutasyon olmayan yabanıl tip olgular (46,247 ay $\pm$ 5,28, %95 CI (confidence interval, güven aralığı) 35,899- 56,595) arasında fark gözlenmemiştir (Log Rank test: 2.307, SD:1, p:0,129). Ancak mutant olguların sağkalım süresi, yabanıl tip olan olgulara göre belirgin düzeyde yüksektir. Lin SC e ark.'nın yaptıkları çalışmada (n:25) da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmasa da *KIT* geninde mutasyon olan olguların sağkalım süresi (ortalama 63.28 months); yabanıl tiplere göre (ortalama 27.7 months) daha yüksektir. Bu nedenle istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da *KIT* geninde mutasyon varlığı sağkalımlar açısından iyi prognostik bir faktör olarak düşünülebilir. Ancak bu konuda daha geniş popülasyon tabanlı çalışmalar yapılmalıdır (238).

*Sağkalım açısından ekzon 9 mutasyonu olan ve mutasyon olmayan olgular (119,1 ay $\pm$ 11,4, %95 CI (confidence interval, güven aralığı) 96,7- 141,4) arasında fark gözlenmemiştir (Log Rank test:0.98, SD:1, p:0,322). Debiec-Rychter M ve ark.'nın yaptıkları çalışmada da sağkalım açısından ekzon 9 mutasyonu olan ve olmayan olgular arasında fark gözlenmemiştir (p:0,3) (175).

*Sağkalım açısından ekzon 11 mutasyonu olan (127,2 ay $\pm$ 14,1, %95 CI (confidence interval, güven aralığı) 99,7 - 154,8) ve mutasyon olmayan olgular (67,5 ay $\pm$ 6,2, %95 CI (confidence interval, güven aralığı) 55,3 - 79,8) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Log Rank test: 0,194, SD:1, p:0,660). İstatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmasa da, ekzon 11 mutant olguların sağkalım süresi, yabanıl tip olanlara göre daha yüksektir. Debiec-Rychter M ve ark.'nın yaptıkları çalışmada da sağkalım açısından ekzon 11 mutasyonu olan ve olmayan olgular arasında fark gözlenmemiştir (175).

*Sağkalım açısından ekzon 13 mutasyonu olan (66,76 ay $\pm$ 13,14, %95 CI (confidence interval, güven aralığı) 40,99 – 92,52) ve mutasyon olmayan olgular (123,98 ay $\pm$ 10,76, %95 CI (confidence interval, güven aralığı) 102,51- 144,68) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Log Rank test: 0,122, SD:1, p:0,727). Ancak yabanıl tip olgularda sağkalım süresi, ekzon 13 mutant olgulara göre daha yüksektir. Bu durum ekzon 13 mutasyonu olan olgularda sağaltıma karşı gelişebilen direnç ile sağkalımın kısalabileceğini düşündürmektedir.

*Sağkalım açısından ekzon 17 mutasyonu olan ve olmayan olgular arasında fark gözlenmemiştir (Log Rank test: 0,307, SD:1, p:0,580). Ekzon 17 mutasyonu olan tek olgu vardır ve yaşamaktadır.

5.4.1 *KIT* Geni Mutasyonu Sağaltım İlişkisi Bağlamında Sağkalım Süreleri

Çalışma grubumuzda mutant olguların genel sağkalımı (132,4 ay $\pm$ 12,23; 108,05–156,03) , hem yabanıl tip olan olgulara göre (46,20 ay $\pm$ 5,28; 35,89–56,59) hem de tüm popülasyona göre (122,0 ay $\pm$ 10,60; 101,5 - 143,0) belirgin oranda artmıştır (Tablo 59).

Metastatik olup imatinib kullanan olgularda da mutant olguların genel sağkalımları (136,0 $\pm$ 20,30; 96,2–175,8) hem yabanıl tip olguların (27,00 ay $\pm$ 2,0; 23,0–31,0) hem de genel sağkalımı (115,30 ay $\pm$ 20,8; 75,5-156,2) belirgin oranda uzamıştır.

GIST tanısı alan tüm olgularda (*KIT* geni ekzon 11 mutant: 127,2 ay $\pm$ 14,1 ;99,7-154,8 ve *KIT* geni ekzon 11 yabanıl tip: 67,5 ay $\pm$ 6,2; 55,3-79,8) ve metastatik olanlarda (*KIT* geni ekzon 11 mutant: 132,4 ay $\pm$ 23,4 ; 86,5- 178,2 ve *KIT* geni ekzon 11 yabanıl tip: 28,3 ay $\pm$ 1,9 ; 24,6- 31,9) *KIT* geni ekzon 11 mutasyonu taşıyanların sağkalımları belirgin oranda artmıştır. Bu açıdan ekzon 11 mutasyonu literatür ile uyumlu olarak prognostik/prediktif bir biyobelirteç olarak değerlendirilmektedir.

Buna karşın *KIT* geni ekzon 13 mutasyonu taşıyan tüm olgularda (*KIT* geni ekzon 13 mutant: 66,76 ay $\pm$ 13,14 ; 40,99-92,52 ve *KIT* geni ekzon 13 yabanıl tip: 123,98 ay $\pm$ 10,76; 102,51-144,68) ve metastatik olup imatinib kullananlarda (*KIT* geni ekzon 13 mutant: 26,8 ve *KIT* geni ekzon 13 yabanıl tip: 104,4 ay $\pm$ 25,1; 55,2- 153,6) genel sağkalımı yabanıl tipe göre kısalmıştır. Böylece ekzon 13 mutasyonlarının tümöre kazandırdığı direnç mekanizması ile sağkalımlardaki düşüş literatürle benzerdir.

Çalışmamızda *KIT* geni mutasyonu olan olguların sağaltımdan 2 kat fazla oranda yarar alması (OR:2) olasılığı GIST yönetimi için iyi bir yol gösterici prognostik bir faktör olmaktadır.

Popülasyon temelli çalışmalarla elde edilen veriler, karsinogenez mekanizmalarının genetik ya da çevresel etkenlerle değişebileceğini göstermiştir. Bu amaçla Türk popülasyonunda yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu açıdan gerek tanı testlerinin gerekse hedefe yönelik sağaltımların etkinliği bağlamında toplumumuzun moleküler özelliklerinde bilinmesi önem taşımaktadır.

Populasyon tabanlı uygulamalarda, kalıtsal genetik değişiklikleri taşıyanların kimliklendirilmesinde, sık karşılaşılan hastalıklar için kalıtsal risklerin belirlenmesinde, prediktif testler ve ilaç yanıtının öngörülmesinde söz konusu olan farmakogenetik testlerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Bu bağlamda tarama ve koruma amaçlı genomik teknoloji uygulamaları, halk sağlığı açısından da oldukça önem kazanmaktadır.

Sağaltımlarda gözlenen farklı sonuçlar, hasta ölümüne sebep olan yan etkiler ve artan sağlık harcamalarının, bireysel farklılıklarla şekillenen terapötiklere verilen yanıtlarla ilişkili olduğu gözlenmektedir. Bu gözlemlerde biyobelirteçlerin tanımlanmasıyla açığa çıkan translasyonel tıbbın söz sahibi olduğu bireyselleştirilmiş sağaltımların önü açılmıştır.

GİST'lerin biyolojik davranışından dolayı malign benign tümör ayırımı zorluklar içerir ve düşük risk grubunda bile olsa malinite potansiyeline sahip tümörlerdir. Bu nedenle GİST'lerde moleküler özelliklerin tanımlanması ve tümör davranışı ile ilişkilendirilerek tanı ve sağaltımı daha iyi yönetecek biyobelirteçler bulunması önem taşımaktadır. Tümör davranışıyla ilişkili moleküler düzeyde yapılan çalışmalar beraberinde yeni sağaltım hedefleri açısından da kazanımlar sağlayacaktır. Bu bağlamda populasyon temelli moleküler düzeyde tasarlanmış translasyonel çalışmaların yapılmasını öneriyoruz.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Gastrointestinal stromal tümörler, gastrointestinal sistemin en yaygın mezenkimal tümörlerindendir. GİST'ler biyolojik davranışından dolayı malign benign tümör ayırımında zorluklar içerir ve düşük risk grubunda bile olsa malinite potansiyeline sahip tümörlerdir. GİST'lerin %65-80'inde *KIT* geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 bölgelerinde aktivasyon mutasyonları tanımlanmıştır. Çalışmaya alınan GİST olgu grubunda *KIT* geni mutasyon yüzdesi literatüre göre düşük bulunmuştur. Bu oranın azlığı genotip analizinde kullanılan parafine gömülü dokuda kaynaklanan DNA kaybında veya etnik populasyon farklılığından ileri gelebilir. Ancak GİST'lerde aktivasyona yol açan *KIT* geni mutasyonlarının dışında başka yollardaki moleküllerdeki mutasyonlarında aktivasyonu tetiklemiş olabileceği düşünülmektedir. Literatürde *KIT* geni aktivasyon mutasyonlarının yanında PDGFRA mutasyonlarının da etkili olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle bu çalışmaya alınan olgu grubunda PDGFRA mutasyon analizi yapılmalıdır. Böylece bu gendeki mutasyon oranları ve dağılımları bulunarak Türk populasyonundaki GİST aktivasyon mutasyonlarına yönelik daha fazla bilgi üretilebilir. Bu açıdan bizim çalışmamız GİST ilgili literatür bilgilerinin Türk populasyonundaki durumunun belirlenebilmesi ve eğer farklıysa bu farklılıkların kaynaklarının bulunabilmesi; *KIT* geni genotip bilgilerini klinikopatolojik ve klinik verilerle birlikte değerlendirilmesi sonucuanlamlandırılabilmesi açısından öncüdür.

Biyolojik davranışın oldukça değişken olduğu GİST'lerde, *KIT* geni aktivasyon mutasyonlarının tümörün biyolojik davranışıyla beraber klinik seyrini de etkilediği yönünde yayınlar bulunmaktadır. Örneğin *KIT* geni ekzon 9 mutasyonlu olgularda agresif karakterin hakim olduğu, ekzon 13 mutasyonlu hastalarda ise sekonder direnç kazanımının söz konusu olduğu gibi bilgiler mevcuttur. Çalışmamızda *KIT* geni ekzon 11 bölgesinde yer alan W557-K558 numaralı kodonlardaki mutasyon varlığı sonucu işleyen karsinogenez ile kazanılan malinite potansiyeli bu kodonlarda yer alan mutasyonların prognostik bir belirteç olarak karşımıza çıkmasını sağlamaktadır (OR:11). Yine benzer bir şekilde çalışmamızda *KIT* geni mutasyonu olan olguların sağaltımdan 2 kat fazla oranda yarar alması (OR:2) olasılığı hekim için iyi bir prognostik faktör olurken hastalık yönetiminde yol gösterici olmaktadır. Bu tarz bilgiler farklı populasyon tabanlı çalışmalarda ışık tutarak populasyon veya çevresel temelli farklılıkların saptanmasını sağlayarak prognostik ve prediktif yeni biyobelirteçlere ışık tutar.

Çalışmamızda GİST'lerde daha önce tanımlanmamış *KIT* geni mutasyonları saptanmıştır. Bu mutasyonlar *KIT* geni ekzon 9 bölgesinde S451C ve N460H, ekzon 11 bölgesinde N567Y, ekzon 13 bölgesinde N649D ve ekzon 17 bölgesinde A795P ile D820A'dır. Bu mutasyonların tümöre kazandırdığı özelliklerin belirlenebilmesi açısından mutasyon-karsinogenez temelli in vitro hücre kültürü çalışmaları yapılması önerilebilir.

Ayrıca genetik materyal üzerindeki mevcut mutasyonların protein yapısında meydana getirdiği farklılıklarla sinyal yollarındaki değişimlerin ve proteinin yapısal bozulmasından ileri gelen protein-ilaç etkileşimlerdeki değişimlerin biyoinformatik analizleri, çözüme götürecek mekanizmaların anlaşılmasında daha yararlı olacaktır.

Kuzey Avrupa kökenli çalışmalarda *KIT* geni ekzon 9 mutasyon oranı yüksek, ekzon 13 mutasyon oranı yüksektir. Çalışmamızın sonuçları Türk GİST popülasyonu *KIT* geni ekzon 9 ve 13 mutasyonu için bunun tersini göstermektedir. Bu bağlamda Akdeniz-Asya kökenli popülasyonlar için *KIT* geni ekzon 9 mutasyon oranı düşük, ekzon 13 mutasyon oranı yüksek denilebilir. Buradan yola çıkılarak Kuzey Avrupa temelli popülasyonlarda daha agresif gidişli (ekzon 9 mutasyonlu) GİST'ler bulunurken, Asya temelinde sağaltıma sekonder direnç görülme (ekzon 13 mutasyonlu) olasılığı klinikte dikkat edilmesi gereken bir husustur.

Çalışmamızda mide yerleşimli tümörlerde ekzon 11 mutasyonu yaygındır. Japon popülasyonu temelli çalışmalarda *KIT* geni ekzon 11 mutasyon oranları çalışmamızdan elde edilen ekzon 11 mutasyon oranlarına göre daha yüksektir. Bu toplumlarda da primer tümör yerleşiminin ve ekzon 11 mutasyonu içeren olguların çoğunluğunun mide yerleşimli olması, *KIT* geni ekzon 11 mutasyonlarının mide yerleşimli tümör karsinogenezinde popülasyon temelli ve/veya çevre temelli bir yatkınlık unsuru görevi görüp görmediğinin ve mide yerleşimli tümör karsinogenezinin açıklanması açısından önemli bir nokta olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle geniş bir örneklem grubunda değerlendirilmesini önermekteyiz.

İmatinib sağaltımındaki olgu sayısı istatistiksel açıdan anlamlılık için yetersiz olduğundan dolayı sonuçlarımız yalnızca olgu grubumuzun tanımlayıcı özelliklerini oluşturmaktadır. *KIT* geni ekzon 9, 11, 13 ve 17 mutasyon durumlarının sağaltıma etkisinin istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde belirlenebilmesi için klinik takibi olan olgu sayılarının artması ile bu çalışmaya devam edilmesi önerilebilir.

Bu nedenle GİST'lerde moleküler özelliklerin tanımlanması ve tümör davranışı ile ilişkilendirilerek tanı ve sağaltımı daha iyi yönetecek biyobelirteçler bulunması önem

taşımaktadır. Tümör davranışlarıyla ilişkili moleküler düzeyde yapılan çalışmalar beraberinde yeni sağaltım hedefleri açısından da kazanımlar sağlayacaktır. Bu bağlamda populasyon temelli moleküler düzeyde tasarlanmış translasyonel çalışmaların yapılmasını öneriyoruz.

7.KAYNAKLAR

1. Laurini JA, Carter JE. Gastrointestinal stromal tumors a review of the literature. Arch Pathol Lab Med 2010;134: 134-141.
2. Connolly EM, Gaffney E, Reynolds JV. Gastrointestinal stromal tumors. British Journal of Surgery 2003;90: 1178-1186.
3. Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumors: an update. Histopathology 2006; 48(1): 83–96.
4. Kitamura Y. Gastrointestinal stromal tumors: past, present, and future. J Gastroenterol 2008;43: 499–508.
5. Mazur M, Clark HB. Gastric stromal tumors. A reappraisal. Am J Surg Pathol 1993;7: 507-510.
6. Fletcher CDM, Berman JJ, Corless C, Gorstein F ve ark. Diagnosis of Gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. Human Pathology 2002;33(5): 459-465.
7. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, , Hashimoto K ve ark. Gain of function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. Science 1998;279: 577-580.
8. Tran T, Davila JA, El-Serag HB. The epidemiology of malignant gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 1,458 cases from 1992 to 2000. Am J Gastroenterol 2005;100(1): 162-168.
9. Tryggvason G, Gislason HG, Magnusson MK. Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990–2003: the Icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study. International Journal of Cancer 2005;117: 289–293.
10. Goettsch WG, Bos SD, Breekveldt-Postma N, Casparie M ve ark. Incidence of gastrointestinal stromal tumours is underestimated: results of a nation-wide study. Eur J Cancer 2005;41: 2868–2872.
11. Tzen CY, Wang JH, Huang YJ, Wang MN ve ark. Incidence of gastrointestinal stromal tumor: a retrospective study based on immunohistochemical and mutational analyses. Dig Dis Sci 2007;52(3): 792-797.
12. Mucciariini C, Rossi G, Bertolini F, Valli R ve ark. Incidence and clinicopathologic features of gastrointestinal stromal tumors. A population-based study. BMC Cancer 2007;7: 230.

13. Nilsson B, Bumming P, Meis-Kindblom JM, Oden A ve ark. Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era – a population-based study in western Sweden. *Cancer* 2005;103: 821–829.
14. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001;438: 1–12.
15. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH, Lasota J. Esophageal stromal tumors: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 17 cases and comparison with esophageal leiomyomas and leiomyosarcomas. *Am J Surg Pathol* 2000;24(2): 211-222.
16. Miettinen M, Monihan JM, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ ve ark. Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors/GISTs in the omentum and mesentery clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *Am J Surg Pathol* 1999;22: 1109–1118.
17. Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005;29: 52–68.
18. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcomas in the colon: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases. *Am J Surg Pathol* 2000;24(10): 1339-1352.
19. Kasapoğlu B, Türkay C. Gastrointestinal Stromal Tümörler. *Güncel Gastroenteroloji*. 2008;12/2: 106-110.
20. Hirota S, Nishida T, Isozaki K, Taniguchi M ve ark. Familial gastrointestinal stromal tumors associated with dysphagia and novel type germline mutation of KIT gene. *Gastroenterology* 2002;122: 1493-1499.
21. Maeyama H, Hidaka E, Ota H, Minami S ve ark. Familial gastrointestinal stromal tumor with hyperpigmentation: association with a germline mutation of the c-kit gene. *Gastroenterology* 2001;120: 210-215.
22. Hirota S, Okazaki T, Kitamura Y, O'Brien P ve ark. Cause of familial and multiple gastrointestinal autonomic nerve tumors with hyperplasia of interstitial cells of Cajal is germline mutation of the c-kit gene. *Am J Surg Pathol* 2000;24: 326-327.

23. Isozaki K, Terris B, Belghiti J, Schiffman S ve ark. Germline-activating mutation in the kinase domain of KIT gene in familial gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000;157: 1581-1585.
24. Carney CA. The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, pulmonary chondroma and functioning extra-adrenal paraganglioma: a five year review. *Medicine* 1983;62: 159-169
25. Zhang L, Smyrk TC, Young WF Jr, Stratakis CA ve ark. Gastric stromal tumors in Carney triad are different clinically, pathologically, and behaviorally from sporadic gastric gastrointestinal stromal tumors: findings in 104 cases. *Am J Surg Pathol* 2010;34(1): 53-64.
26. Sturgeon C, Chejfec G, Espat N. Gastrointestinal stromal tumors: a spectrum of diseases. *Surg Oncol* 2003;12: 21-26.
27. Chak A, Canto MI, Rosch T, Dittler HJ ve ark. Endosonographic differentiation of benign and malignant stromal cell tumors. *Gastrointestinal Endoscopy* 1997;45(6): 468–473.
28. Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT). Gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 1998;153: 1259–1269.
29. Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Modern Pathology* 1998;11(8): 728–734.
30. Miettinen M, Virolainen M, Maarit-Sarlomo-Rikala. Gastrointestinal stromal tumors--value of CD34 antigen in their identification and separation from true leiomyomas and schwannomas. *Am J Surg Pathol*. 1995;19(2): 207-216.
31. Greenson JK. Gastrointestinal stromal tumors and other mesenchymal lesions of the gut. *Mod Pathol*. 2003;16(4): 366-375.
32. Silva MV, Reid R. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): c-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and targeted cancer therapy with imatinib. *Pathol Oncol Res* 2003;9: 13-19.
33. Wasag B, Debiec-Rychter M, Pauwels P, Stul M ve ark. Differential expression of KIT/PDGFRα mutant isoforms in epithelioid and mixed variants of gastrointestinal stromal tumors depends predominantly on the tumor site. *Modern Pathology* 2004;17: 889–894.
34. Weiss SW, Goldblum JR. Extragastrointestinal stromal tumors, in Weiss SW, Goldblum JR (eds): *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*, 4th ed. St. Louis, MO, Mosby, 2001, 749-768

35. Reith JD, Goldblum JR, Lytes RH, Weiss SW. Extragastrointestinal (soft tissue) stromal tumors: An analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. *Mod Pathol* 2000;13: 577-585.
36. Miettinen M, Furlong M, Sarlomo-Rikala M, Burke A ve ark. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas and leiomyosarcomas in the rectum and anus: A clinicopathologic, immunohistochemical and molecular genetic study of 144 cases. *Am J Surg Pathol* 2001;25: 1121-1133.
37. Ortiz-Hidalgo C, de Leon Bojorge B, Albores-Saavedra J. Stromal tumor of the gallbladder with phenotype of interstitial cells of Cajal. A previously unrecognized neoplasm. *Am J Surg Pathol* 2000;24: 1420-1423.
38. Lasota J, Carlson JA, Miettinen M. Spindle cell tumor of urinary bladder serosa with phenotypic and genotypic features of gastrointestinal stromal tumor. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124: 894-897.
39. Hu X, Forster J, Damjanov I. Primary Malignant Gastrointestinal Stromal Tumor of the Liver. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127: 1606-1608.
40. Goldblum JR, Appelman HD. Stromal tumors of the duodenum: A histologic and immunohistochemical study of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 1995;19: 71-80.
41. Tworek JA, Appelman HD, Singleton TP, Greenson JK. Stromal tumors of the jejunum and ileum. *Mod Pathol* 1997;10: 200-209.
42. Tworek JA, Goldblum JR, Weiss SW, Greenson JK ve ark. Stromal tumors of the abdominal colon: A clinicopathologic study of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 1999;23: 937-945.
43. Tworek JA, Goldblum JR, Weiss SW, Greenson JK ve ark. Stromal tumors of the anorectum: A clinicopathologic study of 22 cases. *Am J Surg Pathol* 1999;23: 946-954.
44. Ueyama T, Guo KJ, Hashimoto H, Diamaru Y ve ark. A clinicopathologic and immunohistochemical study of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* 1992;69: 947-955.
45. Emory TS, Sobin LH, Lukes L, Lee DH ve ark. Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors: dependence on anatomic site. *Am J Surg Pathol* 1999;23: 82-87.
46. Brainard JA, Goldblum JR. Stromal tumors of jejunum and ileum: A clinicopathologic study of 39 cases. *Am J Surg Pathol* 1997;21: 407-416.
47. Shiu MH, Farr GH, Papachristou DN, Hajdu SI. Myosarcomas of the stomach: Natural history, prognostic factors and management. *Cancer* 1982;49: 177-187.
48. Sass DA, Chopra KB, Finkelstein SD, Schauer PR. Jejunal Gastrointestinal Stromal

Tumor. Arch Pathol Lab Med 2004;128: 214-217.

49. Lee C, Jan Y, Chen J, Ho WL ve ark. Colorectal mesenchymal tumor: A clinicopathologic study of 25 Cases. J Chin Med Assoc 2005;68: 291-298.

50- Miettinen M, Kopczynski J, Makhoul HL, Sarlomo-Rikala M ve ark. Gastrointestinal stromal tumors, Intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the duodenum. Am J Surg Pathol 2003; 27(5): 625-641.

51. Rosai J. Ackerman's surgical pathology. Eighth edition. St Louis, Mosby, 1996; 589-816.

52- Eroschenko VP. Atlas of histology. Philadelphia. Williams & Wilkins. Eighth edition. 1996; 171-192.

53. <http://www.gistsupport.org/about-gist/what-is-gist.php> (Erişim tarihi: 09.04.2011)

54. Mostafa RM, Moustafa YM, Hamdy H. Interstitial cells of Cajal, the maestro in health and disease. World J Gastroenterol 2010;16(26): 3239-3248.

55. Coffey RJ, Washington MK, Corless CL, Heinrich MC. Ménétrier disease and gastrointestinal stromal tumors: hyperproliferative disorders of the stomach. J. Clin. Invest 2007;117: 70–80.

56. Wang L, Vargas H, French S. Cellular origin of gastrointestinal stromal tumors . Arch Pathol Lab Med 2000;124: 1471-1475.

57. Park S, Kim M, Kim H, Song BJ ve ark. Ultrastructural studies of gastrointestinal stromal tumors. J Korean Med Sci 2004;19: 234-244.

58. Thuneberg L. Intertitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells. Adv Anat Embry Cell Biol 1982;71: 1-130.

59. Lecoin L, Gabella G, Le Douarin N. Origin of the c-Kit positive interstitial cells in the avian bowel. Development 1996;122: 725–733.

60. Young HM, Ciampoli D, Southwell BR, Newgreen DF. Origin of interstitial cells of Cajal in the mouse intestine. Develop Biol 1996;180: 97–107.

61-. Young HM. Embryological origin of interstitial cells of Cajal. Microsc Res Tech 1999; 47: 303-308.

62. Wu JJ, Rothman TP, Gershon MD. Development of the interstitial cell of cajal: Origin, Kit dependence and neuronal and nonneuronal sources of kit ligand. J Neurosc Research 2000;59: 384-401.

63. Rolle U, Yoneda A, Solari V, Nemeth L ve ark. Abnormalities of c-kit-positive cellular network in isolated hypoganglionosis, J of Pediatr. Surg 2002;37(5): 709-714.

64. Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1996;111: 492-515.
65. Faussone-Pellegrini MS, Thuneberg L. Guide to the identification of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* 1999;47: 248-266.
66. Park S, Kim M, Kim H, Song BJ ve ark. Ultrastructural studies of gastrointestinal stromal tumors. *J Korean Med Sci* 2004;19: 234-244.
67. Sircar K, Hewlett BR, Huizinga JD, Chorneyko K ve ark. Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 1999;23: 377-389.
68. Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J. Clin. Oncol* 2004;22: 3813–3825.
69. Antonescu CR, Viale A, Sarraf L, Tschernyavsky SJ ve ark. Gene expression in gastrointestinal stromal tumors is distinguished by KIT genotype and anatomic site. *Clin. Cancer Res* 2004;10: 3282–3290.
70. Subramanian S, West RB, Corless CL, Ou W ve ark. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with KIT and PDGFRA mutations have distinct gene expression profiles. *Oncogene* 2004;23: 7780–7790.
71. Rubin BP, Antonescu CR, Scott-Browne JP, Comstock ML ve ark. A knock-in mouse model of gastrointestinal stromal tumor harboring kit K641E. *Cancer Res* 2005;65: 6631–6639.
72. Sommer G, Agosti V, Ehlers I, Rossi F ve ark. Gastrointestinal stromal tumors in a mouse model by targeted mutation of the Kit receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100: 6706–6711.
73. Nishida T, Hirota S. Biological and clinical review of stromal tumors in the gastrointestinal tract. *Histol Histopathol* 2000;15: 1293–1301.
74. Rubin BP, Fletcher JA. Molecular insights into the histogenesis and pathogenesis of gastrointestinal tumors. *Int J Surg Pathol* 2000;8: 5–10.
75. Arber DA, Tamayo R, Weiss LM. Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Hum Pathol* 1998;29: 498-504.
76. Medeiros F, Corless CL, Duensing A, Hornick JL ve ark. KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 2004;28: 889-894.

77. Liegl-Atzwanger B, Fletcher JA, Fletcher CD. Gastrointestinal stromal tumors. *Virchows Arch.* 2010;456(2): 111-127.
78. Miettinen M, Sobin LH, Sarlomo-Rikala M. Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). *Mod Pathol* 2000;13: 1134-1142.
79. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors review on morphology, molecular pathology, prognosis and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130: 1466–1478.
80. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Lasota J. Calponin and h-caldesmon in soft tissue tumors: Consistent h-caldesmon immunoreactivity in gastrointestinal stromal tumors indicates traits of smooth muscle differentiation. *Mod Pathol* 1999;12: 756–762.
81. Neves LRO, Oshima CTF, Artigiani-Neto R, Yanaguibashi G ve ark. Ki67 ve p53 in gastrointestinal stromal tumors-GIST. *Arq Gastroenterol* 2009;46(2): 116- 120.
82. Meara RS, Cangiarella J, Simsir A, Horton D, Eltoum I, Chhieng DC. Prediction of aggressiveness of gastrointestinal stromal tumours based on immunostaining with bcl-2, Ki-67 and p53. *Cytopathology* 2007;18: 283–289.
83. Silva MVC, Reid R. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): C-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and targeted cancer therapy with imatinib. *Pathology Oncology Research* 2003;9(1): 13–19.
84. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Hum Pathol* 1999;30: 1213-1220.
85. Ogrono R, Jones DV, Faruqi S, Bhutani MS. Recent advances in cell biology diagnosis and therapy of gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Cancer Biology and Therapy* 2004;3(3): 251-258.
86. DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: Recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* 2000;231:51-58.
87. Graadt van Roggen JF, van Velthuisen MLF, Hogendoorn PCW. The histopathological differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol* 2001;54: 96–102.
88. Miettinen M, El-Rifai W, Sobin LH, Lasota J. Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review. *Hum Pathol* 2002;33: 478-483.
89. Fujimoto Y, Nakanishi Y, Yoshimura K, Shimoda T. Clinicopathologic study of primary malignant gastrointestinal stromal tumor of the stomach, with special reference to prognostic factors: analysis of results in 140 surgically resected patients. *Gastric Cancer* 2003;6: 39-48.

90. Hasegawa T, Matsuno Y, Shimoda T, Hirohashi S. Gastrointestinal stromal tumor: consistent CD117 immunostaining for diagnosis, and prognostic classification based on tumor size and MIB-1 grade. *Hum Pathol* 2002;33: 669-676.
91. Nakamura N, Yamamoto H, Yao T, Oda Y ve ark. Prognostic significance of expressions of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and the relevance of the risk grade. *Hum Pathol* 2005;36: 828-837.
92. Franquemont DW. Differentiation and risk assessment of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Pathol* 1995;103: 41-47.
93. Suster S. Gastrointestinal stromal tumors. *Semin Diagn Pathol* 1996;13: 297-313.
94. Ng EH, Pollock RE, Munsell MF, Atkinson EN ve ark. Prognostic factors influencing survival in gastrointestinal leiomyosarcomas: implications for surgical management and staging. *Ann Surg* 1992;215: 68-77.
95. Al-Bozom IA. p53 expression in gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int* 2001;51: 519-523.
96. Takahashi R, Tanaka S, Kitadai Y, Sumii M ve ark. Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncology* 2003;64: 266-274.
97. Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Miettinen M ve ark. High prognostic value of p16INK4 alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2003;21: 1688-1697.
98. Trent JC II, McConkey DJ, Loughlin SM, Harbison MT ve ark. Ras signaling in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *EMBO J.* 1996;15: 4497-4505.
99. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211-225.
100. Majumder S, Brown K, Qiu FH, Besmer P ve ark. c-kit protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization. *Mol Cell Biol* 1988;8: 4896-4903.
101. Taylor ML, Metcalfe DD. Kit signal transduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000;14: 517-535.
102. Blume-Jensen P, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Zsebo KM ve ark. Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *Embo J* 1991;10: 4121-4128.
103. Isozaki K, Hirota S, Nakama A, Miyagawa J ve ark. Disturbed intestinal movement, bile reflux to the stomach, and deficiency of c-kit-expressing cells in Ws/Ws mutant rats. *Gastroenterology* 1995;109: 456-464.

104. <http://www.gistsupport.org/about-gist/mutation-analysis-kit-and-pdgfra.php> (Erişim tarihi 09.04.2011)
105. Anderson DM, Williams DE, Tushinski R, Gimpel S ve ark. Alternate splicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22–q24. *Cell Growth Differ* 1991;2: 373–378.
106. Roskoski R Jr. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase—The stem cell factor receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;337: 1–13.
107. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1999;31: 1037-1051.
108. Safdar A, Sher A. Role of c-kit/SCF in cause and treatment of gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Gene* 2007;401: 38–45.
109. D’Amato G, Steinert DM, McAuliffe JC, Trent JC. Update on the Biology and Therapy of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer Control* 2005;12(1): 44-56.
110. Tornillo L, Terracciano LM. An update on molecular genetics of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol* 2006;59: 557–563.
111. Timokhina I, Kissel H, Stella G, Besmer P. 1998. Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *EMBO J* 1998;17:6250–6262.
112. Lennartsson J, Blume-Jensen P, Hermanson M, Ponten E ve ark. Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/ MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncogene* 1999;18: 5546–5553.
113. Linnekin D, Weiler SR, Mou S, DeBerry CS ve ark. JAK2 is constitutively associated with c-Kit and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Acta Haematol* 1996;95: 221–228.
114. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L ve ark. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003;299: 708–710.
115. Hirota S, Ohashi A, Nishida T, Isozaki K ve ark. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 2003;125: 660–667.
116. Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M. Mutations in exon 11 of c-Kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am J Pathol* 1999;154: 53–60.

117. Lasota J, Wozniak A, Sarlomo-Rikala M, Rys J ve ark. Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases. *Am J Pathol* 2000;157: 1091–1095.
118. Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A ve ark. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001;61: 8118–8121.
119. Miettinen M, Makhlof H, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2006;30: 477–489.
120. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD ve ark. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003;21: 4342–4349.
121. Steigen SE, Eide TJ. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a review. *APMIS*. 2009;117: 73–86.
122. Perrone F, Tamborini E, Dagrada GP, Colombo F ve ark. 9p21 locus analysis in high-risk gastrointestinal stromal tumors characterized for c-kit and platelet-derived growth factor receptor alpha gene alterations. *Cancer* 2005;104: 159–169.
123. Lasota J, Corless CL, Heinrich MC, Debiec-Rychter M ve ark. Clinicopathologic profile of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with primary KIT exon 13 or exon 17 mutations: a multicenter study on 54 cases. *Mod Pathol* 2008;21: 476–484.
124. Roskoski R. Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase – the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338: 1307– 1315.
125. Kitayama H, Kanakura Y, Furitsu T, Tsujimura T ve ark. Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood* 1995;85: 790-798.
126. Ma Y, Cunningham ME, Wang X, Ghosh I ve ark. Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. *J Biol Chem* 1999;274: 13399-13402.
127. Chan PM, Ilangumaran S, La Rose J, Chakrabartty A ve ark. Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. *Mol Cell Biol* 2003;23: 3067-3078.
128. Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, Isozaki K ve ark. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 1999;59: 4297–4300.

129. Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, Miettinen M ve ark. A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab Invest* 2004;84: 874–883.
130. Ernst SI, Hubbs AE, Przygodzki RM, Emory TS ve ark. KIT mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Lab Invest* 1998;78: 1633–1636.
131. Li SQ, O’Leary TJ, Sobin LH, Erozan YS ve ark. Analysis of KIT mutation and protein expression in fine needle aspirates of gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Acta Cytol* 2000;44: 981–986.
132. Sakurai S, Fukasawa T, Chong JM, Tanaka A ve ark. C-kit gene abnormalities in gastrointestinal stromal tumors (tumors of interstitial cells of Cajal). *Jpn. J. Cancer Res* 1999;90: 1321–1328.
133. Wardelmann E, Neidt I, Bierhoff E, Speidel N ve ark. c-kit mutations in gastrointestinal stromal tumors occur preferentially in the spindle rather than in the epithelioid cell variant. *Mod. Pathol* 2002;15: 125–136.
134. Antonescu CR, Sommer G, Sarraf L, Tschernyavsky SJ ve ark. Association of KIT exon 9 mutation with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Cancer Res* 2003;9: 3329–3337.
135. Corless CL, McGreevey L, Town A, Schroeder A ve ark. KIT gene deletion at the intron 10-exon 11 boundary in GI stromal tumors. *J Mol Diag* 2004;6: 366–370.
136. Chen LL, Sabripour M, Wu EF, Prieto VG ve ark. A mutation-created novel intra-exonic pre-mRNA splice site causes constitutive activation of KIT in human gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 2005;24: 4271–4280.
137. Nakagomi N, Hirota S. Juxtamembrane-type c-kit gene mutation found in aggressive systemic mastocytosis induces imatinib-resistant constitutive KIT activation. *Lab Invest* 2007;87: 365–371.
138. Lasota J, Miettinen M. Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2008;53: 245–266.
139. Tuveson DA, Willis NA, Jacks T, Griffin JD ve ark. STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene* 2001;20: 5054–5058.

140. Corless CL. Assessing the prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a growing role for molecular testing. *Am J Clin Pathol* 2004;122: 11–13.
141. Tornillo L, Duchini G, Carafa V, Lugli A ve ark. Patterns of gene amplification in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Lab Invest* 2005;85: 921–931.
142. Wardelmann E, Losen I, Hans V, Neidt I ve ark. Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 2003;106: 887–895.
143. Martin J, Poveda A, Llombart-Bosch A, Ramos R ve ark. Deletions affecting codons 557– 558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J Clin Oncol* 2005;23: 6190–6198.
144. Hirota S, Nishida T, Isozaki K, Taniguchi M ve ark. Gainof- function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. *J Pathol* 2001;193: 505-510.
145. Sakurai S, Oguni S, Hironaka M, Fukayama M ve ark. Mutations in c-kit gene exons 9 and 13 in gastrointestinal stromal tumors among Japanese. *Jpn J Cancer Res* 2001;92: 494-498.
146. Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ ve ark. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000;156: 791-795.
147. Kinoshita K, Isozaki K, Hirota S, Nishida T ve ark. C-kit gene mutation at exon 17 or 13 is very rare in sporadic gastrointestinal stromal tumors. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18: 147-151.
148. He HY, Xiang YN, Li Y, Zhong HH ve ark. c-kit and PDGFRS mutations in 60 cases of gastrointestinal tumors (GISTs). *Beijing Da Xue Xue Bao* 2005;37: 320–324.
149. Cho S, Kitadai Y, Yoshida S, Tanaka S ve ark. Deletion of the KIT gene is associated with liver metastasis and poor prognosis in patients with gastrointestinal stromal tumor in the stomach. *Int J Oncol* 2006;28: 1361–1367.
150. Cho S, Kitadai Y, Yoshida S, Tanaka S ve ark. Genetic and pathologic characteristics of gastrointestinal stromal tumors in extragastric lesions. *Int. J Mol Med* 2006;18: 1067–1071.
151. Kinoshita K, Hirota S, Isozaki K, Nishitani A ve ark. Characterization of tyrosine kinase I domain c-kit gene mutation Asn655Lys newly found in primary jejunal gastrointestinal stromal tumor. *Am J Gastroenterol* 2007;102: 1134–1136.

152. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* 2006;23: 70–83.
153. Corless CL, McGreevey L, Haley A, Town A ve ark. KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *Am J Pathol* 2002; 160: 1567– 1572.
154. Lasota J, Miettinen M. KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Semin Diagn Pathol* 2006;23: 91–102.
155. Lasota J, Stachura J, Miettinen M. GISTs with PDGFRA exon 14 mutations represent subset of clinically favorable gastric tumors with epithelioid morphology. *Lab Invest* 2006; 86: 94–100.
156. Lasota J, Kopczynski J, Sarlomo-Rikala M, Schneider-Stock R ve ark. KIT 1530ins6 mutation defines a subset of predominantly malignant gastrointestinal stromal tumors of intestinal origin. *Hum Pathol* 2003;34: 1306–1312.
157. Subramanian S, West R, Corless CL, Ou W ve ark. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) wit KIT and PDGFRA mutations have distinct gene expression profiles. *Oncogene* 2004;23: 7780–7790.
158. Andersson J, Bumming P, Meis-Kindblom JM, Sihto H ve ark. Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 11 deletions are associated with poor prognosis. *Gastroenterology* 2006;130: 1573–1581.
159. Singer S, Rubin BP, Lux ML, Chen CJ ve ark. Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2002;20: 3898-3905.
160. Moskaluk CA, Tian Q, Marshall CR, Rumpel CA ve ark. Mutations of c-kit JM domain are found in a minority of human gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 1999;18: 1897-1902.
161. DeMatteo RP, Gold JS, Saran L, Gonen M ve ark. Tumor mitotic rate, size, and location independently predict recurrence after resection of primary gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Cancer* 2008;112: 608–615.
162. Emile JF, Tabone-Eglinger S, The'ou-Anton N, Lemoine A. Prognostic value of KIT exon 11 deletions in GISTs. *Gastroenterology* 2006;131: 976–977.

163. Emile JF, The'ou N, Tabone S, Cortez A ve ark. Clinicopathologic, phenotypic, and genotypic characteristics of gastrointestinal mesenchymal tumors. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2: 597–605.
164. Bachet JB, Hostein I, Le Cesne A, Brahimi S ve ark. Prognosis and predictive value of KIT exon 11 deletion in GISTs. *British Journal of Cancer* 2009;101: 7– 11
165. Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A ve ark. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol* 2005;23: 5357–5364.
166. Penzel R, Aulmann S, Moock M, Schwarzbach M ve ark. The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. *J Clin Pathol* 2005;58:634–639.
167. Steigen SE, Eide TJ, Wasag B, Lasota J ve ark. Mutations in gastrointestinal stromal tumors– a population-based study from Northern Norway. *APMIS* 2007;115: 289–298.
168. Debiec-Rychter M, Wasag B, Stul M, De WI ve ark. Gastrointestinal stromal tumours (GISTs) negative for KIT (CD117 antigen) immunoreactivity. *J Pathol* 2004;202: 430–438.
169. Blackstein M, Rankin C, Fletcher C. Clinical benefit of imatinib in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors negative for the expression of CD117 in the S0033 trial. *J Clin Oncol* 2005;23(16S): 9010.
170. Dematteo RP, Heinrich MC, El-Rifai WM, Demetri G. Clinical management of gastrointestinal stromal tumors: Before and after STI-571. *Hum Pathol* 2002;33: 466–477.
171. Ömer Dizdar, Nilüfer Güler. Gastrointestinal stromal tümörler ve imatinib tedavisi. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004;35: 87-91.
172. Schoffski P, Reichardt P, Blay JY, Dumez H ve ark. A phase I–II study of everolimus (RAD001) in combination with imatinib in patients with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Ann Oncol*. 2010;21(10): 1990-1998.
173. Duensing S, Duensing A. Targeted therapies of gastrointestinal stromal tumors (GIST)—The next frontiers. *Biochem Pharmacol* 2010;80(5): 575-583.
174. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH ve ark. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal Of Cancer* 2009;45: 228-247.

175. Debiec-Rychter M, Sciot R, Le Cesne A, Schlemmer M ve ark. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors. *Eur J Cancer* 2006;42: 1093–1103.
176. Debiec-Rychter M, Dumez H, Wasag B ve ark. Use of c-KIT/PDGFR α mutational analysis to predict the clinical response to Imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Surg Oncol* 2004;30: 1098–103.
177. Tamborini E, Bonadiman L, Greco A, Albertini V ve ark. A new mutation in KIT ATP pocket causes acquired resistance to Imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient. *Gastroenterology* 2004;127: 294–299.
178. Chen LL, Trent JC, Wu EF, Fuller GN ve ark. A missense mutation in KIT domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2004;64: 5913–5919.
179. Debiec-Rychter M, Cools J, Dumez H, Sciot R ve ark. Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants. *Gastroenterology* 2005;128: 270–279.
180. McLean SR, Gana-Weisz M, Hartzoulakis B, Frow R ve ark. Imatinib binding and cKIT inhibition is abrogated by the cKIT kinase domain I missense mutation Val654Ala. *Mol. Cancer Ther* 2005;4: 2008–2015.
181. Heinrich MC, Corless CL, Blanke CD, demetri GD ve ark. Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2006;24: 4764–4774.
182. Demetri GD, Oosterom ATvan, Garrett CR, Blackstein ME ve ark. Efficacy and safety of Sunitinib in patients with advanced gastrointestinal tumor after failure of Imatinib: a randomized controlled trial. *Lancet* 2006;368: 1329–1338.
183. Türk Patoloji Derneği GİST Çalışma Grubu. GİST Tanı Kitapçığı. Birinci basım. 2004; 13- 19.
184. Turner MS, Goldsmith JD. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: spindle cell neoplasms of the gastrointestinal tract. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(9):1370-4.
185. Liegl-Atzwanger B, Fletcher JA, Fletcher CD. Gastrointestinal stromal tumors. *Virchows Arch* 2010; 456(2): 111-127.

186. Miettinen M, Sobin LH, Sarlomo-Rikala M. Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). *Mod Pathol* 2000; 13(10): 1134-1142.
187. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH ve ark. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer* 2009; 45: 228-247.
188. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA and protein extraction: The past and the present. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009: 574398.
189. Burrell MM. *Enzymes of molecular biology*. Volume 16. Totowa, NJ, USA, The Humana Press, 1993; 306-309.
190. <http://www.qiagen.com/products/qiaampdnaffpetissuekit.aspx#Tabs=t2> (İndirilme tarihi:20.11.2010)
191. Sambrook J, Fritsch, EF, Manniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Third Edition, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; 8.19- 8.24.
192. Steffan RJ, Goksoyr J, Bej AK, Atlas RM. Recovery of DNA from Soils and Sediments. *Appl Environ Microbiol* 1988;54(12): 2908-2915.
193. http://www.mc.vanderbilt.edu/root/pdfs/mclaughlin_lab/dna_and_rna_with_a_spectrophotometer.pdf (Erişim tarihi: 10.04.2011)
194. Viljoen GJ, Nel LH, Crowther JR. *Molecular diagnostic pcr handbook*. Netherlands, Springer, 2005; 4-10.
195. <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/4728866a.pdf> (Erişim tarihi: 07.04.2011).
196. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463–5467.
197. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P ve ark. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 1986; 321 (6071): 674–679.
198. Smith LM, Fung S, Hunkapiller MW, Hunkapiller TJ ve ark. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 1985;13(7): 2399–2412.

199. <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/Capillary.html> (Erişim tarihi: 10.04.2011).
200. <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/sanger03.jpg> (Erişim tarihi: 10.04.2011).
201. <http://www.westgard.com/qc-applications-4.htm> (Erişim tarihi: 23.03.2011)
202. Gazanfer Aksakoęlu. Sağlıkta Araştırma ve özümleme. İkinci basım. İzmir, D.E.Ü. Rektörlük Basımevi, 2006; 99.
203. http://en.wikipedia.org/wiki/Sensitivity_and_specificity (Erişim tarihi: 31.05.2011)
204. Rauf F, Bhurgri Y, Pervez S. Gastrointestinal stromal tumors: a demographic, morphologic and immunohistochemical study. Indian J Gastroenterol 2007; 26(5): 214- 216.
205. Ichiyanagui Rodriguez C, Frisancho O, Yabar A. Clinical, endoscopic and histologic profile of the gastrointestinal stromal tumours in the Rebagliati Hospital. Rev Gastroenterol Peru 2010;30(3): 201- 210.
206. Nilsson B, Bumming P, Meis-Kindblom JM, Ode'n A ve ark. Gastrointestinal stromal tumors: The incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era. A population-based study in Western Sweden. Cancer 2005;103: 821- 829
207. <http://emedicine.medscape.com/article/179669-overview#a0199> (Erişim tarihi: 15.06.2011)
208. Doęanavsargil B, Akalın T, Sezak M, Kandiloęlu G, ve ark. Gastrointestinal stromal tümörlerde histopatolojik değerlendirme “Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi Patoloji Anabilim Dalı’nın 1992-2007 yılları arasındaki deneyimi”. Ege Journal of Medicine 2008;47(3): 163- 170.
209. Büyükaşık O, Hasdemir AO, Dirican A, öl C. Gastrointestinal stromal tümörler. İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi Dergisi 2009;16 (4): 227-232.
210. Kang YN, Jung HR, Hwang I. Clinicopathological and immunohistochemical features of gastrointestinal stromal tumors. Cancer Res Treat 2010;42(3): 135-143.
211. Nikfarjam M, Kimchi E, Shereef S, Gusani NJ ve ark. Surgical outcomes of patients with gastrointestinal stromal tumors in the era of targeted drug therapy. J Gastrointest Surg 2008;12: 2023-2031.
212. Keun PC, Lee EJ, Kim M, Lim HY ve ark. Prognostic stratification of high-risk gastrointestinal stromal tumors in the era of targeted therapy. Ann Surg 2008;247: 1011-1018.

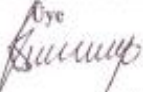
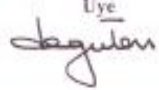
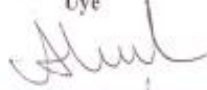
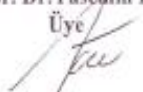
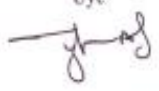
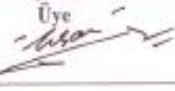
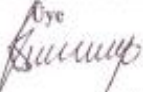
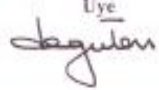
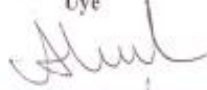
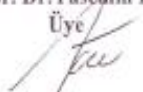
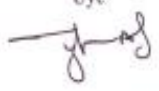
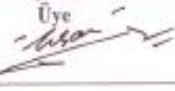
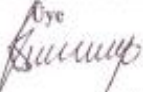
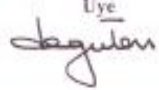
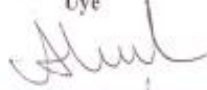
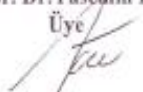
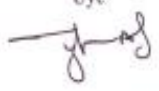
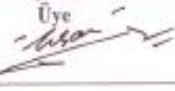
213. Medina-Franco H, Aguilar-Jimenez JR, Medina-Cuairan JZ. Prognostic factors in gastrointestinal stromal tumors among a group of Mexican patients. *Gac Med Mex* 2009; 145(2): 91-96.
214. Ji F, Wang ZW, Wang LJ, Ning JW ve ark. Clinicopathological characteristics of gastrointestinal mesenchymal tumors and diagnostic value of endoscopic ultrasonography. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2008;23: e318–e324.
215. Appelman HD, Helwig EB. Gastric epithelioid leiomyoma and leiomyosarcoma (leiomyoblastoma). *Cancer* 1976;38: 708-728.
216. Evans HL. Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract: A study of 56 cases followed for a minimum of 10 years. *Cancer* 1985;56: 2242-2250.
217. Chakrapan E. Outcomes and prognostic factors of primary gastric GIST following complete surgical resection: A single surgeon experience. *J Med Assoc Thai* 2011;94(1): 55-64.
218. Zalberg JR, Verweij J, Casali PG, Le Cesne A ve ark. Outcome of patients with advanced gastrointestinal stromal tumours crossing over to a daily imatinib dose of 800 mg after progression on 400 mg. *Eur J Cancer* 2005;41:1751–1757.
219. Joensuu H. Sunitinib for imatinib-resistant GIST. *Lancet* 2006;368: 1303–1304.
220. Battocchio A, Mohammed S, Winthrop D, Lefresne L ve ark. Detection of c-KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumors: Comparison of DHPLC and DNA sequencing methods using a single population-based cohort. *American Journal of Clinical Pathology* 2010;133(1): 149.
221. Braconi C, Bracci R, Bearzi I, Bianchi F ve ark. KIT and PDGFRa mutations in 104 patients with gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a population-based study. *Annals of Oncology* 2008;19: 706–710.
222. Gomes AL, Gouveia A, Capelinha AF, De la Cruz D ve ark. Molecular alterations of KIT and PDGFRA in GISTs: evaluation of a Portuguese series. *J Clin Pathol* 2008;61: 203-208.
223. Won Kim T, Hyoungnam Lee H, Kang YK, Choe MS ve ark. Prognostic Significance of c-kit Mutation in Localized Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:3076-3081.

224. Kontogianni-Katsarou K, Dimitriadis E, Lariou C, Kairi-Vassilatou E ve ark. KIT exon 11 codon 557/558 deletion/insertion mutations define a subset of gastrointestinal stromal tumors with malignant potential. *World J Gastroenterol* 2008;14(12): 1891-1897.
225. Li SQ, O’Leary TJ, Sobin LH, Erozan YS ve ark. Analysis of KIT mutation and protein expression in fine needle aspirates of gastrointestinal stromal/ smooth muscle tumors. *Acta Cytol* 2000;44: 981-986.
226. Andersson J, Sjogren H, Meis-Kindblom JM, Stenman G ve ark. The complexity of KIT gene mutations and chromosome rearrangements and their clinical correlation in gastrointestinal stromal (pacemaker cell) tumors. *Am J Pathol* 2002;160: 15-22
227. Kozlowski M, Larose L, Lee F, Mingh Le D ve ark. SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain. *Mol Cell Biol* 1998;18(4): 2089–2099.
228. Pera M, Iglesias M, Puig S, Martínez-Avilés L ve ark. A sporadic multiple gastrointestinal stromal tumor with unique clinical and molecular features . *Human Pathology* 2011, article in pres.
229. Du CY, Shi YQ, Zhou Y, Fu H ve ark. The analysis of status and clinical implication of KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumor (GIST). *J Surg Oncol* 2008;98(3): 175-178.
230. Liu XH, Bai CG, Xie Q, Feng F ve ark. Prognostic value of KIT mutation in gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2005;11(25): 3948-3952.
231. Martin J, Poveda J, Llombart-Bosch A, Ramos R ve ark. Deletions affecting codons 557-558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J Clin Oncol* 2005;23: 6190– 6198.
232. Wardelmann E, Hrychyk A, Markelbach-Bruse S, Pauls K ve ark. Association of platelet-derived growth factor receptor a mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *J Mol Diagn* 2004;6: 197–204.
233. Kang HJ, Nam SW, Kim H, Rhee H ve ark. Correlation of KIT and plateletderived growth factor receptor a mutations with gene activation and expression profiles in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 2005;24: 1066–1074.
234. Choi YR, Kim H, Kang HJ, Kim NG ve ark. Overexpression of high mobility group box 1 in gastrointestinal stromal tumors with KIT mutation. *Cancer Res* 2003;63: 2188–2193.

235. Feng F, Liu XH, Xie Q, Liu WG ve ark. Expression and mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol*. 2003;9: 2548–2551.
236. Hou YY, Tan YS, Sun MH, Wei YK ve ark. C-kit gene mutation in gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2004;10: 1310–1314.
237. Cao H, Zhang Y, Wang M, Shen D ve ark. Prognostic analysis of patients with gastrointestinal stromal tumors: a single unit experience with surgical treatment of primary disease. *Chinese Medical Journal* 2010;123(2): 131-136.
238. Lin SC, Liu CL, Wang TI, Chang W ve ark. Clinical implications of C-kit gene mutation in patients with large gastrointestinal stromal tumors. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2006;21: 1604–1608.

8.EKLER

8.1 ETİK KURUL RAPORU

İZMİR 3 NO'LU KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU																													
Sekreteryâ: Dokuz Eylül Üniversitesi																													
Etik Kurul Üyeleri Doç.Dr.Ayşegül YILDIZ (Başkan) Doç.Dr.Yeşim ÖZTÜRK (Başkan Yardımcısı) Prof.Dr.A.Şebnem ÖZKAN Prof.Dr.Levent ÜSTÜNES Doç.Dr.Mahmut TÖBÜ Doç.Dr.Taner DAĞCI Öğr.Gör.Uzm.Dr.Zübeyde ERBAYRAKTAR Uzm.Dr.Ayşe PARLAR Öğr.Gör.Dr.Yasemin BASKIN Dr.Pembe KESKİNOĞLU Yard.Doç.Sultan ALAN Av.Tayfun OZANKAYA İhsan ÇELİKDEMİR	77/161109 Sayın, Doç.Dr.İlhan ÖZTOP Onkoloji Enstitüsü Müdürlüğü Etik Kurulumuzun 17 Eylül 2009 tarih ve 07/01/2009 no.lu toplantısında; sorumlusu olduğunuz, 207/2009 Protokol numaralı "Gastrointestinal stromal tümörlerde kit mutasyonunun klinik önemi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur. Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz. <table><tbody><tr><td>Doç.Dr.Ayşegül YILDIZ İzmir 3 No'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı</td><td>Doç.Dr. Yeşim ÖZTÜRK Başkan Yardımcısı</td></tr><tr><td></td><td></td></tr><tr><td>Prof.Dr.A.Şebnem ÖZKAN Üye</td><td>Prof.Dr.Levent ÜSTÜNES Üye</td></tr><tr><td></td><td></td></tr><tr><td>Doç.Dr.Mahmut TÖBÜ Üye</td><td>Doç.Dr.Taner DAĞCI Üye</td></tr><tr><td></td><td></td></tr><tr><td>Yard.Doç.Sultan ALAN Üye</td><td>Öğr.Gör.Uzm.Dr.Zübeyde ERBAYRAKTAR Üye</td></tr><tr><td></td><td></td></tr><tr><td>Uzm.Dr.Ayşe PARLAR Üye</td><td>Öğr.Gör. Dr.Yasemin BASKIN Üye</td></tr><tr><td></td><td></td></tr><tr><td>Dr.Pembe KESKİNOĞLU Üye</td><td>Av.Tayfun OZANKAYA Üye</td></tr><tr><td></td><td></td></tr><tr><td>İhsan ÇELİKDEMİR Üye</td><td></td></tr><tr><td></td><td></td></tr></tbody></table>	Doç.Dr.Ayşegül YILDIZ İzmir 3 No'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı	Doç.Dr. Yeşim ÖZTÜRK Başkan Yardımcısı			Prof.Dr.A.Şebnem ÖZKAN Üye	Prof.Dr.Levent ÜSTÜNES Üye			Doç.Dr.Mahmut TÖBÜ Üye	Doç.Dr.Taner DAĞCI Üye			Yard.Doç.Sultan ALAN Üye	Öğr.Gör.Uzm.Dr.Zübeyde ERBAYRAKTAR Üye			Uzm.Dr.Ayşe PARLAR Üye	Öğr.Gör. Dr.Yasemin BASKIN Üye			Dr.Pembe KESKİNOĞLU Üye	Av.Tayfun OZANKAYA Üye			İhsan ÇELİKDEMİR Üye			
Doç.Dr.Ayşegül YILDIZ İzmir 3 No'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı	Doç.Dr. Yeşim ÖZTÜRK Başkan Yardımcısı																												
																													
Prof.Dr.A.Şebnem ÖZKAN Üye	Prof.Dr.Levent ÜSTÜNES Üye																												
																													
Doç.Dr.Mahmut TÖBÜ Üye	Doç.Dr.Taner DAĞCI Üye																												
																													
Yard.Doç.Sultan ALAN Üye	Öğr.Gör.Uzm.Dr.Zübeyde ERBAYRAKTAR Üye																												
																													
Uzm.Dr.Ayşe PARLAR Üye	Öğr.Gör. Dr.Yasemin BASKIN Üye																												
																													
Dr.Pembe KESKİNOĞLU Üye	Av.Tayfun OZANKAYA Üye																												
																													
İhsan ÇELİKDEMİR Üye																													
																													
Etik Kurul Sekreteri Hatice İĞCI																													

Tel: 0232 412 22 54 - 0232 412 22 58

8.2 ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: GİZEM ÇALIBAŞI

Doğum Tarihi: 23.03.1986

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	FEN FAKÜLTESİ, BİYOKİMYA BÖLÜMÜ	EGE ÜNİVERSİTESİ	2008
Y. Lisans	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ ABD	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ	Sürmektedir.

1. Yüksek lisans Tezi Başlığı ve Danışmanı : “Gastrointestinal stromal tümörlerde *KIT* mutasyonlarının klinik önemi” Prof.Dr.İlhan ÖZTOP ve Doç.Dr.Yasemin Baskın

STAJ VE İŞ DENEYİMİ

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Stajyer	Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı bünyesindeki Rutin Biyokimya, Acil Biyokimya, İdrar ve Elektroforez Laboratuvarları	2007
Stajyer	Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı bünyesindeki Bakteriyoloji Laboratuvarı	2007
Volunteer	Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı Farmakogenomik Rutin Laboratuvarı	2009- Sürmekte dir.
Volunteer	Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı Sitotoksikite ve Microarray Laboratuvarı	2009- Sürmekte dir.

PROJELERDE YAPTIĞI GÖREVLER

1. “Gastrointestinal stromal tümörlerde kit mutasyonlarının klinik önemi” Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji Yüksek Lisans Tez Projesi (Danışman Prof.Dr.İlhan Öztıp) (İzmir 3 No’lu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 07.01.2009 nolu toplantı, 207/2009 protokol numaralı proje) (Devam ediyor.)

2. “C-kit Ekson 9 ve 11 Mutasyonlarının Dağılımı” Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri destekli, Araştırma Projesi (Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. İlhan Öztop), (Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fon Saymanlığı 2010.KB.SAG.006) **Araştırmacı** (Devam ediyor).
3. “Dokuz Eylül Üniversitesi İleri Biyomedikal Arge Altyapı Projesi 2009-2013. Alt projeler: Etkin Kanser Sağaltımına Yönelik Farmakogenomik Laboratuvarı Alt Yapısının Oluşturulması.” (Proje yürütücüsü Doç.Dr.Yasemin Baskın) **Araştırmacı** Destek Miktarı: 1,875,052,00TL.
4. “Dokuz Eylül Üniversitesi İleri Biyomedikal Arge Altyapı Projesi 2009-2013. Alt projeler: Translasyonel Kolon Kanseri Araştırma Laboratuvarı Alt Yapısının Oluşturulması” (Proje yürütücüsü Doç.Dr.Yasemin Baskın) **Araştırmacı** Destek Miktarı: 3,227,000.00TL.
5. “Dokuz Eylül Üniversitesi İleri Biyomedikal Arge Altyapı Projesi 2009-2013. Alt projeler: Kolon Kanseri Biyobankası Alt Yapısının Oluşturulması” (Proje yürütücüsü Doç.Dr.Yasemin Baskın) **Araştırmacı** Destek Miktarı: 2,342,520,00TL.
6. “Kolorektal kanserlerde Kras Mutasyonlarının Dağılımı” Araştırma Projesi kurumsal proje (Sorumlu Araştırmacı: Doç.Dr.Yasemin Baskın), **Araştırmacı** (2010- Devam ediyor).
7. “Kolorektal kanserlerde K-ras mutasyonlarının hedefe yönelik sağaltımlardaki yeri” DEÜ Onkoloji Enstitüsü – Merck Sereno alt yapı projesi. **Araştırmacı**. 2009
8. “Molecular-Pathological Detection of KRAS mutations in Colorectal Carcinoma RING South Eastern Europe validation Project” Ludwig-Maximilians-Universität LMU/**München**; Merck Serono; Qualitätssicherungs-initiative pathologie/QuIP; DEU Institute of Oncology, Department of Basic Oncology **Araştırmacı** , Ortak uluslar arası proje 2010, sürüyor.
9. “Farmakogenomik test yöntemlerinin altın standart test yöntemleri ile karşılaştırılması”; CDK ve Qiagen Destekli Araştırma **Araştırmacı**. 2010 sürüyor.
10. “Çoklu Analiz Verilerinin ve Olgu Demografiklerinin Biyoinformatik Analizinde Metodolojik Bir Yaklaşım” Araştırma Projesi (Sorumlu Araştırmacı: Prof.Dr.Hülya Ellidokuz), **Araştırmacı** (2011- Devam ediyor).

BURSLAR

1. The American Society of Clinical Oncology Multidisciplinary Cancer Management Course 20-22 Nov. 2008, Çeşme/İzmir. Düzenleme Komitesi Bursu

2. The 3rd Seminar of Balkan School of Oncology “Immunotherapy and Gene Therapy in Cancer” 10-12Sep.2009, Volos/Greece-Düzenleme Komitesi Bursu
3. Kök Hücre Teknikleri Kursu (12-16Ekim2009)-Kanser Araştırmaları Derneği Bursu
4. Türk Onkoloji Grubu Derneği Çalıştayı, “Onkolojik Araştırmalarda Nanobiyoteknoloji ve Genetik Kursu 10-11Kasım2009-Düzenleme Komitesi Bursu

ÖDÜLLER

1. “Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Derneği Onkoloji Araştırma Ödülleri (İkincilik-Grup Ödülü) 2011 Ulusal Kanser Kongresi “Gastro Intestinal Stromal Tümörlerde KIT Geni Ekson 9, 11,13, ve 17 Mutasyonları”

KİTAP ve KİTAP BÖLÜMLERİ

1. ”Temel Onkolojide Kullanılan Araştırma Yöntemleri” EDITÖRLER Y.Baskın, G. Çalıbaşı Dokuz Eylül Üniversitesi Yayınları ISBN: 978-975-441-330-4, 2011,İzmir.
2. Farmakogenomik ve ilişkili yöntemler, yazarlar; Y. Baskın, G. Çalıbaşı (Bölüm 4) ”Temel Onkolojide Kullanılan Araştırma Yöntemleri” Ed. Y.Baskın, G. Çalıbaşı ; Dokuz Eylül Üniversitesi Yayınları ISBN: 978-975-441-330-4, 2011,İzmir.

ULUSLARARASI İNDEKSLERDE TARANAN HAKEMLİ DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

- 1.“Pharmacogenetic and Cancer ” Y. BASKIN, G.ÇALIBAŞI (Derleme)
Turkish Bulletin Of Hygiene And Experimental Biology 2011. (Cilt:68, Sayı:3, Basım için kabul edildi.)
*CAB Abstracts (Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases,Tropical Diseases Bulletin, Global Health, AgBiotech, Veterinary Abstracts), DOAJ (Directory of Open Access Journals), Index Copernicus, CAS (Chemical Abstracts Service), Google Scholar, Google, Open J-Gate, Ulrichsweb and Serials Solutions, NewJour, Genamics JournalSeek, Türkiye Atıf Dizini, Türk-Medline ve TUBITAK-ULAKBİM Türk Tıp Dizini'nde dizinlenmektedir.
2. “Unusual High Frequency of KRAS Mutations in Female Colorectal Cancer Patients” Yasemin Baskın, **Gizem Çalıbaşı**, Emre Canda, Sülen Sarioğlu, Uğur Yılmaz. *In Vivo* 25: 519- 520 (2011). (Abstract of the 4. International Congress of Molecular Medicine)

3. “Optimisation and Validation of DNA Sequencing for KIT Mutation Testing in Gastrointestinal Stromal Tumors”

Gizem Çalibaşı Yasemin Baskın, İlhan Öztop, Özgül Sağol, Koray Atila, Hülya Ellidokuz, Uğur Yılmaz. In Vivo 25: 518- 519 (2011). (Abstract of the 4. International Congress of Molecular Medicine)

4. “Pyrosequencing Analysis for Detection of KRAS Mutations in Colorectal Cancer”

Yasemin Baskın, **Gizem Çalibaşı**, Emre Canda, Sülen Sarioğlu, Uğur Yılmaz. In Vivo 25: 519 (2011). (Abstract of the 4. International Congress of Molecular Medicine)

5. “The Role of DNA Sequencing in Pharmacogenetic Applications”

Gizem Çalibaşı ,Yasemin Baskın, İlhan Öztop, Uğur Yılmaz. In Vivo 25: 519 (2011). (Abstract of the 4. International Congress of Molecular Medicine)

ULUSLAR ARASI BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTABINDA(PROCEEDINGS) BASILAN BİLDİRİLER

1.“Pharmacogenomics of Anticancer Agents: Using Predictive Biomarkers to Select Patients with Colorectal Cancer for Treatment with Anti-EGFR Therapies”

Yasemin BASKIN, **Gizem ÇALIBAŞI**, Nurçin KAYACIK, Sülen SARIOĞLU, Emre CANDA, Uğur YILMAZ. The 5th APOCP Conference-Asia Pacific Organisation for Cancer Prevention. 3-7 April 2010, İstanbul. Poster sunumu.

2. “K-RAS Mutation Detection In Colorectal Cancer Using The Real-Time Polymerase Chain Reaction With Melting Curve Analysis”

Yasemin BASKIN, Gizem ÇALIBAŞI, Nurçin KAYACIK, Sülen SARIOĞLU, Emre CANDA, Uğur YILMAZ. The 5th APOCP Conference-Asia Pacific Organisation for Cancer Prevention. 3-7 April 2010, İstanbul. Poster sunumu.

3. “Real-time and Dynamic Monitoring of Cell Proliferation and Viability for HEp-2 Cell Lines by xCELLigence System”

Yasemin BASKIN, **Gizem ÇALIBAŞI**, Nurçin KAYACIK, Sülen SARIOĞLU, Emre CANDA, Uğur YILMAZ. The 5th APOCP Conference-Asia Pacific Organisation for Cancer Prevention. 3-7 April 2010, İstanbul. Poster sunumu.

4.”Basic Oncology Doctoral degree Program of Dokuz Eylul University” Ayşe Pınar Erçetin, Gizem Çalıbaşı, Safiye Aktaş. 6th Orpheus Conference. 27-30 April 2011, İzmir. Poster sunumu.

5. “Unusual High Frequency of KRAS Mutations in Female Colorectal Cancer Patients” Yasemin Baskın, **Gizem Çalıbaşı**, Emre Canda, Sülen Sarioğlu, Uğur Yılmaz. 4. International Congress of Molecular Medicine. 27-30 June 2011, İstanbul. Poster sunumu.

6. “Optimisation and Validation of DNA Sequencing for KIT Mutation Testing in Gastrointestinal Stromal Tumors” **Gizem Çalıbaşı** Yasemin Baskın, İlhan Öztop, Özgül Sağol, Koray Atila, Hülya Ellidokuz, Uğur Yılmaz. 4. International Congress of Molecular Medicine. 27-30 June 2011, İstanbul. Poster sunumu.

7. “Pyrosequencing Analysis for Detection of KRAS Mutations in Colorectal Cancer” Yasemin Baskın, **Gizem Çalıbaşı**, Emre Canda, Sülen Sarioğlu, Uğur Yılmaz. 4. International Congress of Molecular Medicine. 27-30 June 2011, İstanbul. Poster sunumu.

8. “The Role of DNA Sequencing in Pharmacogenetic Applications” **Gizem Çalıbaşı** ,Yasemin Baskın, İlhan Öztop, Uğur Yılmaz. 4. International Congress of Molecular Medicine. 27-30 June 2011, İstanbul. Poster sunumu.

ULUSAL HAKEMLİ DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER

ULUSAL BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTAPLARINDA BASILAN BİLDİRİLER

1. “Optimisation and Validation of K-ras Mutation Testing In Colorectal Carcinomas” Yasemin BASKIN, **Gizem ÇALIBAŞI**, Sülen SARIOĞLU, Emre CANDAN, Uğur YILMAZ. III.Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu 14-17 Mart 2010, Bursa. Poster sunumu

2. “Kolorektal Karsinomlu Hastalarda Anti-EGFR Tedavisine Yanıtın Öngörülmesinde KRAS Mutasyon Testi: Farmakogenomik Teranostik Bir Belirteç” Yasemin BASKIN, **Gizem ÇALIBAŞI**, Tülay Akman, Sülen SARIOĞLU, Emre CANDAN, Özgül Sağol, Hülya Ellidokuz, İlhan Öztop, Uğur YILMAZ. Klinik Onkoloji Kongresi 2010, Antalya. Poster sunumu.

3. “Kolorektal Kanserlerde KRAS Geni Mutasyonlarının Saptanmasında Mikroarray Yönteminin Kullanımı” Yasemin Baskın, **Gizem Çalıbaşı**, Emre Canda, Sülen Sarioğlu,

Uğur Yılmaz. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği 6.Ulusal Kongresi 22-25 Eylül 2010, İzmir. Poster sunumu.

4. “Kolorektal Kanserde KRAS Mutasyonlarının Taraması: ARMS PCR ile DNA Dizileme Analizinin (Altın Standart) Karşılaştırılması” Yasemin Baskın, Gizem Çalibaşı, Emre Canda, Sülen Sarıoğlu, Uğur Yılmaz. 22. Ulusal Biyokimya Kongresi 27 - 30 Ekim 2010, Eskişehir. Poster sunumu.

5. “Gastrointestinal Stromal Tümörlerde Biyobelirteç Olarak KIT Geni Mutasyonlarının Yeri” **Gizem Çalibaşı** Yasemin Baskın, İlhan Öztop, Özgül Sağol, Koray Atila, Hülya Ellidokuz, Uğur Yılmaz. 3.Ulusal Gastrointestinal Onkoloji Kongresi. 07-10 Nisan 2011. Antalya.

6. “Gastrointestinal Stromal Tümörlerde KIT Geni Ekzon 9, 11, 13 ve 17 Mutasyonları” **Gizem Çalibaşı** Yasemin Baskın, İlhan Öztop, Özgül Sağol, Koray Atila, Hülya Ellidokuz, Uğur Yılmaz.19.Ulusal Kanser Kongresi. 20-24 Nisan 2011, Antalya.

7. “Onkoloji Alanında Sağaltım Yanıtlarının öngörülmesinde Teranostik Biyobelirteçler” Yasemin Baskın, **Gizem Çalibaşı**, İlhan Öztop, Uğur Yılmaz.19.Ulusal Kanser Kongresi. 20-24 Nisan 2011, Antalya.

SEMINER, SÖZLÜ SUNUMLAR

1. “Su ve Tamponların Önemi” G.ÇALIBAŞI, 2009, DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Seminer Programı
2. “DNA SEKANSLAMA” G. ÇALIBAŞI, 2010, DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Seminer Programı

EĞİTİME YAPTIĞI KATKILAR

1. Dokuz Eylül Üniversitesi Üemel Onkoloji ABD Yaz Stajı Programı-2009.
2. Dokuz Eylül Üniversitesi Özel Çalışma Modülü - ÖÇM (Farkındamısınız? Kansere Geliyorum Der.) Tıp 3 Lisans. 2009-2010 Güz/İlkbahar. **Uygulamacı**
3. “Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD Seminer Programı 2009-2010 Bahar Yarıyılı” **Seminer programı sorumlu yardımcılığı.**
4. Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji ABD Yaz Stajı Programı-2010 Faramakogenetik Laboratuvarı Uygulamaları.**Uygulamacı**

5. Dokuz Eylül Üniversitesi Özel Çalışma Modülü (Türkiyede Kanser Çevre İlişkisi) Tıp 3 Lisans 2010-2011 Güz/İlkbahar. **Uygulamacı.**
6. Dokuz Eylül Üniversitesi Özel Çalışma Modülü (Bireysel tıp ve kanser sağaltımı) Tıp 3 Lisans 2010-2011 Güz/İlkbahar. **Uygulamacı.**
7. Dokuz Eylül Üniversitesi Özel Çalışma Modülü (Kanser Farkındalığını arttırmaya yönelik görsel materyal tasarımı) Tıp 3 Lisans 2010-2011 Güz/İlkbahar. **Uygulamacı**
8. Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji ABD Yaz Stajı Programı-2011 Farmakogenetik Laboratuvarı Uygulamaları. **Uygulamacı**
9. “Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD Seminer Programı 2010-2011 Güz-Bahar Yarıyılı” **Seminer programı sorumlu yardımcılığı.**

KATILDIĞI BİLİMSEL TOPLANTILAR ve KURSLAR

1. Kimyagerler Derneği, “Tehlikeli Kimyasal Maddelerle Güvenli Çalışma Sertifikalı Eğitim Programı”, Nisan 2007, İzmir.
2. Kimyagerler Derneği, “İyi Üretim Uygulamaları (GMP) Sertifika Eğitim Programı”, Ağustos 2007, İzmir.
3. Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET) “Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu”, Mart 2008, İzmir.
4. The American Society of Clinical Oncology Multidisciplinary Cancer Management Course 20-22 Nov. 2008, Çeşme/İzmir.
5. Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET) “Kök Hücre Sempozyumu”, Mart 2009, İzmir.
6. Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu, Deney hayvanları Kullanımı Sertifika Kurs Programı, 25 Mayıs-2 Haziran 2009, İzmir.
7. The 3rd Seminar of Balkan School of Oncology “Immunotherapy and Gene Therapy in Cancer” 10-12 Sep. 2009, Volos/Greece
8. Kök Hücre Teknikleri Kursu 12-16 Ekim 2009, Ege Üniversitesi, İzmir.
9. Türk Onkoloji Grubu Derneği Çalıştayı, “Onkolojik Araştırmalarda Nanaobiyoteknoloji ve Genetik Kursu 10-11 Kasım 2009, İzmir
10. Kanser Çalıştayı 8 Mart 2010, İzmir.
11. Birinci Basamak Hekimlerine Yönelik Kanser Hastalıkları Kursu (Tanı-Tedavi ve Prevansiyon) (I)- 11-12 Mart 2010, İzmir. Dinleyici olarak

12. III. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu 14-17 Mart 2010, Bursa.
13. 5th International APOCP (Asian Pacific Organization for Cancer Prevention) Conference 3-7 Nisan 2010.
14. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği 6.Ulusal Kongresi 22-25 Eylül 2010, İzmir.
15. Dokuz Eylül Üniversitesi Arge Uydu Laboratuvarları Eğitim Programı, Vilber Lourmat Jel Görüntüleme Sistemi ve Jel Yürütme Tankları / 21.10.2010
16. Dokuz Eylül Üniversitesi Arge Uydu Laboratuvarları Eğitim Programı, Steri-Cult CO2 İnkubatör / 19.10.2010, İzmir.
17. Dokuz Eylül Üniversitesi Arge Uydu Laboratuvarları Eğitim Programı, Holten Biyolojik Güvenlik Kabini/ 19.10.2010, İzmir.
18. Dokuz Eylül Üniversitesi Arge Uydu Laboratuvarları Eğitim Programı, Beckman Coulter Vi-Cell Cell Viability Analyzer kullanıcı eğitimleri/ 14.10.2010, İzmir.
19. Dokuz Eylül Üniversitesi Arge Uydu Laboratuvarları Eğitim Programı, Olympus CX41 + DP25 Kamera ve Yazılımları/ IX71 Floresan + Faz Kontrast / IX71 Floresan + DIC Kontrast + DP72 Kamera ve Research Yazılımı / 13.10.2010, İzmir.
20. Dokuz Eylül Üniversitesi Arge Uydu Laboratuvarları Eğitim Programı, Thermo Varioskan (Mikroplaka Multi-Mode Okuyucu) + Derin Dondurucu + Sıvı Azot Tankı / 24.09.2010, İzmir.
21. Dokuz Eylül Üniversitesi Arge Uydu Laboratuvarları Eğitim Programı, Beckman Coulter Ultrasantrifüj kullanıcı eğitimleri / 14.09.2010, İzmir.
22. Uygulamalı Mezenkimal Kök Hücre Kursu 10 Şubat 2010, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir.
23. 2.Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi. 10-13 Şubat 2010, İzmir.
24. “Birinci Basamak Hekimlerine Yönelik Kanser Hastalıkları Kursu (Tanı-Tedavi ve Prevansiyon) (II)” 17-18 Mart 2011, İzmir.
25. 19.Ulusal Kanser Kongresi. 20-24 Nisan 2011, Antalya.
26. 6th ORPHEUS (Organization for PhD Education in Biomedicine and Health Sciences) Conference. 27-30 April 2011. İzmir.
27. “Proteomik: Temel Bilgiler ve Uygulama Örnekleri” semineri. 4 Mayıs 2011, İzmir.
28. “Aydın Onkoloji Günleri” 12-15 Mayıs 2011. Aydın.

KURS VE KONGRELERDE ALDIĞI GÖREVLER

1. Birinci Basamak Hekimlerine Yönelik Kanser Hastalıkları Kursu (Tanı-Tedavi ve Prevansiyon) (I)- 11-12Mart2010, İzmir.
2. “Birinci Basamak Hekimlerine Yönelik Kanser Hastalıkları Kursu (Tanı-Tedavi ve Prevansiyon) (II)” 17-18 Mart 2011,İzmir.

UYGULADIĞI YÖNTEMLER

1. Genel Biyokimya Teknikleri:
2. Hücre Kültürü Teknikleri: Hücre hattı, kök hücre, Xcelligence sitotoksik deneyler
3. Moleküler Teknikler: DNA-RNA izolasyon teknikleri, PCR, RT-PCR
4. Laboratuar Güvenliği ve Laboratuar Kalite Kontrolü ile ilgili çalışmalar
5. Yöntem Validasyonu
6. Micro-array uygulamaları
7. DNA Sekanslama ile baz sırası tayini uygulamaları
8. Biyoinformatik BLAST,DNA dizi tayini uygulamaları

KULLANICI SERTİFİKASI İLE KULLANILAN CİHAZLAR

1. Roche LightCycler 480 Real Time PCR
2. Roche XCelligence Real Time Cell Analysis System
3. Qiagen PyroMark Pyrosequencing Machine
4. Autogenomics Infinity Microarray
5. Beckman Coulter Genetic Analysis System CEQ 800

ÜYE OLDUĞU DERNEKLER

1. Moleküler Kanser Araştırma Derneği (MOKAD)
2. European Association for Cancer Research (EACR)
3. Türk Biyokimya Derneği
4. Federation of European Biochemical Societies (FEBS)