

**KOLOREKTAL ADENOKARSİNOMLARDA WNT-3,
β-KATENİN, MMP7, VEGF, VİMENTİN VE Kİ67
EKSPRESYONLARININ PATOLOJİK EVRE VE DİĞER
PROGNOSTİK FAKTÖRLER İLE İLİŞKİSİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Arş. Grv. Dr. Ahmet Çağrı Evran

DANIŞMAN

Yard. Doç. Dr. Çiğdem Özdemir

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

AFYONKARAHİSAR 2016

T. C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**KOLOREKTAL ADENOKARSİNOMLARDA WNT-3, β -KATENİN,
MMP7, VEGF, VİMENTİN VE KI67 EKSPRESYONLARININ PATOLOJİK
EVRE VE DİĞER PROGNOSTİK FAKTÖRLER İLE İLİŞKİSİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Arş. Grv. Dr. Ahmet Çağrı EVRAN

DANIŞMAN

Yard. Doç. Dr. Çiğdem ÖZDEMİR

**Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Kurulu Birimince 15.TUS.07 proje numarası ile desteklenmiştir.**

AFYONKARAHİSAR 2016

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Başlığı: Kolorektal Adenokarsinomlarda Wnt-3, β -Katenin, MMP7, VEGF, Vimentin ve Ki67 Ekspresyonlarının Patolojik Evre ve Diğer Prognostik Faktörler ile İlişkisinin İmmünohistokimyasal Yöntemle Değerlendirilmesi

Tezi Hazırlayan : Arş. Gör. Dr. Ahmet Çağrı EVRAN
Tez Danışmanı : Yard. Doç. Dr. Çiğdem ÖZDEMİR

İş bu çalışma jürimiz tarafından TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Üye

Üye

ONAY

DEKAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince karşımıza çıkan engellerin üstesinden gelen, çalışmamızın ilerlemesini sağlayan ve bilgilerinden sürekli yararlandığım tez danışmanım Yard. Doç. Çiğdem Özdemir'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bana yardımcı olan, çalışmamızın tüm istatistiksel analizlerini yapan canım kardeşim Arş. Gör. Hasan Nadir Rana'ya ve yine tezime olan katkılarından ötürü Arş. Gör. Tayfun Koçoğlu'na teşekkür ederim.

Zor zamanlarımda yanımda olan ve ben olmadıgımda tüm rutin iş yükünü omuzlayan canım arkadaşlarım Arş. Gör. Esra Uygur, Arş. Gör. Oğuzhan Erol, Arş. Gör. Gözde Konuk ve Arş. Gör. Tuba Kavaklı'ya; tez çalışmamın arşiv taramasında ve iş hayatımda bana hep yardımcı olan Halis Güvener'e teşekkür ederim.

Tez çalışmama verdiği maddi destekten ötürü Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Başkanlığına teşekkür ederim.

Benim için hep en iyisini isteyen, iyi günlerimde benimle sevinen, en kötü günlerimde arkamda durarak bana destek olan babama, kardeşime ve özellikle de anneme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	I
İçindekiler	II
Şekiller	V
Tablolar	VII
1-Giriş ve Amaç	1
2-Genel Bilgiler	2
2.1-Kalın Bağırsak Embriyolojisi	2
2.1.1-Sindirim Kanalı Genel Embriyolojisi	2
2.1.2-Sindirim Kanalı Oluşumunun Moleküler Düzenlenmesi	3
2.2-Kalın Bağırsak Anatomisi	6
2.2.1-Çekum	7
2.2.2-Çıkan Kolon	8
2.2.3-Transvers Kolon	9
2.2.4-İnen Kolon	9
2.2.5-Sigmoid Kolon	10
2.2.6-Rektum	10
2.2.7-Kolonun Arteriyel ve Venöz Dolaşımı	12
2.2.8-Kolonun Sinirsel İnervasyonu	13
2.2.9-Kolonun Lenfatik Sistemi	13
2.3-Kalın Bağırsak Histolojisi	14
2.3.1-Kolon	14
2.3.2-Appendiks Vermiformis	17

2.3.3-Rektum	18
2.3.4-Sinir Ağları	18
2.4-Kolorektal Karsinomlar	20
2.4.1-Klinik	20
2.4.2-Makroskopik Görünüm	22
2.4.3-Histolojik Görünüm	23
2.4.4-Prognostik Belirteçler	28
2.4.5-İmmünohistokimya ve Moleküler Patoloji	30
2.5-Wnt Sinyal Yolağı	32
2.6-İmmünohistokimyasal Belirteçler	39
2.6.1-Wnt-3	39
2.6.2-MMP7	40
2.6.3- β -Katenin	41
2.6.4-VEGF	41
2.6.5-Vimentin	42
2.6.6-Ki67	42
3- Gereç ve Yöntem	44
3.1-Çalışma Grubunun Tanımlanması	44
3.2-Histomorfolojik Değerlendirme	44
3.3-İmmünohistokimyasal Yöntem	45
3.4-İmmünohistokimyasal Değerlendirme	48
3.5-İstatistiksel Değerlendirme	54
4-Bulgular	55
5-Tartışma	63
6-Sonuçlar	68

7-Özet	70
8-Summary	72
9-Referans Kaynaklar	74



ŞEKİLLER

Figür 1-Embriyoda Kloakal Bölgenin Gelişimi	3
Figür 2-Embriyonun Vertikal ve Lateral Katlanması	4
Figür 3-Sindirim Kanalı Oluşumunun Moleküler Düzenlenmesi	5
Figür 4-Kalın Bağırsak Anatomisi	7
Figür 5-Kolon Histolojisi	19
Figür 6-Ülsere Görünümdeki Rektal Adenokarsinom	22
Figür 7-Striktür Oluşturmuş Kolon Adenokarsinomu	23
Figür 8-Kolon Kanseri İntrolüminal Kirli Nekroz	24
Figür 9-Kolonun Müsinöz Adenokarsinomu	25
Figür 10-Kolonun Taşlı Yüzük Hücreli Adenokarsinomu	25
Figür 11-Kolonun Medüller Adenokarsinomu	26
Figür 12-Kolorektal Adenokarsinomda Lenfosit İnfiltrasyonu	27
Figür 13-Kolon Adenokarsinomunda Crohn Benzeri Reaksiyon	27
Figür 14-Wnt Uyarısı ile β -Katenin İlişkisi	36
Figür 15-Farklı Wnt Yolaklarının Kullandığı Moleküller	37
Figür 16-Wnt Yolaklarına Genel Bakış	38

Figür 17-Tümörde MMP7 Ekspresyonu	49
Figür 18-Tümörde ve Normal Dokuda β -Katenin Ekspresyonu	50
Figür 19-Tümörde Güçlü ve Zayıf VEGF Ekspresyonu	51
Figür 20-Tümör Stromasında Vimentin Ekspresyonu	52
Figür 21-Tümörde Yüksek Ki67 Proliferasyon İndeksi	53



TABLÖLAR

Tablo 1-İmmünohistokimyasal Uygulama Prosedürü	45
Tablo 2-Verilerin Tanımlayıcı Özellikleri	56
Tablo 3-Mikroskopik Derece ile Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması	57
Tablo 4-Lenfovasküler İnvazyon ile Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması	58
Tablo 5-Perinöral İnvazyon ile Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması	59
Tablo 6-Lenf Nodu Tutulumu ile Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması	60
Tablo 7-Tümör Evresi ile Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması	61
Tablo 8-Kötü Prognoz Faktörleri ile Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması	61
Tablo 9-Boyanma Özellikleri ve Prognoz Faktörlerinin Korelasyonu	62



1-GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal karsinomlar dünya genelinde en sık görülen üçüncü kanser olmakla birlikte önemli bir mortalite ve morbidite sebebidir. Son yıllarda kolorektal kanser taramalarına yönelik yapılan kolonoskopi uygulamaları, dışkı ve kan tetkikleri erken tanı konan hasta sayısını arttırmış ve kolon kanserine bağlı mortaliteyi düşürmeye başlamıştır. Kolorektal kanserler ileri evrelerde yakalandığında oldukça kötü prognoza ve yüksek mortaliteye sahipken, erken evrelerde yakalandığında minimal morbidite ve mortaliteye sahiptir. Erken evrelerde yapılan uygun cerrahi girişim ile yüksek oranda küratif olarak tedavi edilebilir.

Kolorektal kanserlerin prognozunu ve dolaylı olarak hasta mortalitesini klinik olarak belirlemek amacıyla AJCC cesur davranarak bazı kriterler belirlemiştir. Bu kriterlerden en önemlisi kanserin evresidir. Diğer önemli prognostik kriterler ise serum CEA düzeyi, perinöral invazyon, vasküler invazyon, lenf nodu tutulumu, mikroskopik derece ve cerrahi sınırların durumudur. Yapılan çalışmalarda birçok immünohistokimyasal belirteç, prognozu belirlemek için kullanılmıştır ancak birkaç antikor haricinde anlamlı sonuç elde edilememiştir.

Bu çalışmada başka tümörlerde iyi ve kötü prognoz göstergesi olan ve tümöröenezde rolü olan bazı proteinlerin kolorektal kanserlerdeki ekspresyon durumu ve belirlenmiş önemli prognostik faktörlerle olan ilişkisi immünohistokimyasal yöntemlerle araştırıldı. Kolorektal kanserlerde Wnt-3a, MMP7, VEGF, β -katenin, vimentin ve Ki67 ekspresyon düzeyinin AJCC'nin belirlemiş olduğu prognostik faktörlerle olan ilişkisi belirlendi.

Çalışmanın amacı bu immünohistokimyasal belirteçlerin de prognostik bir faktör olarak kullanılıp kullanılamayacağını belirlemektir. Ayrıca bu çalışmadan yararlanılarak ekspresyon düzeyi anlamlı bir şekilde artan proteinlere karşı hedefe yönelik kemoteröpatikler de geliştirilerek tümör tedavisine yardımcı yöntemler üretilebilir.

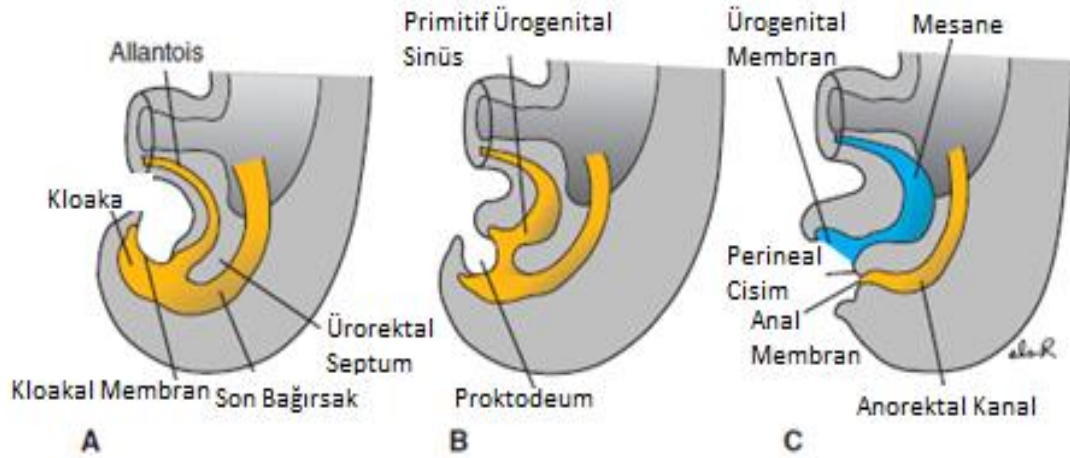
2-GENEL BİLGİLER

2.1-KALIN BAĞIRSAK EMBRİYOLOJİSİ

2.1.1-Sindirim Kanalı Genel Embriyolojisi

Çekum, çıkan kolon ve transvers kolonun sağ 2/3'lük kısmı orta bağırsak, geri kalanı ise son bağırsaktan oluşur. Son bağırsaktan oluşan bölümler transvers kolonun sol 1/3'lük kısmı, inen kolon, sigmoid kolon, rektum ve anal kanalın üst kısmıdır. Son bağırsağın endodermal kısmı mesane ve üretranın iç yüzünü döşeyen epiteli de oluşturur. Son bağırsağın terminal kısmı kloakanın posterior kısmına girerek primitif anorektal kanalı, allantois ise anterior kısmından girerek primitif ürogenital sinüsü oluşturur (Figür 1-A). Kloaka endoderm ile döşeli, ventral kısmı ise yüzey ektodermi ile çevrili bir kavitedir. Endoderm ve ektoderm arasında kalan boşluk kloakal membranı oluşturur (Figür1). Ürorektal septum denen bir mezoderm tabakası allantois ve son bağırsağı birbirinden ayırır. Bu septum yolk kesesini kaplayan ve allantoisi çevreleyen mezodermden köken alır (Figür 1 ve 2). Embriyo geliştikçe ürorektal septumun ucu kloakal membrana yaklaşmaya başlar (Figür 1-B,C). 7. haftanın sonunda kloakal membran yırtılarak ventral tarafta ürogenital sinüs için, dorsal tarafta ise son bağırsak için bir açıklık oluşturur. Bu ikisinin arasında ürogenital septumun tepesi perineal cismi oluşturur (Figür 1-C). Anal kanalın üst 2/3'ünü son bağırsağın endodermi, alt 1/3'ünü ise proktodeumun çevresindeki ektoderm oluşturur (Figür 1-B,C). Kloakanın yüzeyinde bulunan proktodeum adlı bölgenin ektodermi prolifer olup anal çukuru oluşturmak üzere invajinasyon yapar. Bunu takiben anal membran dejenere olarak anal kanalın üst ve alt kısımlarının birbiri ile devamlı hale gelmesini sağlar. Anal kanalın kaudal kısmı ektodermden geliştiği için bu bölgenin kan dolaşımı arteria pudentalis interna'nın arteria rectalis inferior dalları ile sağlanırken; kranial kısmı endodermden geliştiği için bu bölgenin

kan dolaşımı son bağırsağın kan dolaşımından sorumlu olan arteria mezenterica inferior'un devamı niteliğindeki arteria rectalis superior ile sağlanır. Anal kanalın ektodermal ve endodermal kısımları arasındaki bileşkeye dentat (pectinate) çizgi denir. Bu çizgide epitel, kolumnardan çok katlı yassı epitele geçiş gösterir.

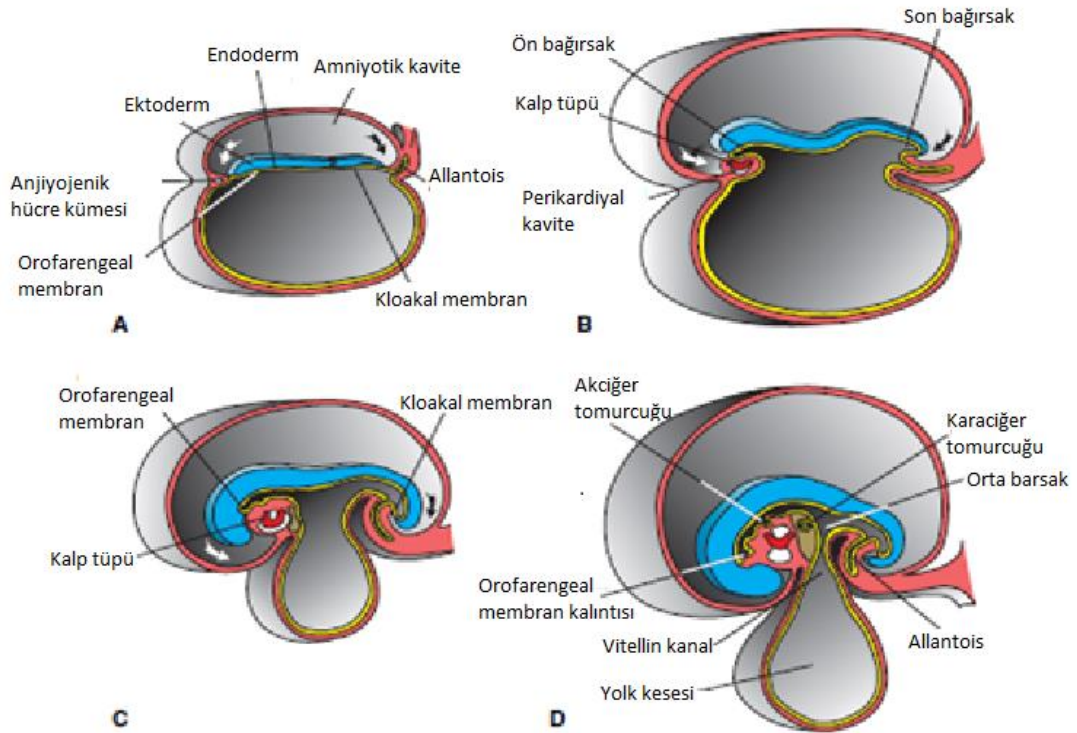


Figür 1: Gelişim evrelerini başarıyla tamamlanmış embriyodaki kloakal bölge gösterilmektedir. A) Son bağırsak kloakanın posterior kısmına girerek ileriki dönemlerde anorektal kanalı oluşturacaktır. Allantois kloakanın anterior kısmına girerek ileriki dönemlerde ürogenital sinüsü oluşturacaktır. Bu iki yapının arasında kalarak bu yapıları saran mezoderm ürorektal septumu oluşturur. Kloakanın ventral kısmını oluşturan kloakal membran endoderm ve ektodermden oluşmuştur. B) Embriyonun kraniokaudal katlanması devam ettikçe ürorektal septum da kloakal membrana yaklaşır. C) Genital tüberkülün uzamasıyla kloaka öne doğru ilerlemeye başlar ve kloakal membranın yırtılmasına sebep olur. Yırtılan membran, son bağırsak ve ürogenital sinüs için bir açıklık yaratır. Ürorektal septumun ucu ise perineal cisimi oluşturur. (1)

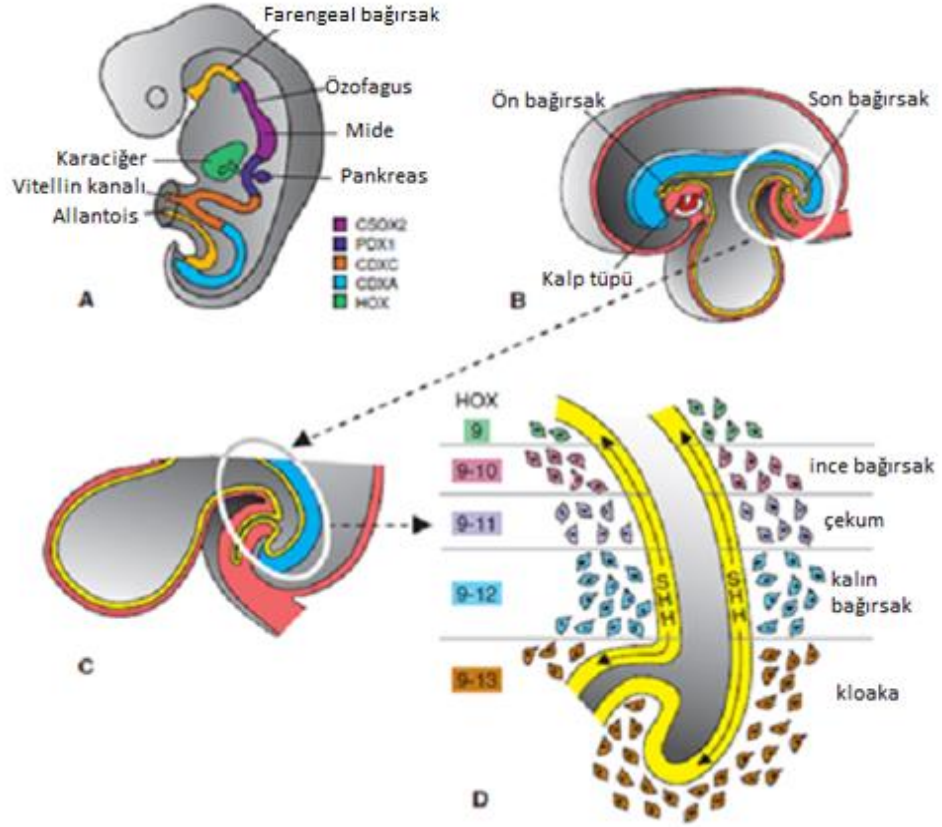
2.1.2-Sindirim Kanalı Oluşumunun Moleküler Düzenlenmesi

Sindirim kanalının farklı bölümlere özelleşmesi lateral vücut kıvrımlarının bir araya gelerek sindirim kanalını oluşturduğu sırada olur (Figür 2 ve 3). Organların özelleşmesi bu kanalın maruz kaldığı retinoik asit yoğunluk gradyanı ile başlar. En yüksek retinoik asit düzeyi kolonda, en düşük retinoik asit düzeyi ise farinkstedir. Bu

retinoik asit gradyanı sindirim kanalının farklı yerlerinde farklı transkripsiyon faktörlerinin eksprese edilmesine sebep olur. Böylelikle SOX2, özofagus ve midenin; PDX1, duodenumun; CDXC, ince bağırsağın; CDXA ise kolon ve rektumun özelleşmesini sağlar (Figür 3-A). Bu başlangıç paterni endoderm ve sindirim kanalına komşu viseral mezoderm arasındaki etkileşim ile stabilize edilir (Figür 3-B,C,D). Bu epitelyal-mezenkimal etkileşim sindirim kanalı boyunca eksprese edilen sonic hedgehog (SHH) proteinleri ile başlatılır. SHH ekspresyonu sindirim kanalının mide, duodenum, ince bağırsak vb. yapısını belirleyecek olan mezodermal faktörleri artırarak düzenler. Mesela orta bağırsağın kaudal kısmı ve son bağırsağın tamamında olan SHH ekspresyonu mezodermde yuvalanmış bir HOX gen ekspresyonunu sağlar (Figür 3-D). Mezoderm bu kod ile özelleştikten sonra endodermin, orta ve son bağırsağın, ince bağırsak, çekum, kolon ve kloaka gibi farklı elemanları oluşturmasını sağlar (Figür 3).



Figür 2: Sagittal kesitlerde embriyonun farklı evrelerindeki sefalokaudal ve lateral katlanmaların endodermal bölgenin pozisyonuna etkisi gösterilmektedir. Ön bağırsak, orta bağırsak ve son bağırsağın oluşumuna dikkat ediniz. A) Presomit embriyo B) 7 somitli embriyo C) 14 somitli embriyo D) 1 aylık embriyo. (1)



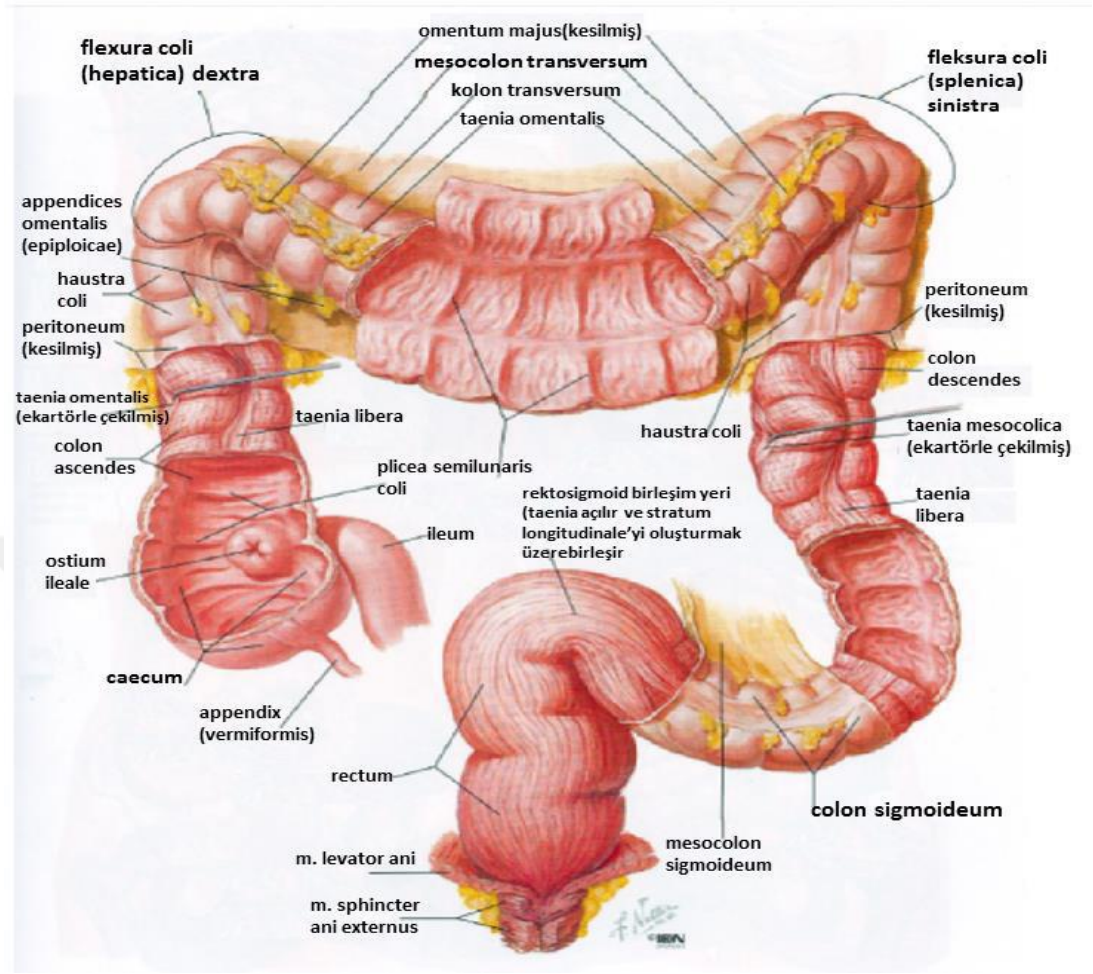
Figür 3: Şekiller bağırsak oluşumunun moleküler düzenlenmesini göstermektedir. A) Renklerle kodlanmış bölgeler o bölgenin özelleşmesini başlatan genleri temsil etmektedir. B-D) Çizimlerde orta ve son bağırsak özelleşmesinin ne kadar erken olduğu ve nasıl stabilize olduğu gösterilmektedir. Stabilizasyon, bağırsak endodermi ve bunu saran viseral mezoderm arasındaki epitelyal-mezenkimal etkileşim ile sağlanmaktadır. Endodermal hücreler stabilizasyon sürecini SHH eksprese ederek başlatır ve buna yanıt olarak bu bölgenin mezoderminde yuvalanmış bir HOX geni ekspresyonu başlar. Bu etkileşim sonrasında tüm bağırsak bölgelerinin ayrı ayrı özelleşmesini sağlayacak bir genetik kaskad oluşur. (1)

2.2-KALIN BAĞIRSAK ANATOMİSİ

Kalın bağırsak lümenli bir organdır, ortalama 150 cm uzunluğundadır ve terminal ileum ile anüs arasında uzanmaktadır (2). İleum ve çekumun birleştiği alanda ileoçekal valv adı verilen kolonik bağırsak içeriğinin ince bağırsağa reflüsüne engel olan anatomik bir kapak bulunur. Kalın bağırsak anslarının görünümü ve yapısı ince bağırsak anslarından farklıdır. Kalın bağırsak ansları daha geniştir ve kalın bağırsağın daha büyük bir bölümü sabittir.

Longitudinal kas liflerinin bir araya gelmesiyle kolon duvarında üç tane “tenya” ismi verilen bantları meydana getirir (tenya libera, tenya mezokolika, tenya omentalis). Tenyalar bağırsak uzunluğundan ve sirküler kas tabakasından daha kısa olduğu için kolon büzülmüş görünümündedir ve haustra yapıları oluşturmuştur. Haustralar bağırsağın iç yüzünde birbirinden semilunar plikalar ile ayrılır (3).

Kalın bağırsağın dış yüzünde periton ile örtülü appendiks epiploika adında yağ dokusu uzantıları bulunmaktadır (2). Kalın bağırsak, çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum olarak adlandırılan bölümlerden oluşmuştur (Figür 4) (4,5).



Figür 4: Kolon Anatomisi. (5)

2.2.1-Çekum

Kalın bağırsağın ilk parçası olup sağ iliak fossa yerleşimlidir. Ortalama olarak uzunluğu 6 cm, genişliği 7,5 cm'dir. Çekum tamamen periton ile örtülüdür. Alt kesimi inguinal ligamenti biraz geçer, çekum distalde ise çıkan kolon adını alarak ilerler. Arka yüzü psoas majör kası ve iliak kas ile komşu olup bu kaslardan kas fasyası ve periton ile ayrılmıştır. Çekum dolu iken ön yüzü karın ön duvarının iç yüzü ile boş iken ince bağırsak kıvrımları ile komşudur. Tenyalar çekumun arka yüzünün iç tarafında appendiks vermiformisin girdiği yerden başlar.

Çekum, kolonun çapı en geniş olan bölgesidir ve bu yüzden bu segmentteki malign lezyonlar nadiren obstrüksiyon semptomları oluşturur ancak daha çok kanama ve anemiye bağlı halsizlik ve kilo kaybı semptomları verir (2).

Çekum kolonun en geniş çaplı segmenti olduğu için Laplace kanununa göre, kolonda tıkaçıcı bir patoloji olduğunda kolonun en sık perforasyon olduğu bölgedir (4).

İlioçekal valv (Bauchini kapağı): Kalın ve ince bağırsağın birleşme yerinde bulunur ve çekumun arka iç yüzüne çıkan kolon ile çekumun birleşme yerine açılır. Bu valv ince bağırsağın mukoza, submukoza ve sirküler kas tabakasının kalın bağırsak içine girmesiyle oluşmuştur. Longitudinal kas tabakası ve seroza kalın bağırsağın aynı tabakaları ile uzanım gösterir. İlioçekal valv hem ileal içeriğin çekuma hızlı geçişini önler, hemde kalın bağırsağa geçen içeriğin tekrar ileuma reflüsünü engeller (2).

Appendiks vermiformis: Çekumun arka iç duvarından ilioçekal valvin 2-3 cm altından, üç tenyanın birleştiği yerden çıkan ince uzun bir boru veya solucan şeklinde ortalama uzunluğu 9 cm olan tubuler bir yapıdır. Çocuklarda yetişkinlerden daha uzundur. Appendiksin kanalı küçük olup lümeni ilioçekal valvin biraz aşağısında ve arkasında çekuma açılır ve açıldığı yerde yarım bir kapak vardır. Tabanı spina iliaca anterior superior ile umblikusu birleştiren çizginin üçte bir dışı (Mc Burney noktası) hizasındadır (2).

2.2.2-Çıkan Kolon

Çekumdan karaciğerin sağ lobu alt yüzüne kadar uzanmakta olup yaklaşık 15-20 cm uzunluğundadır. Bu düzeyde sola ve öne doğru kıvrılarak hepatik fleksurayı oluşturur. Ön yüzü ve yan yüzü periton ile örtülü olup arka yüzü ise gevşek bağ

dokusu ile karın arka duvarına tutunur. Ön yüzü ileum kıvrımları, omentum majusun sağ kesimi ve batın ön duvarı ile komşudur. İçte duodenum, ince bağırsaklar ve psoas majör kası ile ve dışta karın yan duvarı ile komşudur. Arkada iliak kas, quadratus lumborum kası, transversus abdominalis kasının aponerozu, sağ böbreğin alt dış kısmı ve sağ üreter ile komşudur (4).

2.2.3-Transvers Kolon

Hepatik fleksuradan başlayarak ve aşağıya doğru bir kavis yapıp umblikal ve sol hipokondriak bölgeyi çaprazlayıp geçer. Dalağın alt ucu düzeyinde aşağıya doğru bükülerek splenik fleksurayı oluşturur. Ortalama 30-60cm uzunluğundadır (2).

Transvers kolonun sağ ucu duodenum ikinci parçasına ve pankreas başına tutunur. Pankreas başından splenik fleksuraya kadar tamamen peritonla örtülü olup transvers mezokolon ile karın arka duvarına tutunur. Transvers kolon üst yüzü karaciğer alt yüzü, safra kesesi, mide büyük kurvatur ve dalağın ön kesimi ile komşudur. Arkada duodenumun inen parçası, pankreas başı, mezenterin üst bölümü, duodenojejunal fleksura ve ince bağırsak ansları ile komşuluk yapar. Önde karın ön duvarı ve ince bağırsaklarla komşudur (3).

2.2.4-İnen Kolon

Ortalama 25 cm uzunluğunda olup splenik fleksuradan başlayarak sol iliak fossaya kadar uzanır. Sol böbreğin dış kenarı komşuluğundan quadratus lumborum ve psoas majör kası arasında iliak krista düzeyine kadar iner. İliak kas ile psoas majör kası

önünde içe ve aşağıya kıvrılarak küçük pelvis giriminde sigmoid kolonda sonlanır (2).

Ön ve yan yüzeyi periton ile örtülü olup arka yüzeyi çıkan kolon gibi gevşek bağ dokusu ile karın arka duvarına yapışıkır. Arkada sol böbrek, iliak, psoas majör ve quadratus lumborum kasları ile komşudur. Önde jejunal bağırsak ansları ve karın ön duvarı ile komşuluk yapar (4).

2.2.5-Sigmoid Kolon

Sigmoid kolon minör pelvis giriminde psoas majör kası iç kenarından başlayarak bir kıvrım yapıp üçüncü sakral vertebra hizasında rektumla devam eder. Ortalama uzunluğu 40 cm'dir. Sigmoid kolon peritonla tamamen sarılı olup sigmoid mezokolon adı verilen uzunluğu değişebilen bir mezo ile karın arka duvarına tutunur (3).

Sigmoid kolonun şekli ve pozisyonu mezokolonun büyüklüğüne, uzunluğuna, kolon içeriğine, mesane, rektum ve kadında uterusun durumuna bağlı olarak değişir. Sigmoid kolonun aşağı kısımlarında tenyalar incelmeye başlar ve rektuma komşu kısmında tamamen kaybolur. Tenyaları oluşturan lifler rektumu saran longitudinal kas tabakası ile uzanırlar (2).

2.2.6-Rektum

Sigmoid kolon 3. sakral vertebra düzeyi sigmoid mezokolon alt ucunda rektum ile devam eder. Koksiks ve sakrumun konkavlığına uygun bir eğrilik göstererek aşağıya

doğru uzanır ve pelvik diafragmadan geçip anal kanal ile devam eder. Anorektal kavşak koksiks ucunun 2-3 cm önünde ve biraz aşağısında yer alır. Rektum alt ucundan itibaren anal kanal geriye ve aşağıya doğru uzanım gösterir (2).

Rektum uzunluğu ortalama 12 cm'dir. Üst kısmı boş iken 4 cm çapında olup alt kısmı ise daha geniştir ve ampulla adını alır. Sigmoid kolondan farklı olarak rektumun haustraları, appendiks epiploikaları, tenyaları ve mezenteri yoktur. Tenyalar sigmoid kolon ile rektum birleşme yerinin 5 cm üstünde iki geniş muskuler bant yaparak biri rektumun önünde diğeri arkasında aşağıya doğru uzanım gösterir. Rektum üçte iki proksimal kesimi periton ile örtülüdür. Ön yüzünü örten periton mesaneye geçerek erkeklerde ekskavyo rektovezikalis'i, kadınlarda uterusu geçerek ekskavyo rektouterina'yı (Douglas çıkmazı) meydana getirir. Periton sigmoid kolonda fibröz bağ dokusu ile kas tabakasına sıkıca yapışık olup rektumda ise genişlemesini sağlamak için yağ dokusu ile daha gevşek bir şekilde yapışiktır (3).

Rektumun alt parçasında genellikle 3 adet, bazen de 4 adet olan transvers plikalar vardır (Houtson kapakları). Dışkının rektuma geçişi defakasyon isteğini oluşturur (2).

Rektumun arkasında sakral vertebra alt ucu, koksiks, ganglion impar ve süperior rektal arter-ven dalları bulunur. Yan taraflarda piriformis kası, sempatik trunkus, lateral sakral arter-ven, koksiks ve levator ani kasları bulunur. Rektum, sakral açıklık boyunca fibroareolar doku ile sakruma tutunur. Bağ dokusu içinde sakral sinirler, pelvik splanknik sinirler, süperior rektal arter-ven, lenfatikler ve yağ dokusu bulunur. Ön tarafta rektumun komşulukları her iki cinsiyette farklı olup erkekte üstte mesanenin tabanının üst parçası, vezikula seminalis ve ekskavyo rektovezikalis ile altta mesanenin tabanının alt parçası, vezikula seminalis, duktus deferens, üreterin terminal ucu ve prostat ile komşudur. Kadında üstte uterus, vaginanın üst kısmı ve ekskavyo rektouterina ile altta vaginanın alt kısmı ile komşudur. Lateralde rektumun üst parçası pararektal fossa ile altta pelvik plexus,

koksigeus kası, levator ani kası ve süperior rektal damarların dalları ile komşudur (4).

2.2.7-Kolonun Arteriyel ve Venöz Dolaşımı

Kalın bağırsağın çekumdan splenik fleksuraya kadar olan segmenti superior mezenterik arterin dalları tarafından beslenir. Çekum ileoçekal arterin çekal dalından, Appendiks ramus appendicesden, çıkan kolon sağ kolik arterden, transvers kolonun üçte iki sağ kesimi arteria kolika medianın dallarından beslenir. Splenik fleksura ve distalindeki kolon segmentleri inferior mezenterik arterin dalları tarafından beslenir. Splenik fleksura ve inen kolonu sol kolik arter, sigmoid kolonu sigmoid arter ve rektumu da superior rektal arter besler.

Kolonun mezenterik kenarına paralel seyreden bir dizi arterin birleşerek tek bir arter oluşturmasıyla Drummond'un marjinal arteri oluşur ve kolonun 1-8 cm uzağında bulunabilir. Ayrıca rektum ve anal kanalı internal iliak arterin arteria rektalis media dalı, internal pudental arterin inferior rektal arter dalı ve abdominal aortanın bifurkasyosundan çıkan arteria sakralis media dalı besler.

Kalın bağırsakların venleri superior ve inferior mezenterik venlere dökülür. Rektumun ve anal kanalın çevresindeki ven pleksusundan çıkan dalların bir kısmı inferior mezenterik vene superior rektal ven aracılığıyla ve bir kısmı da internal iliak vene medial ve inferior rektal venler aracılığıyla dökülürler (2-6).

2.2.8-Kolonun Sinirsel İnervasyonu

Transvers kolonun üçte iki sağ kesimi, çıkan kolon, çekum ve appendiks sempatiklerini çöliak ve superior mezenterik pleksuslardan, parasempatiklerini ise nervus vagustan alırlar. Anal kanalın üst kısımları, rektum, sigmoid kolon, inen kolon ve transvers kolonun üçte bir sol kesimi sempatiklerini sempatik trunkusun lumbar kısmından ve superior hipogastrik pleksustan, parasempatiklerini ise pelvik splanknik sinirlerden (nervi erigentes) inferior hipogastrik pleksus (pelvik pleksus) vasıtasıyla alırlar (2).

2.2.9-Kolonun Lenfatik Sistemi

Kolon ve rektumun mukoza ve serozası altında yer alan lenfatik pleksusu vardır ve mezokolon içerisinde bulunan lenf nodlarına drene olur. Mezenter içerisindeki lenf nodları ve lenfatikler o bağırsak segmentini besleyen damarlar boyunca yerleşimlidir. Bu lenf nodları epikolik, parakolik, ara ve ana lenf nodları olarak dört grupta toplanır. Epikolik lenf nodları kolonun üzerinde, parakolik lenf nodları marjinal damar ile kolonun arasında bulunurlar. Ara lenf nodları kolik damarlar boyunca ve ana lenf nodları ise superior ve inferior mezenterik damarlar boyunca yerleşim gösterirler.

Anal kanal ve rektum lenfatikleri o bölgeyi besleyen damarlar boyunca yer alır ve aşağı, yukarı veya yana doğru drene olabilirler. Aşağı doğru drenaj rektumun arkası ve anal kanal etrafında ki pleksustan iskiorektal yağ dokusuna, inguinal lenf nodlarına veya internal iliak lenf nodlarına olur. Yukarı doğru drenaj inferior mezenterik arter seyrince olurken, yana doğru drenaj ise arteria rektalis media boyunca internal iliak lenf nodlarına ve dolayısı ile pelvik duvara doğru olur (2,7).

2.3-KALIN BAĞIRSAK HİSTOLOJİSİ

2.3.1-Kolon

Kolon, tüm sindirim kanalında olduğu gibi fibromusküler bir tüp şeklindedir. Bu tüpün duvarı içten dışa doğru şu yapılardan oluşur:

a) Mukoza

- 1-Döşeyici Epitel
- 2-Lamina Propria
- 3-Muskularis Mukoza

b) Submukoza

c) Muskularis Eksterna

- 1-Longitudinal Kas Tabakası
- 2-Sirküler Kas Tabakası

d) Seroza ve Adventisya

a) Mukoza

Kolon mukozasında çok sayıda hilal şeklinde katlantılar mevcuttur ve villüs yapısı barındırmaz. Mukoza, birbirine yakın yerleşimli, çok sayıda tübüler bez veya kriptler içerir. Mukozal yüzey ve bezler silindirik epitelin ile döşelidir. Bu epitelin temel

fonksiyonu bağırsak içerisindeki fazla suyu ve elektrolitleri absorbe etmektir. Birçok silindirik hücre müsin ve antikor (IgA) sentezler. Bu antikorlar patojenik organizmalardan korunmayı sağlar. Birçok goblet hücresi mevcuttur ve sayıları kaudale gidildikçe artar. Bu hücreler tarafından salgılanan mukus lubrikan bir işlev görerek yarı katı maddelerin kolondan geçişini kolaylaştırıcı bir işlev görür. Kolonda Paneth hücreleri bulunmaz ancak bir miktar endokrin hücre ve kök hücre bulunabilir. Lamina propriada bulunan soliter lenfatik folliküllerde M hücreleri bulunur. M hücrelerinin kök hücrelerden köken aldığı ve antijene yönelik yanıtta rol aldığı düşünülür. Bu hücreler lümenal yüzeyden aldıkları antijenleri dar olan sitoplazmalarından geçirerek parçalı olan bazal zardan bağ dokudaki lenfositlere iletir ve IgA salgılanmasında rol oynar.

a-1) Döşeyici Epitel: Döşeyici epitel anal kanalın distali haricinde kolon boyunca silindirik epitelden oluşmaktadır. Daha önce belirtildiği gibi bu epitel endodermal kökenlidir. Anal kanalın distali ise çok katlı yassı epitel ile döşelidir. Bu bölgeyi döşeyen epitel ise yüzey ektodermi kökenlidir.

a-2) Lamina Propria: Lamina propria glikozaminoglikan bir matris içine gömülmüş kollajen ve retiküler fiberlerden oluşur. Bu katmanda fibroblastlar, kılcal damarlar, lenf kanalları ve sinir yapıları izlenir. Yine bu bölgede belirgin lenfoid agregatlar ve dağınık halde bulunan lenfositler mevcuttur. Bu lenfoid dokunun bir kısmı submukozaya da yayılır. Bu lenfoid agregatlar MALT (Mukosa İlişkili Lenfoid Doku) veya GALT (Sindirim Kanalı İlişkili Lenfoid Doku) olarak isimlendirilir.

a-3) Muskularis Mukoza: Lamina propria ve submukozayı birbirinden ayıran ince bir düz kas tabakasıdır. Sirküler olarak lümeni çevreleyen bir iç tabakası ve longitudinal uzanan bir dış tabakası mevcuttur. Muskularis mukoza, mukozal katlantıların içine uzanır ancak villüs yapılarının (kolon dışındaki bağırsak segmentlerinde görülür) içine uzanmaz. Muskularis mukoza kasılmaları bağırsak içeriğinin karışması için önemlidir.

b) Submukoza

Mukozayı, muscularis eksternaya bağlayan gevşek bağ dokusudur. Submukozanın bu gevşek yapısı mukozanın, kas tabakası üzerinde bir miktar hareket edebilmesine imkan tanır. Submukoza içerisinde çok sayıda kan damarı, lenfatik ve sinir yapıları geçer. Bu yapıların küçük dalları mukozaya geçiş yapar. Submukoza genellikle yağ hücreleri içerir. Ayrıca bu bölgede müsifaj ismi verilen, PAS pozitif granüller içeren bazı hücreler de bulunur. Bu hücreler özellikle rektumda sayıca fazladır.

c) Muskularis Eksterna

Anal kanalın en distal kısmı hariç bu kas tabakası düz kas hücrelerinden oluşmaktadır. Anal kanalın duvarına çok yakın yerleşimli çizgili kas fiberleri mevcuttur. Kas tabakası tipik olarak sirküler bir iç tabaka ve longitudinal bir dış tabakadan oluşur. Aslına bakılırsa bu iki tabaka da spiral olarak uzanan düz kas fasiküllerinden meydana gelir. Düz kas fasikülleri iç kısımda sıkışık bir dizilim göstererek sirküler bir yapı oluşturur; dış kısımda ise boylu boyunca uzanarak longitudinal tabakayı oluşturur.

c-1) Longitudinal Kas Tabakası: Kolona has bir yapıya sahiptir. Buradaki kas fiberleri üç farklı noktada bir araya gelerek Tenia Coli ismi verilen kalın ve belirgin kas demetlerini oluşturur. Tenyalar arasındaki boşluklarda yine ince bir longitudinal kas tabakası mevcuttur. Tenya yapıları, kolonun uzunluğundan daha kısa olduğu için kolon duvarında keseleşmiş yapılar (haustra) oluşmasına neden olur.

c-2) Sirküler Kas Tabakası: Lokal kalınlaşmalar göstererek sfinkter ismi verilen ve lümeni kapatarak bir vana sistemi gibi iş gören yapılar oluşturur. İleoçekal bileşkede ve iç anal sfinkterde bu kalınlaşmış sirküler kas yapıları izlenir.

d) Seroza ve Adventisya

Kas tabakasının çevresinde seroza bulunur. Bu tabaka yalnızca viseral peritondan oluşur ve rektum büyük bir kısmı, inen ve çıkan kolonun arka yüzü hariç tüm kolonu çevreler. Serozanın bulunmadığı alanları yağ ve bağ dokusundan oluşmuş adventisya çevreler. Adventisya ile çevrelenen bölgeler tamamen seroza ile çevrili bölgelere göre hareketsizdir.

2.3.2-Appendiks Vermiformis

Appendiks vermiformisin histolojisi aşağıda bahsedilen özellikler haricinde genel kolon histolojisi ile benzerdir.

1. Appendiks vermiformis sindirim kanalının en dar bölgesidir.
2. Kript oluşumu kolona göre daha azdır.
3. Longitudinal kas tabakası her bölgesini eşit kalınlıkta sarar ve tenia coli yapıları burada mevcut değildir.
4. Submukozada belirgin bir lenfoid doku mevcuttur. Hatta bu doku, submukozayı boydan boya doldurabilir. Bu bölgedeki lenfoid doku doğum sırasında mevcut değildir. Zamanla çoğalır ve yaklaşık 10 yaşında en belirgin haline ulaşır. Bu dönemden sonra, yıllar geçtikçe lenfoid doku yavaş yavaş azalır.

2.3.3-Rektum

Rektumun histolojisi aşağıda bahsedilen özellikler haricinde genel kolon histolojisi ile benzerdir.

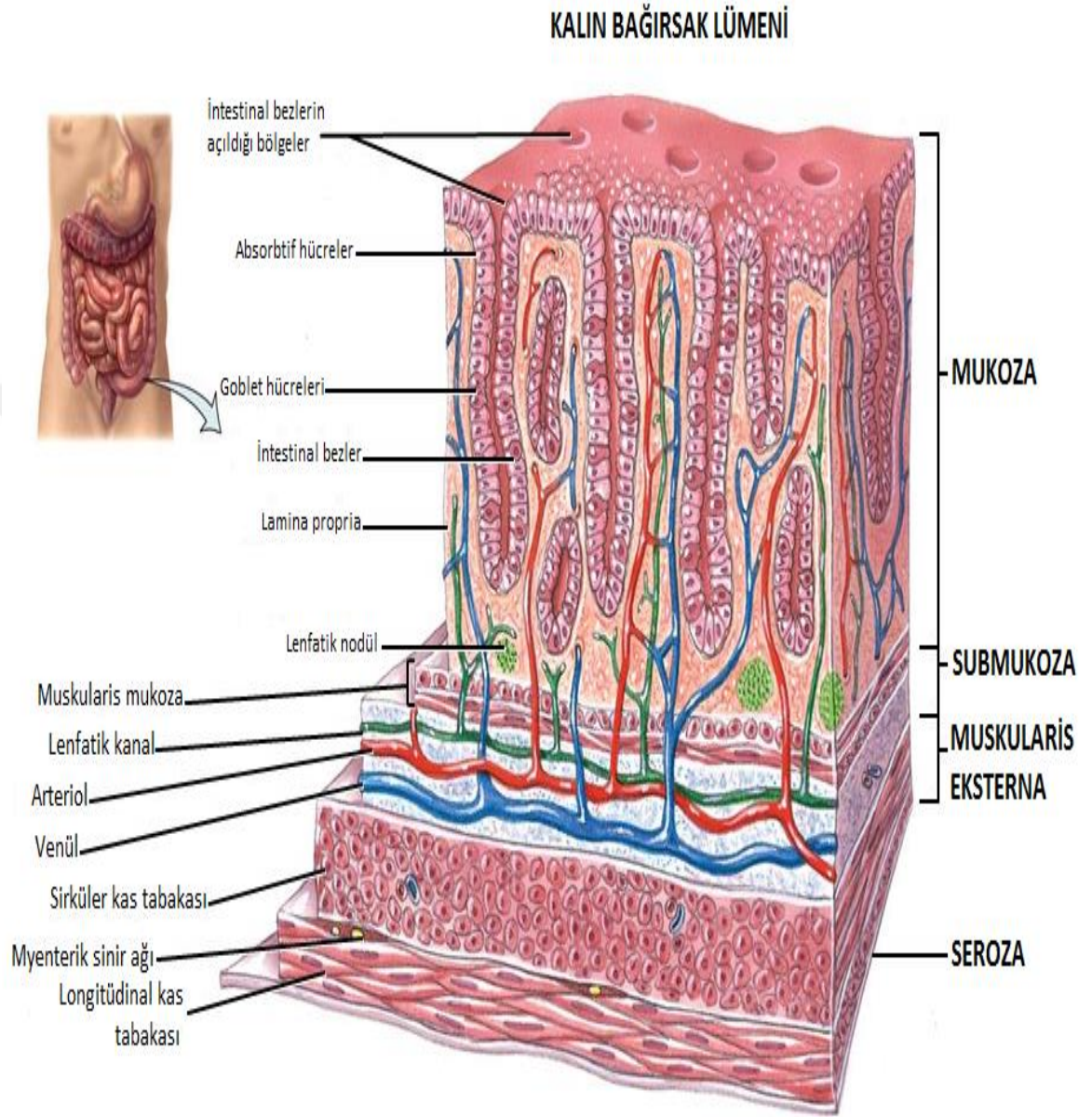
1. Longitudinal kas tabakası her bölgesini eşit kalınlıkta sarar ve tenia coli yapıları burada mevcut değildir.
2. Viseral periton (seroza) rektumun üst 1/3'ünün ön ve yan yüzünü, orta 1/3'ünün de ön yüzünü çevreler. Rektumun geri kalan bölgelerinde seroza yoktur.

2.3.4-Sinir Ağları

Sindirim kanalı sinir ağından zengin bir bölgedir. Başlıca sinir ağları şunlardır:

- (a) Myenterik ağ (Auerbach) muscularis eksterna tabakasının sirküler ve longitudinal kasları arasında seyreder.
- (b) Submukozal ağ (Meissner) submukoza içinde, muscularis eksterna tabakasının sirküler kaslarına yakın seyreder.
- (c) Muskularis mukoza çevresinde üçüncü bir sinir ağı mevcuttur.

Bu ağları oluşturan sinirler hem afferent hem de efferent özelliktedir. Efferent sinirler düz kasları ve bezleri uyarır (8).



Figür 5: Şekilde kolon duvarı kesitinin üç boyutlu bir şeması izlenmektedir. (8)

2.4-KOLOREKTAL KARSİNOMLAR

2.4.1-Klinik

Kolorektal karsinomlar sanayileşmiş ülkelerde en sık görülen ve kansere bağlı ölümlerden en çok sorumlu olan kanserlerden biridir ancak Asya ve Afrika'da görülme insidansı bu kadar yüksek değildir. Örneğin, kolorektal kanser günümüzde kadın ve erkekler arasında üçüncü en sık görülen kanserdir (9). Kolorektal kanser insidansının coğrafi bölgeler arasında ciddi farklar göstermesinin en büyük sebeplerinden birinin diyet olduğuna inanılmaktadır; buna en belirgin örnek olarak kolorektal kanser oluşumu ile ciddi bir ilişkisi olan yüksek et tüketimi (hayvansal yağlar) gösterilebilir. Zirve insidans hayatın yedinci dekatında görülür ve erkeklerde daha fazladır. Sigmoid kolon ve rektum en çok etkilenen segmentlerdir (10).

40 yaşından önce kolorektal karsinom gelişen kişilerde genetik yatkınlık mevcuttur. Bunlardan en sık görüleni Lynch (Hereditär non-polipöz kolorektal kanser-HNPCC) sendromudur. Bu sendrom otozomal dominant kalıtım gösterir ve DNA uyumsuzluk tamir genleri olan MLH1, MSH1, bazen de PMS2 veya MSH6 silinmesine bağlı olarak gelişir (11). Sporadik kolorektal karsinomların yaklaşık %15'i MLH1 düzenleyicisinin metilasyonuna bağlı olarak uyumsuzluk tamiri yetersizliğinden kaynaklanır (genellikle kadınlarda görülür ve kadınlarda sıktır) (12). Uyumsuzluk tamir yetmezliği nedeniyle oluşan kolorektal adenokarsinomlarda belirgin yüksek mikrosatellit instabilitesi (MSI-H) mevcuttur. PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) tabanlı metotlarla mikrosatellit instabilitesi değerlendirilebileceği gibi immünohistokimyasal yöntemlerle de uyumsuzluk tamir proteinlerinin kaybı taranabilir. Lynch sendromlu hastalar ortalama 50 yaşında kolon kanserine yakalanırlar ve kanser çekum, çıkan kolon ve transvers kolon yerleşimli olur. Multipl primer tümör varlığı görece daha sıktır. Lynch sendromlu hastalar ayrıca

endometrium, üreter, renal pelvis, ince bağırsak ve overler gibi viseral organ kanserlerine yakalanma konusunda belirgin bir şekilde daha yüksek riske sahiptirler (13). Muir-Torre sendromu, sebace tümörleri olan Lynch sendromlu hastalara verilen isimdir (14). Turcot sendromu, beyin tümörü ve kolon kanserinin birlikte görüldüğü durumlara verilen isimdir; Lynch sendromu olan hastalarda astrositom veya glioblastom görülebilir. Lynch sendromlu hastaları tanıyabilmek için klinik ilkeler belirlenmiştir; revize edilmiş Bethesda ilkeleri (Revised Bethesda Guideline) yaygın olarak kullanılmaktadır ve klinik ve histolojik birçok parametre içermektedir (15). Güncel olarak elimizdeki bir tümörün yüksek mikrosatellit instabilitesinin (MSI-H) olup olmadığını tahmin edebilmek için birçok algoritma geliştirilmiştir (çeşitli klinik ve histolojik özellikler) ancak enstitüler arasındaki pratik uygulamalar birbirinden çok farklıdır (16-18). FAP (Ailesel Adenomatöz Polipozis), MUTYH ilişkili polipozis, serrated polipozis, herediter mikst polipozis sendromu, Peutz-Jeghers sendromu, juvenil polipozis ve PTEN hamartoma sendromu (Cowden sendromu) gibi kalıtsal sendromlar da kolorektal karsinom riskini yükseltir. Kronik inflamatuvar bağırsak hastalıkları da (Crohn hastalığı ve ülseratif kolit), özellikle pankolitli hastalarda, kolon kanseri riskini arttıran sebeplerdir (hastalık başlangıcından 8-10 sene sonra).

Kolorektal kanseri olan hastalar, kanserin primer odağına göre farklı klinik belirtiler gösterir. Hematokezya ve kabızlık rektosigmoid kanserler için en sık klinik bulgu iken anemi ve kilo kaybı kolonun boydan boya her bölgesinden köken alan kanserler için sıktır. Bazı hastalar ise obstrüksiyon veya perforasyon ile prezente olabilirler (10).

2.4.2-Makroskopik Görünüm

Kolorektal karsinomlar çok farklı makroskopik görünüme sahip olabilirler, mesela mantarlaşan lümen içi kitleler; kenarları eleve, ortası ülserle tümörler (Figür 6); ve dairesel striktür yapan tümörler (Figür 7). Kesit yüzleri genellikle uniform, sıkı ve beyaz renklidir. Kolorektal karsinomların yaklaşık %10'u ise (müsinöz adenokarsinomlar) yumuşak ve mukoid bir kesit yüzüne sahiptir. Viseral peritoneal invazyonlar serözal buruşukluklar şeklinde kendini gösterebilir ve bu bölgeler evreleme doğruluğu açısından tam kat örneklenmelidir.



Figür 6: Ortası ülserle ve kenarları kabarık görünümde rektal adenokarsinom. (10)

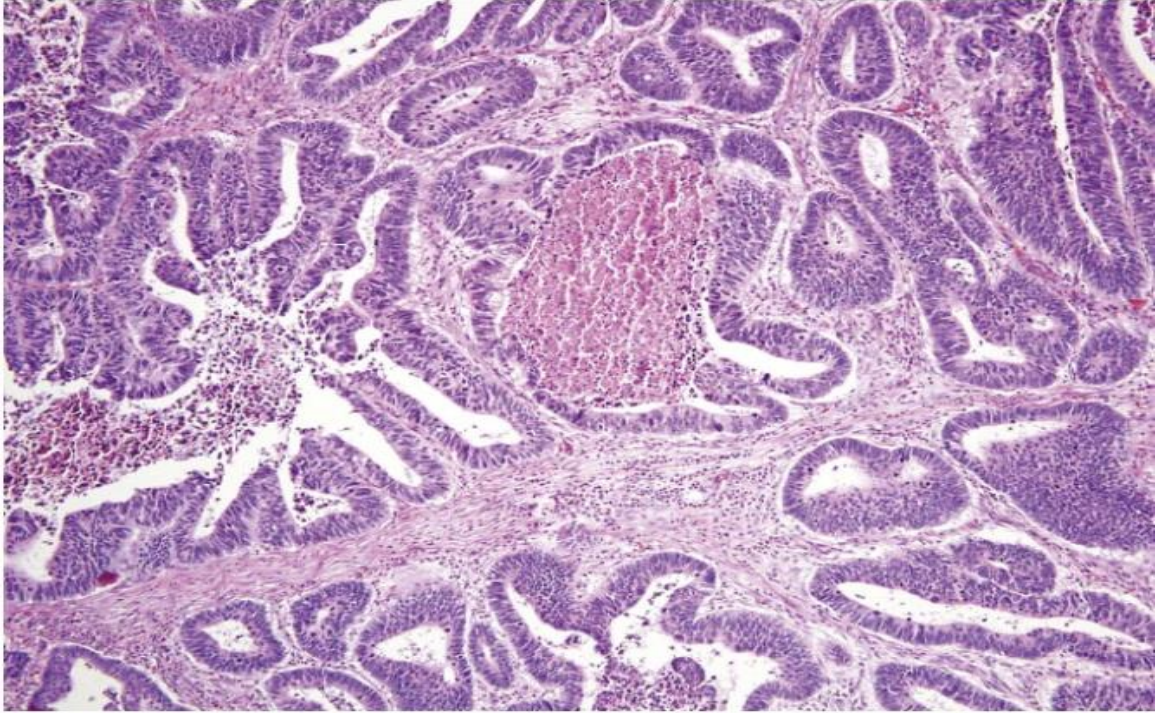


Figür 7: Uzun süredir ülseratif koliti olan hastada gelişen ve striktür oluşturmuş kolon adenokarsinomu. Proksimal ve distal mukoza atrofik görünümde. (10)

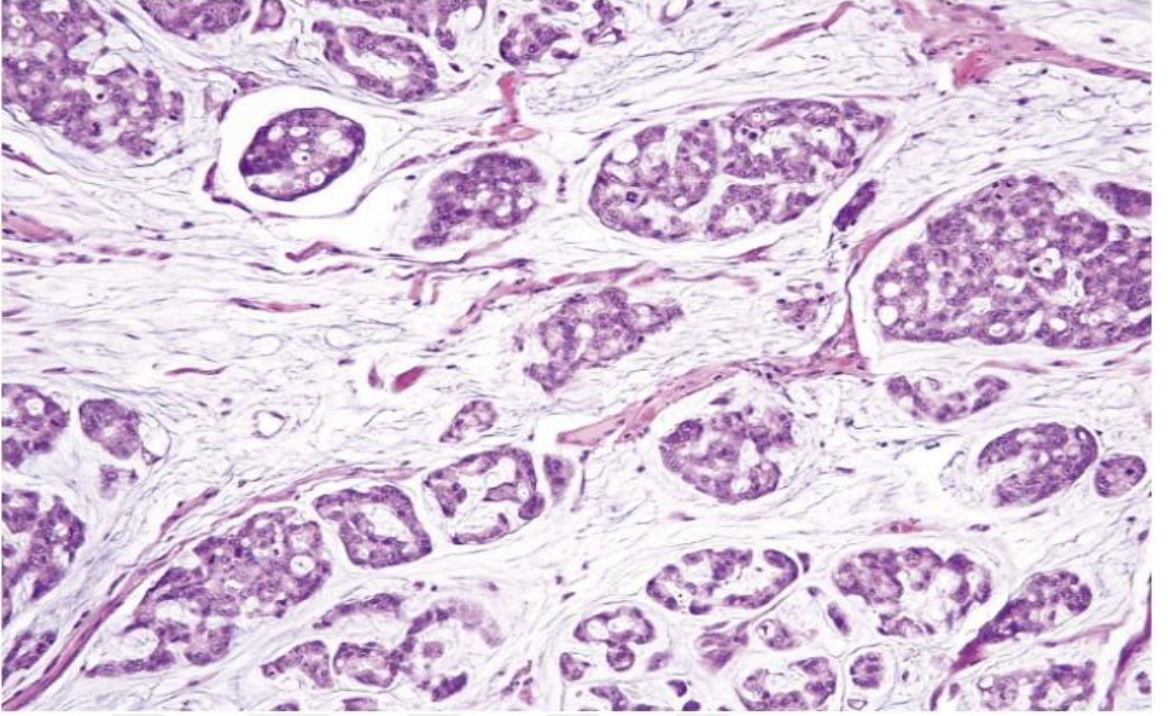
2.4.3-Histolojik Görünüm

Adenokarsinomlar kolorektal karsinomların %90'ından fazlasını oluşturur. Glandüler farklılaşma genellikle çok rahat farkedilebilir. Kolorektal karsinomlar submukozayı infiltrate ettiklerinde metastatik potansiyel kazanırlar. Klasik adenokarsinomlar desmoplastik bir stroma içinde düzensiz dağılımlı tübüler yapılardan oluşur ancak intralüminal kirli nekrozların görüldüğü kompleks kribriform yapılar da yapabilir (Figür 8). Müsinöz adenokarsinomlar kolon karsinomlarının %10'unu oluşturur ve belirgin ekstrasellüler müsin gölleri (tanımsal olarak tümör alanının %50'sinden fazlası olmalı) ile karakterizedir (Figür 9). Taşlı yüzük hücreli karsinomlar çekirdeği kenara itmiş, büyük vakuoller oluşturan yoğun hücre içi müsin içeren diffüz, infiltratif kordlar, yuvalanmalar ve katmanlar şeklinde görünür (Figür 10). Bazı taşlı yüzük hücreli adenokarsinomlarda neoplastik hücreler müsin gölleri içinde yüzer. Yine aynı şekilde bir adenokarsinomu taşlı yüzük hücreli olarak adlandırabilmek için tümörün %50'sinden fazlasının taşlı yüzük görünümünde olması gerekir. Müsinöz ve taşlı yüzük hücreli komponentler tümörün %50'sini oluşturmadığı durumlarda da

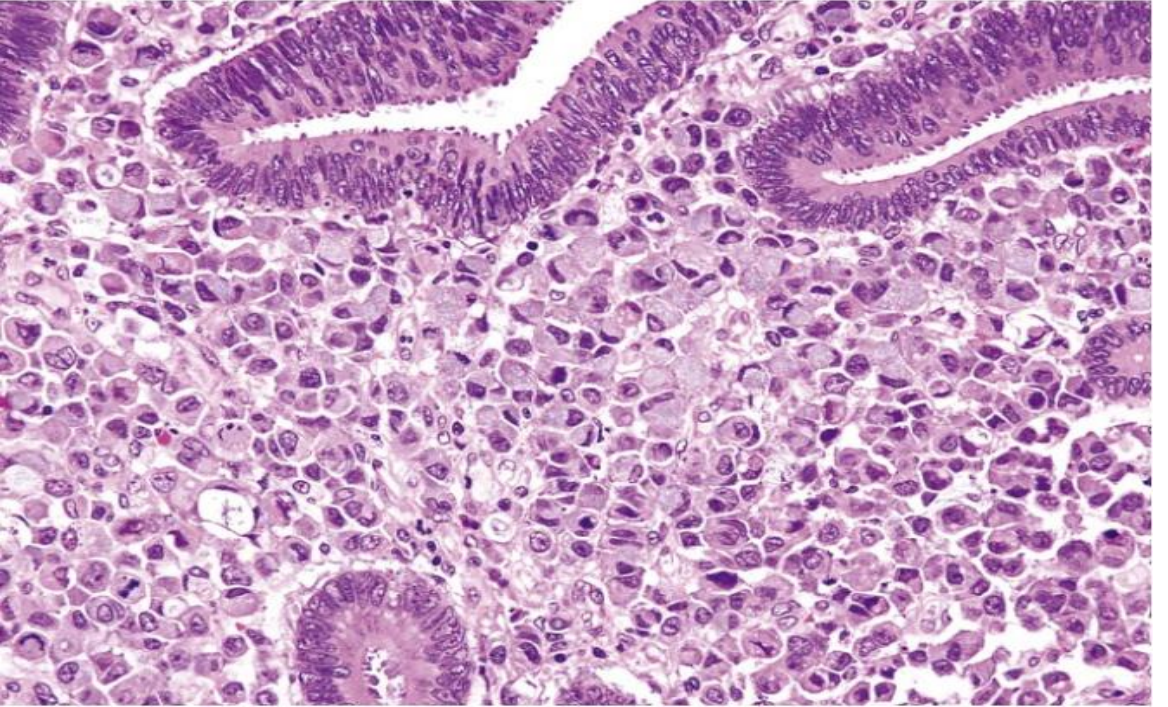
prognostik özelliklerinden dolayı ve mikrosatellit instabiliteyi tahmin etmede yardımcı olduğu için raporda belirtilmelidir. Medüller karsinom, veziküler çekirdek, belirgin çekirdekçik ve eozinofilik-amfofilik sitoplazmaya sahip büyük epitelioid hücrelerin meydana getirdiği katmanlardan oluşmuş nadir bir adenokarsinom tipidir (Figür 11). Bazen bu tümör içine infiltre olmuş çok sayıda lenfosit izlenir (19). Diğer nadir varyantlar serrated adenokarsinom ve adenoskuamöz karsinomdur (20,21). Küçük hücreli karsinomlar ve büyük hücreli nöroendokrin karsinomlar çok nadiren kolorektal adenomdan veya bilindik adenokarsinomdan köken alır (22,23).



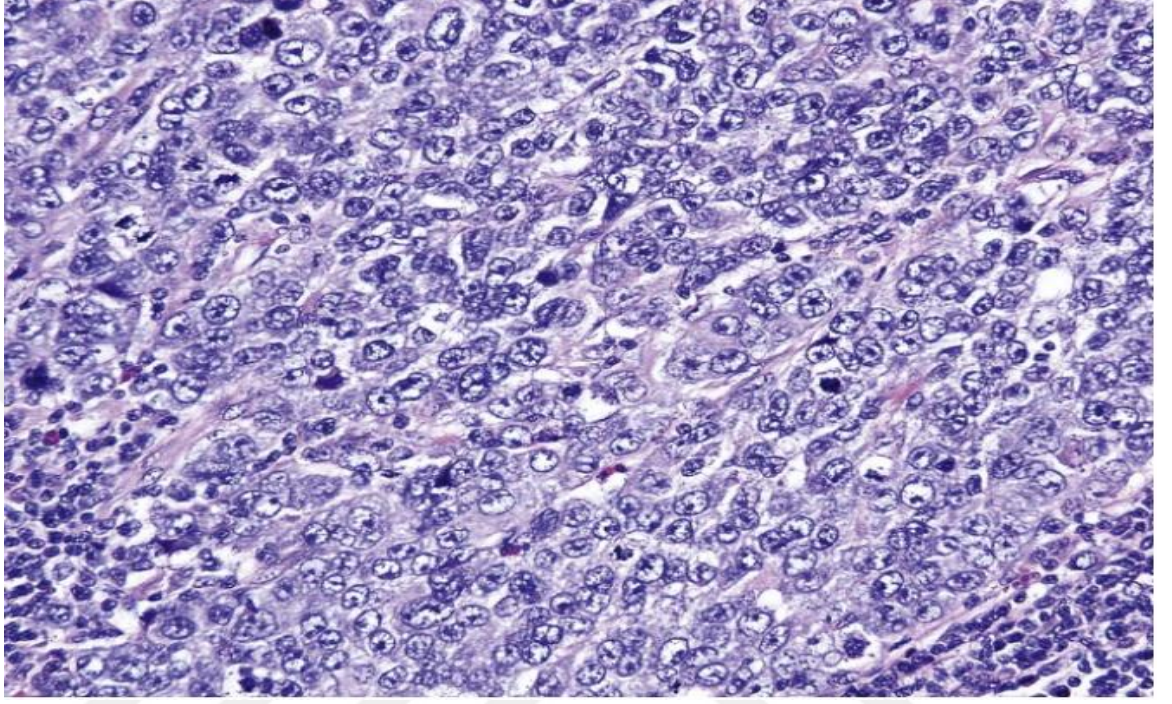
Figür 8: İnteraluminal kirli nekroz içeren düşük dereceli kolon adenokarsinomu. (10)



Figür 9: Kolonun müsinöz adenokarsinomu. Tümör hücre grupları ekstrasellüler müsin içinde yüzmektedir. (10)

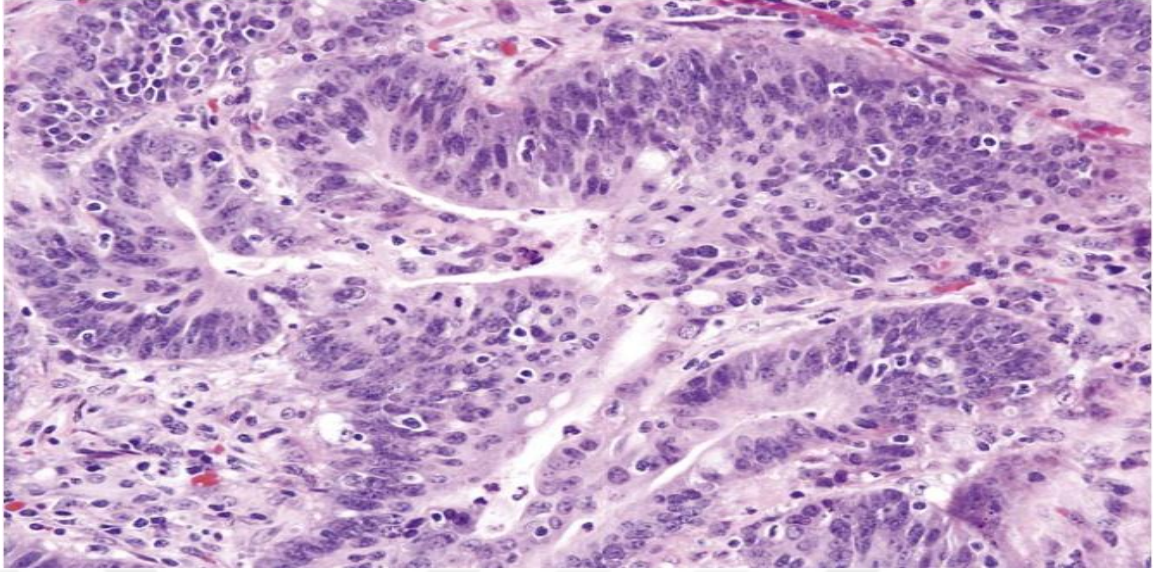


Figür 10: Kolonun taşlı yüzük hücreli adenokarsinomu. İntrasitoplazmik müsin nedeniyle hücre çekirdekleri perifere itilmiş görünümündedir. (10)

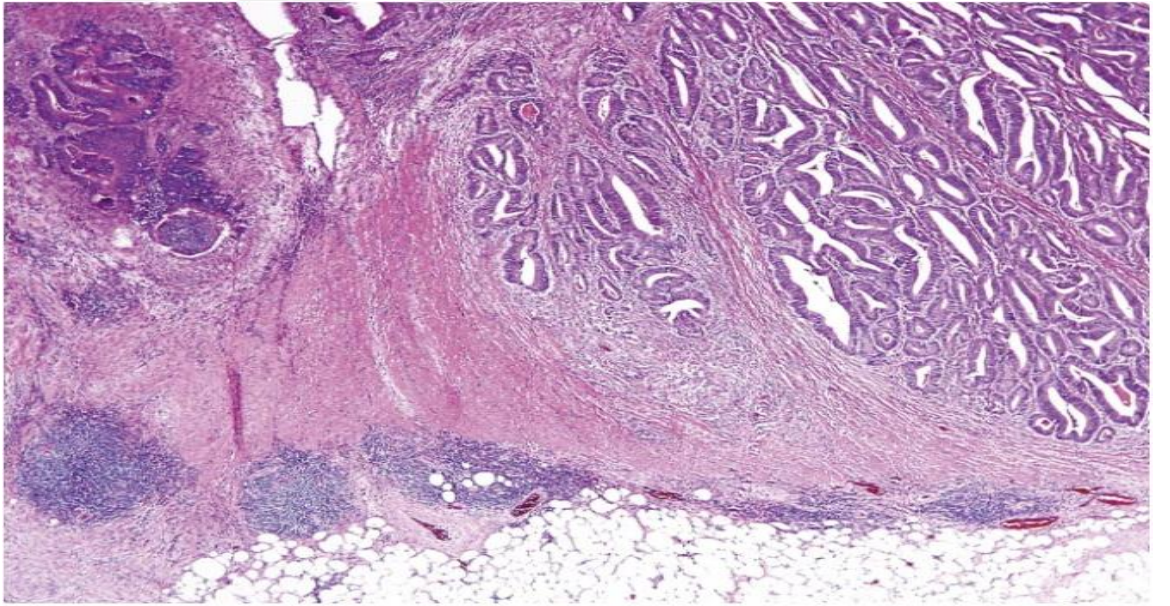


Figür 11: Kolonun medüller adenokarsinomu veziküler kromatin ve belirgin çekirdekçik içeren büyük ve farklılaşmamış hücre katmanlarından oluşmaktadır. (10)

Tümörün erken yaşta ortaya çıkması ve proksimal yerleşimli olmasının yanısıra bazı histolojik bulgular da yüksek mikrosatellit instabilitesi (MSI-H) ile ilişkilidir. Bu histolojik bulgulardan bazıları tümörün müsinöz, taşlı yüzük veya medüller farklılaşma gösteren komponent içermesi; tümörü infiltrate eden lenfosit (Figür 12) veya Crohn benzeri reaksiyon bulunması (Figür 13); ekspansil tümör sınırları, kötü differensiyasyon varlığı ve belirgin intratümöral heterojenite sayılabilir (12,16).



Figür 12: Tümörü belirgin bir şekilde infiltre eden lenfosit varlığı mikrosatellit instabilitesi olan tümörlerin özelliğidir. (10)



Figür 13: Crohn benzeri inflammatuar reaksiyon gözlenen kolon adenokarsinomu. Muskularis proprianın ötesindeki lenfoid agregata dikkat ediniz. (10)

Geleneksel olarak kolorektal adenokarsinomların derecelendirmesi glandüler formasyonu iyi olan tümör yüzdesi baz alınarak iyi differansiye ($>95\%$), orta derecede differansiye ($50\%-95\%$) veya kötü differansiye ($<50\%$) şeklinde yapılır ancak pratik uygulamalarda birçok patolog daha "Gestaltçı" bir uygulamaya meyillidirler ve vakaların büyük bir kısmını (yaklaşık üçte ikisi) orta derecede

differentiye olarak evrelerler. İyi differentiye adenokarsinomlar tübüler adenomlara çok benzer ve bu tip morfoloji en sık ülseratif kolit zemininde oluşmuş adenokarsinomlarda görülür (24). Kötü differentiye adenokarsinomlar geniş alanlarda solid büyüme paterni, infiltratif yuvalar ve tekli hücreler içermesinin yanı sıra sıklıkla belirgin bir nükleer heterojenite de gösterirler. Glandüler differansiyasyon göstermeyen karsinomlar andifferentiye olarak sınıflandırılırlar. Gözlemciler arası derecelendirme farkını azaltabilmek için birçok çalışma grubu iki sınıflı bir sisten önermişlerdir: düşük dereceli (iyi ve orta derecede differentiye) ve yüksek dereceli (kötü differentiye). Ancak bu sınıflama sadece mikrosatellit instabilitesi olmayan vakalarda prognostik faktör olarak kullanılabilir. Taşlı yüzük hücreli, müsinöz ve medüller adenokarsinomlar histolojik olarak yüksek dereceli olmasına rağmen bu varyantlar yüksek mikrosatellit instabilitesi (MSI-H) olan hastalarda sık görülür ve bu hastalar görece daha iyi prognoza sahiptir, bundan dolayı bu varyantlar düşük dereceli olarak değerlendirilmelidir (25).

2.4.4-Prognostik Belirteçler

Kolorektal adenokarsinomlarda en önemli prognostik faktör tümörün evresidir. Cerrahi patologlar için belirlenmesi en kritik olan bulgular viseral peritoneal invazyon (serozal) ve lenf nodu metastazı olup olmadığıdır. Bundan dolayı makroskopik olarak anormal görünen serozanın dikkatlice örneklenmesi gerekir. Tümör hücreleri peritoneal yüzeye çıkıp, mezotelyal hiperplazisi ve inflamatuvar reaksiyon oluşturmuşsa tümör evre T4a olarak sınıflandırılmalıdır. Birçok çalışma az miktarda lenf nodu incelemesinin (muhtemelen metastatik lenf nodları es geçildiği ve evreleme var olandan daha düşük raporlandığı için) daha kötü prognoza sebep olduğunu göstermektedir. Tüm segmental kolektomi materyallerinde en az 12 adet lenf nodu diseke edilmesi önerilmektedir (26). Neoadjuvan kemoterapi sonrası rektal rezeksiyon materyallerinde yeterince lenf nodu bulunamayabilir, böyle vakalarda perirektal yağlı dokunun genişçe örneklenmesi gerekir.

Kötü prognozun diğer histolojik belirteçleri ise ektramural venöz invazyon, lenfovasküler invazyon, infiltratif tümör sınırları, invazif bölgedeki tümör tomurcuklanması ve perinöral invazyondur (27). İyi prognoz göstergesi olan histolojik özellikler ise tümörü infiltre eden lenfositler, tümör çevresinde lenfoid cevap ve Crohn benzeri lenfoid reaksiyon varlığıdır. Daha önce de belirtildiği gibi bu özellikler daha ziyade mikrosatellit instabilitesi olan ve böylelikle iyi prognozla seyreden mikrosatellit instabiliteye bağlı tümörlerde görülür (28).

AJCC'nin (American Joint Committee on Cancer) yaptığı kolorektal kanser çalışma grubu konferansında prognostik kriterlerin pratik kullanımdaki değeri açısından cesur bir sınıflama yapılmıştır.

Kategori 1: Literatür tarafından iyi desteklenmiş, hasta yönetiminde genellikle kullanılan ve TNM evrelemesini geliştirmede önemi belirgin olanlar.

Kategori 2A: Biyolojik ve/veya klinik olarak genişçe çalışılmış, terapi için prognostik değere sahip, patoloji raporunda belirtilmesi yeterli olanlar.

Kategori 2B: İyi çalışılmış ancak Kategori 1 ve Kategori 2A'ya yerleştirilemeyenler.

Kategori 3: Kategori 1 ve 2'ye girebilecek kadar desteklenemeyenler.

Kategori 4: Çalışılmış ancak herhangi bir prognostik değere sahip olmayanlar.

Kategori 1 içinde serum CEA düzeyinin 5.0ng/ml üzerinde olması, lenf nodu invazyonu ve evreleme bulunmaktadır. Kategori 2A içinde vasküler invazyon, perinöral invazyon, cerrahi sınırlar ve mikroskopik derece bulunmaktadır (29).

2.4.5-İmmünohistokimya ve Moleküler Patoloji

Konvensiyonel (mikrosatellit stabil) kolorektal adenokarsinomlar CEA eksprese ederler ve genellikle CK20, CDX-2 ve STAB2 transkripsiyon faktörleri kuvvetli pozitifdir (30,31) ancak TTF-1, PAX8 ve WT-1 negatiftir. CK7 tümörlerin çok küçük bir oranında (%5-10) fokal pozitifdir. Birçok vakada güçlü p53 immünreaktivitesi görülür, bununla birlikte nükleer β -katenin boyanması mevcuttur. Özellikle ileri evre karsinomlarda olmak üzere, tümörlerin yaklaşık %20'sinde SMAD4 (DPC4) protein ekspresyonu kaybı mevcuttur. Yüksek mikrosatellit instabilitesinin olduğu kolorektal adenokarsinomlarda CK20 ekspresyonu daha az yaygındır ve hatta %20'sinde CK20 ekspresyonu tamamiyle yoktur (32). Bu tip tümörlerde CDX-2 ekspresyonu da azalmıştır (33). Medüller karsinomlar genellikle çok sınırlı CK20 ve CDX-2 ekspresyonu gösterirler ve hatta bazen tamamen negatiftirler; bu tip vakalarda tanıyı destekleyebilmek için uyumsuzluk tamir eksikliği taraması yapılmalıdır (34,35).

Lynch sendromuna ve sporadik yüksek mikrosatellit instabilitesine (MSI-H) bağlı kolorektal karsinomlarda MLH1, MSH1, PMS2 ve MSH6 için immünohistokimyasal tarama testi yapılırken MLH1 ve PMS2nin; MSH1 ve MSH6'nın heterodimer oldukları unutulmamalıdır (36). Sporadik yüksek mikrosatellit instabilitesine (MSI-H) bağlı kanserler hem MLH1 ve PMS2 ekspresyon kaybı gösterir. Lynch sendromuna bağlı kanserler MLH1 veya PMS2 mutasyonu gösterdikleri gibi bu iki proteinde ekspresyon kaybı da gösterirler. Yine aynı şekilde MSH1 veya MSH6 mutasyonu olanlarda bu iki proteinin ekspresyon kaybı izlenir. Neoadjuvan kemoterapi alan rektal adenokarsinomlarda MSH6 ekspresyonu zayıflar veya kaybolur, bu durum da tanısal bir tuzak oluşturur (12). Bazı nadir tümörler tek protein kaybı gösterirler ve bu durum nerdeyse her zaman Lynch sendromu için tanısalıdır.

MLH1/PMS2 kaybı olan tümörlerin çoğu sporadik yüksek mikrosatellit instabiliteye (MSI-H) sahiptir çünkü bu tümörlerin çoğu BRAF mutant sesil serrated poliplerden gelişir. Bu tümörlerin sporadik doğasını gösterebilmek için BRAF

V600E mutasyonunun belirlenmesi faydalı olabilir (37). Eğer BRAF vahşı tip ise MLH1 öncölünün hipometilasyon testi yapılarak sporadik yüksek mikrosatellit instabiliteye (MSI-H) bağlı tümörler, Lynch sendromuna bağlı tümörlerden ayrılabilir ancak bu tahlil pek sık kullanılmamaktadır. Spesifik mutasyonun belirlenmesi ailenin diğer üyelerinin taranabilmesine yardımcı olur ki bu Lynch sendromuna bağlı tümörlerin gözetiminde ciddi bir öneme sahiptir. Daha önce de belirtildiği gibi yüksek mikrosatellit instabiliteye (MSI-H) bağlı karsinomlar, mikrosatellit stabil karsinomlara göre daha iyi prognozludur. Mikrosatellit instabilite durumu evre III veya uzak organ metastazı olan hastalarda ileri terapiyi belirleyebilir çünkü yüksek mikrosatellit instabiliteye sahip tümörler geleneksel 5-florourasil (5FU) temelli kemoterapiye kötü cevap verir (38).

KRAS mutasyonları kolorektal karsinomların %40-50'sinde, BRAF mutasyonları ise %5-10'unda görülür; bu proteinler epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyal yolağında bulunurlar (39,40). EGFR hedefleyen kemoteröpatik ajan (örneğin cetuximab monoklonal antikoru) kullanılmadan önce KRAS genotiplemesi rutin olarak yapılır çünkü KRAS mutasyonu olan tümörler bu tedaviye dirençlidirler (39,41). Bazı merkezlerde KRAS vahşı tip tümörlerde BRAF değerlendirmesi de yapılmaktadır çünkü BRAF mutasyonu olan tümörler de cetuximab tedavisine kötü yanıt verirler (42).

2.5-WNT SİNYAL YOLAĞI

Çok hücreli canlıların doku ve organ gelişimi, çok sayıda sinyal yolağının birbirleriyle ilişki kurarak, pozisyonel bilginin ve hücre özelleşmesinin uyarılması ile kontrol edilir. TGF-beta (Transforming Growth Faktör-beta), FGF (Fibroblast Growth Factor), Hedgehog ve Notch proteinleri gibi salgılanan faktörlerin yanısıra Wnt (Wingless-Type MMTV Integration Site Family) büyüme faktörleri de bu işlem sırasında çok önemli bir şekilde yer alır. Günümüzde farklı türlerde yaklaşık 100 çeşit Wnt geni bulunmuştur. İnsanlarda ise birbirleriyle %27-%83 arasında aminoasit sekans benzerliği ve 23-24 adet korunmuş sistein rezidüsü bulunduran 19 çeşit Wnt geni tanımlanmıştır. Gelişme sırasında Wnt'lerin hücrelerin kaderini belirlemede, proliferasyonlarında, migrasyonlarında, kutuplaşmalarında ve ölümlerinde çeşitli rolleri vardır. Erişkinlerde ise homeostaz üzerinde etkileri vardır ve Wnt yolağının düzensiz çalışması çeşitli kanserlerin oluşumundan sorumludur (43,44).

Wnt ligandları hücre zarında 7 defa kıvrılmış transmembran reseptör ailesi olan Frizzled reseptörlerine (İnsan genomunda 11 çeşiti vardır) ve yeni bulunmuş LRP5 ve LRP6 (Lipoprotein Receptor-related Protein-5/6) koreseptörleri ile sinyal sağlar. Yapısal olarak Frizzled reseptörlerinin ekstrasellüler Wnt bağlayıcı birimi, yedi adet döngüsel transmembran proteini ve intrasellüler C-terminal kuyruğu vardır. Wnt reseptörlerinin ikincil yapısı ise tahminen GPCR'leri (G-Protein Coupled Receptors) içermektedir bu da Frizzled reseptörlerinin GPCR ailesinin bir üyesi olarak nitelendirilmesini sağlayabilir. Wnt sinyalleri birbirinden ayrı en az üç hücre içi yolakla iletilir, bunlar klasik Wnt/ β -katenin, klasik olmayan Wnt/Kalsiyum ve Wnt/PCP (Planar Cell Polarity) yolaklarıdır. Wnt/ β -katenin yolağı birincil olarak gelişim sırasındaki hücre kaderini belirlerken, Wnt/PCP yolağı majör olarak sitoskeletal organizasyonu sağlar. Wnt/Kalsiyum yolağının ise biyolojik fonksiyonu belirgin değildir (45).

Wnt/ β -katenin yolağı evrimsel süreçte en iyi korunmuş ve en iyi anlaşılmış olan yolaktır. Wnt/ β -katenin yolağı Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a ve Wnt8 ile aktive

olur ve hücre transformasyonunda rol alır. Wnt sinyal yokluğunda β -katenin CK1Alpha (Casein Kinase-1- Alpha), GSK3Beta (Glycogen Synthase Kinase-3- Beta), AXIN (Axis Inhibitor) ve APC (Adenomatous Polyposis Coli) proteinlerini içeren sitoplazmik bir kompleks ile birleşiktir. Bu durum β -kateninin fosforilasyonunu ve Beta-TRCP (Beta-Transducin Repeat-Containing Protein) ile etkileşimini arttırarak β -kateninin ubiquinasyonunu ve proteozomlar ile yıkılmasını sağlar (43). Wnt sinyali olduğunda ise Frizzled reseptörüne bağlanarak Dsh (Dishevelled) proteininin aktivasyonuna yol açar. Memelilerde tüm organlarda Dishevelled ailesinden olan Dsh1, Dsh2, Dsh3 proteinleri bulunur. Bu aile üyelerinin üç adet çok iyi muhafaza edilmiş bölgesi vardır: N ucundaki DIX (Dsh ve AXIN), santralde PDZ (Postsynaptic Density-95, Discs-large ve Zonula occludens-1), C ucundaki DEP (Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin domain). Aktive olan Dishevelled proteini GSK3-Beta'nın fosforilasyonuna neden olarak GSK3-Beta'yı inhibe eder, böylece sitoplazmada düzenli olarak biriken β -kateninlerin fosforilasyona uğrayarak yıkılması engellenir ve sitoplazmadaki β -katenin düzeyi artar ve bu β -kateninler nukleusa gider. Wnt sinyali ile sitoplazmada artmış olan β -katenin LEF (Lymphoid-Enhancing Factor)/TCF (T-Cell Factor)'lere bağlanarak birçok hedef genin aktivasyonunu sağlayan bir transkripsiyon makinesini başlatır. Transkripsiyon aktivasyonu β -kateninin CREB (cAMP Response Element Binding Protein), SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) kromatin remodelling kompleksi ve Pyg ve BRG1'e bağlı Bcl9 ile etkileşimiyle olur. Chibby ise β -kateninin C-terminal bölgesi ile direkt etkileşerek β -katenine bağlı transkripsiyonel aktivasyonu, LEF1 ile yarışmalı inhibisyona girerek gerçekleştirir (46,47,48).

β -katenin/TCF transkripsiyonel regülasyonunun hedefi olan birçok gen tanımlanmıştır. Bunlar MMP7 (Matrix Metalloproteinase-7), UPAR (Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor), CD44, c-Myc, c-Jun, FRA1 (Fos-Related Antigen-1), CcnD1 (Cyclin-D1), PPAR-Delta (Peroxisome Proliferative Activated Receptor-Delta), TCF1 (Transcription Factor-1), Fibronectin , Slug , Gastrin, Cox2 (Cyclooxygenase-2) ve Laminin5'in Gamma2 zinciridir. Buna ek olarak TCF/LEF ve β -katenin kompleksleri hücrel remodelling işlemlerini düzenlemek için başka

yolaklar ile aktive olmuş faktörler ile işbirliği yapabilir. CcnD1 ve c-Myc'i de içeren birçok gen, hücre büyümesinde, proliferasyonunda ve differansiasyonunda hayati görevler almaktadır ve bunlar kolon kanserinde uygunsuz bir şekilde aktive edilirler. β -katenin uyarısıyla artan c-Myc geni, p53 sentezini ve buna bağlı olarak p21, WAF1 ve p130/RB2'yi arttırarak büyümenin durdurulmasına neden olabilir. β -katenin'in bir diğer hedefi ise hücre göçünde rol oynayan Vimentin'dir. Vimentin, insan memesindeki tümör hücrelerinde β -katenin/TCF transaktivasyon yolağının direkt hedefidir. Wnt sinyalleri Kaspase inhibitörleri, Survivin gibi antiapoptotik proteinleri upregüle ederek apoptozu engelleyebilir ve VEGF upregülasyonu yaparak anjiogenezi arttırabilir. Matrilysin/MMP7 ve MMP26 gibi ekstrasellüler matriksi yıkabilen birçok proteaz ve CD44 ve NRCAM (Neuronal Cell Adhesion Molecule) gibi hücre adezyon molekülleri tümör hücrelerinin invazyonuna ve metastazına neden olabilen potansiyel Wnt hedefleridir. Klasik Wnt sinyal yolağı NRSF/REST (Neuron-Restrictive Silencer Factor/RE1-Silencing Transcription factor) ve ENC1 (Ectodermal-Neural Cortex) genlerini ve böylelikle progenitör hücreleri kontrol eder. Artmış ekspresyonu kolorektal tümörögeneziste rol oynayan Claudin-1 de β -katenin TCF/LEF sinyal yolağında yer alır. Wnt hedef genlerinin büyük bir kısmı Wnt sinyal iletim sisteminin bileşenlerini kodlar.

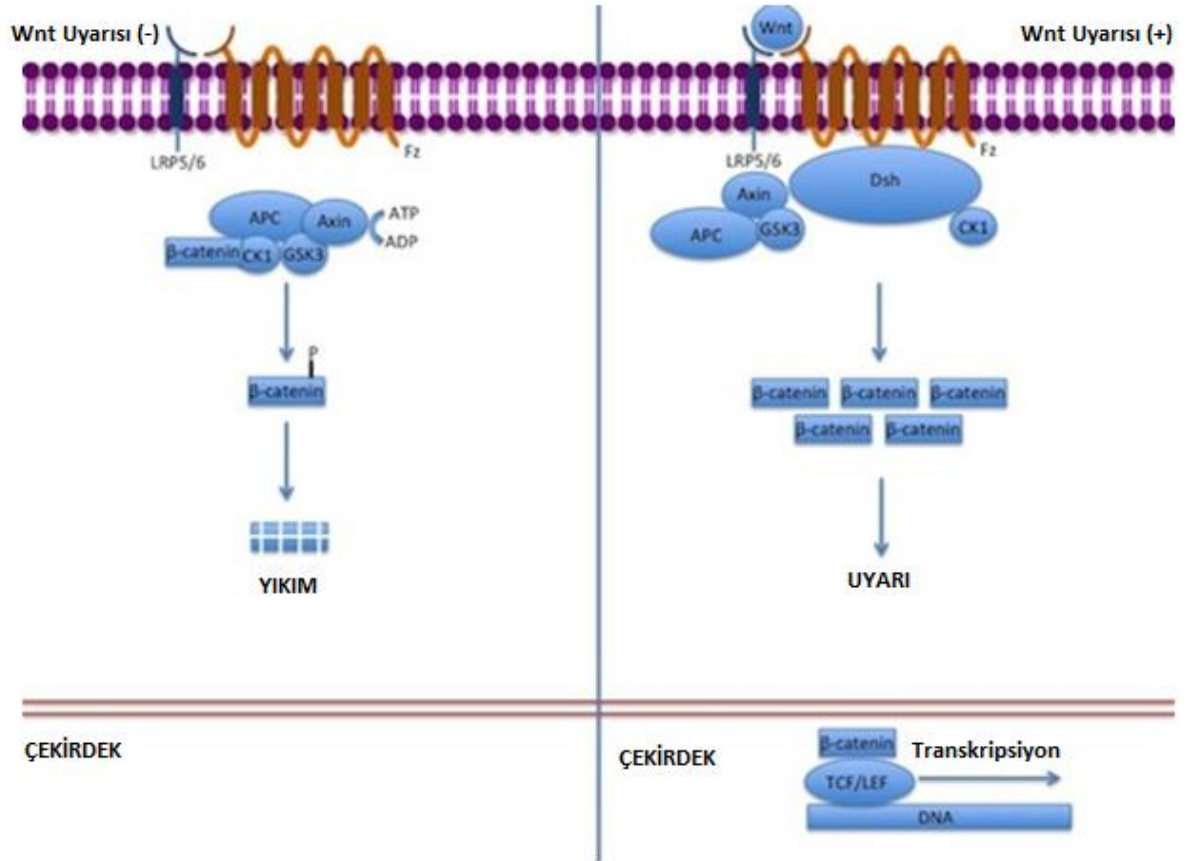
Güncel çalışmalar 4 sinyal yolağının Wnt inhibisyonuna yol açtığını göstermiştir: FRP (Frizzled-Related Protein), Cer (Cerberus), WIF1 (Wnt-Inhibitory Factor-1) ve Dkk1 (Dickkopf-1). Cerberus ve WIF1, Wnt ile direkt fiziksel etkileşime girerek inhibisyon sağlar. FRP ise Wnt sinyal yolağını hem Wnt hem de Frizzled reseptörüyle fiziksel olarak etkileşime girerek inhibe eder. Wnt sinyal yolağı ayrıca multigen ailesinin bir üyesi olan Dkk1 (Dickkopf-related protein 1) tarafından inhibe edilir. Dkk1'in LRP5/6'ya (Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 5/6) bağlanıp bu proteini antagonize ederek Wnt sinyal yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir. Transmembran proteinleri olan Kremen-1 ve Kremen-2, Dkk1 ile fonksiyonel iş birliği yaparak Wnt sinyalini bloke eden yüksek afiniteli Dkk1 reseptörleridir. Kremen 2, Dkk1 ve LRP6 ile üçlü kompleks oluşturarak LRP6'yı hücre zarından uzaklaştıran hızlı bir endositoz başlatır. β -katenin yıkımında rol alan

Beta-TRCP ve Ubikitin Konjuge edici enzim UbC4/5E2'nin artmış ekspresyonu da Wnt sinyalizasyonunda negatif bir geri besleme mekanizması gibi davranabilir (48,49,50).

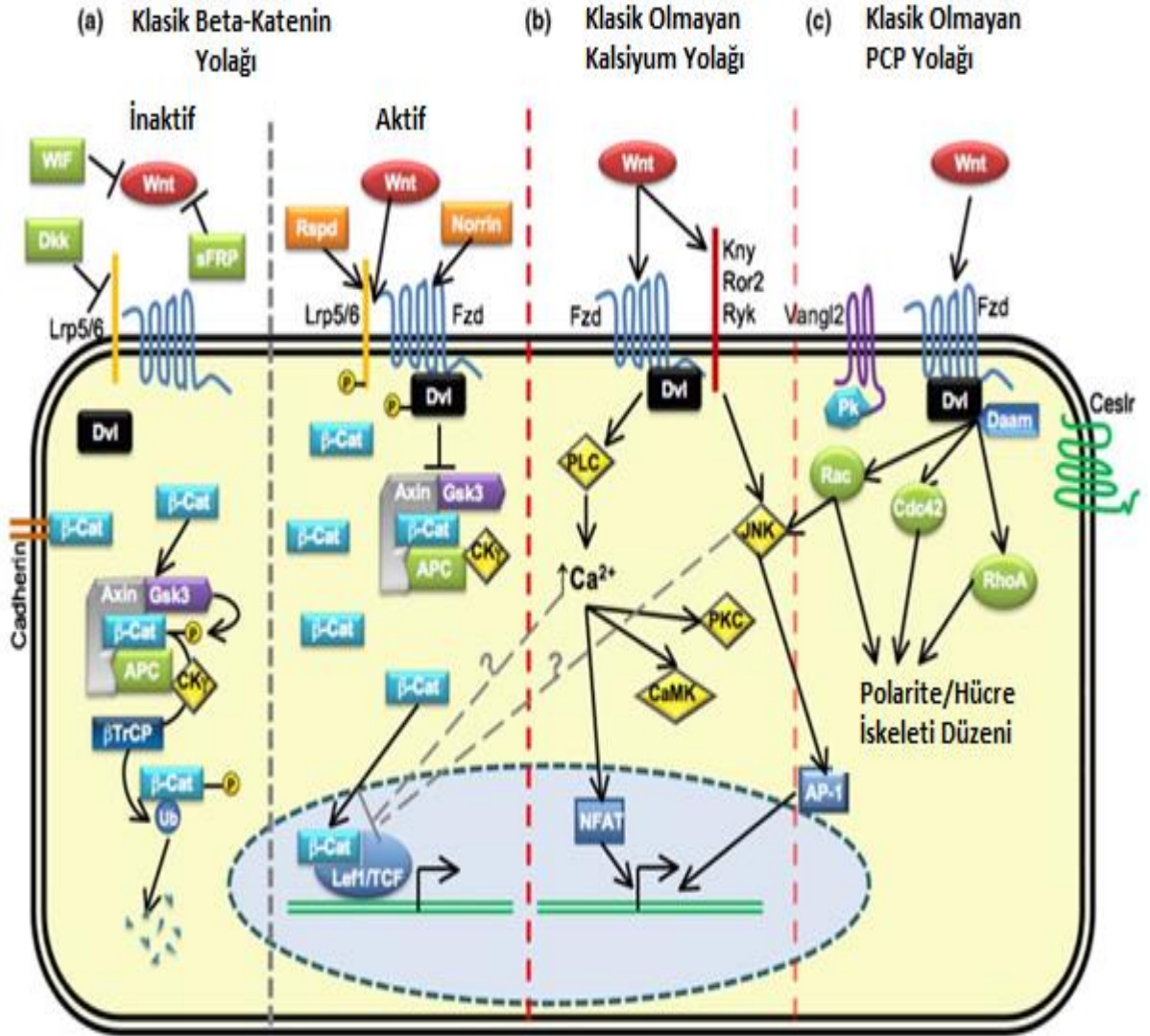
Klasik olmayan Wnt sinyal yolağı aynı zamanda atipik Wnt-Frizzled sinyal yolağı olarak adlandırılır ve Wnt/Kalsiyum ve Wnt/PCP olmak üzere iki adet intrasellüler sinyal yolağını içerir. Wnt/Kalsiyum yolağında Wnt proteini temel olarak Wnt1, Wnt5a ve Wnt11'dir. Bunlar hücre yüzeyinde bulunan Frizzled transmembran reseptörlerine bağlanırlar ve sonuçta Fosfolipaz-C aktivasyonuna neden olacak heterodimerik G-protein uyarısını da içeren birçok hücresel olayı başlatırlar. Fosfolipaz-C intrasellüler kalsiyum iyonunun artmasına, cGMP düzeyinin azalmasına, Kalsiyum-Kalmodulin kinaz ve Protein Kinaz-C aktivasyonuna neden olur. Bu olaylar NFAT nükleer faktörünün ve CREB gibi diğer transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasına neden olabilir. Bundan dolayı Wnt/kalsiyum yolağının G-protein bağımlı bir sinyal yolağı olduğu daha muhtemeldir (45,51). Wnt/PCP yolağında ise Dsh aktivasyonu sonrası Rho/Rac küçük GTPaz ve JNK (Jun N-terminal Kinase) aktive olarak sitoskeletal organizasyon ve gen ekspresyonu sağlanır. Wnt/PCP yolağında Wnt proteinleri hücre yüzeyindeki Frizzled transmembran reseptörlerine bağlanır. Bunu takiben Dsh aracılığı ile Rho/Rac küçük GTPaz ve JNK (Jun N-terminal Kinase) aktive olarak sitoskeletal organizasyonun düzenlenmesi ve gen ekspresyonunu sağlarlar. Dsh, Daam1 aracılığı ile yolak efektörleri olan Rho ve ROCK'a (Rho Associated Kinase) bağlıdır. Rac direkt olarak Dsh ile aktive olur ve o da sırayla MAP3K (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase) ve MAP2K (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase) proteinleri aracılığı ile JNK'yi aktive eder. Wnt hedef genlerinden olan Nkd (Naked) ürününün Dsh'a bağlanıp β -katenin'i bloke ederek Wnt antagonisti gibi davrandığı belirlenmiştir ancak bu ürünler JNK yolağını aktive etmektedir (45,52,53).

Wnt-Frizzled sinyal yolağı sinir sistemi gelişiminde önemli bir role sahiptir. Daha belirgin bir şekilde anlatmak gerekirse nöral progenitör hücrelerin ve nöral plağın gelişiminde, nöral tüpün anterior-posterior uzanımında görev alır. Sonuç

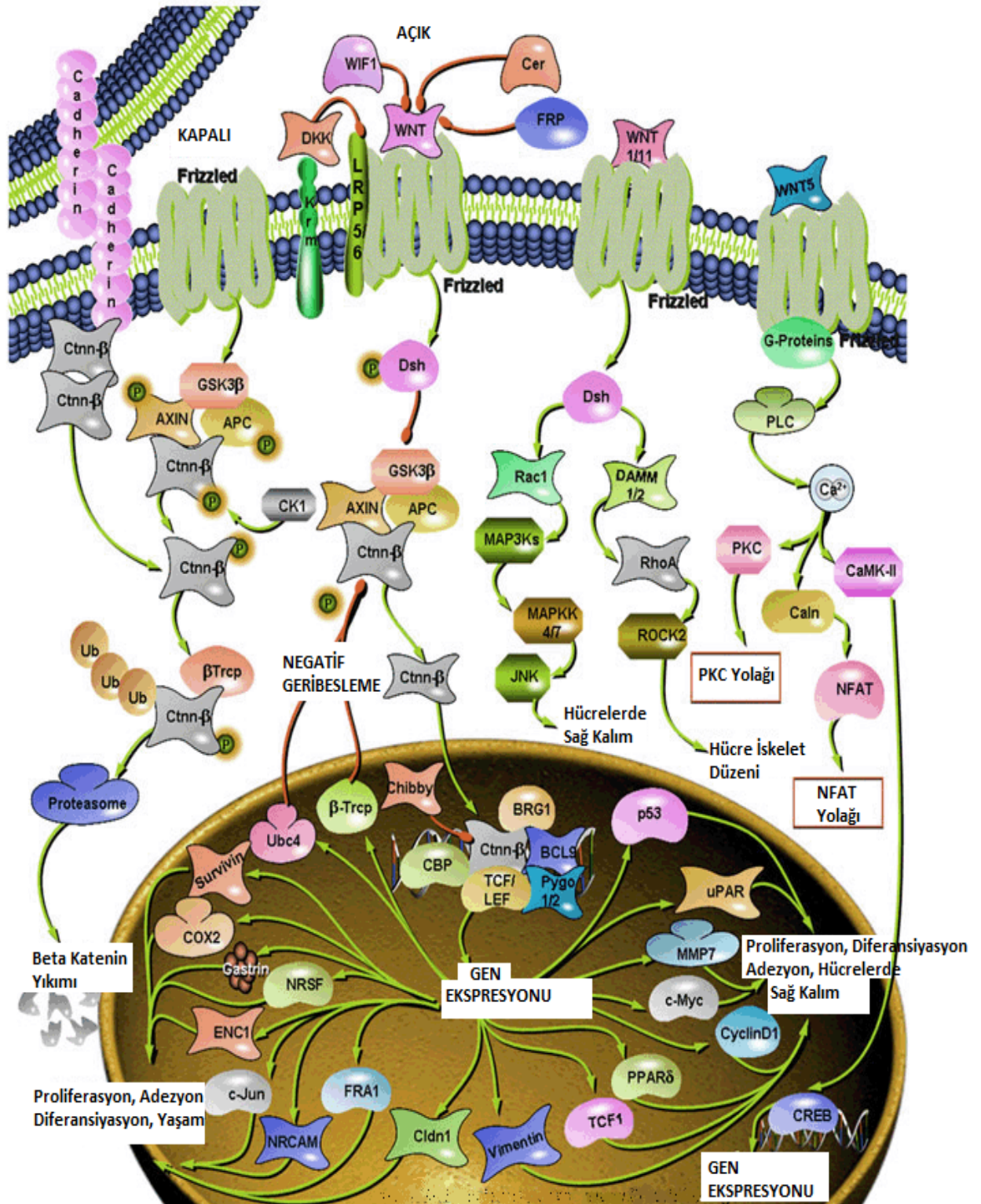
olarak Wnt-Frizzled sinyal yolağı beyin ve spinal kordun gelişimini ve çok sayıda duyu ve motor nöronun uzanımını sağlar. Wnt-Frizzled yolağının disfonksiyonu Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklara sebep olabilir. Wnt-Frizzled yolağını şekillendiren ve kontrol eden kritik elementlerin tanımlanması ve hedeflenmesi, bu yolağın biyolojik potansiyelinin daha iyi anlaşılması kanser, nörodejeneratif ve vasküler hastalıkların tedavisinde yeni seçeneklerin ortaya çıkmasını sağlayabilir (56, 55).



Figür 14: Şekilde klasik yolda Wnt protein uyarısı olan ve olmayan durumda transmembran reseptörleri ve sitoplazmik β-katenin proteinlerinin kaderi gösterilmektedir. (56)



Figür 15: Şekilde klasik yolağın ve klasik olmayan yolakların kullandıkları proteinler, bu yolakların farkı ve kesiştikleri noktalar gösterilmektedir. (57)



Figür 16: Şekilde Wnt yolaklarının geniş bir özeti gösterilmektedir. (58)

2.6-İMMUNOHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLER

2.6.1-Wnt-3

Wnt gen ailesi frizzled reseptörlerine bağlanarak onkogenezi uyararak, embriyogenez sırasında hücre kaderini ve embriyonun modelleşmesini düzenleyerek gelişimi sağlayan bir sinyal molekülü ailesidir. Wnt ailesi biyolojik aktivitelerine göre iki gruba ayrılır. Bir grup sitoplazmik β -katenin düzeyini sabitlerken, diğer grup hücre içi kalsiyum salınımını uyararak G proteini bağımlı iki kinaz olan CamK2 ve PKC'yi aktive eder. Wnt-3 beyinciğin gelişiminde etkili olurken erişkinde sadece Purkinje hücre tabakasında bulunur. Wnt-3 kas afferentlerinin terminal dallarını kontrol eden retrograd bir sinyaldir.

İnsan Wnt-3 proteini, fare Wnt-3 proteini ile %98 homolog iken insan Wnt-3a proteini ile %84 homologdur. Wnt-3 geni Wnt-15 geni ile birlikte 17q21.32 kromozom lokasyonunda kümelenir ve köken alır.

Wnt-3 (Y-15), insan kaynaklı Wnt-3'ün internal kısmının peptid haritalandırılması ile geliştirilmiş ve buna karşı afinitesi olan saflaştırılmış bir keçi poliklonal antikorudur. Molekül ağırlığı 65kDa'dır (kiloDalton). Genetik lokusu insanlarda Wnt-3 için 17q21.32, Wnt-3a için 1q42.13'tür; farelerde ise Wnt-3 için 11E1, Wnt-3a için 11B1.3'tür. Pozitif kontrol için fare testisi kullanılabilir. Wnt-3 (Y15) fare, rat ve insan kaynaklı dokularda Wnt-3 ve Wnt-3a'yı belirlemek için tavsiye edilir. Tavsiye edilen dilüsyon miktarları Western Blot için 1:200-1:1000, immünfloresan uygulama için 1:50-1:1500, parafine gömülmüş dokular dahil olmak üzere immünohistokimyasal uygulama için 1:50-1:500 ve solid faz ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) için 1:30-1:3000'dir.

Wnt-3 aynı zamanda at, köpek, öküz, domuz ve kuş gibi farklı cinslerde de Wnt-3 ve Wnt-3a belirlenmesi için kullanılabilir (59).

2.6.2-MMP7

Matriks metalloproteazları kollajen, fibronektin, gelatin, laminin ve peptidoglikanların da dahil olduğu ekstrasellüler matriks elemanlarının yıkımından sorumlu peptidaz enzim ailesidir. MMP genleri forbol esterleri, lipopolisakkaritler veya stafilokokal enterotoksin B ile aktive olur. MMP katalizi kalsiyum ve çinkoya ihtiyaç duyar. MMP7, kazein, fibronektin, tip I, III, IV ve V gelatini yıkar. MMP7 mRNA'sı farelerin özellikle epitelyal hücrelerinde eksprese edilir ve bu ekspresyon sadece spesifik organlarda izlenmektedir. Bu durum MMP7'nin matriks yıkımı ve yeniden biçimlendirilmesinin yanı sıra bu organların özelleşmiş fonksiyonlarında da görev aldığını düşündürmektedir.

MMP7 (L-17), insan kaynaklı MMP7'nin internal kısmının peptid haritalandırılması ile geliştirilmiş ve buna karşı afinitesi olan saflaştırılmış bir keçi poliklonal antikorudur. Pro-MMP7'nin molekül ağırlığı 30 kDa iken aktif MMP7 20 kDa'dır. İnsandaki genetik lokusu 11q22.2 kromozomudur. Pozitif kontrol olarak HeLa (human epithelial carcinoma cell line) tam hücre lizatı kullanılabilir. İnsan kaynaklı MMP7 belirlenirken tavsiye edilen dilüsyon miktarları Western Blot için 1:100-1:1000, immüno floresan çalışma için 1:50-1:500, parafine gömülü dokular dahil olmak üzere immünohistokimyasal çalışmalar için 1:50-1:500 ve solid faz ELİSA için 1:30-1:3000'dir.

MMP7 aynı zamanda MMP7-siRNA, MMP7-shRNA Plazmid ve MMP7-shRNA Lentiviral Partiküllerinin kontrol antikoru olarak da kullanılabilir (60).

2.6.3- β -Katenin

Kateninler (α , β ve γ) yaygın olarak eksprese edilen, hücresel bağlantı bölgelerinde E-kaderinler ile ilişkili sitoplazmik proteinlerdir. β -katenin ayrıca N-kaderine bağlanır ve APC ile immünopresipitat oluşturur. Kaderin/katenin kompleksleri hücre iskeletine α -aktin ve α -kateninin direkt ilişkisi ile bağlanır. Artmış tirozin fosforilasyonu katenin-kaderin komplekslerini yıkarak hücresel adezyona etki eder.

β -katenin (RB-9035), tavşan antiserumundan saflaştırılmış bir antikordur. Hücredeki lokasyonu sitoplazma ve hücre zarıdır. Antikoru moleküler ağırlığı 92 kDa'dır ve epitopu C-terminalidir. Formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş dokularda çok işe yarar. Reaktif olduğu dokular insan ve fare dokularıdır. Tavsiye edilen dilüsyon miktarı formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş dokularda 1:250-1:500'dür. Optimal dilüsyon, yapılacak işe göre araştırmacı tarafından belirlenir. Pozitif kontrol olarak meme kanseri ve MCF-7 hücre dizisi kullanılabilir (61).

2.6.4-VEGF

VEGF anjiyogenezde rol alan, tümör ilerlemesini ve metastazını destekleyen, homodimerik, disülfid bağları ile bağlı bir glikoproteindir. Vasküler endotel için güçlü bir mitojenik ajan olmakla birlikte vasküler geçirgenlik artışına da sebep olur. VEGF'nin 4 izoformu vardır. Bunlardan VEGF165 ve VEGF121 küçük proteinler olup hücre dışına salgılanabilir ve diffüzyon ile hücre dışına çıkabilir; VEGF189 ve VEGF206 daha büyük proteinlerdir ve hücre içinde kalırlar.

VEGF (MS-1467), rekombinan VEGF189 proteinine karşı üretilmiş ve fare serumundan saflaştırılmış antikordur. Molekül ağırlığı 19-22 kDa'dır. IgG1 izotipi

bir antikordur ve hafif zinciri κ 'dır. Bu antikor VEGF121, VEGF165 ve VEGF189'u tanır. Epitopu belli değildir ve insan dokuları ile reaksiyon verir. Hücre sitoplazmasında, hücre yüzeyinde ve ekstrasellüler matrikste bulunmaktadır. Tavsiye edilen dilüsyon miktarı formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş dokularda 1:100-1:200'dür. Optimal dilüsyon, yapılacak işe göre araştırmacı tarafından belirlenir. Pozitif kontrol olarak anjiyosarkom ve VEGF165 rekombinan proteinini kullanılabilir (62).

2.6.5-Vimentin

Vimentin mezenkimal hücrelerdeki temel orta büyüklükteki filaman proteinidir ve bundan dolayı andiferansiye neoplazilerin ayırıcı tanısında değerlidir.

Vimentin (SP20), tavşan serumundan saflaştırılarak elde edilmiş IgG tipi bir antikordur. Epitopu belli değildir. Molekül ağırlığı 57-60kDa'dır. Formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş dokularda çok işe yarar. İnsan vimentin proteinini ile reaktiftir. Hücresel lokasyonu sitoplazmadır. Tavsiye edilen dilüsyon miktarı formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş dokularda 1:200-1:400'dür. Optimal dilüsyon, yapılacak işe göre araştırmacı tarafından belirlenir. Pozitif kontrol olarak sarkom ve melanom kullanılabilir (63).

2.6.6-Ki67

Ki67 proliferen olan hücrelerde eksprese edilen nükleer bir non-histon proteinidir. Ki67, G0 fazında negatif iken hücrenin özellikle geç G1, S, M ve G2 fazlarında eksprese edilir.

Ki67 (SP6), tavşan serumundan saflaştırılmış IgG tipinde bir antikordur. Epitopu C-terminalidir. Formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş dokularda çok işe yarar. İnsan dokusunda reaktiftir. Hücresel lokasyonu çekirdektir. Tavsiye edilen dilüsyon miktarı formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş dokularda 1:200'dür. Optimal dilüsyon, yapılacak işe göre araştırmacı tarafından belirlenir. Pozitif kontrol olarak dalak, tonsil veya meme kanserleri kullanılabilir (64).



3-GEREÇ VE YÖNTEM

3.1-ÇALIŞMA GRUBUNUN TANIMLANMASI

Bu çalışma kapsamına 01.01.2012-01.01.2015 tarihleri arasında Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda histopatolojik incelemesi yapılmış ve kolorektal adenokarsinom tanısı almış 130 adet radikal rezeksiyon olgusu dahil edildi. Her bir hastaya ait tek bir tümör bloğu seçildi.

9 hastaya ait tümör parafin bloklarının arşivde olmaması nedeniyle (dış merkeze inceleme için gönderilen) bu olgular çalışmadan dışlanarak toplam 121 olguya ait 121 tümör parafin bloğu çalışmaya dahil edildi.

Rezeksiyon materyallerinin araştırma için gerekli demografik verileri hastaların patoloji raporlarından derlendi.

3.2-HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME

Olgulara ait hematoksilen eozin boyalı arşiv preperatları tekrardan değerlendirildi ve bu değerlendirme içerisinde tümör tipi, derecesi, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu tutulumu değerlendirildi, patolojik evreleme yapıldı. Yüksek mikroskopik derece, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu tutulumu ve evre III-IV kötü prognoz faktörleri olarak alındı. Tümöre ait en iyi durumdaki ve en uygun blok seçildi; daha sonra seçilen hematoksilen-eozin preperatına ait parafin bloklar arşivden taranarak toplandı.

3.3-İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM

İmmünohistokimyasal inceleme %10'luk formalin solüsyonunda fikse edilmiş olan dokuların parafin bloklarından hazırlanan kesitlerde yapılmış olup her tümör için tek bir blok seçildi. Her bir antikor için immünohistokimyasal uygulama tüm olgulara tek seansta yapıldı ve pozitif kontroller ile birlikte çalışıldı. Streptavidin-biotin-peroksidaz saptama yöntemiyle gerçekleştirilen immünohistokimyasal çalışmada kullanılan primer antikorlar ve yapılan uygulamalar Tablo 1'de özetlenmektedir.

Tablo 1. İmmünohistokimyasal Uygulama Prosedürü

PRİMER ANTİKOR	TİP; KLON	DİLÜSYON	İNKÜBASYON SÜRESİ	ANTİJEN AÇIĞA ÇIKARMA	FİRMA
Wnt-3a	Y-15	1:200	30 DAKİKA	20 DAKİKA	Santa Cruz sc-5212
MMP7	L-17	1:200	30 DAKİKA	20 DAKİKA	Santa Cruz sc-26674
β-Katenin	RB-9035	1:300	30 DAKİKA	20 DAKİKA	Thermo Scientific rb-9035-p0
VEGF	VG1	1:200	30 DAKİKA	20 DAKİKA	Thermo Scientific ms-1467-p0
Vimentin	SP20	1:200	30 DAKİKA	20 DAKİKA	Thermo Scientific rm-9120-s0
Ki67	SP6	1:200	30 DAKİKA	20 DAKİKA	Thermo Scientific rm-9106-s1

Adhezivli (Surgipath, Snowcoat X-tra, USA) lamlara hazırlanan 4-6 µm kalınlığındaki parafin kesitler 80° C'lik etüvde bir saat bekletildikten sonra, Leica Bondmax İmmünohistokimya otomatik cihazı ile aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. İki kez yıkama solüsyonundan geçirildi (0 dakika).
2. AR solüsyonu - 0 dakika
3. AR solüsyonu - 0 dakika
4. AR solüsyonu - 20 dakika (100° C).
5. AR solüsyonu - 12 dakika
6. Yıkama solüsyonu - 0 dakika (35° C)
7. Yıkama solüsyonu - 0 dakika (35° C)
8. Yıkama solüsyonu - 0 dakika (35° C).
9. Yıkama solüsyonu - 3 dakika
10. Perokside blok - 10 dakika
11. Yıkama solüsyonu - 0 dakika
12. Yıkama solüsyonu - 0 dakika
13. Yıkama solüsyonu - 0 dakika
14. Primer antikor - 15 dakika
15. Yıkama solüsyonu - 0 dakika
16. Yıkama solüsyonu - 0 dakika
17. Yıkama solüsyonu - 0 dakika
18. Postprimer - 7 dakika
19. Yıkama solüsyonu - 2 dakika
20. Yıkama solüsyonu - 2 dakika

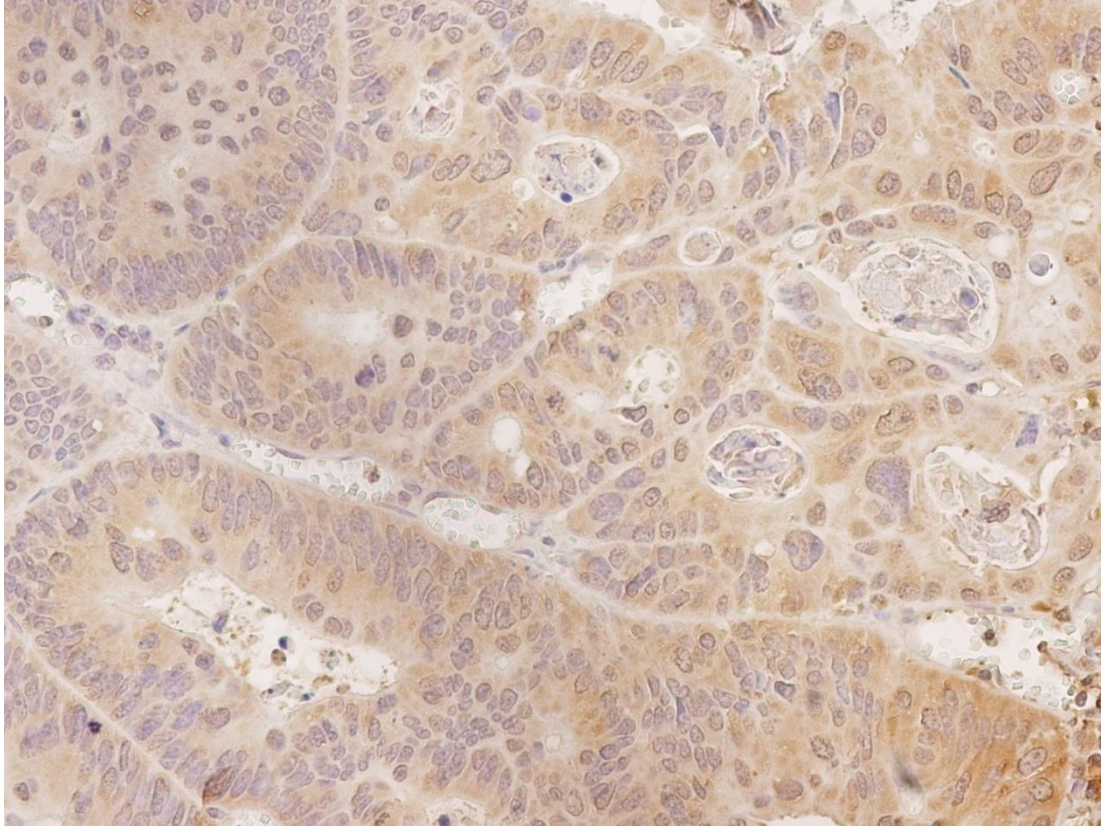
21. Yıkama solüsyonu - 2 dakika
22. Polimer - 7 dakika
23. Yıkama solüsyonu - 2 dakika
24. Yıkama solüsyonu - 2 dakika
25. Distile su - 2 dakika
26. Mikst diaminobenzidin - 0 dakika
27. Mikst diaminobenzidin - 7 dakika
28. Distile su - 0 dakika
29. Distile su - 0 dakika
30. Distile su - 0 dakika
31. Hematoksilen - 5 dakika
32. Distile su - 0 dakika
33. Yıkama solüsyonu - 0 dakika
34. Distile su - 0 dakika

3.4-İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Wnt-3, MMP7, β -Katenin, VEGF, Vimentin ve Ki67 antikorlarının her birinin ayrı ayrı boyanma özellikleri değerlendirildi. İmmünohistokimyasal yönteme göre hazırlanan örnekler binoküler mikroskopta x4, x10, x20 ve x40'lık objektiflerle incelendi.

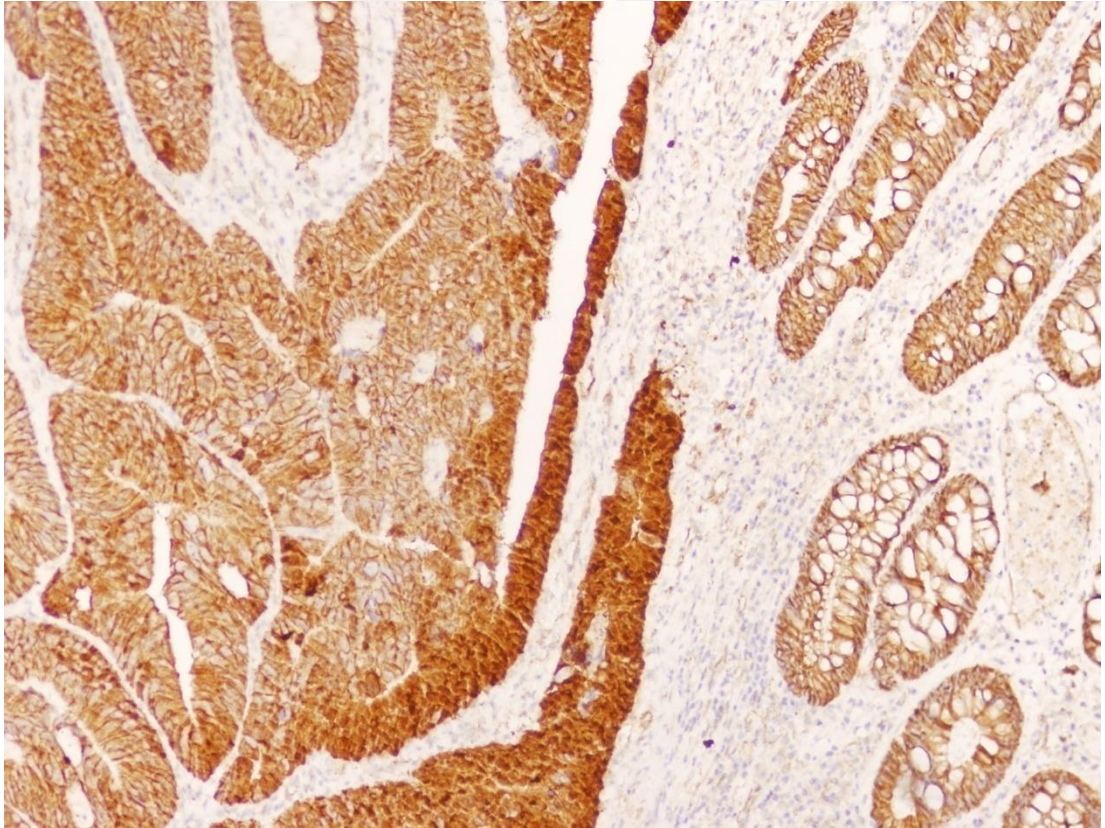
Wnt-3 değerlendirilirken Lisha Qi, Baocun Sun ve ark. (65) yaptığı çalışmadaki skorlama örnek alındı. Sitoplazma içinde kahverengi granüllerin görülmesiyle boyanın immünoreaktif olduğu kabul edildi. Wnt-3 boyanma yoğunluğu 0-2 arasında derecelendirildi (boyanma görülmediğinde 0, zayıf immünoreaktivite görüldüğünde 1, güçlü immünoreaktivite görüldüğünde 2 puan verildi). İmm noreaktivite yüzdesi 0-3 arasında değerlendirildi (pozitif boyanma olmadığında 0, < %25 hücre pozitif olduğunda 1, %25 - %50 hücre pozitif olduğunda 2, > %50 hücre pozitif olduğunda 3 puan verildi). Bu iki skor çarpılarak bileşik bir Wnt-3 ekspresyon skoru elde edildi. Wnt-3 ekspresyonu negatif (skor = 0), zayıf pozitif (skor = 1,2,3), güçlü pozitif (skor = 4,6) olarak sınıflandı. Kesit üzerinde 10 farklı alan rastgele seçilerek incelendi ve bu alanların ortalaması alındı. Vakaların hiçbirinde (3 farklı merkezde, birden fazla defa denenmesine rağmen) Wnt-3 boyanması izlenmedi ve bu yüzden istatistiksel olarak değerlendirilebilecek anlamlı bir veri elde edilemedi.

MMP7 değerdendirilirken Anna Pryczynicz, Mariusz Gryko ve ark. (66) yaptığı çalışmadaki skorldama ördnek alındı. Boyama yoğunluğu semikantitatif olarak değerdendirildi. İmmünoaktivitenin belirgin olarak görüldüğü büyütme çarpanına göre vakalar skorldandı. Toplamda x40 büyütmede görülebilen immünoaktivite güçlü (3 puan), x100 büyütmede görülebilen immünoaktivite orta (2 puan), x200 büyütmede görülebilen immünoaktivite zayıf (1 puan), x200 büyütmede immünoaktivite görülemeyen vakalar negatif olarak skorldandı. Kesit üzerinde 10 farklı alan rastgele seçilerek incelendi ve bu alanların ortalaması alındı (Figür 17).



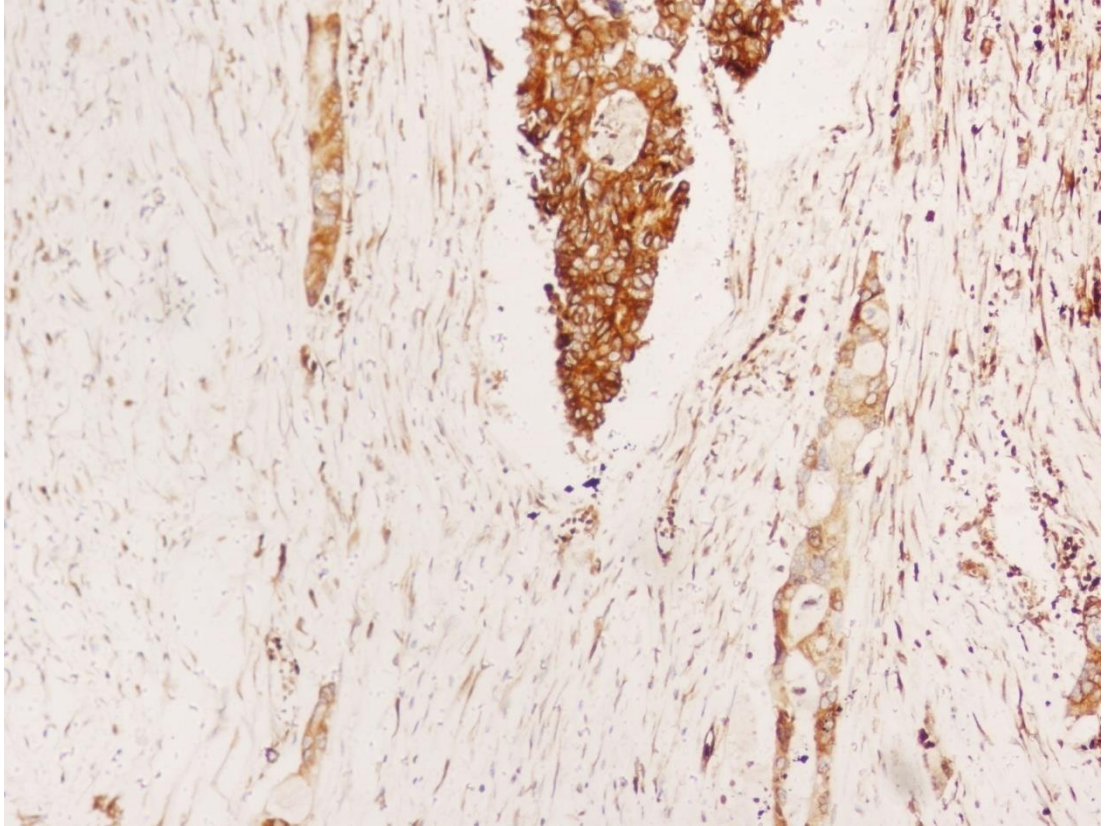
Figür 17: Şekilde MMP7'nin tümör hücre sitoplazmasını zayıf ve kuvvetli boyadığı alanlar izlenmektedir (20x10).

β -Katenin değerlendirilirken Darwish H, Trejo IE, Shapira I ve ark. (67) yaptığı çalışmadaki skorlama örnek alındı. Bir küçük büyütme alanında tümör hücrelerinin %10'undan fazlası çekirdek boyanması gösterdiğinde immünoreaktivite pozitif sayıldı. Örnek alınan çalışmada vakalar sadece boyanma kuvveti açısından, boyanma olmayan vakalar negatif (skor = 0), komşu nonneoplastik epitel ile benzer boyanma gösteren vakalar zayıf (skor = 1), orta derece yoğunlukta boyanma gösteren vakalar (skor = 2) ve güçlü boyanan vakalar (skor = 3) olacak şekilde sınıflandırılmıştı. Sonrasında ise 0 ve 1 puan alanlar negatif, 2 ve 3 puan alanlar pozitif olarak değerlendirilmişti. Bizim çalışmamızda ise negatif ve zayıf boyananlar direkt negatif kabul edildi; orta derecede ve şiddetli boyanan vakalar ise direkt pozitif kabul edilerek bu hücrelerin toplam tümör hücrelerine oranı yüzde cinsinden hesaplandı. Kesit üzerinde 10 farklı alan rastgele seçilerek incelendi ve bu alanların ortalaması alındı (Figür 18).



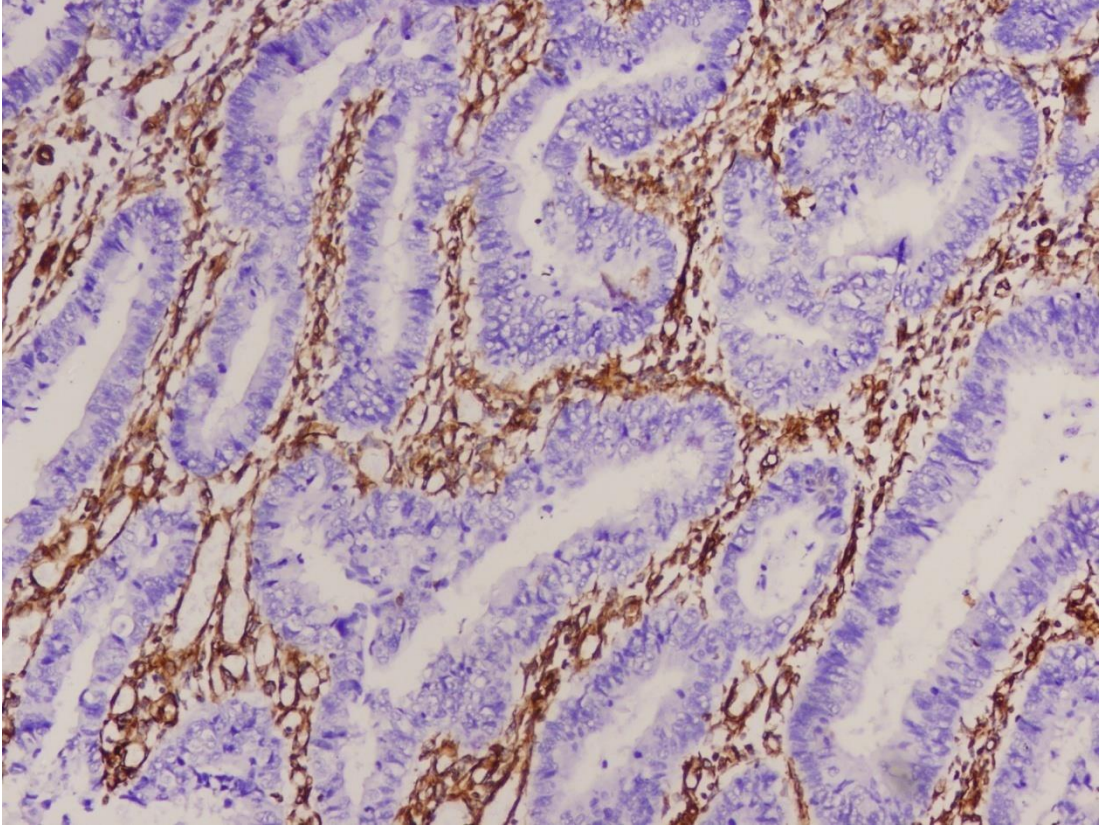
Figür 18: Sol taraftaki tümör glandlarında ve sağ taraftaki normal kolon mukozasında membran boyanması izlenmektedir. İki bölge arasında ise nükleer β -katenin ekspresyonu izlenen tümör glandları izlenmektedir. (10x10).

VEGF değerlendirilirken Liang ve ark. (68) yaptığı çalışmadaki skorlama örnek alındı. VEGF skorlanırken sitoplazmik ve/veya membran spesifik boyanmalar pozitif kabul edilerek boyanan tümöral ve stromal hücrelerin tüm hücrelere oranı yüzde cinsinden hesaplandı. Liang ve ark. yaptığı çalışmada VEGF boyanma durumu 4 dereceye ayrılmıştı. Hücrelerinin $< \%5$ 'i boyandığında negatif, $\%5 - \%25$ arasında boyandığında (+1), $\%26 - \%50$ arasında boyandığında (+2), $> \%50$ boyandığında (+3) olarak değerlendirilmiş ve sonrasında (+2)'den az boyananlar düşük reaktif, geri kalanlar da yüksek reaktif olarak sınıflandırılmıştı. Bizim çalışmamızda ise tüm vakalar için yüzdeler ayrı ayrı hesaplanarak kaydedildi ve istatistiksel hesaplamalar buna göre yapıldı. İkincil ve üçüncül gruplama kullanılmadı. Kesit üzerinde 10 farklı alan rastgele seçilerek incelendi ve bu alanların ortalaması alındı (Figür 19).



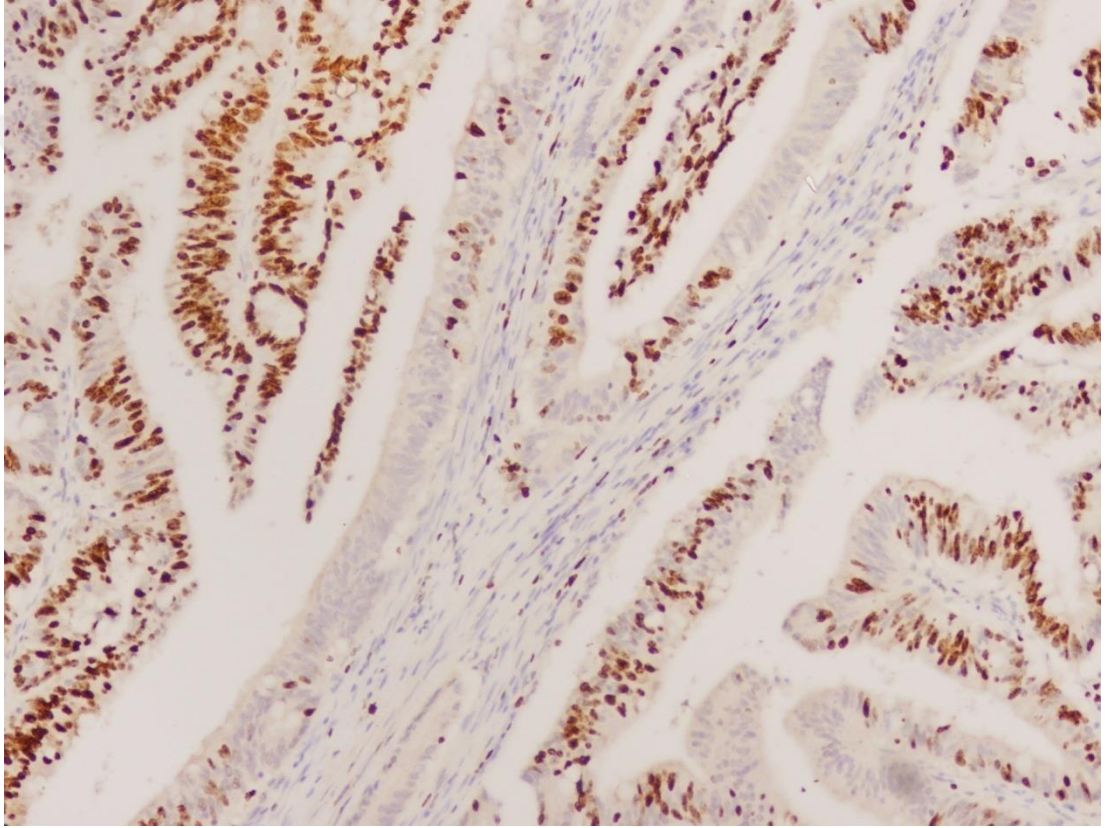
Figür 19: Ortada VEGF ile güçlü sitoplazmik ve membranöz boyanma gösteren, sağ ve sol tarafta ise zayıf boyanma gösteren tümöral glandlar izlenmektedir (20x10).

Vimentin değerdendirilirken tümör stromasındaki hücrelerin sitoplazması incelendi. Ngan CY ve ark. (69) yaptığı çalışma örnek alınarak sitoplazması içinde kahverenkli granüller izlenen bağ dokusu hücreleri immünoreaktif kabul edilerek bu hücrelerin o alandaki tüm bağ dokusu hücrelerine oranı yüzde cinsinden hesaplandı. Kesit üzerinde 10 farklı alan rastgele seçilerek incelendi ve bu alanların ortalaması alındı (Figür 20).



Figür 20: Şekilde tümör stromasında yoğun vimentin boyanması izlenmektedir (10x10).

Ki67 proliferasyon indeksi değerlendirilirken tümör hücrelerinin çekirdeği incelendi. Fluge Ø ve ark. (70) yaptığı çalışma örnek alınarak çekirdeği yoğun bir şekilde boyanan hücreler pozitif kabul edildi ve bu hücrelerin tüm tümör hücrelerine oranı yüzde cinsinden hesaplandı. Kesit üzerinde 10 farklı alan rastgele seçilerek incelendi ve bu alanların ortalaması alındı (Figür 21).



Figür 21: Şekilde yüksek Ki67 proliferasyon indeksine sahip tümoral bezler izlenmektedir (10x10).

3.5-İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Elde edilen veriler tanımlayıcı istatistikler (aritmetik ortalama, ortanca, standart sapma, yüzde dağılımlar) ile değerlendirildi. Gruplar arası ortalama karşılaştırılırken öncelikle normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile değerlendirildi. İki bağımsız grubun ortalaması Mann Whitney U testi, ikiden fazla bağımsız grubun ortalaması Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. Kategorik verilerin gruplar arası yüzde dağılımları Ki-Kare testi ile, birden fazla sürekli verinin korelasyonu Spearman testi ile değerlendirildi. Verilerin analizinde SPSS v18 programı kullanıldı ve $p < 0,05$ düzeyi anlamlı kabul edildi.



4- BULGULAR

Çalışmamızdaki 121 hastanın 66'sı (%54,5) erkek, 55'i (%45,5) kadındı. Hastaların yaş ortalaması 62,3'tü (Tablo 2).

Çalışmaya dahil edilen 121 kolorektal adenokarsinom vakasının 119'u (%98,3) düşük dereceli iken 2'si (%1,7) yüksek dereceli olarak izlendi (Tablo 2).

Vakaların 93'ünde (%76,9) lenfovasküler invazyon izlenmezken 28'inde (%23,1) lenfovasküler invazyon izlendi (Tablo 2).

Vakaların 105'inde (%86,8) perinöral invazyon izlenmezken 16'sında (%13,2) perinöral invazyon izlendi (Tablo 2).

Vakaların 7'si (%5,8) evre I, 62'si (%51,2) evre II, 35'i (%28,9) evre III, 17'si (%14,1) evre 4 olarak izlendi (Tablo 2).

Vakaların 73'ünde (%60,3) lenf nodu tutulumu izlenmezken 48'inde (%39,7) lenf nodu tutulumu izlendi (Tablo 2).

Tablo 2. Verilerin Tanımlayıcı Özellikleri

	N	%
Cinsiyet		
Erkek	66	54,5
Kadın	55	45,5
Mikroskopik Derece		
Düşük Dereceli	119	98,3
Yüksek Dereceli	2	1,7
Lenfovasküler İnvazyon		
Yok	93	76,9
Var	28	23,1
Perinöral İnvazyon		
Yok	105	86,8
Var	16	13,2
Evre		
I	7	5,8
II	62	51,2
III	35	28,9
IV	17	14,1
Lenf Nodu Tutulumu		
Yok	73	60,3
Var	48	39,7

Vakaların hiçbirinde (3 farklı merkezde birden fazla defa denenmesine rağmen) Wnt-3 boyanması izlenmedi ve bu yüzden istatistiksel olarak değerlendirilebilecek anlamlı bir veri elde edilemedi.

Yapılan değerlendirmede tümörlerin mikroskopik derecesi ile immünohistokimyasal belirteçlerin reaksiyon şiddeti ve paterni (boyanma özellikleri) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 3).

Vakaların sadece 2'si (%1,7) yüksek dereceli olduğundan ve bu iki vaka MMP7 skorlamasında istatistiksel açıdan yeterli veriyi sağlamadığı için "p" değeri hesaplanamadı (Tablo 3).

Tablo 3. Mikroskopik Derece ile Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması

		Mikroskopik Derece				
		Düşük Dereceli		Yüksek Dereceli		p
		N	ORT±SS	N	ORT±SS	
β-Katenin		119	17,34±20,99	2	22,5±31,82	0,975
Ki67		119	46,01±18,92	2	57,5±17,68	0,363
Vimentin		119	57,14±20,5	2	72,5±10,61	0,273
VEGF		119	35,14±33,03	2	3±2,83	0,134
		N	%	N	%	p
MMP7	1	60	50,4	1	50,0	
	2	39	32,8	1	50,0	
	3	20	16,8	0	0	

Yapılan değerlendirmede tümörlerin lenfovasküler invazyon durumu ile immünohistokimyasal belirteçlerin reaksiyon şiddeti ve paterni (boyanma özellikleri) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 4).

Tablo 4. Lenfovasküler İnvazyon ile Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması

		Lenfovasküler İnvazyon				
		Hayır		Evet		p
		N	ORT±SS	N	ORT±SS	
β-Katenin		93	17,82±21,95	28	16,11±17,89	0,890
Ki67		93	45,97±17,99	28	46,96±21,96	0,836
Vimentin		93	58,6±20,55	28	53,39±19,91	0,199
VEGF		93	39±36,81	28	33,29±31,88	0,613
		N	%	N	%	p
MMP7	1	51	54,8	10	35,7	0,089
	2	26	28,0	14	50,0	
	3	16	17,2	4	14,3	

Yapılan değerlendirmede tümörlerin perinöral invazyon durumu ile immünohistokimyasal belirteçlerin reaksiyon şiddeti ve paterni (boyanma özellikleri) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 5).

Tablo 5. Perinöral İnvazyon ile Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması

		Perinöral İnvazyon				
		Hayır		Evet		p
		N	ORT±SS	N	ORT±SS	
β-Katenin		105	18,21±21,81	16	12,25±14,32	0,513
Ki67		105	46±18,88	16	47,5±19,49	0,793
Vimentin		105	57,14±20,44	16	59,06±21,07	0,669
VEGF		105	34,28±32,73	16	36,81±35,82	0,871
		N	%	N	%	p
MMP7	1	53	50,5	8	50,0	0,403
	2	33	31,4	7	43,8	
	3	19	18,1	1	6,3	

Yapılan değerlendirmede lenf nodu tutulumu olan hastalarda nükleer β-katenin ekspresyonu ortalama 20,67±22,00 olarak saptanırken, lenf nodu tutulumu olmayan hastalarda 12,48±18,6 olarak saptandı. Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,024) (Tablo 6).

Lenf nodu tutulumu olan hastalarda sitoplazmik ve membranöz VEGF immünoaktivitesi ortalama 38,52±32,36 olarak saptanırken, lenf nodu tutulumu olmayan hastalarda 28,67±33,44 olarak saptandı. Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,039) (Tablo 6).

Lenf nodu tutulum durumu ile diğer immünohistokimyasal belirteçlerin reaksiyon şiddeti ve paterni (boyanma özellikleri) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 6).

Tablo 6. Lenf Nodu Tutulumu ile Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması

		Lenf Nodu Tutulumu				
		Yok		Var		p
		N	ORT±SS	N	ORT±SS	
β-Katenin		73	12,48±18,6	48	20,67±22	0,024
Ki67		73	46,16±18,85	48	46,25±19,14	0,911
Vimentin		73	58,7±20,8	48	55,42±19,94	0,318
VEGF		73	28,67±33,44	48	38,52±32,36	0,039
		N	%	N	%	p
MMP7	1	36	49,3	25	52,0	0,116
	2	21	28,8	19	39,5	
	3	16	21,9	4	8,5	

Yapılan değerlendirmede tümör evresi ≤ 2 olan hastalarda sitoplazmik ve membranöz VEGF immünoaktivitesi ortalama $28,9 \pm 34,00$ olarak saptanırken, tümör evresi ≥ 3 hastalarda $38,91 \pm 31,82$ olarak saptandı. Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,030$) (Tablo 7).

Tümör evresi ile diğer immünohistokimyasal belirteçlerin reaksiyon şiddeti ve paterni (boyanma özellikleri) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ancak tümör evresi ≤ 2 olan ve evresi ≥ 3 hastaların nükleer β -katenin ekspresyon düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da "p" değerinin (0,062) olması ve bu grupların ortalamaları arasında gözlenen fark, vaka sayısının artırılmasıyla istatistiksel anlamlılığın yakalanabileceğini düşündürdü (Tablo 7).

Tablo 7. Tümör Evresi ile Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması

		Evre				
		≤ 2		≥ 3		p
		N	ORT $\pm$ SS	N	ORT $\pm$ SS	
β-Katenin		69	12,69 $\pm$ 17,93	52	20,99 $\pm$ 22,55	0,062
Ki67		69	46,01 $\pm$ 19,19	52	46,44 $\pm$ 18,66	0,821
Vimentin		69	58,7 $\pm$ 21,26	52	55,67 $\pm$ 19,38	0,336
VEGF		69	28,9 $\pm$ 34 ,00	52	38,91 $\pm$ 31,82	0,030
		N	%	N	%	p
MMP7	1	36	52,2	25	48,1	0,228
	2	19	27,5	21	40,4	
	3	14	20,3	6	11,5	

Yapılan değerlendirmede tümörlerin sahip olduğu toplam kötü prognoz faktör sayısı ile immünohistokimyasal belirteçlerin reaksiyon şiddeti ve paterni (boyanma özellikleri) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 8).

Tablo 8. Toplam Kötü Prognoz Faktörü ile Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması

		Kötü Prognoz Faktörleri				
		≤ 2		≥ 3		p
		N	ORT $\pm$ SS	N	ORT $\pm$ SS	
β-Katenin		95	18,55 $\pm$ 22,18	26	13,31 $\pm$ 15,78	0,585
Ki67		95	45,58 $\pm$ 18,82	26	48,46 $\pm$ 19,33	0,480
Vimentin		95	57,32 $\pm$ 21,03	26	57,69 $\pm$ 18,51	0,984
VEGF		95	35,37 $\pm$ 32,32	26	31,85 $\pm$ 35,97	0,394
		N	%	N	%	p
MMP7	1	49	80,3	12	19,7	0,183
	2	28	70,0	12	30,0	
	3	18	90,0	2	10,0	

Yapılan çalışmada tümördeki toplam kötü prognoz faktörü ile immünohistokimyasal belirteçlerin reaksiyon şiddeti ve paterni (boyanma özellikleri) arasında yapılan korelasyon analizinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 9).

İmmünohistokimyasal belirteçlerin birbirleriyle olan korelasyonları değerlendirildiğinde ise tümör hücrelerinin nükleer Ki67 proliferasyon indeksi ve stromal hücrelerdeki vimentin ekspresyon düzeyi arasında düşük düzeyli ($p=0,001$, $r=-0,294$) ters bir korelasyon varlığı saptandı (Tablo 9).

Tümör hücrelerindeki nükleer β -katenin ekspresyon düzeyi ve VEGF immünoreaktivitesi arasında düşük düzeyli ($p=0,001$, $r=0,294$) doğrusal bir korelasyon varlığı saptandı (Tablo 9).

Diğer immünohistokimyasal belirteçler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (Tablo 9).

Tablo 9. Boyanma Özellikleri ve Kötü Prognoz Faktörlerinin Korelasyon Analizi

		β-Katenin	Ki67	Vimentin	VEGF	Toplam Risk
β-Katenin	R	1,000				
	P	–				
Ki67	R	0,122	1,000			
	P	0,183	–			
Vimentin	R	-0,002	-0,294	1,000		
	P	0,981	0,001	–		
VEGF	R	0,299	-0,047	0,024	1,000	
	P	0,001	0,610	0,796	–	
Kötü Prognoz Faktörleri	R	-0,149	-0,003	-0,097	-0,127	1,000
	P	0,104	0,972	0,292	0,165	–

5- TARTIŞMA

Kolorektal karsinomların yaklaşık %10'u iyi diferansiye, %70'i orta derecede diferansiye, %20'si kötü diferansiye olarak tanı alır. İkili sistem kullanıldığında da bu tümörlerin %80'i düşük dereceli, %20'si yüksek dereceli olarak tanı alır (71). Bizim çalışmamızda ise vakaların sadece %1,7'si yüksek dereceli olarak tanı almıştı. Bu durum bazı bulgularımızın istatistiksel olarak anlamsız veya literatür ile uyumsuz olmasına sebep olabilir. Genel bilgilerimize göre tümör içindeki gland formasyonu > %95 olduğunda tümör iyi diferansiye, %50-95 olduğunda tümör orta derecede diferansiye, < %50 olduğunda tümör kötü diferansiye olarak değerlendirilir (10, 29, 71) ancak cerrahi patoloğların büyük bir kısmı "Gestaltçı" bir eğilimde olduğu için vakaların büyük bir kısmı orta derecede diferansiye olarak değerlendirilmektedir (10). Purdie C. A. ve Piris J.'nin (72) yaptıkları çalışmada, mikroskopik derecelendirme yapılırken tümörün tamamının gland formasyonunu değerlendirmek yerine tümördeki en kötü diferansiye alanın gland formasyonunu değerlendirmenin hasta prognozu açısından daha yerinde olacağını bildirmişlerdir. Ayrıca mikroskopik derecenin sadece klasik adenokarsinomlarda prognostik önem arz ettiğini ve mikrosatellit instabilite gösteren vakalarda yüksek dereceli adenokarsinomların bile daha iyi prognozlu olduğu bilinmektedir (71). Çalışmamızda yüksek dereceli tümörlerin oranca düşük çıkmasının sebebi tümörün tamamını değerlendirmemiz veya davranışsal eğilimlerimiz olabilir.

Çalışmamızda 121 kolorektal adenokarsinom vakasının %23,1'inde lenfovasküler invazyon izlendi. Lim SB, Yu CS, Jang SJ ve ark. (73) 2417 kolorektal adenokarsinom vakası üzerinde yaptıkları çalışmada vakaların %25,2'sinde lenfovasküler invazyon saptamışlardır. Johannes Betge ve ark. (74) retrospektif olarak seçtikleri 381 kolorektal adenokarsinom vakasının %33'ünde lenfatik, %23'ünde ise vasküler invazyon saptamışlardır. Bu çalışmalardaki lenfovasküler invazyon oranları ile bizim vakalarımızda izlediğimiz lenfovasküler invazyon oranları benzerlik göstermektedir.

Çalışmaya dahil ettiğimiz 121 vakanın ilk ve ikinci bakısında vakaların %13,2'sinde perinöral invazyon izlendi. Catherine Liebig, Gustavo Ayala ve ark. (75) 269 vaka üzerinde yaptıkları çalışmada ilk bakıda vakaların %0,5'inden daha azında perinöral invazyon saptamışlardır ancak daha sonra bu vakaları retrospektif olarak tekrar incelediklerinde vakaların aslında %22'sinde perinöral invazyon olduğunu fark etmişlerdir. Yine benzer bir şekilde Moo Jun Baek, Hyung Wook Lee ve ark. (76) 148 vaka üzerinde yaptıkları çalışmada ilk bakıda vakaların %10'undan daha azında perinöral invazyon saptamışlardır ancak daha sonra bu vakaları retrospektif olarak tekrar incelediklerinde vakaların aslında %20,9'unda perinöral invazyon olduğunu fark etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da ilk bakıda perinöral invazyon varlığını saptayabildiğimiz vaka oranı bu iki çalışmaya göre daha yüksektir ancak ikinci bakıda literatürden farklı olarak ikinci bakıda fark bulunamamıştır.

Çalışmamızda tümördeki nükleer β -katenin ekspresyon oranının mikroskopik derece, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, tümör evresi ve kötü prognostik faktörler ile ilişkili olmadığı ancak lenf nodu tutulumu ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisinin olduğu izlendi. M Kobayashi, Y Ajioka ve ark. (77) yaptıkları çalışmada da bizim bulgularımızla benzer bir şekilde nükleer β -katenin ekspresyonunun tümörün mikroskopik derecesi ile ilişki olmadığını saptamışlardır. Yine benzer bir şekilde Guilherme Muniz Bourroul ve ark. (78) yaptıkları çalışmada kolorektal karsinomlarda β -katenin boyanmasının klinik ve patolojik özellikler ile ilişkisinin olmadığını saptamışlardır. A. Stanczak ve ark. (79) nükleer β -katenin ekspresyonunun bağımsız bir kötü prognoz faktörü olduğunu belirttikleri çalışmada bizim bulgularımızın aksine genel (membranöz, sitoplazmik ve nükleer) β -katenin boyanmasının lenf nodu tutulumu ile ilişkili olmadığını belirtmişlerdir. Wu ve ark. (80) ise artmış nükleer β -katenin ekspresyonunun lenf nodu metastazı pozitifliği ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu saptamıştır. Kamposioras ve ark. (81) yaptıkları çalışmada membranöz β -katenin kaybının 3'ten fazla perikolik lenf nodu tutulumu (N2) ile ilişkili olduğunu saptamıştır. Membranöz β -katenin kaybı, nükleer β -katenin ekspresyonu ile ilişkili olduğu için (77,78) bu bulgunun bizim bulgularımız ve Wu ve ark. bulguları ile benzerlik taşıdığı düşünülebilir. Yine Kamposioras ve ark. (81)

yaptıkları çalışmada β -katenin ekspresyon düzeyinin perinöral invazyon ve lenfovasküler invazyon ile ilişkisinin bulunmadığı belirtilmiştir (81).

Çalışmamızda VEGF ekspresyon düzeyinin mikroskopik derece, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ve kötü prognoz faktörleri ile ilişkili olmadığı ancak lenf nodu tutulumu ve tümör evresi ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisinin olduğu izlendi. S. Zong ve ark. (82) 27 çalışmayı birleştirerek yaptıkları meta analizde, 22 çalışmanın (3212 hasta) VEGF'deki ekspresyon artışının lenf nodu tutulumu ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Yine aynı meta analizde VEGF ekspresyonu yüksek olan tümörlerde metastazın daha sık görüldüğü; evre III ve IV olan tümörlerde, evre I ve II olan tümörlere göre VEGF ekspresyon artışının da anlamlı derecede yüksek olduğu belirtilmiştir. Lee M. Ellis ve ark. (83) yaptığı çalışmada VEGF boyanma yoğunluğu yüksek olan vakalarda tümör vaskülarizasyonunun arttığını ve bunun da hastada metastaz olma olasılığını arttırdığını saptamıştır. Bunun yanı sıra VEGF ekspresyon düzeyi ile metastazın direkt olarak ilişkili olduğu aynı çalışmada belirtilmiştir. Lee M Ellis ve ark. yaptıkları bu çalışmada spesifik tirozin kinaz VEGF reseptör blokörlerinin metastazı inhibe ettiğini de saptamıştır. Bu bulgular bizim çalışmamızda elde ettiğimiz VEGF ekspresyonunun lenf nodu tutulumu ve tümör evresi ile ilişkisi hakkındaki bulguları direkt ve indirekt olarak destekler niteliktedir. S. Zong ve ark. (82) yaptıkları meta analizde mikroskopik derecesi yüksek olan tümörlerin VEGF ekspresyonunun artmış olduğunu ve vasküler invazyonun da anlamlı bir şekilde sıklaştığını belirtmiştir. VEGF ekspresyon artışının bağımsız bir kötü prognoz faktörü olduğu da yine aynı makalede belirtilmiştir. Bu bulgular ise çalışmamızdaki bu konu ile ilgili bulguları desteklememektedir.

Tümörlerdeki MMP7 ekspresyon düzeyi ile mikroskopik derece, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, lenf nodu tutulumu, tümör evresi ve kötü prognoz faktörleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı. Wu ve ark. (80) yaptıkları çalışmada MMP7 ekspresyon artışının lenf nodu tutulumu ve uzak metastaz ile ilişkili olduğunu belirtmiştir. Xingwu Zhu ve ark. (84) çalışmasının sonuçları da Wu

ve ark. yaptığı çalışma ile benzer sonuçlar vermiştir. Selja Koskensalo ve ark. (85) yaptıkları çalışmada MMP7 ekspresyonu ve mikroskopik derece arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu saptamıştır. Andrea Polistena ve ark. (86) yaptıkları çalışmada kolorektal adenomlarındaki MMP7 ekspresyon düzeyinin evre I ve II kolorektal adenokarsinomlarından daha düşük olduğu belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada evre I ve II kolorektal karsinomlarındaki MMP7 ekspresyonunun evre III ve IV hastalara göre daha düşük olduğu belirtilmiştir yani tümör evresi ilerledikçe MMP7 ekspresyonunun da arttığı saptanmıştır. MMP7 ekspresyon düzeyinin perinöral invazyon ve lenfovasküler invazyon durumu ile ilgili bulgularımızı yanlışlayacak veya destekleyecek herhangi bir yayın literatür taramasında bulunamamıştır.

Çalışmamızda stromal vimentin ekspresyon düzeyi ile mikroskopik derece, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, lenf nodu tutulumu, tümör evresi ve kötü prognoz faktörleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı. CY Ngan ve ark. (69). yaptıkları çalışmada tümör stromasındaki vimentin ekspresyon düzeyinin mikroskopik derece, lenf nodu tutulumu ve lenfovasküler invazyon ile anlamlı bir ilişkisinin olmadığını belirtmiştir. Y.Toiyama ve ark. (87) da benzer bir şekilde stromal vimentin ekspresyon düzeyinin tümörün mikroskopik derecesi ile ilişkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Bu bulgular bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir ancak Y.Toiyama ve ark. yaptığı yine aynı çalışmada vimentin ekspresyon düzeyi yüksek olan vakalarda serozal invazyon, lenf nodu tutulumu, venöz invazyon ve lenfatik invazyonun daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu bulgular ise bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz bulguları desteklememektedir.

Vakalarımızda Ki67 proliferasyon indeksi ile mikroskopik derece, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, lenf nodu tutulumu, tümör evresi ve kötü prognoz faktörleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı. N Melling ve ark. (88) yaptıkları çalışmada Ki67 proliferasyon indeksinin mikroskopik derece ile ilişkisi olmadığını belirtmiştir. Ø Fluge ve ark. (70) yaptıkları çalışmada yine benzer bir şekilde Ki67 proliferasyon indeksinin mikroskopik derece ile ilişkisi olmadığını ve buna ek olarak

tümör evresi ile de ilişkisi olmadığını belirtmiştir. Bu bulgular bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. Bunun yanında N Melling ve ark. (88) yine aynı çalışmada artmış Ki67 proliferasyon indeksinin azalmış lenf nodu tutulumu ve düşük tümör evresi ile ilişkili olduğunu saptamıştır. Ki67 proliferasyon indeksinin bağımsız bir iyi prognoz göstergesi olduğunu belirtmiştir. CTF Oshima, K Iriya, NM Forones (89) ise yaptıkları çalışmada artmış Ki67 proliferasyon indeksinin kolorektal karsinomlarda kötü prognoz ile ilişkili olduğunu ancak tümör evresi ile ilişkili olmadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmalarda Ki67 proliferasyon indeksinin mikroskopik derece ile ilişkisinin olmadığı; lenf nodu tutulumu, tümör evresi ve kötü prognoz faktörleri konusunda farklı çalışmalarda farklı bulguların saptandığı; perinöral invazyon ve lenfovasküler invazyon hakkında araştırma yapılmadığı görülmektedir (70, 87, 89). Ki67 proliferasyon indeksinin perinöral invazyon ve lenfovasküler invazyon durumu ile ilgili bulgularımızı yanlışlayacak veya destekleyecek herhangi bir yayın literatür taramasında bulunamamıştır.

Boyama özellikleri ve kötü prognoz faktörlerinin korelasyonu değerlendirildiğinde Ki67 proliferasyon indeksi ile stromal vimentin ekspresyonu arasında ters bir korelasyon izlenirken, VEGF ekspresyonu ve nükleer β -katenin ekspresyonu arasında doğrusal bir korelasyon izlenmiştir. Literatür taramasında bu bulguları destekleyecek bir çalışma bulunamamıştır ancak Wu ve ark. (78) yaptıkları çalışmada β -katenin ve MMP7 ekspresyonları arasında doğrusal bir korelasyon saptamıştır. N Melling ve ark (88) ise yaptıkları çalışmada Ki67 proliferasyon indeksi ve nükleer β -katenin ekspresyonu arasında doğrusal bir korelasyon izlediklerini belirtmiştir. Bu bulgular bizim çalışmamızdaki bulgular ile uyumlu değildir ancak çalışmalar arası immünohistokimyasal uygulamalar, değerlendirme yöntemleri ve vakaların dağılımı farklılıklar arz ettiği için bulgular birbirleri ile uyumlu olmamış olabilir.

6-SONUÇLAR

1- 121 vaka içeren çalışmamızda mikroskopik derecesi yüksek olan vakaların oranı, literatürde belirtilen oranlara göre çok düşüktü.

2-Çalışmamızda lenfovasküler invazyon saptanan vakaların oranı ile literatürde belirtilen oranlar birbirleri ile uyumluydu.

3-Literatürde, ilk bakıda fark edilip raporlanan perinöral invazyon oranının çok düşük olduğu ve aynı vakalar retrospektif olarak özellikle perinöral invazyon açısından değerlendirildiğinde bu oranların dramatik olarak yükseldiği belirtilmiştir. Çalışmamızda ilk bakıda raporlanan perinöral invazyon oranı literatüre göre 2-10 kat kadar daha yüksektir. Perinöral invazyonun kötü bir prognostik faktör olduğu bilinip vakalar buna dikkat edilerek incelendiğinde patoloji raporlarının doğruluğu artmaktadır.

4-Nükleer β -katenin ekspresyon düzeyi yüksek olan kolorektal adenokarsinom vakalarında, nükleer β -katenin ekspresyon düzeyi düşük olan vakalara göre lenf nodu tutulumu anlamlı bir şekilde artmaktadır. Literatürdeki çalışmalar da bu sonucu desteklemektedir.

5- VEGF ekspresyon düzeyi yüksek olan kolorektal adenokarsinom vakalarında, VEGF ekspresyon düzeyi düşük olan vakalara göre lenf nodu tutulumu ve tümörün patolojik evresi anlamlı bir şekilde artmaktadır. Literatürdeki çalışmalar da bu sonuçları desteklemektedir.

6-Tümördeki MMP7 ekspresyon düzeyinin mikroskopik derece, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu tutulumu ve tümör evresi ile ilişkisi yoktur. Literatürde MMP7 ekspresyon düzeyinin tümörün mikroskopik derecesi ve evresi ile ilişkili olduğunu saptayan çalışmalar mevcuttur.

7-Tümör stromasındaki vimentin ekspresyon düzeyinin mikroskopik derece, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu tutulumu ve tümör evresi ile ilişkisi yoktur. Literatürde vimentin ekspresyon düzeyinin lenf nodu tutulumu, lenfovasküler invazyon ve serozal invazyon ile ilişkili olduğunu saptayan çalışmalar mevcuttur.

8- Tümördeki Ki67 proliferasyon indeksinin mikroskopik derece, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu tutulumu ve tümör evresi ile ilişkisi yoktur. Literatürde Ki67 proliferasyon indeksinin yüksek olmasının iyi bir prognostik faktör olduğunu iddia eden çalışmalar olduğu gibi, bu durumun kötü bir prognostik faktör olduğunu iddia eden farklı çalışmalar mevcuttur.

9-Tümördeki nükleer β -katenin ekspresyon düzeyi ile VEGF ekspresyon düzeyi arasında doğrusal bir korelasyon mevcuttur. Bu iki proteinin ekspresyon düzeyi arttıkça lenf nodu tutulum pozitifliği de artmaktadır. Bulgular doğrultusunda bu proteinlerin ekspresyonunun birbiri ile ilişkili olduğu düşünülebilir.

7-ÖZET

Wnt yolları hücre bölünmesi, hücre göçü, hücre farklılaşması ve hücre ölümünde rol alan geniş bir transmembran reseptör ailesi ve hücre içi sinyalizasyon sistemidir. Bu yoldaki bozuklukların karsinogenezde ve kanser prognozunda önemli bir paya sahip olduğu düşünülmektedir. Kolorektal karsinomlar sanayileşmiş ülkelerde en sık görülen ve kansere bağlı ölümlerden en çok sorumlu olan kanserlerden biridir.

Bu sinyal sistemi elemanlarının kolorektal adenokarsinomların prognozuna etkisi ortaya konabilirse bu proteinlere özgü kemoteröpatikler geliştirilebilecek ve bu yoldaki proteinlerin ekspresyon düzeyi kolorektal adenokarsinomlarında prognostik faktörlerden biri olabilecektir.

Bu çalışmada Wnt3, β -Katenin, MMP7, VEGF, Vimentin ve Ki67 ekspresyonlarının kolorektal adenokarsinomlarda evre ve diğer prognostik faktörlerle olan ilişkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışmamız için 1 Ocak 2012 ile 1 Ocak 2015 tarihleri arasında merkezimizde kolorektal adenokarsinom sebebiyle opere edilmiş 121 vakanın tümör blokları kullanıldı. Bu vakalardaki Wnt3, β -Katenin, MMP7, VEGF, Vimentin ve Ki67 ekspresyon düzeyini belirlemek için immünohistokimyasal yöntemler uygulandı. Vakalar mikroskop altında değerlendirildi.

Elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu, bağımsız grupların ortalaması, kategorik verilerin gruplar arası yüzde dağılımları, birden fazla sürekli verinin korelasyonu SPSS v18 kullanılarak hesaplandı.

Tümördeki artmış nükleer β -katenin ve VEGF ekspresyon düzeyinin lenf nodu tutulumunu arttırdığı izlendi. Buna ek olarak artmış VEGF ekspresyonunun tümör evresini yükselttiği saptandı. Tümöral MMP7 ekspresyonunun, Ki67 proliferasyon

indeksinin ve stromal vimentin ekspresyonunun mikroskopik derece, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu tutulumu ve tümör evresi ile ilişkisi olmadığı görüldü. Tümördeki nükleer β -katenin ekspresyonu ve VEGF ekspresyonunun birbirleri ile korele olduğu izlendi.



8-SUMMARY

Wnt pathway is a large transmembrane receptor family and an intracellular signaling system which takes role in cell proliferation, migration, differentiation and death. Studies suggest that disorders in this pathway takes a significant part in carsinogenesis and cancer prognosis. Colorectal carcinomas are one of the most common cancers in industrialized countries and one of the most responsible for cancer-related deaths.

If the effect of this signaling system on colorectal adenocarcinoma prognosis is revealed, protein specific new chemotherapeutic agents can be developed and this pathway can become one of the prognostic factors in colorectal adenocarcinoma.

In this study, it was aimed to investigate the relationship between Wnt3, β -catenin, MMP7, VEGF, Vimentin and Ki67 expressions in colorectal adenocarcinomas with stage and other prognostic factors. Tumor blocks of 121 cases, who underwent surgery because of colorectal adenocarcinoma between January 1, 2012 and January 1, 2015 at our center, were selected for our study. Immunohistochemical methods were used to determine the expression levels of Wnt3, β -catenin, MMP7, VEGF, Vimentin and Ki67 in these cases. The cases were evaluated under a microscope.

The normal distribution of the obtained data, mean value of the independent groups, the percent distribution of categorical data among the groups, the correlation of multiple continuous data were calculated using SPSS v18.

It was observed that increased levels of nuclear β -catenin and VEGF expression in the tumor, enhance lymph node involvement. In addition, it was found

that increased expression of VEGF enhances tumor progression. Tumoral MMP7 expression, Ki67 proliferation index, and stromal vimentin expression were not associated with microscopic grade, lymphovascular invasion, perineural invasion, lymph node involvement, and tumor progression. Nuclear β -catenin and VEGF expression levels in the tumour were observed to correlate with each other.



9-REFERANS KAYNAKLAR

1. Sadler TW (Thomas W.) Langman's Medical Embryology, 12th edition
Lippincott Williams & Wilkins 2012
2. İlgi S, Konan A Gastrointestinal Sistem Anatomisi, 4. Baskı, Ankara:Güneş
Kitabevi 2013
3. Arıncı K, Elhan A Anatomi, 1.Baskı, Ankara Güneş Kitabevi 1995
4. Snell RS Clinical Anatomy for Medical Students, 6th Edition, Çapa İstanbul Nobel
Tıp Kitapevleri 2004
5. Netter FH Atlas of Human Anatomy, 1st Edition, Japan Ciba-Geigy Corporation
1989
6. Akarsu M Kolon Anatomisi ve Anomalileri, 1. Baskı, Ankara Nobel Tıp
Kitapevleri 2007
7. Colins P, Wigley C Gray's Anatomy The Anatomical Basis of Clinical Practice,
39th Edition, Edinburgh Churchill Livingstone 2005
8. Inderbir Singh Textbook of Human Histology, 6th Edition, New Delhi Jaypee
Brothers Medical Publishers Ltd. 2011
9. Siegel R, Naishadham D, Jemal A Cancer statistics, 2012 . CA Cancer J Clin.
2012;62:10-29

10. Christopher D.M. Fletcher Diagnostic Histopathology of Tumors, 4th Edition, Saunders Elsevier Inc. 2013

11. Lynch HT, De La Chapelle A Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med. 2003;348:919-932

12. Bellizzi AM, Frankel WL Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. Adv Anat Pathol. 2009;16:405-417

13. Lindor NM, Petersen GM, Hadley DW, et al. Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: a systematic review. JAMA 2006;296:1507-1517

14. Shalin SC, Lyle S, Calonje E, et al. Sebaceous neoplasia and the Muir-Torre syndrome: important connections with clinical implications. Histopathol. 2010;56:133-147

15. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst. 2004;96:261-268

16. Greenson JK, Huang SC, Herron C, et al. Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. Am J Surg Pathol. 2009;33:126-133

17. Hyde A, Fontaine D, Stuckless S, et al. A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. Am J Surg Pathol. 2010;34:1820-1829

18. Balaguer F, Balmana J, Castellvi-Bel S, et al. Validation and extension of the PREMM1,2 model in a population-based cohort of colorectal cancer patients. Gastroenterology 2008;134:39-46

19. Lanza G, Gafa R, Matteuzzi M, et al. Medullary-type poorly differentiated adenocarcinoma of the large bowel: a distinct clinicopathologic entity characterized by microsatellite instability and improved survival. *J Clin Oncol.* 1999;17:2429-2438
20. Garcia-Solano ZJ, Perez-Guillermo M, Conesa-Zamora P, et al. Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. *Hum Pathol.* 2010;41:1359-1368
21. Tuppurainen K, Makinen JM, Junttila O, et al. Morphology and microsatellite instability in sporadic serrated and non-serrated colorectal cancer. *J Pathol.* 2005;207:285-294
22. Li AF, Li AC, Hsu CY, et al. Small cell carcinomas in gastrointestinal tract: immunohistochemical and clinicopathological features. *J Clin Pathol.* 2010;63:620-625
23. Gaffey MJ, Mills SE, Lack EE. Neuroendocrine carcinoma of the colon and rectum. A clinicopathologic, ultrastructural, and immunohistochemical study of 24 cases. *Am J Surg Pathol.* 1990;14:1010-1023
24. Levi GS, Harpaz N. Intestinal low-grade tubuloglandular adenocarcinoma in inflammatory bowel disease. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:1022-1029
25. Verhulst J, Ferdinande L, Demetter P, et al. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol.* 2012;65:381-388
26. Washington MK, Berlin J, Branton P, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133:1539-1551

27. Washington MK Colorectal carcinoma: selected issues in pathologic examination and staging and determination of prognostic factors. Arch Pathol Lab Med. 2008;132:1600-1607

28. Popat S, Hubner R, Houlston RS Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. J Clin Oncol. 2005;23:609-618

29. Juan Rosai Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, 10th Edition, Mosby Elsevier Inc. 2011

30. Werling RW, Yaziji H, Bacchi GE, et al. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. Am J Surg Pathol. 2003;27:303-310

31. Magnusson K, De Wit M, Brennan DJ, et al. SATB2 in combination with cytokeratin 20 identifies over 95% of all colorectal carcinomas. Am J Surg Pathol. 2011;35:937-948

32. McGregor DK, Wu TT, Rashid A, et al. Reduced expression of cytokeratin 20 in colorectal carcinomas with high levels of microsatellite instability. Am J Surg Pathol. 2004;28:712-718

33. Zlobec I, Bihl M, Foerster A, et al. Comprehensive analysis of CpG island methylator phenotype (CIMP)-high, -low, and -negative colorectal cancers based on protein marker expression and molecular features. J Pathol. 2011;225:336-343

34. Hinoi T, Tani M, Lucas PC, et al. Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. Am J Pathol. 2001;159:2239-2248

35. Winn B, Tavares R, Fanion J, et al. Differentiating the undifferentiated: immunohistochemical profile of medullary carcinoma of the colon with an emphasis on intestinal differentiation. *Hum Pathol.* 2009;40:398-404
36. Boparai KS, Dekker E, Van Eeden S, et al. Hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas as a phenotypic expression of MYH-associated polyposis. *Gastroenterology.* 2008;135:2014-2018
37. Funkhouser WK JR, Lubin IM, Monzon FA, et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2012;14:91-103
38. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med.* 2003;349:247-257
39. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, et al. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 2010;304:1812-1820
40. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, et al. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res.* 2010;16:790-799
41. Lievre A, Bachet JB, Boige V, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 2008;26:374-379
42. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010;11:753-762

43. Li F, Chong ZZ, Maiese K Winding through the Wnt pathway during cellular development and demise. *Histol Histopathol.* 2006;21(1):103-124
44. Katoh M, Katoh M Comparative genomics on Wnt5a and Wnt5b genes. *Int J Mol Med.* 2005;15(4):749-753
45. Li F, Chong ZZ, Maiese K Vital elements of the Wnt-Frizzled signaling pathway in the nervous system. *Neurovasc Res.* 2005;2(4):331-340
46. Urano T Wnt-beta-catenin signaling in bone metabolism. *Clin Calcium.* 2006;16(1):54-60
47. Souaze F, Viardot-Foucault V, et al. Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/ β -catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. *Carcinogenesis* 2005;27(4):708-716
48. Blavier L, Lazaryev A, Dorey F, et al. Matrix metalloproteinases play an active role in Wnt1-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* 2006;66(5):2691-2699
49. Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp Mol Med.* 2006;38(1):1-10
50. Mao B, Wu W, Davidson G, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 2002;417(6889):664-667
51. Kohn AD, Moon RT Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium.* 2005;38(3-4):439-446
52. Goldstein B, Takeshita H, Mizumoto K, et al. Wnt signals can function as positional cues in establishing cell polarity. *Dev Cell.* 2006;10(3):391-396

53. Katoh M Wnt/PCP signaling pathway and human cancer. *Oncol Rep.* 2005;14(6):1583-1588
54. Timm A, Grosschedl R Wnt signaling in lymphopoiesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;290:225-252
55. Janssens N, Janicot M, Perera T The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery. *Invest New Drugs* 2006;24(4):263-280
56. Macdonald BT, Tamai K, HE X Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell.* 2009;17(1):9-26
57. Franco CA, Liebner S, Gerhardt H Vascular morphogenesis: a Wnt for every vessel?. *Current Opinion in Genetics & Development* 2009;19:476-483
58. http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Wnt_Signaling 28 Nov 2016
59. <https://www.scbt.com/scbt/product/wnt-3-antibody-y-15> 28 Nov 2016
60. <https://www.scbt.com/scbt/product/mmp-7-antibody-l-17> 28 Nov 2016
61. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/RB-9035-P> 28 Nov 2016
62. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/MS-1467-P> 28 Nov 2016
63. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/RM-9120-R7> 28 Nov 2016
64. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/RM-9106-R7> 28 Nov 2016

65. Lisha Qi, Baocun Sun, Zhiyong Liu, et al. Wnt3a expression is associated with epithelial-mesenchymal transition and promotes colon cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33(1):107
66. Anna Pryczynicz, Mariusz Gryko, Katarzyna Niewiarowska, et al. Immunohistochemical expression of MMP-7 protein and its serum level in colorectal cancer. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2013;51(3):206-212
67. Darwish H, Trejo IE, Shapira I, et al. Fighting colorectal cancer: molecular epidemiology differences among Ashkenazi and Sephardic Jews and Palestinians. *Ann Oncol* 2002;13(9):1497-1501
68. Jian-Fang Liang, Hong-Kun Wang, Hong Xiao, et al. Relationship and prognostic significance of SPARC and VEGF protein expression in colon cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2010;29(1):71
69. Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, et al. Quantitative evaluation of vimentin expression in tumour stroma of colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 2007;96:986-992
70. Fluge Ø, Gravdal K, Carlsen E, et al. Expression of EZH2 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis. *British Journal of Cancer* 2009;101:1282-1289
71. Matthew Fleming, Sreelakshmi Ravula, Sergei F. Tatishchev Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Gastrointest Oncol* 2012;3(3):153-173
72. Purdie C A, Piris J Mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2000;36:121-126
73. Lim SB, Yu CS, Jang SJ, et al. Prognostic significance of lymphovascular invasion in sporadic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2010;53(4):377-384

74. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer. *Cancer* 2012;118(3):628-638

75. Catherine Liebig, Gustavo Ayala, Jonathan Wilks, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:5131-5137

76. Moo Jun Baek, Hyung Wook Lee, Tae Sung Ahn, et al. Clinical significance of perineural invasion in colorectal cancer. *Korean J Clin Oncol.* 2012;8(1):30-36

77. Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y et al. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 2000;82(10):1689-1693

78. Bourroul GM, Fragoso HJ, Gomes JW, et al. The destruction complex of beta-catenin in colorectal carcinoma and colonic adenoma. *Einstein* 2016;14(2):135-142

79. Stanczak A, Stec R, Bodnar L, et al. Prognostic significance of Wnt-1, β -catenin and E-cadherin expression in advanced colorectal carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* 2011;17:955-963

80. Qiong Wu, Yan Yang, Shiwu Wu et al. Evaluation of the correlation of KAI1/CD82, CD44, MMP7 and β -catenin in the prediction of prognosis and metastasis in colorectal carcinoma. *Diagnostic Pathology* 2015;10:176

81. Konstantinos Kamposioras, Athina Konstantara, Vassiliki Kotoula et al. The prognostic significance of Wnt pathway in surgically-treated colorectal cancer: β -catenin expression predicts for disease-free survival. *Anticancer Research* 2013;33:4573-4584

82. Shaoqi Zong, Hongjia Li, Qi Shi, et al. Prognostic significance of VEGF-C immunohistochemical expression in colorectal cancer: A meta-analysis. *Clinica Chimica Acta* 2016;458:106-114
83. Lee M. Ellis, Yutaka Takahashi, Wenbiao Liu, et al. Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: Biology and therapeutic implications. *The Oncologist* 2000;5(1):11-15
84. Zhu X, Han Y, Yuan C, et al. Overexpression of Reg4, alone or combined with MMP7 overexpression, is predictive of poor prognosis in colorectal cancer. *Oncology Reports* 2015;33:320-328
85. Koskensalo S, Louhimo J, Nordling S et al. MMP7 as a prognostic marker in colorectal cancer. *Tumor Biol.* 2011;32:259-264
86. Andrea Polistena, Alessandra Cucina, Simona Dinicola, et al. MMP7 expression in colorectal tumours of different stages. *In Vivo* 2014;28:105-110
87. Yuji Toiyama, Hiromi Yasuda, Susumu Saigusa, et al. Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2013;34(11):2548-2557
88. Melling N, Kowitz CM, Simon R, et al. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2016;69:209-214
89. Oshima CTF, Iriya K, Forones NM Ki-67 as a prognostic marker in colorectal cancer but not in gastric cancer. *Neoplasma* 2005;52:420-424