

**T. C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI**

**KOLON KANSERİNDE S100A4 EKSPRESYONUNUN KLİNİK
VE PATOLOJİK ÖNEMİ**

**Serhat ÖZER
Tbp.Yzb.**

**GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI
Tıpta Uzmanlık Tezi**

**ANKARA
2010**

T. C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**KOLON KANSERİNDE S100A4 EKSPRESYONUNUN KLİNİK
VE PATOLOJİK ÖNEMİ**

Serhat ÖZER
Tbp.Yzb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Askeri Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalında
TIPTA UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŐMANLARI

Ali İhsan UZAR
Prof.Hv.Tbp.Kd.Alb.
Ali HARLAK
Doç.Tbp.Yb.

ANKARA
2010

GATA Askeri Tıp Fakültesi Dekanlığına;

“Kolon Kanserinde S100A4 Ekspresyonunun Klinik ve Patolojik Önemi ” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalı’nda Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Hv.Tbp.Tuğg.Sadettin ÇETİNER (GATA)

Prof. Hv.Tbp.Kd.Alb.Orhan KOZAK (GATA)

Prof.Tbp.Kd.Alb.M.Levhi AKIN (GATA Haydarpaşa)

Prof.Tbp.Kd.Alb.Yusuf PEKER (GATA)

Prof.Tbp.Dz.Kd.Alb.Müjdat BALKAN (GATA)

Prof. Hv.Tbp.Kd.Alb.A.İhsan UZAR (GATA) (Yedek üye)

Doç. Hv.Tbp.Kd.Alb. Abdurrahman ŞİMŞEK (GATA) (Yedek Üye)

ONAY:

Tbp.Yzb. Serhat ÖZER’ in 09/07/2010 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

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

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Bu çalışmada, kolon kanserinde S100A4 ekspresyonunun klinik ve patolojik öneminin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Mensubu olmaktan gurur duyduğum Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nin sayın dekanı Prof.Tbp.Tümg. M. Zeki BAYRAKTAR'a, eğitim ve öğretimime büyük katkılar sağlayan Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı çok değerli hocam Sayın Prof.Tbp.Tuğa.C.Turgut TUFAN' a teşekkür eder saygılarımı sunarım. Tez çalışmamda fikirleri, önerileri ve eleştirileriyle bana yol gösteren çok değerli tez hocam ve danışmanım Sayın Prof.Hv.Tbp.Kd. Alb. Ali İhsan UZAR ve tez danışmanım Doç.Tbp.Yb. Ali HARLAK başta olmak üzere, cerrahi eğitimimde ve yetişmemde büyük emekleri geçen değerli hocalarım; Prof.Hv.Tbp.Tuğg.Sadettin ÇETİNER'e, Prof. Hv.Tbp.Kd.Alb. Orhan KOZAK 'a, Prof. Tbp.Kd.Alb.Yusuf PEKER' e, Prof. Dz.Tbp.Kd.Alb. Müjdat BALKAN'a, Doç. Hv.Tbp.Kd.Alb. Abdurrahman ŞİMŞEK'e, Doç. Hv.Tbp.Kd.Alb. Nazif ZEYBEK'e, Doç. Tbp.Alb. Sezai DEMİRBAŞ'a, Doç. Tbp.Alb. Semih GÖRGÜLÜ'ye, Doç. Tbp.Alb. Gökhan YAĞCI'ya, Doç. Tbp.Alb. Taner YİĞİT'e, Doç. Tbp.Yb. Erkan ÖZTÜRK'e, Doç. Hv.Tbp.Yb. Öner MENTEŞ'e ve Genel Cerrahi AD.'nin tüm yardımcı doçent ve uzmanlarıyla, şu anda emekli olan tüm hocalarıma katkıları için teşekkür ediyor saygılarımı sunuyorum.

Tezin her aşamasında destek ve deneyimleri ile bana yardımcı olan başta Doç. Tbp.Yb. Önder ÖNGÖRÜ olmak üzere Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na ve öğretim üyelerine, ayrıca 5 yıllık asistanlık sürecimde her zaman yanımda olup bana güven veren, tüm sıkıntılara göğüs gererek bana desteğini asla esirgemeyen çok değerli eşime ve aileme, cerrahinin tüm zorluklarını beraber paylaştığım uzmanlık öğrencisi arkadaşlarıma, Genel Cerrahi Kliniği'nin tüm çalışanlarına da, ayrı ayrı teşekkür eder saygılarımı sunarım.

ÖZET

“Kolon kanserinde S100A4 ekspresyonunun klinik ve patolojik önemi”

Dr. Serhat ÖZER, GATA Genel Cerrahi AD. Uzmanlık Tezi, ANKARA, 2010.

Bu çalışma, invitro ve invivo metastaz ve invazyon belirteci olarak gösterilmiş olan S100A4 ekspresyonunun kolorektal kanserli hastalarda klinik ve patolojik önemini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

111 kolon kanserli hastanın bloklanmış rezeksiyon materyallerinden kesitler alınmış ve immunhistokimya boyama skorlaması(İHKBS) yapılarak S100A4 ekspresyonu değerlendirilmiştir. İHKBS ile hasta yaşı, cinsiyeti, tümör lokalizasyonu, tümör çapı, ameliyat tipi, perinöral invazyon varlığı, perivasküler invazyon varlığı, T evresi, N evresi, M evresi, hastalık evresi, tümör grade'i, metastatik lenf nodu yüzdesi, sağkalım ve mortalite arasındaki ilişki karşılaştırılmıştır.

Hasta cinsiyeti, hasta yaşı, tümör lokalizasyonu, ameliyat tipi ve tümör çapı ile İHKBS arasında yapılan karşılaştırmalarda anlamlı bir istatistiksel fark elde edilmedi. Tümör progresyonu ve agresivitesini arttıran perivasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu tutulumu ve metastaz parametrelerinin ise İHKBS ile doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak tümör metastazı ve invazyonunu artıran S100A4'nün ekspresyonundaki artışın kötü prognoz göstergesi olabileceği değerlendirilmiştir. Kötü prognostik faktörlerle ilişkili olan S100A4 ekspresyonunun kolorektal kanser tedavi stratejilerinin belirlenmesinde kullanılması mümkün olabilir. Bu konunun klinik pratiğe yansıtılması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Kolon kanseri, S100A4

Danışmanlar: Prof.Hv.Tbp.Kd.Alb. Ali İhsan Uzar, GATA Genel Cerrahi AD.,
Doç. Tbp. Yb. Ali HARLAK, GATA Genel Cerrahi AD.

SUMMARY

“Clinic and pathologic importance of S100A4 expression in colon cancer”
Serhat Özer MD., Residency Thesis, **Department of General Surgery**
GATA, Ankara, 2010.

This study has been carried out to determine the clinical and pathological importance of S100A4 which has previously shown as a marker for invasion and metastasis at colorectal carcinoma cases.

Slides of archived formalin fixed paraffin embedded tissue blocks of primary tumor were obtained for 111 patients with colon cancer and S100A4 expression was evaluated on the basis of immunohistochemistry staining scores (IHCS). By means of IHCS, relationships between, age and, gender of the patient, localization and diameter of the tumor, type of operation, presence of perineural and vascular invasion, T Stage, N stage, M stage, grade of tumor, percent of metastatic lymph node, survival and mortality were comparatively elucidated.

The study reveals that differences were not statistically significant at those comparisons realised between IHCS and variables including gender and age of the patient, type of operation and diameter of the tumor. The correlation between IHCS and the parameters which increase the tumor aggressivity such as perineural invasion, perivascular invasion, lymph node's invasion and metastasis, was statistically significant.

In conclusion, the results of the study reveals that S100A4 overexpression, which contribute to the metastasis and invasion, may be an indicator of poor prognosis. Indeed, it may be possible to utilize S100A4 expression in the determination of strategies for the treatment of colorectal cancers. Further advanced research is required to reflect the issue into clinical practice.

Keywords: Colon cancer, S100A4

Counsellors : Ali İhsan UZAR MD.,(Professor) and Ali HARLAK MD., (Associated Professor) Department of General Surgery, GATA. ANKARA,

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	İx
ŞEKİLLER DİZİNİ	Xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
I- GİRİŞ	1
II- GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kolorektal Kanserlerle İlgili Genel Bilgiler	4
2.1.1. Epidemiyoloji	4
2.1.2. KRK Etiyolojisi	4
2.1.3. Karsinogenez	6
2.1.4. KRK Histopatolojisi	8
2.1.5. Prognostik Faktörler	8
2.1.6. KRK'de tümör yayılımı ve metastaz	13
2.1.7. Tümör Belirleyicileri	14
2.2. Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler	14
2.2.1. Kalmodulin	15
2.2.2. Kalretisulin ve Kalsekstrin	15
2.2.3. Anneksinler	15
2.2.4. C2-bölgesi bulunduran kalsiyum bağlayıcı proteinler	16

2.2.5. EF-el yapısına sahip diğer kalsiyum bağlayıcı proteinler	16
2.3. Apoptozis	16
2.4. S100 Protein Ailesi	18
2.5. Kanserde S100 Ekspresyonu	20
2.6. S100A4 Proteinini	20
III- GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Hasta Grubu ve Verilerin Toplanması	25
3.2. Çalışmaya Kabul Kriterleri	25
3.3. Çalışma Dışı Bırakılma Kriterleri	26
3.4. İmmünohistokimya	26
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	32
IV- BULGULAR	33
V- TARTIşMA	42
VI- SONUÇ VE ÖNERİLER	49
VII- KAYNAKLAR	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AJCC	: Amerikan Birleşik Kanser Komitesi
APC	: Adenomatöz Poliposis Koli
Ca ²⁺	: Kalsiyum
CA	: Karbonhidrat Antijen
CaBP	: Kalsiyum Bağlayan Protein
CEA	: Karsino Embriyonik Antijen
CK2	: Kazein Kinaz 2
CK19/20	: Sitokeratin 19/20
DAB	: Diamino Benzidin
DCC	: Deleted in Kolon Kanser
DNA	: Deoksiribonükleikasit
DPC4	: Deleted in Pankreatik Kanser
ER	: Endoplazmik Retikulum
FAP	: Familyal Adenomatöz Poliposis
GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
HNPCC	: Herediter Nonpoliposis Kolorektal Kanser
HIF-1	: Hipoksi Oluşturan Faktör 1
İHKBS	: İmmunhistokimya Boyama Skoru
kDa	: Kilodalton
KRK	: Kolorektal Kanser
MAPK	: Mitogen-activated protein kinaz
MMTV	: Mouse mammary tumor virus

MLH 1	: Mutl Homolog 1
MSH2/6	: Muts Homolog 2/6
mRNA	: Mesenger RNA (Haberçi RNA)
NF-kB	: Nükleer Faktör kappa B
OR	: Odds ratio
PBS	: Fosfat Tamponlu Saline
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMS1/2	: Postmeiotic Segregation Increased 1/2
PNI	: Perinöral İnvazyon
PVI	: Perivasküler İnvazyon
RAGE	: Receptör for Advanced Glycation of End prodnots
RNA	: Ribonükleikasit
RT-PCR	: Reverse Transkriptaz/Real Time -PCR
SMAD 2	: Mothers against decapentoplegic homolog 2
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
TP53	: Wild Tip P53
TGF- β	: Transforming Growth Factor Beta
UICC	: Uluslararası Birleşik Kanser Merkezi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Kolorektal Karsinogenez Modeli	8
2.2. S100'lerin etki mekanizması	23
3.1. İnkübasyon sephası	27
3.2. Alkolden geçirme ve yıkama basamağı	27
3.3. İHKBS 1 olan tümörde S100A4 ekspresyonu(x200 büyütme)	29
3.4a. İHKBS 2 olan tümörde S100A4 ekspresyonu (x200büyütme)	29
3.4b. İHKBS 2 olan tümörde S100A4 ekspresyonu(x400 büyütme)	30
3.5a. İHKBS 3 olan tümörde S100A4 ekspresyonu(x200 büyütme)	30
3.5b. İHKBS 3 olan tümörde S100A4 ekspresyonu(x400 büyütme)	31
3.6a. İHKBS 4 olan tümörde S100A4 ekspresyonu(x200 büyütme)	31
3.6b. İHKBS 4 olan tümörde S100A4 ekspresyonu(x400 büyütme)	32
4.1 Perivasküler invazyon ile İHKBS ilişkisinin grafiğı	35
4.2. Perinöral invazyon ile İHKBS ilişkisinin grafiğı	36
4.3. İHKBS ile T evresi arasındaki ilişkinin grafiğı	37
4.4. İHKBS ile N evresi arasındaki ilişkinin grafiğı	38
4.5. İHKBS ile M evresi arasındaki ilişkinin grafiğı	39

4.6.	İHKBS ile Tümör Evresi arasındaki ilişkinin grafiği	40
4.7.	İHKBS ile Mortalite arasındaki ilişkinin grafiği	41

TABLolar DİZİNİ

Tablo		Sayfa
2.1.	TNM sınıflaması	10
2.2.	TNM sınıflamasında evrelere göre prognoz	11
2.3.	S100 Protein Ailesi	19
3.1.	İmmunhistokimya boyama skorlaması	28
4.1.	İHKBS ile cinsiyet ilişkisi	33
4.2.	Tümör Grade'i ile İHKBS arasındaki ilişki	34
4.3.	Perivasküler invazyon ile İHKBS arasındaki ilişki	34
4.4.	Perinöral invazyon ile İHKBS arasındaki ilişki	35
4.5.	İHKBS ile T Evresi arasındaki ilişki	36
4.6.	İHKBS ile N Evresi arasındaki ilişki	37
4.7.	İHKBS ile M Evresi arasındaki ilişki	38
4.8.	İHKBS ile Tümör Evresi arasındaki ilişki	39
4.9.	İHKBS ile Mortalite arasındaki ilişki	41
4.10.	İHKBS ile 5 yıllık sağkalım oranı arasındaki ilişki	41

I- GİRİŞ

Kolorektal kanserler (KRK'ler), görülme sıklığı bakımından tüm kanserler arasında dördüncü sırada yer alan önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. KRK nedeniyle ölümler, kansere bağlı ölüm nedenleri arasında; erkeklerde akciğer ve prostat kanserinden sonra, kadınlarda ise akciğer ve meme kanserinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır(1).

Kanser, hücre büyümesini ve ölümünü doğrudan kontrol eden genlerdeki mutasyonların birikimi sonucu gelişir. Adenom-karsinom ardışıklığı, kolorektal karsinogenezis için temel mekanizma olarak düşünülmektedir. Sporadik ve familial kolorektal kanserlerin oluşumunda protoonkogenler, tümör baskılayıcı genler ve mismatch repair genler etkilidir. Protoonkogenler, normal hücresel büyüme ve bölünme için gerekli olan hücresel genlerdir. Noktasal mutasyonlarla, kromozomal translokasyonlarla ve gen amplifikasyonlarıyla aktive olan protoonkogenler hücre büyümesinin artışına yol açar. K-ras, c-myc, c-src gibi protoonkogenlerin kolorektal kanserlerle ilişkisi gösterilmiştir. Tümör baskılayıcı genler hücre büyümesini sınırlarlar. Tümör baskılayıcı fonksiyon kaybolduğunda hücre büyümesi artar. Tümör baskılayıcı gene örnekler; 17 p'deki p53, 5q'daki adenomatöz polipozis koli (APC) ve 'deleted in colon cancer'(DCC), SMAD-4 ve JV18-1/MADR2 genleridir(2-4).

Çok sayıda hücresel fonksiyon kalsiyum (Ca^{2+}) iyonunun hücre içi konsantrasyonu ile kontrol edilmektedir. Ca^{2+} ; hücre bölünmesi, farklılaşması ve apoptozis gibi fonksiyonlarda önemli bir sinyal molekülü olarak etki gösterir. Ancak Ca^{2+} konsantrasyonunun uzun süreli yükselmesi hücre için tehlikelidir. Kalsiyum bağlayıcı proteinlerin(CaBP) tamponlama etkisi ile hücrede yüksek kalsiyuma bağlı olarak ortaya çıkacak zararlı etkiler ortadan kaldırılır. Bu moleküllerin hücredeki konsantrasyonunun artışı ya da azalışı canlılarda kanser ve kalp hastalıkları gibi önemli patolojik durumlara yol açabilmektedir(5). CaBP'lerin ileri laboratuvar teknikleri ile incelenmesi bu protein ailesinin öneminin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

CaBP olan S100 proteinleri ilk olarak Moore tarafından tanımlanmış olup ismini %100 amnion sülfat çözeltisinde soluble olmasından dolayı almıştır(6). S100 protein ailesi ortak kalsiyum bağlayıcı EF-el motifine sahip en az yirmi bir farklı proteinden oluşur ve molekül ağırlıkları 9–13 kDa arasında değişir(7). S100 proteinleri farklı hedef proteinlerle etkileşimlere girerek; protein fosforilasyonu, immun cevap, büyüme, farklılaşma, hücre iskeleti hareketi, enzim aktivitesi ve Ca^{2+} homeostazisi gibi çeşitli fonksiyonlarda önemli rol oynar. Hücre dışında yer alan S100 proteinleri inflamatuvar hücrelerin aktivitesini uyararak nöronal farklılaşma, astrosit proliferasyonunda rol alır(8,9).

Kalp hastalıkları, nörodejeneratif ve inflamatuvar hastalıklar, sedef hastalığı, yara iyileşmesi ve özellikle melanoma gibi kanser hastalıklarında S100 proteinlerinin aşırı ekspresyonu gözlenmektedir(7,10). S100A4 klinikte metastatik tümörlerle ilişkili moleküler belirteç olarak kullanılmaktadır(11). S100A8 ve S100A9'un aşırı ekspresyonu prostat kanserlerinin erken dönemlerinde gözlenir(12). Dolaşımdaki S100B konsantrasyonu melanoma gibi kanserlerde tedavinin yönünü tayin etmede belirleyici olmaktadır(13).

CaBP üzerine etki ederek hücrede kalsiyum konsantrasyonunun belirli düzeyde tutulmasını sağlayan çeşitli ilaçların araştırılması ve bu ilaçların bazı hastalıkların tedavisindeki rollerinin belirlenmesi araştırılmayı bekleyen konular arasındadır ve kanımızca çok önemli bir araştırma alanıdır.

KRK'ler ile ilgili klinikle korele pek çok moleküler araştırma yapılmakta ve özellikle hastalığın seyrini belirlemede tedavi ekibine yol gösterecek yeni belirteçler aranmaktadır. KRK'lerin hangi tipinin hangi hastada nasıl seyredeceğine dair elde edilecek yeni bilgiler tedavi alternatiflerinin doğru seçimi ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi bakımından çok önemlidir. Bu çalışmada, GATA Genel Cerrahi Kliniğinde Kolon kanserli hastalarda S100A4 protein ekspresyonunun tümör progresyonu ve metastaz karakteristikleri ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymak ve prognostik önemini gözlemek amaçlanmıştır. İnvitro ve invivo invazyon ve metastazı kolaylaştıran S100A4 proteinin kolon kanserinin klinik ve patolojik

özelliğeriyle ilişkişinin ortaya konulması ve bu özelliğinin bir prognostik kriter olarak değeri araştırılmıştır.

II- GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanserlerle ilgili genel bilgiler

2.1.1. Epidemiyoloji

Kolorektal Kanserler (KRK'ler), görülme sıklığı ve kansere bağlı ölümler bakımından; kadınlarda akciğer ve meme, erkeklerde ise akciğer ve prostat kanserlerinden sonra üçüncü sıradadır(1).

Amerika Birleşik Devletleri'nde(ABD'nde) yılda yaklaşık 148,300 yeni KRK tanısı konmakta ve bunların yaklaşık olarak 105,000'ini kolon, kalanını ise rektum kanserleri oluşturmaktadır. Her yıl KRK'e bağlı 56,600 ölüm gerçekleşmektedir. Bu rakam tüm kansere bağlı ölümlerin %10'unu oluşturmaktadır(1). KRK insidansı genel olarak, dünyada gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde artmıştır. Ülkemizde kanser kayıt sistemlerinin yeterli olmaması nedeniyle ülke geneline ait gerçek rakamlar bilinmemekle birlikte; KRK sıklığı ABD verileriyle benzerlik göstermektedir.

KRK'ler görülme sıklığı ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasındaki yeriyile önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.1.2. KRK Etiyolojisi

Diyet: Diyette emilemeyen bitkisel liflerin azlığı, karbonhidrattan ve yağdan zengin besinlerin çok, A, C ve E vitaminleri gibi koruyucu besinlerin az tüketilmesinin KRK gelişiminde rolü olduğu öne sürülmüştür. Diyette lif içeriğinin düşük olması dışkı hacminin az olmasına, dışkının barsakta kalma süresinin uzamasına ve bakteriyel floranın değişmesine yol açarak etkili olmaktadır. KRK'ler, batı tipi (yüksek kalorili, yağdan zengin) beslenme alışkanlığı olan ve sedanter yaşayan toplumlarda daha sık görülür. Et tüketimi, sigara ve alkol kullanımı risk faktörleridir. Buna zıt olarak; taze sebze tüketimi, uzun süreli nonsteroid antiinflamatuvar ilaç kullanımı ve östrojen replasman tedavileri bu riski azaltmaktadır(14).

Kronik inflamasyon: KRK etiolojisinde inflamatuvar barsak hastalıklarının önemli yeri vardır. Yapılan çalışmalar, ülseratif kolitli hastaların KRK nedeni ile ölme oranlarının normal popülasyona göre 4.4 kat daha fazla olduğunu göstermektedir(15,16). Crohn hastalığı olanlar da ince ve kalın barsak kanserleri açısından risk altındadır ve bu hastalarda KRK riskinin 3 kat fazla olduğu gösterilmiştir(17).

Radyasyon: Radyasyona maruz kalmanın KRK'ler için risk faktörü olduğu gösterilmiştir(18).

Lokalizasyon: KRK'ler daha çok sigmoid kolon ve rektumda yerleşmekle birlikte epidemiyolojik çalışmalar anatomik dağılımın distalden proksimale yer değiştirme eğiliminde olduğunu göstermektedir(19). Moleküler çalışmalar; çekum, çıkan kolon ve transvers kolon tümörlerinde ras protoonkogen mutasyonunun daha fazla olduğunu göstermektedir(20,21).

Genetik faktörler: KRK'ler kalıtsal, sporadik veya ailesel şekillerde meydana gelmektedir. KRK'in kalıtsal formu; aile öyküsü, genç yaşta görülme ve diğer spesifik tümör ve defektlerin varlığı ile karakterizedir. Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve kalıtsal nonpolipozis KRK'ler (HNPCC), KRK patogenezinin ışık tutan birçok çalışmanın konusu olmuştur. Sporadik KRK, aile öyküsü olmadan ortaya çıkar ve genel olarak yaşlı popülasyonu (60-80 yaş) etkiler. Hastaların tüm hücrelerinde spesifik mutasyonların olduğu kalıtsal hastalığın aksine, kanserle ilişkili genetik mutasyonlar tümörün kendisiyle sınırlıdır. Hastalığın kalıtsal modellerine ilişkin çalışmalar kanserin çok daha sık olan sporadik şeklinin genetiğinin büyük ölçüde anlaşılmasını sağlamıştır(22).

Diğer Faktörler: Özellikle karın bölgesi yağları fazla ve vücut kitle indeksi artmış olan hastalarda ve sigara tüketenlerde KRK daha sık görülmektedir(23). Divertikülozisli hastalarda sol kolon neoplazmalarının görülme sıklığı artmaktadır. Gastrinin tümör gelişiminde rol oynadığı yönünde

çalışmalar vardır. Ayrıca akromegalik hastalarda da daha fazla kolonik adenoma ve karsinoma görülme olasılığı bildirilmiştir. Benzer şekilde steroidlerin de kolon kanseri ile ilişkili olduğu savunulmaktadır(24).

2.1.3. Karsinogenez

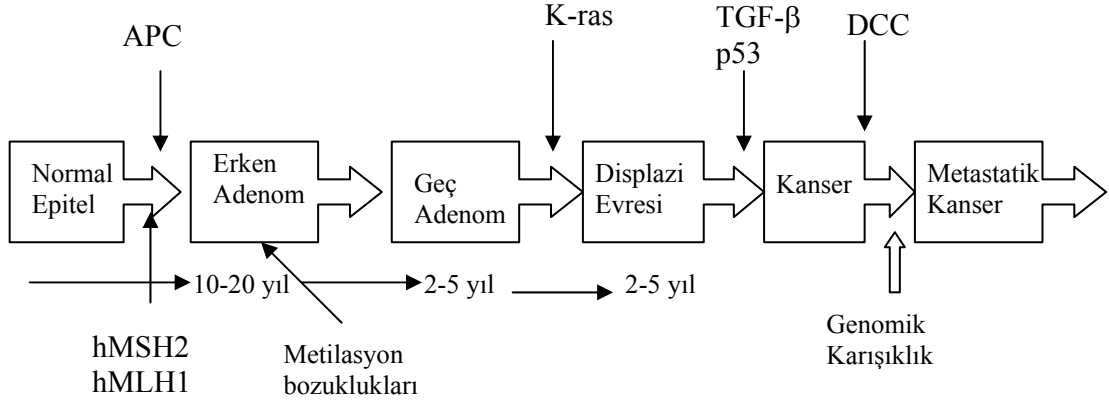
Kolorektal karsinogenezle ilgili çalışmalar kanser gelişiminin temel mekanizmaları konusunda birçok önemli noktanın kavranmasını sağlamıştır. KRK gelişiminde iki farklı yol olduğu bilinmektedir. Her iki yolda da birden fazla sayıda mutasyonun aşamalı olarak birikimi söz konusudur. APC/beta-katenin yolu 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. APC tümör baskılayıcı genin kaybının adenom oluşumunda başlatıcı olay olduğu düşünülmektedir. Adenomların meydana gelmesi için APC geninin her iki kopyası da kaybedilmelidir. Normal APC, beta-katenin yıkımını sağlarken, APC'nin fonksiyon kaybı durumunda biriken beta13 katenin, 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, 1cm' den küçük adenomların %10'undan azında, 1cm'den büyük adenom ve karsinomların %50'sinde mevcuttur. 18q21 delesyonu, lokalize kanser baskılayıcı gen olduğu düşünülen bir genin kaybıdır ve 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. Wild tip P53 de (TP53) bir başka tümör baskılayıcı gendir ve bu 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. Beş 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 ilişkilendirilen genidir. Bu tümörler genel olarak, aynı evredeki APC/Beta katenin 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 bölgeler üzerindedir. Bu genler arasında tip II TGF-beta (transforme edici büyüme faktörü) reseptörü ve BAX'da vardır. TGF-beta sinyalizasyonu kolon epitelyum hücrelerinde büyümeyi engeller, BAX geni ise apoptoza neden olur. Mismatch tamir kaybı, bu genlerde mutasyonlarının birikmesine ve KRK'lerin ortaya çıkmasına yol açar(25).

Klinik ve epidemiyolojik gözlemler, KRK'in benign poliplerin invaziv karsinoma ilerleyişi süresince evrim geçirdiği hipotezini desteklemektedir. Kanser genetik yollarının aydınlatılması bu hipotezin geçerliliğini doğrulamıştır. Kolon mukozasının invaziv kansere dönüşürken çeşitli aşamalardan geçtiği, moleküler biyologlar tarafından yapılan gözlem ve çalışmalar ile gösterilmiştir. Kolon epitel hücreleri normal olgunlaşma ve hücre ölümü basamaklarını kaybeder ve giderek daha kontrolsüz çoğalmaya başlarlar. Bu kontrolsüz çoğalma sonrasında hücreler barsak lümeninde polip şeklinde birikmeye başlar. Daha fazla çoğalma ve hücresel düzensizlik ile hücreler invaziv kansere dönüşmek üzere muskularis mukazaya doğru yayılır. Bu ileri safhada bile KRK karsinogenezisi genellikle muskularis

mukaza, perikolik doku, lenf nodları invazyonu ve son olarak uzak metastazlar şeklinde düzenli bir sıra izler(26)(Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kolorektal karsinogenez modeli

2.1.4. KRK Histopatolojisi

KRK'lerin çoğu adenokanserlerdir ve değişik miktarlarda ve boyutlarda gland benzeri yapılar oluştururlar. Müsinöz, taşlı yüzük ve küçük hücreli adenokanserler klasik tipe göre daha kötü prognozludur(27). Nadiren adenoskuamöz karsinoma, medüller karsinoma, undiferansiye karsinoma, iğsi hücreli komponent içeren tümörler, karsinosarkoma, pleomorfik (dev hücreli), koryokarsinoma, pigmente, berrak hücreli, "stem cell", paneth hücrelerinden zengin ("crypt cell carcinoma") karsinoma histolojik tipleri görülür.

2.1.5. Prognostik Faktörler

Morfoloji: Tümörün makroskopik ve mikroskopik özellikleri, TNM sınıflandırmasındaki yeri, invazyon paterni, diferansiasyon derecesi, ektramural venöz tutulum, lenfatik veya perinöral tutulum, anjiyogenezis,

infiltrasyona lokal inflamatuvar veya dezmoplastik yanıt, rezeksiyon sınırlarına tümörün uzaklığı ve 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, ekspansif yerine infiltratif paternde büyümesi de kötü prognoz ile ilişkilidir(28,29).

Histolojik tip: KRK'lerin çoğunun histolojik tipinin evreden bağımsız prognostik önemi yoktur(27). 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(27).

Grade: Pratikte histolojik derecelendirme subjektiftir. Genel olarak kabul edilen ve şu an kullanılan derecelendirme üç aşamalıdır.

Grade I : iyi diferansiye (>%95 glandüler yapı)

Grade II : orta derecede diferansiye (aradaki olgular)

Grade III: az diferansiye.(>%95 solid)

Histolojik grade'in tek başına evre-bağımsız bir prognostik faktör olarak önemli olduğunu istatistiksel olarak gösteren çalışmalar vardır(30).

Tümörün evresi: KRK'lerde en önemli prognostik faktör evredir(27). Geçmişte Dukes ve Aster Coller sınıflamaları çok kullanılmıştır. Ancak günümüzde en çok kabul gören "American Joint Committee on Cancer (AJCC)" ve "International Union Against Cancer (UICC)" nin tümör, lenf bezi ve metastaz komponentlerini gruplandırmasıyla ortaya konmuş olan TNM evreleme sistemidir(31). "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 sınıflaması tablo 2.1'de, TNM sınıflaması ile hayatta kalım arasındaki ilişki ise tablo 2.2'de özetlenmiştir.

"pTis" terimi, neoplastik hücrelerin bazal membranı geçmediği durumlar için kullanılır. Bu bölgede, lamina propriya invazyonunun lenf nodu metastazı riski bulunmamaktadır. Dolayısıyla hem neoplastik hücrelerin bazal

membranı aşmadığı hem de glandüler bazal membranı yırtıp mukozal lamina propriyaya invazyon göstermeleri (intramukozal karsinoma) durumu pTis sınıfı içinde değerlendirilir. Bu bölge tümörleri için karsinoma in-situ ile intramukozal karsinoma arasında prognostik açıdan fark yoktur (27).

Tablo 2.1. TNM sınıflaması(32-36)

Primer Tümör	
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor.
T0	Primer tümör yok
Tis	Karsinoma in situ (intraepitelial veya intramukozal karsinoma)
T1	Tümör submukozaya infiltre
T2	Tümör muskularis propriaya infiltre
T3	Tümör muskularis propriadan subserozaya infiltre veya perikolik veya perirektal dokuya infiltre. PT3a- Minimal invazyon: Muskularis propria sınırını <1mm aşan minimal invazyon PT3b- Hafif invazyon: Muskularis propriya sınırını 1-5 mm aşan invazyon, PT3c- Orta dereceli invazyon: Muskularis propriya sınırını 5-15 mm geçen invazyon, PT3d- Geniş invazyon: Muskularis propriya sınırını > 15 mm geçen invazyon.
T4	4a-tümör visseral peritona penetre 4b-Tümör direkt olarak diğer organ ya da yapılara invaze.
Rejyonel Lenf Nodları	
NX	Rejyonel lenf nodları değerlendirilemiyor.
NO	Rejyonel lenf nodu metastazı yok
N1	1-3 rejyonel lenf nodunda metastaz mevcut.

1a-1 reyonel lenf nodunda metastaz mevcut
 1b-2-3 reyonel lenf nodunda metastaz mevcut
 1c-reyonel lenf nodu tutulumu olmadan
 subseroza,mezenterde veya peritonize olmayan
 perikolik ve perirektal dokularda tümör depozitlerinin
 olması

N2

> 4 lenf nodunda metastaz mevcut.

2a- 4-6 reyonel lenf nodunda metastaz mevcut

2b- >7 reyonel lenf nodunda metastaz mevcut

Uzak Metastaz

M0

Uzak metastaz yok.

M1

Uzak metastaz mevcut.

1a-1 organ veya bölgeye metastaz

1b->1 organ ve bölgeye metastaz veya periton
 tutulumu

Tablo.2.2. TNM sınıflandırması ve evrelere göre prognoz. (33,34)

EVRE		T	N	M	5 yıllık sürvi
Evre I		T1,2	N0	M0	%93,2
Evre II	A	T3	N0	M0	%84,7
	B	T4a	N0	M0	%72,2
	C	T4b	N0	M0	%70
Evre III	A	T1,2/T1	N1/N2a	M0	%83,4
	B	T3,4a/T2,3/T1,2	N1/N2a/N2b	M0	%64,1
	C	T4a/T3,4b/T4b	N2a/N2b/N1,2	M0	%44,3
Evre IV	A	Any T	Any N	M1a	%8,1
	B	Any T	Any N	M1b	%8,1

Anjiyogenezis: Yüksek miktardaki mikrodamar oluşumu kötü prognostik kriter olarak görülmektedir(37).

Yaş: Çok genç ve çok yaşlı kişilerde görülen tümörler kötü prognoz ile ilişkilidir(31,38).

Cinsiyet: Prognoz kadınlarda erkeklerden biraz daha iyidir(31,38).

Tümör lokalizasyonu: Prognoz üzerine etkisi tartışmalıdır.

Vasküler invazyon: Vasküler invazyon varlığında 5 yıllık sağ kalım süresi belirgin azalma gösterir. Lenfatik damar invazyonu, kan damarı invazyonundan daha az önem taşımaktadır (31,38).

Perinöral invazyon: Genellikle ileri evre tümöre işaret eder ve diğer kötü prognostik bulgularla birlikte olma eğilimindedir(31,38).

İnflamatuvar yanıt: Polimorfonükleer lökositler, özellikle eozinofiller, plazma hücreleri, mast hücreleri ve histiyositleri içeren inflamatuvar yanıt; iyi prognoz göstergesi olarak görülmektedir(39).

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

Genetik belirteçler: Bazı genetik değişikliklerin KRK ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kromozom 18q'nun allelik kaybı kötü prognoz olarak bildirilmektedir. Ayrıca, 17p, 1p, 5q veya 8p'nin allelik kayıplarının, p53'ün yüksek, siklin A'nın yüksek, p27^{Kipi}'nin azalmış ekspresyonunun, ras gen mutasyonunun, apoptozisde görev alan genlerin ekspresyonunun, matriks degradasyonu yapan enzimlerin ve bunların inhibitörlerinin ekspresyonunun (katepsin-L, ürokinaz, doku tipi plazminojen aktivatörü, doku metalloproteinaz

inhibitörleri) prognostik önemi vardır. Yine hücre yüzey moleküllerinin (CD44 ve varyantları, ICAM1, galektin 3) ve metabolik enzimlerin (GLUT1 glikoz transport edici protein, manganesesüperoksid dismutaz, timidilat sentetaz, ornitin dekarboksilaz, siklooksijenaz 2) ekspresyonu da kötü prognoz ile ilişkilidir(22,26).

Tümörün boyutu: Tek başına prognostik olarak anlamlı olmadığı gösterilmiştir(30).

DNA ploidi: Adenomaların karsinomaya dönüşümünde DNA miktarının artışı yanı sıra DNA anormallikleri de görülmektedir. Çeşitli serilerde farklı (%40, %90) (40,41) olmakla birlikte, kolon karsinomalarının anöploid olma sıklığı yüksektir. Anöploid tümörlerde genellikle vasküler invazyon görülmektedir(4).

2.1.6. KRK de Tümör Yayılımı ve Metastaz

Tüm KRK'ler çevre dokulara veya yapılara direkt olarak invazyon ile ya da lenfatikler ve kan damarları ile metastaz yaparak yayılırlar. Metastatik yayılım en sık bölgesel lenf düğümleri ve karaciğerde görülür. Lenf düğümü metastazı, az diferansiye alanlar içeren ve yüksek infiltratif büyüme paterni gösteren tümörlerde daha sıktır. Lenf düğümünün mikrometastazı; kademeli hematoksilen-eosin kesitler, immunhistokimyasal olarak sitokeratin ve diğer belirteçlerin boyanması, CK19/20 için ya da mutant K-ras geni için PCR tekniğiyle tespit edilebilir. Karaciğer metastazı kan damarı invazyonunun yaygın bir göstergesidir. Diğer sık görülen metastaz bölgeleri; periton, akciğer ve overlerdir. Daha nadir metastaz bölgeleri santral sinir sistemi, kemik, testis, uterus ve oral kavitedir(42).

2.1.7. Tümör Belirleyiciler

Karsino embriyonik antijen (CEA), Karbonhidrat antijen (CA) 19-9, CA 50 ve CA 195 KRK ile ilişkili bulunan serum tümör belirteçleridir. Ancak benign hastalık grubunda da yükseliş gösterebileceği için bu belirteçler KRK tanısında özellikle erken evre tümörlerde düşük tanısal değere sahiptir. Üzerinde en fazla çalışılan tümör belirleyici olan karsinoembriyonik antijen (CEA) düşük duyarlılığı ve spesifitesinden dolayı geniş çaplı kitle taraması yapmak için uygun değildir. Akciğer, mide ve pankreas kanserlerinde de değeri yüksektir. Sigara içenlerde CEA yüksek değerlerde çıkabilmektedir. Ancak, preoperatif evrelemede ve postoperatif takiplerde nüksü belirlemede yararlı olduğu gösterilmiştir(43,44).

2.2. Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler

Kalsiyum iyonu (Ca^{2+}), üremeden apoptosise kadar birçok hücre sel fonksiyonun kontrolünden sorumlu ikincil haberci moleküldür(45). Hücre içi depolardan ya da hücre dışından Ca^{2+} salınımıyla sitozolik serbest Ca^{2+} konsantrasyonundaki değişim, kalsiyum bağlayıcı proteinlerin (CaBP) aktivasyonuna ve buna bağlı olarak spesifik protein kinazların fosforilasyonuna neden olur(46). Ca^{2+} bağımlı sinyal iletim sistemi; kas kasılması, sekresyon ya da enzim aktivasyonu gibi fonksiyonlar için önemli bir mekanizmadır(47). Bu sinyalin birçok büyüme faktörü ve mitojeni DNA transkripsiyonu düzeyinde aktive etmesiyle hücre farklılaşması sağlanır(46). Kalsiyum bağlayıcı proteinler hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonundaki değişime bağlı olarak enzim, kanal ve yapısal proteinlerin aktivitelerini düzenleyen bir dizi protein grubudur(48). CaBP'ler spesifik gelişim ve dağılım örnekleri göstererek yapısal olarak farklı alt sınıflara ayrılırlar(49). Bu proteinlerin büyük bir bölümü EF-el adı verilen ortak kalsiyum bağlayıcı motife sahiptir. CaBP ailesinin önemli bir üyesi de anneksinlerdir. Bu proteinler fosfolipitler ve hücre membranı ile etkileşim halindedirler(50). C2-bölgesi bulunan CaBP'ler ise başka bir sınıfı oluşturmaktadır(51). En önemli görevi değişen sitozolik

Ca^{2+} konsantrasyonunu kontrol etmek olsa da, CaBP'lerin tüm fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. CaBP'ler hücrede Ca^{2+} 'un taşınmasında ve tamponlanmasında rol oynar. Ayrıca iyon kanallarının aktivitesini düzenleyerek Ca^{2+} girişinin kontrolünü sağlarlar. Bu proteinlerin eksikliği birçok patolojik duruma yol açar(49). Bu proteinleri kısaca hatırlayalım;

2.2.1. Kalmodulin

Kalmodulin, hemen hemen tüm ökaryotik hücrelerde bulunur. Ca^{2+} iyonunun başlıca hücre içi reseptörüdür ve çeşitli protein kinazların aktivitesini kontrol etmektedir(52).

2.2.2. Kalretisulin ve kalsekestrin

Kalretisulin, eritrositler dışında her hücre tipinde bulunur ve molekül ağırlığı yaklaşık 46 kDa'dur. Başlıca görevi hücre içi ve endoplazmik retikulum (ER) Ca^{2+} konsantrasyonunu düzenlenmektir(53). Kalretisulin, ayrıca; gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücre adezyonu, anjiyogenesis, tümoral gelişimin inhibisyonu, T ve NK hücrelerinde perforin por oluşumunun inhibisyonu gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir(54). Kalsekestrin, iskelet ve kalp kası sarkoplazmik retikulumunda en sık rastlanan CaBP'dir. Bu protein elli kalsiyum bağlama bölgesi içerir. Kalsekestrinin yüksek depolama kapasitesi kasılma için gereken Ca^{2+} 'un 20mM'a kadar depolanmasını sağlar(55).

2.2.3. Anneksinler

Anneksinler, yalnızca ökaryotik hücrelerde bulunan kalsiyum bağlayıcı membran proteinleridir. Hücrede kalsiyum sinyalizasyonu, vezikül hareketi, hücre bölünmesi, apoptozis ve büyümenin düzenlenmesi gibi fonksiyonları vardır(56).

2.2.4. C2-Bölgesi Bulunduran Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler

C2-bölgesi, yüz otuz aminoasit uzunluğunda kalsiyum bağlayıcı bir yapıdır. C2-bölgesi; GTPazların aktivasyonu, membran trafiği, lipid-ikincil habercilerin üretimi ve protein fosforilasyonunun kontrolü gibi önemli hücresel fonksiyonlarda rol oynar. Grup olarak C2-bölgesi bulunan proteinler; Ca^{2+} , fosfolipitler ve inozitol polifosfatlar gibi hücre içi farklı birçok liganda bağlanabilme özelliği gösterirler(51).

2.2.5. EF-el Yapısına Sahip Diğer Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler

“Calmyrin”, dört EF-el yapısı içeren mebrana bağlı bir proteindir. “Calbindin”, Ca^{2+} 'a yüksek afinitesi olan EF-el motifine sahip, nöronal fonksiyonlar ve böbrek ile ince bağırsak epitel hücrelerinde Ca^{2+} taşınması için gerekli önemli bir proteindir(57).

“Aralar 1” ve “citrin” mitokondride kalsiyum bağlayan aspartat/glutamate taşıyıcısıdır. Kalsiyum bağlayıcı bu proteinlerin ekstramitokondriyel matriksde bulunması organelere Ca^{2+} girişi olmadan mitokondriyel Ca^{2+} sinyal iletimini sağlamaktadır(58).

Kalneksin, protein sentezi, katlanma ve posttranslasyonel modifikasyonlar sırasında proteinlerin kalite kontrolünde önemli rol oynar(59). “Centrin” EF-el yapısı içeren kalmodulinin prototipi olarak kabul edilebilen CaBP'dir(27).

2.3. Apoptozis

Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik olarak istenmeyen, hasar görmüş ya da potansiyel olarak neoplastik hücrelerin uzaklaştırılmasında başvurulan bir hücre intihar mekanizmasıdır. Bu içsel intihar formunun temelinde genetik mekanizma vardır. Apoptozis tipik morfolojik ve

biyokimyasal özelliklere sahiptir. Göze çarpan morfolojik değişimler hücre küçülmesi, nükleer kromatinin yoğunlaşması, nükleusun fragmentasyonu ve DNA'nın internükleozomal alandan ayrılmasıdır(60).

Apoptozis ilk kez 1885'de Flemming tarafından gözlenmiş ve bu durum kromatolizis (chromatolizis) olarak isimlendirilmiştir.

1984'de Wyllie ilk kez apoptozis terimini kullanmıştır. Spesifik biyokimyasal belirteçler ekleyerek apoptotik hücrelerin farklı morfolojik değişimlerini gözlemiştir. Bu buluşla birlikte apoptozisle ilgili araştırmalar artmıştır.

Genomik DNA'nın internükleozomal fragmentasyonu son yıllarda apoptozisin en belirgin biyokimyasal işareti olarak düşünülmektedir. Tüm bu özelliklerin oluşumu enerjiye bağımlıdır. Bundan dolayı apoptozis enerjiye bağımlı işlemlerle hücreyi ölüme sürükler. Caspase ailesi proteazları, BCL-2 ailesi proteinleri ve p53 gen ürünü apoptozisin düzenlenmesinde merkezi rol oynar. Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu apoptoziste çok önemlidir. Hücre ölümü ile ilişkili kalsiyum bağımlı moleküller hakkında yapısal bilginin sınırlı olması, Ca^{2+} ve apoptozis arasındaki ilişkinin detaylı olarak bilinmemesine neden olmaktadır(61). Hücre içi Ca^{2+} 'un geçici olarak yükselmesi kasılma, sekresyon, fertilizasyon, proliferasyon, metabolizma, kalp atışı ve hafıza gibi birçok durumda sinyal rolü oynamaktadır. Ancak, Ca^{2+} konsantrasyonunun uzun süreli yükselmesi ($10\mu M$ 'ın üzerine çıkması) apoptozisi uyarır ve hücre için tehlikelidir(5).

Organizmanın gelişimi sırasında hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümü çok sayıda düzenleyici molekül ile kontrol edilir(62) . Özellikle kasta, Ca^{2+} dengesinin bozukluğu birçok hastalığa neden olur(5). İnguinal herni, hidrosel ve inmemiş testis dokularında farklı kalsiyum konsantrasyonları saptanmıştır. Çeşitli patolojik durumlarla ilgili keselerdeki Ca^{2+} oranları, çocukluğun farklı evrelerinde çeşitli nedenlere bağlı olarak inguinal herni veya hidrosel oluşmasına neden olabilir(63).

Miyokard enfarktüsü, felç ve beyin travması gibi birçok hastalığın, “calpain” aktivitesinde meydana gelen değişiklikler sonucunda ortaya çıktığı ileri sürülmektedir(64).

2.4. S100 Protein Ailesi

S100 protein ailesi ortak kalsiyum bağlayıcı EF-el motifine sahip en az yirmi bir farklı proteinden oluşur ve molekül ağırlıkları 9–13 kDa arasında değişir(7). S100 proteinleri farklı hedef proteinlerle etkileşimlere girerek; protein fosforilasyonu, immun cevap, büyüme, farklılaşma, hücre iskeleti hareketi, enzim aktivitesi ve Ca^{2+} homeostazisi gibi çeşitli fonksiyonlarda önemli rol oynar. Hücre dışında yer alan S100 proteinleri inflamatuvar hücrelerin aktivitesini uyararak, nöronal farklılaşma ve astrosit proliferasyonunda rol alır(8,9).

S100'ler tüm hücre tiplerinde eksprese olmamaktadır(65). Bundan dolayı değişik S100'ler değişik fonksiyonlara sahiptir. S100'lerin temel fonksiyonu kalsiyum bağlama kapasitesidir. Bu proteinlerin tipik olarak N-terminal ucu zayıf Ca^{2+} bağlayan EF-el motifine sahiptir. C terminal ucu çok daha sıkı EF-el motifine sahip olup, N terminal ucuyla karşılaştırıldığında yüz kez daha fazla Ca^{2+} bağlama affinitesine sahiptir(66). Ca^{2+} bağlanmamış hiçbir S100 proteini bildirilmemesine rağmen S100'lerin Ca^{2+} bağlaması, fonksiyonel aktiviteleri için önemli olduğu düşünülmüştür. S100 protein ailesinin ekstraselüler ve intraselüler kompartmanda regülör rolleri bulunmaktadır. Kanser progresyonundaki S100 proteinlerinin fonksiyonu tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat S100 proteinleri kanser progresyonunu sinyal yollarını sitümüle ederek sağlamaktadır(66,67). Kalp hastalıkları, nörodejeneratif ve inflamatuvar hastalıklar, sedef hastalığı, yara iyileşmesi ve özellikle melanoma gibi kanser hastalıklarında, S100 proteinlerinin aşırı ekspresyonu gözlenmektedir(7,10) (tablo 2.3.).

S100 A4 klinikte metastatik tümörlerle ilişkili moleküler belirteç olarak kullanılmaktadır(11). S100A8 ve S100A9'un aşırı ekspresyonu prostat kanserlerinin erken dönemlerinde gözlenir. Serumda S100A9 prostat

kanserlerinin belirlenmesinde yardımcı bir belirteç olarak kullanılmaktadır(12).

S100B konsantrasyonu tümör kütleini ve tedavinin etkisini belirlemektedir. S100B konsantrasyonunun azalması tedaviye cevap verildiğini, artan S100B düzeyi ise tümörün geliştiğini gösterir. Dolaşımdaki S100B de melanoma gibi kanserlerde tedavinin yönünü tayin etmede belirleyici olmaktadır(13).

Tablo 2.3. S100 Protein Ailesi(68,69)

Gen adı	Gen haritalaması lokusu	Kanserde varsayılan fonksiyonu
S100A1	1q21	RAGE aktivasyonu
S100A2	1q21	Tümör hücresi motilitesinin inhibisyonu
S100A3	1q21	
S100A4	1q21	P53 inhibisyonu ile invazyon ve metastaz aktivitesi
S100A5	1q21	
S100A6	1q21	Ca ²⁺ sinyal modülasyonu ile hücre siklusunun regülasyonu
S100A7	1q21	Jab-1 aktivasyonu, CD4(+) hücrelerde kemotaksis
S100A8	1q21	
S100A9	1q21	
S100A10	1q21	
S100A11	1q21	Tümör hücresi motilitesinin inhibisyonu
S100A12	1q21	RAGE aktivasyonu
S100A13	1q21	Fibroblastlarda growth faktör-1 salınımı
S100A14	1q21	
S100A15	1q21	
S100B	21q22.2-q22.3	RAGE aktivasyonu, mikrotübul inhibisyonu
S100P	4p16	
S100Z	5q14.1	

“Calprotectin”, S100 ailesinde yer alan ve nötrofillerde sık rastlanan bir CaBP’dır. Romatoid artrit ve kistik fibrosis gibi çeşitli inflamatuvar durumlarda hücre dışı sıvılarda yüksek düzeyde “Calprotectin” bulunur.

Nötrofiller, tümör hücreleri ve normal fibroblastlar gibi çeşitli hücelere karşı büyüme engelleyici ve apoptozisi uyarıcı aktiviteye sahiptir ve bu fonksiyonunun "calprotectin" den kaynaklandığı düşünülmektedir(70).

Çok sayıda hücreyel fonksiyon Ca^{2+} iyonunun hücre içi konsantrasyonu ile kontrol edilmektedir. Ca^{2+} hücre bölünmesi, farklılaşması ve apoptozis gibi önemli fonksiyonlarda önemli bir sinyal molekülü olarak etki gösterir. Ancak Ca^{2+} konsantrasyonunun uzun süreli yükselmesi hücre için tehlikelidir. Kalsiyum bağlayıcı proteinlerin tamponlama etkisi ile hücrede yüksek kalsiyuma bağlı olarak ortaya çıkacak zararlı etkiler ortadan kaldırılır. Özetlemek gerekirse bu moleküllerin hücredeki konsantrasyonunun artışı ya da azalışı canlılarda kanser ve kalp hastalıkları gibi önemli patolojik durumlara yol açar. CaBP'lerin ileri laboratuvar teknikleri ile incelenmesi önümüzdeki yıllarda, bu protein ailesinin öneminin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

2.5. Kanserde S100 Ekspresyonu

Çeşitli S100 proteinlerinin kanser süreciyle ilgili olduğunu gösteren çalışmalarda; normal hücreler ile kanserli hücreler arasında ekspresyon seviyeleri değişmektedir. Kanserde aşırı ekspresyon gösteren S100'ler; S100A4, S100A6, S100A7 ve S100B'dir. S100A2 ekspresyonu ise kanserli hücrelerde azalmaktadır. S100'lerin aksiyonel mekanizmaları ve ekspresyon değişiklikleri belirlenmelidir. Çeşitli çalışmalarda S100 proteinlerinin aşırı ekspresyonunun tanı, evreleme ve prognoz tayininde kullanımları klinik çalışmalarda gösterilmiştir(71).

2.6. S100A4 Proteini

Mts1, P9Ka, metastatin, FSP-1, 18A2, pEL98, p9Ka, CAPL, calvaskulin olarak da bilinir. Kanserdeki rolü en iyi olarak bilinen ve en karakteristik S100 proteindir(71-73). Barraclough ve arkadaşları S100A4'ü meme metastazlı rodent modelinde upregule olmuş m-RNA olarak tanımlamıştır(73). Memeden akciğere metastaz gelişimini sağlayan Murine

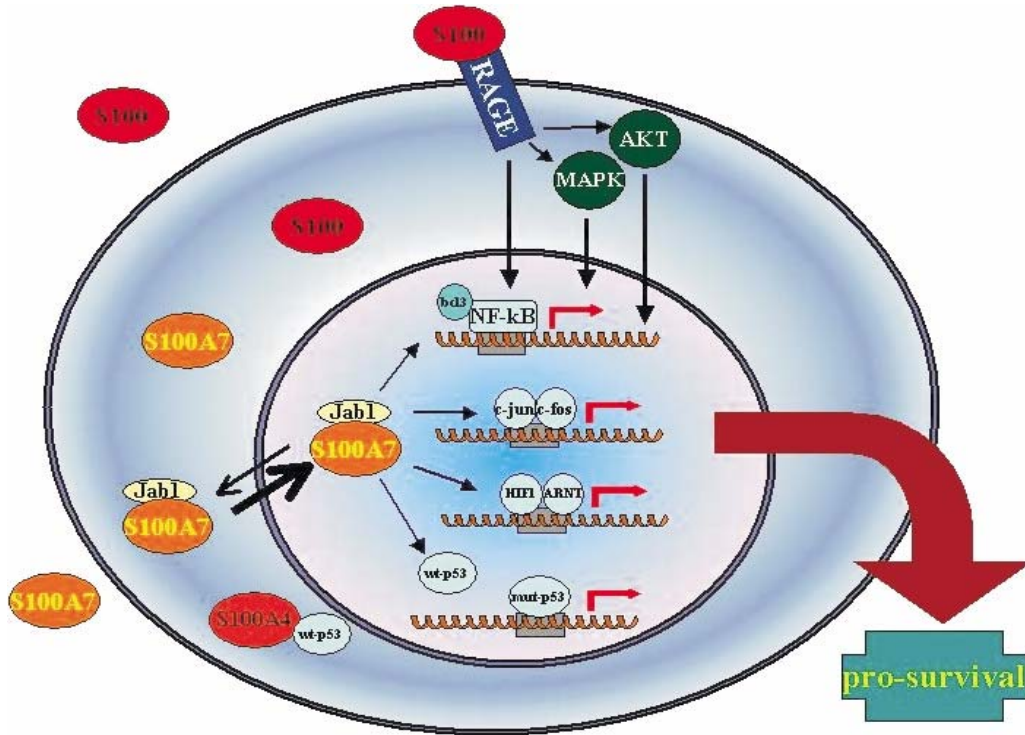
modelinde de m-RNA olarak gösterilmiştir(74,75). Meme, kolorektal, mide, medullablastoma, prostat ve mesane gibi çeşitli kanser tiplerinde S100A4 ekspresyonu gösterilmiştir(76-81). S100A4'lü transgenin farelerde MMTV (The mouse mammary tumor virus) kontrolü altında meme glandında hedeflenmiş S100A4 proteini üretildi. S100A4 proteininin ekspresyonu spontan meme tümör formasyonunda eksprese olmadığı gözlenmiştir. S100A4'lü transgenik fareler MMTV'li yeni fareler ile çaprazlandığında yeni kuşakta S100A4'ün metastaz gelişimini arttırdığı görülmüştür. Buna göre S100A4 tümör oluşumunda rol oynamaz(82). Fakat tümör progresyonunda başlatıcı olarak growth faktör yollarını değiştirerek sinerjize olabilir. Bu bilgilere dayanarak S100A4'ün invazyonda spesifik rolünü görmekteyiz. İnvitro çalışmalarda antisense-RNA ile S100A4'ün inhibisyonu metastatik hücrelerde, hücre motilitesini ve invazyonunu azaltmaktadır(83). Çeşitli proteinlerin etkileşimi metastazı başlatması açısından ipucu olsa da S100A4'ün mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Hücre iskeleti ve yapısında bulunan proteinlerin (f-aktin, myozin, nonmuscle tropomyozin) S100A4 ile etkileşimi gösterilmiştir(84-86). Aynı zamanda melanoma hücrelerinde tubülün polimerizasyonunda da rolü olduğu gösterilmiştir(87). Tümör supresör protein olan P53'ün S100A4 ile olan etkileşimi bulunmuştur. Bu etkileşimin bir sonucu olarak, invitro protein kinaz C'nin inhibisyonu ile P53'ün fosforile olduğu gösterilmiştir(88). İnvitro S100A4 P53'e bağlanması P53 DNA bağlama aktivitesine engel olabilir. Wildtip P53(TP53) eksprese eden hücrelerde S100A4 indüksiyonu sonrasında, bazı P53 hedef genlerinde transkripsiyonun downregulasyonu (P21/WAF,trombospondin1,MDM2 gibi) gözlenmiştir. Fakat bazı deneylerde S100A4 ekspresyonu sonrasında proapoptotik ve P53 gen regülatörü BAX'ın ekspresyonunun uyarıldığı görülmüştür. Wild tip P53 ve P53 bağımlı apoptozisin artmasına yardımı ile S100A4'ün tümör progresyonu üzerine etkisi olabilir ve bu tümörde TP53'ün fonksiyon kaybını hızlandırabilir(87). Alternatif düşünce olarak hücre sitoplazmasında S100A4 sekestre edilen P53'e bağlanarak P53'ün nükleer fonksiyonlarını inhibe edebilir(89).

S100'ler yüksek derecede homolojik dizilişe sahip olmasına rağmen, dokulardaki dağılımları ve modüle ettikleri biyokimyasal reaksiyonlar farklıdır. Sekestre edilen ekstraselüler S100'ler, RAGE (Receptör for advanced glycation of end prodnots) ile etkileşir ve sinyal yolaklarını aktifler. Meme ve akciğer tümör dokularında, RAGE ekspresyonu ile S100A4 ve S100A6 ekspresyonu bol miktarda bulunmuştur(90). S100 proteinlerinin RAGE aktivitelerinin üzerine direkt etkisi ispatlanmış olup, S100'ler RAGE'leri aktive edebilir. Fakat bu hipotezi doğrulamak için birçok çalışmaya ihtiyaç vardır. Hedeflenmiş terapötik müdahalenin amacı; S100'ler ile hücre yüzeyindeki RAGE'lerin etkileşmesini engelleyerek, RAGE blokajını önlemektir. Değiştirilmiş RAGE sinyalinin akış yönünün etkisi NF-kB ve pro-survival yolaklarını etkileyebilir.

Birçok S100 intraselluler kompartmanda bulunur ve değişik görevlerde karşımıza çıkar. Çünkü bu proteinlerin katalitik aktiviteleri yoktur. Başka proteinlerin aktivitelerini modifiye ederler. S100'lere bağlı olarak çeşitli intrasellüler etkileşimleri olmakla birlikte, P53 tümör supresör proteinleriyle olan etkileşimi merak uyandıracak niteliktedir. Bazı vakalarda etkileşim sonucunda P53 hedef olan genlerin promoter bölgesine daha fazla bağlanamaz ve böylece gen transkripsiyonunu aktive edemez. Çeşitli P53 bağımlı genler pro-survival'dır. Diğer vakalarda etkileşimin P53'ün sitoplazmadaki sekesterasyonu sonucu olduğu düşünülmüştür. Bu sekesterasyon hücrede apoptozisin başlamasını durdurur ve bunu apoptotik sinyalinden kurtulabilen mutant tümör hücrelerini kapsayan kısım takip eder. Böylelikle kanser hücreleri gelişir ve agresif tümör olarak karşımıza çıkar. Bu hipotez değişik çelişkiler taşır. P53 bağımlı gen olan BAX S100A4'ün katkısı sonucu üretilir. Bu regülatör faktörlerin dominant fonksiyonları saptanması veya farklı hücre tipleri ve model sistemleri arası çeşitlilik, değişik çalışmalarda kullanılmasına bağlı olabilir. S100A4 ve P53 arasındaki etkileşim ne olursa olsun S100A4'ün invazyonu başlatıcı selüler rolüyle uyumlu olarak gözükmektedir. Hücre içinde S100'ler çeşitli proteinlerle değişik hücre lokalizasyonlarında etkileşebilir. Hücre yüzey reseptörleri ve intrasellüler etkileşimlerle, S100 gen ailesi birçok değişik etkiye sahiptir.

S100'lerin etkileri kanser progresyonunu başlatmalarındaki rollerine katkıda bulunur. İntraselüler ve ekstraselüler aktivasyonlarının etkisi, pro-survival yollar üzerine ortaktır(71). İleride yapılacak mekanizma çalışmaları S100'ün tedavi için hedef olarak kullanılıp kullanılmayacağını gösterecektir.

S100 proteinleri nükleus ve sitoplazmada bulunabilir ve ekstraselüler olarak sekrete edilebilir. Ekstraselüler aktiviteyi RAGE ve hücre tipleri arasında değişebilen MAPK'yı içeren transdüksiyon sinyal kaskadının aktivasyonu ile kontrol edilir. Sonuç olarak prosurvival/anti-apoptotik genler NF-kB transkripsiyon faktörleri ile regüle edilir. İntraselüler aktiviteyi transkripsiyon faktörlerinin etkileşimi ve kofaktörler ile düzenlenir. Örneğin S100A7 Jab1 ile etkileşebilir ve nükleusta aktif form olarak Bcl-3 gibi transkripsiyon genleri ile etkileşerek NF-kB'ye bağlı transkripsiyonu aktifler. Jab-1, c-jun ile etkileşerek AP-1 kırık genlerini aktifler. Hipoksik koşullarda Jab-1, HIF-1(Hipoksi oluşturan faktör 1) ile etkileşerek hipoksik genleri regüle eder. S100A4 ve Jab1, TP53 ile etkileşerek DNA'ya bağlanmayı ve gen transkripsiyonunu engeller(71)(Şekil 2.2).



Şekil 2.2. S100'lerin etki mekanizması. . Ethan D. Emberley, Leigh C.

Murphy, and Peter H. Watson. S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer. *Biochem. Cell. Biol.* 2004;82:508-515' den alınmıştır.

Sonuç olarak yüksek seviyede S100A4 ekspresyonu çeşitli kanser türlerinde metastaz için önemli faktör olup, kötü prognoz ile korele olarak karşımıza çıkmaktadır. Metastatik aktivite transgenik farelerde S100A4'ün aşırı ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. S100A4'lü farelerde tümör progresyonu ve metastaz gelişiminin suprese olduğu gözlenmiştir. S100A4 ekspresyon geni beta-katenin sinyal yolağı ile regüle edilir. Beta-katenin S100A4 ekspresyonunu indükler. Bu kültüre edilmiş hücrelerin migrasyonunu ve invazyonunu artırır(91).

KRK'ler ile ilgili, klinikle korele pek çok moleküler araştırma yapılmakta ve özellikle hastalığın seyrini belirlemede tedavi ekibine yol gösterecek yeni belirteçler aranmaktadır. KRK'in hangi tipinin hangi hastada nasıl seyredeceğine dair elde edilecek yeni bilgiler tedavi alternatiflerinin doğru seçimi ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi bakımından çok önemlidir. Bu çalışmada, GATA Genel Cerrahi Kliniğinde Kolon kanserli hastalarda S100A4 protein ekspresyonunun tümör progresyonu ve metastaz karakteristikleri ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymak ve prognostik önemini gözlemek amaçlanmıştır. İnvitro ve invivo invazyon ve metastazı kolaylaştıran S100A4 proteinin, kolon kanserinde klinik ve patolojik özellikleriyle ilişkisinin ortaya konulması ve bu özelliğin bir prognostik kriter olarak değeri araştırılmıştır.

III- GEREÇ VE YÖNTEM

Planlama aşamasında çalışma projesi hazırlanarak GATA yerel etik kurulundan 05.03.2010 tarihli ve 1491-688-10/1539 sayılı onay alındı.

Çalışma 1995 ile 2008 yılları arasında GATA Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda tedavi edilen kolon kanserli hastalara ait parafin bloklardan hazırlanan preparatlar ve kayıtlı klinik veriler kullanılarak yapılmıştır.

Çalışma kriterlerini karşılayan hastaların, GATA Patoloji AD arşivindeki parafin bloklarından hazırlanan preparatlarda aşağıda ayrıntılı açıklanan yöntemlerle S100A4 ekspresyonları belirlenmiş ayrıca hastalara ait klinik veriler retrospektif olarak toplanmış ve kolon kanseri klinik seyri ile S100A4 ekspresyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır.

3.1. Hasta Grubu ve Verilerin Toplanması

Çalışmaya, kabul kriterlerini karşılayan 67'si erkek, 44'ü kadın toplam 111 hasta dâhil edildi. Hasta dosyalarından ve hastane bilgi sisteminden hastalara ait yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, M evresi, ameliyat tipi, mortalite ve sağ kalım süreleri retrospektif olarak çıkarıldı. Patoloji raporlarından tümör büyüklüğü, T evresi, N evresi, metastatik lenf nodu yüzdesi, diferansiyasyon derecesi, perivasküler invazyon, perinöral invazyon ve evresi retrospektif olarak derlendi. Parafin bloklardan yeni preparatlar hazırlanarak S100A4 immunhistokimya boyaması yapıldı ve boyama skoru hesaplandı. Sağ kalımın değerlendirilmesi için tüm hastalara veya yakınlarına telefon ile ulaşılarak hayatta olup olmadıkları belirlendi.

3.2. Çalışmaya Kabul Kriterleri

Yukarıda belirtilen tarihlerde kolon kanseri nedeniyle GATA Genel cerrahi kliniğinde takip ve tedavi edilen hastalardan çalışma parametrelerini karşılayacak klinik ve patolojik verilerine ulaşılabilenler ile

immünohistokimyasal inceleme için kullanılacak yeterli parafin blokları mevcut olan hastalar çalışmaya dâhil edildi.

3.3. Çalışma Dışı Bırakılma Kriterleri

Çalışma için belirlenen klinik ve patolojik verilerine ulaşılamayan hastalar, takipte kaybolan hastalar ve telefonla ulaşılamayan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Ayrıca teknik olarak immunhistokimya boyaması başarısız olan hastalar da çalışma dışı bırakıldı. TNM evre değerlendirmesinde homojenitenin sağlanması için rektum yerleşimli kanserler çalışmaya alınmadı. Ameliyat sonrası 30 gün içinde cerrahiye bağlı komplikasyonlar sonucu ölüm veya hastaneye ilk kabulden sonra hastaneden çıkmadan ölüm, çalışma dışı bırakılma kriteri olarak kabul edildi. Kolon dışı ikincil primer tümörü olan hastalar, senkron veya metakron tümörlerin varlığı ile hastanın ölümüne neden olan belirgin yandaş hastalıkların varlığı da çalışmaya alınmama nedeni olarak değerlendirildi.

3.4. İmmünohistokimya

Toplam 111 vakaya ait tamponlanmış nötral formalinde tespit edilmiş, parafinde bloklanmış dokulardan hazırlanan 4-6 mikrometre kalınlığındaki kesitler pozitif sarjlı lamlara (Menzel, superfrost plus slides) alındı ve 37⁰C'de 12 saat inkübe edildi.

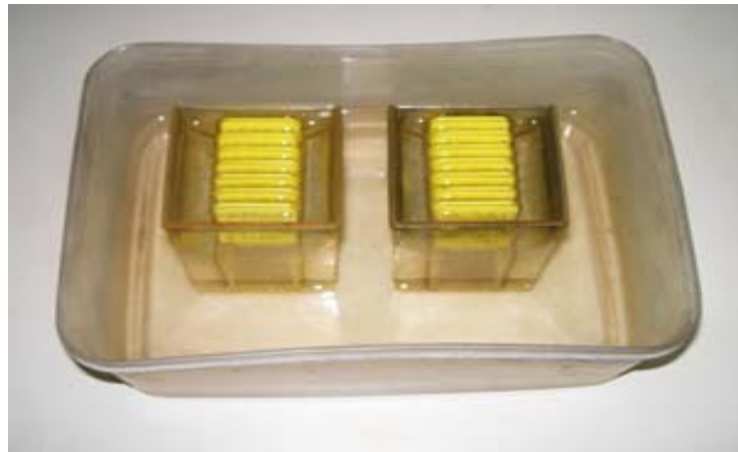
S100A4 ile boyanacak kesitler, ksilen ve yüksek konsantrasyonda alkol ile deparafinize edildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 10 dakika inkübe edildi. Ardından antijen geri kazanımı amacıyla sitrat tamponu içersinde PH 6.0'da 10 dakika kaynatılıp, oda ısısında 20 dakika soğutulmaya bırakıldı. UltraV blok protein blokaj solüsyonu 2-3 damla damlatılarak, 3-5 dakika bekletildi. Bundan sonra kesitlere 1/100 oranında dilüe edilmiş tavşan S100A4 antikoru damlatılarak, 60 dakika oda ısısında inkübe edildi(resim 3.1). Biotinylated Goat Anti-

Polyvalent solüsyonu yine kesitlerin üzerine 2-3 damla damlatılarak, 20 dakika bekletildi. Basamaklar arasında kesitler PBS yıkama solüsyonunda 3-5 dakika bekletildi. Streptavidin Peroksidas solüsyonu da yine kesitlerin üzerine 2-3 damla damlatılarak, 20 dakika bekletildi. DAB kromojeni ile 5-10 dakika inkübe edilen kesitlere, hematoksilin ile counter stain yapıldı (yaklaşık 20 saniye). Kesitler alkolden geçirilerek (şekil 3.2), etüvde kurutuldu ve ondan sonra entellan ile kapatıldı.

Şekil 3.1. İnkübasyon sehpası



Şekil 3.2. Alkolden geçirme ve yıkama basamağı

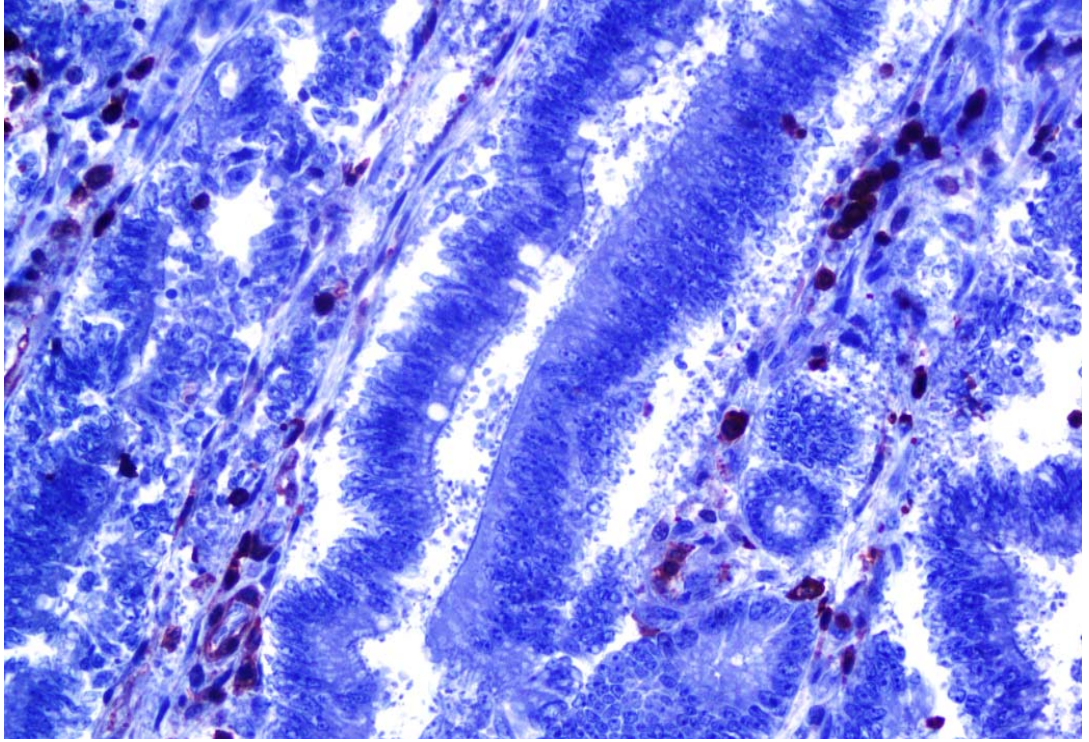


İmmünohistokimya uygulanan tüm kesitler, iki bağımsız gözlemci tarafından çift kör incelendi. DAP'ın kahverengisi baz alınarak, S100A4 için sitoplazmik boyanma aşağıdaki boyama skorlama sistemi uygulanarak değerlendirildi.

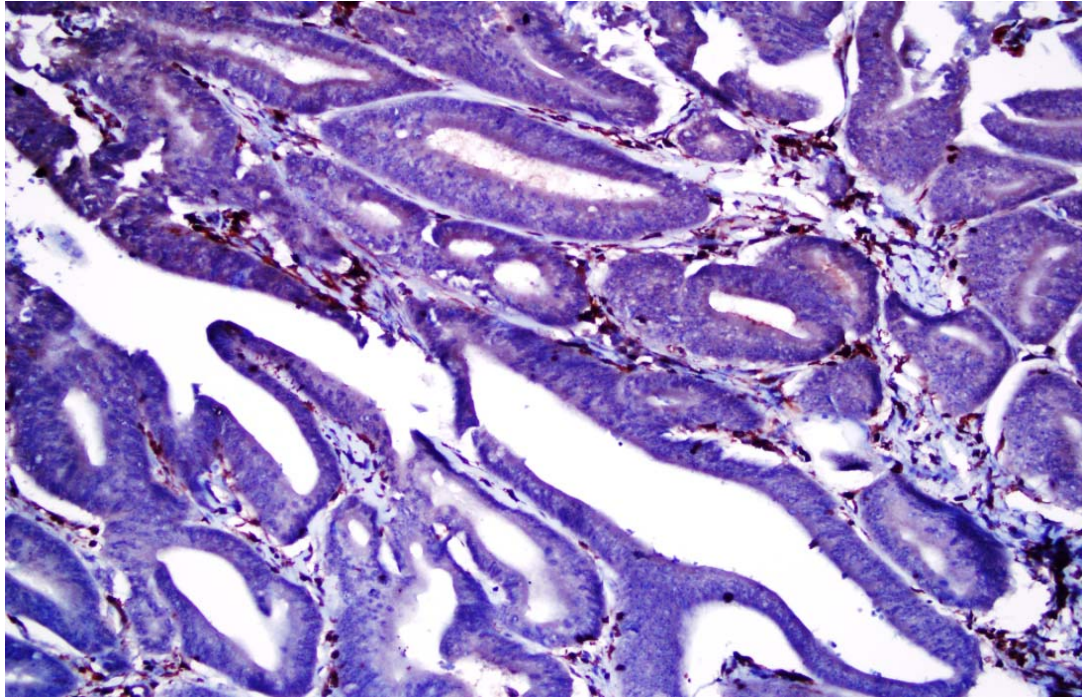
Pozitif kontrol olarak bir tonsil ve melanoma kesiti alındı. Negatif kontrol için primer antikorların yerine non-spesifik immün serum damlatılarak geri kalan boyama işlemlerine devam edildi. İmmünohistokimya kesitlerin değerlendirilmesinde S100A4'ün periferik sinirde gösterdiği boyama en kuvvetli kabul edilerek, buna göre boyanma yoğunluğu negatif(0), zayıf(+1) , orta(+2) ve kuvvetli (+3) olarak belirlendi. Boyanan hücre yüzdesi %0-10 (1), %10-25 (2), %25-50 (3) ve %50-100 (4) olarak belirlendi. Bu iki skor birbiriyle çarpıldı. Skoru 0 olanlar 1(şekil 3.3) ,skoru 1-4 arası olanlar 2(şekil 3.4a ve şekil 3.4b), 5-8 arası olanlar 3(şekil 3.5a ve şekil 3.5b), 9-12 olanlar 4(şekil 3.6a ve şekil 3.6b) olarak immünohistokimya boyama skoru (İHKBS) elde edildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. İmmünohistokimya boyama skorlaması

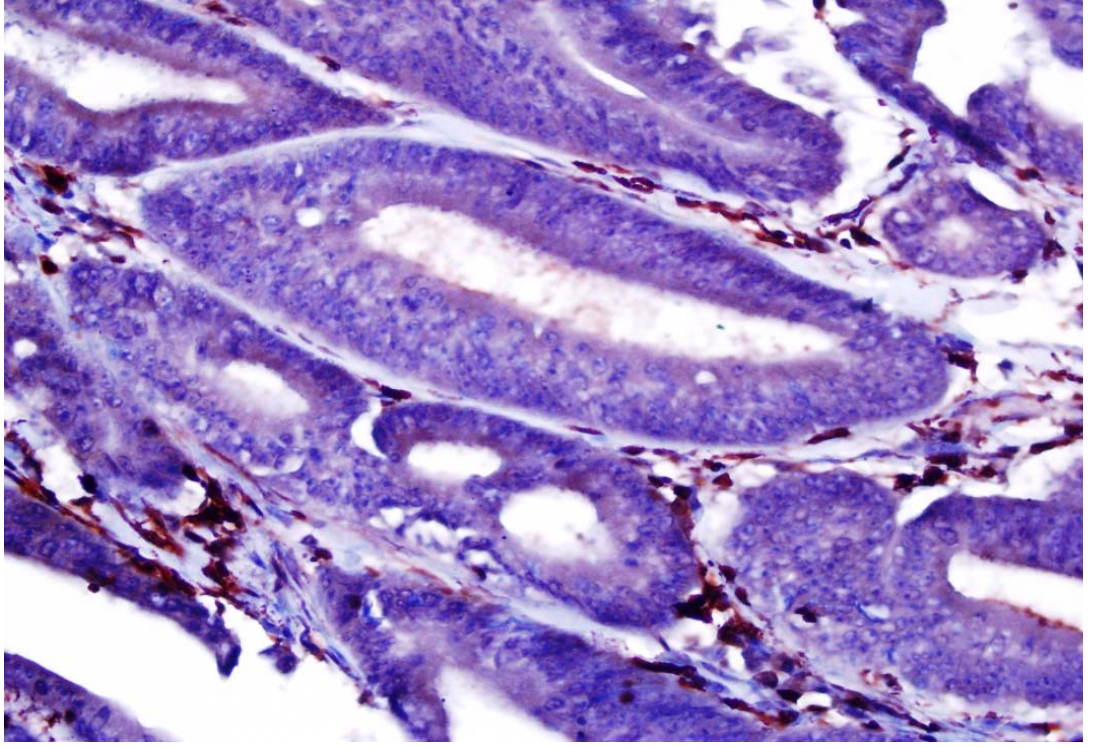
Boyama yoğunluğu	Skor
Negatif	0
Zayıf	+1
Orta	+2
kuvvetli	+3
Boyanan hücre yüzdesi	Skor
%0-10	1
%11-25	2
%26-50	3
%51-100	4
İHKBS	Toplam skor(axb)
1	0
2	1-4
3	5-8
4	9-12



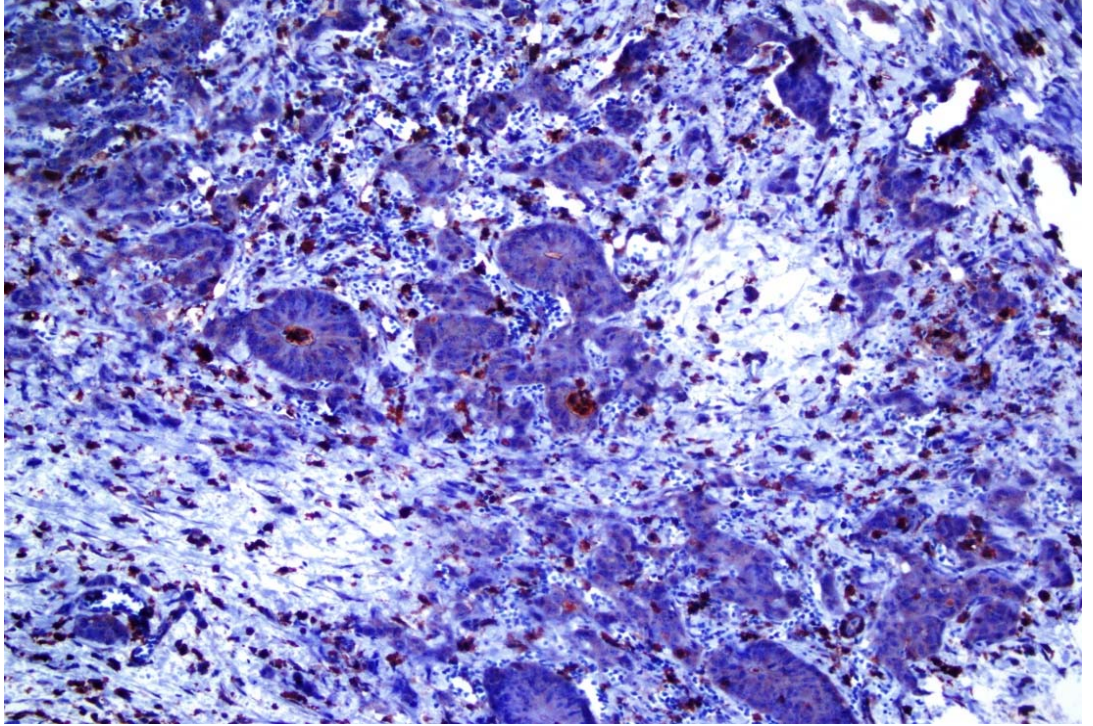
Şekil 3.3. İHKBS 1 olan tümörde S100A4 ekspresyonu (x200 büyütme)



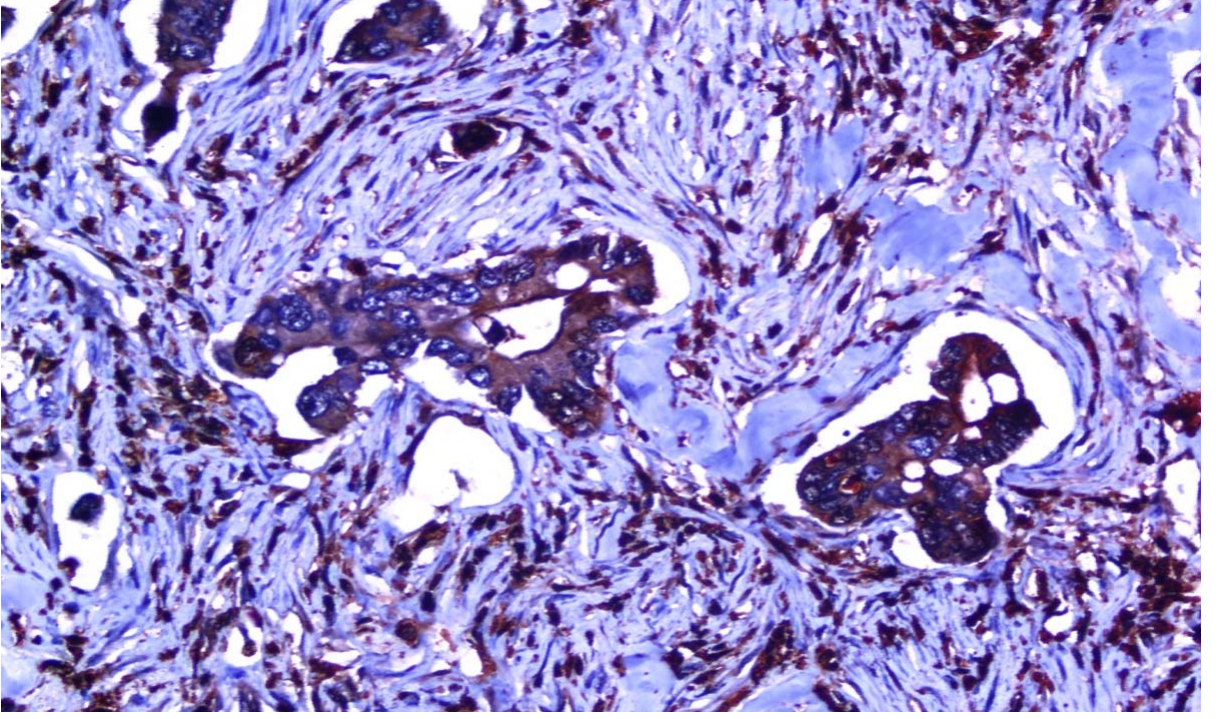
Şekil 3.4a. İHKBS 2 olan tümörde S100A4 ekspresyonu (x200 büyütme)



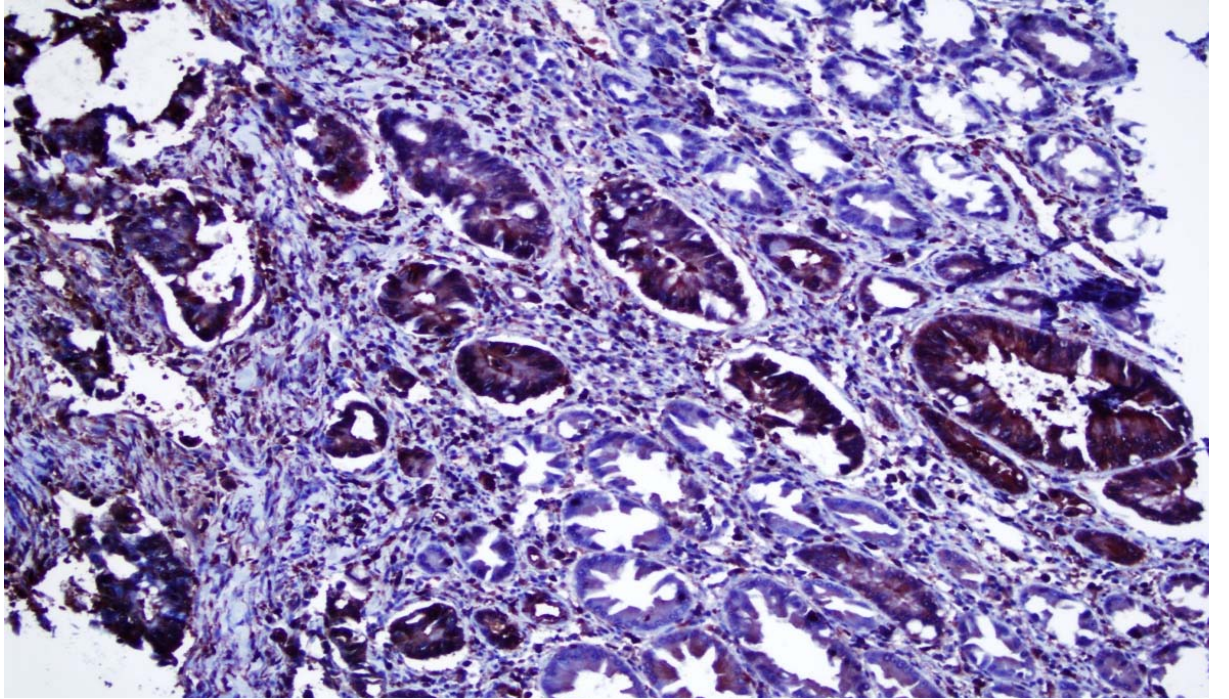
Şekil 3.4b. İHKBS 2 olan tümörde S100A4 ekspresyonu (x400 büyütme)



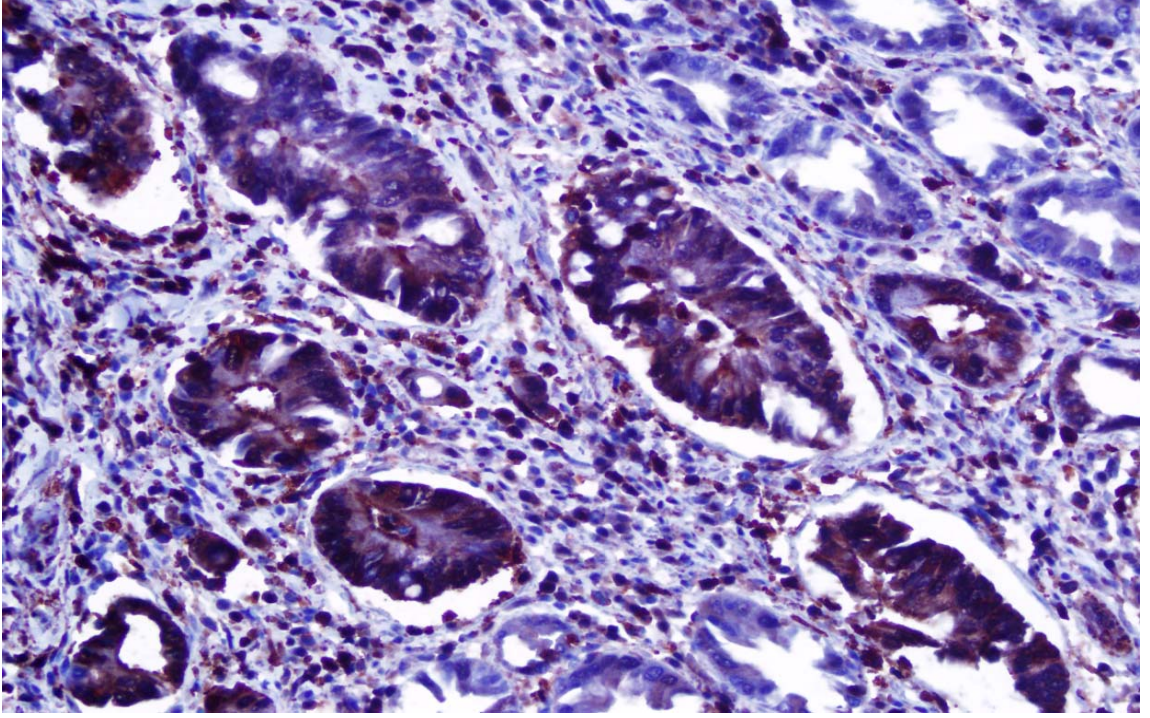
Şekil 3.5a. İHKBS 3 olan tümörde S100A4 ekspresyonu (x200 büyütme)



Şekil 3.5b. İHKBS 3 olan tümörde S100A4 ekspresyonu (x400 büyütme)



Şekil 3.6a. İHKBS 4 olan tümörde S100A4 ekspresyonu (x200 büyütme)



Şekil 3.6b. İHKBS 4 olan tümörde S100A4 ekspresyonu (x400 büyütme)

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için “SPSS 15.0 for Windows” paket programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotlar için %, ortalama \pm standart sapma kullanıldı. Vakaların İHKBS’u yaş, cinsiyet, tümör lokalizyonu, tümör differensiasyonu, metastatik lenf nodu yüzdesi, perivasküler invazyon, perinöral invazyon, tümör çapı, T evresi, N evresi, M evresi, ameliyat tipi, mortalite ve sağ kalım süreleri ile karşılaştırıldı.

Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki kare Testi, Logrank Testi, Tek Değişkenli Cox-regresyon Testi ve Çok Değişkenli Cox-regresyon Testi kullanıldı. P degerinin 0.05’den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

IV- BULGULAR

Çalışmada, 67'si erkek 44'ü kadın olmak üzere 111 hastadan elde edilen veriler kullanılmıştır. Cinsiyet ile İHKBS arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı. Yapılan karşılaştırmalarda cinsiyet ile İHKBS arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. (P=0,519) (Tablo. 4.1)

Tablo.4.1. İHKBS ile cinsiyet ilişkisi

İHKBS	Erkek	Kadın	Toplam	P değeri
1	8(%66,7)	4(%33,3)	12	P=0,519
2	36(%57,1)	27(%42,9)	63	
3	20(%69)	9(%31)	29	
4	3(%42,9)	4(%57,1)	7	
Toplam	67(%60,4)	44(%39,6)	111	

Hastaların yaş ortalaması; 60,9 (21-90) olarak tespit edildi. Yaş ile İHKBS arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı. Yapılan karşılaştırmada anlamlı sonuç elde edilmedi (P=0,551).

Hastaların; 64'ünde sağ kolon yerleşimli, 28'inde sol kolon yerleşimli, 9'unda sigmoid kolon yerleşimli ve 10'unda multisentrik yerleşimli tümörler mevcuttu. Tümör lokalizasyonu ile İHKBS arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı. Yapılan karşılaştırmada anlamlı sonuç elde edilmedi (P=0,216).

Grade 1 (iyi diferansiye) tümörü olan 6, Grade 2 (orta derecede diferansiye) tümörü olan 72 ve Grade 3 (az diferansiye) tümörü olan 33 hasta mevcuttu. Tümör Grade'i ile İHKBS arasında (P=0,751) (Tablo. 4.2) Pearson Chi-square testi ile yapılan karşılaştırmalarda anlamlı sonuç elde edilmedi.

Tablo. 4.2. Tümör grade'i ile İHKBS arasındaki ilişki.

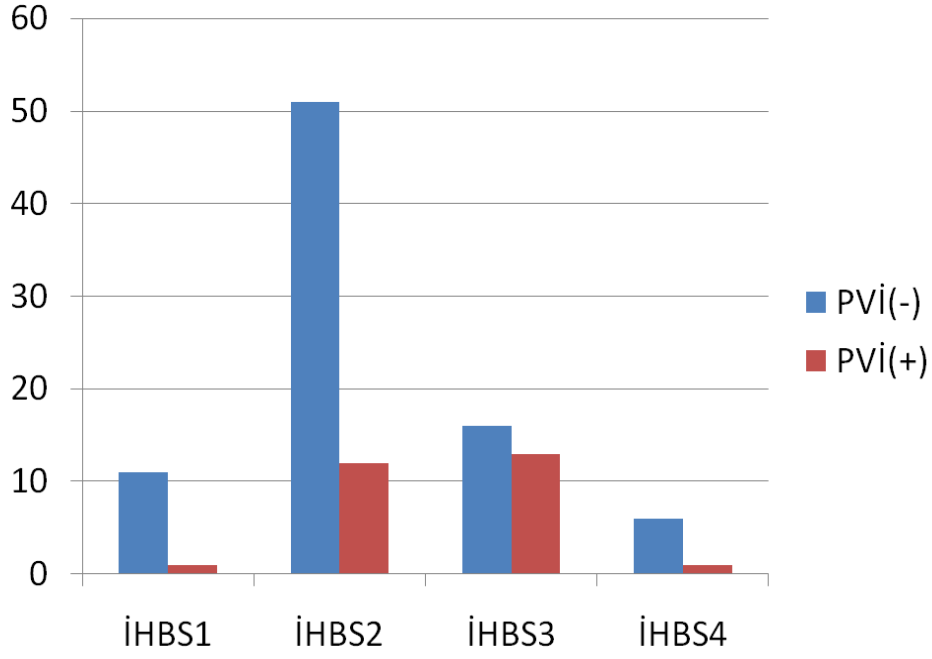
İHKBS	Grade1	Grade2	Grade3	Toplam	P değeri
1	1	7	4	12	P=0,751
2	5	41	17	63	
3	0	19	10	29	
4	0	5	2	7	
Toplam	6(%5,4)	72(%64,)	33(29,7)	111	

Metastatik lenf nodu sayısı ve metastatik lenf nodu yüzdesi ile İHKBS arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı. Metastatik lenf nodu sayısı ve metastatik lenf nodu yüzdesi yükseldikçe İHKBS nun arttığı belirlendi. (P=0,001).

111 hastanın 27'sinde perivasküler invazyon olduğu gözlemlendi. Perivasküler invazyon ile İHKBS Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı. Perivasküler invazyonu olan hastalarda, İHKBS'nun daha yüksek olduğu gözlemlendi(P=0,022) (Tablo.4.3) (Şekil 4.1).

Tablo. 4.3. PVI(Perivasküler invazyon) ile İHKBS ilişkisi

İHKBS	PVI(-)	PVI(+)	P değeri
1	11	1	P=0,022
2	51	12	
3	16	13	
4	6	1	
Toplam	84(%75.7)	27(%24.3)	

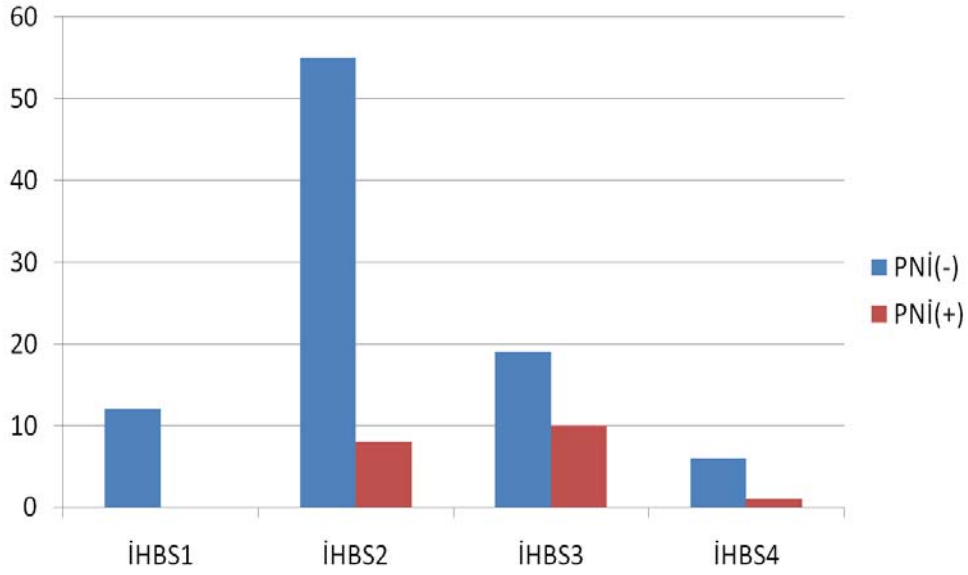


Şekil 4.1. PVİ(Perivasküler invazyon) ile İHKBS ilişkisinin grafiği

Hastaların 19'unda perinöral invazyon olduğu gözlemlendi. Perinöral invazyon ile İHKBS arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı. Perinöral invazyonu olan hastalarda, İHKBS'nun yüksek olduğu gözlemlendi(P=0,023) (Tablo.4.4) (Şekil4.2).

Tablo.4.4. PNİ(Perinöral invazyon) ve İHKBS ilişkisi

İHKBS	PNİ(-)	PNİ(+)	P değeri
1	12	0	P=0,023
2	55	8	
3	19	10	
4	6	1	
Toplam	92(%82.9)	19(%17.1)	



Şekil 4.2. PNI(Perinöral invazyon) ve İHKBS ilişkisinin grafiği

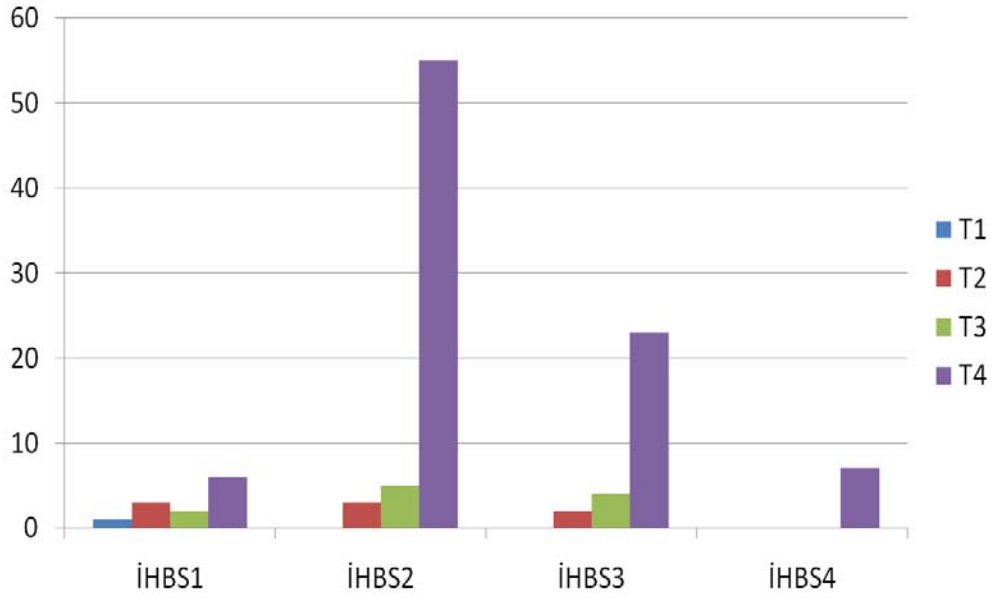
Tümör çapı ile İHKBS arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı($P=0,628$).

Hastaların 59'una sağ hemikolektomi, 14'üne transvers kolektomi, 20'sine sol hemikolektomi, 9'una anterior rezeksiyon, 10'una total kolektomi operasyonu uygulandı. İHKBS ile ameliyat tipi arasında yapılan istatistiksel analizde herhangi bir anlam bulunmadı.

Hastaların T evreleri değerlendirildiğinde 1'i T1, 8'i T2, 11'i T3 ve 91 tanesi T4 evresindeydi. T evresi ile İHKBS arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı ($P=0,030$) (Tablo.4.5.)(Şekil 4.3)

Tablo.4.5. İHKBS ile T evresi arasındaki ilişki

İHKBS	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	P değeri
1	1	3	2	6	P=0,030
2	0	3	5	55	
3	0	2	4	23	
4	0	0	0	7	
Toplam	1(%0.9)	8(%7.2)	11(%9.9)	91(%82)	

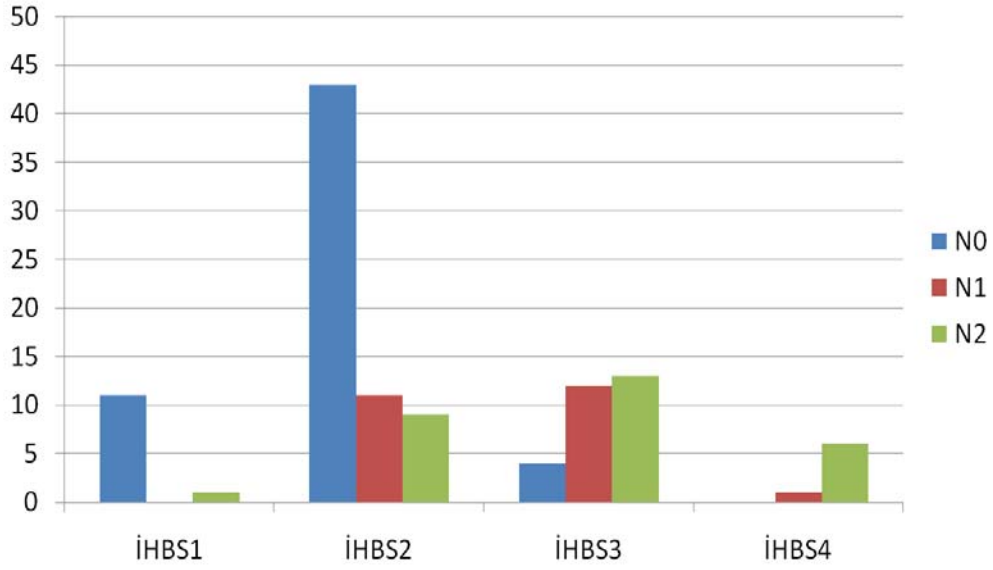


Şekil 4.3. İHKBS ile T evresi arasındaki ilişkinin grafiği

N evresinin değerlendirilmesinde ise N0 58 hasta, N1 24 hasta ve N2 29 hasta tespit edildi. N evresi ile İHKBS arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı ($P < 0,001$) (Tablo.4.6.) (Şekil 4.4).

Tablo.4.6. İHKBS ile N Evresi arasındaki ilişki

İHKBS	N ₀	N ₁	N ₂	P değeri
1	11	0	1	P<0,001
2	43	11	9	
3	4	12	13	
4	0	1	6	
Toplam	58(%52.3)	24(%21.6)	29(%26.1)	

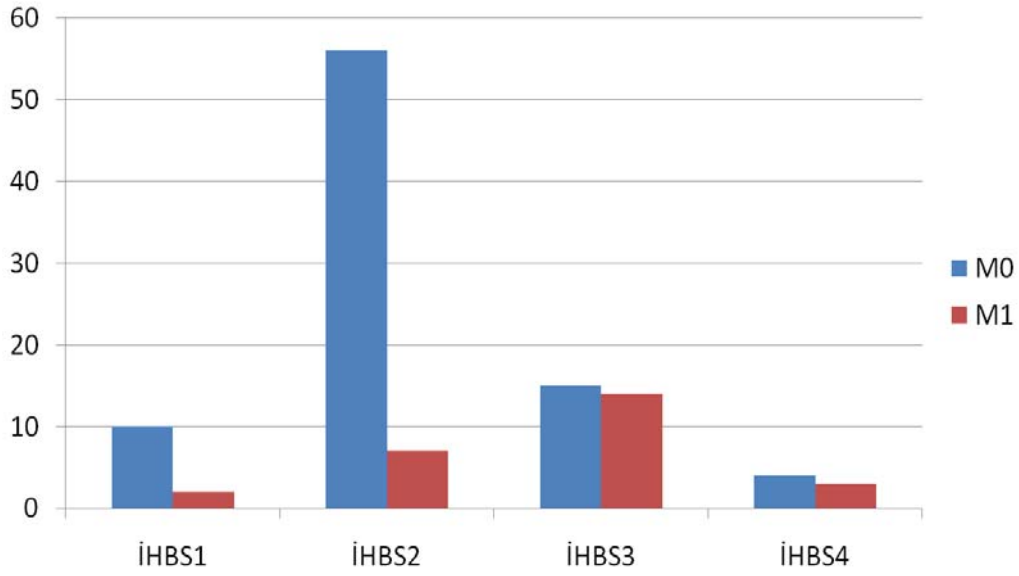


Şekil 4.4. İHKBS ile N Evresi arasındaki ilişkinin grafiği

M0 evresi olan 85 hasta ve M1 evresi olan 26 hasta mevcuttu. Yine M evresi ile İHKBS arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı ($P=0,001$) (Tablo 4.7)(Şekil 4.5). Sonuçta İHKBS'un; T evresi, N evresi ve M evresi arttıkça yükseldiği gözlemlendi.

Tablo.4.7. İHKBS ile M evresi arasındaki ilişki

İHKBS	M ₀	M ₁	P değeri
1	10	2	P=0,001
2	56	7	
3	15	14	
4	4	3	
Toplam	85(%76.6)	26(%23.4)	

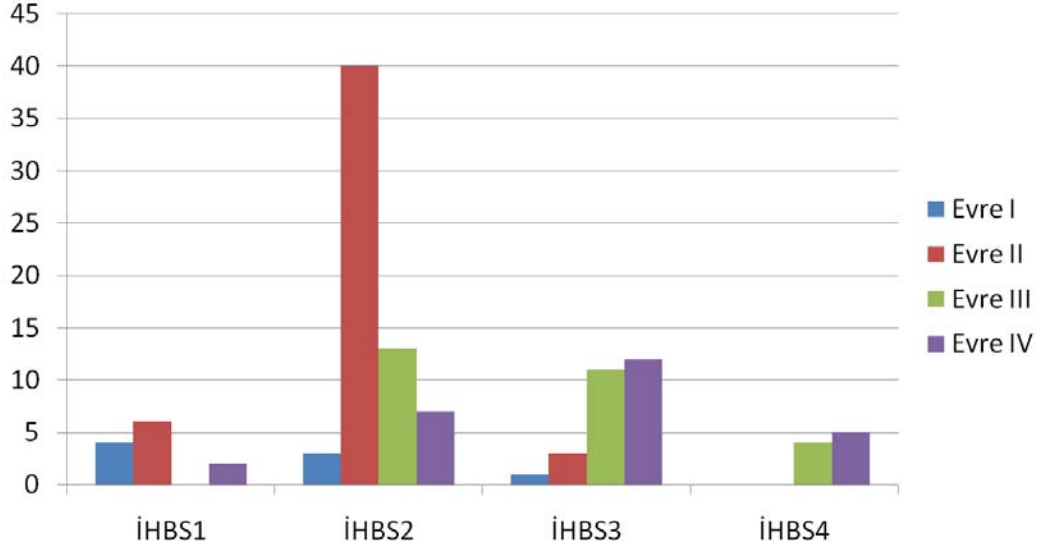


Şekil 4.5. İHKBS ile M evresi arasındaki ilişkinin grafiği

TNM evrelemesine göre hastaların 8'i Evre I, 49'u evre II, 28'i evre III ve 26'sı evre IV idi. Evre II'lerin 2'si Evre IIA, 42'si Evre IIB idi. Evre III hastaların 1'i evre IIIA, 13'ü Evre IIIB ve 14'ü Evre IIIC idi. İHKBS ile evre arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı ($p < 0,001$) (Tablo 4.8) (Şekil 4.6). Anlamlı olarak tümörlerin evreleri ilerledikçe, İHKBS'leri yüksek olarak bulundu.

Tablo 4.8. İHKBS ile Tümör evresi arasındaki ilişki

İHKBS	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	P değeri
1	4	6	0	2	P<0,001
2	3	40	13	7	
3	1	3	11	14	
4	0	0	4	3	
Toplam	8(%7.2)	49(%44.1)	28(%25.2)	26(%23.5)	



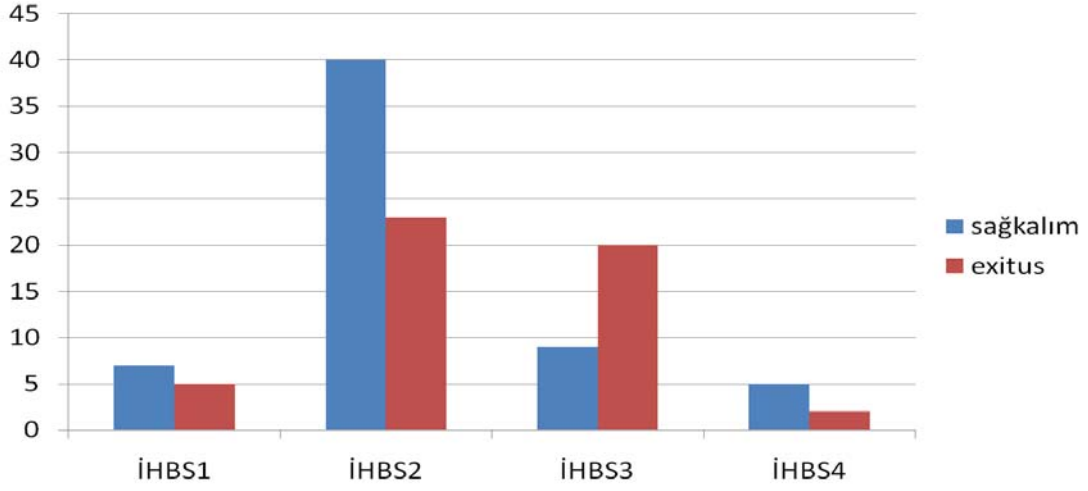
Şekil 4.6. İHKBS ile tümör evresi arasındaki ilişkinin grafiği

Mortalite ile İHKBS arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı ($P=0,025$) (Tablo 4.9)(Şekil 4.7). İHBS yükseldikçe, mortalitenin arttığı görüldü.

Hastaların ortalama takip süresi 44 ay(2-113 ay) idi. İHKBS ile 5 yıllık sağkalım arasındaki ilişki Logrank testi ile değerlendirildi. İHKBS arttıkça sağkalım oranlarının düştüğünü görüldü ($P=0,002$) (tablo 4.10). Mortalite ile İHKBS arasında ilişki Cox-regresyon testi ile değerlendirildi. İHKBS'ları 1 ile 2 olanlar arasında 0,43-29,8 güven aralığında $OR_{mortalite}$ 1,13 olarak hesaplandı ($P=0,809$). İHKBS'ları 2 ile 3 olanlar arasında, 1,20-8,98 güven aralığında $OR_{mortalite}$ 3,29 olarak hesaplandı ve anlamlı istatistiksel sonuç elde edildi ($P=0,020$). İHKBS'ları 3 ile 4 olanlar arasında 0,22-6,11 güven aralığında $OR_{mortalite}$ 1,16 olarak hesaplandı ($P=0,856$). İHKBS ile mortalite arasında skoru 1 ile 2 ve 3 ile 4 arasında Cox-regresyon testiyle anlamlı sonuçlar elde edilemedi.

Tablo 4.9. İHKBS ile mortalite ilişkisi

İHKBS	sağkalım	exitus	P değeri
1	7	5	P=0,025
2	40	23	
3	9	20	
4	5	2	
Toplam	61(%54.9)	50(%45.1)	



Şekil 4.7. İHKBS ile mortalite ilişkisinin grafiği

Tablo 4.10. İHKBS ile 5 yıllık sağ kalım oranları ilişkisi

İHKBS	N	5 yıllık sağkalım oranları	P değeri
1	12	%65,4	P=0,002
2	63	%60,7	
3	29	%21,8	
4	7	%57,1	

V- TARTIŞMA

Toplumda görülme sıklığı açısından önemli yer tutan KRK'ler, kanserle ilişkili mortalite sıralamasında kadın ve erkeklerde dördüncü sırayı almaktadır. Dünyada yılda 900 binden fazla yeni vaka bildirilmekte ve yaklaşık 500 bin kişi KRK nedeniyle kaybedilmektedir. KRK'lerin büyük çoğunluğunun adenoma zemininden geliştiği kabul edilmektedir(92).

KRK'ler ile ilgili, klinikle korele pek çok moleküler araştırma yapılmakta ve özellikle hastalığın seyrini belirlemede tedavi ekibine yol gösterecek yeni belirteçler aranmaktadır. KRK'lerin hangi tipinin hangi hastada nasıl seyredeceğine dair elde edilecek yeni bilgiler tedavi alternatiflerinin doğru seçimi ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi bakımından çok önemlidir. Bu nedenle KRK'lerde kemoterapiden fayda görecektir hastaların seçimini sağlayacak yeni biyolojik ve genetik belirleyicilere ihtiyaç vardır(92,93).

Aynı zamanda tümör oluşum sürecini en iyi yansıtan KRK'ler bu süreç içinde oluşan genetik ve biyolojik değişikliklerin araştırılmasına da uygun ortam sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda KRK gelişiminde etkili olan myb, c-myc, APC, K-Ras ve tümör supressör (p53 gibi) genlerinde çeşitli genetik değişiklikler yayınlanmıştır(94).

Kanserler, çeşitli patolojik bozuklukları içerir. Bunlar bozulmuş Ca^{+2} hemoastasis ile ilişkilidir. Ca^{+2} bağlayan protein olan S100 proteinleri spesifik hücre ve dokularda ekspres olurlar. S100'ler, çeşitli kanser türlerinde downregüle veya overekspres olmaktadır. Günümüzde S100 proteinlerinin karsinogenezisdeki rolü tam olarak bilinmemektedir(88,95-98).

S100A4 proteini; S100 multigen protein ailesinin üyesi olup mts-1, metastatin, FSP-1,18A2, pEL98, p9Ka, CAPL veya calvaskulin olarak bilinir. EF-el yapısında olup, kalsiyum bağlayan proteindir. Bu gen ailesi 1q21 kromozomda kodlanmıştır. Ca^{+2} bağımlı protein olan S100A4 hücre iskelet proteinleri (tropomiyozin, ağır zincirli nonmuscle miyozin vd.) ile etkileşerek miyozin filamentinin depolarizasyonunu artırır. Bunu protein kinaz ve CK2

enzimi ile miyozin fosforilasyonunu inhibe ederek yapar(86, 87, 99, 100). Son zamanlarda S100A4'ün liprinb1 ve S100A1 ile etkileştiği gösterilmiştir(101,102). S100A4'ün değişik şekillerde homodimer, heterodimer ve oligomer olan 3 formu vardır. Bu 3 form proteinin fleksible yapısını yansıtmaz fakat hücre dinamiği ve motilitesi ile yakından ilişkilidir(103).

Yüksek seviyede S100A4 ekspresyonu çeşitli kanser türlerinde(108-112) ve KRK'lerde(78,104-106) metastaz için önemli faktör olup kötü prognoz ile korele olarak karşımıza çıkmaktadır. Meme, kolorektal, mide, medullablastoma, prostat ve mesane gibi çeşitli kanser tiplerinde S100A4 ekspresyonu gösterilmiştir (76-81). Bizim çalışmamızda da kolon kanserinde tümör hücrelerindeki S100A4 aşırı ekspresyonu immunhistokimyasal boyama ile ortaya konuldu. Literatürde, S100A4 aşırı ekspresyonunu gösteren İHKBS'ları veya S100A4 pozitifliği değişik şekillerde hesaplanmıştır. Bu çalışmada, immunhistokimya boyama skorları değerlendirilirken S100A4'ün periferik sinirde gösterdiği boyama en kuvvetli kabul edilerek hesaplandı. Buna göre boyanma yoğunluğu, negatif(0), zayıf(+1) , orta(+2) ve kuvvetli (+3) olarak belirlendi. Boyanan hücre yüzdesi; %0-10 (1), %10-25 (2), %25-50 (3) ve %50-100 (4) olarak belirlendi. Bu her iki skor birbiriyle çarpıldı. Skoru 0 olanlar 1,skoru 1-4 arası olanlar 2, 5-8 arası olanlar 3, 9-12 olanlar 4 olarak immunhistokimya boyama skoru(İHKBS) elde edildi (113). Yong-Gu Cho ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada boyanan hücre yüzdesinin, %30'dan yüksek olması pozitif olarak kabul edilmiştir(114). Ok-Jae Lee ve arkadaşlarının yaptığı skorlamada boyama yoğunluğu ile boyanan hücre yüzdesinin çarpımıyla elde edilen skor 0 olanların İHKBS 0, 1-2 arası olanlar 1, 2-6 arası olanlar 2, 5-12 olanlar 3 olarak kabul edilmiştir (115).

Yapılan çalışmalarda, S100A4 ekspresyonunun normal kolon epitelinde de az da olsa gözlenebileceği ortaya konmuştur. Adenomlarda %33 oranında, adenokarsinomlarda %38 oranında ve karaciğer metastazlılarda %97 oranında aşırı ekspresyon olmaktadır. Bu gözlemler, çalışmalar arasında farklı sonuçlara neden olabilecek faktörlerden bir tanesidir (116).

Son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalarda tümör dokusuna yakın sağlam dokularda S100A4 seviyelerinin artığı gözlenmiştir. Bu durum Western blotting yöntemi ve RT-PCR yöntemi ile tümör dokusuyla ve hemen komşu sağlıklı doku arasındaki S100A4 ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmış (Komatsu et al, 2001) ve istatistiksel anlam elde edilememiştir. Fakat immunhistokimya boyama ile yapılan karşılaştırmalarda, tümör dokusuyla sağlıklı komşu doku arasında ekspresyonun ayırt edilmesi açısından anlamlı farklar elde edilmiştir (P=0.0016, Fisher exact test)(116).

İleri evre metastatik kolon kanserlerinde, metastatik olmayanlara göre daha fazla S100A4 mRNA ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (91). Yine transgenik ratlarda aşırı eksprese olan S100A4'ün metastatik aktivitesi gösterilmiştir. Birçok hayvan modelinde yapılan çalışmalarda, tümör gelişimine etkisi olmayan S100A4'ün metastaz gelişimini sağladığı bildirilmiştir(82, 117). Aşırı S100A4 ekspresyonunun, kötü prognoz ve düşük sağkalım ile korele olduğu ortaya konmuştur(118). KRK'de S100A4 ekspresyonunun olması; tümör progresyonunu arttırıp, karaciğerde metastaz gelişmesine neden olur(83, 119, 120). İmmunohistokimyasal tekniklerle değerlendirilen S100A4'ün aşırı ekspresyonunun düşük sağkalım süresi ile korele olduğu gösterilmiştir(121). Metastatik olmayan kolon kanserli hastalarda yapılmış çalışmada, S100A4 ekspresyonu gösteren hastaların takiplerinde daha çok metastaz ortaya çıktığı gözlenmiştir(91).

Barret özafaljit zemininde gelişen adenokarsinomlar üzerinde yapılan çalışmada, S100A4 ekspresyonunun kuvvetli olduğu gösterilmiştir. İstatistiksel olarak lenf nodu tutulumu ile S100A4 ekspresyonu arasında kuvvetli bir ilişki olduğu, farklı histolojik alt tipler karşılaştırıldığında daha kötü prognoza sahip oldukları gösterilmiştir(122)

Değişik klinik çalışmalarda, çeşitli kanser türlerinde S100A4 ekspresyonu ile kötü prognostik faktörler arasında karşılaştırmalar yapılmış ve anlamlı sonuçlar bulunmuştur(122-129).

KRK'lerde lenf nodu tutulumu ile S100A4 aşırı ekspresyonu arasında korelasyon gösterilmiştir(128).

Erken evre meme kanserinde S100A4 ekspresyonu potansiyel metastaz belirteci ve sağkalım belirteci olarak gösterilmiştir(129).

S100A4'ün intrasellüler ve ekstrasellüler fonksiyonları bulunmaktadır. İntrasellüler S100A4 vital hücre fonksiyonları olan motilite, invazyon, hücre bölünmesi ve hücre yaşam süresini etkiler. Aynı zamanda, tümör hücresinde S100A4 hücre motilitesi ve invazyon yeteneğini artırarak metastaz kabiliyetini arttırdığı gösterilmiştir(85,88).

S100A4 P53'ün kuvvetli bir inhibitörüdür. S100A4 ekspresyonu ve kötü prognoz arasındaki ilişkiye rağmen S100A4'ün bunu nasıl yaptığı ve mekanizmasının ne olduğu hala tam olarak bilinmemektedir ve araştırma konusudur(130).

İmmunhistokimya boyama sırasında yalnızca tümör hücreleri boyanmaz. Bunun yanında parankimal doku, reaktif fibroblast-like hücreler, sinir hücreleri, lenfositler ve kan damarları da azalmış oranlarda boyanmaktadır. Tümör hücrelerinin boyanması, boyamanın etkinliğini gösterir. S100A4'ün heterojen boyama paterni, antijenin antikora bağlanamaması nedeniyle bir takım yanlış sonuçlar doğurabilir. Bunlar boyama esnasındaki hatalar nedeniyle karşımıza çıkmaktadır (131).

Rodent modellerde metastazlara yol açtığı gösterilmiş olan S100A4'ün, bir grup meme kanserli hastada kötü prognozla birlikteliğinin gösterilmesi birçok metastatik kanserde ispatlanmayı bekleyen bir konudur(132).

Bu çalışmadaki amaç; değişik evredeki Kolon kanserli olgularda S100A4 ekspresyon durumlarının hastaların cinsiyetleri, tanı anındaki yaşları, tümör lokalizasyonları, ameliyat tipi, tümör çapı, histolojik diferansiyasyonları, metastatik lenf nodu yüzdesi, T evresi, N evresi M evresi, vasküler invazyon, perinöral invazyon, sağ kalım ve mortalite ile ilişkilerini değerlendirmektir.

Bu çalışmada; bağımsız bir prognostik faktör olup olmaması açısından S100A4 ekspresyonu, çeşitli parametreler ile tek tek karşılaştırılmıştır. İmmunohistokimya boyamayla değerlendirilen S100A4 aşırı ekspresyonu ile hasta cinsiyeti, hasta yaşı, tümör lokalizasyonu, ameliyat tipi ve

tümör çapı arasında yapılan karşılaştırmalarda anlamlı bir istatistiksel fark elde edilmedi. S100A4'ün bu parametrelerden bağımsız olduğu görüldü.

Bu çalışmada tümör grade'i ile İHKBS arasında (P=0,751) Pearson Chi-square testi ile yapılan karşılaştırmalarda anlamlı sonuç saptanmadı. Bunun, çalışmaya dâhil edilen grade 3 hastaların sayılarındaki yetersizlik ve boyama skorlarına göre grade dağılımlarının homojen olmamasına bağlı olduğu düşünüldü.

Metastatik lenf nodu yüzdesi ile İHKBS arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı. Metastatik lenf nodu sayısı ve metastatik lenf nodu yüzdesi yükseldikçe İHKBS'nun arttığı belirlendi. (P=0,001). Boyama skorlarındaki artış ile metastatik lenf nodu yüzdesinin yükselmesi diğer literatür bilgilerine paralel olarak S100A4'ün invazyon ve metastazda etkin olduğunu göstermiştir.

Perivasküler invazyon ile İHKBS arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı. Perivasküler invazyonu olan hastalarda İHKBS'nun daha yüksek olduğu (P=0,022) izlendi. Perinöral invazyon ile İHKBS arasındaki ve hastalık evresi arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı. Perinöral invazyonu olan hastalarda İHKBS'nun yüksek olduğu (P=0,023) izlendi. Perinöral ve perivasküler invazyonların kötü prognostik faktör oldukları düşünüldüğünde; bu vakalarda S100A4'ün aşırı ekspresyonu yine S100A4'nün invazyon ve metastaz açısından önemli bir faktör olduğunu ve prognostik değerinin olduğunu ortaya koymuştur.

T, N ve M evreleri ile İHKBS arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı Her üçü de istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sonuçta T evresi, N evresi ve M evresinin yüksek olduğu olgularda İHKBS'nunda yüksek olduğu gözlemlendi. Tümör başlatıcı etkisinden ziyade tümörün invazyon ve metastaz kabiliyetini gösteren S100A4 aşırı ekspresyonu T, N ve M evreleri ilerledikçe olması şaşırtıcı değildir. Evreyi belirleyen bu parametreler ile S100A4'ün yakın ilişkisi prognostik açıdan anlam taşımaktadır.

İHKBS ile patolojik evre arasındaki ilişki Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı (p<0,001). Anlamlı olarak tümörlerin evreleri ilerledikçe, İHKBS'ları yüksek olarak bulundu. Prognostik değer olarak en önemli faktör

olduğu bilinen tümör evresi ilerledikçe, S100A4 ekspresyonun kuvvetlenmesi en önemli bulgu olmuştur. Evreye göre tedavinin planlandığı düşünüldüğünde erken evrede aşırı ekspresyonunun belirlenmesi, beklide de ileride kişiye özel tedavi endikasyonlarının olabileceğini dşndrebilir.

Mortalite ile İHKBS arasındaki ilişi Pearson Chi-square testi ile karşılaştırıldı(P=0,025). İHKBS yükseldikçe mortalitenin arttığı görüldü. İHKBS ile 5 yıllık sağkalım arasındaki ilişi Logrank testi ile değerlendirildi. İHKBS arttıka sağkalım oranlarının dşdğ görüldü(P=0,002).

İleri evrelerde; lenf nodu tutulumu ve metastazların olduğu düşünüldüğünde kötü prognoz olmasını beklemek sürpriz değerildir. Bu hastalarda S100A4 aşırı ekspresyonu olması ise anlamlıdır. S100A4 aşırı ekspresyonu olan hastalarda invazyon ve metastaz yeteneği artmış bir tümör söz konusu ise bu hastalarda lenf nodu tutulumu, perivasküler invazyon, perinöral invazyon ve metastaz gibi kötü prognostik faktörlerin birlikte olabileceği düşünülür. Erken evrede yakalanmış hastalarda, S100A4 ekspresyonunun gösterilmesi (tümörün ileride agresivite kazanacağının göstergesi olarak düşünüldüğünde) oldukça önemlidir. İleride bu konuya yönelik yapılacak çalışmalarda, beklide tedavi stratejilerimizi değeriftirecek ve kişiye özel tedavi protokollarının uygulanmasını gerektirecek sonuçlar elde edilebilir.

Bizim yaptığımız çalışmada prognoza etki eden temel faktörlerle S100A4 aşırı ekspresyonu karşılaştırılmıştır. Tümör diferansiasyonu hariç diğer tüm parametreler ile arasında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Bu alışmada S100A4, tümör agresivitesini artıran bir faktör olarak bulunmuştur. Fakat S100A4 tek başına kötü prognostik faktör olarak karşımıza çıkmamıştır. Bunun nedenleri olarak; çalışılan hasta sayısındaki yetersizlik ve evrelere göre hasta dağılımının homojen olmaması gibi faktörler sayılabilir.

Hemandas ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da bizim yaptığımız çalışmayla paralellik göstermiştir. Yaptıkları alışmada S100A4 ekspresyonunu tek başına bağımsız bir prognostik faktör olarak ortaya koyamamışlar ve bunun nedeni olarak çalışmaya dâhil ettikleri hasta

sayılarının az olmasını göstermişlerdir. Ayrıca evre III olan hastalarda en az 12 lenf nodu eksize edilmesinin gerektiğini vurgulamışlar. 15'den fazla lenf nodu çıkarılmasının metastaz saptama insidansı %85, 15'den az çıkması halinde %22 olduğu düşünüldüğünde; her vakada standart olarak en az 12 lenf nodunun çıkmış olması evreyi etkileyeceği gibi tedaviyi de etkileyecek bir faktördür. Yaptıkları çalışmada 4 lenf nodu ve üstü tutulan S100A4 pozitif olan hastalarda 5 yıllık sağkalımı 57 ay olarak bulmuşlar. S100A4 negatif olan hastalarda ise bu 74 ay olarak bulunmuş ($P=0,0052$). S100A4'ün prognoz açısından yararlı bir parametre olduğunu gösterebilmek için, her vakada çıkarılan lenf nodu sayısının standardize edilmesinin gerekliliği vurgulanmıştır. Çünkü her vakada çıkan lenf nodu sayıları arasında farklılıkların olması, S100A4'ün prognoz üzerine etkisinde değişik ve yanlış sonuçlar ortaya çıkarabilir. Sağlıklı sonuçlar için daha fazla sayıda hasta ve zaman gerekmektedir. Biz de çalışmamızda, ideal olarak kaç lenf nodu çıkarılması gerektiğinden ziyade metastatik lenf nodu sayısı ve yüzdesinin S100A4 ile olan ilişkisini göstermeye çalıştık(133).

Yaptığımız çalışmada evre dâhil diğer tüm parametreler ile korele olan S100A4'ün ekspresyon derecesinin belirlenmesi kanımızca oldukça önemlidir. Özellikle lenf nodu tutulumu ile birlikte olması tümörün agresivitesini göstermesi açısından değerlidir. Prognostik faktör olarak düşünüldüğünde erken evrelerde S100A4 ekspresyonuna rastlanması belki de ileride tedavi yaklaşımını değiştirecektir. Bunun için daha fazla sayıda hastayla, daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

VI- SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada; GATA Genel Cerrahi Kliniği'nde, kolon kanserli hastalarda bloklanmış rezeksiyon materyallerinden alınan kesitlerde S100A4 ekspresyonunun klinik ve patolojik önemi ortaya konmaya çalışılmıştır.

Çeşitli kanserle aşırı ekspresyon gösterilen S100A4 proteini invazyon ve metastaz belirteci olarak da bilinmektedir. Değişik kanser tiplerindeki ekspresyonu kötü prognosisla karakterizedir.

Bizim çalışmamızda, Kolon kanserinde S100A4 ekspresyonu tümör evresi ve lenf nodu tutulumu gibi tümör progresyonu ve agresivitesini artıran bir parametre olarak değerlendirildi. İleri evrelerde ve metastaz gelişen hastalarda S100A4 ekspresyonunun arttığı istatistiksel olarak gösterildi.

Mekanizması tam olarak bilinmeyen, metastaz ve invazyonu artıran bu proteinin erken evrelerde ekspresyonunun gösterilmesi ileride oluşacak nüks ve metastazların önlenmesini sağlayabilir. Hatta bu hastalara özel tedavi protokolları geliştirilebilir. Bunun için daha geniş serilerde yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

VII- KAYNAKLAR

1. Jemal A, Murray T, Samuels A, et al: Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 53: 5-26,2003.
2. Neiberghs HL, Hein DW, Spratt JS: Genetic profiling of colon cancer. *J Surg Oncol* 80:204-213,2002.
3. Kinzler KW, Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87:159-170, 1996.
4. Calvert PM, Frucht H: The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* 137: 603-612, 2002.
5. MacLennan DH (2000) Ca²⁺ signalling muscle disease. *Eur J Biochem.* 267 (17), 5291–7.
6. Bastianelli E (2003) Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum.* 2 (4), 242–62.
7. Eckert RL, Broome AM, Ruse M, Robinson N, Ryan D, Lee K(2004) S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol.* 123 (1),23–33.
8. Emberley ED, Murphy LC, Watson PH (2004) S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer. *Biochem Cell Biol.* 82 (4), 508–15.
9. Donato R (2001) S100:a multigenic family calcium modulated proteins of the EF hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 33 (7), 637–68.
10. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. (2004) S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature) *Biochem Biophys Res Commun.* 322 (4), 1111–22.
11. Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M (2005) The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer.* 92 (11), 1955–8.
12. Hermani A, Hess J, De Servi B, Medunjanin S, Grobholz R, Trojan L, Angel P, Mayer D. (2005) Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 11 (14), 5146–52.
13. Harpio R, Einarsson R (2004) S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin Biochem.* 37 (7), 512–8.
14. Orwen R.W: Dietary and chemopreventive strategies. *Recent Results Cancer Res,* 1998, 146:195-213.
15. Mellemkjaer L: Cancer in patient with ulcerative colitis. *Int J Cancer,* 1995, 60:330-333.

16. 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.
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. Tsunoda A, Shibusawa M, Kawamura M, Marumari T, Kusano M, Ohta H: Colorectal cancer after pelvic irradiation: casereports. *Anticancer res* , 1997 17/1B: 729-732.
19. Thomas R.M., Sobin L.H: Gastrointestinal cancer. *Cancer*, 1995 75:154-170.
20. 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.
21. Tang W.Y., Elnatan J., Lee Y.S., Goh H.S, Smith D.R: c-Kiras mutations in colorectal adenocarcinomas from a country with a rapidly changing colorectal cancer incidence. *Br J Cancer*, 1999, 81:237-241.
22. Fearon ER, vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 2002.
23. 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
24. Smith JP, Wood JG, Solomon TE: Elevated gastrin levels in patient colon cancer or adenomatous polyps. *Dig Dis Sci*, 1989, 34:171-178
25. Pathologic Basis of Disease. Cotran Kumar Sixth Edition. Chapter 18:831-835
26. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al: Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532, 1998.
27. Compton CC, Carolyn C: Colorectal carcinomas: diagnostic, prognostic and molecular features. *Mod Pathol*, 2003, 16(4):376-388.
28. 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.
29. Cerottini JP, Caplin S, et al: Prognostic factor of colorectal cancer. *Oncol Rep*, 1999, 6: 409-414.
30. 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.
31. Rosai J: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. In Rosai J. Gastrointestinal Tract, Large Bowel. Vol 1.9 th ed: Mosby, 2004:76-885.
32. Compton CC, Greene FL. The staging kolorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin*. 2004; 54: 294-308
33. O' Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the New American Joint Committee on the cancer sixth edition staging. *J. Natl Cancer Inst*. 2004; 96: 1420-1425.

34. Burke HB. Outcome prediction and the future of the TNM staging system. *J. Natl Cancer Inst.* 2004; 96: 1408-1409.
35. Compton CC. Updated protocol for the examination of the specimens from patients with the cancer of the colon and rectum, excluding carcinoid tumors, lymphomas, sarcomas and the tumor of vermiform appendix: a basis for checklists. Cancer committee. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; 124: 1016-1025.
36. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in the colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; 124: 979-994
37. 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.
38. Cooper HS: Stenberg's Diagnostic Surgical Pathology. In Mills SE. *Intestinal Neoplasms.* Vol 2, 4th ed: Lippincott Williams&Wilkins, 2004: 1543-1601.
39. 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.
40. 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.
41. Fischbach W, Zidianakis Z, Luke G, et al: DNA mapping of colorectal neoplasms: A flow cytometric study of DNA abnormalities and proliferation. *Gastroenterology* 1993;105:1126.
42. Kumar V, Robbins S, Cotran R (Çeviri: U. Çevikbaş). *Temel Patoloji.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2000:505-514.
43. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 2003;16(4):376-88.
44. Güler N. *Tümör Belirleyicileri.* İskender Sayek (Editör). *Temel Cerrahi.* Ankara: Güneş Kitabevi; 2004.s.581-90.
45. Bouschet T, Henley JM (2005) Calcium as an extracellular signalling molecule: perspectives on the Calcium Sensing Receptor in the brain. *C R Biol.* 328 (8), 691–700.
46. Munaron L, Antoniotti S, Fiorio Pla A, Lovisolo D (2004) Blocking Ca²⁺ entry: a way to control cell proliferation. *Curr Med Chem.* 11 (12), 1533–1543.
47. *Endocrinology An Integrated Approach* Stephen Nussey Saffron Whitehead BIOS Scientific Publishers Ltd, 2001.
48. Haeseleer F, Palczewski K (2002) Calmodulin and Ca²⁺-binding proteins (CaBPs): variations on a theme. *Adv Exp Med Biol.* 514, 303–317.
49. Bastianelli E (2003) Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum.* 2 (4), 242–262.
50. Heizmann, CW. (1992) Calcium-binding proteins: basic concepts and clinical implications. *Gen. Physiol. Biophys.* 11, 411–425.
51. Nalefski EA Falke JJ. (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci.* 5 (12), 2375–2390.

52. Kahl CR, Means AR (2003) Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev.* 24 (6), 719–36.
53. Gelebart P, Opas M, Michalak M (2005) Calreticulin, a Ca²⁺ binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol* 37 (2), 260–6
54. Ferreira V, Molina MC, Valck C, Rojas A, Aguilar L, Ramirez G, Schwaeble W (2004) Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol Immunol.* 40 (17), 1279–91.
55. Beard NA, Laver DR, Dulhunty AF; (2004) Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol.* 85 (1), 33–69.
56. Hayes MJ, Moss SE (2004) Annexins and disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 322 (4), 1166–70.
57. Venyaminov SY, Klimtchuk ES, Bajzer Z, Craig TA (2004) Changes in structure and stability of calbindin-D (28K) upon calcium binding. *Anal Biochem.* 334 (1), 97–105.
58. del Arco A, Satrustegui J (2004) Identification of a novel human subfamily of mitochondrial carriers with calcium-binding domains. *J Biol Chem.* 279 (23), 24701–13.
59. Bergeron JJ, Brenner MB, Thomas DY, Williams DB (1994) Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.* 19 (3), 124–8
60. Hu H, Sheehan JH, Chazin WJ (2004) The mode of action of centrin. Binding of Ca²⁺ and a peptide fragment of Kar1p to the C-terminal domain. *J Biol Chem.* 279 (49), 50895–903.
61. Wu F, Zhang M, Gong W (2001) Crystallization preliminary crystallographic studies apoptosis-linked CaBP ALG-2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 57, 1162–3.
62. Krebs J, Saremaslani P, Caduff R (2002) ALG-2: a Ca²⁺ -binding modulator protein involved in cell proliferation and in cell death. *Biochim Biophys Acta.* 1600 (1–2), 68–73
63. Tanyel FC, Ulusu NN, Tezcan EF, Büyükpamukcu N. (2003) Total calcium content of sacs associated with inguinal hernia, hydrocele or undescended testis reflects differences dictated by programmed cell death. *Urol Int.* 70 (3), 211–5.
64. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiol Rev.* 83 (3), 731–801.
65. Donato, R. 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* 60: 540–551.
66. Donato, R. 1999. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim. Biophys. Acta*, 1450: 191–231.
67. Schafer, B.W., and Heizmann, C.W. 1996. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem. Sci.* 21: 134–140.
68. Heizmann, C.W., Fritz, G., and Schafer, B.W. 2002. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci.* 7: d1356–d1368.

69. Emberley, E.D., Gietz, R.D., Campbell, J.D., HayGlass, K.T., Murphy, L.C., and Watson, P.H. 2002. RanBPM interacts with psoriasin *in vitro* and their expression correlates with specific clinical features *in vivo* in breast cancer. *BMC Cancer*, 2: 28.
70. Yui S, Nakatani Y, Mikami M (2003) Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biol Pharm Bull.* 26 (6), 753–60
71. Ethan D. Emberley, Leigh C. Murphy, and Peter H. Watson. S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer . *Biochem. Cell. Biol.* 2004;82:508-515
72. Grigorian MS, Tulchinsky EM, Zain S, Ebralidze AK, Kramerov DA, Kriajevska MV, Georgiev GP, Lukanidin EM. The mts1 gene and control of tumor metastasis. *Gene* 1993;135:229–238.
73. Barraclough R. Calcium-binding protein S100A4 in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1998;1448:190–199.
74. Davies, B.R., Davies, M.P., Gibbs, F.E., Barraclough, R., and Rudland, P.S. 1993. Induction of the metastatic phenotype by transfection of a benign rat mammary epithelial cell line with the gene for p9Ka, a rat calcium-binding protein, but not with the oncogene EJ-ras-1. *Oncogene*, 8: 999–1008.
75. Grigorian, M., Ambartsumian, N., Lykkesfeldt, A.E., Bastholm, L., Elling, F., Georgiev, G., and Lukanidin, E. 1996. Effect of mts1 (S100A4) expression on the progression of human breast cancer cells. *Int. J. Cancer*, 67: 831–841.
76. Nikitenko, L.L., Lloyd, B.H., Rudland, P.S., Fear, S., and Barraclough, R. 2000. Localisation by *in situ* hybridisation of S100A4 (p9Ka) mRNA in primary human breast tumour specimens. *Int. J. Cancer*, 86: 219–228.
77. Takenaga, K., Nakamura, Y., and Sakiyama, S. 1997a. Expression of antisense RNA to S100A4 gene encoding an S100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of highmetastatic Lewis lung carcinoma cells. *Oncogene*, 14: 331–337.
78. Yonemura, Y., Endou, Y., Kimura, K., Fushida, S., Bandou, E., Taniguchi, K., et al. 2000. Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* 6: 4234–4242.
79. Hernan, R., Fasheh, R., Calabrese, C., Frank, A.J., Maclean, K.H., Allard, D., et al. 2003. ERBB2 up-regulates S100A4 and several other prometastatic genes in medulloblastoma. *Cancer Res.* 63: 140–148.
80. Gupta, S., Hussain, T., MacLennan, G.T., Fu, P., Patel, J., and Mukhtar, H. 2003. Differential expression of S100A2 and S100A4 during progression of human prostate adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* 21: 106–112.
81. Davies, B.R., O'Donnell, M., Durkan, G.C., Rudland, P.S., Barraclough, R., Neal, D.E., and Mellon, J.K. 2002. Expression of S100A4 protein is associated with metastasis and reduced survival in human bladder cancer. *J. Pathol.* 196: 292–299.

82. Davies, M.P., Rudland, P.S., Robertson, L., Parry, E.W., Jolicoeur, P., and Barraclough, R. 1996. Expression of the calcium-binding protein S100A4 (p9Ka) in MMTV-neu transgenic mice induces metastasis of mammary tumours. *Oncogene*, 13: 1631–1637.
83. Takenaga, K., Nakanishi, H., Wada, K., Suzuki, M., Matsuzaki, O., Matsuura, A., and Endo, H. 1997b. Increased expression of S100A4, a metastasis-associated gene, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* 3: 2309–2316.
84. Mandinova, A., Atar, D., Schafer, B.W., Spiess, M., Aebi, U., and Heizmann, C.W. 1998. Distinct subcellular localization of calcium binding S100 proteins in human smooth muscle cells and their relocation in response to rises in intracellular calcium. *J. Cell Sci.* 111(14): 2043–2054.
85. Kriajevska, M., Tarabykina, S., Bronstein, I., Maitland, N., Lomonosov, M., Hansen, K., Georgiev, G., and Lukanidin, E. 1998. Metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein modulates protein kinase C phosphorylation of the heavy chain of nonmuscle myosin. *J. Biol. Chem.* 273: 9852–9856.
86. Takenaga, K., Nakamura, Y., Sakiyama, S., Hasegawa, Y., Sato, K., and Endo, H. 1994. Binding of pEL98 protein, an S100-related calcium-binding protein, to nonmuscle tropomyosin. *J. Cell. Biol.* 124: 757–768.
87. Lakshmi, M.S., Parker, C., and Sherbet, G.V. 1993. Metastasis associated MTS1 and NM23 genes affect tubulin polymerisation in B16 melanomas: a possible mechanism of their regulation of metastatic behaviour of tumours. *Anticancer Res.* 13: 299–303.
88. Grigorian, M., Andresen, S., Tulchinsky, E., Kriajevska, M., Carlberg, C., Kruse, C., et al. 2001. Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J. Biol. Chem.* 276: 22 699 – 22 708.
89. Chen, H., Fernig, D.G., Rudland, P.S., Sparks, A., Wilkinson, M.C., and Barraclough, R. 2001. Binding to intracellular targets of the metastasis-inducing protein, S100A4 (p9Ka). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286: 1212–1217.
90. Hsieh, H.L., Schafer, B.W., Sasaki, N., and Heizmann, C.W. 2003. Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307: 375–381.
91. Ulrike, Stein, Franziska Arlt, Wolfgang Walther, Janice Smith, Todd Waldman, Erik D. Harris et al . The Metastasis-Associated Gene *S100A4* Is a Novel Target of β -catenin/T-cell Factor Signaling in Colon Cancer. *Gastroenterology* 2006;131:1486–1500
92. 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
93. Matthew S. Lyall: Profiling Markers of Prognosis in Colorectal Cancer, *Clin Cancer Res* 2006; 12(4) February 15.

94. Pathologic Basis of Disease. Cotran Kumar Sixth Edition. Chapter 18: 831-835
95. Mueller A, Bachi T, Hochli M, Schafer BW, and Heizmann CW (1999). Subcellular distribution of S100 proteins in tumor cells and their relocation in response to calcium activation. *Histochem Cell Biol* 111, 453 – 459.
96. Heighway J, Knapp T, Boyce L, Brennand S, Field JK, Betticher DC, Ratschiller D, Gugger M, Donovan M, Lasek A, et al. (2002). Expression profiling of primary non – small cell lung cancer for target identification. *Oncogene* 21, 7749 – 7763.
97. Imazawa M, Hibi K, Fujitake S, Kodera Y, Ito K, Akiyama S, and Nakao A (2005). S100A2 overexpression is frequently observed in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 25, 1247 – 1250.
98. Kao JP, Alderton JM, Tsien RY, and Steinhardt RA (1990). Active involvement of Ca²⁺ in mitotic progression of Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 111, 183 – 196.
99. Kriajevska, M., Bronstein, I. B., Scott, D. J., Tarabykina, S. Et al., *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1498, 252–263.
100. Tarabykina, S., Scott, D. J., Herzyk, P., Hill, T. J. et al., *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 24212–24222.
101. Kriajevska, M., Fischer-Larsen, M., Moertz, E., Vorm, O. et al., *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 5229–5235.
102. Wang, G. Z., Rudland, P. S., White, M. R., Barraclough, R., *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 11141–11146.
103. Mazzucchelli, L., *Am. J. Pathol.* 2002, 160, 7–13.
104. Taylor S, Herrington S, Prime W, Rudland PS, Barraclough R. S100A4 (p9Ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes. *Br J Cancer* 2002;86:409–416.
105. Gongoll S, Peters G, Mengel M, Piso P, Klempnauer J, Kreipe H, von Wasielewski R. Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2002; 123:1478–1484.
106. Flatmark K, Pedersen KB, Nesland JM, Rasmussen H, Aamodt G, Mikalsen SO, Bjornland K, Fodstad O, Maelandsmo GM. Nuclear localization of the metastasis-related protein S100A4 correlates with tumour stage in colorectal cancer. *J Pathol* 2003;200:589–595.
107. Grigorian MS, Tulchinsky EM, Zain S, Ebralidze AK, Kramerov DA, Kriajevska MV, Georgiev GP, Lukanidin EM. The mts1 gene and control of tumor metastasis. *Gene* 1993;135:229–238.
108. Barraclough R. Calcium-binding protein S100A4 in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1998;1448:190–199.
109. Mazzucchelli L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *Am J Pathol* 2002;160:7–13.
110. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:1111–1122.

111. Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M. The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* 2005;92:1955–1958.
112. Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* 2006;281:677–680.
113. Gunal, Armagan; Onguru, Onder; Safali, Mukerrem; Beyzadeoglu, Murat. Fascin expression in glial tumors and its prognostic significance in glioblastomas. *Neuropathology* 2008; 28, 382–386
114. Cho YG, Kim CJ, Nam SW, Yoon SH, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Overexpression of S100A4 is closely associated with progression of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11(31):4852-4856
115. Ok-Jae Lee, Seung-Mo Hongz, Mohammad H. Razvi, Dunfa Peng, Steven M. Powell, Mark Smoklin , Christopher A. Moskalukz and Wael El-Rifai. Expression of Calcium-Binding Proteins S100A2 and S100A4 in Barrett's Adenocarcinomas. *Neoplasia* 2006;8;843-850
116. *Journal of Surgical Oncology* 2006;93:498–503
117. Ambartsumian NS, Grigorian MS, Larsen IF, Karlstrom O, Sidenius N, Rygaard J, Georgiev G, Lukanidin E. Metastasis of mammary carcinomas in GRS/A hybrid mice transgenic for the mts1 gene. *Oncogene* 1996;13:1621–1630.
118. Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M. The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* 2005;92:1955–1958.
119. Taylor S, Herrington S, Prime W, Rudland PS, Barraclough R. S100A4 (p9Ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes. *Br J Cancer* 2002;86:409–416.
120. Flatmark K, Pedersen KB, Nesland JM, Rasmussen H, Aamodt G, Mikalsen SO, Bjornland K, Fodstad O, Maelandsmo GM. Nuclear localization of the metastasis-related protein S100A4 correlates with tumour stage in colorectal cancer. *J Pathol* 2003;200:589–595.
121. Gongoll S, Peters G, Mengel M, Piso P, Klempnauer J, Kreipe H, von Wasielewski R. Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2002; 123:1478–1484.
122. Ok-Jae Lee, Seung-Mo Hongz, Mohammad H. Razvi, Dunfa Peng, Steven M. Powell, Mark Smoklin , Christopher A. Moskalukz and Wael El-Rifai. Expression of Calcium-Binding Proteins S100A2 and S100A4 in Barrett's Adenocarcinomas. *Neoplasia* 2006;8;843-850
123. Mazzucchelli L (2002). Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *Am J Pathol* 160, 7–13.
124. Rudland PS, Platt-Higgins A, Renshaw C, West CR, Winstanley JH, S100A Proteins in Barrett's Tumorigenesis Lee et al. 849 Robertson L, and Barraclough R (2000). Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res* 60, 1595 – 1603.,

125. Cho YG, Nam SW, Kim TY, Kim YS, Kim CJ, Park JY, Lee JH, Kim HS, Lee JW, et al. (2003). Overexpression of S100A4 is closely related to the aggressiveness of gastric cancer. *APMIS* 111, 539 – 545.
126. Lee WY, Su WC, Lin PW, Guo HR, Chang TW, and Chen HH (2004). Expression of S100A4 and Met: potential predictors for metastasis and survival in early-stage breast cancer. *Oncology* 66, 429 – 438.
127. Gongoll S, Peters G, Mengel M, Piso P, Klempnauer J, Kreipe H, and von Wasielewski R (2002). Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer. *Gastroenterology* 123, 1478 – 1484.
128. Kimura K, Endo Y, Yonemura Y, Heizmann CW, Schafer BW, Watanabe Y, and Sasaki T (2000). Clinical significance of S100A4 and E-cadherin – related adhesion molecules in non – small cell lung cancer. *Int J Oncol* 16, 1125 – 1131.
129. Nakamura T, Ajiki T, Murao S, Kamigaki T, Maeda S, Ku Y, and Kuroda Y (2002). Prognostic significance of S100A4 expression in gallbladder cancer. *Int J Oncol* 20, 937 – 941.
130. Mueller A, Schafer BW, Ferrari S, Weibel M, Makek M, Hochli M, and Heizmann CW (2005). The calcium-binding protein S100A2 interacts with p53 and modulates its transcriptional activity. *J Biol Chem* 280, 29186 – 29193.
131. Matsubara D, Niki T, Ishikawa S, Goto A, Ohara E, Yokomizo T, Heizmann CW, Aburatani H, Moriyama S, et al. (2005). Differential expression of S100A2 and S100A4 in lung adenocarcinomas: clinicopathological significance, relationship to p53 and identification of their target genes. *Cancer Sci* 96, 844 – 857.
132. Philip S. Rudland, Angela Platt-Higgins, Christine Renshaw, Christopher R. West, John H. R. Winstanley, Lynne Robertson and Roger Barraclough. Prognostic Significance of the Metastasis-inducing Protein S100A4 (p9Ka) in Human Breast Cancer. *Cancer research* 60, 1595–1603, March 15, 2000
133. A.K. Hemandas, FRCS, MSc, M. Salto-Tellez, LMS, MRCPATH, S.H. Maricar, BSc, A.F.P.K. Leong, MMed, FRCS, C.K. Leow, FRCS, MD. Metastasis-associated protein S100A4 - a potential prognostic marker for colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2006;93:498–503