

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**KOLOREKTAL KARSİNOMALARDA EGFR
EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK ÖNEMİ.**

Aysuhan TURGUT
Tbp. Yzb.

PATOLOJİ ANABİLİM DALI
Tıpta Uzmanlık Tezi

ANKARA
2007

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**KOLOREKTAL KARSİNOMALARDA EGFR
EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK ÖNEMİ.**

Aysuhan TURGUT
Tbp. Yzb.

PATOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Ömer GÜNHAN
Prof.Tbp. Alb.

ANKARA
2007

GATA Askeri Tıp Fakóltesi Dekanlığına:

“Kolarektal karsinomalarda EGFR Ekspresyonunun Prognostik Önemi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Patoloji Anabilim Dalı’ nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı	:	Prof. Tbp. Kd. Alb. Ömer GÜNHAN
Asıl Üye	:	Prof. Tbp. Kd. Alb. Murat DEMİRİZ
Asıl Üye	:	Prof. Tbp. Kd. Alb. Hüseyin BALOĞLU
Asıl Üye	:	Prof. Tbp. Kd. Alb. Orhan KOZAK
Asıl Üye	:	Prof. Tbp. Kd. Alb. Ahmet ÖZET
Yedek Üye	:	Prof. Tbp. Kd. Alb. Fikret ARPACI
Yedek Üye	:	Doç. Tbp. Kd. Alb. Mükerrrem SAFALI

Tbp. Yzb. Aysuhan TURGUT’ un 11 Ocak 2008 tarihinde savunduğı bu tez Akademi Kurulu’ nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

M.Zeki BAYRAKTAR
Prof.Tbp.Tümgeneral
Askeri Tıp Fakóltesi Dekanı

TEŞEKKÜR

İhtisas sürem boyunca eğitimimde ve tezimi hazırlamamda emeğini ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Ömer Günhan' a, başta Patoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Murat Demiriz olmak üzere Doç. Dr. Mükerrerem Safalı, Doç. Dr. Salih Deveci, Doç. Dr. Ayhan Özcan, Doç. Dr. Önder Öngürü, Yrd. Doç. Dr. Yıldırım Karslıoğlu, Yrd. Doç. Dr. Bülent Kurt, Uzm. Dr. Güzin Deveci, Uzm. Dr. Ayper Kaya, Uzm. Dr. Armağan Günal ile asistan arkadaşlarım Dr. A. Fuat Çiçek, Dr. Ertuğrul Çelik, Dr. A. Tolga Şentürk ile İmren Öztürk başta olmak üzere Patoloji A.D. personeline ve ayrıca tez çalışması esnasında büyük desteğini gördüğüm Doç. Dr. Emin Öztaş' a da teşekkür ederim.

Tez çalışmasının istatistiksel analizinin yapılmasında yardımını esirgemeyen GATA Halk Sağlığı A.D. öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Cengiz Han Açıkel' e teşekkür ederim.

Ayrıca sevgisinden güç aldığım biricik oğlum Murathan' a da teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Kolorektal karsinomlar, sık görülen malignitelerdir ve en önemli ölüm sebeplerinden biridir. Günümüzde kolorektal tümör karsinogenezisi ve buna bağlı olarak hedefe yönelik tedaviler gündemde olan konulardır.

Kolorektal karsinomların nüks risklerinin tespiti ve adjuvant tedavilerin uygulanması, hastaların sağ kalım oranlarını artırır.

Karsinogenezde yer alan spesifik değişiklikler, hedefe yönelik tedavilere öncülük edebilir. Önemli biyomoleküler belirteçleri tespit etmeye yönelik çok sayıda prognostik çalışma mevcuttur. Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ailesi proteinleri bu hedef moleküllerindendir ve neoplastik epitelyal hücre büyümesi ve anjiyogenez üzerinde etkileri vardır.

Bu çalışmada, histopatolojik ve klinik prognostik kriterlerin birbirleriyle olan ilişkisi EGFR ekspresyonu ile karşılaştırılmıştır. Kolorektal karsinomlu 55 olguya ait parafin bloklar GATA Patoloji A.D. arşivinden çıkarılarak kesitler alınmıştır. Preparatlar EGFR proteini ile immünohistokimyasal olarak boyanmıştır. Boyanmanın dansitesi değerlendirilmiştir. Değişik histolojik tip ve derecedeki kolorektal karsinoma örnekleri; negatif (-), hafif (+), orta (++) , belirgin (+++) pozitif olarak derecelenen bir skala ile, boyanmanın dansite ve sıklığı göz önüne alınarak incelenmiştir.

Sonuçlarımız; EGFR boyanmasının patern, dansite ve dağılım açısından istatistiki olarak anlamlı olmadığını göstermiştir. Ancak pozitif boyanma daha çok gland oluşturan tümörlerde görülmüştür.

EGFR ekspresyonu için yapılacak çalışmalar ve yakın takip, kolorektal karsinogenez hakkında daha detaylı bilgi verebilir. Aşırı ekspresyonlar; klinik pratikte nonspesifik antineoplastik ajanların kullanımından, spesifik hedefe yönelik tedavilere geçişe öncülük edebilir.

Anahtar kelimeler: Epidermal büyüme faktörü, Epidermal büyüme faktör reseptörü, Kolorektal karsinoma.

SUMMARY

Colorectal carcinomas are common malignancies and are one of the most important cause of death. Today, colorectal tumor carcinogenesis and related targeted therapies are hot medical topics.

Detection of recurrence risks of colorectal carcinomas and application of adjuvant therapies increase the survival rate of the patients. There are several prognostic studies for detection of important bio-molecular markers. Specific targets involved in carcinogenesis may lead to the targeted therapies. Epithelial growth factor and epithelial growth factor receptor family proteins are such targets and have profound effects on neoplastic epithelial cell growth and angiogenesis.

In this study, the relationship of histopathologic and clinical prognostic criterias are compared with epithelial growth factor receptor expressions. Paraffin blocks of fifty-five cases of colorectal carcinomas were retrieved from the files of GMMA, Department of Pathology. Slides were immunohistochemically stained with anti-epithelial growth factor receptor protein and density of stainings were evaluated. Different histopathologic types and different grades of colorectal carcinomas were evaluated concerning density and frequency of staining with a proper scale of nil (-), mild positive (+), moderately (++) and highly positive (+++).

Our results showed that, epithelial growth factor receptor staining patterns, densities and distributions are not statistically significant, though positivity usually seen in gland forming tumors.

Epithelial growth factor receptor expression studies on further cases and close follow up may give more detailed information about colorectal carcinogenesis. Over expressions may lead to a shift in clinical practice from nonspecific use of antineoplastic agents to the use of specific targeted therapies.

Key words: Epithelial growth factor, Epithelial growth factor receptor, Colorectal carcinomas

.İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar	vi
ŞEKİLLER	vii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
KALIN BAĞIRSAĞIN ANATOMİSİ:	3
HİSTOLOJİSİ	6
KOLOREKTAL KANSERLERİN İNSİDANSI, ETYOLOJİSİ VE KARSİNOGENEZİ	9
HİSTOPATOLOJİSİ	14
PROGNOSTİK FAKTÖRLER	15
EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ ve REPTÖRLERİ	24
GEREÇ VE YÖNTEM	29
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM	30
WESTERN İMMUNOBLOTLAMA METODU	31
İSTATİSTİKSEL İNCELEME	32
BULGULAR	32
TARTIŞMA	46
SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	56

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Kolorektal karsinomalar için WHO sınıflaması	17
Tablo 2. 1932 Dukes evrelemesi	19
Tablo 3. 1936 Dukes evrelemesi	19
Tablo 4. Astler-Coller evrelemesi	20
Tablo 5. TNM sınıflaması.	22
Tablo 6. Tümörün evresi ile hayatta kalım oranları arasındaki ilişki.	22
Tablo 7. Olgulara ait klinik ve histolojik parametreler.	35
Tablo 8. Tümör derecelerine göre EGFR ekspresyonunun yaygınlık yüzdesi ve yoğunluk değerlerinin dağılımı.	40
Tablo 9. Tümör derecelerine göre EGFR ekspresyonunun yaygınlık-yoğunluk skorları.	41
Tablo 10. EGFR ekspresyonunun yaygınlık yüzdesi ile yaygınlık-yoğunluk skorunun klinik ve patolojik parametrelere göre dağılımları.	41

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Cinsiyetlere göre kolorektal adenokarsinoma dağılım grafiği.	36
Şekil 2. Yaşa göre kolorektal adenokarsinoma dağılım grafiği.	36
Şekil 3. Histolojik diferansiyasyona göre kolorektal adenokarsinoma dağılım grafiği.	37
Şekil 4. Lokal invazyonlara göre kolorektal adenokarsinoma dağılım grafiği.	37
Şekil 5. Tümör evresine göre kolorektal adenokarsinoma dağılım grafiği.	38
Şekil 6. Lenf nodu, vasküler ve perinöral tutulumuna göre kolorektal adenokarsinoma dağılım grafiği.	38
Şekil 7. Olguların EGFR ekspresyonu dağılım grafiği.	39
Şekil 8. EGFR'nin Western immünoablottama metodu ile gösterilmesi.	39
Şekil 9. Kolorektal adenokarsinomların "histolojik grade" lerine göre morfolojik görünüşleri.	42
Şekil 10. EGFR ekspresyonunun yoğunluğuna göre mikroskopik görünüşleri.	44
Şekil 11. Kontrol EGFR boyanma için kullanılan normal kolon mukozası ve plasenta.	45

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tümör oluşumu pek çok evreden oluşan karmaşık bir süreçtir. Bu süreç içinde çok sayıda genetik değişiklik oluşmaktadır. Fizyolojik büyüme kontrolü bu genetik değişiklikler sonucunda bozulmaktadır. Tümör oluşumunu sergileyen en mükemmel modellerden biri de kolorektal karsinom gelişimidir.

Şimdiye kadar elde edilen klinik ve histopatolojik bulgular, çoğu kolorektal karsinomlarının öncü benign lezyon olan adenomdan geliştiğini göstermektedir. Bu gelişim sırasında onkogen ve tümör supresör genlerin tanısallık ve prognostik önem taşıyan faktörler olduğu gösterilmiştir.

Kolorektal karsinomlar; özellikle gelişmiş, endüstriyel ülkelerde sık olup, tüm kanserlerin % 9'unu oluşturmaktadır. Ortalama görülme yaşı 50-75'dir. Sıklık olarak erkeklerde prostat ve akciğer karsinomlarından sonra üçüncü sıklıkta kadınlarda ise meme karsinomundan sonra ikinci sıklıkta görülmektedir. Mortalite oranı kadın ve erkekte benzerdir. Distal ve proksimal bölge karsinomlarının görülme sıklığı erkeklerde daha fazladır.

Dünyada her yıl 900 binin üzerinde kolorektal karsinoma tanısı konmaktadır. Bunların %70'ine küratif rezeksiyon uygulanmakta, %45'inde tam kür sağlanmakta ve %25'i ilk iki yılda nüks etmektedir (27).

Böylesine sık görülen ve ölüm nedeni olan bir tümör grubu olarak kolorektal karsinomlar, malign tümörler içinde, üzerinde en çok çalışılanlardan biri olmuştur. Bu tümörlerin prognozunu belirlemeye yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Kolorektal karsinomlar için prognostik önemi olan bir çok faktör tanımlanmıştır. Klinik olarak; yaşı, cinsiyeti, semptomları önemli iken patolojik olarak ise; tümörün evresi, derecesi, lenf nodu metastazı, DNA ploidi, prognostik faktörler olarak sayılabilir. Kolorektal karsinomlarda en önemli prognostik faktör metastatik lenf nodu varlığıdır. Lenf nodu metastazı olmadığında uzak organ metastazının gelişme riski %23 oranındadır (27). Araştırmacılar, bu orana rağmen rutin adjuvant kemoterapi kullanımını destekleyen kanıtlar olmadığını düşünmektedirler.

Hastalık rekürrens riskinin erken tahmin edilmesi ve tedaviye adjuvant terapinin eklenmesi; hastaların yaşam sürelerine katkı sağlayabilir. Bu amaçla evreleme sistemine ilave olarak prognoz göstergesi olacak yeni biyolojik ve genetik belirteçlere ihtiyaç vardır (27).

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), normal ve malign epitelyal hücrelerin büyümesi, diferansiyasyonu, apoptozisin inhibisyonu, anjiyogenez, tümör hücre motilitesi ve metastaz üzerine etkisi vardır. EGFR (cerbB-1), siklin D-1'i de indüklemektedir. Siklin D-1 ise hücre siklus progresyonunda önemlidir. Kolorektal karsinomda EGFR ekspresyonu hem "tümörün evresi hem de tümörün derecesi" ile koreledir. Yoğun EGFR ekspresyonu ortalama 5 yıllık sağkalımda kötüleşmeyle birlikte (54). Fazladan EGFR'ye sahip olmanın, kolon kanseri hücrelerinde çoğalmada artış ve kolon kanserli hastada daha kısa yaşam beklentisi ile bağlantılı bulunduğu bilinmektedir.

Bu araştırmada; retrospektif olarak, değişik histolojik tip ve evredeki kolorektal adenokarsinomlarında bilinen klasik klinik ve histopatolojik parametreler ile EGFR ekspresyonu ilişkisi üzerinde çalışılması planlanmıştır.

Çalışma sonucunda EGFR ekspresyonunun kolon karsinomlarında tümör gelişimi üzerindeki etkileri ve prognostik bir kriter olarak kullanılabilmesi konusunda veri elde edilebilecektir. Bu sonuçlar ise EGFR blokajı ile yapılacak kanser tedavilerinin planlanmasını sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KALIN BAĞIRSAĞIN ANATOMİSİ:

Kolon, ilioçekal valvden başlayıp anüse kadar uzanan yaklaşık 1.5 m uzunluğunda içi boş muskuler bir organdır. İnce bağırsaktan farklı olarak longitudinal kas liflerinden oluşan tenyalara, yağ dokusundan oluşan periton ile örtülü appendiks epiploikalara ve sirküler kas liflerinin oluşturduğu haustralara sahiptir. Anatomik olarak çekum (appendiks ile ilişkili), çıkan, transvers, inen ve sigmoid kolon ile rektumdan oluşur.

1. Çekum: Kolonun en geniş kısmıdır (yaklaşık 7.5-8.5 cm. çapındadır). %95'i intraperitonealdır. Mezenteri olmayan geniş bir poştur. Bu nedenle çekum tümörleri septomatik olduklarında bulgu verir. İleumun açıldığı yerde bir valv (Bauchini valvi) bulunur. Bu valv ince bağırsağın kısmen kolonun içine girmesi ile oluşur ve içeriğin kolona hızlı bir şekilde geçmesini sağlarken, kolon içeriğinin ince bağırsağa dönmesini engeller.

2. Çıkan kolon: Çekumdan hepatik fleksuraya kadar uzanır. Yaklaşık 20 cm uzunluğundadır. Sadece ön yüzü periton ile örtülüdür. Arkada musculus quadratus lumborum ve sağ böbrek alt kısmı ile komşudur.

3. Transvers kolon: Kolonun en uzun segmentini (ortalama 50 cm uzunluğunda) oluşturur. Hepatik fleksuradan, splenik fleksuraya kadar batını bir baştan diğer başa kateder. Gastrokolik ligament ile mideye tutunur ve duodenumun 2. segmenti, pankreas ve dalak ile komşuluğu vardır.

4. İnen kolon: 25 cm uzunluğundadır ve kolonun, lümeni en dar olan segmentidir. Splenik fleksuradan başlar. Retroperitoneal olarak uzanır. Sadece ön yüzü periton ile örtülüdür. Kısmen mezenteri bulunabilir ve sol iliyak fossada sigmoid kolon ile birleşir. Aynı zamanda duvarı en kalın olan kısmıdır. Sol üreter ile komşuluğu vardır.

5. Sigmoid kolon: Yaklaşık 40 cm uzunluğunda ve 2.5 cm çapındadır. İnen kolonun distalinden başlar, rektuma kadar uzanır ve

tümüyle intraperitonealdır. Arkada internal iliyak damarlar, üreter ve sakral plexus ile ilişkilidir. Sigmoid kolonda appendiks epiploikalar dikkat çekecek kadar çoktur. Taenia koliler, burada incelir ve rektumda tamamen kaybolurlar.

6. Rektum: Ortalama 12-15 cm olup, sigmoid kolondan anal kanala dek uzanır. Rektumun üst 1/3 ü anteriordan ve lateralden peritonla örtülüdür. Orta 1/3 ü sadece anteriordan örtülü alt 1/3 ise peritoneal refleksiyonun altındadır. Kolonun diğer kısımlarında görülen taenia ve haustralar burada kaybolur. Ön yüzü örten periton erkeklerde, mesaneye atlayarak rektovezikal çıkmazı, kadında ise uterusu geçerek rektouterin çıkmazı oluşturur. Kadında oluşan bu kaviteye “Douglas poşu” denir ve burası karın boşluğunun en derin noktasıdır.

7. Anal kanal: Pelvik diafragm hizasından başlar ve anal çizgide sona erer. Yaklaşık 4 cm uzunluğunda ve anteroposterior olarak kollabe şekliindedir. İlk 2 cm’lik kısmı silindirik epitel ile; kalan kısım ise skuamöz epitel ile örtülüdür. Bu iki epitelin birleştiği çizgiye linea pectinea veya linea dentata denir. Burası internal hemoroidal pakelerin görüldüğü yerdir. Anal kanal; internal ve eksternal sfinkter kasları ile çevrilidir. Internal kaslar, düz kaslardan oluşur ve otonom sinir sistemi ile innerve edilir. Eksternal sfinkter kaslar ise çizgili kaslardan oluşur ve motor sinirlerle uyarılırlar.

2.1.1. KOLON DUVARININ ANATOMİSİ

Kolon duvarının kas tabakası, sirküler ve longitudinal yerleşim gösteren düz kas liflerinden oluşur. Dış longitudinal tabaka, 3 ayrı yerde kalınlaşarak “taenia coli” denilen bantları oluşturur. Bu bantlar appendiksin tabanından rektuma kadar uzanır. Taenia kolilerin kolon kadar uzun olmaması nedeni ile, kolon haustralara sahiptir. Taenialar, rektum ve appendikte yoktur. Sirküler kas tabakası ise çekumdan anal kanala kadar uzanır. Anal kanalda kalınlaşarak internal anal sfinkteri oluşturduğu yerde sonlanır. Ayrıca mukoza ve submukozanın birlikte lümene doğru projeksiyonu sonucu pilika semilunarisler oluşur.

2.1.2. İNNERVASYONU

Kalın bağırsak; otonom sinir sistemi tarafından innerve edilir. Peristaltizmi; sempatik sinirler inhibe, parasempatik sinirler stimule ederler.

Sağ kolona giden sempatik sinirler, spinal kordun alt 6 torasik segmentinden gelir, splanknik sinirler içinde önce çölyak plexusa sonra da superior mesenterik plexusa ilerler.

Transvers kolonun sağ tarafının parasempatik sinirlerinin sağ vagustan geldiği kabul edilir.

Sol kolonun ve rektumun sempatik innervasyonu ilk üç lumbal sinirden gelir, bu sinirler birleşerek önce preaortik plexusu daha aşağıda ise inferior mesenterik plexusu oluştururlar. Sol kolonun parasempatik sinirleri sakral sinirlerden gelerek rektumun her iki yanında nervi erigentesi oluştururlar.

Sempatik ve parasempatik sinir lifleri bağırsak duvarı içinde iki plexus yapar. Bunlardan submukozal olana Meissner plexusu, kas tabakası içinde olana ise Auerbach plexusu denir.

2.1.3. ARTERLERİ

Kolonun sağ yarısını arteria mezenterika süperior besler. Bu arter 3 dala ayrılır. Arteria iliokolika; çekumu, arteria kolika dekstra; çıkan kolonu, arteria kolika media ise transvers kolonun ilk yarısını besler. Splenik fleksuradan sonraki kısım ise arteria mezenterika inferior tarafından beslenir. Bu arter de 2 dala ayrılır: arteria kolika sinistra; splenik fleksura ve inen kolonu, arteria sigmoidea; sigmoid kolonu, süperior rektal arterler de rektumu beslerler. Orta rektal arterler iliyak damarlardan dallanır. Inferior rektal arterler ise internal pudental arterden gelir. Süperior ve inferior mezenterik arterler, yer yer anostomozlaşarak arklar oluştururlar.

2.1.4. VENLERİ

Sol kolik arterin çıkan dalının yanında seyreden inferior mesenterik ven hariç kolonu drene eden tüm venler arterlerle aynı yolu takip eder. Arterler ile aynı ismi taşıyan venler ile venöz kan, portal sisteme oradan da

karaciğere ulaşır. Rektumun ilk parçasının venöz kanını süperior hemoroidal venler alır. Bu venlerin taşıdığı kan, inferior mezenterik venler aracılığı ile portal vene dökülür. Rektumun orta ve alt kısmının venöz kanını ise orta ve alt hemoroidal venler taşır.

Inferior mezenterik ven, inen kolon, sigmoid ve üst rektumu drene eder ve splenik vene dökülür. Süperior mezenterik ven ise, çekum, çıkan kolon ve transvers kolonu drene ederek portal veni oluşturmak üzere splenik vene dökülür.

1.2.5. LENFATİKLER

Kolon; submukoza ve muskularis mukozadaki lenfatik kanallarla çevrilidir. Mukozada zengin vasküler ağ olmasına rağmen lenfatik kanallar yoktur. Bu nedenledir ki; muskularis mukozaya erişmemiş kanserler, lenfatik olarak yayılamaz. Barsak duvarındaki lenf nodları; “epiploik”, barsağın iç marjindeki lenf nodları; “parakolik”, mezenterik arterler boyunca olanlar; “intermediate” adlarını alırlar.

2.2. HİSTOLOJİSİ

1-Mukoza

2-Submukoza

3-Muskularis eksterna

4-Seroza tabakalarından oluşur.

Rektumda seroza yoktur.

Kalın bağırsak mukozası düzdür ve rektumun distali hariç katlantı içermez. Villus yoktur. Kriptlerin çapları 0.5 mm kadardır, dallanmalar göstermez ve muskularis mukozaya kadar uzanırlar. Epiteli oluşturan hücreler kolumnardır, yoğun olarak goblet hücresi ve arada az sayıda endokrin hücre içerir. Goblet hücreleri, müsin sekrete eder ve yüzey bu müsin ile kaplanır. Normal kolonik epitel: farklılaşmamış hücreler, matür goblet hücreleri, matür ve immatür absorbtif hücreler, tuft hücreler, enterokromaffin hücreler içerir. Bunlara ek olarak, lenfoid folliküllerin

üzerini örten epitel içinde, M hücreleri ve arada dağılmış olarak T hücreleri bulunur. Kolon epitelini oluşturan hücreler birbirleri ile sıkı bağlar kurarak mukozal bariyeri oluştururlar. Kriptler; mukus sekrete eden hücreler, immatür absorbtif hücreler ve az sayıda da endokrin hücreler ile örtülüdür.

1. Absorbtif hücreler: Matür absorbtif hücreler su ve elektroliti absorbe ederler. Kolon epitelini döşeyen hücrelerin arasındaki boşlukların çapı, kolonun fizyolojik aktivitesine göre değişir. Apikal alandaki sitoplazma bir terminal web içerir. Mitokondri, lipid damlacıkları ve apikal veziküller mevcuttur. Nükleuslar yuvarlaktır ve bazale yerleşmiştir. Bu hücreler mikrovillus içerirler.

2. Goblet hücreleri: Kalın bağırsak yüzey epitelinde, ince bağırsaktakinden daha fazla goblet hücresi bulunur. En sık sigmoid kolon ve rektumdadır. Kript epiteli içinde oldukça yaygındır ortalama her 4 kolumnar hücre için bir goblet hücresi mevcuttur. Diferansiye olabildikleri gibi yüzeye doğru göç de edebilirler ve progresiv olarak mukus içeren granüller ile dolarlar. Nükleus; içerdikleri yoğun mukus nedeni ile bazale doğru itilmiştir. Müsin sekresyonunun ilk belirtileri, kriptlerin tabanlarında bulunan andiferansiye hücreler ile goblet hücrelerinde görülür. Goblet hücrelerinin salgıladığı müsin, pH 2.5 ve 1 iken Alcian mavisi ile kuvvetli reaksiyon verir (24). Sülfomüsin daha çok kriptlerin bazalinde bulunurken, karboksimüsin daha üst seviyelerde ve yüzeyde bulunur.

3. Tuft hücreleri: Multiveziküler hücreler olarak da bilinirler. Kolonik epitelial hücrelerin %1-2 kadarını oluştururlar. Bu hücreler kolon lümenine doğru uzanan, apikal bölgelerindeki kalın uzun mikrovillus bulundurmaları nedeni ile bu ismi almışlardır. Fonksiyonları bilinmemektedir. Bazı araştırmacılara göre bu hücreler, kemoreseptör olarak görev yapmaktadır (2).

4. Endokrin hücreler: Kalın bağırsak, gastrointestinal sistemin en az sayıda endokrin hücre içeren bölümüdür. Kolonik endokrin hücreler özellikle rektumda çoktur.

5. Paneth hücreleri: Kolonda bulunan az sayıdaki paneth hücresi; çekum ve proksimal kolonda yer alır. Diğer kısımlarda normalde yoktur.

Hücresel yenilenme ve diferansiyasyon: İntestinal epitelyal hücreler insan vücudundaki en hızlı bölünebilen hücrelerdendir. Bölünebilen hücreler, kriptlerin 2/3 alt kısmında bulunur. Normal kolon epiteli 3-4 günde kendini tamamen yeniler ve bu döngü ömür boyu devam eder. Epitelyal hücreler, üzerinde yer aldıkları bazal laminanın temel maddesi olan laminin ve tip IV kollajen sentezleme yeteneğine sahiptirler.

2.2.a. Lamina propriya: Mukozanın, yüzey epiteli ile muskularis mukoza arasında kalan kısmıdır. Fibroblastlar, damarlar, sinirler, düz kas ve inflamatuvar hücrelerin, gevşek bir stromada organizasyonu ile oluşur. Epitelin hemen altı primer olarak fibroblastlar, miyofibroblastlar ve makrofajlardan zengindir. Makrofajlar çoğunlukla mukozanın üst kısımlarında yer alırlar. Mast hücreleri de sitoplazmik histamin içerikleri ile lamina propriyada yerlerini alır. Lamina propriya aynı zamanda lenfoid folliküller de içerir. Bu folliküller geniş olabilir. Kalın bağırsakta bu kadar çok lenfoid follikülün olması, bu alanda yaşayan yüzlerce çeşit bakteri bulunması nedeniyledir. Genç erişkinlerde ve çocuklarda biraz daha büyük olma eğilimindedir. Lenfoid follikülleri oluşturan lenfosit popülasyonu ile intraepitelyal lenfosit popülasyonun içeriği farklıdır. İntraepitelyal inflamatuvar hücreleri oluşturan T lenfositler, B lenfositler ve null hücreler birbirine hemen hemen eşit sayıda bulunurken, lenfoid folliküllerde, %52 oranında T hücre, %22 oranında B hücre ve %26 oranında da null hücre bulunur (2).

2.2.b. Submukoza: Kollajen retikülin fibrilleri, elastik doku, sinirler, kan damarları, lenfatikler ve muskularis mukozanın hemen altında yer alan küçük gruplar halindeki gangliyon hücrelerinden oluşur. Burada sinir lifleri Meissner pleksusunu oluşturur. Ayrıca değişik miktarlarda yağ dokusu da bulunabilir.

2.2.c. Muskularis propriya: İçte sirküler ve dışta longitudinal biçimde düzenlenen düz kas liflerinden oluşur. Arada elastik ve kollajen liflerden oluşan bağ dokusu bulunur. Bu tabakada; sinir lifleri, Auerbach (miyenterik) pleksusunu oluştururlar. Dışta bulunan longitudinal düz kas

lifleri, appendiks ve rektumun 2/3 distal kısmı hariç, tüm kalın bağırsak boyunca uzanan taenia kolileri oluştururlar.

2.2.d. Seroza: Muskuler tabakanın dış tarafında yer alan, kan ve lenfatik damarları içeren, çoğunlukla periton ile ilişkili olan kısımdır.

2.3. KOLOREKTAL KANSERLERİN İNSİDANSI, ETYOLOJİSİ VE KARSİNOGENEZİ

2.3.1. İNSİDANS

Kolorektal karsinomaların sıklığı coğrafik bölgeler ve beslenme alışkanlıklarına göre değişiklik gösterebilir. Endüstriyel ülkelerde (Batı Avrupa, Kuzey Amerika), beslenme alışkanlıkları nedeni ile sık görülür (41). Ülkelerin kendi içlerinde de insidans farklılıkları olabilir. Kolon kanseri riski düşük olan yerlerden yüksek riskli bölgelere göç edenlerde, kendi ülkelerinde riskin sabit kalmasına rağmen, kolon kanseri görülme sıklığının arttığı bildirilmektedir. 1990 yılında dünya genelinde 472.000 kişi kolorektal karsinomalar nedeni ile ölmüştür (43).

2.3.2. ETYOLOJİ

2.3.2.a. Diyet:

Diyet ile ilgili faktörler şunlardır:1-Emilemeyen bitkisel liflerden fakir içerik 2- Karbonhidrattan zengin diyet 3- Yüksek yağ miktarı 4- A, C ve E vitaminleri gibi koruyucu besinlerin az tüketimi.

Düşük lif içeriğinin, dışkı hacminin az olmasına, dışkının bağırsakta kalma süresinin uzamasına ve bağırsaktaki bakteriyel floranın değişim geçirmesine yol açtığı öne sürülmektedir.

Kolorektal karsinomalar, batı tipi (yüksek kalorili, yağdan zengin) beslenme alışkanlığı olan ve sedanter yaşayan toplumlarda sık görülür. Et tüketimi, sigara ve alkol kullanımı risk faktörleridir. Buna zıt olarak, taze sebze tüketimi, uzun süreli nonsteroid antiinflamatuvar ilaç kullanımı (10 yıl ya da daha uzun süreli, günde 4-6 adet aspirin veya diğer NSAİ tableti

alan kadınlarda kolon kanseri insidansı düşük olduğu gösterilmiş), östrojen replasman tedavileri bu riski azaltmaktadır. Bu epidemiyolojik ilişkinin moleküler tabanı henüz net olarak bilinmemektedir. Ancak, et ürünleri pişirilirken ortaya çıkan heterosiklik aminler, yüksek seviyelerde fekal safra asidinin stimülasyonu ve reaktif oksijen ürünlerinin oluşması muhtemel mekanizmalar olarak görülmektedir (48).

2.3.2.b. Kronik inflamasyon

Kolorektal karsinomaların etyolojisinde inflamatuvar bağırsak hastalıklarının önemli yeri vardır. Ülseratif kolit, majör bir risk faktörüdür. Yapılan çalışmalar (34,61) ülseratif kolitli hastaların kolorektal karsinoma nedeni ile ölme oranlarının 4.4 kat daha fazla olduğunu göstermektedir. Kolonun bir yarısından fazlasında tutulum olan olgularda riskin %15, sadece sol yarıya kadar olan olgularda ise %5 civarında olduğu bildirilmektedir. Crohn hastalığı olanlar hem ince hem de kalın bağırsak karsinomu açısından risk altındadır. Yine yapılan çalışmalar bu popülasyonda kolorektal karsinoma riskinin 3 kat fazla olduğunu göstermektedir (17).

2.3.2.c. Radyasyon

Radyasyona maruz kalmanın kolorektal karsinomalar için risk faktörü olduğu kesin olarak gösterilmiştir (66).

2.3.2.d. Lokalizasyon

Kolorektal karsinomalar daha çok sigmoid kolon ve rektumda yerleşir. Son zamanlardaki yapılan epidemiyolojik çalışmalar (63) kolorektal karsinomların anatomik dağılımının distalden proksimale yer değiştirme eğiliminde olduğunu göstermektedir. Çekum ve çıkan kolon kanser insidansının son yıllarda artış gösterdiği bildirilmiştir. Aynı şekilde transvers kolon tümörlerinde de %15.8'den %17.2 düzeyinde artış görülmüştür. Sigmoid kolon tümörlerinde ise %36'dan %33'e azalma görülmüştür (60). Distalden proksimale doğru kolorektal karsinom

insidansındaki artışın; kanser önleyici değerlendirmelerin ve erken teşhis tekniklerinin daha etkin kullanımının sonucunda olduğu düşünülmektedir. Aynı şekilde yapılan çalışmalarda yıllar içinde sol kolon karsinomlarında 5 yıllık yaşam sürelerinin uzadığı; ancak tedavi ve teşhis tekniklerindeki gelişmelerin sağ kolon karsinomlarının yaşam sürelerine katkı sağlamadığı bulunmuştur. Moleküler çalışmalar, çekum, çıkan kolon ve transvers kolon tümörlerinde, *ras* proto-onkogen mutasyonunun daha fazla olduğunu göstermektedir (24,62).

2.3.2.e. Genetik faktörler

Kolorektal kanserlerin ailesel formları birkaç gruba ayrılabilir:

1- Polipozis koli sendromlu hastalar

2- Kolon kanseri için ailesel sendromlu hastalar

3- Ailesinde başka kişilerde de kolon kanseri olan, sporadik olarak kolon kanseri gelişimi izlenen hastalar.

Genetik olarak, kolon kanserine eğilimi olduğu kesin olan ve iyi tanımlanmış 2 sendrom bulunmaktadır. Birincisi, ailesel adenomatöz polipozis (bütün kolon kanserlerinin %1'i); ikincisi ailesel non-polipozis kolon kanseri sendromudur (ANPKKS). ANPKKS hastaları 2 grup altında incelenebilir; Lynch I ve Lynch II sendromu. Her iki sendromda diğer organ kanserleri de görülür. Kolon kanserinin görülebildiği bir diğer grup da, Muir-Torre sendromlu hastalardır. Sendrom; otozomal dominant olarak aktarılır ve tümör spektrumu Lynch II sendromuna benzer.

2.3.2.f. Obezite

Özellikle karın bölgesi yağları fazla ve vücut kitle indeksi (body mass index) artmış olan hastalar daha fazla kolon kanseri görülme riskine sahiptir. Bu konuda yapılan çalışmalarda karsinoma oluşum sürecinde geç dönemde kötü ajan olarak obesitenin; iyi ajan olarak fiziksel aktivitenin rol oynadığı görülmüştür.

2.3.2.g. Sigara tüketimi

Sigara tüketenlerde hem kolon adenomu hem de kanseri riski artmıştır. Özellikle uzun süreli sigara kullanımı ve tüketimin erken yaşlarda başlaması, riski daha da artırır (21).

2.3.2.h. Divertikülozis ile ilişki

Divertikülozisli hastalarda sol taraf kolon neoplazmlarının görülme sıklığı artmaktadır.

2.3.2.ı Hormonal faktörler

Gastrinin tümör gelişiminde rol oynadığı yönünde çalışmalar vardır (59). Ayrıca akromegalik hastalarda da daha fazla kolonik adenoma ve karsinoma görülme olasılığı mevcuttur. Benzer şekilde steroidlerin de kolon kanseri ile ilişkili olduğunu savunanlar vardır.

2.3.3. KARSİNOGENEZ

Kolorektal karsinogenez, kanser gelişiminin temel mekanizmaları konusunda birçok önemli noktanın kavranmasını sağlamıştır. Kolon karsinogenezinde patogenetik olarak 2 farklı yol olduğu bilinmektedir. Her 2 yolda da birden fazla sayıda mutasyonun aşamalı olarak birikimi sözkonusudur. APC/beta-catenin yolu olarak adlandırılan yol, bir seri onkogen ve tümör baskılayıcı gende mutasyonların aşamalı olarak gerçekleşip birikmesine neden olan bir kromozomal dengesizlik ile karakterizedir. Önce kolonda lokalize bir epitel proliferasyonu meydana gelir ve küçük adenomlar oluşur, bunlar progresif olarak genişlerler. Bir yandan da daha displastik hale gelerek invaziv kansere dönüşürler. Gerçekleşen olayların genetik karşılığı şu şekilde özetlenebilir.

APC tümör baskılayıcı genin kaybı. Bunun adenom oluşumunda en erken olay olduğu düşünülmektedir. Adenomların meydana gelmesi için APC geninin her iki kopyası da kaybedilmelidir. Normal APC, beta-catenin yıkımını sağlarken, APC 'nin fonksiyon kaybı durumunda biriken beta-

catenin, nükleusta MYC ve siklin D1 aktivasyonunu ve DNA transkripsiyonunu hızlandırır. Sporadik kolon kanserlerinin %80'inde APC mutasyonları mevcuttur.

K-RAS mutasyonu. APC kaybının ardından meydana gelir. Mutasyona uğramış RAS aktif halde sabit kalarak mitotik sinyalleri iletmeye devam eder, apoptozu engeller. K-RAS mutasyonu, 1 cm. den küçük adenomların %10'undan azında, 1 cm. den büyük adenom ve karsinomların %50'sinde mevcuttur.

18q21 delesyonu. Lokalize olan ve kanser baskılayıcı gen olduğu düşünülen bir genin kaybı kolon kanserlerinin %60-70 'inde saptanmıştır. Bu kromozom bölgesinde 3 genin varlığı bilinmektedir. Bunlar, DCC (deleted in colon carcinoma), DPC4/SMAD4 (deleted in pancreatic carcinoma) ve SMAD2'dir. Bunlardan hangisinin kolon karsinogenezinde rolü olduğu bilinmemektedir.

TP53 kaybı. Bu tümör baskılayıcı genin kaybına kolon kanserlerinin %70-80'inde rastlanmaktadır. Bu kayıp adenomlarda seyrek görüldüğünden TP53 mutasyonlarının kolorektal karsinogenezinde geç bir olay olduğu düşünülmektedir.

Genetik lezyonların varlığı ile karakterize ikinci yol DNA mismatch tamir genleri ile ilişkilidir. Sporadik vakaların %10-15'inde saptanmıştır. Bu yolla gelişen kolorektal kanserlerde en olası ve en önemli başlangıç noktası, DNA mismatch tamir genlerinin inaktivasyonu sonucu DNA tamirinde meydana gelen aksaklıklardır. 5 DNA mismatch tamir geninden (MSH2, MSH6, MLH1, PMS1 ve PMS2) birindeki kalıtsal mutasyon herediter nonpolipozis kolon karsinomu ile sonuçlanır. Bu genlerden MLH1, sporadik kolon karsinomu ile en sık ilişkili bulunan gendir. Bu tümörler genel olarak, aynı evredeki APC/Beta catenin yolundan kaynaklanan tümörlerden daha iyi prognoza sahiptirler. DNA mismatch tamir genlerinin kaybı sonucu , mikrosatellit denen kısa DNA dizileri, DNA replikasyonu sırasında dengesiz hale gelirler. Ortaya çıkan mikrosatellit dengesizliği, hatalı DNA mismatch tamirinin moleküler işaretidir. Mikrosatellit dizilerinin çoğu, genlerin kodlama yapmayan bölgeleri

üzerindedir. Bu genler arasında tipli TGF-beta (transforme edici büyüme faktörü) reseptörü ve BAX'da vardır. TGF-beta sinyalizasyonu kolon epitel hücrelerinde büyümeyi engeller, BAX geni ise apoptoza neden olur. Mismatch tamir kaybı, bu genlerde mutasyonlarının birikmesine ve kolorektal karsinomların ortaya çıkmasına yol açar (49).

2.4. HISTOPATOLOJİSİ

Kolorektal adenokarsinomalar, tanımı gereği muskularis mukozayı geçmiş submukozaya infiltre tümörlerdir. Adenokarsinomanın karakteristik morfolojik özelliklerini taşıyan tümörler, epitel içine sınırlı olabilir veya lamina propriyaya invazyon gösterebilirler. Muskularis mukozayı geçerek submukoza invazyon göstermeyen tümörlerde metastaz riski yoktur. Bu tümörler için, yüksek dereceli intraepitelyal karsinoma terimi, adenokarsinoma in-situ teriminden daha fazla kullanılmaktadır. Lamina propriyaya infiltre tümörler, intramukozal adenokarsinoma olarak adlandırılır. Adenokarsinomaların çoğu değişik miktarlarda ve boyutlarda gland benzeri yapılar oluştururlar. Diğer histolojik tipler;

1. Müsinöz adenokarsinoma: %50'den fazla müsinöz materyal mevcuttur. Karakteristik özelliklerinden birisi, geniş müsin gölcükleri ve içlerinde tek tek duran malign epitelyal hücreler ve/veya atipik glandüler yapılardır. Yüksek mikrosatellit instabilitesine (MSI-H) sahip tümörler genellikle müsinözdür. Bu nedenle klasik adenokarsinomalardan daha kötü seyirlidir.

2. Taşlı yüzük hücreli karsinoma: Bu tümörün özelliği, %50 den fazla alanında belirgin intrasitoplazmik müsin içeren epitelyal hücreler içermesidir. Taşlı yüzük tabiri, intrasitoplazmik müsin içeriğinin çok fazla olması nedeni ile hücrenin oldukça genişlemesi ve nükleusun bir kenara itilmesi sonucunda, hücrelerin taşlı yüzük görünümü kazanmasından dolayıdır. Çok geniş müsin gölcükleri içinde tek tek bulunabildikleri gibi, hiç ekstrasellüler müsin içermeyen tümüyle infiltratif taşlı yüzük hücreli karsinomalar da vardır. Bazı MSI-H tümörler bu tiptedir. Taşlı yüzük

hücreli karsinoma, kolon kanserleri içinde, prognozun kötü olduğu kesin olarak bilinen iki tümörden biridir. Diğerisi ise küçük hücreli karsinomadır.

3. Adenoskuamöz karsinoma: Pek sık rastlanmayan bu histolojik tip, hem skuamöz hücreli karsinoma hem de adenokarsinomanın özelliklerini birlikte bulundurur. Bu ayrı morfolojik alanlar, tümör içinde ayrı ayrı bulunabildiği gibi birbiri ile iç içe de bulunabilir. Bir kolon kanserine adenoskuamöz karsinoma diyebilmek için, skuamöz adaların, tek tük küçük odaklar halinde, arada bir rastlanan şekilde olmaması gerekir. Pür skuamöz hücreli karsinoma çok nadirdir. Bu histopatolojik alt tipin davranışı hakkında net bir bilgi yoktur.

4. Medüller karsinoma: Bu tümör, geniş eozinofilik sitoplazmalı, veziküler nükleus ve belirgin nükleoluslu malign hücrelerin oluşturduğu tabakalar şeklinde görülür. Tümör hücrelerinin arasında belirgin lenfosit infiltrasyonu mevcuttur. MSI-H ile belirgin bir birliktelik gösterir ve diğer az diferansiye kolon karsinomaları ile karşılaştırıldığında, prognozu daha iyidir.

5. Andiferansiye karsinoma: Epitelyal bir tümörden öteye bir şey söyletmeyecek kadar diferansiasyonu az olan tümörlerdir ve morfolojik görünimleri değişken olabilir (65). Prognozunun klasik adenokarsinomalara göre daha kötü olduğu kabul edilir.

6. Diğer varyantlar: İğsi hücreli komponent içeren tümörler, iğsi hücreli karsinoma veya sarkomatoid karsinoma olarak adlandırılır. Bu iğsi hücreler fokal olarak da olsa sitokeratin ile immünoreaktivite gösterir. Karsinosarkoma terimi, karsinomatöz ve heterolog mezenkimal elamanlar içeren tümör için kullanılır. Diğer çok nadir görülen kolon karsinomaları ise, küçük hücreli karsinoma, pleomorfik (dev hücreli), koryokarsinoma, pigmente, berrak hücreli, “stem cell”, paneth hücrelerinden zengin (“crypt cell carcinoma”) karsinoma olarak sayılabilir.

2.5. PROGNOSTİK FAKTÖRLER

1. Morfoloji: Tümörün makroskopik ve mikroskopik özellikleri (TNM sınıflandırmasındaki yeri, obstrüksiyon, perforasyon, invazyon paterni,

diferansiasyon derecesi, ektramural venöz tutulum, lenfatik veya perinöral tutulum, anjiyogenezis, infiltrasyona lokal inflamatuvar veya dezmoplastik yanıt, rezeksiyon sınırlarına tümörün uzaklığı, kalıntı tümör bulunup bulunmaması) prognozu etkiler. Ayrıca; tümörün büyük, ülser, çevreye infiltre olması, tümüyle tıkanıklık oluşturması, perforasyon yapması ve serozal depozitler içermesi kötü prognoz ile ilişkilidir. Derin invazyon yapması, ekspansil yerine infiltratif paternde büyümesi de kötü prognoz ile ilişkilidir (6,7).

2. Histolojik tip: Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), kolorektal karsinomaların sınıflamasını en son 2000 yılında yenilemiştir (Tablo 1) (20). Bu sınıflamada ayrı bir histolojik alt tip olarak yer alan medüller karsinoma, önceden andiferansiye karsinomalar içinde geçen ve hiç glandüler yapı oluşturmayan bir tümördür. Bu tipin özelliği, mikrosatellit instabilitesi, DNA tamir edici gen disfonksiyonu ve ailesel non-polipozis kolon kanseri sendromu ile kuvvetli ilişkileridir (38). Kolon kanserlerinin çoğunun histolojik tipinin evreden bağımsız prognostik önemi yoktur (9). Ancak, çok az görülen alt tipler olan taşlı yüzük hücreli karsinoma ve küçük hücreli karsinoma, diğerlerine göre daha kötü; medüller karsinoma ise diğerlerine göre daha iyi seyretmektedir (9). Bazı çalışmalar, müsinöz adenokarsinomaların, tanı anında daha geç evrede olduğunu ve prognozlarının kötü olduğunu savunur (63). Bazı çalışmalarda, müsinöz karsinomanın, eğer rektosigmoid bölgede yerleşim gösteriyor ise veya 45 yaşının altındaki bir hastada ise daha kötü seyrettiği savunulmaktadır (9). İstatistiksel olarak değerlendirilen bir çalışmada, müsinöz adenokarsinomaların, kalın bağırsak tıkanıklığına neden olduklarında, evre-bağımsız olarak tek başlarına kötü prognoz belirteci olduğunu gösterilmiştir (42). Bazı çalışmalar ise müsinöz adenokarsinomaların, nonmüsinöz karsinomalardan bir farkı olmadığını savunur (50). Taşlı yüzük hücreli ve küçük hücreli karsinomalar da evre-bağımsız kötü prognoz belirteci olarak kabul edilmektedir. Kolorektal karsinomaların diğer histolojik tiplerinde görülebilen fokal nöroendokrin farklılaşmanın prognostik önemi ise net olarak bilinmemektedir.

Sadece histolojik alt tipleri ele alınacak olur ise, taşlı yüzük hücreli ve küçük hücreli karsinoma, kötü prognozlu, medüller karsinoma iyi prognozludur ve eğer kalın bağırsak tıkanıklığı yapmış ise müsinöz adenokarsinomalar da kötü prognozludur.

Tablo 1: Kolorektal karsinomalar için WHO sınıflaması

Adenokarsinoma

Medüller karsinoma

Müsinöz adenokarsinoma (>%50 müsinöz alan)

Taşlı yüzük hücreli karsinoma (>%50 taşlı yüzük görünümünde hücre)

Skuamöz hücreli (epidermoid) karsinoma

Adenoskuamöz karsinoma

Küçük hücreli (yulaf hücreli) karsinoma

Andiferansiye karsinoma

Diğer (Papiller karsinoma gibi...)

3. Tümörün derecesi: Pratikte histolojik derecelendirme subjektiftir. Genel olarak kabul edilen ve şu an kullanılan derecelendirme 3 aşamalıdır.

- Derece I : iyi diferansiye (>%95 glandüler yapı)
- Derece II : orta derecede diferansiye (aradaki olgular)
- Derece III: az diferansiye.(>%95 solid)

Derecelemedeki subjektiflik ve doğruluğun azlığı, tümörün; çoğunlukla heterojen olmasından kaynaklanıyor olabilir ve “interobserver” uyumsuzluğun belirgin olduğu bildirilmektedir.

Bu problemlere rağmen, derecelemenin, tek başına evre-bağımsız prognostik bir faktör olarak önemli olduğunu istatistiksel olarak gösteren çalışmalar vardır (10).

Kolorektal çalışma grubunun 1999’da yapmış olduğu ortak karar konferansında, “iyi diferansiye” ve “orta derecede diferansiye” birleştirilerek “düşük dereceli” (ki genelde uyumsuzluk bu ikisi arasında görülmektedir) ; “az diferansiye ise “yüksek dereceli” olarak kullanılması

uygun olur şeklinde bir teklif getirilmiştir ki bu dereceleme sisteminin de prognostik önemi olduğu gösterilmiştir (9,10). Düşük ve yüksek dereceli ayrımı, tümörün içerdiği glandüler yapı oranına göre yapılmaktadır (>%50 = yüksek; <%50=düşük dereceli).

4. Tümörün evresi: Kolorektal karsinomalarda prognozun en iyi belirteci, tümörün anatomik dağılımı ile ilgilidir (9). Yıllar boyunca çok sayıda evreleme sistemi kullanılmıştır.

Kolorektal karsinomlarının evrelemesinde 3 farklı sistem kullanılır.

- . Dukes sistemi
- . Astler-Coller sistemi
- . TNM sistemi

1932 yılında Dukes, rektal karsinomların evrelemesinde yeni bir sistem oluşturdu ve bu kolon karsinomlarına da uygulandı. Bu evreleme prognozla direkt ilişkili olduğundan dolayı günümüzde pek çok kişi tarafından kullanılmaktadır. Bu sistemde sınıflama; tümörün derinliği ve lenf bezi tutulumuna göre A,B,C olarak yapılmıştır (Tablo 2.). 1936 yılında Dukes, kendi sınıflamasını modifiye ederek C evresini C1 ve C2 şeklinde modifiye etmiştir (Tablo 3.). Dukes sınıflaması kolay ve anlaşılır olması nedeniyle önemini korumaktadır. 1954 yılında Astler ve Coller tarafından başka bir evreleme sistemi geliştirilmiştir. Dukes sınıflamasına benzetmekle birlikte, derinlikleri farklı olan tümörde lenf düğümü tutulumunu da değerlendirmesiyle farklılık göstermektedir (Tablo 4.) (53). Daha ayrıntılı; fakat prognozla Dukes kadar ilişkili olmayan başka bir evreleme sistemi olan ve günümüzde en çok kabul gören TNM sınıflaması; “American Joint Committee on Cancer (AJCC)” ve “International Union Against Cancer (UICC)” nin tümör, lenf bezi ve metastaz komponentlerini gruplandırmasıyla ortaya konmuştur (53).

TNM sınıflamasındaki “T”, primer tümörün tanı anındaki lokal yaygınlığını karşılar. “N”, lenf nodu tutulumu olup olmadığını, “M”, uzak metastaz bulunup bulunmadığını belirtir. Arada “p” ve “c” sembolleri de kullanılmaktadır. “p”, patolojik olarak tespit edilmiş TNM sınıflamasını, “c” ise klinik olarak tespit edilen sınıflamayı anlatır. “c” TNM radyolojik olarak

elde edilen veriler ile yapılır. TNM sınıflamasının yapılması için hastanın tedavi almamış olması gerekir.

TNM sınıflaması tablo 5.'de, TNM sınıflaması ile hayatta kalım arasındaki ilişki ise tablo 6.' de özetlenmiştir.

“pTis” terimi, neoplastik hücrelerin bazal membranı geçmediği durumlar için kullanılır. Bu bölgede, lamina propria invazyonunun lenf nodu metastazı riski bulunmamaktadır. Dolayısı ile, hem neoplastik hücrelerin bazal membranı aşmadığı hem de glandüler bazal membranı yırtıp mukozal lamina propriaya invazyon göstermeleri (intramukozal karsinoma) durumu pTis sınıfı içinde değerlendirilir. Bu bölge tümörleri için karsinoma in-situ ile intramukozal karsinoma arasında prognostik açıdan fark yoktur (9).

Tablo 2. 1932 Dukes evrelemesi

Evre A	Tümör kolon duvarında sınırlı Muskularis propriayı aşmamış
Evre B	Tümör muskularis propriayı aşmış, seroza / perirektal dokuya invaze. Lenf nodu tutulumu yok
Evre C	Lenf nodu tutulumu var

Tablo 3. 1936 Dukes evrelemesi

Evre A	Tümör kalın bağırsak duvarında sınırlı
Evre B	Tümör muskularis propriayı aşmış, seroza / perirektal dokuya invaze Lenf nodu tutulumu yok.
Evre C1	Bölgesel lenf nodlarına metastaz yok
Evre C2	Mezenterik kan damarları etrafındaki lenf nodları tutulumu

Tablo 4. Astler-Coller evrelemesi

Evre A	Tümör mukozada sınırlı
Evre B1	Tümör submukozaya sınırlı, lenf nodu tutulumu yok.
Evre B2	Tümör kas tabakasına sınırlı, lenf nodu tutulumu yok.
Evre C1	Tümör barsak duvarını aşmadığı halde lenf nodu tutulumu var
Evre C2	Tümör barsak duvarını aşmış ve lenf nodu tutulumu var.

AJCC/UICC TNM tanımlaması

Primer tümör (T)

TX:Primer tümör bilinmiyor

T0:Primer tümör yok

Tis: Karsinoma in-situ (intraepitelyal veya intramukozal karsinoma).

T1: Tümör submukozaya invaze

T2: Tümör muskularis propriyaya invaze

T3:Tümör muskularis propriyayı geçerek serozal veya perikolik/ perirektal bölgeye invaze

T3'ün opsiyonel subklasifikasyonu:

- pT3a- minimal invazyon (muskularis propriyayı 1 mm.den daha az geçen tümörler)
- pT3b- hafif invazyon (muskularis propriyayı 1-5 mm arasında geçen tümörler)
- pT3c- orta derecede invazyon (muskularis propriyayı 5-15 mm arasında geçen)
- pT3d- belirgin invazyon (muskularis propriyayı 15 mm.den fazla geçen tümörler)

T4: Tümör komşu organ veya yapılara invaze ise (T4a) veya periton perforasyonu yapıyor ise (T4b).

Bölgesel lenf nodları (N)

NX: bölgesel lenf nodu değerlendirilememekte

N0: bölgesel lenf nodu metastazı yok.

N1: 1-3 adet lenf nodu metastazı var

N2: 3 den fazla lenf nodu metastazı var.

Uzak metastaz (M)

MX: uzak metastaz değerlendirilememekte

M0:uzak metastaz yok

M1: uzak metastaz var

Tablo 5. TNM sınıflaması

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre II	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
Evre III	T4	N0	M0
	Herhangi bir T	N1	M0
	Herhangi bir T	N2	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

Tablo 6. Tümörün evresi ile hayatta kalım oranları arasındaki ilişki

TNM evresi	5 yıl hayatta kalım oranı (%)
Evre 0 ve I (Tis, N0, M0)	>90
Evre I (T1-T2, N0, NO)	80-85
Evre II (T3-T4, N0, M0)	70-75
Evre III (T2, N1-3,M0)	70-75
Evre III (T3, N1-3, M0)	50-65
Evre III (T4, N1-3, M0)	20-45
Evre IV (M1)	<3

5. Lenf nodu metastazı: Çok sayıda lenf nodu metastazı bulunması kötü prognoz ile ilişkilidir. İmmünohistokimyasal veya moleküler teknikler ile tespit edilen mikrometastazlar da kötü prognozla ilişkilendirilmekle birlikte bu konu halen tartışmalıdır (47).

6. Anjiyogenezis: Tümör stromasının neovaskülarizasyonu, tümörün büyümesinde kritik bir rol oynar. Yüksek miktardaki mikrodamar oluşumu kötü prognostik kriter olarak görülmektedir (67).

7. Yaş: Çok genç ve çok yaşlı kişilerde görülen tümörler kötü prognoz ile ilişkilidir (11,53).

8. Cinsiyet: Prognoz kadınlarda erkeklerden biraz daha iyidir (11,53).

9. Tümör lokalizasyonu: Prognoz üzerine etkisi tartışmalıdır. sigmoid kolon ve rektumda olanların kötü prognozlu olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise tümör lokalizasyonunun prognostik öneminin minimal olduğu sonucuna varılmıştır (11,53).

10. Vasküler invazyon: Vasküler invazyon varlığında 5 yıllık sağ kalım süresi belirgin azalma gösterir. Lenfatik damar invazyonu, kan damarı invazyonundan daha az önem taşımaktadır (11,53).

11. Perinöral invazyon: Genellikle ileri evre tümöre işaret eder ve diğerkötü prognostik bulgularla birlikte olma eğilimindedir (11,53).

12. İnflamatuvar yanıt: Polimorfonükleer lökositler, özellikle eozinofiller, plazma hücreleri, mast hücreleri ve histiyositleri içeren inflamatuvar yanıt; iyi prognoz olarak görölmektedir (44). Ayrıca Crohn'a benzer şekilde muskuler tabaka ya da perikolik dokuda lenfoid agregat varlığı; sinüs histiyositoziste olduğu gibi, parakortikal T-lenfosit ve B-germinal merkez hiperplazileri de iyi prognoz ile ilişkilidir.

13. Rezeksiyon sınırı: Rezeksiyonda tümöre yakın cerrahi sınır (2-5cm)'den yakınsa lokal nüks olasılığı artar.

14. Genetik belirteçler: Bazı genetik değışikliklerin kolorektal karsinomalar ile ilişkili olduğu düşünölmektedir. Kromozom 18q'nun allelik kaybı kötü prognoz olarak bildirilmektedir. Ayrıca, 17p, 1p, 5q veya 8p'nin allelik kayıpları, p53'ün yüksek, siklin A'nın yüksek, p27^{Kip1} 'nin azalmış ekspresyonu, ras gen mutasyonu, matriks degradasyonu yapan enzimlerin ve bunların inhibitörlerinin ekspresyonunun (katepsin-L, ürokinaz, doku tipi plazminojen aktivatörü, doku metalloproteinaz inhibitörleri), apoptozisde görev alan genlerin ekspresyonunun prognostik önemi vardır. Yine hücre yüzey moleküllerinin (CD44 ve varyantları, ICAM1, galektin 3) ve metabolik enzimlerin (GLUT1 glikoz transport edici protein, manganese-süperoksid dismutaz, timidilat sentetaz, ornitin dekarboksilaz, siklooksijenaz 2) ekspresyonu da kötü prognoz ile ilişkilidir.

15. Tümörün boyutu: Prognostik olarak anlamlı bir önem bulunamamıştır (10).

16. DNA ploidi: Adenomaların karsinomaya dönüşümünde DNA miktarının artışı yanısıra DNA anormallikleri de görülmektedir. Çeşitli serilerde farklı (%40, %90) (4,16) olmakla birlikte, kolon karsinomalarının anöploid olma sıklığı yüksektir. Anöploid tümörlerde genellikle vasküler invazyon görülmektedir.

2.5.1 EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ ve REPTÖRLERİ

Epidermal büyüme faktörü (EGF) 1962 yılında Dr. Stanley Cohen tarafından erkek farelerin submandibular bezi ve insan idrarından elde edilmiştir. Cohen, sinir büyüme faktörünü (NGF) izole etmek için yaptığı çalışmalar sırasında elde ettiği maddenin NGF'den farklı etkide olduğunu gözlemlemiştir. Bu maddeyi yeni doğan farelere hergün verdiğinde göz kapaklarının erken açıldığını ve dişlerin erken çıktığını saptamıştır. Bu maddeye, epidermisin gelişimini hızlandırdığı için epidermal büyüme faktörü (EGF) adını vermiştir (8,15).

Gregory ve arkadaşları; insan idrarının, köpeklerde mide asit salgısını başlattığını bulmuş ve bu etkin maddeye ürogastron adını vermişlerdir. Daha sonra ürogastronun fare EGF' üne benzediğini saptamışlardır. Bu nedenle bu madde, insan EGF' ü olarak adlandırılmıştır (19).

EGF tam olarak 1972 yılında belirlenmiş ve aminoasit dizilimi ortaya konulmuştur. EGF 53 aminoasitlik 6kDa molekül ağırlığında 3 disülfid bağı içeren tek zincirli bir polipeptit olup birçok vücut sıvısı ve dokuda varlığı gösterilmiştir. EGF; idrarda, mide ve pankreas sıvısında, seminal ve prostat sıvısı, süt ve kan ile duodenumun Brunner bezleri, over, tiroid, özofagus, böbrek, karaciğer ve akciğerde bulunur. EGF' ün böbrek üstü bezlerinden kortizol salınımını artırdığı da saptanmıştır.

EGF; epitelyal ve mezotelyal kökenli hücrelerde mitojenik etkiye sahiptir. Etkin olduğu hücrelerde iyon alınımlarını, glikolizi, DNA ve RNA sentezini artırıcı özelliği vardır (8,15). EGF ile uyarılan hücre, sonuçta

DNA sentezi ve hücre bölünmesine yolaçan bir dizi olayı başlatır. Hücre döngüsünün denetimi G1 evresinde yapılır. Bu evrede hücre, çevreden aldığı tüm bilgileri toplar, değerlendirir ve büyüme konusunda karar verir. EGF' ün etkisinde yaklaşık 10-24 saat sonra hücre DNA sentezine yol açan hızlı bir biyokimyasal ve fizyolojik sürece girer. Ancak DNA sentezinin oluşumu için, sentez öncesi G0/G1 evresi süresince (8-10 saat) EGF varlığı gereklidir (15).

EGF fetal tavşanlara uygulandığında akciğer gelişimini hızlandırıcı etki gösterir. Anne EGF' ü plasentadan geçemez, erişkinde de kan-beyin engelini aşamaz (15).

Amniyon hücrelerinde PgE2 sentezini, endotel hücrelerinde ise Pgl2 sentezini artırır. Trombositlerde de varlığı gösterilmiştir. Anne sütünde özellikle prematür doğumlarda daha fazla bulunur.

EGF, tümöral dokuların gelişiminde de etkilidir. Meme tümörü implantasyonu yapılan farelerde, EGF uygulanması tümör gelişimini hızlandırırken antikorun verilmesi gelişimi yavaşlatmaktadır. Normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüşümünde de etkilidir.

EGF varlığında kendi kendine gelişen tümörlerin oluşumunda immünolojik önleyici etki kaybolur. EGF' ün vücuda antijen verilmesinden 1 gün önce uygulanması antikor yapımının baskılanmasına neden olur. Yardımcı T hücreleri EGF'nin asıl hedefleridir (15).

EGF' ün dalak, timus, kemik iliği hücrelerinde DNA sentezini azalttığı gösterilmiştir (15).

EGF, hücre yüzeyine lokalize olan ERB-B1'e bağlanarak hem in vivo hem de in vitro ortamdaki çeşitli hücreler üzerinde güçlü bir bölünme ve farklılaşma özelliğine sahiptir.

Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi aktivasyonunu sağlayan epidermal büyüme faktörü ligandları ERB-B reseptörlerine ilgi derecelerine göre sınıflandırılır.

Birinci grup ligandlar EGFR reseptörüne bağlanır. Bunlar epidermal büyüme faktörü, TGF-alfa (transforme edici büyüme faktörü) amphiregulin (AR), heparin binding-EGF (HB-EGF), betacellulin, epiregulindir. İkinci

grup cerbB-1 ve cerbB-4 reseptörlerine bağlanan betacellulin, HB-EGF, epiregulin ligandlarıdır.

EGF genelde hücre yüzeyinde bulunan özel reseptörlerine bağlanarak işlev görür. EGF reseptörleri O'Keefe ve arkadaşlarınca belirlenmiştir. Cohen tarafından izole edilmiştir (46)

Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi; EGFR (cerbB-1), cerbB-2, cerbB-3, cerbB-4 proteinlerinden oluşan 4 üye içermektedir. Reseptör, kan hücreleri dışında çok geniş hücre ve doku grubunda da tanımlanmıştır. cerbB-1 her üç germ hücre tabakasından kaynaklanan sağlıklı hücrelerden (deri, karaciğer, gastrointestinal sistem) eksprese olur. Trombosit degranülasyonu sırasında salınır (54). Epidermal büyüme faktörünün; epitel hücreleri endotel ve fibroblastlar için kemotaktik özelliği vardır. Anjiyogenezi ve kollagen aktivitesini uyarıcı özelliğe sahiptir (19). EGFR, malign hücrelerden de (kolon, baş-boyun, küçük hücreli olmayan akciğer, böbrek, meme, over, pankreas, mesane kanserleri ve gliyoma) eksprese olur. Örneğin normal hücrelerde EGFR ekspresyonu hücre başına 40-100 bin reseptördür. Malign epitelyal hücrede bu sayı artmıştır; meme kanserinde hücre başına 2 milyon EGFR'den bahsedilmektedir (32). Fizyolojik olarak cerbB-1 ve cerbB-2'nin eksprese olduğu hücre grubu oldukça geniştir. Ancak cerbB-3 ekspresyonu daha çok epitelyal ve nöroektodermal hücrelerde sınırlıdır. Bir grup EGFR varyantı da tanımlanmıştır. En iyi bilineni EGFRVIII' dir. cerbB-1'in aksine EGFRVIII; normal dokudan eksprese edilmez. EGFR, cDNA kolonu içerir. Bu hücre dizisi A-431 olarak tanımlanmıştır. A-431 hücreleri ilk kez vulvanın epidermoid karsinomlarında tanımlanmıştır.

170 kDa molekül ağırlığındaki ve glikoprotein yapısındaki EGFR; 3 ana birimden oluşmaktadır. Birinci kısım EGF' ü bağlayan hücre yüzeyindeki kısımdır. Sistein ve karbonhidratlardan zengindir. Karbonhidrat içeriği EGF'nin reseptöre bağlanmasında önemlidir. İkinci kısım hücre zarı boyunca uzanan orta parçadır. Üçüncü kısım ise karboksil uç olarak isimlendirilen sitoplazmik kısımdır. Sitoplazmik kısım reseptörün katalitik bölgesi sayılabilir. HER-2 (cerbB-2), 185 kD'luk

transmembran glukoproteinidir ve cerbB-1 ile yakından ilişkilidir. cerbB-1 ve cerbB-2 proteinleri tirozin kinaz ile %82'lik bir benzerlik gösterir. HER-3 (cerbB-3)'ün ligand bağlayıcı kısmı cerbB-1'e %40 benzer. Grubun son üyesi HER-4 (cerb B-4) ise heregulin-alfa ve beta için reseptördür.

EGFR, iki bağlanma alanı içeren tek bir polipeptid zincirinden oluşmuştur. 1186 aminoasit içerir. Bunun 621 aminoasitlik hücre yüzeyi bölgesi, 11 ve 12. konumlarındaki asparagin aminoasidinden glikolizlenmiştir ve EGF bağlanma bölgesine sahiptir. 542 aminoasit içeren sitoplazmik bölge karboksil uç olup, fosforile olabilme yetisindedir ve tirozin kinaz içerir. Bu kısım uyarımdan etkilenen ilk bölümdür.

EGFR' nin hem yapısal hem de işlevsel açıdan transforme edici proteinlerle ilişkisi vardır. Çoğu proteini tirozin aminoasitinden fosforile edebilme yeteneğindedir. Bu protein fosforilasyonu ise DNA sentezine neden olan bir uyarıcı olabilecektir.

Reseptörün tirozin kinaz bölgesi 694. aminoasitten başlayarak 250 aminoasitlik bölgeyi kapsar. Benzer tirozin kinaz aktivitesi diğer büyüme faktörleri ve onkogen ürünlerinde de bulunur. ATP bağlanma bölgesi 694. aminoasitten başlar. Tripsinle karşılaştırıldığında 150kDa ve 20kDa molekül ağırlığında iki parçaya ayrılır. Devamı halinde 150kDa'luk bölüm 110 ve 40 kDa'luk parçalara bölünür. 40 kDa'luk bölüm ATP bağlayabilen, otofosforile olan tirozin aktivitesinin %30'undan sorumludur. 1172 pozisyonundaki tirozin, EGF ile uyarılan önemli bir fosforilasyon bölgesidir. Bu arada 1068 ve 1148 pozisyonlarındaki tirozinler de fosforile olur.

Hücre dışında reseptörü ile birleşen EGF, reseptörün tirozine özgü protein kinaz bölgesini aktive ettikten sonra, hücrede bir seri reaksiyon ve fosforilasyon meydana gelir. Sonuçta EGF ve reseptörü sitoplazmaya geçer. Seçici bir yol olarak da EGF ve reseptör doğrudan çekirdeğe gider ve orada kopyalamayı başlatır.

Sitometrik veriler 1 mol EGFR' nin 2 mol EGF ile bağlandığını göstermektedir. Forbol esterleri, EGF'nin reseptörüne bağlanmasını azaltır. Bu etki protein kinaz C ve kalsiyum aracılığıyla olur. Forbol esterleri EGFR'nin internalize olmasını ve reseptozom oluşmasını sağlar.

Ancak bundan sonraki aşamada reseptör yıkıma uğrayarak yeniden hücre yüzeyine geri döner. Protein kinaz C'nin katalizlediği treoninin fosforilasyonu; EGF etkisini azaltır (15).

Retinoitler hücre çoğalmasını düzenlerler. Epidermal, fibroblastik ve embriyonal kanser hücrelerinde EGFR sayısını artırırlar.

EGFR, EGF'nin embriyonik formu olarak kabul edilen ve %40-44 aminoasitlik benzerlik gösteren TGF-alfa ile TGF-beta bağlanabilmesi için uygun bir reseptördür. Ancak reseptör bu 3 büyüme faktörü için farklı kromozomlar üzerindedir. İnsanlarda EGFR 4. kromozomda, TGF-alfa reseptörü de 2. kromozomda yerleşmiştir(13).

Kolorektal karsinomlarda hücre çoğalmasını kontrol eden K-ras, c-myc, APC, myb ve tümör supresör (p53, DCC) genlerinde pek çok değişiklik saptanmıştır. Epidermal büyüme faktörü ailesindeki değişiklikler de bunlardan biridir.

Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve transforming büyüme faktörü (TGF)-alfa gibi ligandlar EGFR' ye bağlanarak normal ve malign epitelyal hücrelerin büyümesine, diferansiyasyonuna, apoptozisin inhibisyonuna, anjiyogeneze, tümör hücre motilitesine ve metastaz üzerine etki ederler. EGFR, siklin D-1'i de indüklemektedir. Siklin D-1 ise hücre siklus progresyonunda önemlidir (54). Kolorektal karsinomda EGFR ekspresyonu hem ileri evre hem de derece ile koreledir (1). Yoğun EGFR ekspresyonu ortalama 5 yıllık sağkalımda kötü prognoz ile birlikte. Fazladan EGFR' ye sahip olmanın, kolon kanseri hücrelerinde çoğalmada artış ve kolon kanserli hastada daha kısa yaşam beklentisi ile bağlantılı bulunduğu bilinmektedir. Monoklonal antikolar; aşırı EGFR taşıyan kolon karsinomlarında aktivite gösterip, kemoterapi ile birlikte verildiğinde hayatta kalımı artırır. Kolon kanseri hücreleri modellerinde, anti-EGFR ve monoklonal antikoların kullanımı; sonuçta antiproliferatif etki ile sonuçlanır. Cetuximab, bu konuda en çok bilinendir. Cetuximab (IMC-C225), insan-mürin kimerik anti-cerbB-1 monoklonal antikordur. EGFR' nin ekstrasellüler parçasını hedef alır; yüksek spesifite ve affinitesi vardır. Baş-boyun ve kolon kanserlerinin tedavisinde kemoterapi veya radyoterapi

ile birlikte verildiğinde tedavi etkinliğini artırdığına dair birçok çalışma vardır (32).

Bu çalışmada; EGFR' ün primer kolorektal karsinomlardaki ekspresyonu ve elde edilen verilerin; söz konusu tümörlerin prognozunu saptamada ne derece etkili olduğu araştırılmıştır. Anlamli pozitiflikler ve prognozla ilişkisi; EGFR' ün hedeflendiği tedavi uygulamalarına yol gösterici olabilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda 1996-2007 yılları arasında GATA Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığı Patoloji Laboratuvarına gönderilen kolorektal karsinoma nedeniyle opere edilmiş olgulardan taranarak seçilen 55 olgu retrospektif olarak incelendi. Olgulara ait H&E boyalı arşiv preparatları tekrar değerlendirilerek immünohistokimyasal inceleme için uygun parafin bloklar seçildi.

3.1.a. Yaş-cinsiyet: Olgulara ait bu bilgiler patoloji raporlarından elde edildi.

3.1.b. Histolojik grade: Patoloji raporlarından elde edildi. Glandüler yapılanmaya göre; az, orta, iyi diferansiye adenokarsinoma ve klasik adenokarsinomalardan daha kötü seyirli olduğu için ayrı bir grup olarak değerlendirilen müsinöz adenokarsinoma şeklinde sınıflandırıldı.

3.1.c. Lokal invazyon: H&E boyalı preparatlar yeniden değerlendirilerek lokal invazyon derecesine göre;

pT1: submukozaya invaze tümörler

pT2: muskularis propriaya invaze tümörler

pT3: subseroza ya da perikolik /perirektal dokuya invaze tümörler

pT4: komşu organ ya da yapılara invaze tümörler şeklinde gruplandırıldı.

3.1.d. Damar invazyonu: H&E boyalı preparatlar yeniden değerlendirilerek damar invazyonu bulunan tümörler (+), bulunmayanlar (-) olarak gruplandırıldı.

3.1.e. Perinöral invazyon: H&E boyalı preparatlar yeniden değerlendirilerek perinöral invazyon bulunan tümörler (+), bulunmayanlar (-) olarak gruplandırıldı.

3.1.f. Lenf bezi tutulumu: Patoloji raporlarından elde edildi. Lenf bezi metastazı olup olmamasına göre (+) veya (-) olarak değerlendirildi.

3.1.g. Evre: Evrelendirmede TNM sistemi kullanıldı.

Evre I, II, III, IV olarak gruplandırıldı.

3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM

Olguların EGFR ekspresyonlarını belirlemek için formalin ile fikse parafine gömülü dokulardan Poly-L-Lysine ile kaplı lamlara 5 mikronluk kesitler alındı. Tüm kesitler deparafinize edilmek üzere etüvde 65-70 derecede 30 dakika bekletildi. Etüvden çıkarılan lamlar önce 15 dakika içinde 3 ksilenden geçirilmek suretiyle devam eden deparafinizasyondan sonra yine 15 dakika içinde 3 farklı absolu alkolden geçirilerek kesitler hidrate edildi. Distile suda 5 dakika yıkandı. Mikrodalga fırında 3 defa 5 dakika EDTA buffer uygulaması yapıldı. Mikrodalgadan sonra 20 dakika oda ısısına gelene kadar bekletildi. Distile su ile yıkandı. 5-10 dakika PBS (phosphate buffered saline)'de bekletildi. %3' lük peroksit ile 10 dakikalık inkübasyondan sonra tekrar PBS'de 10 dakika bekletildi. Ultra V Blok damlatılarak 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Ultra V Blok damlatıldıktan sonra yıkamadan dokuların etrafındaki ıslaklık kurulanıp, EGFR (NeoMarkers clone 111.6) primer antikoru damlatılarak 30 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı. 10 dakika PBS'de bekletildi. "Biotinylated goat antiserum" ile 20 dakika inkübe edildi. Yine 10 dakika PBS'den geçirildikten sonra kurulanarak, streptavidin (pembe renkli) solüsyon damlatıldı ve 20 dk bekletildi. 5-10 dakika AEC kromojen damlatılarak renk alıncaya kadar inkübasyona bırakıldı. Renk alan lamlar distile su ile yıkandı 5 dakika hematoksilende bekletildi. Tekrar 5 dakika distile su ile yıkandıktan sonra dokulara zarar vermeden kenarları silindi ve ultramount ile kapatıldı. EGFR antikorumuzun ekspresyon gösterip göstermediğini,

pozitif işaretlenmenin sitoplazmik ve/veya membranöz olduğunu saptamak için pozitif kontrol olarak, normal kolon mukozası ve plasenta kullanıldı.

İmmünohistokimyasal olarak uygulanan EGFR; ışık mikroskopunda değerlendirildi. Tüm olgularda tümör hücreleri immünohistokimyasal işaretleyicilerle boyanma şiddetine, dolayısıyla EGFR ekspresyon şiddetine ve yüzdesine göre gruplandırıldı. Bu grupların, tümörün yüzde kaçını oluşturduğu hesaplandı.

EGFR immün boyaması aşağıdaki kriterlere (boyanma yüzdesine ve şiddetine) göre değerlendirildi;

Sitoplazmik ve/veya membranöz boyanma yüzdesine göre;

0: Boyanma yok

1: % 1- 25 tümör hücresinin boyanması.

2: %26- 75 tümör hücresinin boyanması.

3: % 75'den fazla tümör hücresinin boyanması

Sitoplazmik ve/veya membranöz boyanma şiddetine göre;

1: hafif yoğunluk (normal kolon mukozası boyanmasına göre hafif yoğunlukta boyanma).

2: orta yoğunluk (normal kolon mukozası ile aynı yoğunlukta boyanma).

3: belirgin yoğunluk (normal kolon mukozası boyanmasından daha fazla yoğunlukta boyanma).

3.3. WESTERN İMMUNOBLOTLAMA METODU

EGFR antikorumuzun hangi molekül ağırlığında ve sitoplazmik ve/veya membranöz reaktivasyonunu doğrulamak için western blot analizi yapıldı. Kanseri dokuları sıvı azotta saklandı. Dokulardan protein ekstraksiyonu yapıldı. Kısaca dokular NP40 lizis buffer içinde homojenize edildi. Elde edilen homojenat santrifüj edilerek sitoplazmik proteinler (süpernatant içinde) alındı. Tüpün dip kısmındaki pelletten (membranöz parçalar) lizis buffer içine SDS eklenerek tekrar protein ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen sitoplazmik ve membranöz proteinler %10 luk SDS

PAGE hazırlanarak elektrofez metodu ile yürütüldü. Gel PVDF membrana blotlandı. PVDF membran % 3-5 Powder Milk solusyonu ile bloklandıktan sonra EGRF primer antikoru ile bir gece +4 °C de inkübe edildi. Ertesi gün anti-rabbit sekonder antikor ile inkübe edildikten sonra ECL-Plus chemiluminescence metodu ile immuno pozitiflik belirlenerek resim çekildi. Huh7 hepatosellüler karsinoma hücre hattı proteinleri negatif kontrol, FLC4 iyi differansiye hepatosellüler karsinoma (çok iyi diferansiye, normal hepatosit olarak kabul edilmekte) hücre hattı proteinleri pozitif kontrol olarak kullanıldı.

3.4. İSTATİSTİKSEL İNCELEME

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için “SPSS 10.0 for Windows” paket programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlar için %, ortalama $\pm$ standart sapma kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-kare testi kullanıldı. P değerinin 0.05’ den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1.a. Cinsiyet

Çalışma kapsamına alınan 55 hastadan 30 (% 54.5)’u erkek, 25 (%45.4)’i kadındır (Şekil 1.).

4.1.b. Yaş

Olgular 21 ile 85 yaşları arasında olup; ortalama yaş 57.89 ± 13.40 idi. (Şekil 2.).

4.1.c. Histolojik Derece

Tümörlerin 3 (%5.4)' ü iyi diferansiye, 44 (%80)' ü orta derecede diferansiye, 5 (%9.09)' i az diferansiye ve 3 (%5.4)' ü müsinöz adenokarsinomadır (Şekil 3.).

4.1.d. Lokal invazyon

3 (%5.4) olgu T2, 51 (%92.7) olgu T3, 1 (%1.81) olgu T4'dür (Şekil 4.).

4.1.e. Evre

Olguların 32 (%58.1)' si grup 1'de (evre I veya II), 23 (%41.8)' ü grup 2'de (evre III veya evre IV) yer almaktadır (Şekil 5.).

4.1.f. Lenf Nodu Metastazı

24 (%43.6) olguda metastaz mevcut iken; 31 (%56.3) olguda metastaz saptanmamıştır (Şekil 6.).

4.1.g. Vasküler İnvazyon

27 (%49.09) olguda mevcut olup; 28 (%50.9) olguda görülmemiştir. (Şekil 6.).

4.1.h. Perinöral İnvazyon

21 (%38.1) olguda mevcut olup, 34 (%61.8) olguda görülmemiştir. (Şekil 6.).

4.1.i. EGFR Ekspresyonu

İmmünohistokimyasal inceleme ile yapılan çalışmada tüm olguların %84' ünde EGFR ekspresyonu saptanmıştır (Şekil 7). Olguların 25 (45.4)' inde +1, 16 (29.09)' inde +2, 5 (%9.09)' inde +3 boyanma saptanırken; 9 (%16.3)' unda EGFR ile boyanma olmamıştır (Tablo 7). 26 olguda (%47) hafif, 16 olguda (%29) orta ve 4 olguda (%7.2) belirgin yoğunlukta boyanma görülmüştür (Tablo 7).

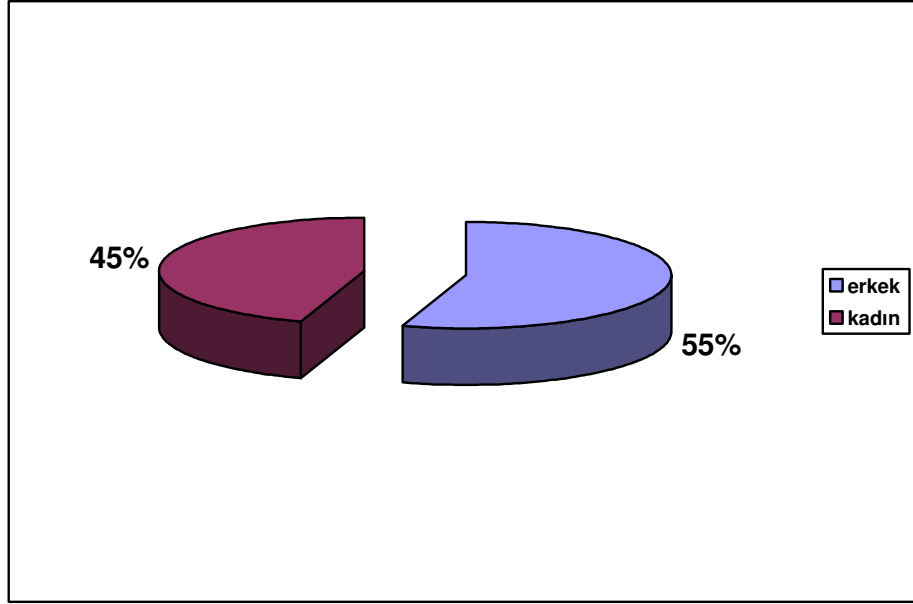
4.1.j. EGFR' nin Western Metodu ile İmmünoiblotlaması.

2 adet kolon adenokarsinoma dokularımızın sitoplazmik parçalarından elde edilen proteinlerde EGFR antikoru ~ 55 kDa büyüklüğündeki bir proteini spesifik olarak tanıdığı gösterilmiştir. Membranöz parçalardan elde edilen proteinlerde EGFR pozitifliğine rastlanmamıştır. Pozitif kontrol olarak FLC4 hücre hattı membranöz proteinlerinde ise EGFR' nin ~170 kDa' luk bir proteini spesifik olarak tanıdığı gösterilmiştir (Şekil 8).

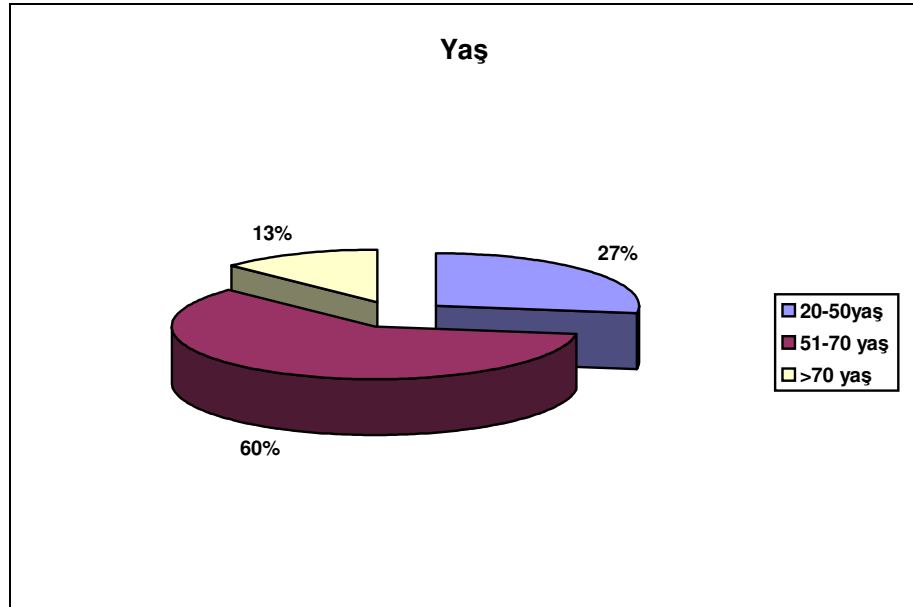
Olgulara ait klinik ve histolojik parametreler Tablo 7' de sunulmuştur.

Tablo 7.

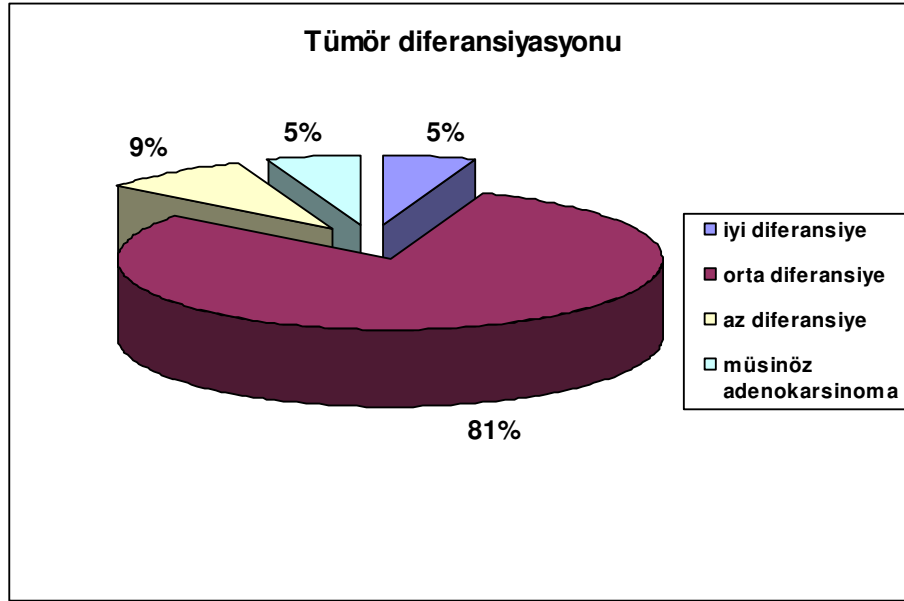
		n	%
Yaş	20-50	15	27.2
	51-70	33	60
	>70	7	12.7
Cinsiyet	Erkek	30	54.5
	Kadın	25	45.4
Histolojik Grade	Az	5	9.09
	Orta	44	80
	İyi	3	5.4
	Müsinöz	3	5.4
Lokal invazyon	T2	3	5.4
	T3	51	92.7
	T4	1	1.8
Evre	1 (evrel ve II)	32	58.1
	2 (evrelIII ve IV)	23	41.8
Lenf nodu tutulumu	var	24	43.6
	yok	31	56.3
Vasküler invazyon	var	27	49
	yok	28	50.9
Perinöral invazyon	var	21	38.1
	yok	34	61.8
EGFR Ekspresyonu % 'si	0: yok	9	16.3
	+1(%1-25)	25	45.4
	+2(%25-75)	16	29
	+3(%75 üzeri)	5	9
EGFR ekspresyonu şiddeti	yok	9	16.3
	hafif	26	47.2
	orta	16	29
	yoğun	4	7.2



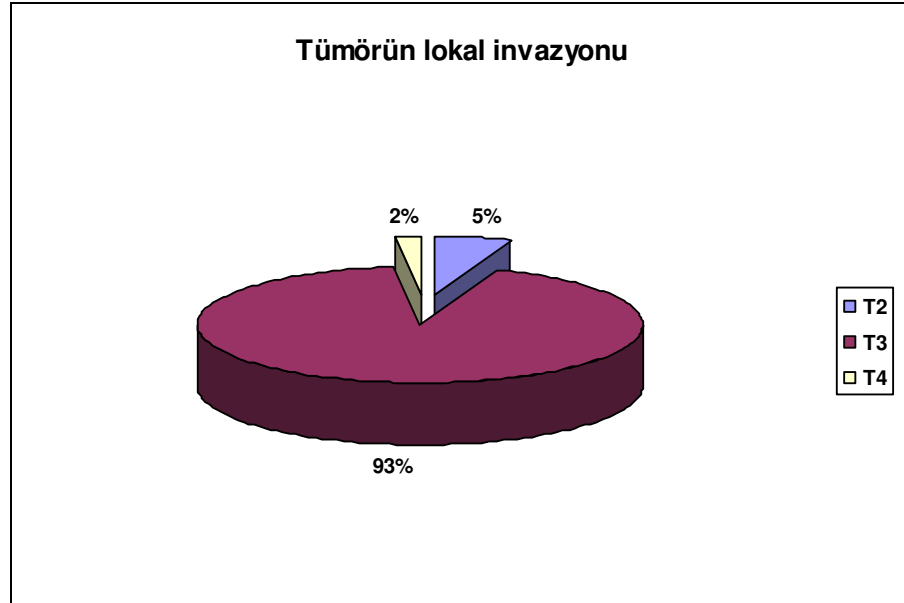
Şekil 1. Cinsiyetlere göre kolorektal adenokarsinom dağılım grafiği.



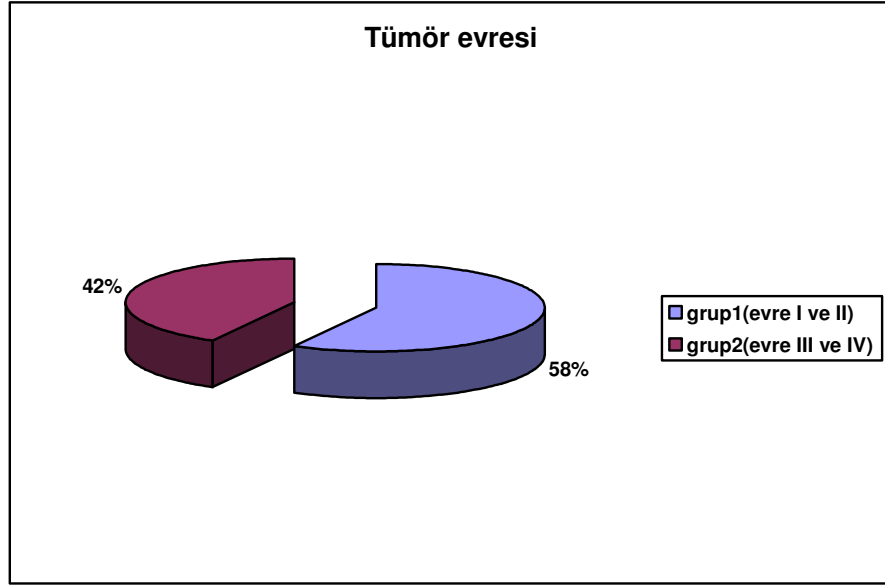
Şekil 2. Yaşa göre kolorektal adenokarsinoma dağılım grafiği.



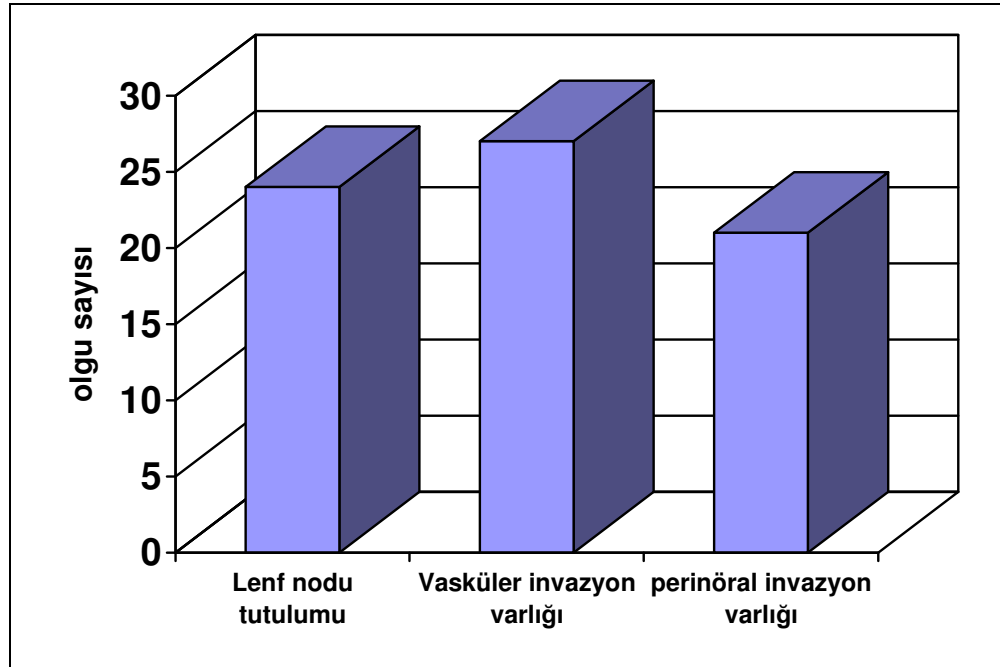
Şekil 3. Histolojik diferansiyasyona göre kolorektal adenokarsinoma dağılım grafiği.



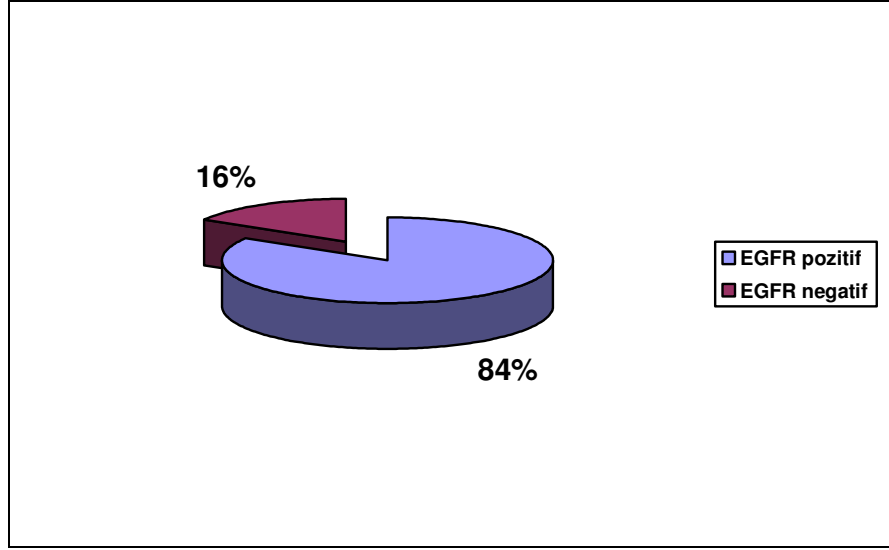
Şekil 4. Lokal invazyonlara göre kolorektal adenokarsinoma dağılım grafiği



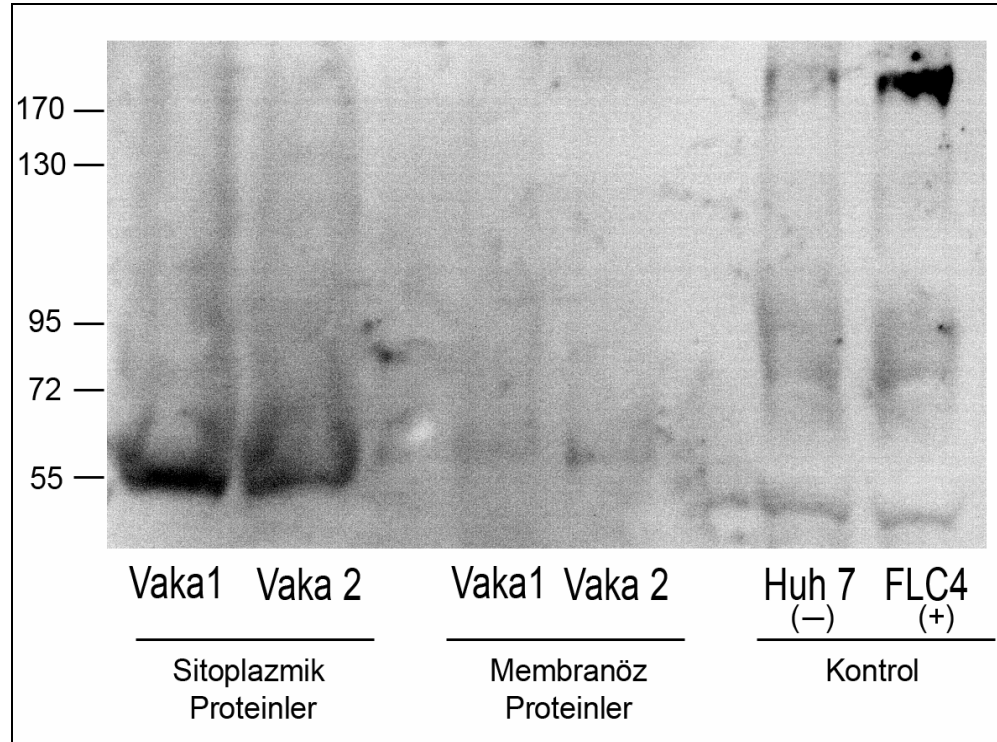
Şekil 5. Tümör evresine göre kolorektal adenokarsinoma dağılım grafiği.



Şekil 6. Lenf nodu, vasküler ve perinöral tutulumuna göre kolorektal adenokarsinoma dağılım grafiği.



Şekil 7. Olguların EGFR ekspresyonu dağılım grafiği



Şekil 8. EGFR Western immünoiblamlama metodu ile gösterilmesi.

EGFR ekspresyonunun yaygınlık yüzdesi, boyanma yoğunluğu ve yaygınlık-yoğunluk skorunun tümör derecesine göre dağılımları tablo 8 ve tablo 9' dadır.

Tablo 8. Tümör Derecelerine Göre EGFR ekspresyonunun Yaygınlık Yüzdesi ve Yoğunluk Değerlerinin Dağılımı.

Tümör derecesi (olgu sayısı)	Yaygınlık değeri (olgu sayısı)	Yoğunluk değeri (olgu sayısı)
İyi (3)	0 (0) +1(1) +2(1) +3(1)	0 (0) 1 (1) 2 (1) 3 (1)
Orta (44)	0(8) +1(19) +2(13) +3(4)	0 (8) 1 (21) 2 (13) 3 (2)
Az (5)	0(1) +1(3) +2(1) +3(0)	0 (1) 1 (2) 2 (1) 3 (1)
Müsinöz (3)	0(0) +1(2) +2(1) +3(0)	0 (0) 1 (2) 2 (1) 3 (0)

Yaygınlık değeri: +3= >%75, +2= %26-75, +1= %1-25, 0=yok

Yoğunluk değeri: 3=belirgin, 2= orta, 1= hafif

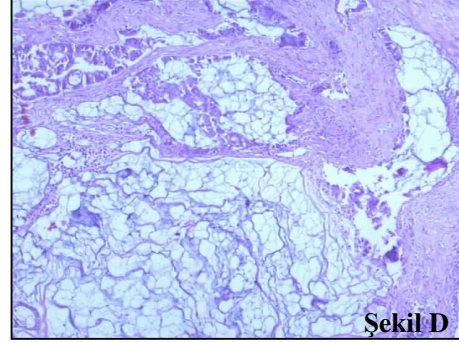
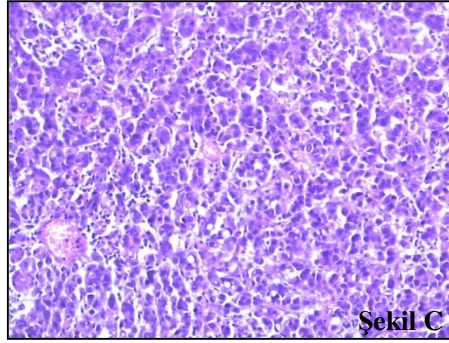
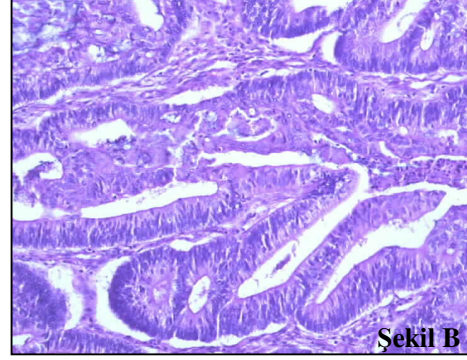
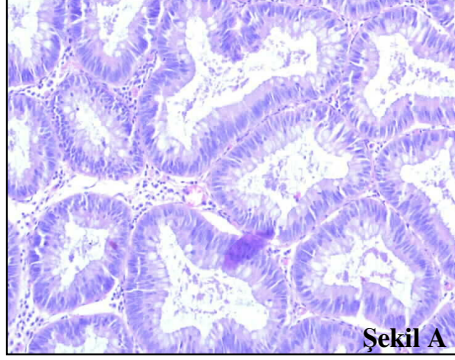
Tablo 9. Tümör Derecelerine Göre EGFR Ekspresyonunun Yaygınlık – Yoğunluk Skorları.

Tümör derecesi (olgu sayısı)	Yaygınlık yoğunluk skoru (olgu sayısı)
İyi (3)	<6 (2) ≥6 (1)
Orta (44)	0 (8) <6 (30) ≥6 (6)
Az (5)	0 (1) <6 (4) ≥6 (0)
Müsinöz (3)	<6 (3) ≥6 (0)

Tablo 10. EGFR ekspresyonunun yaygınlık yüzdesi, yaygınlık-yoğunluk skorunun klinik ve patolojik parametrelere göre dağılımları.

		EGFR Yaygınlık %' si				p	EGFR Skoru		P
		0	1-25	26-75	> 75		≥6	<6	
		n(%)	n(%)	n(%)	n(%)		n(%)	n(%)	
Yaş	20-50	3(20.0)	6(40.0)	6(40.0)	-	0.792	1(6.7)	11(73.3)	0.940
	51-70	5(15.2)	16(48.5)	8(24.2)	4(12.1)		5(15.2)	23(69.7)	
	>70	1(14.3)	3(42.9)	2(28.6)	1(14.3)		1(14.3)	5(71.4)	
Cinsiyet	Erkek	6(20.0)	10(33.3)	11(36.7)	3(10.0)	0.258	4(13.3)	20(66.7)	0.698
	Kadın	3(12.0)	15(60.0)	5(20.0)	2(8)		3(12)	19(76)	
Histolojik grade	İyi	-	1(33.3)	1(33.3)	1(33.3)	0.865	1(33.3)	2(66.7)	0.727
	orta	8(18.2)	19(43.2)	13(29.5)	4(9.1)		6(13.6)	30(68.2)	
	az	1(20.0)	3(60.0)	1(20.0)	-		0	4(80)	
	müsinöz	-	2(66.7)	1(33.3)	-		0	3(100)	
Lokal invazyon	T2	-	1(33.3)	1(33.3)	1(33.3)	0.692	1(33.3)	2(66.7)	0.736
	T3	9(17.6)	23(45.1)	15(29.4)	4(7.8)		6(11.8)	36(70.6)	
	T4	-	1(100)	-	-		0	1(100)	
Vasküler invazyon		3(11.1)	13(48.1)	8(29.6)	3(11.1)	0.748	4(14.8)	20(74.1)	0.563
Perinöral invazyon		2(9.5)	11(52.4)	6(28.6)	2(9.5)	0.720	3(14.3)	16(76.2)	0.557
Lenf nodu tutulumu		4(16.7)	12(50.0)	7(29.2)	1(4.2)	0.722	2(8.3)	18(75)	0.688
Evre	I ve II	5(15.6)	13(40.6)	10(31.3)	4(12.5)	0.678	5(15.6)	22(68.8)	0.748
	III ve IV	4(17.4)	12(52.2)	6(26.1)	1(4.3)		2(8.7)	17(73.9)	

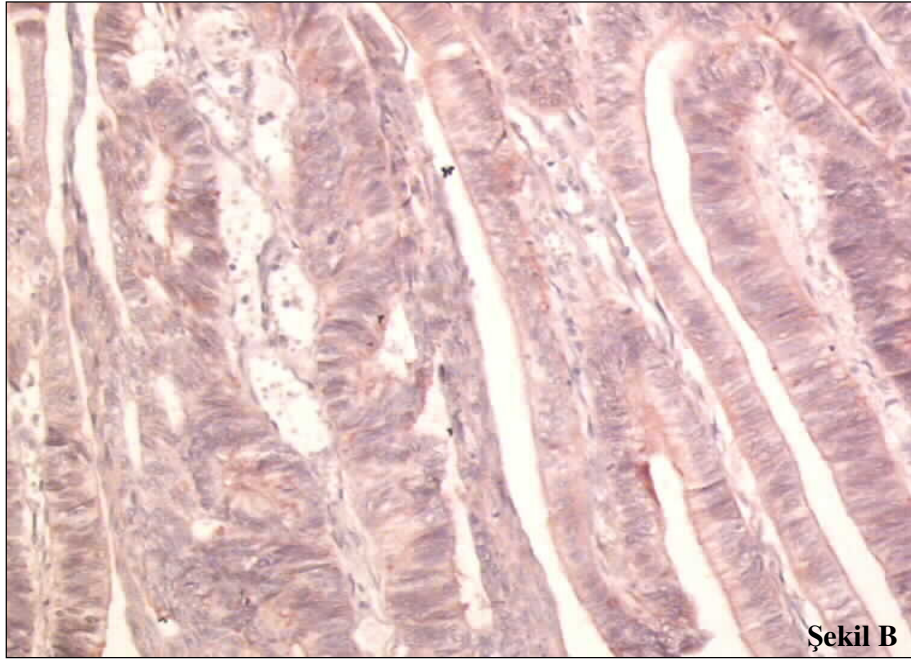
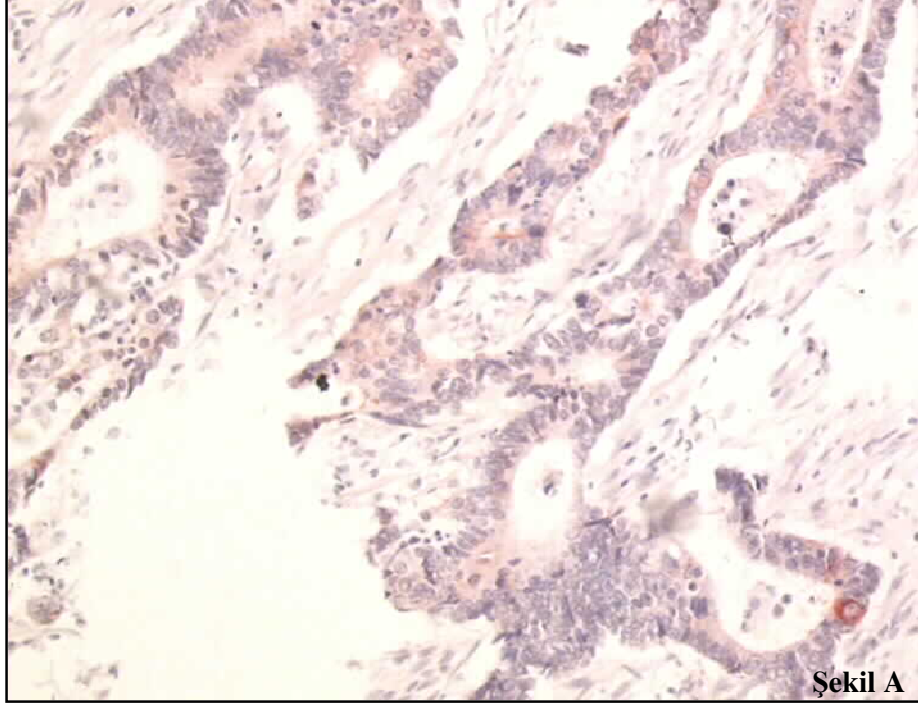
Kolorektal adenokarsinomların “histolojik grade” lerine göre morfolojik özelliklerin mikroskopik görünümüleri şekil 9’ da gösterilmiştir.

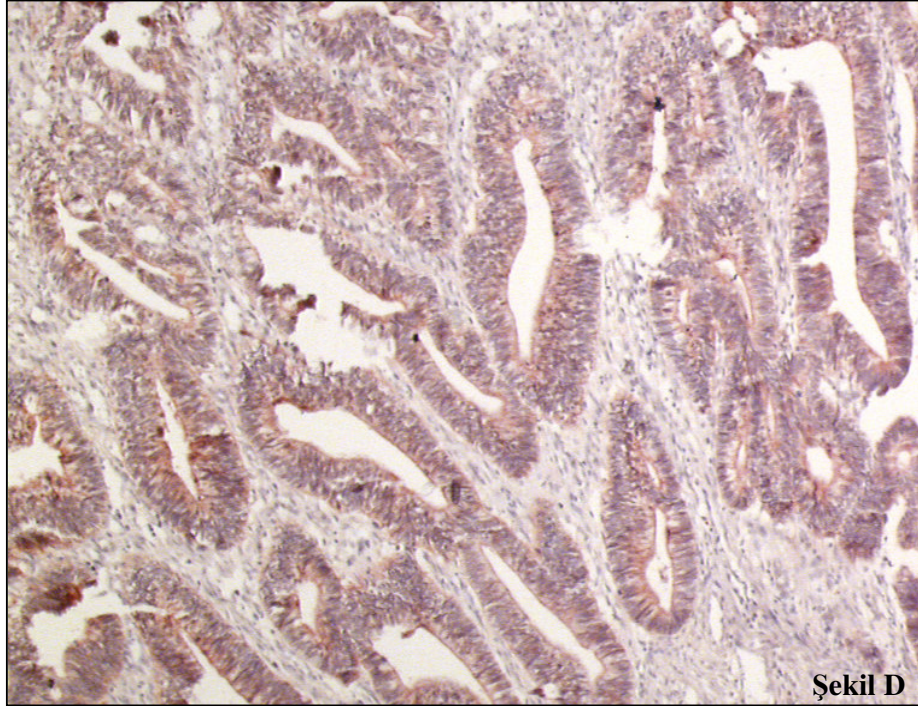
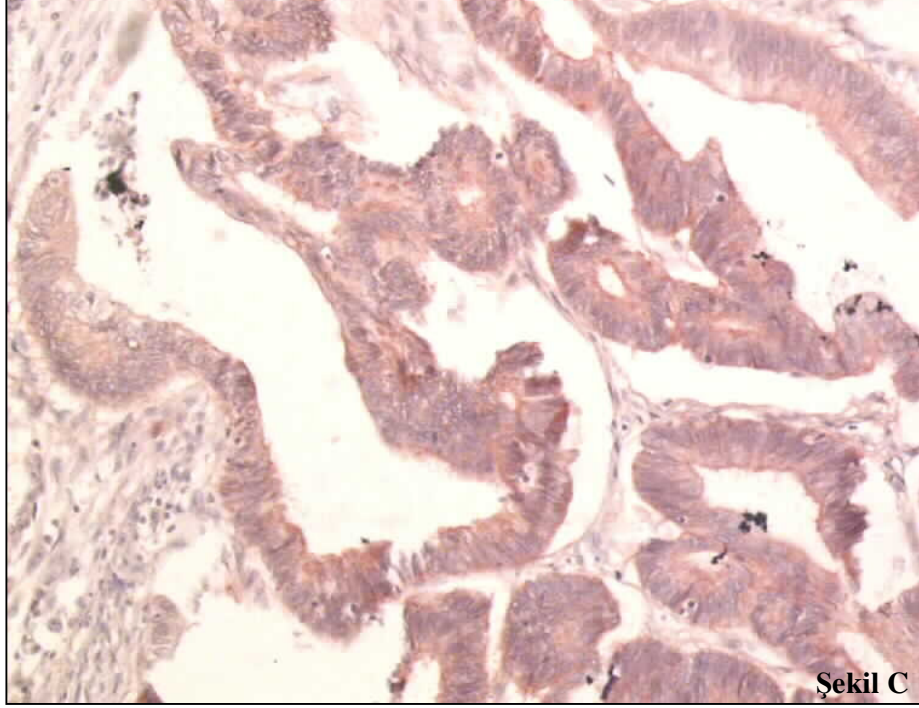


Şekil 9. Kolorektal adenokarsinomların “histolojik grade” lerine göre morfolojik görünümüleri.

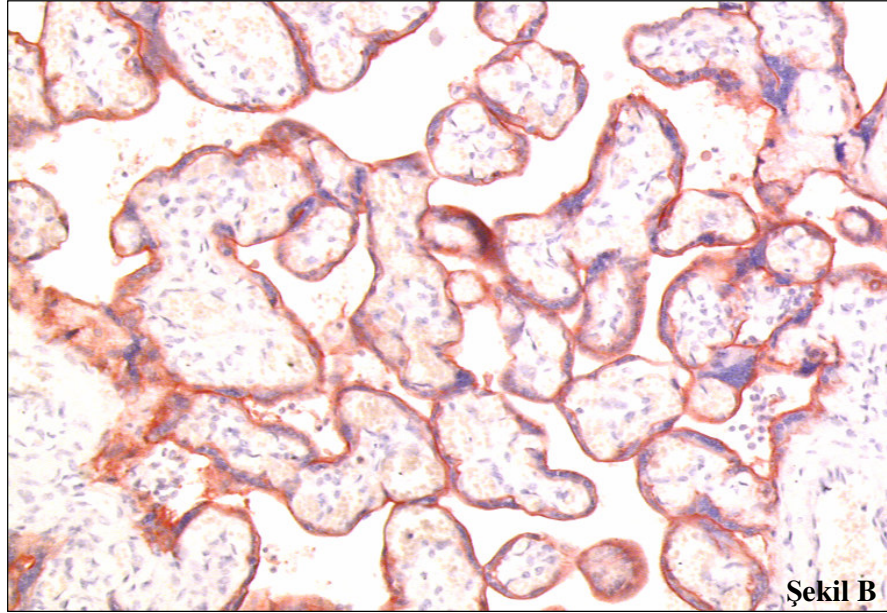
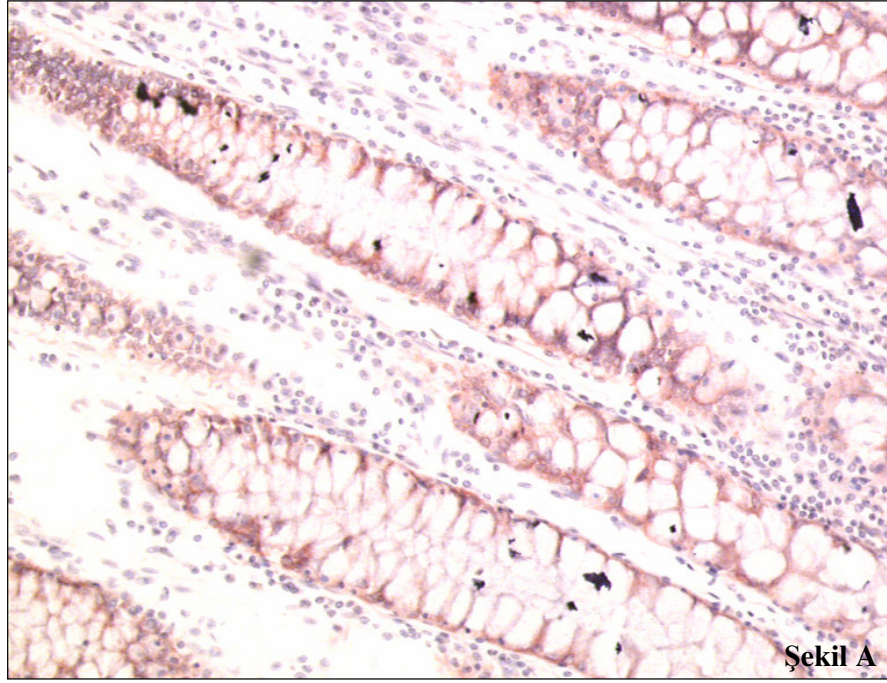
A: İyi diferansiye adenokarsinoma B: Orta diferansiye adenokarsinoma
C: Az diferansiye adenokarsinoma D: Müsinöz adenokarsinoma.

İmmünohistokimyasal incelemede saptanan EGFR ekspresyonunun yoğunluk değerlerine ait mikroskopik görünümler şekil 10' da gösterilmiştir.





Şekil 10. EGFR ekspresyonunun yoğunluğuna göre mikroskopik görünimleri.
A: hafif yoğunluk B: orta yoğunluk C: belirgin yoğunluk D:belirgin yoğunluk.



Şekil 11. A: kontrol EGFR boyanma için kullandığımız normal kolon mukozası
B: kontrol boyanma için kullandığımız plasenta

5. TARTIŞMA

Toplumda görülme sıklığı açısından önemli yer tutan kolorektal karsinomlar, kanserle ilişkili mortalite sıralamasında kadın ve erkeklerde dördüncü sırayı almaktadır. Dünyada yılda 900 binden fazla yeni vaka bildirilmekte ve yaklaşık 500 bin kişi kolorektal karsinom nedeniyle kaybedilmektedir (27). Kolorektal karsinomların büyük çoğunluğunun adenoma zemininden geliştiği kabul edilmektedir.

Kolorektal kanserlerde görülen yüksek ölüm sıklığının tedavi seçimini yönlendiren evreleme sisteminin yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle kolorektal kanserlerde kemoterapiden fayda görecekt hastaların seçimini sağlayacak yeni biyolojik ve genetik belirleyicilere ihtiyaç vardır (27,33).

Aynı zamanda tümör oluşumunun sürecini en iyi yansıtan kolorektal kanserler bu süreç içinde oluşan genetik ve biyolojik değişikliklerin araştırılmasına da uygun ortam sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda kolorektal kanser gelişiminde etkili olan myb, c-myc, APC, K-Ras ve tümör supressör genleri p53 gibi genlerde çeşitli genetik değişiklikler yayınlanmıştır (49).

EGFR (cerbB-1) onkoproteini, tirozin kinaz aktiviteli büyüme faktörü reseptör ailesine ait glikoprotein yapıda transmembran reseptörüdür. Bu reseptör ailesinde EGFR (cerbB-1), cerbB-2, cerbB-3 ve cerbB-4 reseptörlerinden oluşan toplam 4 üye bulunmaktadır. Bu reseptörler, geniş oranda epitelyal, mezenşimal ve nöronal dokudan eksprese edilirler (57).

EGFR; hücrel farklılaşma, proliferasyon ve anjiyogenezi düzenlediği için tümör oluşumunda önemli bir reseptördür. Yapılan çalışmalar sonucunda EGFR' nin artmış ekspresyonu pek çok solid tümörde kötü prognoz ile ilişkisi bulunmuştur (1,52,54).

Retrospektif olarak düzenlenen bu çalışmadaki amaç; değişik histolojik tip ve evredeki kolorektal karsinomlu olgularda EGFR ekspresyon durumlarının; hastaların cinsiyetleri, tanı anındaki yaşları, tümör

lokalizasyonları, histolojik diferansiyasyonları, lenf nodu metastazları, vasküler ve perinöral invazyonları ile ilişkilerini değerlendirmektedir.

Literatürde EGFR ekspresyonu ile histolojik derece ilişkisini karşılaştıran temel çalışmalara göre histolojik derece ile EGFR ekspresyonu arasında anlamlı ilişki yoktur (3,26,68).

Ancak birkaç çalışmada EGFR ekspresyonunun orta ve az diferansiye tümörlerde yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir (39). Spano ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise; iyi diferansiye kolorektal adenokarsinomlarda EGFR ekspresyonunun artmış olduğu bildirilmiştir (25).

EGFR pek çok hücre tipinde ve sağlıklı üroepitelin bazal tabakasında saptanmıştır. Mesanenin değişici epitelyum hücreli kanserlerinde de EGFR belirlenmiş olup; tümörün artan evre ve histolojik derecesine paralel olarak EGFR ekspresyonunda artma saptanmıştır. Ancak yüzeysel tümörler ile invaziv tümörler arasında anlamlı farklılıklar saptanmıştır.

Tüm meme kanserlerinin yaklaşık yarısında EGFR'nin aşırı üretimi saptanır; ancak amplifikasyon oranı %0-14 arasında değişmektedir (28).

EGFR ekspresyonunun özellikle invaziv lobüler karsinomlu hastalarda daha önemli olduğu, EGFR ekspresyon seviyesi yüksek olan bu hastalarda diğer meme kanser alt tiplerine göre yaşam süresinin çok kısa olduğu bildirilmiş ve bu tip için EGFR'nin önemli bir prognostik belirteç olabileceği vurgulanmıştır (55).

EGFR kolonda hiperproliferasyon ve karsinogeneizde önemli rol oynar. Bununla birlikte prognostik önemini anlamaya yönelik çalışmalar yeterli değildir (1,30,39).

EGFR inhibitörlerinin; tümör proliferasyonunu inhibe ettiği ve bazı vakalarda apoptozu arttırdığı gözlenmiştir (39). Bu da EGFR' nin inhibitörlerine olan ilgiyi arttırmaktadır. EGFR inhibisyonu; antiproliferatif etkilerine ek olarak metastatik aktiviteyi geciktirebilir, radyasyonla indüklenmiş apoptozu artırır ve hücre siklusunun G1 fazında durdurulmasını indükleyerek radyasyon hasarlı hücrelerin onarılmasının

gerçekleştirdiği G2/M fazına girmelerini önler (22). Tüm bunlara karşı bazı neoplazmlardaki artmış EGFR ekspresyonunun altında yatan sebepler açık değildir (18,30).

Çeşitli çalışmalarda EGFR' nin küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde % 43 ile % 89 oranlarında eksprese olduğu bildirilmiştir. Ayrıca rezeke edilmiş erken evre küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde EGFR ekspresyonu kötü prognostik faktör ile birlikte olduğu bildirilmiştir (35,56).

Astrositomlarda EGFR ekspresyonu kötü prognozu işaret eder. Glioblastoma multiforme başta olmak üzere malign gliomların çoğunda EGFR ekspresyonu artmıştır. Jaros ve arkadaşlarının 43 olguluk çalışmasında EGFR ekspresyonu grade II tümörlerde %33, grade III tümörlerde % 85, grade IV' de ise %95' dir (23)

EGFR; pek çok karsinom tipinde özellikle kolorektal adenokarsinomada fazlaca eksprese edilir ve daha agresif histolojik tip ve ileri evre ile birlikte dir. EGFR aşırı ekspresyonu ile tümör evresi arasında anlamlı birliktelik bulunmasına karşın EGFR ekspresyonunun spesifik ve tüm yaşam süresi için bağımsız bir prognostik faktör olabileceği gösterilememiştir (25).

Spano ve arkadaşlarının yaptığı 150 olguluk kolorektal adenokarsinomada EGFR reaktivitesi 143 (%97) hastada (+) bulunmuş ve 118 (%80) hastada ise yüksek düzeyde ekspresyon saptanmıştır. EGFR aşırı ekspresyon oranları TNM T3' lülerde T4' lülerden daha fazla (%85' e % 59) bulunmuştur. TNM evre III kolorektal adenokarsinomlar için EGFR aşırı ekspresyonunun anlamlı düzeyde olduğunu gösteren en geniş çalışmadır. Primer tümörün vasküler invazyon ve perinöral invazyonu ile EGFR (+) liği arasında anlamlı korelasyon bulunamamıştır (25).

EGFR; kemoterapinin kolorektal karsinomlu hastalar için bir adjuvan tedavi olabileceği konusunda major prognostik faktör olmasa da stage T3 hastalığıdaki major aşırı ekspresyonu; EGFR hedefli tedavileri gündeme getirmeye yeterdir (25).

Spano ve arkadaşları; EGFR aşırı ekspresyonunun kötü prognoz veya daha kısa survi ile birlikteliğini gösterememişlerdir (25).

Kolorektal adenokarsinomlu hastalarda EGFR oranları %25 ile %77 arasında artar EGFR ekspresyonu oranlarındaki bu farklılık; teknikler arasındaki farkla ilişkilidir (18,37).

Tümörün değişik bölgelerindeki EGFR ekspresyonu yönüyle fark olmadığı (18) belirtilmiş, sadece bir çalışmada (29) distal kolonda, rektuma göre daha yüksek EGFR ekspresyonu izlenmiştir.

Ekspresyon – aşırı ekspresyon ile parametreler arasındaki muhtemel ilişki halen belirsizdir. EGFR ekspresyonunun daha ileri evre hastalıkla korele olduğu, metastaz riskini arttırdığı, tümör evresini ilerlettiği, yüzeysel olanlarla karşılaştırıldığında daha derin invazyonlu olanlarda daha anlamlı düzeyde eksprese olduğu ve mezenterik lenf nodu tutulumunda daha yüksek oranlarda eksprese olduğu rapor edilmiştir (18,26,51).

Klinik bir çalışmada EGFR ekspresyonunun stage IV kolorektal karsinomlu hastalarda kötü prognozla birlikte olduğu bildirilmiştir (18).

Spano ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada EGFR ekspresyonu ile iyi diferansiye kolon kanserlerinde anlamlı bir ilişki bulunmuştur (25).

Spano ve arkadaşlarının çalışmasında yüksek EGFR ekspresyonu ve tanı aşamasındaki TNM tümör evresinin anlamlı birlikteliği; EGFR aşırı ekspresyonu ile tümör invazyonu ilişkisini doğrular. Bu çalışma; TNM stage III için EGFR aşırı ekspresyonunun anlamlı düzeyde olduğunu gösteren en geniş çalışmadır. Bu sonuç Goldstein ve Armin'in (18) sonuçlarıyla da örtüşür ki bu iki araştırmacı ilk kez EGFR ekspresyonun; tümörün derin zonlarında yüzeysel ve luminal zonlara kıyasla anlamlı düzeyde fazla olduğunu göstermiştir.

EGFR ekspresyonu; kolorektal karsinom için prognostik bir faktör olarak kabul edilmese de tümör hücre proliferasyonunda önemli bir role sahiptir (64). Stage II kolorektal tümörlerde de (ki bu durumda kemoterapi standart bir seçenek değildir). eksprese edilir. Bu durum bu spesifik hasta popülasyonunda EGFR inhibitörlerinin etkinliğinin test edilmesi fırsatını sunar (36).

EGFR ekspresyonun prediktif değeri halen ispatlanamamıştır. Sinyalizasyon yolları ve EGFR somatik mutasyonları gibi basit EGFR tespit tekniklerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (31).

Cunningham ve arkadaşlarının çalışmasında; kolorektal adenokarsinoma olgularında EGFR ekspresyonu % 8- 100' ünde rapor edilmiş ve tümör stage - grade ve tümör lokalizasyonu ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (12).

Primer tümör ve metastatik lenf nodu ile EGFR ekspresyonu arasında korelasyon anlamlı değildir. Primer tümörün EGFR ekspresyonu metastatik lenf nodu durumunu yansıtmayabilir. Bu; tümör yayılımının doğal süreci sırasında görülen metastatik hücrelerin diferansiyasyonu ile açıklanabilir (45).

İmmunohistokimyasal inceleme ile yapılmış diğer organ tümörlerini içeren Neal ve arkadaşlarının çalışmasında; artmış EGFR ekspresyonunun mesane tümörlerinde invazyon; meme ve özofagus kansinomlarında kötü prognoz, akciğer küçük hücreli olmayan kansinomlarında diferansiyasyon azlığı, yüksek büyüme hızı ve yüksek metastatik oranı ile ilişkisi gösterilmiştir (22,55).

EGFR reaktivitesinin lenf nodu ve karaciğer metastazı ile ilişkili olduğunu gösteren çalışma da mevcuttur (18).

Kolon adenokarsinomlarında yapılan 31 vakalık çalışmada, EGFR' nin artmış ekspresyonunun gen amplifikasyonu ile birlikteliği gösterilememiştir (30).

Renal hücreli kansinomlarda yapılan kombine immünohistokimyasal inceleme ve FISH çalışmasında immünohistokimyasal olarak saptanan protein artışı ile gen kopya sayısında olan değişiklikler arasında ilişki bulunamamıştır (40).

Cui ve arkadaşları; 28 adet prostat adenokarsinomu üzerinde yaptığı çalışmada EGFR' nin artmış ekspresyonuna eşlik eden EGFR gen amplifikasyonu gösterilememiştir (58).

Bu tezin konusu olan EGFR ekspresyonunun, kolorektal adenokarsinomaların derecesi ile olan ilişkisi yanısıra EGFR

ekspresyonunun kolorektal adenokarsinomlar için prognostik değerinin olup olmadığı araştırma fikrine Spano, Alok ve arkadaşlarının yaptığı iki çalışma dayanak olmuştur (1,25).

Tez çalışmasına farklı dört tümör derecesine sahip örnekler (5 olgu az diferansiye, 44 olgu orta diferansiye, 3 olgu iyi diferansiye, 3 olgu müsinöz adenokarsinoma) incelemeye dahil edilmiştir. Böylece EGFR ekspresyonunun tümör derecesi ile ilişkisinin net olarak belirlenebileceği düşünülmüştür.

Arşiv taraması ile hasta patoloji raporlarından elde edilen bilgiler; yaş, cinsiyet, tümör derecesi ve lenf nodu metastazı bilgilerinden oluşmaktadır.

Ortalama görölme yaşı 50-75'dir. Çok genç ve çok yaşı kişilerde görülen tümörler kötü prognoz ile ilişkilidir (11,53). bilgisine dayanarak; yaş değişkeni, 20-50 yaş, 51-70 yaş ve >70 olarak üç gruba ayrılmıştır. Yaşa göre olguların dağılımına bakıldığında; olguların %60' ı 51-70 yaşta ve bu yaş grubunda en fazla (% 64) orta diferansiye KK görölmüştür. Az diferansiye KK 'ların %60' ı 20-50 yaşta olmasına karşın, müsinöz KK' ların %67' si >70 yaşta.görölmüştür. Bu dağılım literatür bilgisine paralellik göstermektedir.

Vasküler invazyon varlığı 5 yıllık sağ kalım süresinde belirgin azalma gösterdiğinden (11,53) vasküler invazyon varlığı var ve yok diye iki gruba ayrılmıştır. Olguların %49' unda vasküler invazyon görölmüştür.

Perinöral invazyon; genellikle ileri evre tümöre işaret ettiği ve diğer kötü prognostik bulgularla birlikte olma eğiliminde (11,53) olduğundan perinöral invazyon var ve yok diye iki gruba ayrılmıştır. Olguların %38' inde perinöral invazyon saptanmıştır.

Çok sayıda lenf nodu metastazı bulunması kötü prognoz ile ilişkili (47) olduğundan lenf nodu tutulumu var ve yok şeklinde iki gruba ayrılmıştır. Toplam 55 KK' lı vakasının 24 (%43.6)' ünde lenf nodu metastazı saptanmıştır.

Kolon kanserlerinin histolojik tiplerinin çoğunluğunda evreden bağımsız prognostik farklılık yoktur. Müsinöz adenokarsinomalar klasik

adenokarsinomalardan daha kötü seyirlidir. Çok az görülen alt tipler olan taşlı yüzük hücreli karsinoma ve küçük hücreli karsinoma, diğerlerine göre daha kötü; medüller karsinoma ise diğerlerine göre daha iyi seyretmektedir (9). Buna göre tümörler; iyi, orta, az diferansiye adenokarsinoma ile müsinöz adenokarsinoma olarak dört gruba ayrılmıştır.

Tez konusu için belirlenen immünohistokimyasal veriler: EGFR eksprese eden hücrelerin toplam hücre sayısına göre yaygınlığın yüzdesi, ekspresyonun yoğunluğu ve bu ikisinin çarpımı ile elde edilen boyanmanın yaygınlık-yoğunluk skoru olarak üç farklı değerden oluşturulmuştur.

Tüm olguların % 84' ünde EGFR ekspresyonu saptanmıştır.

İmmünohistokimyasal olarak EGFR eksprese eden hücrelerin yaygınlığının yüzdesinin belirlenmesi ve bunların dilimlere ayrılması; 1' den 3' e kadar gruplar (1: %1-25 arası, 2: %26-75 arası, 3: %75 üzeri) elde edilmesi şeklinde yapılmıştır. Tümör derecelerine göre bakıldığında iyi diferansiye KK (kolorektal adenokarsinoma)' da ekspresyon yaygınlık yüzdesi (%33), orta diferansiye KK' nın büyük çoğunluğunda (%43) ; %1-25 (+1) arasında, az diferansiye KK' nın büyük çoğunluğunda (%60); %1-25 (+1) arasında, müsinöz adenokarsinomaların da büyük çoğunluğunda (%67) ekspresyon yaygınlık yüzdesi %1-25 (+1) arasında bulunmuştur.

İncelenen kolorektal adenokarsinomların 9' unda (8 adet orta derecede diferansiye KK, 1 adet az diferansiye KK) EGFR ekspresyonu saptanmamıştır. Ekspresyon görülen olguların çoğunluğunda (%45.5) EGFR ekspresyonunun yaygınlık değeri %1-25 (+1) saptanmıştır. 1 adet iyi diferansiye KK' da, 4 adet orta diferansiye KK' da >%75 (+3) boyanma görülmüştür.

EGFR ekspresyonunun yoğunluğunun değerlendirilmesi ve gruplara ayrılması 1 ile 3 arası gruplar (1: normal bağırsak mukozasının boyanma yoğunluğundan daha az boyanan, 2: mukozanın boyanma yoğunluğu ile aynı derecede boyanan, 3: mukozanın boyanma yoğunluğundan daha fazla boyanan); 1 (hafif yoğunlukta), 2 (orta yoğunlukta), 3 (belirgin yoğunlukta) şeklinde belirlenerek yapılmıştır.

Ekspresyonun yoğunluk dağılımlarına bakıldığında; olguların çoğunluğunda (%47) hafif yoğunlukta (1) boyanma görülmüştür. İyi diferansiye (%33), orta diferansiye (%48), az diferansiye (%40) KK ve müsinöz adenokarsinoma (%66.7) olgusunda hafif (1) yoğunlukta ekspresyon tespit edilmiştir. 1 adet iyi diferansiye, 2 adet orta diferansiye, 1 adet az diferansiye KK olgusunda belirgin (3) yoğunlukta boyanma tespit edilmiştir.

İmmünohistokimyasal olarak boyanmanın yaygınlık-yoğunluk skoru diye adlandırdığımız skor elde edilirken; birden fazla immünohistokimyasal verinin birlikte ve kantitatif olarak değerlendirilmesini sağlayan bir yöntem kullanılmıştır. Örneğin meme tümörlerindeki östrojen ekspresyonunun değerlendirilmesinde kullanılan H skoru= boyanma yüzdesi x boyanma yoğunluğu (14). Boyanma yaygınlığı ile boyanma yoğunluğunun çarpımı ile elde edilen skor sayesinde her iki immünohistokimyasal değer birlikte değerlendirilebilmiştir. Ekspresyonun yaygınlık-yoğunluk skoru ≥ 6 ve < 6 olan olgular diye iki grup belirlenmiştir. 4 adet (%80) az diferansiye , 30 adet (%68) orta diferansiye , 2 adet (%66) iyi diferansiye KK ve 3 adet (%100) müsinöz adenokarsinomada ekspresyonun yaygınlık-yoğunluk skoru; < 6 olduğu görülmüştür. 1 adet (%33.3) iyi diferansiye , 6 adet (%13.6) orta diferansiye KK' da ise ekspresyonun yaygınlık-yoğunluk skoru ≥ 6 olarak saptanmıştır.

EGFR yaygınlık yüzdesi ve yaygınlık-yoğunluk skoru sınıflamasına göre; yaş, cinsiyet, histolojik derece, lokal invazyon, lenf nodu metastazı, vasküler invazyon, perinöral invazyon ve tümör evresi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1996-2007 yılları arasında GATA Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığı laboratuvarında incelenen 55 olgu çalışmaya alındı.

Çalışmada kolorektal adenokarsinomlarda immünohistokimyasal inceleme ile EGFR ekspresyonu değerlendirildi. EGFR ekspresyon yüzdesi ve yoğunluğu; yaş, cinsiyet, histolojik grade, lokal invazyon, vasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu tutulumu, evre ile karşılaştırıldı.

Klinik ve histolojik parametreler ile EGFR ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bu ilişki, ekspresyon yaygınlığının yüzdesi, ekspresyonun yoğunluğu ve ekspresyonun yaygınlık-yoğunluk skoru değişkenlerinin her üçü için de geçerlidir. İstatistiksel olarak da bu üç değişken için anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Sonuç olarak günümüzde değişik organ kanserlerinde özellikle meme tümörlerinde büyüme faktörü reseptörlerin tümör etyolojisinde önemli olduğu anlaşılmış ve bu ekspresyonların baskılanması tedavide etkili olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak kolorektal kanserler başta olmak üzere büyüme faktörü reseptörlerinin gerek tümör gelişimi konusunda ne kadar rolü olduğu ve tedavide ne kadar etkin kullanılabileceği konusu sıcak bir gündem oluşturmakta ve çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Kolorektal kanserlerde; büyüme faktörü reseptör ailesinden EGFR (cerbB-1)' nin etkinliğinin gösterilmesi, hangi paternlerin, hangi yoğunlukların pozitif ve anlamlı kabul edileceği konusunda net bir fikir birliği yoktur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar; boyanma paternleri, yaygınlıkları ve bunların klinik ve histolojik parametreler ile kıyaslanmaları bazı ipuçları vermekle birlikte kesin istatistikî veri oluşturmadan uzaktır. Zaman içinde boyama tekniklerinin geliştirilmesi, daha purifiye antikorlar üretilmesi; gerek tümör hücresi büyümesi, gerekse tümör vaskülaritesi konusunda rol oynayan EGF reseptör ailesi proteinlerine ilişkin tedavi yöntemlerinin kolorektal kanserlerinde de kullanılabileceğini düşündürmektedir. Özellikle prospektif çalışmalar ve genetik olarak EGFR

gen amplifikasyonlarının belirlenmesi bu konuda daha somut veriler oluşturabilecektir.

7. KAYNAKLAR

- 1- Alok A. Khorana, Charlotte K. Ryan, Christopher Cox.: Vascular Endothelial Growth Factor CD68 and Epidermal Growth Reseptor Expression and Survival in Patients with Stage II and Stage III Colon Carcinoma.American Cancer Society 2003
- 2- Bartnik W, ReMine SG, Chiba M et al: Isolation and characterization of intraepithelial and lamina propriya lymphocytes. Gastroenterology 1980; 78: 976.
- 3- Baselga J. Targeting the EGFR with tyrosine kinase inhibitors: small molecules, big hopes. J Clin Oncol 2002; 20: 2217-2219
- 4- Bauer K, Bagwell B, Giretti W, et al: Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in colorectal cancer. Cytometry 1993;14:486.
- 5- Burke AP, Thomas RM, et al: Carcinoids of the jejunum and ileum: and immunohistochemical and clinicopathologic study of 167 cases. Cancer, 1997, 79:1086-1093.
- 6- Cagir B, Nagy MW et al: Adenosquamous carcinoma of the colon, rectum and anus: epidemiology, distribution and survival characteristic. Dis Colon Rectum, 1999, 42:258-263.
- 7- Cerottini JP, Caplin S, et al: Prognostic factor of colorectal cancer. Oncol Rep, 1999, 6: 409-414.
- 8- Cohen, S. Epidermal Growth Factor, Bioscience Reports, 6, 1017-1028 (1986)
- 9- Compton CC, Carolyn C: Colorectal carcinomas: diagnostic, prognostic and molecular features. Mod Pathol, 2003, 16(4):376-388.
- 10- Compton CC, Fielding LP, Burgard LJ, et al: Prognostic factors in colorectal cancer: Collage of American Pathologist consensus statements 1999. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124:979-94.
- 11- Cooper HS: Stenberg's Diagnostic Surgical Pathology. In Mills SE. Intestinal Neoplasms. Vol 2,4 th ed: Lippincott Williams&Wilkins, 2004: 1543-1601.

- 12- Cunningham MP; coexpression of the colorectal cancer patients. *Int J. Oncol* 2006; 28; 329-335
- 13- Derynak, R., Goeddel, D.V., Ullrich, A.: Synthesis of Messenger RNAs for TGF-alfa ve beta and the EGF reseptor by Human Tumours, *Cancer Research*, 47,707-712,(1987)
- 14- Diagnostic immunohistochemistry of the Breast. Diagnostic immunohistochemistry. Daabs D.J. China Churchill Livingstone Co.2002,550.
- 15- Ekmekçi, A., Erbaş, D. Kanserin Moleküler Mekanizması, 136-168, Ankara,(1991)
- 16- Fischbach W, Zidianakis Z, Luke G, et al: DNA mapping of colorectal neoplasms: A flow cytometric study of DNA abnormalities and proliferation. *Gastroenterology* 1993105:1126.
- 17- Gillen C.D., Walmsley R.S., Prior P, Andrews H.A., Allan R.N: Ulcerative colitis and crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut*, 1994, 35:1590-1592.
- 18- Goldstein NS: EGFR İmmunohistochemical Reactivity in Patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV Colon Adenocarcinoma. *Cancer* 2001;92:1331-1346
- 19- Gregory, H. Isolation and Structure of Urogastrone and it's Relationship to EGF, *Nature*, 257,325-327,(1975)
- 20- Hamilton SR, Rubio CA, Vogelstein B, et al: Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Altonen LA, editors. World Healthy Organization classification of tumors. Tumors of digestive system. Lyon, France: IARC Press; 2000.p.101-119.
- 21- Heinemann EF, Zahm SH, McLaughlin JK, Vaught JB: Increased risk of colorectal carcinoma among smokers: Results of a 26-year follow up of US veterans and a review. *Int J Cancer*, 1994, 59:728-
- 22- Herbst RS. Review of EGFR biology. *Int. J. Radiation Oncology* 2004: 59:21-26
- 23- Jaros E, Perry RH, Adam L: Prognostic implications of P53, EGFR and Ki 67 labelling in brain tumors, *Br J Cancer* 66:373-85,1992

- 24- Jass J.R., Do K.A., Simms L.A., Lino H., Wynter C, Pillay S.P., Searle J, Radford S.G., Young J., Leggett B: Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut*, 1998, 42:673-679.
- 25- J-P. Spano, C. Lagorce: Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival *Annals of Oncology* 16: 102-108, 2005
- 26- Kameris A et al. Expression of EGF and EGFR in gastric and colorectal carcinomas. An immunohistological study of 63 cases. *Pathol Res Pract* 1993; 189: 133-137
- 27- K-F Chin, J Greenman, E Gardiner, H Kumar, K Topping and J Monson: Preoperative serum vascular endothelial growth factor can select patients for adjuvant treatment after curative resection in colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 83(11),1425-1431,2000
- 28- Klijn JGM, Schmits PLM, Foekens JA. Clinical Significance of EGFR in Human Breast Cancer: a Review on 5232 patients. *Endocr. Review* 13:3-17,1992
- 29- Koretz K; Expression of EGFR in normal colorectal mucosa, adenoma and carcinoma. *Virchow Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990: 416:343-349
- 30- Layfield LJ. Color multiplex polymerase chain reaction for quantitative analysis of EGFR genes in colorectal adenocarcinoma *J Surg. Oncol* 2003; 83,227-231
- 31- Lynch TJ. Et al. Activating mutations in the EGFR underlying responsiveness of non small cell lung cancer to gefinitib. *N Engl J Med* 2004; 350:2129-2139
- 32- Mahmoud A. Khalifa, MD, Calvin Law, MD.: Expression of Epidermal Growth Factor Reseptor in Primary Colorectal Adenokarsinoma Predicts Expression in Recurrent Disease. *Am J Clin Pathol* 2006;125:229-233.
- 33- Matthew S. Lyall: Profiling Markers of Prognosis in Colorectal Cancer, *Clin Cancer Res* 2006; 12(4) February 15.

- 34- .Mellemkjaer L: Cancer in patient with ulcerative colitis. *Int J Cancer*, 1995, 60:330-333.
- 35- Mendelsohn J. EGFR antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 21: 2787-2799,2003
- 36- Mendelsohn J. EGFR as a target for therapy with antireceptor monoclonal antibodies. *J.Nat Cancer Inst. Monogr* 1992; 13: 125-131
- 37- Messa C, Russo F, Caruso MG et al. EGF, TGF alfa and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. *Acta Oncologica* 1998; 37: 285-289.
- 38- Messerini L, Vitelli F, DeVitis LR, et al: Microsatellite instability in sporadic coloectal carcinomas: relationship of clinico-pathological variables. *J Pathol*, 1997; 182: 380-384.
- 39- Mc Kay JA: Evaluation of the EGFR in colorectal tumours and lymph node metastases, *European journal of cancer* 2002;38:2258-2264.
- 40- Moch H: EGF-r gene copy number changes in renal cell carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *J Pathol* 1998;184:424-429
- 41- Muir CS, Waterhause J, Mark T, et al: Cancer incidence in five continents. Vol 5. Lyon, France: International agency for research on cancer. IARC Scientific Publication no: 88; 1987.
- 42- Mulcahy HE, Skelly MM, Husain A, et al: Long-term outcome following curative surgery for malignant large bowel obstruction. *Br J Surg*, 1996, 83:46-50.
- 43- Murray JL, Lopez AD: Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet*, 1997; 349: 1269.
- 44- Nielsen HJ, Hansen U, et al: Independent prognostic value of eosinophil and mast cells infiltration in colorectal cancer tissue. *J Pathol*, 1999, 189:487-495.
- 45- O' Dwyer PJ: EGFR-targeted therapy in colorectal cancer. *Semin Oncol* 2002;29:10-17

- 46- O'Keefe, EJ., Pledger, WJ., A Model of Cell Cycle Control Sequential Events Regulated BY Growth, Mol Cell Endocrinol, 167-186,(1983)
- 47- Oberg A, Stenling R, et al: Are lymph node metastases of any clinical significance in Dukes Stage A and B colorectal cancer ? Dis Colob Rectum, 1998, 41:1244-1249.
- 48- Orwen R.W: Dietary and chemopreventive strategies. Recent Results Cancer Res, 1998, 146:195-213.
- 49- Pathologic Basis of Disease. Cotran Kumar Sixth Edition.Chapter 18: 831-835
- 50- Purdie CA, Piris J: Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy relation to prognosis in colorectal carcinoma. Histopathology, 2000, 36:121-126.
- 51- Radinsky R et al. Level and function of EGFR predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. Clin Cancer Res 1995;1:19-31.
- 52- Rohit Bhangava MD: Comparison of two Antibodies for Immunohistochemical evaluation of EGFR expression in Colorectal Carcinomas, Adenomas and Normal Mucosa, Am. Cancr Society 2006: Volume 106:1857-1862)
- 53- Rosai J : Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. In Rosai J. Gastrointestinal Tract, Large Bowel. Vol 1.9 th ed: Mosby, 2004:76-885.
- 54- Roy S. Herbst, Dong M. Shin Monoclonal Antibodies to Target Epidermal Growth Factor Reseptor-Positive Tumors. American Cancer Society, 2002
- 55- Sainsbury JR; EGFR Status of Histological Sub-types of Breast Cancer Br. J. Cancer:8:458-460,1988
- 56- Salomon DS, EGF- related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol 19: 183-232, 1995
- 57- Sanja Kapitanovic: Expression of erbB Protein in Colorectal Adenocarcinoma: Correlation with Poor Survival: J Cancer Res Clin Oncol 2000;126:205-211

- 58- Skacel M: Aneusomy of chromosomes 7,8 and 17 and amplification of Her-2/neu and EGFR in gleason score 7 prostat carcinoma.Hum Pathol 2001;32:1392-1397
- 59- Smith JP, Wood JG, Solomon TE: Elevated gastrin levels in patient colon cancer or adenomatous polyps. Dig Dis Sci,1989, 34:171-
- 60- Steele GD, Jessup JM, Winchester DP, et al. Colorectal cancer. National cancer data base. Annu Rev Patient Care 67;66,1995
- 61- Stewenius J: Incidence of colorectal cancer and all cause of mortality in non-selected patients with ulcerative colitis and indeterminate colitis in Malmo, Sweden. Int J Colorectal Dis, 1995, 10:117-122.
- 62- Tang W.Y., Elnatan J., Lee Y.S., Goh H.S, Smith D.R: c-Ki-ras mutations in colorectal adenocarcinomas from a country with a rapidly changing colorectal cancer incidence. Br J Cancer, 1999, 81:237-241
- 63- Thomas R.M., Sobin L.H: Gastrointestinal cancer. Cancer, 1995 75:154-170.
- 64- Tong WM et al. EGFR expression in primary cultured human colorectal carcinomas cells. Br J cancer 1998: 77; 1792-1798.
- 65- Tortola S, Marcuello E, et al: p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. J Clin Oncol, 1999, 17:1375-1381.
- 66- Tsunoda A, Shibusawa M, Kawamura M, Marumari T, Kusano M, Ohta H: Colorectal cancer after pelvic irradiation: case reports. Anticancer res , 1997 17/1B: 729-732.
- 67- Vermeulen PB, Van der Eynden GG, et al: Prospective study of intratumoral microvessel density, p53 expression and survival in colorectal cancer. Br J Cancer, 1999, 79:316-322.
- 68- Waksal HW. Role of an anti-EGFR in treating cancer. Cancer metastasis Rev 1999: 18; 427-436