

T1223

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**NORMAL KOLON MUKOZASI, KOLOREKTAL ADENOM VE
ADENOKARSİNOMDA İMMÜNHİSTOKİMYASAL OLARAK
PCNA ve Ki-67 ile BELİRLENEN PROLİFERASYON
İNDEKSLERİNİN, p53 ve P-GLİKOPROTEİN İFADELERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ ve KARŞILAŞTIRILMASI
(Patoloji Uzmanlık Tezi)**

T1223/1-1

**Dr. Melek (Özkal) Üstün
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Tekinalp Gelen
(Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir)**

Antalya 1997

AKDENİZ
M.Ü.

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasının her aşamasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Tekinalp Gelen'e; yetişmemde emeği geçen hocalarım Sayın Prof. Dr. Şeyda Karaveli ve Prof. Dr. Gülten Karpuzoğlu'na; tezimin klinik verilerinin elde edilmesinde değerli katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Burhan Savaş'a; laboratuvar çalışmaları sırasında immünhistokimyasal boyamalarda yardımlarından dolayı Biyolog Figen Sargın'a ve diğer laboratuvar çalışanlarına; her zaman en büyük desteğim olan eşim Hasan Üstün'e teşekkürü borç bilirim.

Dr. Melek (Özkal) Üstün

İÇİNDEKİLER

	<i>SAYFA</i>
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
3. MATERYAL ve METOD	30
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇLAR	75
7. ÖZET	78
8. KAYNAKLAR	80

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kolon ve rektum karsinomları erkeklerde akciğer ve prostat karsinomlarından sonra üçüncü, kadınlarda meme karsinomlarından sonra ikinci sıklıkta görülmektedir. Kolon ve rektum karsinomları en sık 6 ve 7. dekatlarda ortaya çıkmakla birlikte olguların %20' si tanı konulduğunda 50 yaş altındadır. Butün ülkelerde görülebilen kolorektal karsinomun en sık olduğu ülkeler Amerika, Kanada, Avustralya ve İsveç'tir (1-6).

Kolon ve rektum karsinomlarının etyoloji ve patogenezinde çevresel ve genetik faktörler, diyet alışkanlıkları, inflamatuvar barsak hastalıklarının yanısıra son yıllarda artan moleküler biyolojik çalışmalarla tümör baskılayıcı gen ve onkogenlerin rolü de ortaya konulmuştur (7-9).

Kolon ve rektumdaki tüm kanserlerin %98'ini oluşturan adenokarsinomların büyük kısmının daha önceden varolan adenom üzerinden geliştiği bilinmektedir (10,11). Adenomlar içinde invaziv karsinom odaklarının görülmesi ve invaziv karsinomlar etrafında daha önceden varolan adenoma ait artıkların izlenmesi sıktır (11).

Son zamanlarda onkogenler ve tümör baskılayıcı genler ile ilgili gelişmeler insan tümörlerinde karsinogenezin değişik basamaklarını araştırmak için yeni olanaklar sağlamıştır (12). Kolorektal karsinomlarda onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin kaybını içeren çok basamaklı karsinogenez üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Kolon epitelinde hiperplaziyi adenom ve bunu da adenokarsinom oluşumu takip etmektedir. Bu morfolojik değişiklikler sırasında ilk ortaya çıkan moleküler değişiklik olan APC geninde mutasyonu DNA metilasyonunda kayıp, ras geninde mutasyon, DCC geninde kayıp ve p53 geninde mutasyon izlemektedir (13, 14).

İnsan kanserlerinde mutasyonu en çok gösterilmiş olan tümör baskılayıcı gen p53 genidir. Bu genin inaktivasyonu, delesyonu ve/veya mutasyonu onkogeniktir. Karsinogenezde p53 geni fiziksel faktörler, kimyasal karsinojenler

ve tümör virüslerinin temel hedefidir (15). Kromozom 17'nin kısa kolunda (17p13.1) bulunan ve 11 eksondan oluşan p53 geni hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan, moleküler ağırlığı 53 kD olan, 393 aminoasidik çekirdek fosfoproteinini kodlar (16-19).

Normal hücrelerde az miktarda bulunan p53 proteini insan tümörlerinde ve kültürlerdeki transforme olmuş hücrelerde artmış miktarda bulunmaktadır (15). Epitelyal, mezenkimal, hematopoietik, lenfoid ve santral sinir sistemi ile ilgili malignitelerin %50'den fazlasında değişmiş p53 geni gösterilmiştir; p53'ten yoksun olan farelerin normal doğması ve hayatlarının ileri bir döneminde kanser gelişebilmesi, p53'ün kanser gelişiminde başlatıcı olmadığını, geç dönemde ortaya çıktığını düşündürmektedir (20). Kolorektal adenokarsinom gelişiminde de, p53 gen mutasyonu ve allelik delesyonunun geç adenom evresinden adenokarsinoma geçiş aşamasında rol oynadığı ileri sürülmektedir; p53 genindeki değişikliklerin genetik heterojenitesi p53'ün tamamen kaybından, nokta mutasyona kadar farklılıklar göstermektedir (21-23).

Kanserli hastanın tedavisini belirlemede ve prognozu tahminde yardımcı olabilecek objektif verilere ihtiyaç duyulmaktadır. Kolorektal karsinomlarda histopatolojik tanı ve evresi aynı olan hastalarda prognoz tümörün biyolojik özellikleri nedeniyle farklı olabilmektedir. Bu nedenle tümör prognozunda rol oynayan parametrelerin saptanması tedaviyi yönlendirme açısından önem taşımaktadır (24). Günümüzde devam eden çalışmalar, tümör proliferasyon aktivitesinin ölçülmesinin prognozu belirlemede ve tedaviyi yönlendirmede yararlı olabileceğini göstermektedir (25, 26). Doku proliferasyon aktivitesini saptamak için kullanılan yöntemler; mitotik figürleri saymak, 3H-thymidine veya bromodeoxyuridine ile işaretlenme indeksini ölçmek, flow-sitometre ile hücre analizi ve immünohistokimyasal yöntemlerle PCNA ve Ki-67 antikorları ile boyanmanın değerlendirilmesi şeklindedir (27, 28).

Kolorektal adenom ve adenokarsinom biyolojik davranışını belirlemeye ışık tutmayı amaçlayan ve hücre kinetiğini değerlendiren bir çok çalışma yapılmaktadır. Mitotik figürleri saymak G2 ve M fazındaki hücreleri, thymidine ve bromodeoxyuridine indeksleri S fazındaki hücreleri saptar. DNA flow-sitometri ile yapılan analizler hücre proliferasyonunu yalnızca S fazındaki

hücreler olarak veya hücre döngüsünün G2/M fazı olarak gösterir. Mitotik indeksin saptanması, timidin ile yapılan otoradyografik çalışmalar, flow sitometri ve antibromodeoksiuridine ile S fazındaki hücrelerin işaretlenmesi gibi yöntemler zaman alıcı olmaları ve kompleks araç-gereç gerektirmeleri gibi dezavantajlara sahiptir. İmmünohistokimyasal metodların ise tümör proliferasyon aktivitesini saptamada; kolay uygulanabilir, tekrarlanabilir, ucuz, doku morfolojisini koruyabilen ve arşive dönük çalışmalar yapılabilmesine olanak veren, kısa zamanda sonuca ulaşılabilen avantajlarından dolayı rutin kullanıma girme potansiyelleri gittikçe artmaktadır. Ancak günümüzde bu yöntemlerin rutin kullanıma girebilmeleri için daha birçok araştırmaya ihtiyaç olduğu gözden kaçırılmamalıdır.

Parafine gömülü dokularda büyüme fraksiyonunu immünohistokimyasal olarak belirleyebilen beş antikorun karşılaştırıldığı bir çalışmada normal ve maligniteli dokular; monoklonal Ki-67, poliklonal Ki-67, PC10, MIB1 ve JC1 antikorları ile boyanmıştır. Antikorlar ile boyanma çekirdek, sitoplazma ve zemin boyanması açısından değerlendirilmiştir. Hiçbir belirteç tam ideal olmamakla birlikte, en iyi sonucun MIB1 ve poliklonal Ki-67 ile alındığını ve bunları JC1, PC10 ve monoklonal Ki-67'nin izlediği bulunmuştur (27).

Hücre proliferasyonu için gerekli bir faktör olan Ki-67'nin moleküler ağırlığı ve gerçek fonksiyonu bilinmemektedir. Ki-67 antikoru proliferen hücre çekirdeğindeki bir antijen ile reaksiyona girer ve Go fazı dışındaki tüm hücre döngüsünde ifade edilir. Bazen G1 fazının erken dönemlerinde de bulunmadığı bildirilmektedir (29, 30).

Miyachi ve arkadaşları 1978 yılında sistemik lupus eritematozuslu hastalardan elde edilen otoantikörlerin proliferen hücrelerde bulunan bir nükleer antijeni tanıdığını göstermişler ve bu antijeni "proliferating cell nuclear antigen" (PCNA) olarak isimlendirmişlerdir (31). PCNA son yıllarda doku proliferasyonunu belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır. DNA sentezi için gerekli olan PCNA, 36 kDa ağırlığında asidik non-histon nükleer protein olup, DNA polimeraz δ için yardımcı bir protein olarak görev yapmaktadır (32). PCNA mRNA yalnızca proliferen hücrelerde artar. Stabil PCNA mRNA'nın dinlenme fazındaki hücrelerde yokluğu PCNA'yı kodlayan gende intron 4'ün

varlığına bağlıdır. Bu intronun ortadan kalkmasıyla proliferen olan hücrelerde PCNA mRNA yüksek düzeylerde birikmektedir (33).

Malign tümörlerde ilaca direncin gelişmesi sitotoksik tedavinin etkinliğini sınırlamaktadır. Çok İlaça Direnç'li (ÇİD) hücrelerde ilaç birikimi azalmış olarak bulunmaktadır. ÇİD'li hücre dizilerinde değişmiş topoizomera II veya artmış glutathione S transferaz (GST) varlığı gösterilmişse de, P-glikoprotein (P-gp) yoğunluğunda artma en çok rastlanan değişikliktir (34, 35). Kolorektal tümörlerde P-gp varlığı insitu hibridizasyon ve immünhistokimya analizleri ile gösterilmiştir (24, 36).

P-gp 170-kDa ağırlığında plazma membran proteini olup "multidrug resistance gene" MDR1 ile kodlanmaktadır (36,37). Bu protein bakteriyel ve ökaryotik birçok taşıma proteini ile benzerlik gösterir (37,38). P-gp metabolik olarak aktif çalışan ATP bağımlı pompa görevi yapar ve ilaç dahil olmak üzere iyonlardan peptidlere kadar birçok maddeyi hücre membranı dışına doğru taşır (39,40).

Kemoterapinin başlamasıyla P-gp ifadesi olan hücrelerin sayıca artması ilaca duyarlı hücrelerin öldüğünü ve ilaca dirençli hücrelerin ise çoğaldığını göstermektedir (34). Kemoterapötik ilaçlar bölünen hücreler üzerine etkili olduklarından, PCNA ve Ki-67 pozitif hücrelerin oranı adjuvan kemoterapiye karar verilmesine yardımcı olma potansiyeli taşımaktadır (24). Bu nedenle proliferasyon aktivitesi ile kemoterapi direncini gösteren P-gp ifadesinin arasındaki ilişkinin belirlenmesi önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada kolorektal karsinogenezi çok yönlü araştırmak amacıyla, normal kolon mukozası, kolorektal adenom ve adenokarsinomlarda PCNA ve Ki-67 ile saptanan doku proliferasyon aktivitesi, p53 ve P-gp ifadeleri arasındaki ilişki; kolorektal adenokarsinomlarda tümör proliferasyon aktivitesi ile prognozu belirlemede rolü olduğu bilinen klinik ve histopatolojik parametreler arasındaki ilişki; adenokarsinomlarda P-gp boyanması ile hastaların kemoterapiye yanıtı arasındaki ilişki araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.KOLOREKTAL TÜMÖRLER

Kolon ve rektumun benign ve malign tümörlerinin büyük kısmını epitelyal tümörler oluşturur (11, 41-44). Kolon tümörlerinin Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre sınıflanması Tablo 1'de görülmektedir (45).

2.1.1. KOLOREKTAL ADENOMLAR

Kolorektal adenomlar, kolon epitelinin değişik derecelerde atipi taşıyan, sapsız ya da saplı benign tümörleridir (11, 43, 44, 46, 47). Kolorektal adenomlar dünyanın değişik bölgelerinde farklı sıklıkta olup erkeklerde ve kadınlarda eşit oranda görülür. Adenom görülme sıklığı 40 yaş altında %20-30 iken, 60 yaş üzerinde %40-50'ye kadar yükselmektedir (42, 48, 49). Kolonun tüm bölgelerinde yerleşebilen adenomların yaklaşık 1/3'ü rektum ve sigmoid kolonda bulunur (44, 47). Adenomlar histolojik yapılarına göre tübüler, villöz ve tübülovillöz olmak üzere 3 alt gruba ayrılır. Her üç grupta da değişik derecelerde displazi görülebilir (47).

a)Kolorektal tübüler adenom (Adenomatöz polip): Tübüler adenomların kolondaki yerleşimleri sağ kolonda %40, sol kolonda %40 ve rektumda %20 oranındadır (50, 51). Yetişkin otopsilerinin yaklaşık %30-40'ında rastlanabilmekte olup bu oran yaşla birlikte artmaktadır (46, 52).

Küçük çaplı tübüler adenomlar genellikle asemptomatik olup; anemi veya gizli kan kaybı sebepleri araştırılırken ve ya rektal kanama sonrası tesadüfen saptanırlar. Büyük çaplı olan tübüler adenomlar ise barsak alışkanlıklarında değişikliğe veya intussepsiyona da sebep olabilirler (50).

Tablo 1: Kalın barsak tümörlerinin histolojik sınıflaması (WHO).

KALIN BARSAK TÜMÖRLERİNİN HİSTOLOJİK SINIFLAMASI	
I EPİTELYAL TÜMÖRLER	
A) Benign	
1 Adenom	
a. Tübüler (Adenomatöz polip)	
b. Villöz	
c. Tübülo-villöz	
2 Adenomatosis (adenomatöz poliposis koli)	
B) Malign	
1 Adenokarsinom	
2 Müsinöz adenokarsinom	
3 Taşlı yüzük hücreli karsinom	
4 Yassı epitel hücreli karsinom	
5 Adenoskuamöz karsinom	
6 Diferansiye olmamış karsinom	
7 Sınıflandırılmamış karsinom	
II KARSİNOİD TÜMÖRLER	
A. Argentaffin	
B. Argentaffin olmayan	
C. Birleşik	
III EPİTELYAL OLMAYAN TÜMÖRLER	
A. Benign	
1 Leiomyom	
2 Leiomyoblastom	
3 Neurilemmom (shwannom)	
4 Vasküler tümörler (hemanjiom, lenfanjiom)	
5 Diğerleri	
B Malign	
1 Leiomyosarkom	
2 Diğerleri	
IV: HEMATOPOİETİK ve LENFOLD NEOPLAZMALAR	
V SINIFLANDIRILMAMIŞ TÜMÖRLER	
VI. SEKONDER TÜMÖRLER	
VII. TÜMÖR BENZERİ LEZYONLAR	
VIII ÜLSERATİF KOLİTE EPİTELYAL ATİPİ	

Tübüler adenomlar makroskopik olarak nadiren 2.5 cm'den büyük çapta olup, çoğunlukla 1 cm'den daha küçük çaplıdırlar. Sapsız yada saplı, tek yada çok sayıda olabilirler. Tübüler adenomlar yuvarlak şekilli, düzgün yüzeyli, çevre mukoza ile karşılaştırıldığında daha koyu, kırmızımsı renktedirler (46, 51). Mikroskopik olarak normal mukoza ile karşılaştırıldığında bezlerde artış görülür. Bezler birbirinden normal görünümde olan lamina propria ile ayrılır. Adenomun sapı fibromusküler doku ve belirgin kan damarlarından oluşur. Bezleri döşeyen hücrelerde çoğalma, hiperkromatik çekirdek ve mitoz sayısında artış (arada atipik mitozlar olabilir), değişik derecelerde musin sekresyonu görülebilmekle birlikte bazen hiç olmayabilir (52).

Tübüler adenomlarda ilk değişiklikler bezlerin üst kısımlarında saptanır. Bazal membran kalınlaşmıştır ve sıklıkla hafif derecede olmak üzere değişik derecelerde displazi izlenebilir (52).

Kolonun düz (flat) adenomları makroskopik olarak 1 cm'den küçük çaptadırlar. Düz adenomların iki tipi tarif edilmiştir. Bunlardan bir tanesi tümüyle düz iken, diğesinde merkezde basıklık (depressed adenoma) tanımlanmıştır (53-56). Mikroskopik olarak lezyon komşu normal epitelin vertikal boyutunun iki katından daha uzun değildir. Karakteristik olarak tübüler adenomdurlar ve sıklıkla şiddetli derecede displazi izlenir (53, 54). Bazı yazarlar düz adenomların tipik polipoid adenomlara dönüştüğünü ileri sürerken, bazı yazarlar da düz adenomların düz karsinomların kenarlarında izlenmeleri nedeniyle doğrudan invaziv özellik kazanabildiklerini düşünmektedir (57, 58).

Kolonun genetik geçiş gösteren polipozis sendromlarında çoğunlukla tübüler adenomlar görüldüğü için bu sendromları kısaca gözden geçirmekte fayda vardır.

i. Familial polipozis (polipozis coli): Otozomal dominant geçiş gösterir, kolonda minimum 100 adenomatöz polip izlenir. Familial polipoziste kolonu kaplayan polipler ışık ve elektron mikroskopik özellikleriyle sporadik tübüler adenomlardan farklı değildir (59). Hastalıkla ilgili sorumlu gen kromozom 5q21'de lokalize "Adenomatous Polyposis Coli" (APC) genidir (60).

Makroskobik olarak, barsak mukozası hafif yükseltilerden, büyük kitlelere kadar değişen poliplerle dolu olup yer yer düz adenomlar da bulunabilir. Poliplerin sayısı birkaç yüz ile birkaç bin arasında değişir (59).

Tedavi edilmezse familial polipozis olgularının tümünde kalın barsakta bir veya birden fazla yerde karsinom/lar/ gelişir. Familial polipozisli hastalarda kolon karsinomu sporadik kolon karsinomu olgularından ortalama 20 yıl önce ortaya çıkar. Bu yüzden familial polipozisli olgularda 20-25 yaşları arasında profilaktik kolektomi uygulanması gerekir (59).

Familial polipozis sendromunun bir varyantı da kalıtsal düz adenom sendromudur. Bu sendromda polipler düz tipte olup, sayıları 100'den azdır, sağ kolonda yerleşimi daha sıktır. Kromozomal anormallik familial polipozis sendromu ile aynı lokustadır (61).

ii.Gardner sendromu:

Familial adenomatöz polipozisin bir varyantı olup; intestinal polipler, kafatası kemikleri ve mandibulada multiple osteomlar, deride multiple epidermal kistler, yumuşak doku tümörleri ve fibromatozisin birlikte olduğu otozomal dominant geçişli bir sendromdur. Fibromatozis sıklıkla daha önceki cerrahi girişim yerlerinde izlenir. Karsinom gelişme riski familial adenomatöz polipozisteki kadar yüksektir ve profilaktik kolektomi uygulanması gerekir. Gardner sendromlu hastalarda periampuller bölge karsinomlarında da artış saptanmıştır (59).

iii.Turcot's sendromu:

Kolorektal tübüler adenomların ve beyin tümörlerinin (özellikle glioblastom) birlikte olduğu otozomal resesif geçişli bir sendromdur (59)

b) Kolorektal villöz adenom (Villöz papillom): Villöz adenomlar rektum ve rektosigmoid bölgede daha sık görülür ve tüm kolorektal adenomların yaklaşık %10'unu oluşturur. Hastalar genellikle yaşlıdır. Villöz adenomlar 10 cm'e kadar ulaşabilir ve makroskobik olarak papiller villöz projeksiyonlar ve geniş bir taban izlenir. Mikroskobik olarak; papillaların epitelle döşeli parmak şeklinde çıkıntılar ve muskularis mukozaya kadar inen lamina propriadan oluştuğu

izlenir. Villöz adenomlarda da musin sekresyonu değişik derecelerde ve şiddetli derecede displaziye daha sık rastlanır (47).

c)Kolorektal tübülovillöz adenom: Kolon ve rektumdaki villöz ve adenomatöz komponenti yaklaşık olarak eşit olan poliplere villoglandüler polipler, tübülovillöz adenomlar ya da papiller adenomlar adları verilmektedir (62).

2.1.2.KOLOREKTAL ADENOKARSİNOMLAR

Kolorektal karsinom insidansı dünyada değişik coğrafi bölgelerde farklılıklar göstermektedir. Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'da sıklık bakımından akciğer ve meme kanserinden sonra üçüncü sırada gelmektedir. Bu farklılığın yaşam stili ve beslenme alışkanlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Düşük risk bölgelerinden yüksek risk bölgelerine göçenlerde kolorektal karsinom gelişme riski de artmaktadır (3).

Kolorektal karsinomlar en sık 6-7. dekatta görülürler. Olguların %20'si 50 yaşın altındadır. Genç bir hastada kolorektal karsinom ile karşılaşıldığında ülseratif kolit ya da familyal polipozis sendromu ile birlikte olabileceği akla gelmelidir (4-6). Rektum kanserlerinde erkek, kadın oranı 2/1 iken; kalın barsağın diğer bölgelerinde bu oran eşittir (63).

Kolorektal karsinomun etyolojisi ve patogenezi hem çevresel hem de genetik faktörlere bağlıdır. Çevresel faktörler büyük oranda diyetle ilgilidir. Özellikle yüksek oranda hayvansal yağ tüketenlerde karaciğerde kolesterol ve safra asitlerinin üretimi artmaktadır. Safra asitleri ve kolesterol intestinal mikroflorayı değiştirerek potansiyel karsinojenlere dönüşebilirler. Lifli gıdalar ise barsak geçiş zamanını kısaltarak koruyucu etki yaparlar (3, 64-66). Genetik faktörler içinde en açık olan, familyal polipozisli ve Gardner sendromlu hastalarda kolorektal kanser gelişiminin yaklaşık %100 olmasıdır (47). İnflamatuvar barsak hastalığı (özellikle ülseratif kolit) olan hastalarda da kolon kanseri riski artmaktadır. Ancak inflamatuvar barsak hastalıkları tüm kolorektal adenokarsinomların küçük bir bölümünden sorumludurlar (47, 67).

a) Kolorektal adenokarsinomların makroskopik özellikleri:

Kolon karsinomlarının yaklaşık %50'si rektosigmoid bölgede yerleşim gösterirler. Kolorektal karsinomlar polipoid yada ülser/infiltratif tiptedirler. Polipoid kanserler ülseratif olanlara göre daha iyi prognoza sahiptirler. Bu muhtemelen polipoid kanserlerin ülseratif kanserlerden daha erken klinikopatolojik evrede yakalanmalarına bağlıdır (68). Polipoid kanserler yuvarlak kenarlı olup çevre normal mukozadan belirgin bir sınırla ayrılırlar. Ülser/infiltratif kanserlerde ise tümör daha basıktır ve merkezi ülseredir (69). Sol kolonda gelişen tümörlerde ülser/infiltratif, sağ kolonda gelişen tümörlerde ise polipoid büyüme paterni daha sık izlenir (53).

Kolon tümörlerinin kesit yüzünde tümör dokusu grimsi-beyaz renkli, desmoplazi varsa sert kıvamlıdır, musinöz tümörlerde ise kesit yüzünde jelatinöz görünüm dikkat çeker (70).

b) Kolorektal adenokarsinomların mikroskopik özellikleri:

Kolorektal karsinomların %98'i adenokarsinomdur. Tümör hücreleri kolumnar hücrelerden, goblet hücrelerinden ve az sayıda endokrin hücrelerden oluşur. Özellikle tümör sınırlarında belirgin olmak üzere desmoplazi ve inflamasyon görülebilir. Nadiren tümör stromasında metaplastik kemik dokusu olabilir. (68, 71). Tümör kenarlarında önceki adenoma ait kalıntılar saptanabilir. Daha sık olarak bezlerde hiperplazik değişiklikler vardır ve goblet hücrelerinde artış ile karakterize "tranzisyonel mukoza" görülür (68). Kolorektal adenokarsinomların çoğunda histokimyasal olarak gösterilebilen musin bulunur (72).

c) Kolorektal adenokarsinomlarda grade ve evre:

Kolorektal adenokarsinomlarda grade ve prognoz arasında ilişki olmakla birlikte özellikle biyopsilerde subjektif değerlendirmeler nedeniyle sorunlar yaşanmaktadır. Adenokarsinomların diferansiyasyonu tümör hücrelerinin tübüler (asiner) yapılanma derecesine göre belirlenmektedir. Parantez içinde adenokarsinomların diferansiyasyon derecelerine göre görülme oranları verilmiştir.

Grade I. İyi derecede diferansiye adenokarsinom (%15-20)

Grade II. Orta derecede diferansiye adenokarsinom (%60-70)

Grade III. Kötü derecede diferansiye adenokarsinom (%15-20)

Grade I adenokarsinomlar basit ve daha az olmak üzere kompleks tübüllerden oluşurlar. Tübülleri döşeyen epitelde polarite korunmuştur ve çekirdekler uniform boyuttadır, adenomatöz polip epiteline benzerler.

Grade II adenokarsinomlar basit, kompleks ve düzensiz tübüllerden oluşur, polarite kaybolmuştur ve solid alanlar taşıyabilir

Grade III adenokarsinomlarda ise ileri derecede düzensiz bez yapıları veya diferansiyasyonda tümüyle kayıp izlenir. Tümör en az %50 alanda solid adalardan oluşur.

i) Kolorektal adenokarsinomlarda Duke evreleme sistemi:

Duke tarafından 1929 yılında önerilen evreleme sistemi geniş kullanım alanı bulmuş ve prognozla yakın ilişkisi nedeniyle bugüne kadar kullanılmaya devam etmiştir (73). Parantez içinde 5 yıllık yaşam beklentisi verilmiştir.

Evre A: Tümör sadece barsak duvarındadır (%83).

Evre B: Tümör barsak duvarını aşmıştır ancak bölgesel lenf düğümlerinde metastaz yoktur (%64).

Evre C: Bölgesel lenf düğümlerine metastaz vardır (%33).

1949 yılında evre C için yine Duke tarafından bir modifikasyon önerilmiş ve bölgesel lenf düğümü metastazı için C1, mezenter apeksi veya damar bağlanma bölgesindeki lenf düğümü metastazları için C2 alt grupları kullanıma girmiştir. Yine 1949 yılında 4. bir evre dahil edilmiş ve uzak metastazlar için D grubu eklenmiştir (73).

ii) Astler-Coller sınıflaması (1954)

Parantez içinde 5 yıllık yaşam beklentisi verilmiştir.

Evre A: Tümör mukozada sınırlı (%100).

Evre B1: Tümör muskularis propriayı tutmuş ancak aşmamıştır (%67).

Evre B2: Tümör muskularis propriayı geçmiştir (%54).

Evre C1: Lenf düğümlerine metastaz vardır, ancak tümör barsak duvarında sınırlıdır (%43).

Evre C2: Lenf düğümlerine metastaz vardır ve tümör barsak duvarını aşmıştır (%22).

iii)TNM sistemi:

American Joint Committee on Cancer (ASCC) ve Union Internationale Contre le Cancer'de (UICC) TNM sistemi ile evreleme yapmışlardır. Parantez içinde 5 yıllık yaşam beklentisi verilmiştir.

0. Tis, N0, M0 (%100).

I T1, N0, M0 (%100); T2N0M0 (%85).

II. T3, N0, M0 (%70); T4N0M0 (%30).

III. Herhangi bir T, N1, M0 (%60); Herhangi bir T, N2, N3, M0 (%30)

IV. Herhangi bir T, herhangi bir N, M1 (%3).

Tis= İn situ

T1= Submukozaya invaze

T2= Muskularis propriaya invaze

T3= Subseroza ve perirektal dokulara invaze

T4= Serozaya veya diğer organ yada dokulara invaze

N0= Lenf düğümü metastazı yok

N1= 1-3 bölgesel lenf düğümü metastazı

N2= 4 yada daha fazla bölgesel lenf düğümü metastazı

N3= Büyük kan damarları boyunca herhangi bir lenf düğümü metastazı

M0= Uzak metastaz yok

M1= Uzak metastaz var

En son olarak Jass tarafından önerilen evreleme sisteminde peritümöral lenfositik infiltrasyon ve tümörün büyüme paterni de prognostik belirteç olarak değerlendirilmeye alınmıştır.

iv)Fischer'e göre önerilen Duke evreleme sistemi modifikasyonu: 1989 yılında 745 rektal adenokarsinom olgusunda yapılan bir çalışmada; Duke, Astler-Coller ve TNM evreleme sistemlerinin prognoz açısından değerliliği karşılaştırılmış ve Duke evreleme sisteminin en kolay uygulanabilir ve prognozla en yakın ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bu evreleme sisteminde C grubunun Astler-Coller sınıflamasına göre modifiye edilmesinin daha yararlı sonuçlar sağlayacağı öne sürülmüştür (73).

A.Tümör barsak duvarına sınırlı

B.Tümör barsak duvarını aşmış, lenf düğümü metastazı yok

C1. Tümör perirektal yağ dokusuna ulaşmamış, lenf düğümü metastazı var

C2. Tümör perirektal yağ dokusuna ulaşmış, lenf düğümü metastazı var.

d) Yayılım ve Metastaz:

Kolorektal karsinomlarda en çok bölgesel lenf düğümlerinde ve karaciğerde metastaz görülür. Kötü diferansiye alanlar taşıyan ve infiltratif özelliği olan tümörlerde lenf düğümü metastazı daha sıktır (74). Diğer sık görülen metastaz yerleri periton, akciğerler ve overlerdir. Nadir rastlanan metastaz yerleri ise santral sinir sistemi, iskelet sistemi, testis, uterus ve oral kavitedir (75-77)

e) Prognoz:

Kolorektal karsinomlarda cerrahi tedaviden sonra 5 yıllık sağ kalım oranının birçok seride %40-60 oranında olduğu bildirilmektedir. Kolorektal karsinomlarda prognozu etkileyen klinik ve patolojik parametreler çok çeşitlidir (78-80). Bunlar;

1.Yaş: Çok genç ve çok yaşlı olan hastalarda prognoz kötüdür (78-80).

Gençlerde izlenen kötü prognoz, tanıdaki gecikmelere bağlı ileri evrelerde tanı konulması, taşlı yüzük hücreli ve musinöz adenokarsinomların ve

ülseratif kolit zemininde gelişen adenokarsinomların daha sık görülmesi ile ilgilidir

2. *Cinsiyet*: Kadınlarda prognoz erkeklere oranla belirgin olarak daha iyi bulunmuştur. Ancak nedeni konusunda herhangi bir açıklama yapılamamıştır (79).

3. *Yerleşim bölgesi*: Tümörün yerleşimi ile prognoz arasındaki ilişki konusunda değişik sonuçlar mevcuttur. Tümörleri kolona ait ve rektal olarak iki grupta ele alan bir çalışmada yaşam süresi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (79).

Kolon tümörlerini sağ kolon, sol kolon ve rektum olarak sınıflayıp ele alan bir diğer çalışmada tümör yerleşimi ile sağ kalım arasında bir ilişki izlenmemiştir (11, 78). Büyük bir seriyi ele alan bir çalışmada Russell ve arkadaşları sol kolonda yerleşen tümörlerin daha iyi prognoza sahip olduğunu ve sigmoid kolon ve rektum yerleşimli tümörlerin ise en kötü prognoza sahip olduklarını bildirmişlerdir (81).

4. *Tümör sayısı*: Tek bir tümörü olan hastalar ile senkron yada metakron kanseri olan hastalar arasında sağkalım süresi açısından fark bulunmamıştır.

5. *Tümöre bağlı primer semptomlar*: Bir çok çalışmada obstruksiyonun Duke evreleme sisteminden bağımsız bir prognostik faktör olarak sağkalım üzerine etkisi olduğu gösterilmiştir. Barsak duvarının tümör dokusu tarafından ileri derecede invaze edilmesi sonucu oluşan perforasyon da kötü bir prognostik faktördür. Rektum tümörlerinde rektal kanama şikayeti ile erken dönemde hekime başvurulduğunda bu olgularda yaşam süresi daha uzundur (11, 79).

6. *Mikroskopik tip ve grade*: Tümör grade'i ile prognoz arasında anlamlı ilişki mevcuttur. Ancak grade'lemedeki subjektiflik nedeniyle farklı değerlendirmeler sorun yaratabilmektedir (Beş yıllık sağ kalıma bakıldığında iyi diferansiye tümörler ile kötü diferansiye tümörler arasında anlamlı fark bulunmadığını bildiren çalışmalar mevcuttur) (78). Mikroskopik alt tipler arasında musinöz karsinom ve taşlı yüzük hücreli karsinom klasik adenokarsinomlara göre daha kötü prognoza sahiptir.

7. *Vasküler ve perinöral invazyon:* Kolorektal karsinomlarda vasküler invazyonu olan hastalarda metastaza %60 oranında rastlanırken vasküler invazyonu olmayan hastalarda bu oran %17'dir. Vasküler invazyonun sağkalım süresini anlamlı olarak azalttığı görülmüştür. Kolorektal karsinomlarda perinöral invazyon da hastalığın ilerlemiş olduğunun belirticidir ve perinöral invazyonu olmayan hastalara göre prognoz daha kötüdür (82).
8. *Lenf düğümü tutulumu:* Lenf düğümü tutulumu 5 yıllık sağkalım süresini kesin olarak azaltmaktadır. Lenf düğümü tutulumunun lokalizasyonu ve sayısı da önemlidir. Ancak tutulan lenf düğümlerinin sayısı lokalizasyona göre daha fazla prognostik öneme sahiptir (73).
9. *Duke's evreleme sistemi:* Tümörün lokal yayılımı ve lenf düğümü tutulumu parametrelerinin kombinasyonu olan bu sistem prognozla yakından ilişkilidir (73). Beş yıllık sağ kalım süreleri Evre A'da %85, Evre B'de %64, Evre C'de %33'tür.
10. *Büyüme paterni:* Kolon tümörleri büyüme paternine göre genişleyen veya infiltre eden şeklinde tanımlanmaktadır. Genişleyen tümörde büyüme kenarı iyi sınırlanmış olmasına rağmen, infiltratif tipte sınır belli değildir veya tümör kümeleri vardır. Genişleyen tümörlerin infiltratif yayılımı olan tümörlere göre daha iyi prognoza sahip olduğu bildirilmektedir (78).
11. *Lenfositik infiltrasyon:* Lenfositik infiltrasyon tümörün etrafında belirlenir. Tümör çevresinde çoğunluğu lenfositlerden oluşan yagısal infiltrasyonun sağ kalım süresini olumlu yönde etkilediği bulunmuştur.

2.2.ADENOM-KARSİNOM İLİŞKİSİ

Kolorektal adenokarsinomlara predispozan olduğu bilinen klinik ve patolojik durumlar izole polipler, familyal polipozis gibi genetik sendromlar ve ülseratif kolit başta olmak üzere inflamatuvar barsak hastalıklarıdır. Bunların dışında özellikle Japonya'da yaygın olmak üzere normal mukozadan gelişen de novo karsinomlar da önemli bir gruba oluşturmaktadır (10).

Adenom karsinom ilişkisini destekleyen ilk bulgular epidemiyolojik ve morfolojik çalışmalardan elde edilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalar adenomların yüksek oranda bulunduğu ülkelerde karsinomların da fazla olduğunu göstermektedir

(Bunun tersi de doğrudur) (83-86). Aynı zamanda karsinom nedeniyle rezeke edilen barsaklarda başka nedenlerle rezeke edilen barsaklara göre adenomlara daha sık rastlanmaktadır (87).

Rijid sigmoidoskopi yapılan ve polipektomi uygulanan 1618 hastada uzun dönemde kolorektal karsinom gelişme riskinin 1 cm'den büyük çaplı ve/veya tübülovillöz ve villöz tipte adenom bulunduranlarda en yüksek olduğu görülmüş ve bu hastalar yüksek risk grubu olarak tanımlanmışlardır (88). Bu bulgular adenomların prekanseröz olduğunu desteklemekle birlikte; 60 yaş üzerinde %40-50'ye kadar yükselen adenom insidansına karşılık kolorektal adenokarsinomların bu kadar yüksek oranda olmaması tüm adenomların malignleşmediğini göstermektedir (89).

Günümüzde kolon adenokarsinomlarının büyük bölümünün daha önceden varolan adenom üzerinden geliştiği kabul edilmektedir (11). Adenomlar içinde invaziv karsinom odaklarının görülmesi premalign özelliklerinin en iyi kanıtıdır. Aynı zamanda invaziv karsinomlar etrafında da daha önceden varolan adenoma ait artıkların izlenmesi sıklıkla Tumor komşuluğunda izlenen adenom kalıntılarının submukozada sınırlı olan adenokarsinomlarda daha çok, muskularis propriayı infiltre eden ve ektramural yayılımı olan tümörlerde daha az görülmesi tümörün yayılımı ile adenom dokusunun ortadan kalktığını düşündürmektedir (47, 90).

2.2.1. Adenomlarda malignleşme potansiyelini etkileyen faktörler

a) Boyut: Adenomun boyutu, adenomda şiddetli displazinin bulunmasını ya da karsinom gelişme riskini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Adenomun boyutu büyüdükçe şiddetli displazi gösteren alanlar ve içerdiği villöz komponent oranı da artmaktadır (52). Bunun yanı sıra karsinom görülme oranı 1 cm altındaki adenomlarda %1 iken, 1-2 cm arasındaki adenomlarda %10, 2 cm üzerindeki adenomlarda ise % 46'ya ulaşmaktadır (47).

b) Histolojik tip: Tübüler adenomlar villöz adenomlardan daha sık görülmektedir. (52). Malignite görülme oranı tübüler adenomlarda %5 iken, villöz adenomlarda %40'tır. Tübülovillöz adenomlarda bu oranın %22 olması, davranışlarının villöz adenomlara daha yakın olduğunu düşündürmektedir (47).

c)Epitelyal atipi:Adenomlarda hafif, orta ve şiddetli olarak derecelendirilen atipinin şiddeti arttıkça adenom içinde invaziv adenokarsinom odağı bulunma olasılığı da artmaktadır. Hafif derecede atipi adenomların %70'inde izlenirken, hafif derecede atipi gösteren adenomlarda invaziv adenokarsinom odağı bulunma oranı yalnızca %5'tir. İnvaziv adenokarsinom odağı orta derecede atipi gösteren adenomların %18'inde, şiddetli derecede atipi gösteren adenomların ise %34.5'inde görülebilmektedir. Adenokarsinomların daha sık olarak görüldüğü distal kolondaki adenomlarda şiddetli derecede displazi anlamlı olarak fazla izlenmektedir. Adenomlarda atipi şiddeti boyut ve histolojik tiple de orantılıdır (47).

Adenomların malign transformasyonu özellikle kimyasal olarak oluşturulan kolorektal tümörlerde ayrıntılı olarak incelenmiştir. Adenomlarda hafif, orta ve şiddetli displaziden invaziv ve metastatik karsinoma kadar olan değişikliklerin bir seri moleküler değişikliğe bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Bunlar onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunu içermektedir. En az 4 yada 5 gende mutasyon sonucu tümüyle malign bir fenotip oluştuğu düşünülmektedir (91-98).

Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmeler; kanserlerin genetik değişimlerin birikimi ve buna bağlı olarak anormal hücre proliferasyonu sonucu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Genetik değişiklikler esas olarak proto-onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır (99-102). Proto-onkogenler normal hücre genleri olup, onkogen gibi uygun olmayan şekilde aktive olduklarında büyüme ve diferansiyasyon düzenlenmesinde bozukluklara yol açarak neoplastik transformasyon riskinin artmasına sebep olurlar. Tümör baskılayıcı genler de normal hücresel genler olup proto-onkogenlerin tersine inaktive oldukları zaman hücre proliferasyonu ve neoplazi gelişimine sebep olurlar (15).

2.3.1.Onkogenler:

a) ras Mutasyonları:

Normal hücre büyümesi ve diferansiyasyonunda ras ailesi protoonkogenleri rol alırlar ve p21 olarak adlandırılan bir proteini kodlarlar. Bu protein hücre membranı üzerindeki büyüme faktörü reseptörlerinden hücre içine sinyal iletiminde rol oynar, ras genindeki nokta mutasyonlar ras proteinin sürekli aktif ve sinyal iletir durumda kalmasına bu da otonom hücre büyümesi ve proliferasyonuna yol açar (97).

İnsan kanserlerinde ras mutasyonları sıklıkla K-ras, N-ras ve H-ras onkogenlerinin 12., 13. ve 61. kodonlarında gelişir. Kolorektal karsinom gelişiminde erken dönemde ras gen ailesine ait onkogenlerin rol oynadığı gösterilmiştir (96, 97). Kolorektal karsinomların ve orta yada şiddetli derecede atipili tübüler adenomların %50'sinde ras gen mutasyonları izlenmektedir. Mutasyonların büyük çoğunluğu K-ras (%88) geninde iken daha az olmak üzere N-ras mutasyonlarına da rastlanmaktadır (96). Displazi veya karsinom bulunduran mukozaların neoplastik olmayan başka alanlarında da ras mutasyonlarının olduğu rapor edilmiştir. (97, 103, 104)

Bir başka çalışmada premalign ve malign dokularda normal kolorektal mukozaya göre K-ras ve H-ras ile ilgili transkriptlerin artmış olduğu gösterilmiştir. Bu onkogenlerin premalign lezyonlarda arttığının gösterilmesi karsinogenez işlevinde onkogenlerin önemli olduğunu düşündürmektedir. Buna karşın premalign adenomların yalnızca bir kısmının malignleşmesi karsinogenezin çok basamaklı bir işlem olduğu görüşünü desteklemektedir (97).

b) bcl-2:

Bir protoonkogen olan bcl-2 geni programlanmış hücre ölümünü (apoptozis) düzenler. Bu gendeki bozukluk sonucu hücre ölümü engellenir (93). Düşük grade'li foliküler B-hücreli lenfomada kromozom 14:18 translokasyonu bcl-2'nin aşırı ifadesine neden olur (105, 106) Epitelyal malignitelerde kromozom 14:18 translokasyonu olmadan da bcl-2 aşırı ifadesinin olma sebebi anlaşılamamıştır. Gastrointestinal kanalda bcl-2 fizyolojik ifadesi kök hücrelerde ve proliferatif

bölge olan kript tabanlarındaki epitel hücrelerinde bulunur, bcl-2'nin buradaki görevi rejeneratif epitelde hücre ölümünü engellemektir (107). Gastrointestinal kanalda hücre kaybından diferansiye ve olgun hücrelerin dökülmesi ile fizyolojik olarak apoptozisin normal intestinal döngüde yer alması sorumludur. Adenomda daha belirgin olmak üzere hem kolorektal adenomda hem de kolorektal karsinomda bcl-2 aşırı ifadesinin bulunduğu gösterilmiştir, bcl-2'nin fazla miktarda olması; uzun yaşayan hücrelerin çok olduğunu ve bunun da tümör gelişimine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (92, 93).

2.3.2. Tümör Baskılayıcı Genler:

a) APC (Adenomatous polyposis coli) Değişiklikleri:

Kolorektal neoplazilerde tanımlanan genetik değişikliklerden bir tanesi 5.kromozomun uzun kolundaki allelik delesyondur. Familial adenomatöz polipozis sendromundan sorumlu tutulan lokusun (fap lokusu) kromozom 5'in uzun kolunda olduğu bulunmuştur, fap lokusu kolonun epitelyal proliferasyonunda negatif düzenleyici olarak rol oynar. Kromozom 5'in bir allelinde konjenital kayıp olması 2 veya 3 dekatta multipl kolon polipleri oluşumuna neden olur (Familial adenomatöz polipozis ve Gardner sendromu). Bir allel mutasyon sonucu inaktif olduğunda hücre proliferasyon kontrolü bozulur. Bu da allelik delesyonu olan hücrelerde selektif büyüme avantajı sağlar (96). Familial adenomatöz polipozis sendromu dışında sporadik kolorektal adenomlarda %63, sporadik kolorektal adenokarsinomlarda ise %60 oranında APC mutasyonu görülmüştür (108). Bu genin mutasyona uğramış şeklinin küçük çaplı adenomlarda bile saptanabilmesi ve bu mutasyonların tümörün benign formdan malign forma dönüşmesi durumunda da sabit kalması, APC gen mutasyonunun kolorektal neoplaziye yol açan genetik değişikliklerin birincisi olabileceğini düşündürmektedir (94). Neoplazi öncesi normal APC geninin her iki kopyasının fonksiyonel kaybı APC'nin tümör baskılayıcı işlevi ile uyumludur (108).

c) DCC (Deleted in Colon Carcinoma) Değişiklikleri:

Kolorektal karsinomlarda kromozom 18'in uzun kolunun allelik kaybının sık olduğunun görülmesi üzerine tümör baskılayıcı geninin bu bölgede olduğu düşünülmüş ve 18q21 bölgesinde DCC olarak adlandırılan tümör baskılayıcı

gen tanımlanmıştır. Bu tümör baskılayıcı gen 180 kD'luk gen ürünü kodlamaktadır. DCC gen ürünü yüzey glikoproteini olup tümör büyümesinde ve metastazda önemli olabilecek hücre-hücre, hücre-matriks etkileşiminde rol almaktadır. DCC gen ifadesi kolorektal karsinomlarda ve kolon karsinomu hücre dizilerinde azalmış olarak bulunmaktadır ve tümör baskılayıcı gen olarak işlev gördüğünü göstermektedir. DCC fonksiyonunun azalması kolorektal karsinogenezde p53 mutasyon ve delesyonundan önce olmaktadır (94).

d) p53 değişiklikleri:

Tümör baskılayıcı gen olan p53 son zamanlarda "moleküler düzenleyici" olarak da tanımlanmıştır. Bu genin transkripsiyon faktörü olarak biyokimyasal fonksiyonu ve DNA hasarı için G1 kontrol noktasında biyolojik fonksiyonu vardır (23, 109).

İnsan kanserlerinde, bugüne kadar mutasyona uğradığı en çok gösterilmiş olan gen p53'dür; gen inaktivasyonu, delesyon ve mutasyonlarının onkogeneze rol oynadığı bilinmektedir (15, 110-112).

Hücrelerin ölümsüzlüğüne yol açtığı için ve kobay embriyo fibroblastlarını aktif ras genleriyle birlikte transforme ettiğinden p53 geni daha önceleri dominant onkogen olarak kabul edilmekte idi (113-115). Mutasyona uğrayan p53 geninin varyantlarının asıl p53 geninden farklı özelliklere sahip oldukları anlaşılmıştır. Hücre kültüründe normal fonksiyon gören (asıl) p53'ün ras ve adenovirus E1B ile sağlanmış kobay embriyo fibroblastlarının transformasyonunu engellediği ve hücre büyümesini G1 fazında durdurduğu görülmüştür (116-120).

Normal p53 fonksiyonları ve tümör gelişimini etkilemesindeki moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Asıl p53'ün hücre proliferasyonuna etkisi olarak hücre döngüsünde G1'den S fazına geçişi düzenlemesindeki ve hücre ölümünü belirlemedeki rolü bilinmektedir (121, 122). Biyolojik analizler p53 etkisinin normal hücre döngüsü üzerinde az olmasına rağmen stres altındaki hücreler üzerine daha çok olduğunu göstermiştir (104). Eğer DNA hasarlanacak olursa p53 birikmekte ve hücre siklusunu durdurarak tamir mekanizmalarının çalışabilmesi için ek zaman kazandırmaktadır. Buna rağmen onarım yapılamazsa p53 apoptozisi tetiklemektedir (17).

Bu düzenleyici fonksiyonlar muhtemelen p53 proteinin spesifik DNA dizileriyle etkileşimi sonucu olmaktadır (123, 124). Bu belkide transkripsiyon seviyesindeki diğer genlerin düzenlenmesine veya DNA replikasyonunun başlamasına izin vermektedir. Mutasyona uğrayan p53 proteininde, DNA'ya bağlanma kapasitesi, transkripsiyonel aktivatör fonksiyonu ve DNA replikasyonunu başlatma özellikleri tamamen değişmiştir (125, 126).

Asıl p53 proteininin yarı ömrünün 6-20 dakika gibi kısa olması immünohistokimyasal metodlarla belirlenecek miktarda birikimine engel olmaktadır (127, 128). Buna karşın bazı missense mutasyonlar (Bir üçlü baz dizisinde kodu değiştirerek gen ürününde bir aminoasitin değişmesine neden olan nokta mutasyonlar) p53 proteininde değişikliğe yol açarak yarı ömrünü 6 saate kadar çıkarabilmektedir. Bu nedenle immünohistokimyasal metodlarla belirlenebilen p53 proteininin varlığı mevcut p53'ün mutant olduğunun indirekt bulgusu olarak kabul edilmektedir (129, 130).

Nokta mutasyonlar p53 proteinin stabilize olması için tek mekanizma değildir. Normal p53 proteini viral gen ürünlerinin (SV40 büyük T antijeni, adenovirüs E1B proteini ve papillomavirüs E6 proteini) ve hücrel proteinlerin (MDM2) etkisiyle de stabilize olabilmektedir. UV ışını, γ radyasyonu gibi DNA hasarı yaratan tedavilerin de p53 proteininin seviye ve stabilitesini arttırdığı görülmüştür (131, 132). Bundan dolayı immünohistokimyasal yöntemlerle p53 proteinini gösteren pozitif boyanmaları değerlendirirken çok dikkatli olunmalıdır (133).

Son yıllarda p53'ün tümör gelişiminde rol oynadığını gösteren çalışmalar hızla artmaktadır. Malignite gelişiminde p53'ün rol aldığını gösteren en az 5 gözlem bulunmaktadır. Bunlar:

1. Değişik insan tümörlerinde p53'ün direkt olarak incelenmesinde missens mutasyonların veya allelik kayıpların olduğunun gösterilmesi (134),
2. Li-Fraumeni ailesel kanser sendromunda p53 mutasyonu olması (135),
3. Normal p53 fonksiyonunun kaybının farelerde tümör oluşumunu arttırması (136),
4. Virüs aracılı onkogeneizde p53'ün rol alması (137),

5. Bazı insan malignitelerinde spesifik olarak artmış gen ürünleriyle p53 ilişkisinin gösterilmesidir (138).

Tümörlerin çoğunda p53 geninin biri nokta mutasyonla ve diğeri delesyonla olmak üzere her iki alleli de inaktif haldedir. Buna ek olarak insan kanserlerindeki p53 mutasyonlarının çoğu missense mutasyonlardır ve değişmiş protein yapımına sebep olurlar, p53 mutasyonlarının yaklaşık %30'undan missense mutasyonlar sorumludur (15).

Epitelyal, mezenkimal, hematopoietik ve lenfoid neoplazmlarda p53 gen mutasyonları saptanmıştır (20). Hücre kültürlerinde p53'ün allelik kaybı ve mutasyonları arasındaki sıkı ilişki gösterilmiş olmakla birlikte insandaki solid tümörlerde bu ilişkiyi gösteren çalışmalar sınırlıdır. Meme tümörlerinde %90'nın üzerinde bildirilen p53 proteinindeki değişikliklere rağmen p53 gen mutasyonları bu tümörlerin ancak %20'sinde gösterilebilmiştir. Tümör tipleri arasında bildirilen p53 gen mutasyon oranlarının çeşitliliği büyük oranda tümör örnekleme ve kullanılan yöntemlerdeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (15).

Li-Fraumeni nadir görülen otozomal dominant geçişli, ailesel kanser sendromudur (vücudun değişik yerlerinde mezenkimal ve epitelyal neoplazmlar görülür) (139). İlk kez 1990'da Li-Fraumeni sendromlu bazı ailelerde mutant p53 geni belirlenmiştir. Bu ailenin üyeleri bir mutant p53 alleli bir de asıl p53 alleli bulundurmaktadır. Li-Fraumeni sendromlu hastalarda kanser gelişebilmesi için bir p53 alleli inaktive olduğundan yalnızca geriye kalan allelin somatik mutasyonla değişimi yeterli olmaktadır. Sendromdan etkilenen aile üyelerinin tümör dokularında mutant p53 alleli bulunmasına rağmen asıl p53 allelinin kaybolduğu görülmüştür. Normal insanlarda ise sporadik tümör gelişimi için aynı hücrede her iki p53 allelinin somatik mutasyonla inaktive olması gerekmektedir (135).

Mutasyona uğramış p53 geni enjekte edilen farelerin %20'sinde tümör gelişmesi p53'ün tümör gelişimindeki rolünü desteklemektedir. Fare germ hücrelerine anormal p53 geninin sokulması ile bunların yaklaşık %75'inde tümör gelişmesi de p53'ün tümör gelişiminde rol oynadığını direkt olarak gösteren bir başka bulgudur. Tümör gelişimi için uzun bir aralığın (6 ay)

gerekmesi p53 genindeki değişikliklerin tümör gelişimi için tek başına yeterli olmadığı, daha başka genetik değişikliklerinde gerekli olduğu fikrini desteklemektedir (140).

Missense mutasyonlarına ek olarak p53'ün inaktivasyonuna neden olan bir diğer alternatif mekanizma da asıl p53'ün DNA virüslerinin transforme edici proteinlerine bağlanarak inaktive olmasıdır. Human papilloma virus (HPV) tip 16 ve 18 ile infeksiyon servikal ve vulvar kanserler için major risk faktörleridir, HPV pozitif olan servikal karsinomlarda p53 mutasyonlarının düşük oranda bulunması p53'ün viral proteinlerle olan ilişkisini ortaya çıkartmıştır. HPV, p53'ü inaktive eden E6 isimli bir proteini kodlamaktadır. Sonuçta, HPV(+) tümörlerin gelişiminde p53 geninde mutasyonların gerekli bir basamak olmadığı, p53 geninde mutasyon olmadan da p53'ün inaktive olabileceği sonucuna varılmıştır (15, 20).

Ayrıca; kromozom 12'nin uzun kolunda haritalanan (farelerdeki MDM2 geninin eşdeğeri olan) genin ürünü olan bir proteinin de tümör virüslerinin onkoproteinleri gibi p53'e bağlanarak onu inaktive ettiği gösterilmiştir (141).

Kolorektal tümörögenizde p53 genindeki hem mutasyonlar hem de allelik kayıpların, özellikle adenomdan fokal adenokarsinoma malign transformasyonda rol oynadığı ileri sürölmektedir (110, 142). Ayrıca kolorektal kanserli hastaların gayta örneklerinde tespit edilen p53 mutasyonlarının kolorektal karsinomlarda tarama testi olarak kullanılabileceği düşünölmektedir (110).

2.3.2. Tümör proliferasyon belirteçleri

Eskiden beri tümör proliferasyon hızının klinik gelişimle ilgili olduğu düşünölmektedir. Tümör hücre proliferasyon aktivitesinin belirlenmesinde flow sitometri, ³H-thymidine ya da bromodeoxyuridine ile bağlanma indeksinin ölçümü, immünhistokimyasal olarak PCNA ya da Ki-67 monoklonal antikorları gibi yöntemler mevcuttur. Bu yöntemlerin her birinin avantaj ve dezavantajları vardır. Bu durum her belirleyicinin farklı siklus fazlarında ve farklı sürelerde ifadesine dayanmaktadır. İdeal olarak proliferasyon durumu belirlenecek materyalin birden fazla yöntemle değerlendirilmesi önerilmektedir (143).

Tümör proliferasyon hızını belirlemede ve histopatolojik ayırıcı tanıda (özellikle leiomyosarkom, malign schwannom, sistosarkoma filloides gibi tümörlerde) mitotik figürlerin sayılması en çok kullanılan ve en basit yöntemdir. Fakat bu yöntemle serviks karsinomu ve folliküler lenfoma gibi tümörlerin prognozu hakkında yeterli bilgi edinmek mümkün olamamaktadır (144-147). Mitotik figürlerin sayımının güvenilirliği yeterli değildir (148). Mitotik sayım hücre döngüsünün G₂ fazındaki hücrelerin bir kısmını ve M fazındaki hücrelerin tümünü saptar. Ancak M fazının uzunluğunu göstermediğinden proliferasyon hızını yansıtmaz. Örneğin bazal hücreli karsinomda mitoz sayısı yüksek olabilir ancak bu yükseklik tümörün yüksek proliferasyon hızına bağlı olmayıp uzamış M fazına bağlıdır (149). Ayrıca kesit kalınlığı, mikroskopun alan büyüklüğü, tespitteki gecikmelerde sonucu etkilemektedir.

Thymidine ile S fazındaki çekirdek DNA'sına bağlanma yapılarak S fazındaki hücrelerin oranı belirlenir. Bu yöntemde taze doku ve otoradyografiye ihtiyaç duyulması ise kullanımını sınırlamaktadır. Flow sitometrik DNA analizi ile yalnız S fazındaki hücreler ya da bununla birlikte G₂/M fazındaki hücreler belirlenir (149). Uygulanması için gereken teknik donanımlar ve doku morfolojisinin korunamaması gibi kısıtlamaları vardır. Thymidin analogu olup benzer sonuçlar veren 5-BrdU antikoru da ancak taze dokuda uygulanabilmektedir. İmmunhistokimyasal yöntemler içinde, PCNA ve Ki-67 gibi arşiv materyallerinde uygulanabilen belirleyiciler ise daha basit, ucuz, doku morfolojisini koruyan ve patologların alışkın olduğu yöntemlerdir (150-153).

2.7.1.Ki-67

Ki-67 Hodgkin hastalıklı hücre dizisi olan L428'in nükleer fraksiyonuna karşı geliştirilmiş IgG₁ sınıfından, sıçan monoklonal antikordur. Üretim yeri olan Kiel'de (Batı Almanya) antikor üreten klonun 67. doku kültür kabında olması nedeni ile Ki-67 adını almıştır (29).

Bazı yazarlar hücre döngüsünün fazına bağlı olmak üzere proliferasyon hızının hücrelerin çekirdeklerindeki Ki-67 miktarının değiştiğini söylemektedir. Sasaki ve arkadaşları hücre döngüsü ilerledikçe Ki-67 antijenik ifadesinin arttığını, S fazının son yarısı boyunca yükselerek G₂ ve M fazlarında ise zirveye eriştiğini

bulmuşlardır (154). Verheijen ve arkadaşları flow-sitometri ile flöresan sinyal kullanarak Ki-67 miktarına bakmışlar ve yoğunluğun en fazla mitotik hücrelerde olduğunu göstermişlerdir (155, 156). Buna karşın başka bir çalışmada değişik hücre dizileri kullanılarak hücre döngüsü boyunca Ki-67 antijeninin aynı kaldığı bildirilmiştir (157).

Ki-67 antijeni ile boyanmanın çekirdekteki lokalizasyonu hücre döngüsü ile ilgilidir. Braun ve arkadaşları insan embriyonik akciğer hücre dizisi kullanarak, Ki-67 antijeninin G1 fazının geç döneminde perinükleolar bölgede olduğunu, S fazında karyoplazmada homojen dağıldığını ve G2 fazında karyoplazmada granüler boyanma olduğunu ve perinükleolar boyanmanın devam ettiğini göstermişler, yoğun perikromozomal Ki-67 boyanmasının profaz ve metafazda devam ettiğini ve boyanmanın anafaz ve telofazda aniden azaldığını bulmuşlardır (158). Guillaud ve arkadaşları da 2 ayrı hücre dizisinde benzer bulguları rapor etmişlerdir (159).

Tümörlerin proliferasyon oranı; büyüme fraksiyonu (Ki-67, PCNA immünohistokimyasal boyama yöntemleri ile belirlenen) ve hücre siklusunu tamamlamak için gereken süre olmak üzere iki parametreden oluşur PCNA ve Ki-67 ile immünohistokimyasal boyama yapıldığında boyanan hücrelerin yüzde oranı büyüme fraksiyonunu ifade eder. Bu nedenle tüm hücrelerin döngüde olduğu fakat döngüyü tamamlamaları için uzun süre gereken tümörlerde izlenen yoğun Ki-67 boyanması tümörün gerçek proliferasyon oranından yüksek olabilir. Bunun tersine küçük bir hücre popülasyonu döngüde olan ancak döngüyü tamamlama hızı yüksek olan tümörlerde de gerçekten daha düşük bir proliferasyon oranı bulunabilir (149).

Ki-67 ile belirlenen tümör büyüme fraksiyonunun prognozla olan ilişkisi birçok tümörde detaylı olarak araştırılmıştır ve bu konuda ki çalışmalar devam etmektedir. Lenfoproliferatif hastalıklar çalışmaların en yoğun olduğu gruptur. Ki-67 ile belirlenen tümör büyüme fraksiyonu ile histolojik grade arasında güçlü bir uyum izlenmiştir. Hall tarafından yapılan bir çalışmada Ki-67 tümör boyanması ile 91 lenfomalı hastanın klinik seyri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada tümörün %20'den fazlasının pozitif olduğu birinci grubun Kiel sınıflamasına göre yüksek grade'li lenfomalar olduğu, tümörün %20'den azının

pozitif olduğu ikinci grubun ise Kiel sınıflamasına göre düşük grade'li lenfomalar olduğu görülmüştür. Ayrıca histolojik olarak düşük grade'de olup; proliferasyon skoru yüksek olan hastaların düşük proliferasyon skorlu hastalara göre daha kötü prognoz gösterdikleri görülmüştür. Hist lojik grade'i ve proliferasyon skoru yüksek olan hastaların aynı grade'de olup proliferasyon skoru daha düşük olan hastalara göre daha iyi prognoz gösterebilmesi ise yüksek grade'li hastalardaki proliferatif olan hücre topluluğunun kemoterapiye daha iyi cevap vermesi ile açıklanmıştır (160).

Nakano ve arkadaşları 45 servikal kanserli hastada radyoterapinin proliferatif olan hücre popülasyonunda Ki-67 indeks ve mitotik indeks ile belirlenen büyüme fraksiyonuna etkisini araştırmışlardır. Radyoterapi  ncesi serviksten alınan örneklerde ortalama Ki-67 indeksi 36% ve mitotik indeks 2.74% olarak bulunmuştur. Ki-67 indeksi %33 ve üzeri olan proliferatif aktivitesi yüksek hastalar radyoterapiye daha iyi yanıt vermişlerdir. Mitotik indeks 3.5%'ten düşük olan hastaların prognozu daha iyi bulunmuştur. Bu sonuçlar büyüme fraksiyonu yüksek olan tümörlerin radyoterapiye cevabının daha iyi olduğunu düşündürmektedir. Buna ek olarak Ki-67 indeksi ile mitotik indeks arasında radyoterapiye yanıt açısından ters prognostik ilişki olması her iki indeksin prognoz açısından bağımsız değerler olduğunu düşündürmektedir (161). Ki-67 ile belirlenen proliferatif aktivite ile prognoz ilişkisi günümüzde meme, prostat, yumuşak doku tümörleri, lösemilerde çalışılmakta olup araştırmalar devam etmektedir (162-165)

2.7.2.PCNA

Son yıllarda histolojik materyalin proliferasyonunu belirlemede "Proliferating Cell Nuclear Antigen" (PCNA) sıklıkla kullanılmaktadır (166, 167). PCNA proteini G1 ve S fazında sentezlenmekte ve hücre siklusu boyunca çekirdekte bulunmaktadır. PCNA mRNA'nın birikimi ve proteinin yüksek düzeylerde sentezi büyüme faktörleri özellikle PDGF ile stimüle edilir ve DNA sentezi ile birlikte olması şart değildir (34).

İmmünfloresan çalışmalar bir formu fiksasyon sırasında organik çözücülerle çözünerek kaybolan ve diğer formu ise organik çözücülerle çözünmeyen iki PCNA populasyonu olduğunu göstermiştir. PCNA'nın çözünmeyen formu hücre döngüsünün S fazında DNA sentezi ile ilişkilidir. PCNA immünoaktivitesi bromodeoxyüridine ile S fazında eş zamanlı olarak ortaya çıkar ve replikasyon komplekslerinde aynı lokalizasyonda yer alması, PCNA'nın DNA replikasyon bölgeleri ile ilişkili olduğunu ve DNA sentezinde rolü olduğunu düşündürmektedir (168).

PCNA başlangıçta yalnız frozen kesitlere uygun iken parafin dokularda PCNA'nın farklı epitoplarını tanıyan PC10, 19 A2 ve 19 F4 monoklonal antikoları üretilmiştir. Meme ve pankreas tümörleri, non-Hodgkin lenfomalar, hücre kültürleri (insan epidermal keratinositleri ve insan periferik kan mononükleer hücreleri), ve normal dokularda Hall ve arkadaşları tarafından PC10 monoklonal antikoruna ile ilk geniş çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada normal dokularda PC10 boyanmasının çekirdekte sınırlı, diffüz ya da granüler tarzda olduğu, nadiren sitoplazmik boyanmaların da olabildiği gözlenmiştir. Bazı mitotik hücrelerin boyanmaması dikkati çekmiş olmasına rağmen herhangi bir açıklama yapılamamıştır. Hücre proliferasyonu fazla olan normal dokularda beklendiği gibi yoğun PCNA boyanması izlenmiştir (lenfoid dokuların germinal merkezleri ve dağınık olarak parakorteks, çok katlı yassı epitelin bazal hücreleri, kıl kökü hücrelerinin çoğu, mide, ince barsak ve kolonun proliferatif alanları, proliferatif faz endometriyumun epitelyal ve stromal hücreleri, testiste spermatogoniaların çoğu). Yetişkin santral ve periferik sinir sisteminde, iskelet, düz kas ve kalp kasında, hepatositlerde hiç boyanma izlenmezken, böbrekte çok az, pankreasta normal asiner ve duktal hücrelerde nadir olarak PCNA ile çekirdek boyanmaları izlenmiştir (166, 169).

Gastrointestinal kriptlerde proliferasyon zonu üzerinde PCNA ile saptanan hafif çekirdek boyanmaları PCNA'nın yarı ömrünün uzunluğuna (20 saat) ve gastrointestinal hücrelerin hızlı göçüne bağlanmıştır (170). Hücre döngüsünü yeni tamamlayan hücrelerde de PCNA ile pozitif boyanma görülebilmektedir. Hücre döngü zamanı 20 saat olan ve bilinen büyüme fraksiyonu olan tümör xenograftlarında PCNA pozitif hücreler %100'e yakın bulunmuştur (171).

Mayer ve arkadaşları 82 kolorektal adenokarsinom ve 18 lenf düğümü metastazına immünohistokimyasal olarak PCNA ve P-gp uygulamış ve prognostik önemini araştırmışlardır. PCNA pozitif hücrelerin yüzdesi ile yaşam süresi arasında ters ilişki bulunurken, P-gp ifadesinin ise yaşam üzerine doğrudan etkisinin olmadığını ileri sürmüşlerdir. Proliferatif aktivitesi yüksek olan tümörlerin kemoterapiye yanıt verme olasılığı daha fazla olacağı için PCNA-pozitif hücrelerin yüzdesini bilmenin lokalize hastalığı kemoterapi ile tedavi edip etmeme kararını aldirmakta önemli olduğu düşünülmektedir (172).

2.8.P-glikoprotein (P-gp)

Tümör hücrelerinin sitotoksik ilaçlara direnç göstermeleri kemoterapide karşılaşılan en büyük engeldir. Çok ilaça direnç (ÇİD) hücrenin çeşitli ilaçlara karşı olan direncini tanımlar. ÇİD'ten etkilenen ilaçlar fungal veya bitki kökenli antibiyotikler veya alkaloidler, antrasiklinler, actinomycine, vinka alkaloidleri ve kolşisinidir (34).

Antrasikline dirençli tümör hücrelerinde değişen ilaç taşınımına ait ilk deneysel gözlem 1968'de yapılmıştır. P-gp'nin, 1976 yılında ilacın hücre membranı dışına atılmasında anahtar rol oynadığı bulunmuştur. ÇİD'de ana hipotez dirençli hücrenin membranı üzerinde bulundurduğu enerji bağımlı pompanın toksik ürünleri hücre dışına atması ve böylece hücrenin korunmasıdır (173).

P-gp, *mdr1* geninin ürünü olup normal hematopoietik öncü hücrelerde, karaciğerde safra kanallarını döşeyen hücrelerde, jejunum ve kolonun mukoza yüzeyini örten hücrelerde, böbreğin proksimal tübül epitelyal hücrelerinde, beyin ve testisin kapiller endotel hücrelerinde bulunmaktadır (173). Normal hematopoietik öncü hücrelerin yanında lösemik blastlarda da P-gp varlığı gösterilmiştir. P-gp pozitifliği saptanan tümörlerde ÇİD'i tersine döndüren ajanların (örn. verapamil) kemoterapötiklerle birlikte verilmesi tedavi şansını artırmaktadır (174).

İkinci olarak, bilgiler P-gp'nin kanser hücrelerinde sitotoksik ilacı hücre dışına atmanın yanında biyolojik fonksiyonları olduğunu da düşündürmektedir. Bu fonksiyonlar kanser hücrelerinin metastaz yapmasında rol alıyor gibi görünmektedir. Kolon kanserlerinde yapılan bir çalışmada invaziv davranan tümör hücrelerinde artmış P-gp pozitifliğinin görülmesi yüksek metastatik

potansiyeli göstermiş, P-gp varlığının direkt veya indirekt olarak tümörün daha agresif davranmasına yol açabileceği ileri sürülmüştür (173)

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Olgular:

Bu çalışmada Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde 1982-1996 yılları arasında kayıtlı endoskopik biyopsi ve ameliyat materyallerine ait parafin bloklar kullanılmıştır. Formalinde fikse edilip, parafine gömülü olarak saklanan dokular arasından 30 adenom, 30 kolorektal adenokarsinom ve adenokarsinom olgularına ait 30 normal barsak dokusu alanını içeren bloklar aşağıdaki özellikler doğrultusunda seçilmiştir.

- 1.Endoskopik biyopsi ile elde edilen adenom olgularında immünhistokimyasal boyama yapabilmek için yeterli doku bulunduranlar çalışmaya alındı.
2. Adenokarsinom olgularının seçiminde biyopsi tanısı olan ve ilk defa radikal cerrahi tedavi uygulanan olgular seçildi.
3. Adenokarsinom olgularında müsinöz adenokarsinom, taşlı yüzük hücreli karsinom, adenoskuamoz karsinom grupları çalışma dışı bırakılarak çalışma grubunda homojenlik sağlanması amaçlandı.
4. Ameliyat materyallerinde başka hastalıklara ait (inflamatuar barsak hastalığı gibi) patolojik bulgular olmayan adenokarsinom olguları çalışmaya alındı.

3.2. Arşiv kayıtları:

Seçilen olguların arşiv kayıtlarından yaşları, cinsiyetleri, materyallerin alınma şekli (ameliyat-biyopsi), yılı, makroskopik özellikleri, fiksasyon süreleri, çapları ve lokalizasyonları ile ilgili bilgiler elde edildi.

3.3. Histopatolojik parametrelerin elde edilmesi:

Çalışmaya alınan olgulara ait parafin bloklardan hazırlanan 4-5 µ kalınlığındaki kesitler Hemotoksilen-Eosin (HE) boyama yöntemi ile boyandı ve adenokarsinom ameliyat materyalleri aşağıda sıralanan özellikler gözönüne alınarak yeniden değerlendirildi.

1. Barsak rezeksiyon materyallerinde tümör dışındaki alanlarda adenom varlığı
2. Tümör komşuluğunda daha önceden varolan adenoma ait kalıntılar
3. Tümörün diferansiyasyonu

4. Tümörün evresi (Fischer'in modifiye Duke sistemi)
5. Venöz invazyon
6. Perinöral invazyon
7. Lenf düğümü metastazı
8. Tümörün büyüme paterni (sınırlı-infiltratif)
9. Tümör dokusu etrafında mononükleer hücre cevabı

Kolorektal adenomlarda ise şu özellikler değerlendirildi.

1. Adenom tipi (Tübüler, villöz, tübülovillöz)
2. Displazi derecesi (Hafif-orta-şiddetli)

3.4. İmmünohistokimyasal boyama yöntemi:

İmmünohistokimyasal olarak "Streptavidin-Biotin Kompleks" yöntemi ile p53 (NO-7), PCNA (PC10), Ki-67 (monoklonal Ki-67 antikoru), Pgp (JSB1) antikorları uygulandı (Tablo 2).

Chromalum-Gelatin Adhesive ile kaplanan lamlara alınan 4-5µm kalınlığındaki kesitler, 56°C'de etüvde 15 dakika kurutulup, ksilolde iki kere 5'er dakika bırakılarak deparafinize edildi. Daha sonra azalan derecelerdeki alkollerden geçirilip distile suya alınarak hidrate edildi. Daha sonra doku kesitlerine antijenlerin yeniden kazanılması amacıyla mikrodalga fırında ısıtma esasına dayanan "Antigen Retrieval" işlemi uygulandı. PCNA, p53 ve Pgp için hazırlanan kesitler 0.01 molar ve pH 6 olarak hazırlanan sitrat (trisodyum sitrat) solüsyonu içinde mikrodalga fırında sıvı seviyesi lamaların üzerini kapatacak ve kesitler kurumayacak şekilde 90°C'de 10 dakika "antijen geri kazanım" işlemine tabi tutuldu.

Ki-67 antikoru için hazırlanan kesitlerin kaynatılmasında 10 dakika ısıtma süresi ile kontrol olarak kullanılan reaktif lenf düğümünde ve olgularımızda başarılı boyanma elde edilemedi (Resim 1).

Tablo 2: Kullanılan monoklonal antikorların özellikleri.

	<i>Klon</i>	<i>Kaynak</i>	<i>Dilüsyon</i>	<i>Boyanma paterni</i>	<i>Negatif kontrol</i>	<i>Pozitif kontrol</i>
p53	DO-7	DAKO	Predilüe	Çekirdek	spesifik olmayan serum	-
PCNA	PC10	DAKO	Predilüe	Çekirdek	-	Reaktif lenf düğümü ve kolon submukoz asındaki lenfoid folliküller
Ki67	Monoklonal Ki-67 antikoru	DAKO	Predilüe	Çekirdek	-	Reaktif lenf düğümü ve kolon submukoz asındaki lenfoid folliküller
Pgp	JSB-1	NOVOCASTRA	1/50	Membran	-	Normal karaciğer dokusu

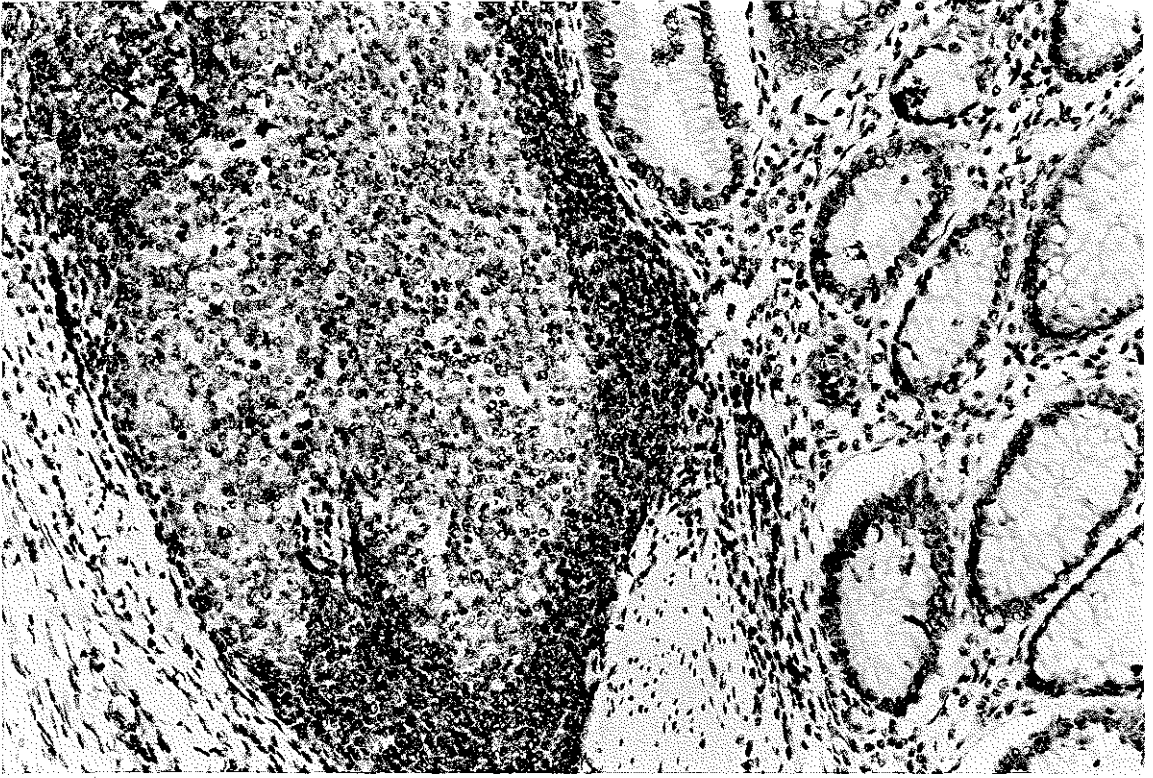
Isıtma süresi 20 dakikaya çıkarıldığında ise kesitlerin lamlardan dökülme sorunu ortaya çıktı. Kesitlerin kaynatılmasında 1 litrelik cam şale içine oturtulmuş toplam 48 lam dizilebilen plastik şale kullanıldı. Cam şale içine işlem sırasında yeniden eklemeyi gerektirmeyecek kadar sitrat tampon dolduruldu. İşleme cam şale içindeki sitrat tamponun 90°C'ye kadar ısıtılması ile başlandı. Bu ısıya 10 dakika kaynatma süresi ile ulaşıldı. Daha sonra sitrat

tampon doldurulmuş ve kesitler yerleştirilmiş olan plastik şale cam şale içine konuldu. Her 5 dakikada bir kaynatmaya 30 saniye ara verip ısıyı kontrol ederek (90°C'yi geçmeyecek şekilde) kaynatma süresi toplam 20 dakikaya tamamlandı. Bu süre ile kontrol olarak kullanılan reaktif lenf düğümünde, normal mukoza (Resim 2) ve adenokarsinom olgularının tümünde; 30 adenom olgusunun 19 tanesinde pozitif boyanma, 11 adenom olgusunda ise negatif boyanma görüldü. 11 adenom olgusunda kaynatma süresi 30 dakikaya çıkarıldığında bir tanesi dışında yine pozitif boyanma sağlanamadı. Kaynatma süresi 40 dakikaya çıkarıldığında ise yeniden kesitlerin lamlardan dökülme sorunu ile karşılaşıldı ve denemelere son verildi.

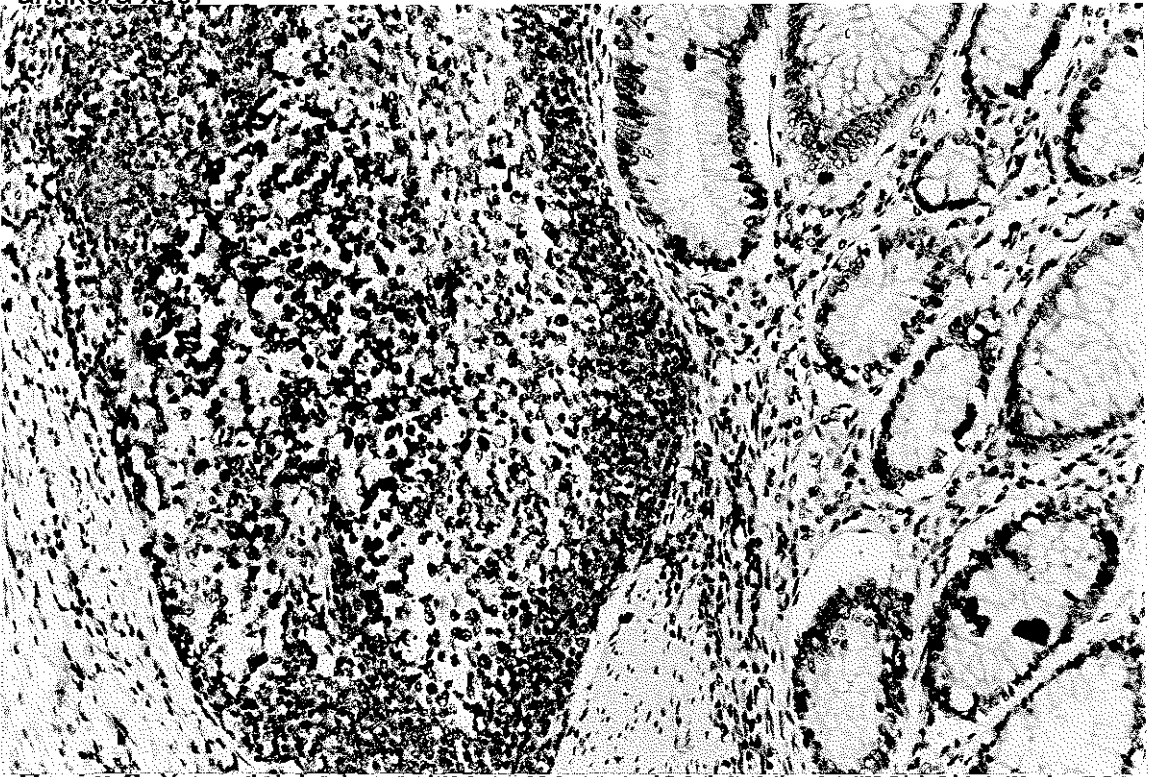
Kaynatma sonunda preparatlar sitrat solüsyonu içerisinde oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. Streptavidin-Biotin peroxidase yöntemi ile immünohistokimyasal boyama aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

1. Endojen peroksidaz enzim blokasyonu için %3'lük H_2O_2 solüsyonu ile kesitler 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra preparatlar tamponlanmış fosfat solüsyonunda yıkanarak 5 dakika bekletildi.
3. Primer antikor ile üzerleri kaplanan doku kesitleri 60 dakika inkübe edildi.
4. Primer antikor ile enzim taşıyan antikor arası bağlayıcı görev yapan Linking Reagent (Dako, Germany) ile doku kesitleri 20 dakika inkübe edildi.
5. Kesitler tamponlanmış fosfat solüsyonunda 5 dakika bekletildi.
6. Labeling reagent (Dako, Germany): Streptavidin ile konjuge edilmiş "horseradish peroksidase" ile dokular 20 dakika inkübe edildi.
7. Kesitler tamponlanmış fosfat solüsyonunda 5 dakika bekletildi.
8. Chromogenic substrate (DAB) (Dako, Germany) ile 10 dakika inkübe edildi.
9. Preparatlara HE (Dako, Germany) ile zıt boyama yapıldı ve kapatıldı.

Bütün inkübasyonlar oda sıcaklığında ve nemli ortamda uygulandı. Renklendirici olarak Diaminobenzidine (DAB) kullanıldı ve oluşan kahverengi renk reaksiyonu pozitif olarak değerlendirildi.



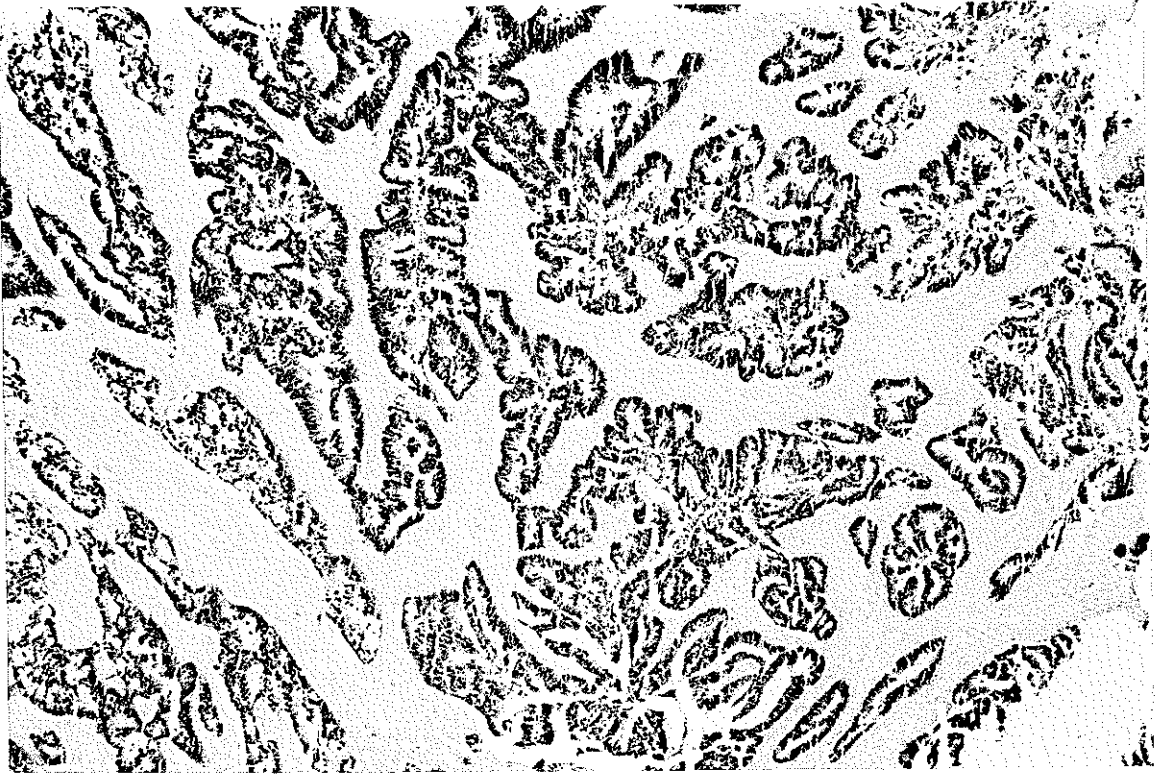
Resim 1. On dakika kaynatma süresi uygulandığında normal kolon mukozası ve lenfoid follikülünde negatif Ki-67 immün boyanması (Monoklonal Ki-67 antikor x20)



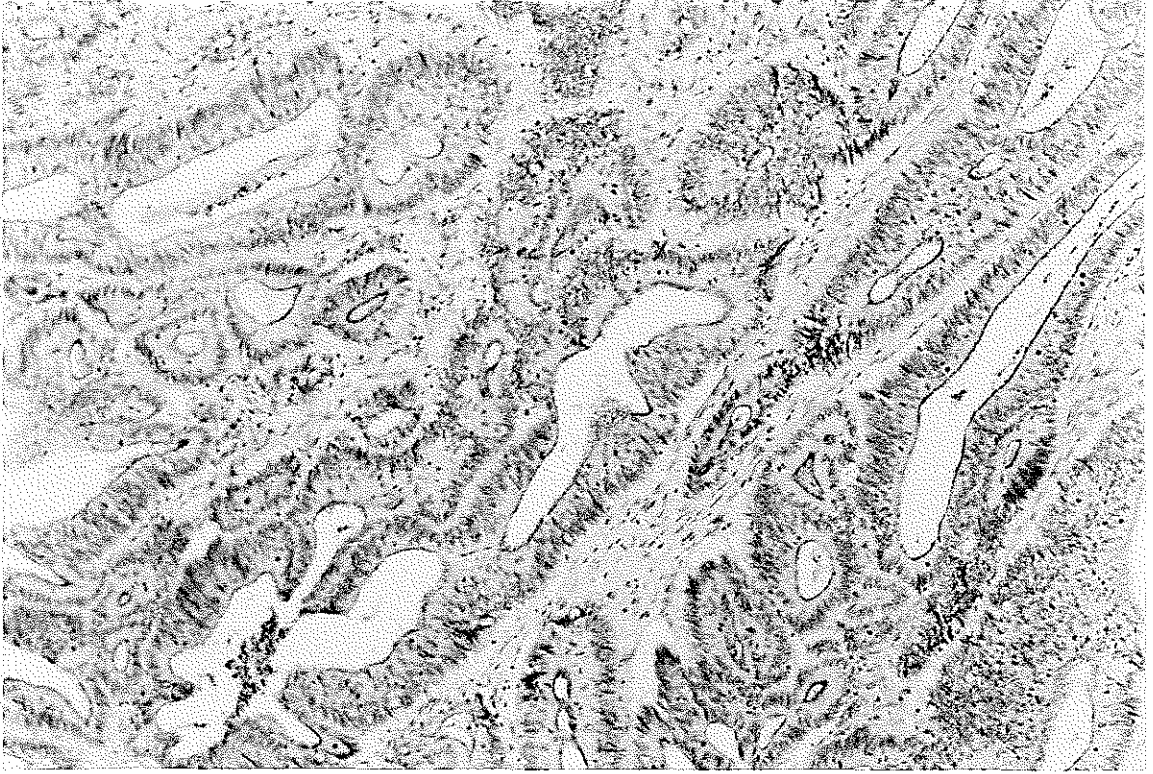
Resim 2. Yirmi dakika kaynatma süresi uygulandığında normal kolon mukozası ve lenfoid follikülünde Ki-67 ile pozitif çekirdek boyanması (Monoklonal Ki-67 antikor x20)

3.7. P53 ve Pgp immünhistokimyasal boyanma sonuçlarının değerlendirilmesi:

P53 antikoru ile yapılan immünhistokimyasal boyada çekirdek boyanması, Pgp antikoru ile yapılan immünhistokimyasal boyamada ise membran boyanması pozitif ve negatif olarak değerlendirildi. Ayrıca her iki antikor için boyanan alan yüzdesi negatif (%0);0, %5'ten daha az;1, %5-50 arası;2 ve %50'den fazla;3, boyanma  iddetide hafif;1, orta;2 ve şiddetli;3 olarak skorlandı (Resim 3, 4).



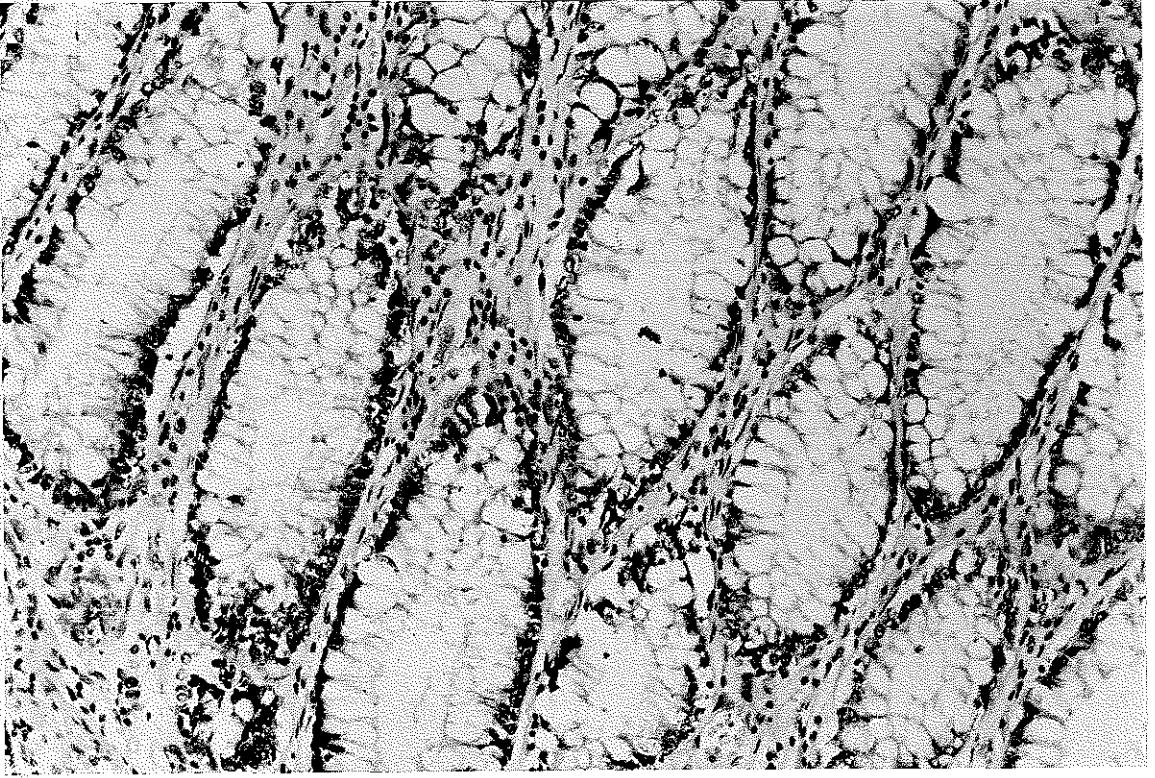
Resim 3. Adenokarsinom olgusunda p53 ile %50'den fazla alanda, şiddetli çekirdek boyanması (NO-7 x5)



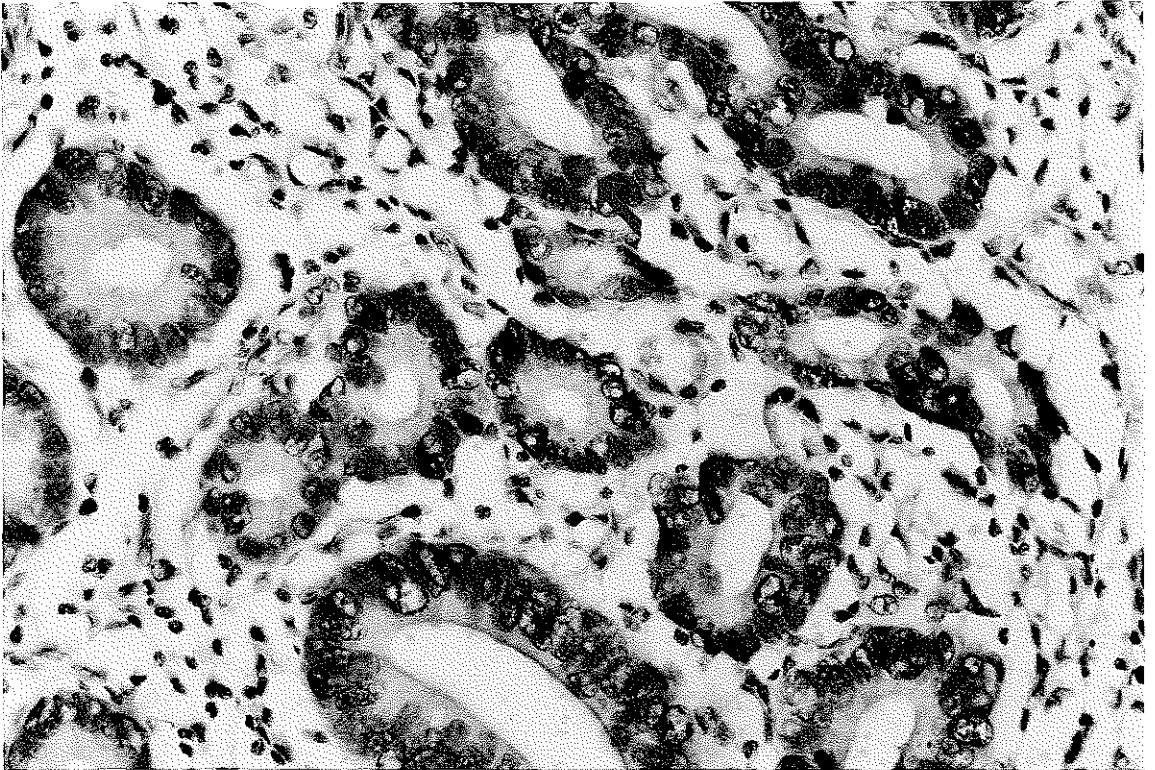
Resim 4. Adenokarsinom olgusunda P-gp ile %50'den fazla alanda, şiddetli membran boyanması (JSB-1 x10)

3.8. Ki-67 ve PCNA ile immün boyanmanın skorlanması:

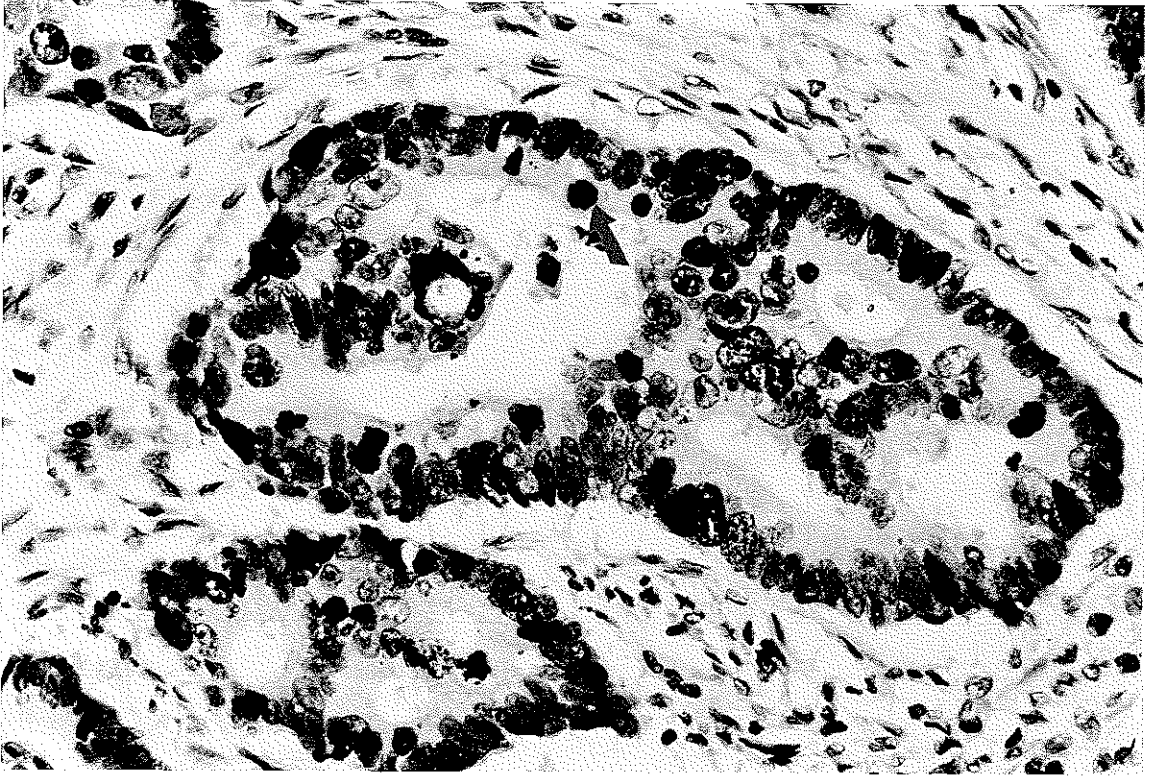
Ki-67 ve PCNA immün boyanmalarının skorlanması için Kamel ve Wintzer'in 1991'de tanımladıkları metodun Linden tarafından önerilen modifiye şekli kullanıldı (175). Ki-67 ve PCNA ile boyanmış lamalar yarı nicesel olarak değerlendirildi. Zeiss, Axioskop ışık mikroskobu ve standart objektifler kullanıldı. Kesitlerde düşük ve orta büyütmelerde yoğun ve uniform immün boyanma alanları belirlendi. Çekirdek boyanması görülen hücreler boyanma derecesine bakılmaksızın pozitif kabul edildi. Normal kolon mukozasında PC10 antikoru ile boyama sonucunda kript tabanı (proliferatif zon) üzerinde de boyanmalar izlendi (Resim 5) Gastrointestinal kriptlerde proliferasyon zonu üzerinde saptanan hafif boyanmalar PCNA'nın yarı ömrünün uzunluğuna (20 saat) ve gastrointestinal hücrelerin hızlı göçüne bağlanmıştır (170, 171). Her olguda x400 büyütmede 200 hücre sayıldı ve pozitif çekirdeklerin sayısı kaydedildi. Pozitif çekirdeklerin yüzdesi proliferasyon indeksini belirledi (Resim 6,7)



Resim 5. Normal mukozada PCNA ile kriptlerdeki diffüz çekirdek boyanması (PC10 x20)



Resim 6. Adenokarsinomda PCNA ile kuvvetli çekirdek boyanması ve mitozdaki hücrelerde negatif boyanma (ok) (PC10 x40)



Resim 7. Adenokarsinomda Ki-67 ile mitozdaki hücreler de dahil olmak üzere (ok) kuvvetli çekirdek boyanması (Monoklonal Ki-67 antikor x40)

3.8. İstatistik: Elde edilen sonuçları değerlendirirken grup içi karşılaştırmalarda Fisher'in kesin ki-kare testi, korelasyon testleri, Kruskal-Wallis varyans analizi, Mann Whitney U testi, gruplar arası karşılaştırmalarda ki-kare testi, t testi, korelasyon testleri, Mann Whitney U testi kullanıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışmadaki hastaların demografik özellikleri, kolorektal adenom ve kolorektal adenokarsinomlarda saptadığımız histopatolojik bulgular ve normal kolon mukozası, adenom ve adenokarsinom gruplarında p53, P-gp, PCNA ve Ki-67 ile immünhistokimyasal boyanma sonuçları Tablo 3 ve Tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 3: Kolorektal adenom olgularımızın demografik özellikleri, histopatolojik bulguları ve immünohistokimyasal boyanma sonuçları.

NO	YAŞ	CİNSİYET	ALINMA ŞEKLİ	ÇAP	TİP	DISPLAZİ	MAKROSKOPİ	p53	PCNA	Ki-67	P-gp
1	35	Kadın	Biyopsi	0.8	Tübüler	Hafif	Sapsız	negatif	0,305	0,09	negatif
2	30	Erkek	Biyopsi	1.4	Tübülovillöz	Şiddetli	Saplı	pozitif	0,27	0,61	negatif
3	39	Kadın	Ameliyat	0.9	Tübüler	Orta	Saplı	negatif	0,07	0,215	negatif
4	37	Erkek	Biyopsi	0.8	Tübüler	Orta	Sapsız	negatif	0,26	0	negatif
5	55	Erkek	Ameliyat	0.5	Tübüler	Hafif	Sapsız	negatif	0,11	0	negatif
6	74	Kadın	Biyopsi	0.4	Tübüler	Hafif	Saplı	negatif	0,06	0,24	negatif
7	78	Erkek	Ameliyat	5	Villöz	Orta	Sapsız	pozitif	0,425	0	negatif
8	67	Erkek	Biyopsi	1	Tübüler	Orta	Saplı	negatif	0,54	0	negatif
9	52	Erkek	Biyopsi	0.7	Tübülovillöz	Orta	Saplı	negatif	0,055	0,21	negatif
10	49	Erkek	Biyopsi	0.6	Tübüler	Hafif	Saplı	negatif	0,165	0,285	negatif
11	60	Erkek	Biyopsi	0.8	Tübülovillöz	Şiddetli	Sapsız	negatif	0,07	0,12	negatif
12	39	Erkek	Biyopsi	0.3	Tübüler	Hafif	Sapsız	pozitif	0,19	0	negatif
13	60	Erkek	Biyopsi	0.3	Tübüler	Şiddetli	Sapsız	pozitif	0,25	0,16	negatif
14	42	Kadın	Biyopsi	0.5	Tübüler	Hafif	Sapsız	negatif	0,315	0,36	negatif
15	65	Erkek	Biyopsi	0.4	Tübüler	Orta	Sapsız	pozitif	0,315	0,43	negatif
16	55	Erkek	Biyopsi	0.6	Tübüler	Orta	Saplı	negatif	0,235	0	negatif
17	21	Kadın	Biyopsi	1	Tübüler	Orta	Saplı	negatif	0,28	0,31	negatif
18	42	Kadın	Biyopsi	1	Villöz	Şiddetli	Saplı	negatif	0,225	0,34	negatif
19	58	Kadın	Biyopsi	0.7	Tübülovillöz	Orta	Sapsız	negatif	0,14	0	negatif
20	48	Kadın	Biyopsi	0.5	Tübüler	Hafif	Sapsız	negatif	0,31	0,08	negatif
21	60	Erkek	Biyopsi	0.8	Tübülovillöz	Hafif	Sapsız	negatif	0,355	0,26	negatif
22	64	Erkek	Biyopsi	0.7	Tübüler	Orta	Sapsız	negatif	0,125	0,14	negatif
23	35	Erkek	Biyopsi	0.5	Tübüler	Hafif	Sapsız	negatif	0,16	0	negatif
24	25	Kadın	Biyopsi	0.9	Tübüler	Orta	Sapsız	negatif	0,09	0	negatif
25	39	Kadın	Biyopsi	0.6	Tübüler	Hafif	Sapsız	negatif	0,06	0,09	negatif
26	34	Kadın	Biyopsi	1	Villöz	Orta	Saplı	pozitif	0,24	0,105	negatif
27	60	Erkek	Biyopsi	0.9	Tübülovillöz	Şiddetli	Sapsız	pozitif	0,07	0,095	negatif
28	60	Erkek	Biyopsi	0.4	Tübülovillöz	Hafif	Sapsız	negatif	0,08	0,12	negatif
29	28	Kadın	Biyopsi	1	Tübüler	Hafif	Sapsız	negatif	0,335	0	negatif
30	56	Kadın	Biyopsi	1	Tübülovillöz	Hafif	Sapsız	negatif	0,49	0,38	negatif

Tablo 4: Kolorektal adenokarsinom olgularımızın demografik özellikleri, histopatolojik bulguları ve immünohistokimyasal boyanma sonuçları.

NO	YAŞ	CINSİYET	YERLEŞİM	DİFERANSİYASYON	ÇAP	EVRE	ADENOM ARTIĞI	VENÖZ İNVAZYON	PERİNÖRAL İNVAZYON	LENF DÜĞÜMÜ METASTAZI
1	55	Erkek	Sol kolon	Orta	6	C2	Tübüler	Yok	Yok	Var
2	61	Erkek	Rektum	Orta	3	C2	Yok	Var	Yok	Var
3	89	Kadın	Rektum	İyi	2	D	Yok	Yok	Var	Var
4	37	Erkek	Sağ kolon	Kötü	5	D	Yok	Var	Var	Yok
5	47	Erkek	Sol kolon	İyi	5	B	Yok	Yok	Yok	Yok
6	57	Erkek	Rektum	Orta	3	B	Yok	Yok	Yok	Yok
7	75	Kadın	Sağ kolon	Orta	3.5	C2	Yok	Yok	Yok	Var
8	77	Erkek	Sağ kolon	Orta	5.5	B	Villöz	Yok	Yok	Yok
9	75	Erkek	Rektum	Orta	6	C2	Villöz	Yok	Yok	Var
10	65	Erkek	Rektum	Orta	5	C1	Yok	Var	Yok	Var
11	57	Erkek	Sol kolon	Orta	8	C2	Yok	Yok	Yok	Var
12	55	Erkek	Sağ kolon	Orta	6	B	Yok	Yok	Yok	Yok
13	78	Erkek	Rektum	İyi	5	B	Yok	Yok	Var	Yok
14	39	Erkek	Rektum	Orta	4	C2	Yok	Var	Var	Var
15	58	Erkek	Rektum	Orta	7	D	Yok	Yok	Yok	Var
16	67	Kadın	Sağ kolon	İyi	4	C2	Yok	Var	Yok	Var
17	74	Kadın	Sağ kolon	İyi	8	B	Yok	Yok	Yok	Yok
18	58	Kadın	Rektum	Orta	4.5	C2	Yok	Yok	Var	Var
19	49	Erkek	Sol kolon	İyi	2	C2	Yok	Yok	Yok	Var
20	39	Erkek	Sol kolon	Kötü	14	C2	Yok	Var	Var	Var
21	60	Kadın	Rektum	İyi	3	C2	Yok	Yok	Var	Var
22	54	Erkek	Sol kolon	Orta	4	B	Villöz	Yok	Yok	Yok
23	47	Kadın	Rektum	İyi	2.5	C2	Yok	Yok	Yok	Var
24	52	Kadın	Rektum	Orta	4.5	A	Yok	Yok	Yok	Yok
25	37	Erkek	Rektum	Orta	5	B	Tübüler	Yok	Yok	Yok
26	43	Kadın	Rektum	Orta	5	A	Yok	Yok	Yok	Yok
27	77	Erkek	Sol kolon	Orta	9	D	Yok	Yok	Yok	Var
28	64	Erkek	Sol kolon	Orta	2	B	Yok	Yok	Yok	Yok
29	62	Erkek	Rektum	Orta	8	C2	Villöz	Yok	Yok	Var
30	53	Erkek	Rektum	Orta	4	D	Yok	Yok	Yok	Var

Tablo 4'ün devamı.

NO	MAKROSKOPI	YANGI	BÜYÜME PATERNI	Normal mukoza p53	Adenokarsinom p53	Normal mukoza PCNA	Adenokarsinom PCNA	Normal mukoza Ki-67	Adenokarsinom Ki-67	Normal mukoza P-gp	Adenokarsinom P-gp
1	Polipoid	Var	İnfiltratif	negatif	pozitif	0,02	0,88	0,05	0,475	negatif	pozitif
2	Polipoid	Yok	İnfiltratif	negatif	pozitif	0,03	0,32	0,06	0,835	negatif	pozitif
3	Ülsere-infiltratif	Var	İnfiltratif	negatif	pozitif	0,09	0,71	0,04	0,59	pozitif	pozitif
4	Ülsere-infiltratif	Var	İnfiltratif	negatif	negatif	0,07	0,51	0,06	0,559	negatif	negatif
5	Polipoid	Var	Sınırlı	negatif	pozitif	0,095	0,6	0,14	0,545	pozitif	pozitif
6	Ülsere-infiltratif	Yok	Sınırlı	negatif	pozitif	0,04	0,655	0,145	0,955	negatif	pozitif
7	Polipoid	Yok	Sınırlı	negatif	pozitif	0,06	0,9	0,07	0,76	negatif	negatif
8	Polipoid	Var	İnfiltratif	negatif	negatif	0,05	0,865	0,04	0,495	negatif	pozitif
9	Polipoid	Yok	Sınırlı	negatif	pozitif	0,05	0,535	0,07	0,485	negatif	negatif
10	Ülsere-infiltratif	Yok	Sınırlı	negatif	negatif	0,045	0,82	0,03	0,654	pozitif	pozitif
11	Ülsere-infiltratif	Yok	Sınırlı	negatif	pozitif	0,085	0,59	0,015	0,68	negatif	pozitif
12	Polipoid	Yok	Sınırlı	negatif	pozitif	0,125	0,54	0,095	0,49	negatif	negatif
13	Polipoid	Yok	İnfiltratif	negatif	pozitif	0,11	0,78	0,04	0,46	negatif	pozitif
14	Polipoid	Yok	İnfiltratif	negatif	pozitif	0,09	0,45	0,03	0,385	negatif	negatif
15	Polipoid	Yok	Sınırlı	negatif	pozitif	0,1	0,49	0,05	0,56	negatif	pozitif
16	Ülsere-infiltratif	Yok	İnfiltratif	negatif	negatif	0,06	0,565	0,1	0,39	negatif	negatif
17	Polipoid	Yok	İnfiltratif	negatif	negatif	0,055	0,43	0,065	0,685	negatif	negatif
18	Ülsere-infiltratif	Yok	Sınırlı	negatif	pozitif	0,06	0,515	0,055	0,46	pozitif	pozitif
19	Polipoid	Yok	Sınırlı	negatif	pozitif	0,165	0,835	0,04	0,385	negatif	pozitif
20	Ülsere-infiltratif	Yok	Sınırlı	negatif	pozitif	0,06	0,355	0,13	0,44	negatif	pozitif
21	Polipoid	Yok	İnfiltratif	negatif	pozitif	0,1	0,49	0,11	0,62	negatif	pozitif
22	Ülsere-infiltratif	Var	İnfiltratif	negatif	negatif	0,04	0,495	0,025	0,44	negatif	pozitif
23	Ülsere-infiltratif	Yok	İnfiltratif	negatif	negatif	0,135	0,86	0,05	0,51	negatif	pozitif
24	Ülsere-infiltratif	Yok	Sınırlı	negatif	pozitif	0,11	0,345	0,055	0,36	negatif	negatif
25	Ülsere-infiltratif	Yok	Sınırlı	negatif	negatif	0,09	0,39	0,08	0,46	negatif	pozitif
26	Ülsere-infiltratif	Yok	İnfiltratif	negatif	pozitif	0,055	0,41	0,04	0,385	pozitif	pozitif
27	Ülsere-infiltratif	Yok	İnfiltratif	negatif	pozitif	0,08	0,55	0,05	0,49	negatif	negatif
28	Polipoid	Yok	Sınırlı	negatif	pozitif	0,11	0,34	0,06	0,38	negatif	negatif
29	Ülsere-infiltratif	Yok	İnfiltratif	negatif	pozitif	0,085	0,78	0,04	0,605	negatif	negatif
30	Ülsere-infiltratif	Yok	Sınırlı	negatif	negatif	0,12	0,705	0,07	0,68	negatif	negatif

4.1. Cinsiyet ve Yaş: Kolorektal adenom grubu 13'ü kadın (yaş aralığı 21-74, yaş ortalaması 41.60), 17'si erkek (yaş aralığı 30-78, yaş ortalaması 54.47) toplam 30 hastadan oluşmaktaydı (K/E oranı 4/5). Adenokarsinom grubu 9'u kadın (yaş aralığı 43-89, yaş ortalaması 57), 21'i erkek (yaş aralığı 37-78, yaş ortalaması 56.95) toplam 30 hastadan oluşmaktaydı. Bizim kolorektal adenokarsinom olgularımızda kadın/erkek oranı 3/7 iken, rektum yerleşimli olgularımızda kadın/erkek oranı 2/3, kolon yerleşimli olgularımızda kadın/erkek oranı 1/4 olarak bulundu. Adenom grubunda yaş ortalaması 48.90 (yaş aralığı 21-78) adenokarsinom grubunda ise yaş ortalaması 58.70 (yaş aralığı 37-89) olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.02$) (Tablo 5).

Tablo 5: Kolorektal adenom ve adenokarsinom gruplarında hastaların cinsiyet ve yaş dağılımı

		Adenom	Adenokarsinom
KADIN	<i>en küçük yaş</i>	21	43
	<i>en büyük yaş</i>	74	89
	<i>yaş ortalaması</i>	41.60	57.00
	<i>hasta sayısı</i>	13	9
ERKEK	<i>en küçük yaş</i>	30	37
	<i>en büyük yaş</i>	78	78
	<i>yaş ortalaması</i>	54.47	56.95
	<i>hasta sayısı</i>	17	21

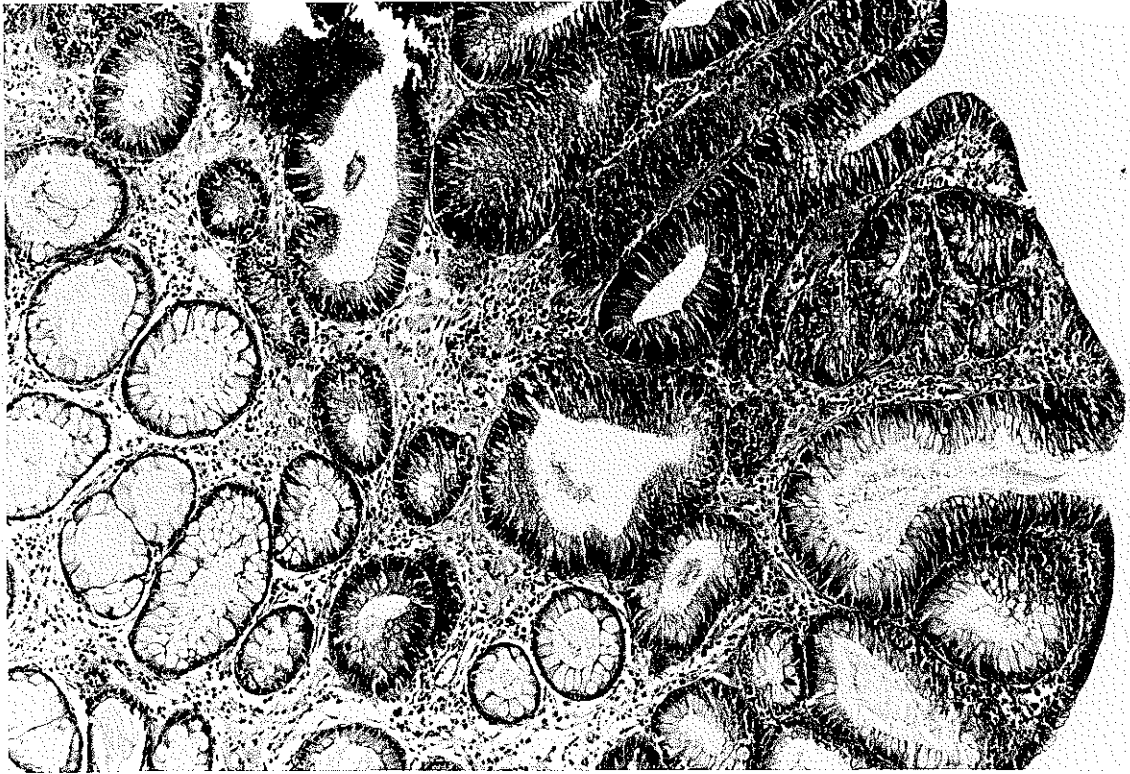
4.2. Kolorektal adenomların morfolojik özellikleri:

Kolorektal adenomlarda en küçük çap 0.30 cm, en büyük çap 5.0 cm, ortalama çap 0.87 cm olarak bulundu. Adenomların 19 tanesi tübüler (2'si düz adenom), 8 tanesi tübülovillöz ve 3 tanesi de villöz adenom tipindeydi (Resim 8-10). Olguların arşiv kayıtlarından 20 adenomun sapsız ve 10 adenomun saplı olduğu kaydedildi (Tablo 6). Kolorektal adenomların 27'si endoskopik biyopsi, 3'ü tümör dışı nedenlerle ameliyat edilen hastaların ameliyat materyallerinde

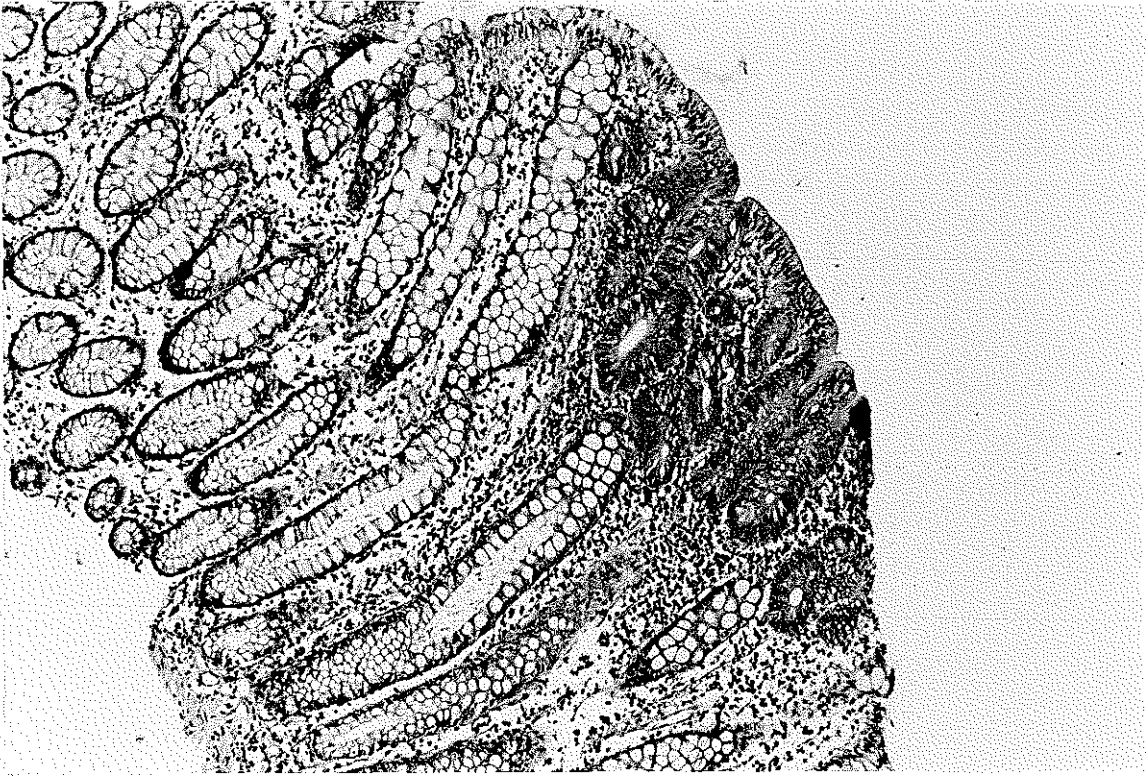
elde edildi (Tablo 7). Kolorektal adenom olgularımızın 13'ünde hafif, 12'sinde orta ve 5'inde şiddetli derecede displazi izlendi (Tablo 8).

Tablo 6: Kolorektal adenomların tipleri ve makroskopik şekilleri.

<u>Kolorektal adenom</u>	TÜBÜLER	TÜBÜLOVİLLÖZ	VİLLÖZ
SAPSIZ	13	6	1
SAPLI	6	2	2



Resim 8. Bezlerin üst kısmında başlayan adenomatöz değişikliğin izlendiği tübulovillöz adenom (Hematoksilen-Eozin x10).



Resim 9. Mukozanın vertikal boyunun iki katını geçmeyen düz adenom olgusu (Hematoksilen-Eozin x10).



Resim 10. Villöz adenom olgusunda izlenen parmakı çıkıntılar (Hematoksilen-Eozin x10).

Tablo 7: Kolorektal adenomların alınma şekli.

Kolorektal	ENDOSKOPI	OPERASYON
adenom	27	3

Tablo 8: Kolorektal adenomların tiplerine göre displazi dereceleri.

KOLOREKTAL ADENOM TİPLERİ

<u>Displazi</u> <u>dereceleri</u>	TÜBÜLER ADENOM	TÜBÜLOVİLLÖZ ADENOM	VİLLÖZ ADENOM	<u>TOPLAM</u>
HAFİF	10	3	-	13
ORTA	8	2	2	12
ŞİDDETLİ	1	3	1	5
<u>TOPLAM</u>	19	8	3	30

4.3. Kolorektal adenokarsinomların morfolojik özellikleri:

İncelenen 30 kolorektal adenokarsinom olgusunda en küçük çap 2 cm, en büyük çap 14 cm, ortalama çap 5.32 cm olarak bulundu. Tümörlerin 6 tanesi sağ kolon, 8 tanesi sol kolon ve 16 tanesi ise rektum yerleşimli idi (Tablo 9). Olguların 2'sinde tübuler, 4'ünde villöz tipte adenom alanları adenokarsinom alanları çevresinde dikkati çekti. On beş olguda sınırlı (Resim 11), 15 olguda ise infiltratif büyüme paterni izlendi. Tümörlerde makroskopik olarak 14'ünde polipoid, 16'sında ise ülser-infiltratif gelişim saptandı (Tablo 10). Olgularımızın 8 tanesi iyi, 20 tanesi orta ve 2 tanesi ise kötü diferansiye idi (Resim 12-14) Adenokarsinomların Fischer'in modifiye Duke sistemine göre evrenmesi sonucunda 2'si evre A'da, 9'u evre B'de, 1'i evre C1'de, 13'ü evre

C2'de ve 5'i evre D'de bulundu (Tablo 11). Venöz invazyon 6 olguda, perinöral invazyon ise 7 olguda saptandı (Resim 15,16). Lenf düğümü metastazı olan olgu sayısı 18 idi. Altı olguda tümör çevresinde yoğun mononükleer yangı hücre infiltrasyonu izlendi (Resim 17).

Tablo 9: Kolorektal adenokarsinomların barsakta yerleşim yerleri.

Kolorektal	SAĞ KOLON	SOL KOLON	REKTUM
adenokarsinom	6	8	16

Tablo 10: Kolorektal adenokarsinomlarda makroskopik görünüm büyüme paterni ilişkisi.

MAKROSKOBİK GÖRÜNÜM

<u>Büyüme paterni</u>	Polipoid	ülkere-infiltratif	<u>toplam</u>
sınırlı	8	7	15
infiltratif	6	9	15
<u>toplam</u>	14	16	30

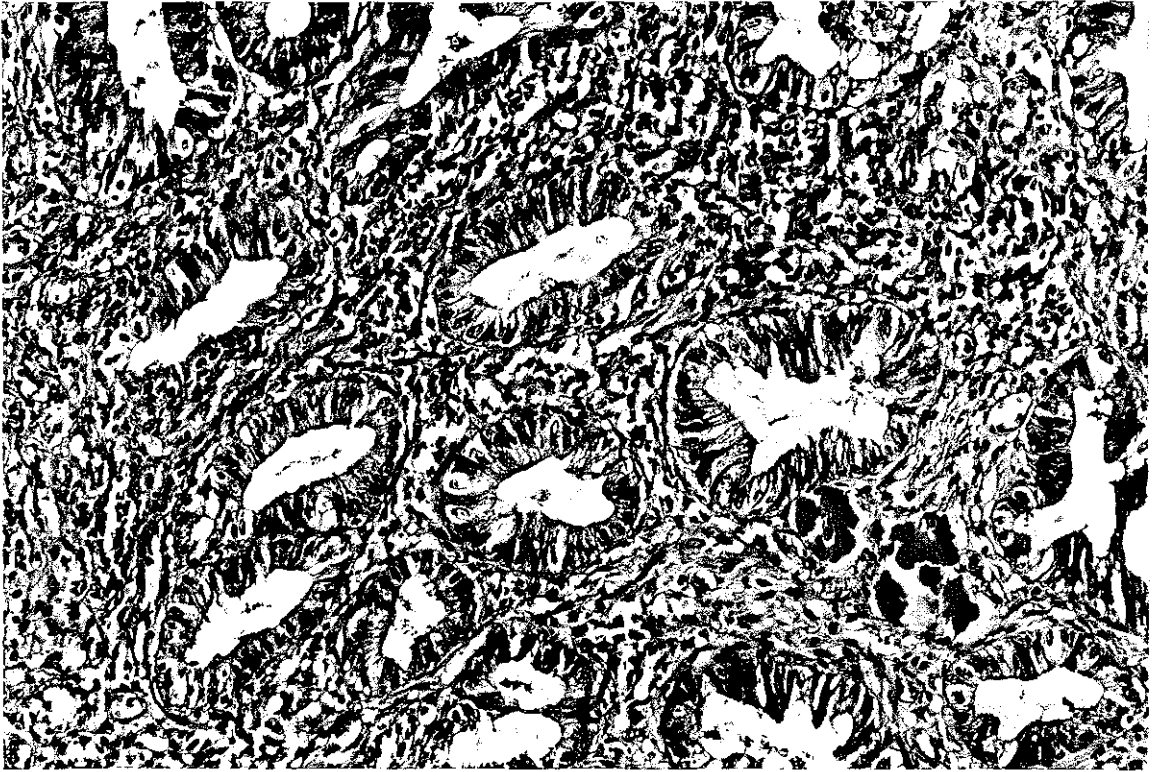
Tablo 11: Kolorektal adenokarsinomların evrelerine göre diferansiasyon dereceleri.

KOLOREKTAL ADENOKARSİNOM EVRELERİ

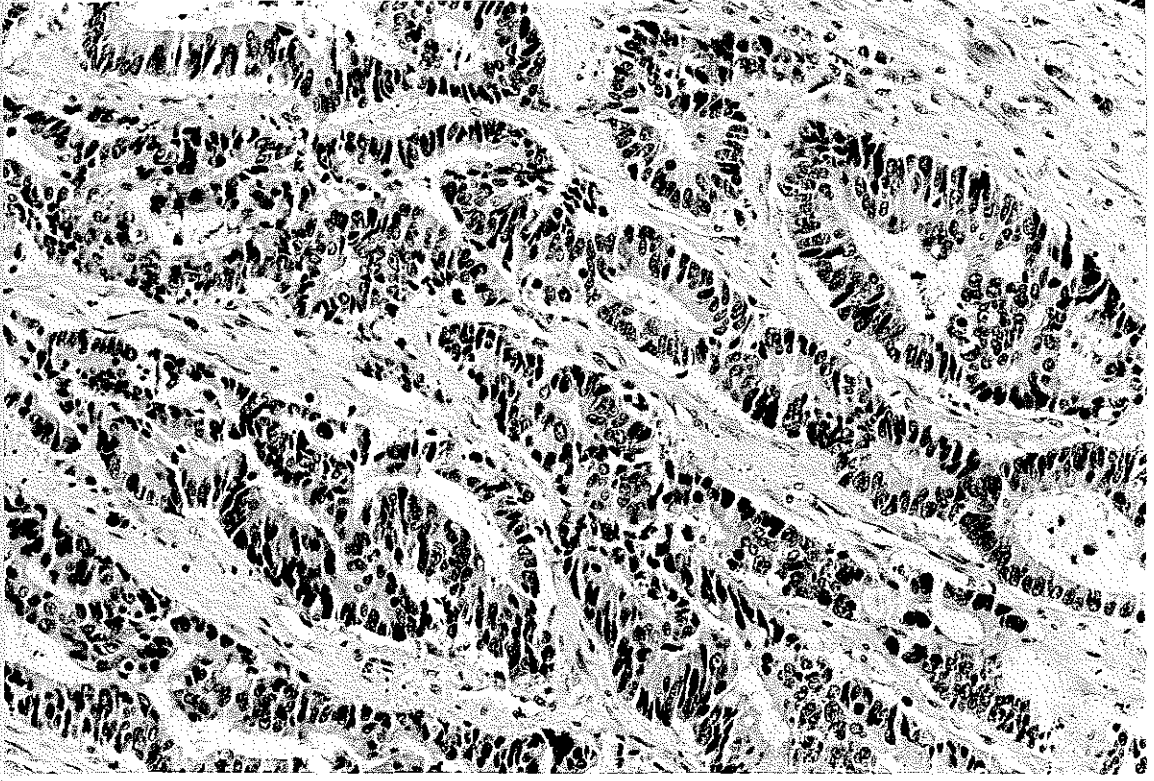
<u>Diferansiasyon dereceleri</u>	EVRE A	EVRE B	EVRE C1	EVRE C2	EVRE D	<u>toplam</u>
İYİ	-	3	-	4	1	8
ORTA	2	6	1	8	3	20
AZ	-	-	-	1	1	2
<u>toplam</u>	2	9	1	13	5	30



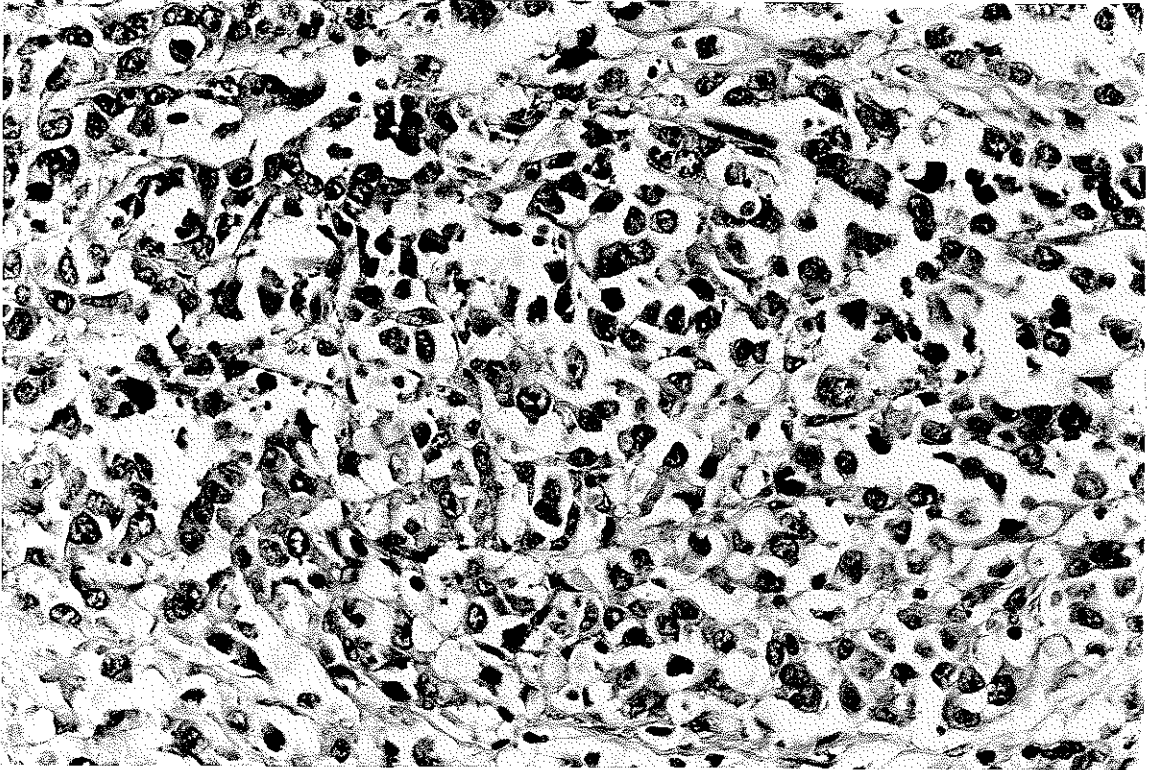
Resim 11. Adenokarsinom olgusunda izlenen sınırlı büyüme paterni (Hematoksilen-Eozin x5).



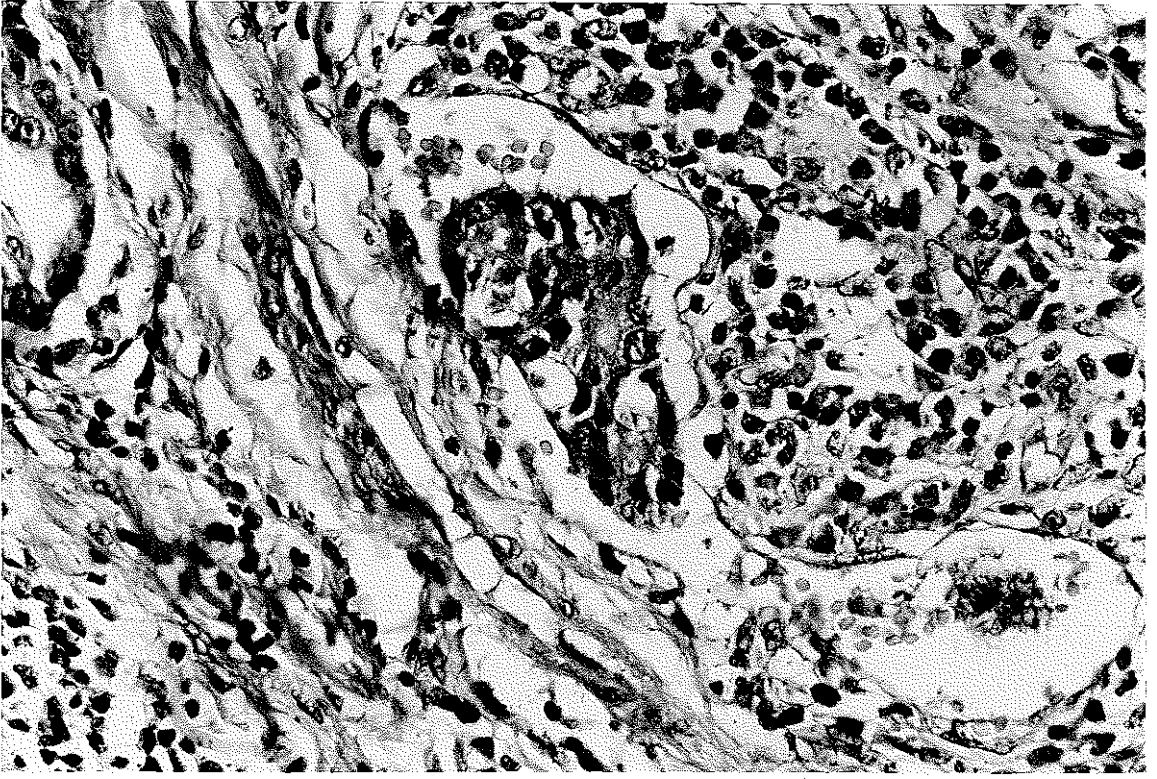
Resim 12. Tubüler yapılar oluşturan iyi derecede differansiye adenokarsinom olgusu (Hematoksilen-Eozin x20).



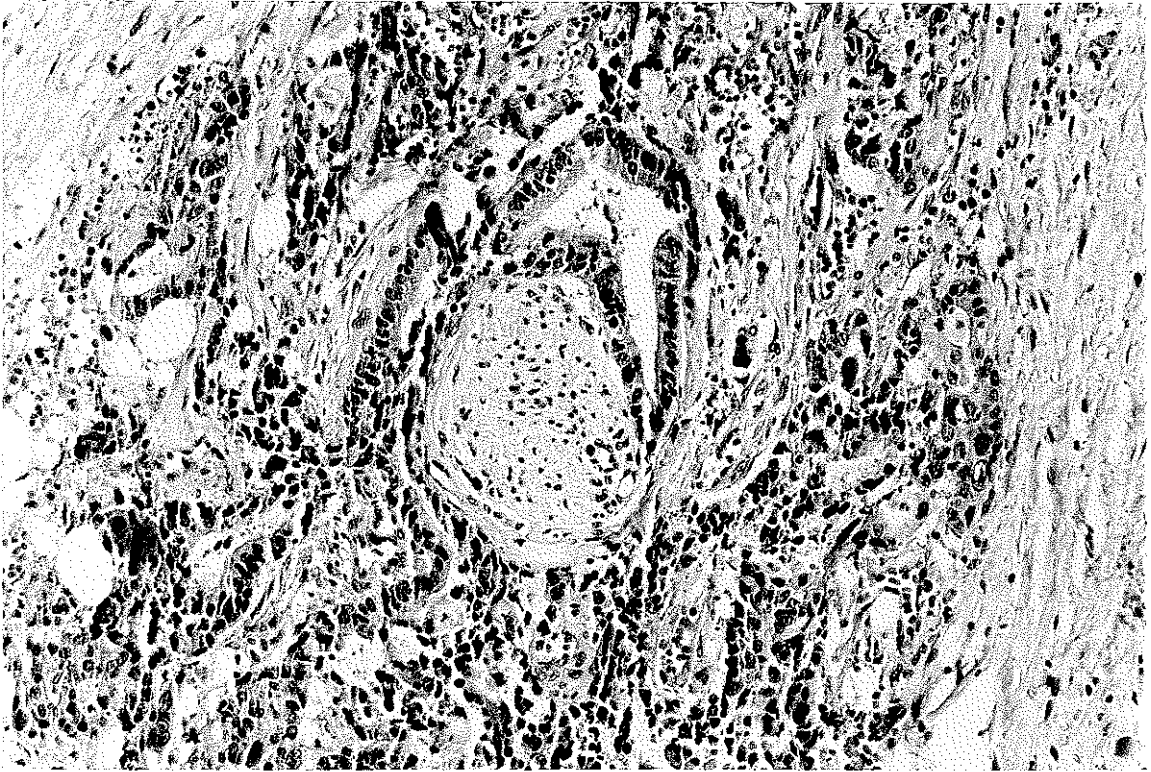
Resim 13. Kompleks tübüler yapılar izlenen, polaritenin bozulduğu orta derecede differansiye adenokarsinom olgusu (Hematoksilen-Eozin x20).



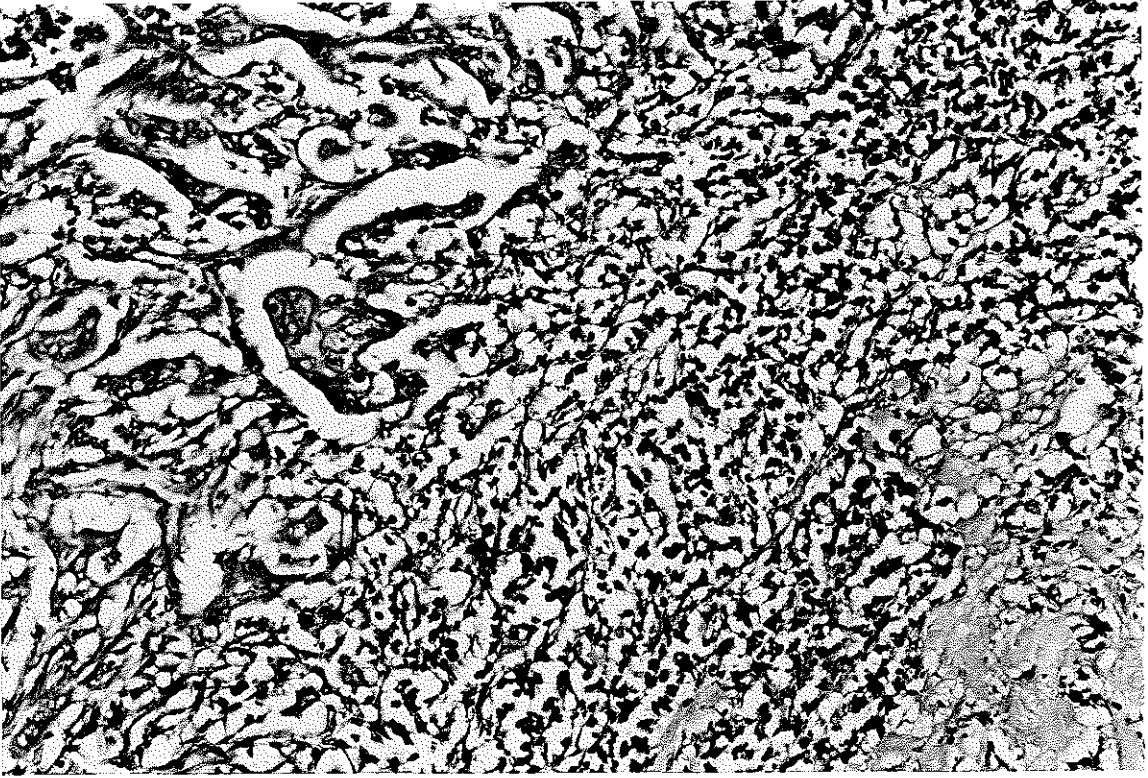
Resim 14. Tümör hücrelerinden oluşan solid alanlar, kötü differansiye adenokarsinom olgusu (Hematoksilen-Eozin x40).



Resim 15. Serozada bulunan bir ven duvarının bütünlüğünü bozarak damar içine giren tümör hücreleri, venöz invazyon (Hematoksilen-Eozin x40).



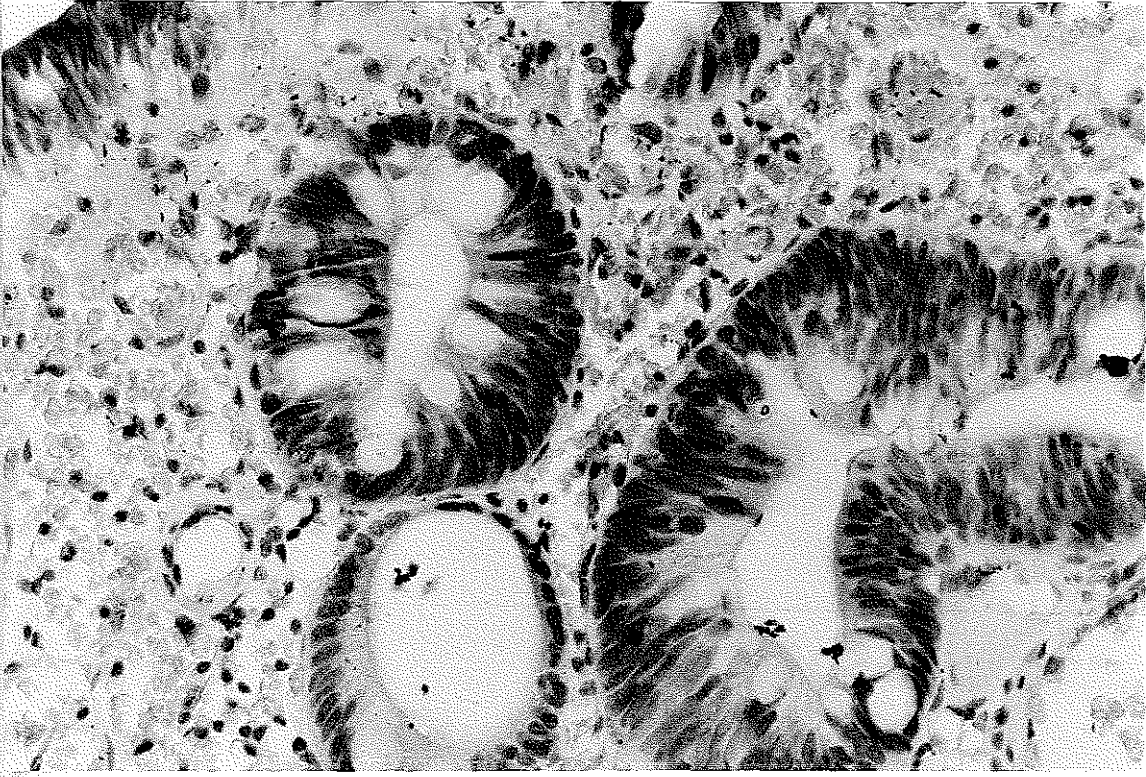
Resim 16. Perinöral invazyon (Hematoksilen-Eozin x40).



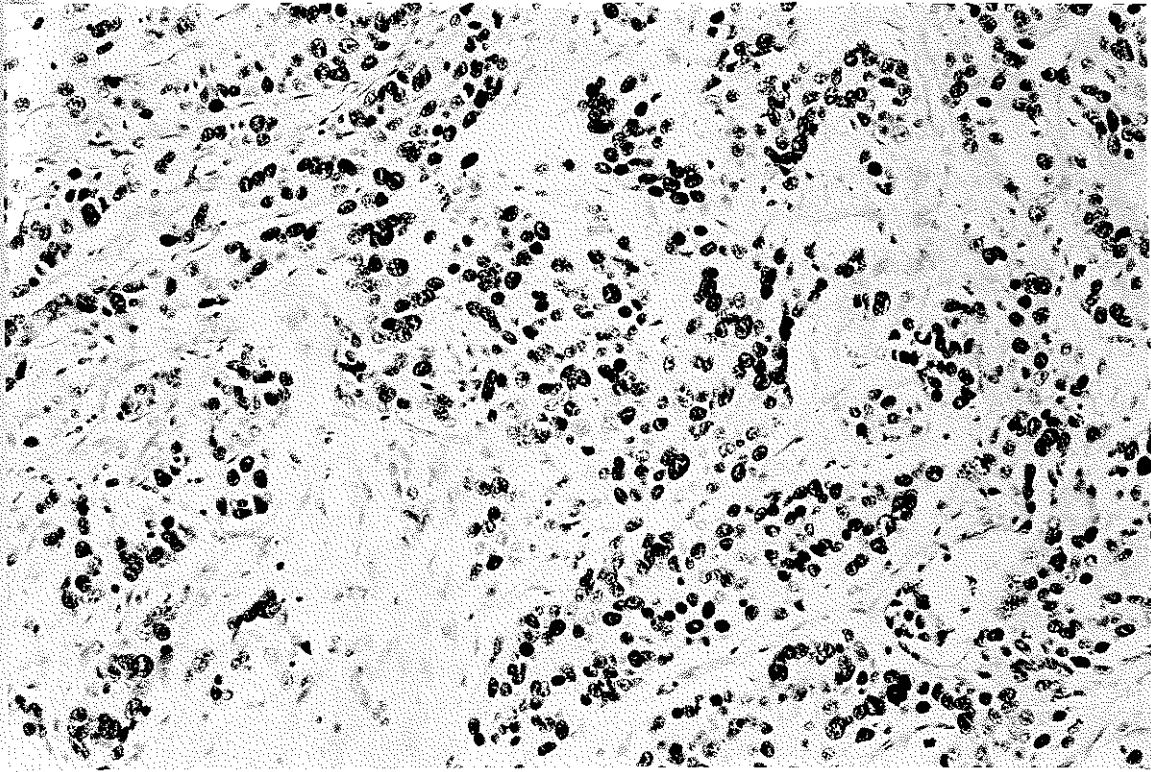
Resim 17. Adenokarsinom etrafında izlenen yoğun mononükleer hücre infiltrasyonu (Hematoksilen-Eozin x20).

4.4. Normal mukoza, adenom ve adenokarsinomlarda p53, Ki-67, PCNA ve Pgp arasındaki ilişki:

Normal mukozada p53 (NO-7 monoklonal antikoru) ile boyanma olmazken, adenomların 7'sinde ($p<0.01$), adenokarsinomların ise 21'inde pozitif çekirdek boyanması izlendi ($p<0.01$), (Grafik 1) (Resim 18, 19).



Resim 18. Tübüler adenom olgusunda izlenen p53 ile çekirdek boyanması (NO-7 x40)

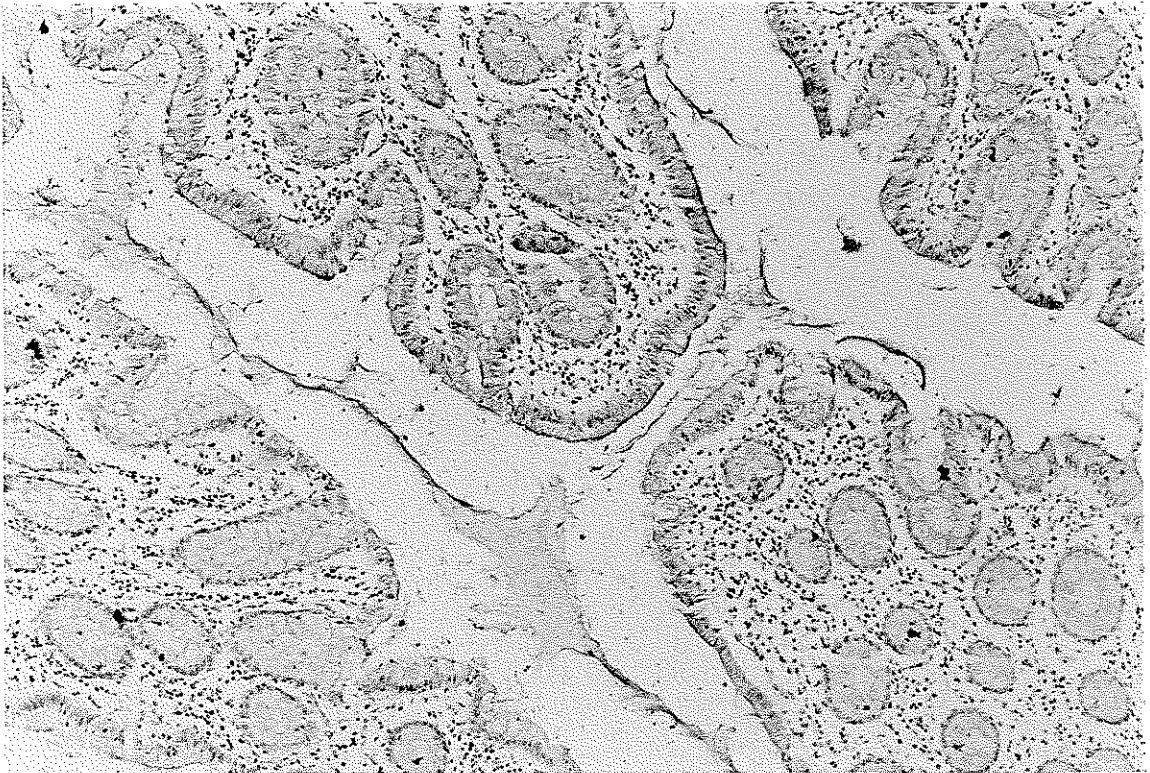


Resim 19. Kötü differansiye adenokarsinom olgusunda p53 ile kuvvetli çekirdek boyanması (NO-7 x40)

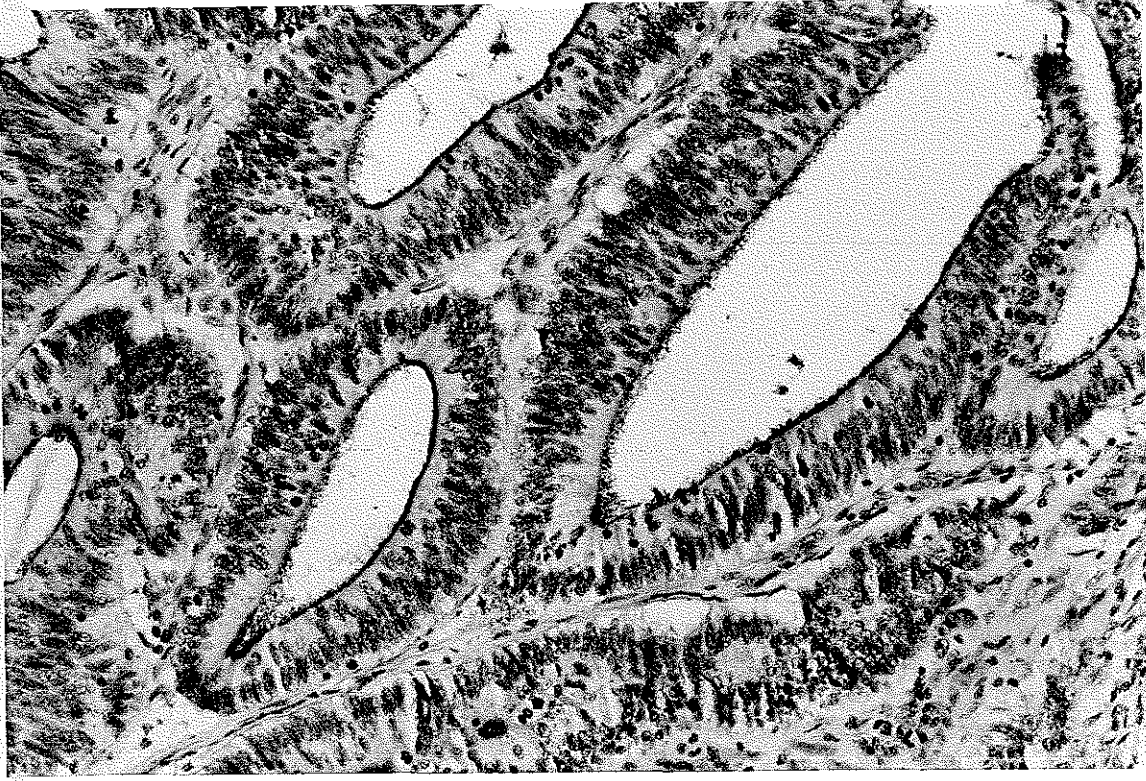
P-gp (JSB-1 monoklonal antikoru) ile yapılan immünhistokimyasal boyama sonucunda adenomlarda pozitiflik saptanmazken, normal mukozaya ait preparatların 6'sında ve adenokarsinomların 18'inde pozitif membran boyanması izlendi ($p<0.01$), (Grafik 2) (Resim 20, 21).

PCNA (PC10 monoklonal antikoru) ile 200 hücrede pozitif boyanan çekirdeklerin sayılması sonucu elde edilen ortalama proliferasyon indeksi normal mukozada %8 (min%1-max%16), adenomlarda %22 (min%6-max%54), ($p<0.01$), adenokarsinomlarda %59 (min%32-max%90), ($p<0.01$) olarak bulundu (Resim 22, 23).

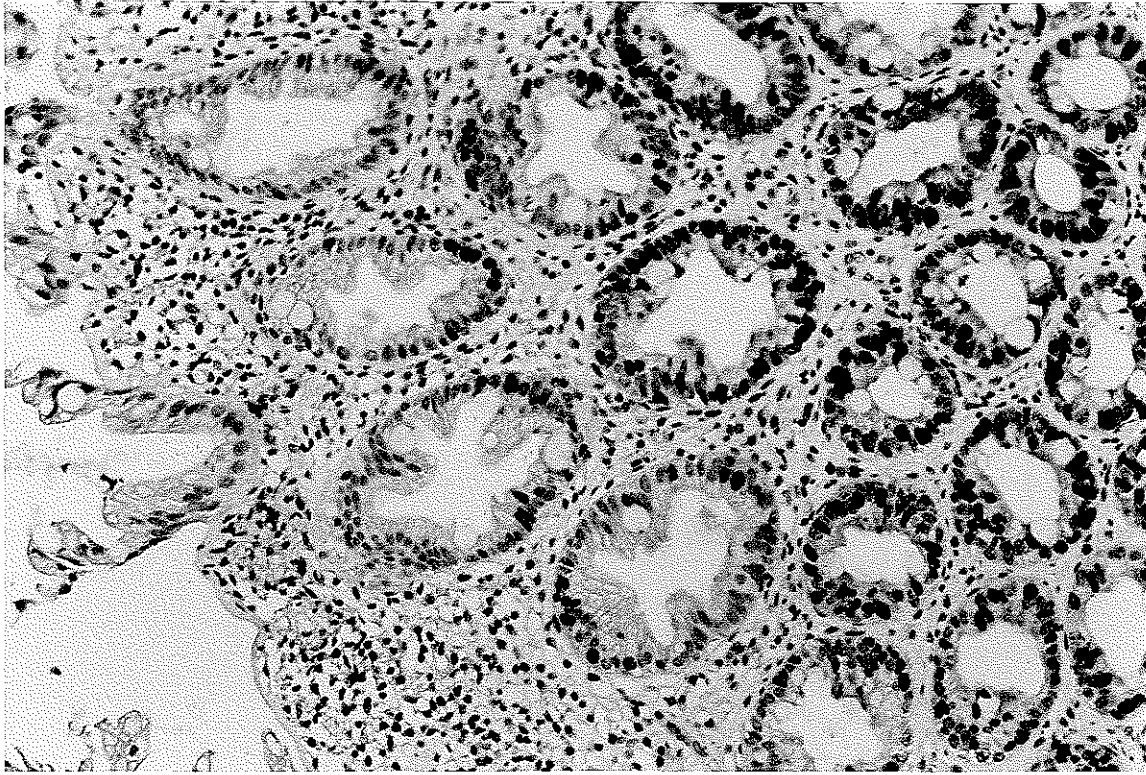
Ki-67 (monoklonal Ki-67 antikoru) ile 200 hücrede pozitif boyanan çekirdeklerin sayılması sonucu elde edilen ortalama proliferasyon indeksi ise normal mukozada %5 (min%05-max%14), adenomlarda %23 (min%8-max%61), ($p<0.01$), adenokarsinomlarda %54 (min%36-max%95), ($p<0.01$) olarak bulundu (Resim 24-26).



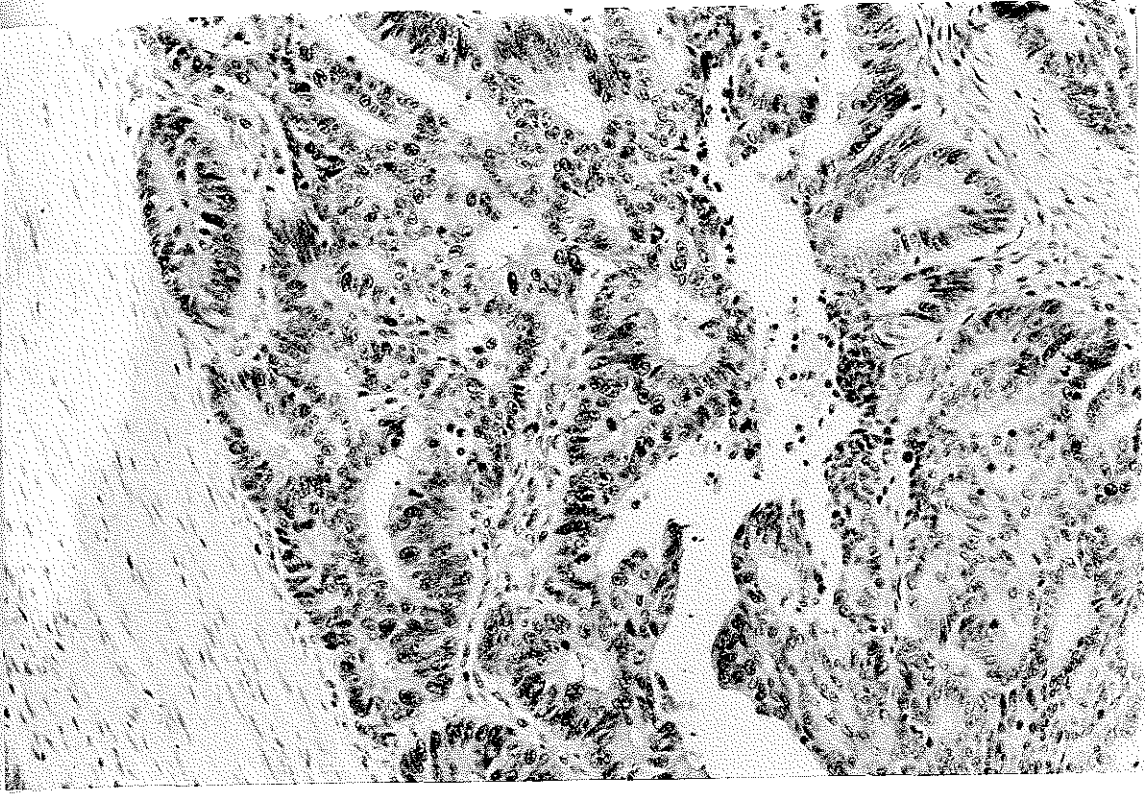
Resim 20. Yoğun musin sekresyonu olan normal kolon mukozasında P-gp ile hücre membranlarında özellikle luminal yüzde kuvvetli pozitif boyanma (JSB-1 x10)



Resim 21. Adenokarsinom olgusunda bez lümenine bakan yüzde P-gp ile kuvvetli pozitif boyanma (JSB-1 x20)



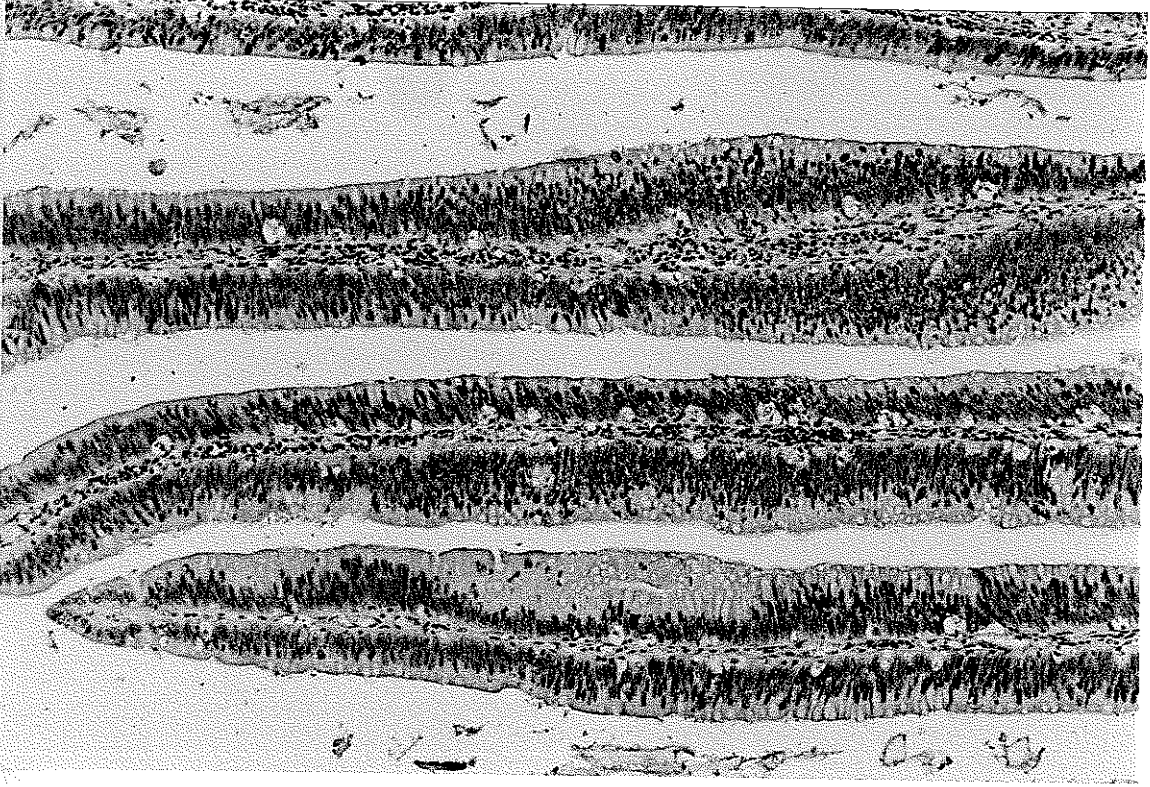
Resim 22. Tübüler adenomda musin kaybı olan ve polaritenin bozulduğu bezlerde PCNA ile kuvvetli çekirdek boyanması (PC10 x20)



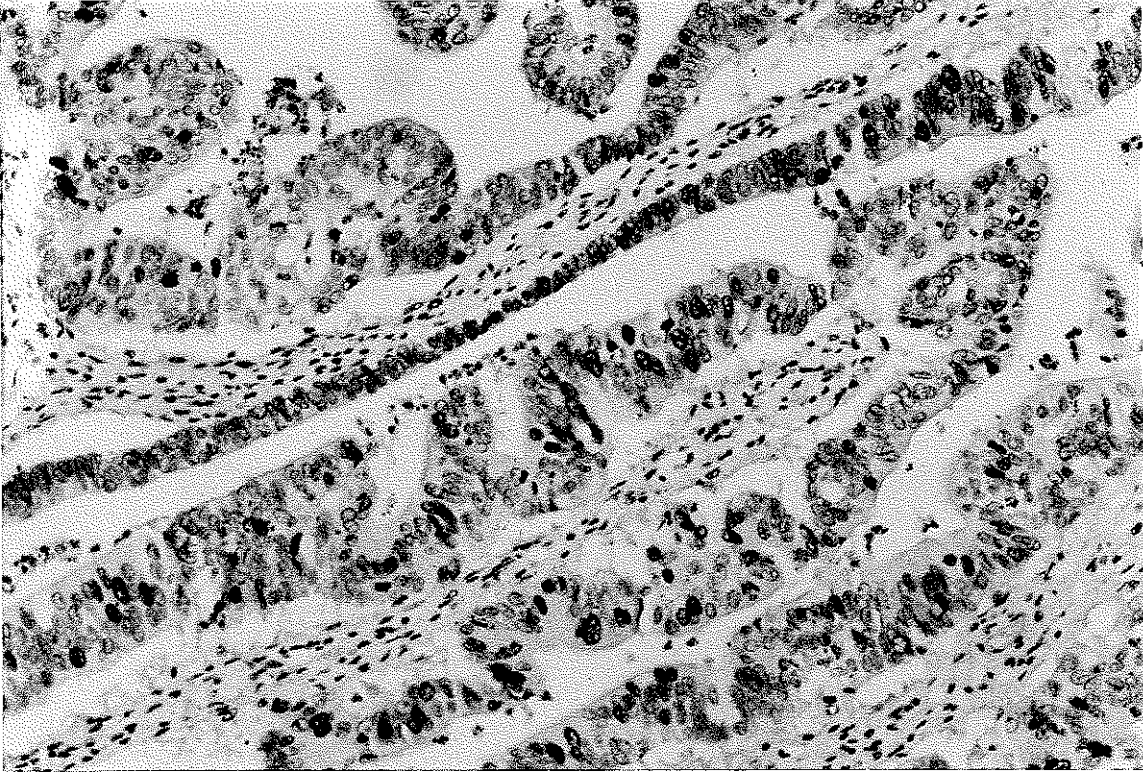
Resim 23. Orta derecede differansiye adenokarsinom olgusunda PCNA ile çekirdek boyanması (PC10 x20)



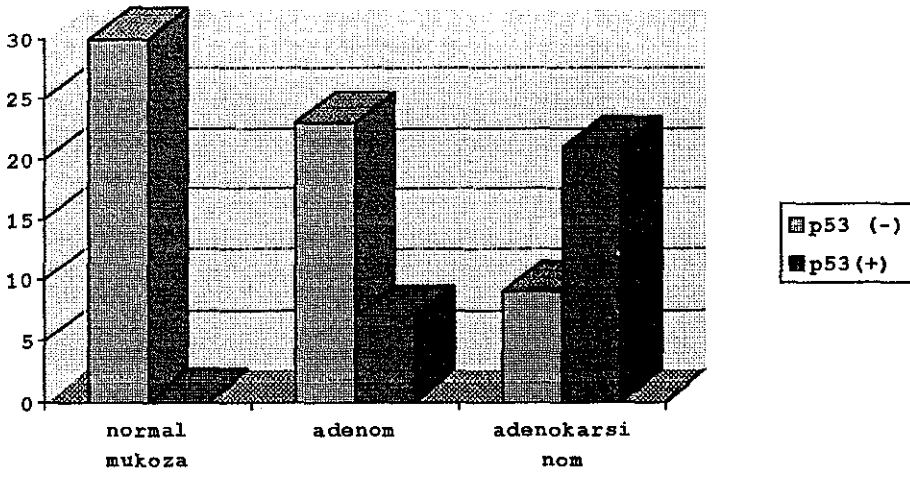
Resim 24. Tübülovillöz adenom olgusunda Ki-67 ile elde edilen pozitif çekirdek boyanması (monoklonal Ki-67 antikoru x10)



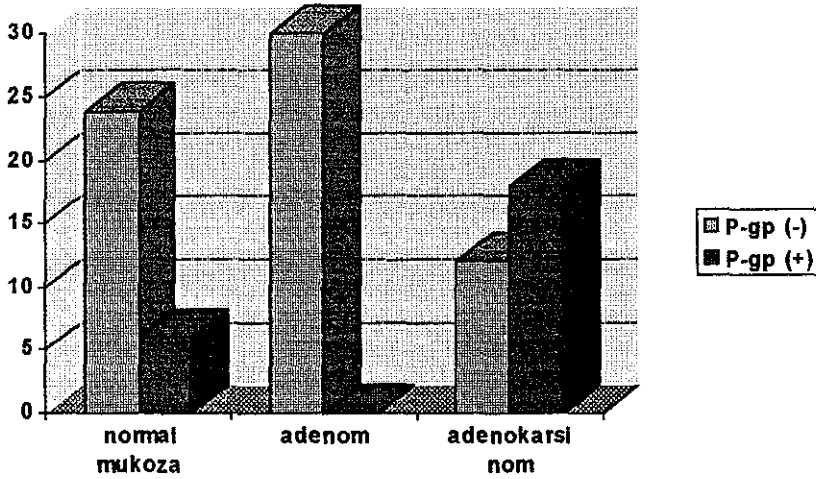
Resim 25. Villöz adenom olgusunda Ki-67 ile elde edilen pozitif çekirdek boyanması (monoklonal Ki-67 antikoru x10)



Resim 26. Adenokarsinom olgusunda Ki-67 ile elde edilen çekirdek boyanması (monoklonal Ki-67 antikoru x20)



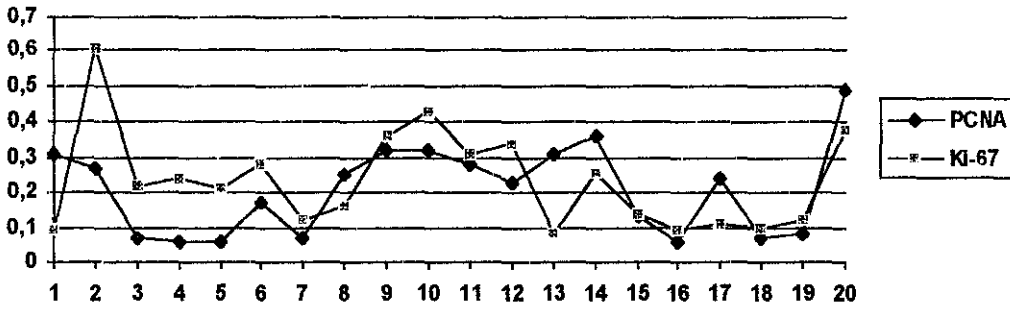
Grafik 1: Normal mukoza, adenom ve adenokarsinom gruplarında p53 boyanma dağılımı



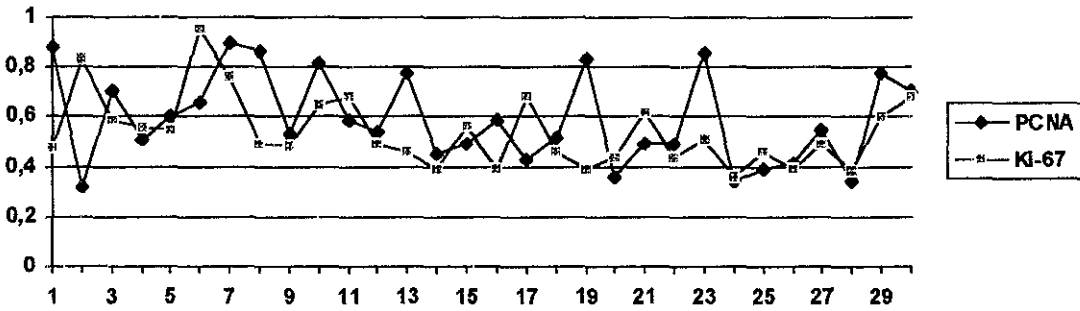
Grafik 2: Normal mukoza, adenom ve adenokarsinom gruplarında P-gp boyanma dağılımı

4.5. Kolorektal adenomlarda ve adenokarsinomlarda Ki-67 ile PCNA boyanma indekslerinin uyumlarının araştırılması:

Kolorektal adenokarsinomlarda her iki antikorla tüm olgularda boyanma izlenirken, adenomlarda PCNA ile tüm olgularda, Ki67 ile 20 olguda boyanma elde edilmiştir (Tablo 3, Tablo 4). Kolorektal adenomlarda her iki belirleyici ile boyanabilen 20 olguda iki yöntemin uyumluluğu araştırıldığında Ki-67 ile PCNA boyanma indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunurken ($p<0.044$), adenokarsinomlarda Ki-67 ile PCNA boyanma indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$) (Grafik 3, Grafik 4).



Grafik 3: Kolorektal adenom grubunda PCNA ve Ki-67 indekslerinin dağılımı



Grafik 4: Kolorektal adenokarsinom grubunda PCNA ve Ki-67 indekslerinin dağılımı

4.6. Ki-67 antikoru ile boyanma sonuçlarını etkileyebilecek faktörlerin araştırılması:

Kolorektal adenomların 19'unda ve adenokarsinomların tümünde 20 dakika antijen geri kazanım işlemi ile boyanma elde edilirken, boyanma sağlanamayan adenomların 1 tanesinde antijen geri kazanım işlemi 30 dakikaya uzatıldığında boyanma sağlandı. Adenomlarda fiksasyon süresi (24 saatten az-24 saatten çok), adenom çapı (1 cm'den küçük-1 cm'den büyük) ve materyalin elde edilmiş şeklinin (ameliyat-biyopsi) Ki-67 antikoru ile boyanmayı etkileyip etkilemediğini görmek amacıyla yapılan istatistiksel analizde ilişki olmadığı görüldü ($p>0.05$), (Tablo 12).

Tablo 12: Kolorektal adenom olgularında Ki-67 boyanması ile fiksasyon süresi, adenom çapı ve materyalin elde edilmiş şekli arasındaki ilişki.

Kolorektal	adenom	Ki-67 pozitif	Ki-67 negatif
Fiksasyon	24 saatten az	10	4
	24 saatten çok	10	6
Çap	1cm'den küçük	15	6
	1cm'den büyük	5	4
Alınma şekli	Ameliyat	1	2
	Biyopsi	19	8

4.7. Adenokarsinomlarda morfolojik bulgular ile Ki-67 ve PCNA ile belirlenen proliferasyon indekslerinin ilişkisi:

Adenokarsinomlarda hasta yaşı, cinsiyeti, tümör çevresindeki mononükleer yangı hücre infiltrasyonu, perinöral ve venöz invazyon, lenf düğümü metastazı, diferansiyasyon ve evre ile Ki-67 ve PCNA ile belirlenen tümör proliferasyon indeksleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$), (Tablo 4).

4.8. Tümör proliferasyon indeksi ile p53 ve P-gp ifadesi arasındaki ilişki:

PC10 ve monoklonal Ki-67 antikorları ile belirlenen tümör proliferasyon indeksleri ile p53 ve P-gp ifadesi arasındaki ilişkiye ayrı ayrı bakıldığında her iki antikorla belirlenen tümör proliferasyon indekslerinin p53 ve P-gp ifadeleri ile ilişkili olmadığı görüldü ($p>0.05$), (Tablo 4).

4.9. Adenomlarda p53 boyanması ile morfolojik bulgular ve hasta yaşı arasındaki ilişki:

Adenom olgularımızda p53 pozitifliği ile adenom çapı (1cm'den küçük-1cm'den büyük), tipi (tübüler-tübülovillöz, villöz), displazi derecesi (hafif-orta, şiddetli) arasında ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$) Bizim çalışmamızda adenom grubunda yaş ortalamasının 48.9 olup adenokarsinom grubundan 9.8 yıl küçük olması ($p=0.02$) nedeniyle 50 yaş altı ve 50 yaş üstü hastalar karşılaştırıldığında p53 pozitifliğinde fark bulunmamıştır ($p>0.05$), (Tablo 3).

4.10. Kolorektal adenokarsinomlarda p53 ve P-gp ile elde edilen pozitif boyanma şiddeti ile boyanan alan yüzdesi arasındaki ilişki:

Kolorektal adenokarsinomlarda p53 ile 21 olguda çekirdekde, P-gp ile 18 olguda membranda elde edilen pozitif immünohistokimyasal boyanmalar boyanma şiddetine göre hafif;1, orta;2, ağır;3, boyanan alan yüzdesine göre negatif;0, %5'in altında boyanma;1, %5-50 arası boyanma;2 ve % 50'den çok pozitif boyanma;3 olarak değerlendirilerek boyanma şiddeti ile boyanan alan ilişkisine bakıldığında p53 için r değeri 0.98 ($p<0.01$), P-gp için r değeri 0.90 ($p<0.01$) bulunmuş ve her ikisinde de boyanma şiddeti ile boyanan alan yüzdesinin korele olduğu görülmüştür (Tablo 13, Tablo 14).

Tablo 13: P53 ile pozitif çekirdek boyanması izlenen 21 kolorektal adenokarsinom olgusunda ki boyanma şiddeti ve boyanan alan yüzdesi

Boyanan alan yüzdesi

<u>Boyama şiddeti</u>	% 5'in altında	%5-50 arası	%50'den fazla	<u>Toplam</u>
HAFİF	4	1	0	5
ORTA	0	3	2	5
ŞİDDETLİ	0	0	11	11
<u>Toplam</u>	4	4	13	21

Tablo 14: Kolorektal adenokarsinomlarda 18 olguda P-gp ile pozitif membran boyanmalarının boyanma şiddeti ve boyanan alan yüzdesi.

Boyanan alan yüzdesi

<u>Boyama şiddeti</u>	% 5'in altında	%5-50 arası	%50'den fazla	<u>Toplam</u>
HAFİF	5	0	0	5
ORTA	1	6	1	8
ŞİDDETLİ	0	0	5	5
<u>Toplam</u>	6	6	6	18

4.11.P-gp immünohistokimyasal boyanması ile çok ilaca direnci araştırılan hastaların kemoterapiye cevapları:

5-Fluorouracil (5FU) temeline dayanan sistemik kemoterapi uygulanan 15 adenokarsinom olgusunun tedavi yanıtları ve P-gp boyanma sonuçları Tablo

15'de gösterilmiştir. Kolorektal adenokarsinomlarda tedaviye yanıt ile P-gp boyanması arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 15: P-gp immünohistokimyasal boyanması, uygulanan kemoterapi ve elde edilen klinik yanıtlar

OLGU NO	P-gp	TEDAVİ	KLİNİK YANIT
1	(-)	5-FU, LV	Remisyon
2	(-)	5-FU, LV	Remisyon
3	(-)	5-FU, LV	Remisyon
4	(-)	5-FU, LV	Remisyon
5*	(-)	5-FU, LV, E, A, M	Yanıt yok
6	(-)	5-FU, LV	Yanıt yok
7	(-)	5-FU, LV	Yanıt yok
8	(+)	5-FU, LV	Remisyon
9	(+)	5-FU, LV	Remisyon
10	(+)	5-FU, LV	Remisyon
11	(+)	5-FU, LV	Remisyon
12	(+)	5-FU, LV, Radyoterapi	Remisyon
13	(+)	5-FU, LV	Kısmi yanıt
14	(+)	5-FU, LV	Yanıt yok
15	(+)	5-FU, LV, Radyoterapi	Yanıt yok

(5-FU: 5-Fluorouracil, LV: Leucovorin, A: Doxorubicine, M: Methotrexate, E: Etoposide)

* Tedavi sonrası alınan lenf düğümünde P-gp pozitif saptanan hastaya Verapamil, Tamoxifen, 5-Fluorouracil, Doxorubicine, Methotrexate tedavisi verildi ve kısmi yanıt alındı.

5. TARTIŞMA

Kolorektal karsinom oluşum mekanizmasını anlamaya yönelik çalışmalar ve dolayısıyla bilgilerdeki yoğun artış hastaların prognozunu olumlu yönde etkileyebilecek fırsatlar sağlama yönünde gelişme göstermektedir. Kalın barsak tümörlerinin %98'ini oluşturan adenokarsinomlar her iki cinste maligniteye bağlı ölümlerde ikinci sırayı alarak önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır (1). Kolorektal adenokarsinom etyopatogenezinde etkili faktörler olarak diyet alışkanlıkları, inflamatuvar barsak hastalıkları ve genetik faktörler üzerinde durulmuştur (3, 8, 66). Kolorektal karsinogenez barsak mukozasında proliferasyon ile başlayıp, adenom gelişimi ile devam eden ve adenokarsinom oluşumu ile sonlanan karmaşık ve çok basamaklı bir süreçtir (12, 13).

Bu çalışmada normal mukoza, adenom ve adenokarsinom gruplarında PCNA, Ki-67 ile belirlenen proliferasyon indeksleri ile p53 ve P-gp ifadesinin kolorektal karsinogenezdeki rolü; proliferatif aktivitenin prognoz üzerine etkisi ve P-gp ifadesi ile kemoterapi cevabı arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Literatürde kolorektal adenom görülme sıklığının 40 yaş altında %20-30 iken, 60 yaş üzerinde %40-50'ye kadar yükseldiği bildirilmektedir. Kolorektal adenomlar kadınlarda ve erkeklerde eşit oranda görülmektedir (42,48,49). Bizim kolorektal adenom olgularımızın yaş ortalaması 48.9 yıl (yaş aralığı 21-78) olup, kadın/erkek oranı 4/5 olarak bulunmuştur. Kolorektal adenom olgularımızın 23'ü (%76) rektum, 7'si (%24) kolon yerleşimli idi. Otopsi çalışmalarında kolorektal adenomların 1/3'ünün rektosigmoid bölge yerleşimli olduğu belirtilmektedir (44, 47). Çalışmamızda adenom olgularının 27'si endoskopik biyopsi ile alındığı için bu oran daha yüksek olarak bulunmuştur. Kolorektal adenomlar çoğunlukla 1 cm'den küçüktürler (46, 51). Bizim olgularımızda da kolorektal adenomlarda en küçük çap 0.30 cm, en büyük çap 5.0 cm, ortalama çap 0.87 cm olarak bulunmuştur.

Kolorektal adenokarsinom genellikle 6. ve 7. dekatta görülür (4-6). Kolorektal adenokarsinom olgularımızda da yaş ortalaması literatürle uyumlu olarak 58.70 yıl (yaş aralığı 37-89) bulunmuştur. Rektum kanserlerinde kadın/erkek oranı

1/2 iken, kalın barsağın diğer bölgelerinde bu oran eşittir (63). Bizim kolorektal adenokarsinom olgularımızda kadın/erkek oranı 3/7 iken, rektum yerleşimli olgularımızda kadın/erkek oranı 2/3, kolon yerleşimli olgularımızda kadın/erkek oranı 1/4 olarak bulundu. Kolorektal adenokarsinomlarda ortalama çap 5.32 cm (en küçük çap 2- en büyük çap 14) olarak bulundu. Kolorektal adenokarsinomların %50'si rektosigmoid bölgede ortaya çıkmaktadır (68). Bizim olgularımızda da tümörlerin 16'sı (%53) rektum, 14'ü (%47) kolon yerleşimli idi.

Kolorektal adenomlardan adenokarsinom gelişimi için geçen süre 5 ile 15 yıl arasında değişmektedir (183, 184). Bizim çalışmamızda da adenom grubunda yaş ortalaması 48.9 olup, adenokarsinom grubundan 9.8 yıl küçüktür ($p=0.02$).

Kolorektal adenokarsinomların büyük çoğunluğunun daha önceden varolan adenomlar üzerinden geliştiğine ait ilk bulgular epidemiyolojik ve morfolojik çalışmalardan elde edilmiştir (11, 64, 65, 83, 84). Adenomlar içinde adenokarsinom odaklarının görülmesi yanısıra adenokarsinomlar etrafında daha önceden varolan adenoma ait artıkların görülmesi önemli bir bulgudur. Geniş serilerde %14 ve %23 olarak bildirilen tümör etrafında adenom artıkları, bizim olgularımızda da %20 oranında bulunmuştur (47, 90).

Spesifik tümör baskılayıcı genlerin kaybı ile birlikte onkogenlerin aktivasyonunu içeren kolorektal karsinogeneizde p53 mutasyonlarının geç adenomdan adenokarsinoma geçiş aşamasında rol oynadığı ileri sürülmüştür (142). Tümörlerin çoğunda nokta mutasyon veya delesyonla p53'ün her iki allelide inaktif haldedir. İnsan kanserlerindeki p53 mutasyonlarının %30'undan missense mutasyonlar sorumludur (15). Yarı ömrü 6-20 dakika olan asıl p53 immünohistokimyasal metodlarla belirlenememektedir (127, 128). Buna karşın mutasyon ya da delesyonla değişikliğe uğrayan p53'ün yarı ömrü 6 saate kadar çıkabilmektedir. Bu nedenle immünohistokimyasal metodlarla belirlenebilen p53'ün varlığı p53'ün mutant olduğunun indirekt bulgusudur (129, 130). Ancak çeşitli yayınlarda meme tümörlerinde %90'nın üzerinde olduğu bildirilen p53 proteinindeki değişikliklere rağmen p53 gen mutasyonları meme tümörlerinde sadece %20 oranında gösterilebilmiştir (15). Kolon karsinomlarında 17p allelik delesyonu ve buna eşlik eden p53 genindeki

mutasyonlar 1989 yılında tanımlanmıştır (15). Cunningham ve arkadaşları 90 kolorektal adenokarsinom olgusunda p53 ifadesini 3 tip p53 monoklonal antikoru (PAb1801, PAb421, PAb240) kullanarak araştırmışlar, kendi serilerindeki kolorektal karsinomların %70'i p53 ile immünhistokimyasal olarak pozitif boyanırken, pozitif boyanma gösteren bu olgularının yalnızca %76'sında kromozom 17p'de kayıp izlemişlerdir. Tümörlerde 17p heterozigositesi kaybı olanların her üç antikorla boyanmasına karşın, 17p heterozigosite kaybı olmayanlar sadece PAb240 ile pozitif boyanmışlardır. Spesifik p53 mutasyonu için araştırılan 15 olgunun 10'unda mutasyon bulunurken, missense mutasyon olan 1 olgu p53 ile immünhistokimyasal olarak pozitif boyanmıştır (176).

Tümör tipleri arasında bildirilen p53 mutasyon oranlarının çeşitliliği büyük oranda tümör örneklemesindeki ve kullanılan yöntemlerdeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (15). Bizim çalışmamızda kullanılan predilue DO-7 monoklonal antikoru asıl ve mutant tip p53'ün amino terminalindeki bir epitopu tanımaktadır. DO-7 monoklonal antikoru parafine gömülü arşiv materyallerinde p53'ün gösterilmesinde antijen geri kazanım işleminden sonra kullanılan bir antikordur (177).

Çeşitli çalışmalarda normal kolon mukozasında p53 ile boyanma izlenmezken, kolorektal adenomlarda immünhistokimya ile gösterilen p53 ifadesi %8.7, %9, %11, %24, %26 olarak bildirilmiştir (178-182). Çalışmamızda DO-7 monoklonal antikoru ile immünhistokimyasal boyama uygulanan gruplardan normal mukozaya ait olanlarda boyanma izlenmezken, adenom olgularımızın 7'sinde (%23.3) p53 pozitifliği izlenmiştir. Adenomlarda malign transformasyon riski adenom çapı, tipi ve displazi derecesi ile ilişkilidir (52). p53 boyanmasının da adenomun tipi ve displazi derecesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (178, 180, 182). Adenokarsinom görülme oranı 1 cm altındaki adenomlarda %1 iken, 1-2 cm arasındaki adenomlarda %10, 2 cm üzerindeki adenomlarda ise % 46'ya ulaşmaktadır (47). Adenom tanısı alan olgularımız 1cm'den küçük ve 1cm'den büyük çaplı olmak üzere iki gruba ayrıldığında, adenom çapı ile p53 pozitifliği arasında ilişki izlenmemiştir. Adenomun taşıdığı villöz komponentin yoğunluğu arttıkça malignite gelişme riski de artmaktadır. Bizim çalışmamızda adenomlar tübüler ve tübülovillöz-villöz olarak iki gruba ayrıldığında p53 pozitifliği ile

adenom tipi arasında ilişki bulunmamıştır. Hafif ve orta-şiddetli displazili adenom olgularımızda da p53 pozitifliğinde fark izlenmemiştir. Kolorektal adenomlardan adenokarsinom gelişimi için geçen süre 5 ile 15 yıl arasında değişmektedir (183, 184). Bizim çalışmamızda adenom grubunda yaş ortalamasının 48.9 olup, adenokarsinom grubundan 9.8 yıl küçük olması ($p=0.02$) nedeniyle 50 yaş altı ve 50 yaş üstü adenom grubu hastalar karşılaştırıldığında p53 pozitifliğinde fark bulunmamıştır. Bu sonuçlar DO-7 monoklonal antikoru ile tespit ettiğimiz pozitif boyanmaların tümünün mutasyonları temsil etmediğini düşündürmekle birlikte, normal mukozada hiç boyanma olmaması ve adenokarsinom olgularımızda izlenen %70 pozitiflik (21 olgu) literatürle uyumlu bulunmuştur (179-181, 185, 186). Ancak bu çalışmada DO-7 monoklonal antikoru ile elde edilen pozitif boyanmaların tümünün mutasyonları temsil edip etmediğini tespit edebilecek moleküler patoloji yöntemleri uygulanamamıştır.

Normal kolon mukozası, adenom ve adenokarsinom gruplarımızın p53 ifadesinin gruplar arasında istatistiksel fark göstermesi ($P<0.01$), (Tablo 3, Tablo 4), p53 mutasyonlarının kolorektal karsinogeneze rol oynadığı ve adenom evresinde ortaya çıktığı görüşünü desteklemiş, ancak p53 ile boyanma oranları ile adenom çapı, tipi ve displazi derecesi arasında ilişki bulunmamıştır.

Rutin patoloji pratiğinde hücre proliferasyonunu belirlemek amacıyla geliştirilen monoklonal antikolarla elde edilen sonuçlar araştırılan tümörün cinsine, kullanılan monoklonal antikora, dilüsyona ve uygulanan yöntemle göre farklılıklar göstermektedir (187-189). Bu nedenle proliferasyon durumu araştırılacak dokuların birden fazla yöntemle değerlendirilmesi önerilmektedir (143). Bizim çalışmamızda; normal mukoza, adenom ve adenokarsinom gruplarında proliferatif aktiviteyi araştırmak amacıyla immünohistokimyasal Ki-67 (monoklonal Ki-67 antikoru) ve PCNA (PC 10) antikoları kullanılmış ve bu iki yöntem arasındaki uyum, avantaj ve dezavantajlar tartışılmıştır.

PC10 monoklonal antikoru ile immünohistokimyasal boyama yöntemi arşiv materyalinde çalışılabilen, kompleks donanım gerektirmeyen bir yöntemdir. Birçok antikor için rutin takip edilen materyallerde mikrodalga fırında antijen

geri kazanım işlemi boyanmayı arttırdığı için, bu çalışmada da uygulanan 10 dakika standart antijen geri kazanım işlemi ile predilue PC10 monoklonal antikor ile tüm olgularda homojen boyanma sağlanmıştır (190).

Monoklonal Ki-67 antikor ile immünohistokimyasal boyama yöntemi de antijenlerin yeniden kazanılma işleminden sonra arşiv materyalinde uygulanabilen bir yöntemdir (191). Çalışmamızda normal kolon mukozası, adenom ve adenokarsinom alanları taşıyan bloklardan yapılan 90 kesite monoklonal Ki-67 antikor ile boyanma uygulanmış, negatif boyanma oranı %11 olarak bulunmuştur. Literatürde %19'a kadar varan negatif boyanma oranı bildirilmiştir (187). Ki-67 antijeninin tesbit sırasında oluşan formol çapraz bağları nedeniyle antikor tarafından tanınmadığı, kaynatma işleminin bu çapraz bağları kırdığı düşünülmektedir (27). Literatürde tesbit süresine bağlı olarak gereken kaynatma süresinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda mikrodalga fırında kaynatma süresi arttığında lam üzerinden doku dökülmesi olmadan, ideal kaynatma süresini 20 dakika olarak bulduk (192). Bu çalışmada başarılı boyanma sağlanan 20 adenom olgusu ile boyanma sağlanamayan 10 adenom olgusu arasında tesbit süresi (24 saatten az ve 24 saatten çok olmak üzere) açısından istatistiksel olarak fark bulunamamıştır. Çalışmaya alınan adenom olgularımızın endoskopik biyopsi ile elde edilenlerinin ameliyat materyalinden elde edilenlere göre daha az hacimde formol içinde tesbit edildiği göz önüne alınarak, bu iki grubun boyanmasını değerlendiren istatistiksel analizde de fark bulunamamıştır. Dokunun formol tesbitinden yararlanmasını etkileyebilecek bir diğer faktör olan adenom çapları (1cm'den küçük ve büyük) açısından da herhangi bir fark görülmemiştir.

PC10 ve monoklonal Ki-67 antikorlarının uygulanması aşamasında, PC10 ile daha kısa sürede, daha kolay ve daha homojen boyanma sağlandığı, monoklonal Ki-67 antikor ile daha detaylı ve titiz çalışma gerektiği ve her laboratuvarın yöntemi kendi materyalinde oturtması için çok sayıda deneme gerektiği görülmüştür.

PC10 ve monoklonal Ki-67 antikorları ile boyanan olgularımızı değerlendirirken boyanan çekirdek pozitif ve boyanmayan çekirdek negatif kabul edilerek, homojen ve yoğun boyanan alanlarda sayılan 200 hücre içindeki pozitif

boyanan çekirdek sayısı kaydedilmiştir. Her iki monoklonal antikorun değerlendirmesinde de olgu başına ortalama 20 dakika gerekmiştir. Böylece her iki antikor objektif verilerle değerlendirilmiştir.

PC10 monoklonal antikorunun boyanma şiddeti antikorun dilusyonu ile yakından ilişkilidir. Tonsil germinal merkez hücrelerinde 1/256 dilusyondan itibaren artan tüm konsantrasyonlarda hücrelerin % 99'unun boyandığı bildirilmektedir (188). Normal kolon mukozasında PC10 antikorunun kullanıldığı çalışmalarda antijen geri kazanım işlemi uygulanmadan 1:200 dilusyonla pozitif hücre yüzdesi 29.1, 1:400 dilusyonla 27.37, 19A2 antikoru ile yapılan bir başka çalışmada 7.64 olarak bulunmuştur (187, 193, 194). Bizim çalışmamızda predilue olarak hazırlanmış ve antijen geri kazanım işlemi uygulanan PC10 antikoru ile kript tabanında boyanan hücrelerde pozitif hücre yüzdesi normal mukozada ortalama % 8 (min 1.1-max 16.5)'dir. Bu çalışmada 19A2 antikoruna yakın olarak elde edilen boyanma yüzdesinin, kullanılan antikorun predilue olmasına bağlı olduğu düşünülmüştür (170, 195).

Bizim olgularımızda; kolorektal adenom ve adenokarsinomlarda PC10 ile pozitif boyanan hücre yüzdesi adenomlarda ortalama %22 (min 6-max 54) ve adenokarsinomlarda ortalama %59 (min 32-max 90) olarak bulunmuştur. PC 10 antikorunun 1/400 dilue edilerek kullanıldığı bir çalışmada ise bu oranlar adenom için ortalama % 38.48, adenokarsinom için ortalama % 68.66 olarak bildirilmektedir (193).

Bizim çalışmamızda monoklonal Ki-67 antikoru ile pozitif boyanma; normal kolon mukozasında ortalama % 5 (min 0.5-max 14.5), kolorektal adenomlarda ortalama %23 (min 8-max 61) ve kolorektal adenokarsinomlarda ortalama %54 (min36-max95.5) olarak bulunmuştur. Frozen kesitlerde Ki-67 monoklonal antikoru kullanılarak yapılan bir çalışmada pozitif hücre yüzdesinin normal kolon mukozasının proliferatif zonunda %32.7 (min 17-max 49), orta derecede displazili tubuler adenomlarda %42.3 (min 25.9-max 62), orta derecede displazili tubulovillöz adenomlarda %48.7 (min 31.7-max 66.5) olduğu bildirilmiştir (196). Yine Ki-67 monoklonal antikoru kullanılarak yapılan bir başka çalışmada normal mukoza ve tranzisyonel mukozada pozitif boyanan hücre yüzdesi %5'in altında bulunmuştur (197). Literatürde

adenokarsinomlarda monoklonal Ki-67 ile boyanma yüzdesi %17.1 (min 0-max 60), %37.6 (min 6.6-max 75.3), % 66.3 (min 20-max 87) gibi farklı değerlerde bildirilmektedir (196-198).

Bizim olgularımızda; her iki yöntemle de boyanabilen 20 adenom ve 30 kolorektal adenokarsinom olgusunun PCNA ve Ki-67 değerleri arasında yapılan karşılaştırmada adenom grubunda uyumluluk tespit edilirken ($r=0.454$, $p<0.05$) adenokarsinom grubunda uyumsuzluk tespit edildi. Daha önce yapılan çalışmalarda reaktif lenfoid hiperplazi ve lenfoma olgularında Ki-67 ve PCNA boyanması arasında lineer ilişki izlenirken, rutin kolorektal biyopsi materyallerinde ilişki olmadığı bildirilmiştir (187).

Çok basamaklı kolorektal karsinogenez teorisinde büyüme kontrolünün progresif kaybı ve hücre proliferasyonun kolon kriptleri boyunca yer değiştirmesi yer almaktadır (199-201). Kolon mukozasında proliferatif zon kriptlerinin tabanına sınırlı iken, yüzeyde diferansiye olan hücreler bulunur. İn vivo çalışmalarda tümör gelişiminin erken dönemlerinde proliferasyon zonunun yüzeye doğru yer değiştirdiği gösterilmiştir (200, 202). Bizim çalışmamızda da PC10 ve monoklonal Ki-67 antikoru ile elde edilen proliferasyon indeksleri normal mukoza, adenom ve adenokarsinom dokuları arasında istatistiksel fark göstermiş ($p<0.01$) ve bu teoriyi desteklemiştir. Çalışmamızda kolorektal karsinogenezde rol oynayan p53 ifadesinin proliferasyon aktivitesinden bağımsız olarak ortaya çıktığı dikkati çekmiştir.

Çalışmamızda PCNA ve Ki-67 indeksinin 1 cm'den büyük adenomlarda daha yüksek olduğu, bu farkın PCNA ile anlamlı ($p<0.05$), Ki-67 ile anlamsız ($p=0.06$) olduğu görülmüştür. Literatürde ise PCNA ve Ki-67 indeksi ile adenom çapı arasında ilişki bulunmamıştır (193, 196). Yang ve arkadaşlarının çalışmasında histolojik tipler ile PCNA indeksi arasında anlamlı ilişki bulunmuş ($p=0.03$) ve tubuler ve villöz adenomlarda, tubulovillöz adenomlara göre daha yüksek PCNA indeksi olduğu bildirilmiştir (193). Bir başka çalışmada tubulovillöz adenomlarda tubüler adenomlara göre daha yüksek Ki-67 indeksi olduğu, ancak farkın anlamlı olmadığı bildirilmektedir (196). Bizim çalışmamızda da Ki-67 indeksini tubulovillöz ve villöz adenomlarda, tubüler adenomlara göre daha yüksek olduğu, ancak istatistiksel fark göstermediği

bulunmuştur. Displazi ve hasta yaşı ile PCNA ve Ki-67 indeksleri arasında da ilişki bulunmamıştır

Kolorektal adenokarsinomlar erkeklerde akciğer, kadınlarda meme karsinomlarından sonra hemen ikinci sırayı alarak maligniteye bağlı morbidite ve mortalitede önemli bir yer tutmaktadır (203, 204). Erken tanı, tarama programları ve cerrahi girişimlerdeki gelişmelere rağmen kolorektal karsinomların prognozunu iyileştirmede ki başarı çok sınırlı olmuştur (205). Çalışmalar daha malign biyolojik davranış gösteren tümörlerin belirlenebilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Kolorektal karsinomların prognozu ile ilişki gösteren en önemli parametre hastalığın evresidir (78, 79, 206, 207). Tüm evreleme sistemlerinin zayıf yönü lenf düğümü tutulumu olmayan ancak kötü prognozu olan ya da lenf düğümü tutulumuna rağmen sağkalım süresi uzun olan hastaları tahmin etmemize imkan vermemesidir. Bu durum özellikle kemoterapi uygulandığında önem kazanmaktadır. Hastanın yaşı, cinsiyeti, tümörün büyüme paterni (infiltratif-sınırlı), damar invazyonu, perinöral invazyon, metastaz olan lenf düğümü sayısı, tümör çevresindeki lenfositik infiltrasyon, tümör çapı, tümör lokalizasyonu ve grade ile prognozun ilişkisini gösteren çok sayıda çalışma yapılmış, ancak bu parametrelerin tümünün klinik evreden bağımsız olmayan prognostik faktörler olduğu görülmüştür (78, 81, 206). Hücre proliferasyonunu belirleyen farklı yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda malign potansiyel ve grade ile ilgili farklı sonuçlar bildirilmiştir. İnvaziv tümör sınırındaki PCNA ifadesinin kolorektal karsinomda karaciğer ve lenf düğümü metastazı ile ilgili olduğunu, PCNA ile belirlenen proliferasyon indeksinin tümör evresine bağlı olmadan rekürrens ve kötü yaşam süresini belirleyebilen bağımsız belirteç olduğunu bildiren çalışmalar vardır (172, 208, 209, 210). Kubota ve arkadaşları 3 yıl veya daha uzun süre izlenmiş kolorektal karsinomlu 100 hastada Ki-67 skorunu 1 ile 90 (ortalama 34.6) arasında değişen değerlerde bulmuşlardır. Duke sınıflamasına A evresinde; B, C ve D evrelerine göre Ki-67 skoru daha yüksek bulunmuş ve hastaların yaşam süresi ile Ki-67 skoru arasında ilişki bulunmamıştır (210). Bir çalışmada 74 kolorektal karsinom olgusunda flow-sitometre ve Ki-67 monoklonal antikoru ile tümör büyüme fraksiyonu değerlendirildiğinde ortalama Ki-67 ve S-faz değerleri sırasıyla %17.1 (%0 - %60) ve %17.5 (%3 - %39) olarak bulunmuştur. Ki-67

indeksi ile hastanın yaşı, lenf düğümü metastazı, tümörün boyutu, yerleşimi, evresi, diferansiyasyon derecesi ve diploidisi arasında ilişki bulunmamıştır (197). Bir başka çalışmada DNA diploid adenokarsinomlarda PCNA ve Ki-67 ile belirlenen tümör proliferasyon indeksleri ile histolojik grade, lenfositik infiltrasyon, tümör çevresindeki fibrozis, anjiolenfatik invazyon, invazyon derinliği, lenf düğümü metastazı ve uzak metastaz arasında ilişki bulunmamıştır (175).

Proliferatif aktivitenin kolorektal adenokarsinomlarda prognozu belirlemedeki rolünü saptamak amacıyla evre, hastanın yaşı, cinsiyeti, tümörün büyüme paterni (infiltratif-sınırlı), venöz invazyon, perinöral invazyon, lenf düğümü metastazı, tümör çevresindeki lenfositik infiltrasyon ve grade ile PCNA ve Ki-67 indekslerinin karşılaştırıldığı çalışmamızda, çevresinde mononükleer hücre cevabı olan, lenf düğümü metastazı olan, infiltratif büyüme paterni gösteren tümörlerde; erkeklerde ve 50 yaş üzeri hastalarda Ki-67 ve PCNA indekslerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca Fischer'in modifiye Duke sınıflamasına göre evresi C1, C2 ve D olan tümörlerin, evresi A ve B olan tümörlere göre daha yüksek proliferasyon indeksi gösterdikleri de dikkati çekmiştir. Bununla birlikte; bu klinik ve histopatolojik parametrelerin proliferasyon indeksinin derecesi ile istatistiksel olarak ilişkili olmadıkları görülmüştür (Tablo 4).

Kolorektal karsinomu olan hastalarda izlenen prognoz ve klinik cevaptaki heterojenite nedeniyle PCNA ya da Ki-67 gibi biyolojik kriterlerin hastaların prognostik gruplanmasına eklenmesinin yararlı olabileceği düşünülse de bu çalışmada elde edilen sonuçların prognozu belirlemede rolü olduğu bilinen parametrelerle (hasta yaşı, cinsiyeti, tümörün büyüme paterni, venöz invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, tümör çevresindeki lenfositik infiltrasyon ve grade) uyumlu olmaması ve literatürde de farklı sonuçlar bildirilmesi nedeni ile daha geniş serilerde ve uzun süreli takibi olan hastalarda yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür (172, 175, 208, 209).

Bizim çalışmamız ve literatürde bildirilen bazı diğer çalışmalarda olduğu gibi Ki-67 ve PCNA ile belirlenen büyüme fraksiyonunun prognostik diğer parametrelerle doğrudan ilişkisi olmasa bile Ki-67 ve PCNA ile belirlenen

büyüme fraksiyonlarının tedaviyi yönlendirme potansiyelleri gözden kaçırılmamalıdır. Kolorektal adenokarsinom tedavisinde önemli bir sorun adjuvant kemoterapi protokolleri için uygun hastaları belirlemektir. Bugün için hastalar klinikopatolojik kriterler ile seçilmektedir. Kemoterapi esas olarak bölünen hücreleri etkilediği için yüksek proliferasyon oranına sahip olan tümörlerde kemoterapiye cevabın daha iyi olduğu bildirilmiştir (211, 212). Seymour ve arkadaşları meme karsinomlarında P-gp ile immün boyanmanın klinik kullanılabilirliğini araştırmışlar ve ilerlemiş meme karsinomlu 101 hastada yüksek P-gp ifadesi ile yüksek Ki-67 ifadesi arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. P-gp ifadesinin hücre döngüsüne bağımlı olabileceğini ve aşırı ifadenin hızlı hücre döngüsü ile ilgili olabileceğini düşünmüşlerdir. Buna karşın P-gp pozitif boyanması ile kemoterapi başarısızlığı veya yaşam süresi arasında ilişki bulamamışlardır (213). Çalışmamızda ise kolorektal adenokarsinom olgularımızda PCNA ve Ki-67 ile saptanan proliferasyon indeksi ile P-gp ifadesi arasında istatistiksel ilişki bulunamamış, ancak P-gp ile pozitif boyanan olgularda daha yüksek PCNA ve Ki-67 indeksleri olduğu görülmüştür.

P-gp, *mdr1* geninin ürünü olup bazı normal dokularda ve tümörlerde bulunur (173). Bizim çalışmamızda da P-gp (JSB-1 monoklonal antikor) ile 30 normal kolon mukozasının 6'sında, özellikle goblet hücrelerinin ve mukus sekresyonunun yoğun olduğu alanlarda pozitif boyanma izlenmiştir.

P-gp ifadesi ile kemoterapiye cevap ve prognoz arasındaki en güçlü ilişki çocukluk çağı tümörlerinden rabdomyosarkom, nöroblastom, osteosarkom ve Ewing sarkomunda izlenmiştir (214, 215). Over karsinomları ve küçük hücreli akciğer karsinomlarında da P-gp ifadesinin kombine kemoterapiye klinik direnci belirlemede yararlı olduğu bildirilmiştir (216).

Kolorektal adenokarsinomlarda kemoterapi tedavisinde ilk basamak olarak kullanılan 5-Fluorouracil'in (5-FU) hedef enzime (thymidilate sentetaz) afinitesinde azalma, etkisini sınırlayan önemli bir faktördür. Tedaviye leucovorin eklenmesinin hücre içi folat düzeyini yükselterek, hedef enzime afiniteyi artırdığı deneysel ve klinik çalışmalarla gösterilmiştir (217, 218).

Yüksek riskli kolorektal karsinom olgularında tek başına radyoterapinin yaşam süresini uzatmadığı, ancak lokal rekürrens oranını düşürdüğü bilinmektedir (219). Postoperatif radyoterapi ile kombine edilen 5-FU temeline dayanan sistemik kemoterapi ile rekürrenslerin %34 ve kansere bağlı ölümlerinde %36 oranında azaldığı bildirilmiştir (220).

Tümör hücrelerinde; çok ilaca direnç bir veya daha fazla kemoteropötik ajanla karşılaşıldıktan sonra veya birçok tümörde olduğu gibi kemoterapiden önce primerde olabilir. Primer kolon karsinomlarında tedaviden önce *mdr1* ifadesi yüksek oranlardadır. Pirker ve arkadaşları 113 primer kolorektal karsinomlu hastada prospektif olarak *mdr1* ve *mdr2* gen ifadesini *mdr1* RNA ve *mdr2* RNA varlığı ile değerlendirmişler, olguların %65'inde *mdr1* RNA pozitifliği saptanırken, *mdr2* RNA pozitifliği ise hiçbir olguda saptanmamıştır. Evre 2 ve 3 olan ve operasyon sonrası intravenöz 5-FU ve leucovorin tedavisi alan 30 hasta ile kemoterapi almayan hastalar karşılaştırıldığında her iki grupta yaşam süresinin tümörün *mdr1* RNA ifadesi ile ilişkisi olmadığı görülmüştür (221). Bir başka çalışmada kolorektal karsinomlu 95 hastanın 65'inde immünohistokimyasal boyama yöntemi ile P-gp pozitif boyanma oranı %68 olarak bulunmuştur (222). Bizim çalışmamızda 30 kolorektal adenom olgusunda P-gp ile boyanma görülmezken, adenokarsinom olgularının 18'inde, (%60) pozitif boyanma izlenmiştir. Adenokarsinomlarda literatürde bildirilen oran ile uyumlu pozitif boyanma olmasına rağmen, literatürde adenomlarda P-gp boyanma özellikleri ile ilgili çalışmaya rastlanılmamış ve adenomlarda pozitif boyanma olmamasının primer çok ilaca direncin kolorektal tümörögenezisin geç dönemlerinde ilaç direnci gösteren hücre popülasyonlarının ortaya çıkması ile ilgili olabileceği düşünülmüştür.

Mutant p53'ün spesifik olarak *mdr1* promoter'ini aktive ederken, asıl p53'ün baskıladığı görülmüş, *mdr* promoter'i ile p53'ün birlikte NIH3T3 hücre dizisine kotransfeksiyonu ile yapılan deneysel çalışmalarda mutant p53'ün *mdr1* ifadesinde rolü olabileceği ileri sürülmüştür (223). P-gp ile pozitif boyanan 18 kolorektal adenokarsinom olgumuzun 13'ünde p53 ile pozitif boyanma izlenirken, 5'inde negatif boyanma izlenmiş ($p>0.05$) ve kolorektal adenokarsinomlarda daha önce çalışılan myelodisplastik sendromlardaki gibi

mutant ve asıl p53'ün P-gp düzenlenmesinde belirleyici olmadığı düşünülmüştür (224).

Kolorektal adenokarsinom olgularımızda p53 ve P-gp için boyanan alan yüzdesi ve boyanma şiddetinin korelasyonuna kendi içlerinde ayrı ayrı bakıldığında boyanan alan yüzdesi ile boyanma şiddeti arasında güçlü bir korelasyon olduğu (p53 $r=0.98$, P-gp $r=0.90$), bu tür çalışmalarda her iki verinin de sonuçları değerlendirmek için kullanılabileceği görülmüştür.

in vitro çalışmalarda mdr hücre dizilerinin 5-Fluorouracil de dahil olmak üzere bir çok ilaca normalde duyarlı olduğu gösterilmiştir (225). Bizim çalışmamızda da JSB1 monoklonal antikoru ile immunhistokimyasal boyama uygulanan 30 kolorektal adenokarsinom olgumuzdan 5-Fluorouracil temeline dayanan sistemik kemoterapi alan ve klinik izlemi olan 15 olguda boyanmanın pozitif veya negatif olmasının tedaviye yanıt oranını anlamlı olarak değiştirmedeği görülmüştür.

Bu çalışmada barsak mukozasında proliferasyon ile başlayan, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile devam eden kolorektal karsinogenez için model olarak seçtiğimiz normal mukozada, adenom ve adenokarsinom gruplarında p53 ifadesi ile PCNA ve Ki-67 ile saptanan lokus proliferasyon indekslerinin normal mukozadan adenoma ve adenokarsinoma doğru progresif artış gösterdiği; normal mukozada varolan ve adenom evresinde kaybolan P-gp ifadesinin adenokarsinomlarda yeniden ortaya çıkabildiği görülmüştür. Kolorektal adenokarsinomların prognoz ve tedavisinde rol oynayabileceği ileri sürülen tümör proliferasyon indeksi ile prognozu belirlemede rolü olduğu bilinen parametreler (hasta yaşı, cinsiyeti, tümörün büyüme paterni, venöz invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazi, tümör çevresindeki lenfositik infiltrasyon ve grade) arasında ilişki kurulamaması nedeniyle uzun süreli takibi olan hastalardan oluşan daha geniş serilerde yeni prognostik ve tedaviyi yönlendirici parametrelerle yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

6. SONUÇLAR

1. Oluşturulan çalışma gruplarında adenom grubunda yaş ortalaması 48.9, adenokarsinom grubunda ise 58.7 olup, bu fark anlamlı bulunmuştur.
2. NO-7 monoklonal antikoru ile normal mukozaya ait preparatlarda boyanma olmazken, kolorektal adenomların 7 tanesinde ve adenokarsinomların 21'inde pozitif boyanma saptanmış ve p53 mutasyonunun adenomdan adenokarsinoma geçiş aşamasında rol oynadığı görüşü desteklenmiştir. Ancak p53 boyanması ile adenom çapı, tipi ve displazi derecesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı için tüm pozitif boyanmaların mutasyonları temsil etmediği düşünülmüştür.
3. Kullanılan iki proliferasyon belirleyicisi arasında boyanma yöntemlerinin oturtulması konusunda PC10 monoklonal antikoru ile immünohistokimyasal boyama yönteminin daha basit ve hızlı olduğu; monoklonal Ki-67 antikoru ile immünohistokimyasal boyama yönteminin ise antijenin yeniden kazanılması esnasında dikkat, titizlik ve uzun zaman gerektiren, her laboratuvar ve her doku için standardize edilmesi için birçok ön denemeye ihtiyaç duyulan daha kompleks bir yöntem olduğu görülmüştür. Antijenlerin yeniden kazanılması yönteminde kaynatma süresinin doku tespit süresi, doku çapı ve tesbit solüsyonunun hacminden başka faktörlerden de etkilenebileceği ve bu konunun araştırılması gerektiği düşünülmüştür.
4. Proliferasyon belirleyicisi olan PC10 ve monoklonal Ki-67 antikoru ile boyanma sonuçlarının adenomlarda uyumlu iken, adenokarsinomlarda uyumsuz olduğu görülmüş, ancak nedeni konusunda bir yorum yapılamamıştır.
5. Normal kolon mukozasında PC10 monoklonal antikoru ile bulunan pozitif hücre yüzdesinin literatürde bildirilen oranlardan düşük olması, kullanılan antikorun predilüe olmasına bağlanmıştır.
6. PC10 ve monoklonal Ki-67 antikoru ile belirlenen proliferatif aktivite normal mukozadan adenoma ve adenokarsinoma doğru progresif artış göstermiş ve

kolorektal karsinogenezde büyüme kontrolünün progresif kaybı olduğu görüşünü desteklemiş, p53 ve P-gp ifadesi ile ise ilişkisi bulunmamıştır.

7. Kolorektal adenomlarda adenom tipi ve displazi derecesi ile PC10 ve monoklonal Ki-67 antikoruna ile belirlenen proliferatif aktivitenin istatistiksel olarak ilişkili olmadığı ancak 1 cm üzerindeki adenomlarda PC10 ile belirlenen proliferasyon indeksinin istatistiksel olarak fark yaratacak kadar yüksek olduğu görülmüştür.

8. Kolorektal adenokarsinomlarda proliferasyon indeksi ile klinik ve patolojik prognostik parametreler arasında ilişki bulunmamış ve daha geniş serilerde, uzun süreli takibi olan hastalarda yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

9. P-gp pozitif ve negatif olan olgularda p53 boyanması arasında fark bulunmamış ve kolorektal adenokarsinomlarda mutant veya asıl p53'ün P-gp düzenlenmesinde belirleyici rol oynamadıkları sonucuna varılmıştır.

10. Kolorektal adenokarsinom olgularımızda p53 ve P-gp için boyanan alan yüzdesi ve boyanma şiddetinin korelasyonuna kendi içlerinde ayrı ayrı bakıldığında boyanan alan yüzdesi ile boyanma şiddeti arasında güçlü bir korelasyon olduğu (p53 $r=0.98$, P-gp $r=0.90$), bu tür çalışmalarda sonuçları değerlendirmek için her iki yöntemin de kullanılabileceği görülmüştür.

11. Kolorektal adenokarsinom olgularımızda literatürle uyumlu olarak primer ÇİD oranı %60 olarak bulunmuş ve P-gp ifadesinin 5-FU temeline dayanan sistemik kemoterapi alan hastalarda tedaviye yanıtı etkilemediği görülmüştür.

12. Normal mukozada var olan P-gp ifadesinin adenomlarda kaybolurken, adenokarsinomlarda yeniden ortaya çıkması tümör hücrelerinin klonal diferansiyasyon ile varlıklarını sürdürebilmek için gerekli yetenekler kazandığı görüşünü desteklemiştir.

13. Kolorektal karsinogenezde; p53 ifadesi ile PCNA ve Ki-67 ile saptanan doku proliferasyon indekslerinin normal mukozadan adenoma ve adenokarsinoma doğru progresif artış gösterdiği; P-gp ifadesinin ise karsinogenezin geç dönemlerinde ortaya çıktığı görülmüştür. Tümör proliferasyon indeksi ile prognozu belirlemede rolü olduğu bilinen parametreler

(hasta yaşı, cinsiyeti, tümörün büyüme paterni, venöz invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, tümör çevresindeki lenfositik infiltrasyon ve grade) arasında ilişki bulunmaması nedeni ile uzun süreli takibi olan hastalardan oluşan daha geniş serilerde yeni prognostik ve tedaviyi yönlendirici parametrelerle yapılacak çalışmalara gerek olduğu sonucuna varılmıştır

7. ÖZET

Bu çalışmada p53 ve P-gp ifadeleri ile proliferatif aktivitenin kolorektal karsinogenezdeki rolleri; tümör proliferasyon aktivitesinin prognozu belirlemede rolü olduğu bilinen parametreler (hasta yaşı, cinsiyeti, tümörün büyüme paterni, venöz invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, tümör çevresindeki lenfositik infiltrasyon ve grade) ile ilişkisi ve P-gp ifadesinin kemoterapiye yanıt üzerine etkisi araştırılarak kolorektal karsinogenezin çok yönlü değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden 30 adenom ve 30 adenokarsinom olgusu seçilmiş ve adenokarsinom ameliyat materyallerine ait 30 normal mukoza alanı alınarak çalışma grubu oluşturulmuştur.

Proliferatif aktiviteyi belirlemek için PC10 (PCNA) ve monoklonal Ki-67 antikoru (Ki-67) ile immünohistokimyasal boyama yöntemleri kullanılmıştır. İmmünohistokimyasal boyama işlemi açısından iki proliferasyon belirleyiciden PC10 daha basit ve hızlı, monoklonal Ki-67 antikoru ise daha fazla dikkat, titizlik, uzun çalışma süresi gerektiren ve standardizasyon için birçok ön denemeye ihtiyaç gösteren bir yöntem olduğu bulunmuştur.

Proliferasyon indeksleri (PC10 ve monoklonal Ki-67 antikoru ile belirlenen) ve p53 (NO-7) pozitifliğinin normal mukozadan adenom ve adenokarsinoma geçişte progresif artış gösterdiği ve gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu görülmüştür. Proliferatif aktivite ile p53 pozitifliği arasında ilişki bulunmaması nedeniyle kolorektal karsinogenezde birbirlerinden bağımsız olarak rol oynadıkları düşünülmüştür.

Adenom olgularında saptanan p53 (NO-7 monoklonal antikoru) ile pozitif boyanma adenom çapı, tipi ve displazi derecesi ile ilişkili bulunmamış ve NO-7 monoklonal antikoru ile immünohistokimyasal boyanmanın tüm mutasyonları temsil etmeyebileceği düşünülmüştür.

Kolorektal adenokarsinomlarda primer çok ilaca direnç P-gp (JSB) ile %60 olarak bulunmuş ancak P-gp ifadesi ile kemoterapiye cevap arasında ilişki bulunamamış, in vitro çalışmalarda gösterildiği gibi 5-FU'nin ÇİD'den etkilenmediği saptanmıştır. Proliferatif aktivite ile prognozda rolü olduğu bilinen klinik ve histopatolojik parametreler arasında ilişki izlenmediği için kolorektal adenokarsinomlu hastaların prognozlarının belirlenmesi ve tedavilerinin yönlendirilmesi konusunda daha geniş serilerde başka prognostik parametrelerle yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu ortaya çıkmıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer Statistics, 1993. *Cancer J Clin* 43: 7-26; 1993.
2. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins Pathologic Basis of Disease, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1994:782-822.
3. Damjanov I, Linder J. Anderson's Pathology, Mosby-year book, Inc. St. Louis, 1996: Chap 56.
4. Nugent FW, Haggitt RC, Gilpin PA. Cancer surveillance in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 100:1241-6; 1991.
5. Lashner BA. Colon cancer surveillance in chronic ulcerative colitis. Historical cohort study. *Am J Gastroenterol* 85:1083-9; 1990.
6. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 329:1982-6; 1993.
9. Hill MJ, Morson BC, Bussey HJR. Etiology of adenoma-carcinoma sequence in large bowel *Lancet* 4:245-7; 1978.
10. Wada R, Matsukuma S, Abe H, Kuwabara N, Suda K, Arakawa A, Kitamura S. Histopathological studies of superficial-type early colorectal carcinoma. *Cancer* 77:44-50; 1996.
11. Morson BC. Evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 34:845-9; 1974.
12. Spandidos DA, Liloglou T, Field JK. Prognostic significance of oncogenes and tumor supressor genes in human malignancy. *Stem Cells* 11:194-8; 1993.
13. Yamaguchi A, Makimoto K, Goi T. Overexpression of p53 protein and proliferative activity in adenoma. *Oncology* 51(3):224-7; 1994.

14. Fearon ER. Genetic alterations underlying colorectal tumorigenesis. *Cancer Surv* 12:119-23; 1992.
15. Chang F, Syrjanen S, Tervahauta A, Syrjanen K. Tumorigenesis associated with the p53 tumor supressor gene. *Br J Cancer* 68:653-61; 1993.
16. Soussi T, Caron C, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5:945-52; 1990.
17. Lane P. p53 guardian of the genome. *Nature* 358:15-6; 1992.
18. McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci USA* 83:130-4; 1986.
19. Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prockocimer M, Rotter V, Koeffler PH. Human p53 localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 319:783-4; 1986.
20. Miller C, Koeffler HP. p53 mutations in human cancer. *Leukemia (suppl. 7)*:518-21; 1993.
21. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM. Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244:217-21; 1989.
22. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 70:523-6; 1992.
23. Lane DP. p53 guardian of the genome. *Nature* 39:486-7; 1992.
24. Mayer A, Takimoto M, Schellander G, Koeffler K, Ludwig H. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor and mdr gene expression. *Cancer* 71:2454-60; 1993.
25. Merkel DE, McGuire WL. Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer* 65:1194-1205; 1990.
26. Meyer JS. Cell kinetics in selection and stratification of patients for adjuvant therapy of breast carcinoma. *NCI Monogr* 1:25-8; 1986.
27. Rose DSC, Maddox PH, Brown DC. Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparision of five antibodies. *J Clin Pathol* 47:1010-4; 1994.

28. Risio M, Coverlizza S, Ferrari A, Candelaresi GL, Rossini FP. Immunohistochemical study of epithelial cell proliferation in hyperplastic polyps, adenomas and adenocarcinomas of the large bowel. *Gastroenterology* 94: 899-906; 1988.
29. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133: 1710-15; 1984.
30. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibodies to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121:2228-34; 1978.
31. Bravo R, Frank R, McDonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxillary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* 326:515-20; 1987.
32. Chang CD, Ottavio L, Travalli S, Lipson KE, Baserg R. Transcription and posttranscriptional regulation of the proliferating cell nuclear antigen gene. *Mol Cell Biol* 10:3289-96; 1990.
33. Ottavio L, Chang CD, Rizzo MG, Travalli S, Casadevall C, Baserga R. Importance of introns in the growth regulation of mRNA levels of the proliferating cell nuclear antigen gene. *Mol Cell Biol* 10:303-9; 1990.
34. Nielsen D, Skovsgaard T. P-glycoprotein as multidrug transporter: a critical review of current multidrug resistant cell lines. *Bioch Biophy Acta* 1139: 169-183; 1992.
35. Weinstein RS, Jakate SM, Dominguez JM, Lebovitz MD, Koukoulis GK, Kuszak JR, Klusens LF, Grogan TM, Saclarides TJ, Roninson IB. Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. *Cancer Res* 51: 2720-2726; 1991.
36. Juranka PF, Zastawny RL, Ling V. P-glycoprotein: multidrug resistance and a superfamily of membrane-associated transport protein. *FASEB J* 3:2583-2592; 1989.
37. Roninson IB. The role of MDR-1 (P-glycoprotein) gene in multiple drug resistance in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 43: 95-102; 1992.

38. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ. Structural model of ATP-binding protein associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346: 362-365; 1990
39. Sharma RC, Inoue S, Roitelman J, Schimke RT, Simoni RD. Peptide transport by multidrug resistance pump. *J Biol Chem* 267: 5731-5734; 1992.
40. Pilarski LM, Belch AR. Circulating monoclonal B cells expressing P-glycoprotein may be a reservoir of multidrug-resistant disease in multiple myeloma. *Blood* 83(3): 724-736; 1994
41. Rickert RR, Auerbach O, Garfinkel L, Hammond EC, Frasca JM. Adenomatous lesions of the large bowel: an autopsy study. *Cancer* 43:1847-51; 1979.
42. Grangvist S: Distribution of polyps of the large bowel in relation to age. *Scand J Gastroenterol* 16:1025-9; 1981
43. Hoff G, Foerster A, Vatn MH, Sauar J, Larsen S. Epidemiology of polyps in the rectum and colon: recovery and evaluation of unresected polyps two years after detection. *Scand J Gastroenterol* 21:852-8; 1986.
44. Eide TJ, Schweder T. Clustering of adenomas in large intestine. *Gut* 25:1261-8; 1984.
45. Morson BC, Sobin LH. Histological typing of intestinal tumours. International histological classification of tumors No:15. World Health Organization, Geneva, 1976.
46. Thompson JT, Enterline HT. The macroscopic appearance of colorectal polyps. *Cancer* 48:151-6; 1974.
47. Muto T, Bussey HJR, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36:2251-70; 1975
48. Haggitt RC. Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for lesions removed by endoscopic polypectomy. *Gastroenterology* 89: 328-31; 1985.

9. Arminski TC, McLean DW. Incidence and distribution of adenomatous polyps of the colon and rectum based on 1000 autopsy examinations. *Dis Colon Rectum* 7:249-61; 1964.
10. Konishi F, Morson BC. Pathology of the colorectal adenomas. A colonoscopic survey. *J Clin Pathol* 35:830-41; 1982.
11. Williams AR, Balasooriya BAW, Day DW. Polyps and cancers of the large bowel. A necropsy study in Liverpool. *Gut* 23:835-42; 1982.
12. O'Brien MJ, Winaver SJ, Zauber AG, Gottlieb LS, Stenberg SS, Diaz B, Dickersin GR, Ewing S, Geller S, Kasimian D, Komorowski R, Szporn A. The National Polyp Study: Patient and Polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 98:371-9; 1990.
13. Wolber RA, Owen DA. Flat adenomas of the colon. *Hum Pathol* 22:70-4; 1991.
14. Muto T, Kamiya J, Sawada T, Konishi F, Sugihara K, Kubota Y. Small "flat adenoma" of the large bowel with special reference to its clinicopathological features. *Dis Colon Rectum* 28:847-51; 1985.
15. Yao T, Tada S, Tsuneyoshi M. Colorectal counterpart of gastric depressed adenoma. A comparison with flat and polypoid adenomas with special reference to the development of pericryptal fibroblasts. *Am J Surg Pathol* 8:559-68; 1994.
16. Lanspa SJ, Rouse J, Smyrk T, Watson P, Jenkins JX, Lynch HT. Epidemiologic characteristics of the flat adenoma of Muto. A prospective study. *Dis Colon Rectum* 35:543-6; 1992.
17. Kubota O, Kino I. Minute adenomas of the depressed type in familial adenomatous polyposis of the colon. *Cancer* 72:1159-62; 1993.
18. Owen DA. Flat adenoma, flat carcinoma, and de novo carcinoma of the colon. *Cancer* 77:3-6; 1996.
19. Haggitt RC, Reid BJ. Hereditary gastrointestinal polyposis syndromes. *Am J Surg Pathol* 10:871-87; 1986.

60. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJR, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P, Sheer D, Soloman E, Spurr NK. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328:614-6; 1987.
61. Lynch HT, Smyrk TJ, Watson P, Lanspa SJ, Lynch PM, Jenkins JX, Rouse J, Cavalieri J, Howard L, Lynch J. Hereditary flat adenoma syndrome. A variant of familial adenomatous polyposis? *Dis Colon Rectum* 35:411-21; 1992.
62. Konishi F, Morson BC. Pathology of colorectal adenomas: a colonoscopic survey. *J Clin Pathol* 35:830-41; 1982.
63. Cooper HS, Slemmer JR. Surgical pathology of carcinoma of colon and rectum. *Semin Oncol* 18:367-76; 1991.
64. Levin B. Nutrition and colorectal cancer. *Cancer* 70:1723-6; 1992.
65. Potter JD, McMichael AJ. Diet and cancer of the colon and rectum: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 76:557-67; 1986.
66. Wargovich MT, Eng VW, Newnork HL. Calcium inhibits the damaging and compensatory proliferative effects of fatty acids on mouse colon epithelium. *Cancer Lett* 23:253-8; 1984.
67. VanHeerden JA, Beart RW. Carcinoma of the colon and rectum complicating chronic ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum* 23:155-9; 1980.
68. Sternberg SS. *Diagnostic Surgical Pathology*, Raven Press Ltd, New York, 1994: Chap 34.
69. Iishi H, Tatsuta M, Tsutsui S, Imanishi K, Otani T, Okuda S, Ishiguro S, Taniguchi H. Early depressed adenocarcinoma of the large intestine. *Cancer* 69:2406-10; 1992.
70. Symonds DA, Vickery AL. Mucinous carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 37:1891-1900; 1976.
71. Weidner N, Zekan P. Carcinosarcoma of the colon. Report of a unique case with light and immunohistochemical studies. *Cancer* 58:1126-30; 1986.
72. Sasaki O, Atkin WS, Jass JR. Mucinous carcinoma of the rectum. *Histopathology* 11:259-72; 1987.

73. Fischer ER, Sass R, Palekar A, Fisher B, Wolmark N. Dukes' classification revisited: Findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (Protocol R-01). *Cancer* 64:2354-60; 1989.
74. Inada K, Shimokawa K, Ikeda T, Hayashi M, Azuma S. Development of liver metastasis in colorectal carcinoma. With special reference to venous invasion and basement membrane laminin. *Acta Pathol Jpn* 41:2240-45; 1991.
75. Goldstein J, Mazor M, Leiberman JR. Primary carcinoma of the cecum with uterine metastases. *Hum Pathol* 12:1139-40; 1981.
76. Moore JB, Law DK, Moore EE, Dean CM. Testicular mass. An initial sign of colon carcinoma. *Cancer* 49:411-2; 1982.
77. Rusthoven JJ, Fine S, Thomas G. Adenocarcinoma of the rectum metastatic to the oral cavity. Two cases and a review of the literature. *Cancer* 54:1110-2; 1984.
78. Leon MP, Sant M, Micheli A, Sacchetti C, Di Gregorio C, Fante R, Zanghieri G, Melotti G, Gatta G. Clinical and pathologic prognostic indicators in colorectal cancer. *Cancer* 69(3):626-35; 1992.
79. Chapuis PH, Dent OF, Fisher R, Newland RC, Phelis MT, Smyth E, Colquhoun H. A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *Br J Surg* 72:698-702; 1985.
80. Griffin MP, Bergstrahl EJ, Coffey RJ, Beart RW, Melton LJ. Predictors of survival after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 60:2318-24; 1987.
81. Russell AH, Tong D, Dawson LE, Wisbeck W, Tong DY, Dawson LE. Adenocarcinoma of the proximal colon. Sites of initial dissemination and patterns of recurrence following surgery alone. *Cancer* 53:360-7; 1984.
82. Krasna MJ, Flancbaum L, Cody RP, Shneibaum S, Ari GB. Vascular and neural invasion in colorectal carcinoma: Incidence and prognostic significance. *Cancer* 61:1018-23; 1988.
83. Winawer SJ, Zanber AG, Ho MH. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. *N Engl J Med* 329:1977-81; 1993.

84. Bat L, Pines A, Ron E, Rosenblum Y, Niv Y, Shemesh E. Colorectal adenomatous polyps and carcinoma in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews in Israel. *Cancer* 58:1167-71; 1986.
85. Clark JC, Collan Y, Eide TJ, Esteve J, Ewen S, Gibbs NM, Jensen OM, Koskela E, MacLennan R, Simpson JG, Stalsberg H, Zaridze DG. Prevalence of polyps in an autopsy series from areas with varying incidence of large-bowel cancer. *Int J Cancer* 36:179-86; 1985.
86. Correa P, Strong JP, Reif A, Johnson WD. The epidemiology of colorectal polyps. Prevalence in New Orleans and international comparisons. *Cancer* 39:2258-64; 1977.
87. Eide TJ. Prevalence and morphological features of adenomas of the large intestine in individuals with and without colorectal carcinoma. *Histopathology* 10:111-8; 1986.
88. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Eng J Med* 326:658-62; 1992.
89. Winaver SJ, Zauber AG, Stewart E, O'Brien MJ. The natural history of colorectal cancer: Opportunities for intervention. *Cancer* 67:1143-9; 1991.
90. Eide TJ. Remnants of adenomas in colorectal carcinomas. *Cancer* 51:1866-72; 1983.
91. Kobayashi M, Watanabe H, Ajioka Y, Honma T, Asakura H. Effect of K-ras mutation on morphogenesis of colorectal adenomas and early cancers: relationship to distribution of proliferating cells. *Hum Pathol* 27:1042-9; 1996.
92. Barrett GB, Dibold J, Christoforis G, Vogt M, Muller C, Dobfer K, Schneiderbanger K, Schmidt M, Löhns U. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. *Cancer* 77:255-64; 1996.
93. Bosari S, Moneghini L, Graziani D, Lee AKC, Murray JJ, Coggi G, Viale G. bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas. *Hum Pathol* 26:534-9; 1995.

94. Hamilton SR. The molecular genetics of colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 105:3-7; 1993.
95. Bookstein R, Allred C. Recessive oncogenes. *Cancer* (suppl) 71:1179-86; 1993.
96. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Perisenger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Eng J Med* 319:525-32; 1988.
97. Spandidos DA, Kerr IB. Elevated expression of human ras oncogene family in premalignant and malignant tumors of the colorectum. *Br J Cancer* 49:681-8; 1984.
98. Bronner MP, Culin C, Reed JC, Furth EE. The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am J Pathol* 146:20-6; 1995.
99. Bishop JM. The molecular genetics of cancers. *Science* 235:305-11; 1987.
100. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49:4682-9; 1989.
101. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-67; 1990.
102. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64:281-302; 1991.
103. Burner GC, Levine DS, Kulander BG, Haggitt RC, Rubin CE. C-Ki-ras mutations in chronic ulcerative colitis and sporadic colon carcinoma. *Gastroenterology* 99: 416-20; 1990.
104. Claubert P, Benhattar J, Saraga C. K-ras mutations and p53 alterations in neoplastic and nonneoplastic lesions associated with longstanding ulcerative colitis. *Am J Pathol* 144: 767-75; 1994.
105. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: Clustering around JH on chromosome 14 and near a transcription unit on 18. *Cell* 41:889-906; 1985.

106. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocation involved in B-cell neoplasms results from mistakes in VDJ joining. *Science* 229:1390-3; 1985.
107. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6961-5; 1991.
108. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359:235-7; 1992.
109. Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Wahl GM. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* 70: 937-48; 1992.
110. Eguchi S, Kohara N, Komuta K, Kanematsu T. Mutations of the p53 gene in the stool of patients with resectable colorectal cancer. *Cancer (Suppl.)* 77: 1707-10; 1996.
111. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Exp Cell Res* 55:5187-90; 1995.
112. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351:453-6; 1991.
113. Jenkins JR, Rudge K, Currie GA. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 312:651-4; 1984.
114. Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V. Cooperation between gene encoding p53 tumor antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312:649-51; 1984.
115. Rovinski B, Benchimol S. Immortalization of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogene. *Oncogene* 2:445-52; 1988.
116. Lane DP, Benchimol S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Gene develop* 4:1-8; 1990.

117. Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinashi-Kimhi O, Oren M. Wild -type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8763-67; 1989.
118. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a supressor of transformation. *Cell* 57:1083-93; 1989.
119. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JKV, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249:912-5; 1990.
120. Guillouf C, Grana Xavier, Selvakumaran M, De Luca A, Giordana A, Hoffman B, Lieberman DA. Dissection of the genetic programs of p53-mediated G1 growth arrest and apoptosis: Blocking p53-induced apoptosis unmasks G1 arrest. *Blood* 85:2691-8; 1995.
121. Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka MA, Litwak G, Gebhardt M, Bressac B, Oztürk M, Baker SJ, Vogelstein B, Friend SH. p53 function as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol Cell Biol* 10:5772-81; 1990.
122. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin 6. *Nature* 352:345-57; 1991.
123. Kern SE, Kinzler K, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. Identification of p53 as a sequence specific DNA binding protein. *Science* 252:1708-11; 1991.
124. Kern SE, Pietenpol JA, Thigalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 256:827-30; 1992.
125. Farmer G, Bargonetti J, Zhu H, Friedman P, Prywes R, Prives C. Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature* 358:83-6; 1992.
126. Fridman P, Kern S, Vogelstein B, Prives C. Wild-type, but not mutant human p53 proteins inhibit the replication activities of simian virus 40 large tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9275-9; 1990.

127. Ulrich SJ, Anderson CW, Mercer WE. The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation. *J Biol Chem* 267: 15259-62; 1992.
128. Davidoff AM, Herndon JE, Glover NS, Kerns BJ, Pence JC, Iglehart JD, Marks JR. Relation between p53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. *Surgery* 110: 259-64; 1991.
129. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B. p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53; 1991.
130. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 suppressor gene. *Nature* 351: 453-6; 1991.
131. Lu X, Park SH, Thompson TC, Lane DP. ras-induced hyperplasia occurs with mutation of p53, but activated ras and myc together can induce carcinoma without p53 mutation. *Cell* 70:153-61; 1993.
132. Hall PA, McKee PH, Menage HP, Dover R, Lane DP. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* 8:203-7; 1993.
133. Wynford-Thomas D. p53 in tumor pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 166:329-30; 1992.
134. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53; 1991.
135. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250:1233-8; 1990.
136. Lavigne A, Maltby V, Mock D, Rossant J, Pawson T, Bernstein A. High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol Cell Biol* 9:3282-91; 1989.
137. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351:453-6; 1991.

138. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358:80-3; 1992.
139. Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW. A cancer family syndrome in twenty four kindreds. *Cancer Res* 48:5358-62; 1988.
140. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 356:215-21; 1992.
141. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69:1237-45; 1992.
142. Ohue M, Tomita N, Monden T, Fujita M, Fukunaga M, Takami K, Yana I, Ohnishi T, Enomoto T, Inoue M, Shimano T, Mori T. A frequent alteration of p53 gene in adenoma of colon. *Cancer Res* 54:4798-804; 1994.
143. Crocker J. Molecular and immunological aspects of cell proliferation. Crocker J ed. *Molecular Biology in Histopathology*. John Wiley and Sons Ltd., 1994; 93-120.
144. Ranchod M, Kempson RL. Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract and retroperitoneum. *Cancer* 39:255-62; 1977.
145. Norris HJ, Taylor HB. Relationship of histologic features to behaviour of cytosarcoma philloides analysis of ninety-four cases. *Cancer* 20:2090-9; 1967.
146. Goellner JR. Carcinoma of cervix. Clinicopathologic correlation of 196 cases. *Am J Clin Pathol* 66:775-85; 1976.
147. Ellison DJ, Nathwani BN, Metter GE. Mitotic counts in follicular lymphomas. *Hum Pathol* 18:502-5; 1987.
148. Donhuijsen K. Mitosis counts: reproducibility and significance in grading of malignancy. *Hum Pathol* 17:1122-5; 1986.
149. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67:its use in histopathology. *Histopathology* 17:489-503; 1990.

150. Malaise EP, Chavaudra N, Tubiana M. The relationship between growth rate, labeling index and histological type of human solid tumours. *Eur J Cancer* 9:305-12; 1973.
151. Dean PN, Dolbeare F, Gratzner H, Rice GC, Gray JW. Cell-cycle analysis using a monoclonal antibody to BrdUrd. *Cell Tissue Kinet* 17:427-36; 1984.
152. Quirke P, Dyson JED. Flow cytometry: methodology and applications in pathology. *J Pathol* 149: 79-87; 1986.
153. Mason DY, Gatter GC. The role of immunocytochemistry in diagnostic pathology. *J Clin Pathol* 40: 1042-54; 1987.
154. Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 133:579-84; 1987.
155. Verheijen R, Kuijpers HJH, van Driel R, Beck JL, VanDierendock JH, Brakenhoff GJ. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Science* 92:531-40; 1989.
156. Wersto RP, Herz F, Gallagher RE, Koss LG. Cell cycle-dependent reactivity with the monoclonal antibody Ki-67 during myeloid cell differentiation. *Experimental Cell Res* 179:79-88; 1988.
157. Baisch H, Gerdes J. Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation-associated antibody Ki-67 and propidium iodide: analysis by flow cytometry. *Cell Tissue Kinet* 20:387-91; 1987.
158. Braun N, Papadopoulos T, Muller-Hermelink HK. Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virchows Archiv. (Cell Pathol)* 56:25-33; 1988.
159. Guillaud P, Manoir S, Seigneurin D. Quantification and topographical description of Ki-67 antibody labelling during the cell cycle of normal fibroblastic (MRC-5) and mammary tumour cell lines (MCF-7). *Anal Cell Pathol* 1:25-39; 1989.

160. Hall PA, Richards MA, Gergory WM, d'Adenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG. The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* 154:223-35; 1988.
161. Nakano T, Kuniyuki O. Differential values of Ki-67 index and mitotic index of proliferating cell population. *Cancer* 72:2401-8; 1993.
162. Wintzer H-O, Zipfel I, Schulte-Mönting J, Hellerich U, Kleist S. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 67:421-28; 1991.
163. Raymond WA, Leong AS-Y, Bolt JW, Milios J, Jose JS. Growth fractions in human prostatic carcinoma determined by Ki-67 immunostaining. *J Pathol* 156:161-7; 1988.
164. Ueda T, Aozasa K, Tsujimoto M. Prognostic significance of Ki-67 reactivity in soft tissue sarcomas. *Cancer* 63:1607-11; 1989.
165. Yamada Y, Murata K, Kamihira S, Atogami S, Tsukasaki K, Sohda H. Prognostic significance of the proportion of Ki-67 positive cells in adult T-cell leukemia. *Cancer* 67:2605-9; 1990.
166. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohns R, Dover R, Waseem NH, Laen DP. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162:285-94; 1990.
167. Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Garrels JI. Identify of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 303:374-6; 1984.
168. Bravo R, MacDonald -Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 105:1549-54; 1987.
169. Hall PA, Woods AL. Immunohistological markers of cell proliferation: Achivements, problems and prospects. *Cell Tiss Kinetics* 23:2228-34; 1990.

170. Bravo R, Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of Cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: associated with DNA replication sites. *J Cell Biol* 105:1549-54; 1987.
171. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferating with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 165:173-8; 1991.
172. Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and *mdr* gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 71(8):2454-60; 1993.
173. Kaye SB. P-glycoprotein and drug resistance - time for reappraisal. *Br J Cancer* 67: 641-3; 1993.
174. Drenou B, Fardel O, Amiot L, Fauchet R. Detection of P glycoprotein activity on normal and leukemic CD34+ cells. *Leukemia Res* 17(12): 1031-5; 1993.
175. Linden MD, Ma CK, Kubus J, Brown RD, Zarbo RJ. Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen tumor proliferative indices in DNA diploid colorectal adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 100:206-12; 1993.
176. Cunningham J, Lust JA, Schaid DJ, Bren GD, Carpenter HA, Rizza E, Kovach JS, Thibodeau SN. Expression of p53 and 17p allelic loss in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 52:1974-80; 1992.
177. Terada T, Shimizu K, Izumi R, Nakanuma Y. Methods in pathology. p53 expression in formalin-fixed, paraffin-embedded archival specimens of intrahepatic colangiocarcinoma: retrieval of p53 antigenicity by microwave oven heating of tissue sections. *Mod Pathol* 7:249-52; 1994.
178. Colin AP, Grady JD, Piris J, Wyllie AH, Bird CC. p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 138: 807-13; 1991.
179. Kawasaki Y, Monden T, Morimoto H, Muratoni M, Miyoshi Y, Kobayashi T, Shimano T, Mori T. Immunohistochemical study of p53 expression in

microwave-fixed, paraffin-embedded sections of colorectal carcinoma and adenoma. *Anat Pathol* 97: 244-9; 1991.

180. Campo E, Calle-Martin O, Miquel R, Palacin A, Romero M, Fabregat V, Vives J, Cardesa A, Yague J. Loss of heterozygosity of p53 gene and p53 protein expression in human colorectal carcinomas. *Cancer Res* 51:4436-42; 1991.

181. Darmon E, Cleary K, Wargovich MJ. Immunohistochemical analysis of p53 overexpression in human colonic tumors. *Cancer Detect Prevent* 18:187-95; 1994.

182. Kaklamanis L, Gatter KC, Mortensen N, Baigrie RJ, Heryet A, Lane DP, Harris AL. p53 expression in colorectal adenomas. *Am J Pathol* 142:87-93; 1993.

183. Morson BC. Precancerous conditions of the large bowel. *Proc R Soc Med* 64:7-10; 1971.

184. Scarborough RA. The relationship between polyps and carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 3:336-40; 1960.

185. Hanski C, Bornhoeft G, Shimoda T, Hanski ML, Lane DP, Stein H, Riecken EO. Expression of p53 protein in invasive colorectal carcinomas of different histologic types. *Cancer* 70:2772-7; 1992.

186. Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, Kanno M, Yonemura Y, Miwa K, Miyazaki I. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. *Cancer* 70:2778-84; 1992.

187. Diebold J, Dopfer K, Lai M, Löhrs U. Comparison of different monoclonal antibodies for the immunohistochemical assessment of cell proliferation in routine colorectal biopsy specimens. *Scand J Gastroenterol* 29:47-53; 1994.

188. McCormick D, Yu C, Hobbs C, Hall PA. The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology* 22:543-7; 1993.

189. Van Dierendonck JH, Wijsman JH, Keijzer R, Van de Velde CJH, Cornelisse CJ. Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell

nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison with BrdUrd labeling and Ki-67 staining. *Am J Pathol* 138:1165-72; 1991.

190. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MHG, Poggi S, Bifulco C. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 171:83-98; 1993.

191. Porschan R, Lohe B, Hengels KJ, Borchard F. Assessment of cell proliferation in colorectal carcinomas using the monoclonal antibody Ki-67. Correlation with pathophysiologic criteria and influence of irradiation. *Cancer* 64:2501-5; 1989.

192. Munakata S, Hendricks JB. Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 41:1241-6; 1993.

193. Yang HB, Hsu PI, Chan SH, Lee JC, Shin JS, Chow NH. Growth kinetics of colorectal adenoma-carcinoma sequence: An immunohistochemical study of proliferating cell nuclear antigen expression. *Hum Pathol* 27:1071-6; 1996.

194. Weisberger UM, Boeing H, Nemitz R, Raedsch R, Waldherr R. Proliferating cell nuclear antigen (clone 19A2) correlation with bromo-2-deoxyuridine labelling index in human colonic epithelium. *Gut* 34:1587-92; 1993.

195. D'Errico A, Garbisa S, Liotta LA, Castronovo V, Stetler-Stevenson WG, Grigioni WF. Augmentation of Type IV collagenase, laminin receptor, and Ki-67 proliferation antigen associated with human colon, gastric, and breast carcinoma progression. *Modern Pathol* 4:239-46; 1991.

196. Johnston PG, O'Brien MJ, Dervan PA, Carney DN. Immunohistochemical analysis of cell kinetic parameters in colonic adenocarcinomas, adenomas and normal mucosa. *Hum Pathol* 20:696-700; 1989.

197. Sahin AA, Ro JY, Brown RW, Ordonez NG, Cleary KR, El-Naggar AK, Wilson P, Ayala AG. Assessment of Ki-67-derived tumor proliferative activity in colorectal carcinomas. *Modern Pathol*, 7: 17-22; 1994

198. Porschen R, Kriegel A, Langen C, Classen S, Hilse M, Lohe B, Hengels K-J, Borchard F. Assessment of proliferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining. *Int J Cancer* 47:686-91; 1991.
199. Lipkin M. Phase 1 and 2 proliferating lesions of colonic epithelial cells in disease leading to colonic cancer. *Cancer* 34:878-88; 1974.
200. Deschner EE, Lipkin M. Proliferating patterns in colonic mucosa in familial polyposis. *Cancer* 35:413-8; 1975.
201. Welberg JWM, de Vries EGE, Hardonk MJ. Proliferation rate of colonic mucosa in normal subjects and patients with colonic neoplasm: A refined immunohistochemical method. *J Clin Pathol* 43:453-6; 1990.
202. Lightdale C, Lipkin M, Deschner E. In vivo measurements in familial polyposis: Kinetics and location of proliferating cells in colonic adenomas. *Cancer Res* 42:4280-3; 1982.
203. Devesa SS, Silverman DT, Young JL. Cancer incidence and mortality trends among whites in the United States 1947-84. *J Natl Cancer Inst* 79:701-70; 1987.
204. Bailar JC, Smith EM. Progress against cancer? *N Engl J Med* 314:1226-32; 1986.
205. Enblad P, Adami HO, Bergström R. Improved survival of patients with cancers of the colon and rectum. *J Natl Cancer Inst* 80:586-91; 1988.
206. Wiggers T, Arends JW, Schutte B, Volovics L, Bosman FT. A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. *Cancer* 61:386-95; 1988.
207. Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, Stablein DM. Prognostic indicators of colon tumors. *Cancer* 57:1866-70; 1986.
208. Nakano T, Kuniyuki O. Differential values of Ki-67 index and mitotic index of proliferating cell population: an assessment of cell cycle and prognosis in radiation therapy for cervical cancer. *Cancer* 72: 2401-8; 1993.

209. Al-Schneber IF, Shibata HR, Sampalis J, Jothy S. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer. *Cancer* 71:1954-9; 1993.
210. Kubota Y, Petras RE, Easley KA, Bauer TW, Tubbs RT, Fazio VW. Ki-67-determined growth fraction versus standard staging and grading parameters in colorectal carcinoma. *Cancer* 70:2602-9; 1992.
211. Shepherd NA, Richman PI, England J. Ki-67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J Pathol* 155:213-9; 1988.
212. Hall PA, Richards MA, Gregory WM, d'Ardenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG. The prognostic value of Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin lymphoma. *J Pathol* 154:223-36; 1988.
213. Seymour L, Bezwoda WR, Dansey RD. P-glycoprotein immunostaining correlates with ER and with high Ki67 expression but fails to predict anthracycline resistance in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 36: 61-9; 1995.
214. Chan HSL, Thorner PS, Haddad G, Ling V. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: Prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol* 8:689-701; 1990.
215. Chan HSL, Haddad G, Thorner PS, DeBorger G, Lin YP, Ondrusek N, Yeger H, Ling V. P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N Engl J Med* 325:1608-14; 1991.
216. Holzmayer TA, Hilsenbeck S, Von-Hoff DD, Roninson IB. Clinical correlates of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in ovarian and small-cell lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 84:1486-91; 1992.
217. Keyomarsi K, Moran RG. Folinic acid augmentation of the effects of fluoropyrimidines murine and human leukaemic cells. *Cancer Res* 46:5229-35; 1986.
218. Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, Wieand HS, Leigh JE, Rubin J, McCormack GW, Gerstner JB, Krook JE, Malhart J, Twito DI, Morton RF,

Tschetter LK, Barlow JF. Surgical adjuvant therapy of large bowel carcinoma: An evaluation of levamisole and combination of levamisole and 5-Fluorouracil: a study of the North Central Cancer Treatment Group and Mayo Clinic. *J Clin Oncol* 7:1447-56; 1989.

219. Balslev I, Pedersen M, Teglbaerg PS. Postoperative radiotherapy in Dukes' B and C carcinoma of the rectum and rectosigmoid: A randomized multicenter study. *Cancer* 58:22-8; 1986.

220. Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, Beart RW, Kubista TP, Poon MA, Meyers WC, Mailliard JA, Twito DI, Morton RF, Veeder MH, Witzig TE, Cha S, Vidyarthi SC. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med* 324:709-15; 1991.

221. Pirker R, Wallner J, Gsur A, Götzl M, Zöchbauer S, Scheitauer W, Depisch D. MDR1 gene expression in primary colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 68:691-2; 1993.

222. Weinstein RS, Jakate SM, Dominguez JM, Lebovitz MD, Koukoulis GK, Kuszak JR, Klusens LP, Grogan TM, Saclarides TJ, Roninson IB, Coon JS. Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. *Cancer Res* 51:2720-6; 1991.

223. Chin KV, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM. Modulation of activity of the promoter of the human *mdr1* gene by *ras* and *p53*. *Science* 255:459-62; 1992.

224. Preudhomme C, Lepelley P, Vachee A, Soenen V, Qusnel B, Cosson A, Fenaux P. Relationship between *p53* gene and multidrug resistance (*mdr1*) gene expression in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 7:1888-90; 1993.

225. Morow CS, Cowan KH. Mechanisms and clinical significance of multidrug resistance. *Oncology* 2:55-67; 1988.

100