



13

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

KOLOREKTAL TÜMÖRLERİN GENETİK ANALİZİ VE PATOLOJİK PARAMETRELER ARASINDA Kİ İLİŞKİ.

**Dr. HÜSEYİN KEREM TOLAN
UZMANLIK TEZİ**

İSTANBUL 2009



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

KOLOREKTAL TÜMÖRLERİN GENETİK ANALİZİ VE PATOLOJİK PARAMETRELER ARASINDA Kİ İLİŞKİ.

**Dr. HÜSEYİN KEREM TOLAN
UZMANLIK TEZİ**

Danışman: Doç. Dr. RASİM GENÇOSMANOĞLU

İSTANBUL 2009

ÖZET

Kolorektal kanserlerin tedavi modaliteleri için birçok prediktif tetkik literatürde bulunmaktadır. CEA, patolojik ve klinikopatolojik değişkenler, tümörün proliferasyon indeksi hastalığın tedavisinin yönlendirilmesinde kullanılan önemli prediktif değerlerdir. Literatürde bu testleri karşılaştıran ve birbirinden farklı sonuçları olan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada biz bu prediktif değerlerin hastanemizde ki sonuçlarını ve hastaların DNA onarım kapasitelerinin bu parametreler ile ilişkisini araştırdık.

Kolorektal kanserlerde evre hastalığın tedavi seçenekleri açısından önem arz etmektedir. Hastalığın ameliyat öncesinde bakılan CEA değerleri hastalığın yaygınlığı hakkında ön bilgi verebilmektedir. Ancak rezeksiyon sonrasında ki nihayi patoloji raporu hastanın tedavisinin esas yönlendiricisi olmaktadır. TNM Evreleme sistemine göre hastalık evrelenmektedir. Histopatolojik lenfovasküler ve perinöral invazyon da bu evreleme içine eklenmiş faktörlerdir. Tümörün hesaplanan proliferasyon indeks değerlerinin de hastalık açısından önemli olduğu çeşitli yayınlarda gösterilmiştir. Literatürde comet assay ile bakılmış DNA hasarları ve DNA onarım kapasiteleri arasında, kolorektal kanserli olguların ve sağlam kontrol gruplarının arasında anlamlı bir farklılık olduğu saptanmıştır. Ancak kolorektal kanser genetiği ile patolojik parametreler arasında ilişki literatürde yaygın olarak çalışılmamıştır.

Bu çalışmada prospektif ve randomize olarak çalışmaya alınan kolorektal kanserli hastaların DNA onarım kapasiteleri comet assay yöntemi ile çalışıldı. Olguların CEA değerlerine ameliyat öncesi bakıldı. Hastaların ameliyat sonrasında nihayi patoloji raporları gerekli parametreler açısından kontrol edilerek dosyalanarak saklandı. Hastaların hazırlanmış olan preperatları proliferasyon indeksi (PI); Ki-67 boyası ile çalışılmak üzere patoloji'de saklandı. Bu preperatlardan tümörlerin PI değerleri hesaplandı.

Sonuç olarak tüm bu veriler birbirleri ile karşılaştırıldı. Araştırmanın sonuçlarına bakıldığında PI değerleri ile hastalığın evresi arasında ve lenfatik invazyon arasında anlamlı ilişki saptandı. Histopatolojik değerlere bakıldığında tümörün Grade'i ile tümörün penetrasyonunun anlamlı olarak ilişkili görüldü. Ayrıca grade ile perinöral invazyon da ilişkili saptandı. DNA onarım kapasitesi ile ilgili tümörün lenfatik invazyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu da bulunan bir diğer önemli sonuçtu. Çalışmamız da daha fazla hasta sayısına ulaşamamasından dolayı beklediğimiz sonuçların hepsi istatistiksel olarak anlamlı

bulunamadı ancak çalışmaya halen hasta sayısı arttırılarak devam edilmektedir. Çalışmada ortaya çıkan verilere bakıldığında genetik olarak önemli ve faydalı sonuçlar vereceğini dşündüğümüz bu konuda yapılacak başka alışmalarla bu parametrelerin araştırılmasına ihtiya olduğunu dşünmekteyiz .

ABSTRACT

There are a lot of predictive tests in the literature about the treatment modalities for colorectal cancer. CEA, pathological and clinicopathological values, proliferation index are some of the predictive values that will be guiding the treatment of the colorectal cancer. There are a lot of studies that compared all these and got different results. In our research we looked for the predictive values interaction and compared these results with the DNA repair capacity of the patients.

Staging is important in the treatment of the colorectal cancer patients. The CEA level that is measured preoperatively can help us in predicting the dissemination of the cancer. But the main important thing is the last pathological report of the resected specimen for the decision of the treatment. TNM staging is used for this step. The histopathological parameters as lenfovacular and perineural invasion were added to this staging. Also it is known that the PI is also important in the tumor invasion. In the literature it was shown that there is a difference in the DNA damage & the DNA repair capacity between the colorectal cancer & the control group. But the association between colorectal cancer genetics, the pathological and histopathological values; there is just a number of studies in the literature.

In our research CEA levels were recorded & the DNA repair capacities of the prospective and randomized selected patients were measured by comet assay. The pathology reports including the research parameters were filed. The specimens that will be used for the PI by the Ki-67 stain were kept in the pathology department. Later on PI were calculated.

As a result the parameters were statistically compared. There was a statistically significant relation between PI; TNM & the lenfatic invasion of the tumor. Among the histopathological measures there was a statistically significant correlation between the grade and the tumor status. Looking at the genetic relation there was a correlation with the DNA repair capacity of the patient & the lenfatic invasion of the tumor too. Because of the number of the patients in the research we could not get the results that we expect but the research is still going on to get the sufficient number of cases. As we look at our results we can assume that there should be more studies with the genetics & these parameters.

İÇİNDEKİLER:

ÖZET **Hata!**

Yer işareti tanımlanmamış.ii

ABSTRACT **Hata!**

Yer işareti tanımlanmamış.iv

İÇİNDEKİLER **V**

ANAHTAR SÖZCÜKLER (KeyWORDS) **VII**

SİMGELER VE KISALTMALAR **VIII**

1. GİRİŞ VE AMAC: **1**

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1 KOLOREKTAL KANSER: **4**

2.1.1. GENETİK: **4**

2.1.2. RİSK FAKTÖRLERİ: **5**

2.1.3. KİLİNİK DEĞERLENDİRME: **6**

2.1.4 EVRELEME VE PROGNOZ: **6**

2.1.4.1 KLİNİK EVRELEME: **6**

2.1.4.2 PATOLOJİK EVRELEME **6**

2.1.4.2.1PATOLOJİK GRADE **10**

2.1.4.2.2 TÜMÖRAL İNVAZYON **12**

2.1.4.2.2.1 VENÖZ İNVAZYON	13
2.1.4.2.2.2 LENFATİK İNVAZYON	14
2.1.4.2.2.3 PERİNÖRAL İNVAZYON	15
2.1.4.2.3.PROLİFERASYON İNDEKSİ	16
<u>2.2.DNA HASARI VE ONARIM KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ</u>	17
2.2.1.DNA Hasarının Belirlenmesi (Comet yöntemi)	17
2.2.2.DNA Onarım Kapasitesinin Belirlenmesi(Challenge)	18
<u>3. GEREÇ VE YÖNTEM:</u>	18
3.1. HASTA SEÇİLME KRİTERLERİ	19
3.2. ALKALİ COMET HAZIRLIĞI:	20
3.2.1 ALKALİ COMET TEKNİĞİ:	22
3.2.1.1 LENFOSİT İZOLASYONU:	22
3.2.1.2 ELEKTROFOREZ AŞAMASI:	23
3.2.1.3 BOYAMA AŞAMASI:	24
3.3 PATOLOJİK DEĞERLENDİRİLME:	28

3.3.1 Kİ-67 İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME 29

4. İSTATİSTİK: 33

5. BULGULAR : 34

6. TARTIŞMA : 36

7. KAYNAKLAR : 39

ANAHTAR SÖZCÜKLER (KEYWORDS)

Colorectal cancer
Colon cancer
Colorectal Cancer Stage
Carsinoembryonic Antigen
Comet Assay
Challenge Technique
Deoxyribonucleic Acid / DNA
DNA Damage
DNA Repair
Electrophoresis
Genetics
Histopathologic variables
Immunohistochemistry
Immune floresans
Lenfovaskuler İnvazyon
Lymphocyte Extraction
Nucleus
Perineural invasion
Proliferation index
Single Cell Electrophoresis
Ki-67

SİMGELER VE KISALTMALAR

KRK Kolorektal kanser

SCE	Single Cell Electrophoresis
AJCC	American Joint Committee on Cancer
CEA	Karsinoembriyonik antijen
UICC	International Union against Cancer
PI	Proliferation Index
CA	Comet Assay
CRF	Kortikotropin salgılatan faktör
APC	Adenomatous Polyposis Coli
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
LMA	Low Melting degree Agar
DCC	Deleted in Colon Cancer
MSI	Mikrosatellit İstabilitesi
PBS	Phosphate Buffer Saline
DNA	Deoksiribonükleik asit

1. GİRİŞ VE AMAC:

Kolorektal kanserler dünyada en sık görülen malign tümörler arasında 4. sırayı almaktadır.¹ Ülkemizde elimizdeki verilere bakıldığında kolorektal kanserler en sık 10 kanser için de 7. sırada bulunmaktadır ve bu hastalık nedeniyle de yaklaşık yılda 3200 ölüm gerçekleşmektedir.² Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de mortalite ve morbidite açısından önemli bir sağlık problemidir.

Kolorektal kanserin moleküler ve biyolojik özellikleri hakkındaki bilgilerin hızla artması patogeneze ışık tutmaktadır. Bu kanserlerin genetik yatkınlık ve çevresel etkiler arasındaki etkileşim sonucu uzun sürede ortaya çıktığı bildirilmiştir.^{3 4} Hastalığın başlangıcında normal olarak bulunan mukoza çeşitli faktörlerin etkisiyle adenoma dönüşmekte; sonrasında oluşan bu adenom da bazı mutasyonlar sonucunda zaman içerisinde kansere dönüşmektedir.⁵ Günümüzde yapılan bir epidemiyolojik araştırmada cinsiyetler arasında görülme sıklığının eşit olduğu, kolorektal kanser riskinin 40 yaşından sonra arttığı ve riskinin en yüksek düzeye 50-55 yaşlarında ulaştığı bildirilmiştir.⁶ Dünyanın pek çok ülkesinde yapılan araştırmalar kalıtsal duyarlılık ve çevresel faktörlerin etkileri sonucu kolorektal kanserlerin oluştuğuna işaret etmektedir. Kolorektal kanserogenez de yapılan genetik bir modelde bazı anahtar mutasyonların kolorektal kanser oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir.⁷ Son yıllarda bu kansere neden olan genetik faktörler hakkında bir çok çalışma yapılmış ve kolorektal kanserlere %25 oranında kalıtsal faktörlerin neden olduğu bildirilmiştir.^{6 8} Kalıtsal faktörlerin kolorektal kanserde önemli olduğunun bir başka kanıtı da hastalarının birinci derece yakın akrabalarında kansere yakalanma riskinin daha yüksek olduğunu göstermiş olan Foulkes ve ark.'nın⁹ yaptığı çalışmadır. Kolorektal adenom-karsinom zincirinde genetik değişikliklerin moleküler modeli ilk olarak Vogelstein ve ark.¹⁰ tarafından tanımlanmıştır.

Kolorektal kanserli olgularda evreleme (Staging) hastanın prognozunu belirlemede ve adjuvan tedavisi gereksiniminin araştırılmasında son derece önem arz etmektedir. Geleneksel olarak kolorektal kanser evrelemesi ilk olarak 1930 yılında rektum kanseri için prognostik araç olarak geliştirilmiş olan, Dukes sınıflandırmasına göre yapılmaktadır.¹¹ Şu anda

American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve International Union against Cancer (UICC) tarafından geliştirilmiş olunan TNM klassifikasyonu tercih edilen evreleme sistemidir. Bu sistemde tümörün penetrasyon derinliği (T), mesenterik nodların bulunup bulunmaması ve sayısı (N), ve uzak metastaz varlığı (M) hesaplamaya katılmaktadır.¹²

Patolojik evreleme; cerrahi eksplorasyondan ve spesimenin değerlendirilmesi ile yapılır. Kanserin final evrelemesi TNM sistemine göre yapılmaktadır. AJCC evreleme (6th edition) sisteminde kanserin duvara penetrasyonu, lenf-nodu tutulumu göz önüne alınarak evreler altgruplara ayrılmıştır. Bu altgruplarda da surveyde ve hastalığın prognozunda farklılıklar olduğu gösterilmiştir.¹³

Patolojik olarak tümör hücresinin proliferasyon indeks miktarının (PI) değerlendirilmesi de tümörün davranış paternini dolayısıyla hastalığın evresini bize gösterebilen değerlerdendir.^{14 15} Çoğu retrospektif olarak yapılmış olunan çalışmalarda meme kanseri, mide kanseri ve lenfoma için proliferasyon miktarının tümörün davranışı açısından bilgi verdiği ortaya konulmuştur.^{16 17} Proliferasyon indeksi (PI) ölçümü için kullanılan Ki-67' de literatürde bu amaçla kullanılan ve ileri derece de kontrolsüz çoğalan hücrelerde saptanılan ancak normal dinlenme durumunda bulunan hücrelerde bulunmayan bir monoklonal antikordur.¹⁸ Kolorektal kanserde yüksek PI değerleri ile kötü prognostik değişkenler arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir.^{19 20 21 22}

Proliferasyon belirteçleri ile kolorektal kanserlerin prognozu arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalarda literatürde bulunmaktadır.^{23 24 25} Literatürde yapılmış olunan çalışmalarda gösterilmiştir ki kolorektal kanserler ile proliferasyon indeks değerleri arasında; PI değerinin artmasıyla, tümörün penetrasyonunun derinliği, lenf nodu metastazı yapma sıklığı ve uzak metastaz yapma sıklığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır. Tümörün lokal invazif olması, metastatik olması ve diferansiyasyonu ile PI değerleri arasında anlamlı bir korelasyon olduğu gösterilmiştir.^{19 20 21 22 26}

Ameliyat öncesin de bakılan Karsinoembriyonik antijenin (CEA) hastalığın resektabilitesi ve evresi ile ilgili ön bilgi verdiği de bilinmektedir.²⁷

Yapılan çalışmalarda, SCE ve CA gibi tekniklerin kanserde biyogösterge olarak kullanılabileceğini göstermektedir.^{28 29 30 31} Ayrıca kolorektal kanserde sitogenetik sayısal ve yapısal anormallikler olduğu gösterilmiş ve duyarlılığın biyogöstergesi olarak kabul edilen

sitogenetik bir ölçüm olan Challenge tekniği ile hücrelerin onarımı ölçülebilmektedir. Challenge tekniği, DNA onarım yetersizliğinde genetik predispozisyonu belirleyebilmektedir.^{32 33 34 35 36 37 38}

Bu çalışmada amaç ameliyat öncesi değerlendirmede kullanımı literatürce desteklenmiş olunan kolorektal kanserde PI ve CEA gibi hastalığın evresini öngörebilen tetkiklerin , patoloji raporlarının; literatürde kullanılmakta olan biyogöstergelerden SCE ve CA ile karşılaştırılarak ; biyogöstergelerin kolorektal kanser evrelemesinde yerinin olup olmayacağının araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

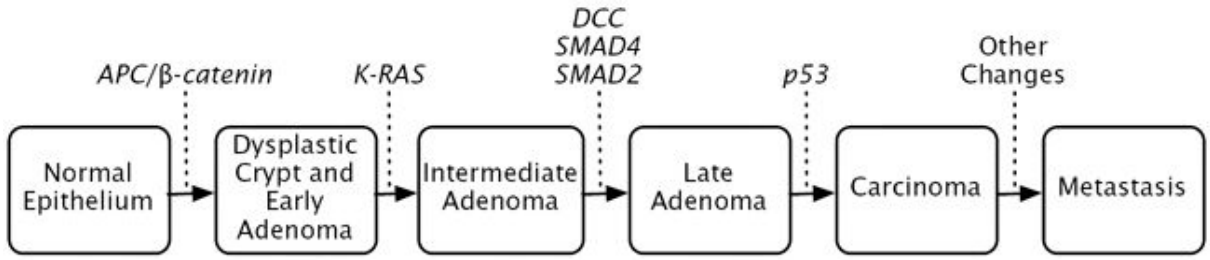
2.1 KOLOREKTAL KANSER:

Kolorektal kanserler tüm dünyada mortalite ve morbidite açısından temel bir halk sağlığı problemidir. 2004 yılında A.B.D de 106.000 kolon kanseri ve 41.000 rektum kanseri olgusu saptanılmış olup, bu olgulardan da 57.000 tanesi ölümle sonlanmıştır.³⁹ Amerika Birleşik devletlerinde kolorektal kanser tedavisi için harcanan paranın yıllık 5.5 ila 6.5 milyar dolar arasında olduğu düşünülmektedir.⁴⁰ Ülkemizde ise aynı yıllar için elimizdeki verilere bakıldığında; kolorektal kanserler en sık görülen 10 kanser sıralamasında 7,24 / 100.000 insidans ile 7. sırada bulunmakta ve yılda yaklaşık 5000 yeni vaka görülmektedir. Kolorektal kanser nedeniyle ülkemizde yaklaşık yılda 3200 ölüm gerçekleşmektedir.² Ülkemizde de kolorektal kanserler bu veriler ışığında mortalite ve morbiditenin önemli nedenleri arasında bulunmaktadır.

2.1.1. GENETİK:

Kolorektal kanser gelişiminin normal mukozanın adenoma progrese olması; sonrasında da adenomun kansere dönüşmesi sekansı; gerçekleşmiş olan mutasyonlar sonucunda olduğu bilinmektedir.⁵ Bu mekanizmanın genetik modeli bazı anahtar mutasyonlar sonucunda normal mukozanın kansere dönüştüğünü göstermektedir. Sekansın içinde tümör supresör genlerde ve proto-onkogenlerde mutasyonların birikmesinin etkili olduğu düşünülmektedir.⁷ (Resim1) Oluşan genetik instabilite mutasyon oranını arttırmakta ve bu progresyonu ilerletmektedir. Son 20 yıldır kolorektal kanserlerde kromozomal anomaliler saptanmakta ve özellikle de 5q, 17p ve 18q kromozom lokalizasyonlarındaki allelik kayıpların patogeneze major rolü olduğu gösterilmektedir. Örnek olarak FAP'lı hastalarda 5. kromozomdaki bir delesyon bu kromozomun uzun kolundaki (5q21) APC geninin inaktivasyonuna neden olmaktadır. APC genindeki somatik mutasyonlar sporadik kolorektal kanserlerin ve adenomların %60-80'inde saptanılmaktadır. Bu mutasyonun kolonda başlayan kesintisiz hücresel proliferasyondan ve kolonda neoplazinin oluşumundan sorumlu

olduğu gösterilmiştir. 18. kromozomun uzun kolu üzerindeki heterozigosite kaybı adenomdan kanser gelişmesinde geç ortaya çıkan ancak oluştuğunda kötü prognozu gösteren bir bulgudur. 18q bölgesinin kaybının DCC tümör supresör geninin inaktivasyonuna katkıda bulunduğu ve kolorektal kanserlerde uzak metastazların 17p ve 18q'nun yüksek fraksiyonel allelik kayıp ve delesyonları ile beraber görüldüğü kanıtlanmıştır. Kromozom 17p üzerindeki tümör supressör geni p53'ün mutasyonu ve inaktivasyonu ise kolorektal karsinogeneze geç bir fenomen olarak görülür ve hastaların %75'inde saptanılabilir.^{10 41 42 43 44 45 46} Mikrosatellit İnstabilitesi (MSI) kolorektal karsinogeneze alternatif bir yoldan genomik instabiliteye ve müteakiben de kolorektal kansere yol açmaktadır. Bu fenomen mismatch repair genlerinin çalışmasını bozarak yüksek mutasyon oranlarına neden olmaktadır. Sporadik kolorektal kanserlerde MSI ; hMLH1 geninin promotör alanının hipermetilasyonu ile bu proteinin ekspresyonunu bozarak etki etmektedir.⁴⁷



Resim 1: Mukoza-adenom-kanser sekansı genetik modeli.

2.1.2. RİSK FAKTÖRLERİ:

Çok sayıda risk faktörü kolorektal kanser hastalığı için tanımlanmıştır. Ailede kolorektal kanser (KRK) ve/veya adenomatöz polip hikayesi, ailesel KRK sendromları, sigara tüketimi, enflamatuvar barsak hastalıkları, diet ve yaşam tarzı farklılıkları gibi çok sayıda tanımlanmış risk faktörleri literatürde bulunmaktadır.⁴⁸ Ancak tüm dünyada kolorektal kanserlerin büyük bir çoğunluğu sporadik olarak görülmektedir.

Kolorektal kanser riski ve aile hikayesini araştıran meta-analiz çalışmalarında birinci derece akrabasında KRK saptanan kişilerin rölatif riskinin 2.25 olduğu; eğer birden fazla birinci dereceden akrabasında KRK bulunmaktaysa bu oranın 4.25'e kadar çıktığı gösterilmiştir.⁴⁹

2.1.3. KLİNİK DEĞERLENDİRME:

Tarama yapılan ülkelerde KKK hastalarının çoğu artık semptomatik olmadan tanı alabilmektedir. Bazı hastalar anemi ve gastrointestinal kanama ile başvuruyorsa da çoğu hasta hastalığın ileri safhalarına kadar asemptomatik olarak kalmaktadır. Semptomların süresinin hastalığın evresiyle ilişkili olmadığı gösterilmiştir.⁵⁰

2.1.4 EVRELEME VE PROGNOZ:

Kolorektal kanserli olgularda evreleme (Staging) hastanın prognozunu belirlemede ve adjuvan tedavi gereksinimine karar vermek için gerekli, objektif uygulamadır. Geleneksel olarak kolorektal kanser evrelemesi Dukes sınıflandırmasına göre yapılmaktadır.¹¹ Şu anda American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve International Union against Cancer (UICC) tarafından geliştirilmiş olunan TNM klassifikasyonu tercih edilen evreleme sistemidir. Bu sistemde tümörün penetrasyon derinliği (T), mesenterik nodların bulunup bulunmaması ve sayısı (N), ve uzak metastaz varlığı (M) hesaplamaya katılmaktadır.⁵¹

2.1.4.1 KLİNİK EVRELEME:

Temel olarak hikaye ve fizik muayene, endoskopik bulgular ve biopsi sonucunun incelenmesinden oluşan preoperatif evrelemedir. Akciğer filmi çekilmesi diğer komorbid hastalıklar ve sistemik hastalıkların değerlendirilmesi gibi hastanın operasyon için durumunun incelendiği dönemdir. Bu dönemde hastalığın tedavisini yönlendirecek olan durumlarda ve metastatik hastalık şüphesi olması durumunda yüksek riskli hastalarda tomografi ve/veya PET çekilebilir.⁵² Preoperatif olarak bakılan Karsinoembriyonik antijenin (CEA) hastalığın resektabilitesi ve evresi ile ilgili preoperatif ön bilgi verdiği bilinmektedir.²⁷

2.1.4.2 PATOLOJİK EVRELEME:

Kolorektal kanserli olgularda evreleme (Staging) hastanın prognozunu belirlemede ve adjuvan tedavi gereksiniminin araştırılmasında son derece önem arz etmektedir. Geleneksel olarak kolorektal kanser evrelemesi ilk olarak 1930 yılında rektum kanseri için prognostik araç olarak geliştirilmiş olan, Dukes' sınıflandırmasına göre yapılmaktadır.¹¹ Şu anda

American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve International Union against Cancer (UICC) tarafından geliştirilmiş olunan TNM klassifikasyonu tercih edilen evreleme sistemidir. Bu sistemde tümörün penetrasyon derinliği (T), mesenterik nodların bulunup bulunmaması ve sayısı (N), ve uzak metastaz varlığı (M) hesaplamaya katılmaktadır.⁵¹ Patolojik evreleme cerrahi eksplorasyondan ve spesimenin değerlendirilmesi ile yapılır. Kanserin final evrelemesi TNM sistemine göre yapılmaktadır. AJCC evreleme (6th edition) sisteminde evre2, evre2A ve evre2B olarak ; evre3 ise evre3A , evre3B ve evre3C olarak hem duvara penetrasyon, hem de lenfnodu tutulumu göz önüne alınarak altgruplara ayrılmıştır. Bu altgruplarda da sağkalım da farklılıklar olduğu gösterilmiştir.⁵³ Lenfatik invazyonun derecesi ve vasküler invazyonun varlığı TNM evreleme sistemine önemli eklerdir.^{54 55}

Dukes; önceki Lockhart and Mummery sınıflandırmasını bir sekile sokarak, 1932’de kendi ismini verdiği bir evreleme sistemi geliştirdi. Buna göre:

- Dukes evre A’da; tümör barsak duvarında olup (submukoza veya muskularis propria), seroza invazyonu yoktur
- Dukes evre B’de; tümör muskularis propriadan serozaya invaze olmuştur
- Dukes evre C’de; tümör bölgesel lenf nodlarına metastaz yapmıştır.^{56 57}

Bir diğer evreleme sistemi ise Astler- Coller sınıflandırmasıdır. Buna göre :

- Evre A: Tümör mukozaya sınırlıdır.
- Evre B1: Tümör muskularis propriayı invaze eder fakat onun tamamını tutmaz
- Evre B2: Tümör muskularis propria boyunca invazedir
- Evre C1: Evre B1’in özellikleri ile beraber lenf nodlarının tutulması

-Evre C2: Evre B2'nin özellikleri ile lenf nodlarının tutulması

-Evre D: Yaygın metastaz olmasıdır. ^{58 59}

1954'de ise Denoix TNM sistemini uygulamaya başladı.Bu sistem UICC ve AJCC tarafından literatüre uyarlanmıştır ve şuanda en yaygın olarak kullanılan sınıflandırma sistemidir.

Kolorektal karsinomda evreleme (TNM)

Primer tümör (T)

TX Primer tümörün olmaması

T0 Primer tümör için hiçbir delil olmaması

Tis Karsinoma insitu (intraepitelyal ve intramural)

T1 Tümör submukozayı invaze eder

T2 Tümör muskularis propriayı invaze eder

T3 Tümör muskularis propriadan geçerek subserozaya veya periton ile kaplı olmayan perikolik veya perirektal dokuya invazedir

T4 Tümör diğer organları veya yapıları invaze eder veya visseral peritonu perfor etmiştir.

Bölgesel lenf nodları (N)

- NX** Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi
- N0** Bölgesel lenf nodlarında metastaz yoktur
- N1** Perikolik veya perirektal lenf nodlarına 1- 3 metastaz
- N2** Perikolik veya perirektal lenf nodlarına > 4 metastaz.
- N3** Uzak lenf nodülü tutulumu (prinsipal lenf nodülleri)

Uzak metastaz (M)

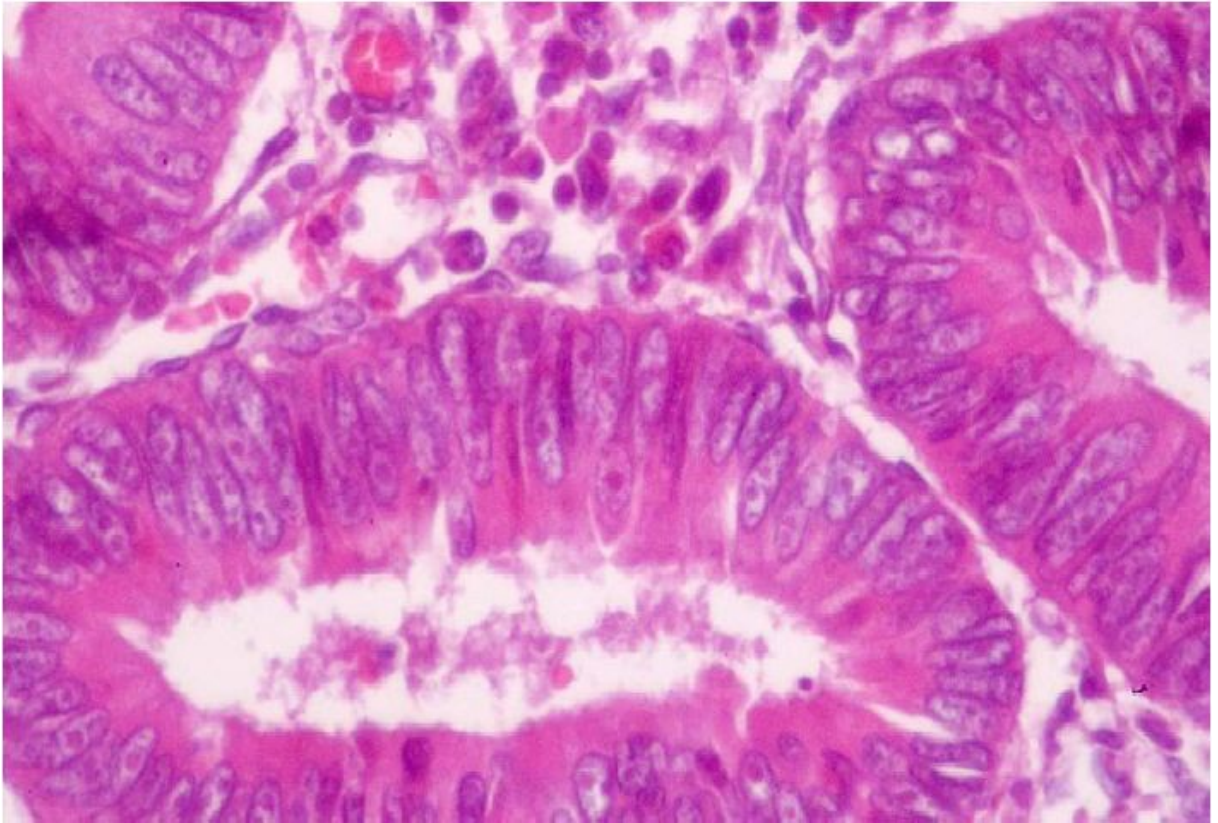
- MX** Uzak metastaz varlığı değerlendirilememistir.
- M0** Uzak metastaz yoktur
- M1** Uzak metastaz vardır

Kolorektal Kanserde Evreleme:

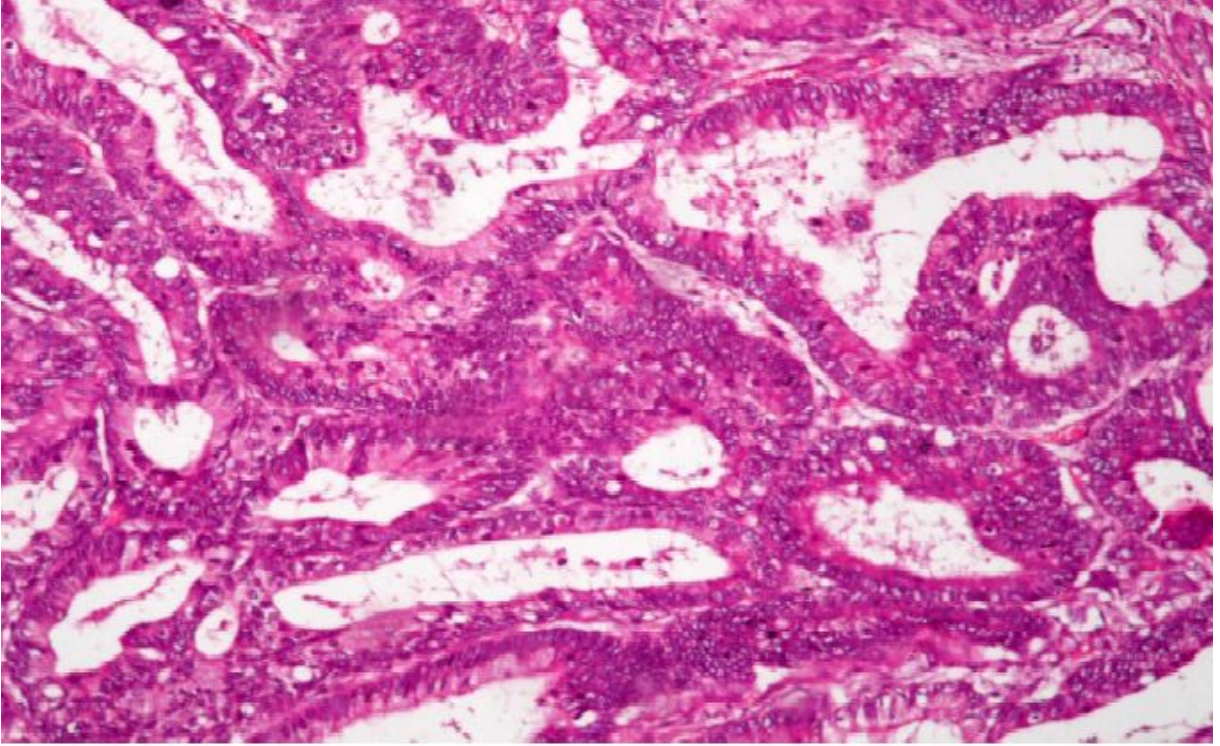
Evre 0	:Tis,N0,M0	
Evre I	:T1,N0,M0(DukesA);	T2,N0,M0
EvreII	:T3,N0,M0(DukesB);	T4,N0,M0
Evre III	:Herhangi T, N1,M0 (DukesC);	Herhangi bir T,N2,M0
Evre IV	:Herhangi bir T, herhangi bir N, M1.	

2.1.4.2.1 PATOLOJİK GRADE (DERECELENDİRME):

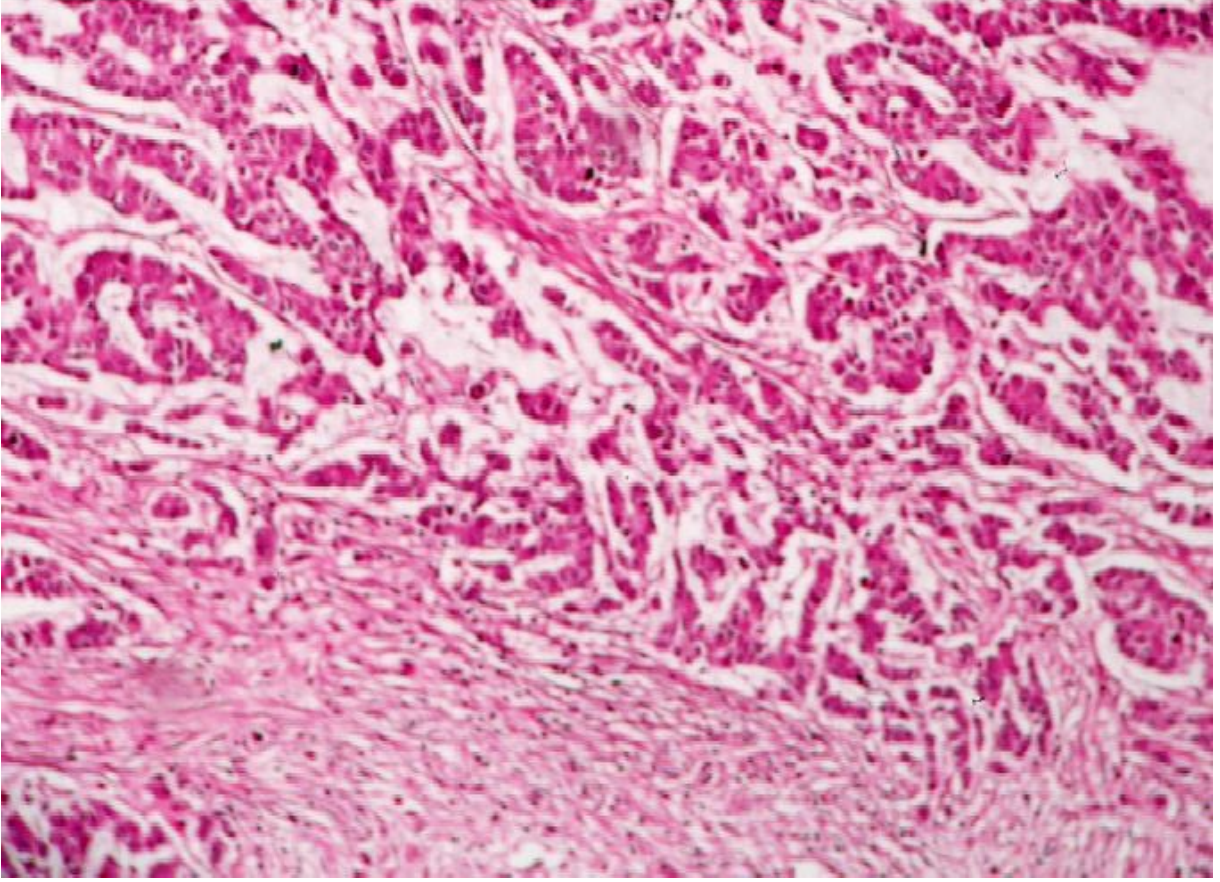
Histolojik olarak derecelendirme (grade) adenokarsinomların bez yapıların varlığı temel alınarak yapılmaktadır.^{56 57 60 61} Histolojik grade prognostik değer olarak da kullanılmaktadır.⁵⁷ Kötü diferansiye olanlarda en azından bazı bez yapıları ve müsin üretimi izlenmelidir. Karsinomlar karışık diferansiasyon yapılanması gösterdiğinde derecelendirme en az diferansiye bileşene göre yapılmaktadır. İyi diferansiye tümörler (Grade I) de tümörün %75'inden fazlasının bez benzeri yapıda olması (Resim 2) ; orta derece diferansiye (Grade II) tümörler de bez benzeri yapının % 25-75 oranında olması (Resim 3) ve kötü diferansiye tümörler (Grade III) de ise bez benzeri yapının % 25'den az olması gözlemlenir (Resim 4). Müsinöz adenokarsinomlar ve taşlı yüzük hücreli karsinomlar genellikle grade III' tür.^{57 60 61}



Resim 2: İyi diferansiye adenokarsinom (H&E, x400)



Resim 3: Orta derece diferansiye adenokarsinom (H&E, x100)



Resim 4: Kötü diferansiye adenokarsinom (H&E, x100)

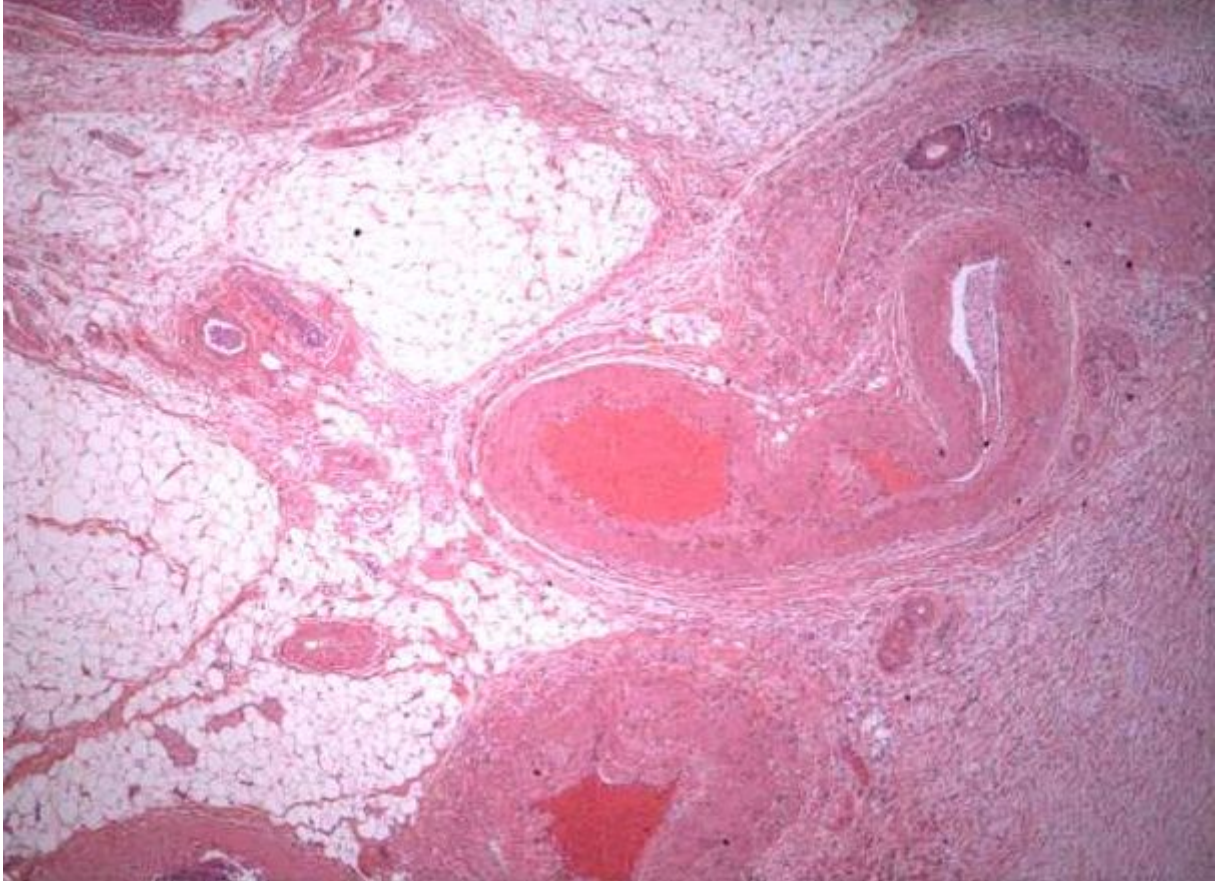
2.1.4.2.2 TUMÖRAL İNVAZYON :

Kolorektal adenokarsinomlar; perinöral, lenfatik , venöz invazyon ve direkt invazyon ile bitisik yapılara, ekilme ile periton ve serozal membranlara, implantasyon ile cerrahi yaralara ve anastomoz alanlarına yayılırlar. ^{63 56 57} Tümör geliştiğinde birkaç yönde büyümeye devam eder. Bu büyüme lümene ve kolon duvarına doğrudur. Kasa penetrasyon, bitisik organ ve dokulara direk yayılım ile sonuçlanır.

2.1.4.2.2.1 VENÖZ İNVAZYON :

Venöz invazyon üç histolojik özellik taşır.

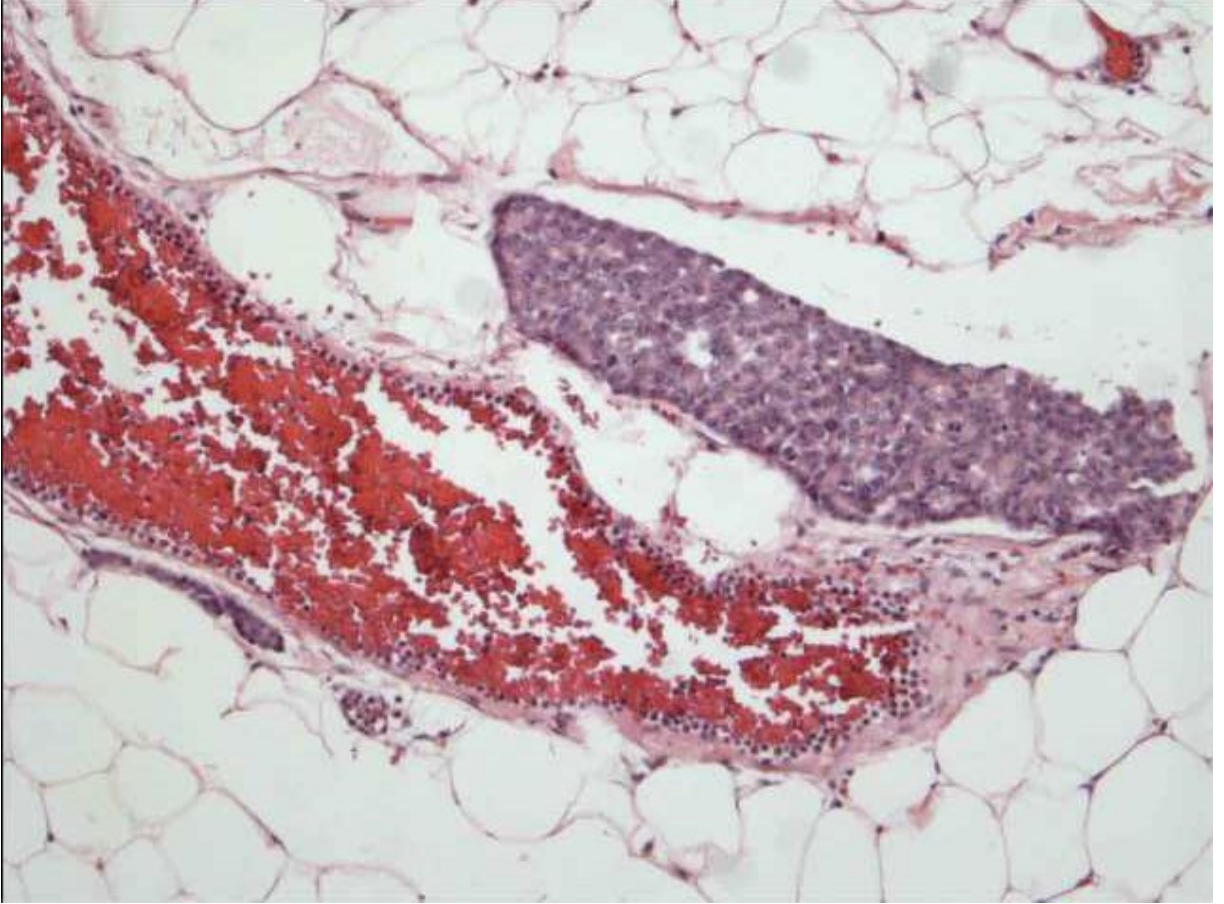
- 1) Tümör hücreleri ven duvarından ayrılır
- 2) Tümör hücreleri ven lümenini doldurmuştur. Merkezinde rekanalizasyon olabilir.
- 3) Tümör lümende vasküler kalınlaşma, duvar ve etraf dokuda enflamatuvar reaksiyon ile büyür. Duvar dışında, kalın duvarlı ven invazyonu, intramural invazyondan kötü prognozludur. Duvar dışında ki venlerde tümör varlığı ile metastatik hastalıklardan ölenler arasında güçlü uyum vardır. Kan damarı invazyonu ile tümör evre ve grade'i artar.^{57 63}
(Resim 5)



Resim 5: Vasküler invazyon. (H&E, x100)

2.1.4.2.2.2 LENFATİK İNVAZYON :

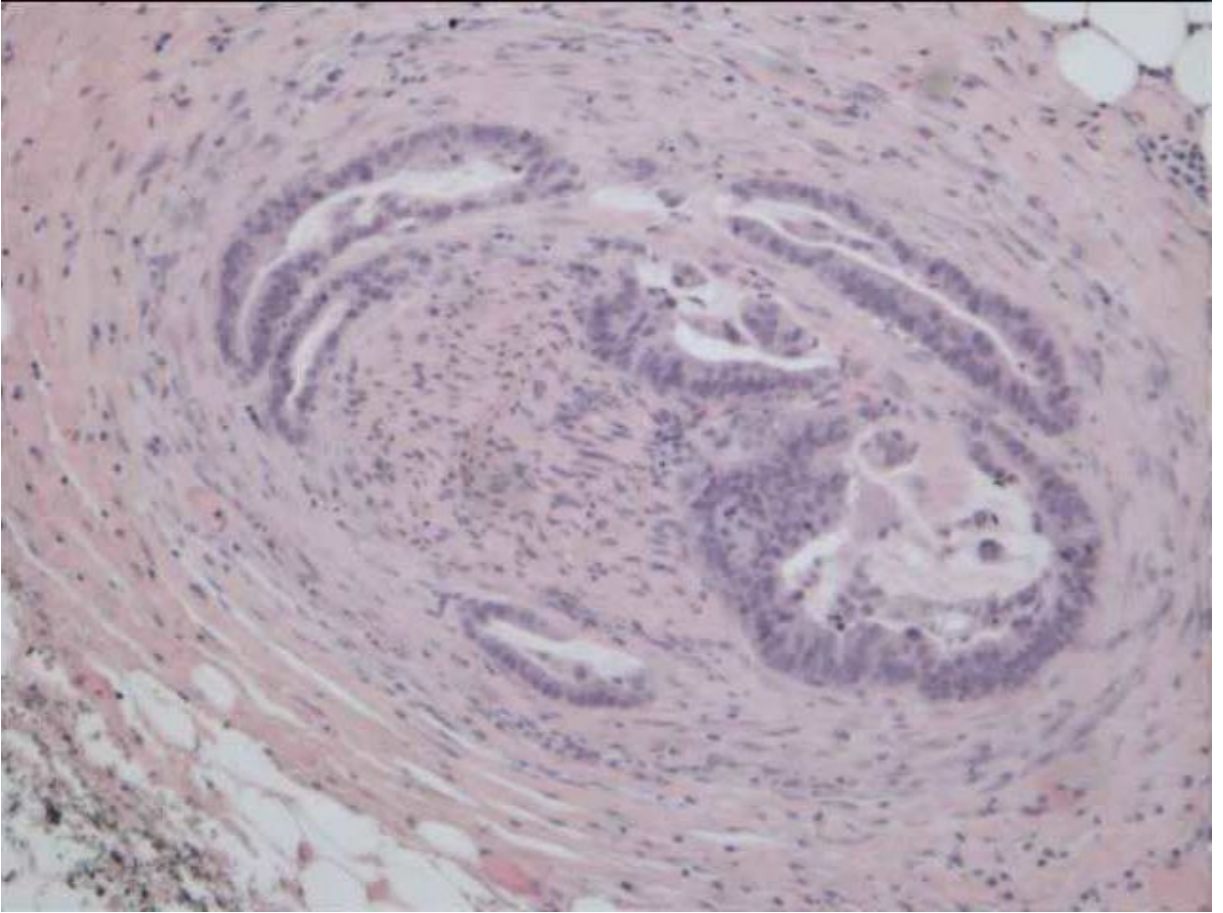
Lenfatik invazyonun artışı düşük sağ kalım ile beraberdir. Lenfatik invazyonun artışı ile tümör evre ve grade'i artar. Ayrıca bölgesel tekrar oranı ile de orantılıdır. Lenfatik invazyon hayatta kalım için bağımsız bir prognostik faktördür. Kolon kanserleri sıklıkla bölgesel lenf nodlarına metastaz yapar. Düşük gradeli tümörler lenf nodlarına %30, yüksek gradeli tümörler ise %81 oranında metastaz yapar.^{57 63} (Resim 6)



Resim 6: Lenfatik invazyon. (H&E, x100)

2.1.4.2.2.3 PERİNÖRAL İNVAZYON :

Perinöral invazyon patolojik evreleme için gerekli diğer önemli kriterlerdendir. Evre III 'de perinöral invazyon görülme oranı artmaktadır ve perinöral invazyon olmayan evre III hastalara göre perinöral invazyonlu evre III hastalarda bölgesel tekrar oranı artmıştır.^{57 63} (Resim 7)



Resim 7: Perinöral invazyon. (H&E, x100)

2.1.4.2.3. PROLİFERASYON İNDEKSİ :

Proliferasyon indeksi tümörün saldırganlığı ve yayılıma ne kadar yatkın olduğunun belirteci olarak kullanılmaktadır. Patolojik olarak tümör hücresinin proliferasyon miktarının değerlendirilmesi de tümörün davranış paternini bize gösteren değerlerdendir.^{64 65} Çoğu retrospektif çalışmada meme kanseri, mide kanseri ve lenfoma için proliferasyon miktarının tümörün davranışı açısından bize bilgi verdiği ortaya konulmuştur.^{16 17} Proliferasyon indeksi (PI) ölçümü için kullanılan Ki-67 çoğalan hücrelerde eksprese olan ancak resting hücrelerde bulunmayan bir monoklonal antikordur.¹⁸ Ki-67 proliferasyon belirleyicisi ilk kez 1983'de Gerdes ve arkadaşları tarafından, hücre siklus bağımlı nükleer proliferasyon belirleyicisi olarak tanımlanmıştır ve kortikal timosit, germinal merkez lenfositleri, epidermisin bazal hücreleri gibi proliferatif hücrelerde eksprese edilmiştir. Aynı araştırmacılar 1984'de Non-Hodgkin Lenfomalarda Ki-67 ekspresyonunu incelemişler ve Ki-67'nin önemli bir klinik gösterge olabileceğini gözlemlemişlerdir.^{66 67} Ki-67 hücre siklusunun proliferatif G1, G2, M ve S fazlarında hücre tarafından eksprese edilen, G0 fazında eksprese edilmeyen, nonhiston nükleer bir proteindir. Bu belirleyiciye karşı esas antikor sadece taze frozen kesitlerde çalışılmıştır, bu nedenle parafin bloklarda çalışılmak üzere monoklonal antikorların formaline dirençli epitopları (MIB-1 ve MIB-3) geliştirilmiştir. Ki-67 ve mitoz sayımı arasında iyi bir korelasyon vardır.⁶⁸ Ki-67, 345 ve 395 kilodalton ağırlığında iki molekülden oluşan bir komplekstir ve Ki-67 geni 10.kromozom üzerinde yer alır.⁶⁷ İmmünohistokimya sal boyamalarla bu antikorun spesimenlerde gösterilebilmesi mümkündür. Kolorektal kanserde yüksek PI değerleri ile kötü prognostik değişkenler arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Yüksek PI değerlerinin çeşitli tümörlerin invazyon derinliği, lenf-nodu metastazı ve uzak metastaz ile beraber olduğu çeşitli retrospektif olarak yapılmış olan çalışmalarla gösterilmiştir. Kolorektal kanserlerin patolojik karakteri olarakta PI ile tümörün diferansiyasyonu, metastatik olması ve lokal invazif olması arasında ilişkiler gösterilmiştir; PI değeri arttıkça tümörün penetrasyon derinliği, lenf nodu metastazı yapma sıklığı ve uzak metastaz yapma sıklığı arasında anlamlı bir ilişki bulunduğu literatürde birçok çalışmada gösterilmiştir.^{19 20 21 22} Proliferasyon markırları ile kolorektal kanserlerin prognozu arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalarda literatürde bulunmaktadır.^{23 24 25}

2.2. DNA HASARININ VE DNA ONARIM KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ:

2.2.1.DNA Hasarının Belirlenmesi (Comet yöntemi):

Genotoksisite, fiziksel veya kimyasal ajanlarla genetik materyalde oluşan hasara verilen isimdir. Genetik materyalde olan değişikliklerin tamir edilemediği durumlarda rekombinasyon, mutasyon, yaşlanma, kanser oluşabilmektedir. ^{69 70} Comet tekniği veya bir diğer adıyla tek hücre jel elektroforezi, DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan, hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip bir tekniktir. 1970 li yıllardan beri dünyada yaygın olarak kullanılmakta olan bu test ilk olarak 1975 yılında Rydberg ve Johanson ⁷¹ tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kullanılmıştır. 1984 yılında Östling ve Johanson ⁷² tarafından geliştirilen bu teknik nötral pH'da (pH:7.0-9.6) DNA'nın çift zincir yapısını korumasından faydalanarak DNA da bulunan çift sarmal kırıklarını tayin etmekteydi. ⁷³ Bu dönemde yaygın olarak kullanılmasının ardından geliştirilerek 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından bu yöntem alkali lizing koşullarında uygulanmıştır. Singh ve arkadaşlarının yönteminde ki fark; alkali ortamda (pH>13) DNA'nın unwinding'e uğramasıdır. Böylece daha hassas olarak çok daha küçük DNA değişiklikleri gösterilebilir hale gelmiştir. ^{74 75} Singh ve arkadaşlarının comet yöntemi protokolü bugün dünya genelinde en yaygın kullanılan protokoldür. ⁷⁶ Yöntemin en önemli avantajlarından bir tanesi de insan lenfositlerinde çalışma olanağı sağlamasıdır. ⁷⁷ Comet yönteminde, hücreler izole edildikten sonra agar içine gömülerek mikroskopik lamlara yayılır, lizing aşamasından sonra elektroforeze bırakılır. Bu elektroforez işlemi esnasında hasarlı DNA çekirdekten anoda doğru sürüklenmeye başlar ve kuyruklu yıldız (comet) oluşumu floresan boya (Etidyum Bromür) ile boyanmak suretiyle floresan mikroskop altında değerlendirilir. Comet tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirmenin yanısıra kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi gibi parametrelerde hesaplanabilmekte ve sayısal olarak değerler elde edilebilmektedir. Kuyruktaki DNA yüzdesinin (% Tail DNA) belirlenmesi ve sonuçların gözle değerlendirilmesi diğer parametrelere göre doz cevap ilişkisini daha iyi yansıtmaları sebebiyle tercih edilmektedir. ^{78 79} Diğer genotoksisite yöntemleri ile karşılaştırıldığında Comet Yöntemi; düşük düzeylerde de olsa DNA hasarını yüksek sensitivite ile saptayabilmesi, kısa sürede ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle daha öne çıkan bir yöntem olarak kullanılmaktadır. ⁸⁰

2.2.2.DNA Onarım Kapasitesinin Belirlenmesi (Challenge Yöntemi):

İlk olarak Hsu, Au ve arkadaşlarının 1970’lerde yapmış oldukları genotoksisite çalışmalarının sonucunda kanser hastalarının ve kansere yatkın bireylerin kendi DNA’larını onarmada başarısız oldukları gösterilmiştir. Çalışmalarında Au ve arkadaşları X ve gama ışınları gibi fiziksel ajanları kullanmaya başlamışlardır. Au ve ark. uyguladıkları yöntemi “Challenge tekniği” diye isimlendirmişlerdir. Böylece bu teknik ilk olarak William Au tarafından sitogenetik literatürüne sokulmuş ve DNA onarımının kişilere göre farklılığının tespitini; dolayısıyla bireysel duyarlılığı göstermek için kullanılmaya başlanılmıştır.^{81 82} Bu yöntemde deney ve kontrol bireyleri yüksek dozda radyasyona maruz bırakılır ve oluşmuş olan indüklenmiş DNA hasarı saptanır. İndüklenmiş değerlerdeki farklar kantitatif olarak değişen onarım kapasitesini göstermektedir.^{83 84} DNA hasarının radyasyon ile indüklenmesi ve radyasyon genotoksisitesi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır ve literatürde çok güvenilir bir yöntem olarak kullanılmaktadır.⁸⁵

Hasarlı DNA’nın onarılamaması kanser oluşumunun temel mekanizması olarak kabul edilir. Bu durum DNA onarım yetersizliğini ve kansere yatkınlığı dolayısıyla bireysel duyarlılığı belgeler. DNA onarım yetersizlikleri spesifik genlerde mutasyon meydana getirebilir.⁸⁶ DNA onarım bozukluğunun saptanılabilmesi için Comet tekniğinin kan lenfositlerinde Challenge tekniği ile kombine kullanımı yöntemin hızlı ve güvenilir olması nedeniyle tercih edilmektedir.⁸⁷

3. GEREÇ VE YÖNTEM:

Bu prospektif randomize olarak 2008 yılından itibaren yürütülen çalışmada Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı’na başvuran veya burada tanısı konulan kolorektal kanser tanılı hastaların DNA hasarlarının & DNA onarım kapasitelerinin

hastalığın Evresi ve tümörün saldırganlığı arasında ki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bunun için Kolorektal kanser tanılı hastalara çalışmanın içeriği ve esaslarının anlatılıp, okuyup anladıkları yönünde imzaladıkları onama formları alınarak, çalışmanın kriterlerine uyan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. 2008 yılı Ocak ayında çalışmaya başlanılarak 2009 Ağustos ayına kadar çalışmanın kriterlerine uyan 30 hasta bu çalışmaya alınmıştır.

Çalışmaya alınmış olan hastalardan 21 G çaplı steril enjektör yardımıyla steril şartlarda iki adet Heparinli tüpe 5 er mililitre olacak şekilde kanlar alınmıştır. Bu kanlar DNA çalışılacağından bekletilmeden 0.75 Gy ile ışınlamak üzere Acıbadem Hastanesi Kozyatağı Radyasyon Onkolojisi Bölümüne önceden anlaşıldığı üzere götürülmüştür.

Bu çalışmaya alınan hastaların preoperatif CEA değerleri, ameliyat notları, gerekli demografik bulguları, epikrizleri ve ameliyat sonrası patoloji raporları takibe alınmıştır.

3.1. HASTA SECİLME KRİTERLERİ:

Çalışmaya alınma kriterleri ;

1. Kolorektal kanser tanısı almış hastalar
2. Onama formunu okumuş ve çalışmayı kabul etmiş hastalar

Çalışmadan çıkartılma kriterleri ;

1. Ailesel kolorektal kanser hikayesi olan hastalar

2. Enflamatuvar barsak hastalığı zemininde gelişmiş olan kolorektal kanser hastaları
3. Preoperatif kemoterapi ve/veya radyoterapi almış hastalar
4. Bilinen genetik geçişli ailevi hastalığı olanlar
5. Sigara içen hastalar
6. Çalışmadan kendi isteğiyle herhangi bir aşamada çıkmak isteyen hastalar
7. Patolojik incelemesi hastanemiz dışında yapılacak olan hastalar.

3.2. ALKALİ COMET HAZIRLIĞI:

Çalışmaya alınan hastadan preoperatif dönemde heparinli tüpe alınan örnek ışınlanması yapılması için Acıbadem Hastanesi Kozyatağı Radyasyon Onkolojisi Bölümüne götürülmüştür. Burada daha önce yapılan doz-viabilite çalışmaları sonucunda hesaplanmış olunan 0.75 Gy ile kanlar; toplam 30 saniye boyunca vücut ısını taklit etmek için 37 derece santigrat da sabitlenmiş suyla doldurulmuş olan polietilen su banyosu içine yerleştirilerek indüklendi. (Resim 8)



Resim 8: Kanların 0.75 Gy doz ile 37 santigrad derece de polietilen su banyosu içinde indüklenme süreci.

Işınlanmış olan kanlar Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilerek hemen iki ayrı ependorfa bölünerek bir ependorf 37 derecede 30 dakika onarılabilmesi için bekletilip inkübe edildikten sonra, diğer ependorf ise hasar onarılması için bekletilmeden comet tekniği ile çalışıldı.

Böylece hastanın normal periferik kan lenfositlerinde comet, indüklenmiş kanında comet ve indüklenip onarılması için inkübe edilmiş lenfositlerde ki comet değerleri hesaplandı.

3.2.1 ALKALİ COMET TEKİNİĞİ:

3.2.1.1 LENFOSİTLERİN İZOLASYONU:

Laboratuvar ortamına getirilen kanlardan (düz comet veya indüklenmiş) 100 mikrolitre kadarı ependorflar içine bir tamponlama çözeltisi olan 1 ml PBS (Phosphate Buffer Saline) ile beraber alınarak ters-düz edilmek suretiyle karıştırılıp buz içinde 10 dakika kadar bekletilir. Sonrasında her bir ependorfun tam dibine 100 mikrolitre Histopag (Lymphoprep) eklenir. Lymphoprep lenfositlerin katman halinde ayrışması için gereklidir. Kanların içinde ki lenfositlerin ayrıştırılması için bu ependorflar + 4 derecede 400 G de 5 dakika olmak üzere santrifüje edilirler.

Santrifüj sonrasında çıkarılan ependorflara göz ile bakıldığında tam dipte kırmızı bir katman olarak eritrositler görülmektedir. En üstte sarı bir katman olarak serum ve iki katman arasında ise lenfositlerin bulunduğu bulanık bir alan görülmektedir. Otomatik pipet ile comet de kullanılacak olunan lenfosit katmanı çekilip alınarak ayrı bir ependorf'a yerleştirilir.

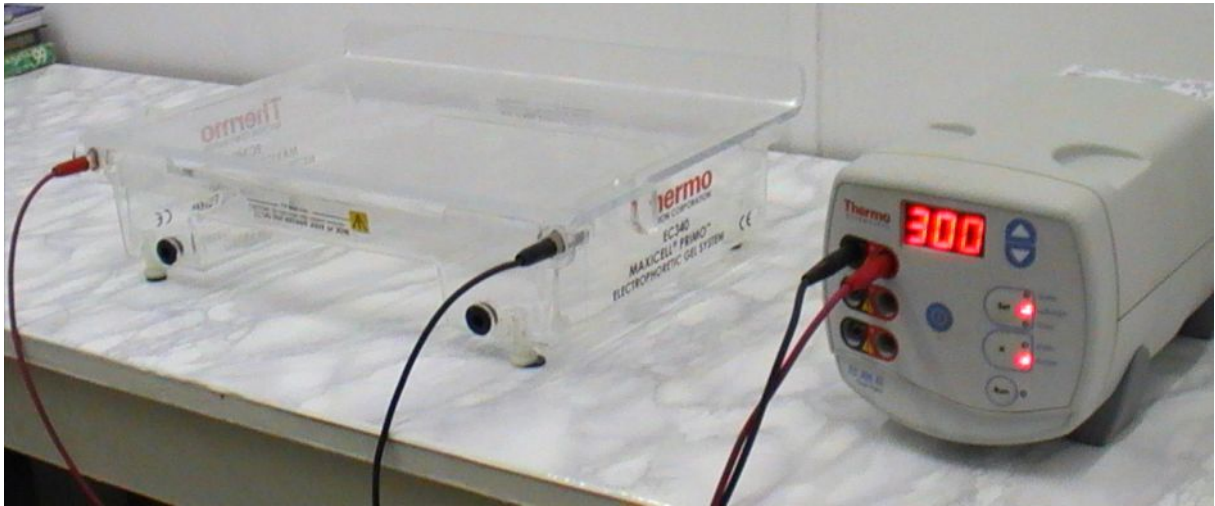
Lenfositlerin ayrıştırılmasını müteakiben lenfositlerin yaşamının devamını sağlamak amacıyla LMA (Low Melting degree Agar) (0.65 mg LMA 100 ml PBS ile beherde mikrodalga da çözülür ve 40 derece de saklanır) hazırlanır. Bu agarın sıcaklığı + 37 derece olarak ayarlanır ve ayrıştırılmış 100 mikrolitrelik lenfosit için 100 mikrolitre agar her bir ependorfa eklenir. Bu karışım da mikropipet ile çekilerek lamaların üzerine uzunlamasına yayılır, üzeri de lamel ile kapatılarak DNA hasarlanmasını engellemek için karanlık bir kutu içinde agar donana kadar yaklaşık olarak 30 dakika kadar + 4 derece de bekletilir.

Lamlar buzdolabından çıkışta şaleler içinde hazırlanılmış olan lysis çözeltisine (şaleler 60 ml almakta ; şale içinde 53.4 ml stok lysis çözeltisi + 6 ml DMSO + 0.6 ml Triton-X eklenerek yapılır) üzerinde ki lameller çıkartılarak konulur ve bir gece boyunca + 4 derece de buzdolabında karanlık ortamda bekletilmeye alınırlar.

3.2.1.2 ELEKTROFOREZ AŞAMASI:

Lenfositlerin ayrıştırılmasının ardından + 4 derece de bekletilen lamalar ertesi sabah lysis çözeltisinden çıkartılarak hazırlanmış olunan elektroforez çözeltisi (10 M NaOH 37.5 ml + 0.2 M EDTA ve 1250 ml ye distile su ile tamamlanır) ile doldurulmuş şaleye alınırlar. DNA sarmallarının ayrılması için yapılan bu işlemde şale 20 dakika boyunca buzdolabında karanlıkta bekletilir.

Etrafı kırılmış buz ile doldurularak içine elektroforez çözeltisi doldurulmuş olarak hazır halde bekletilen elektroforez tankına lamalar dikkatlice yerleştirilirler. Elektroforez tankı 300 miliamper de 20 dakika boyunca üzeri kapalı olarak karanlık bir oda da içerisine lamalar yerleştirilip DNA kırıkları elektroforez de yürütölmeye bırakılır. (Resim 9)



Resim 9: Elektroforez tankı (Thermo) ve elektroforez aşaması.

Kırılmış olan DNA sarmalından ayrılmış olan DNA kırıkları daima negatif yüklüdür. Elektroforez içerisinde negatif yüklüler pozitif kutuba doğru göç edeceklerinden lam üzerinde sürüklenen DNA kırıkları lamaların üzerinde comet kuyruğunu oluştururlar.

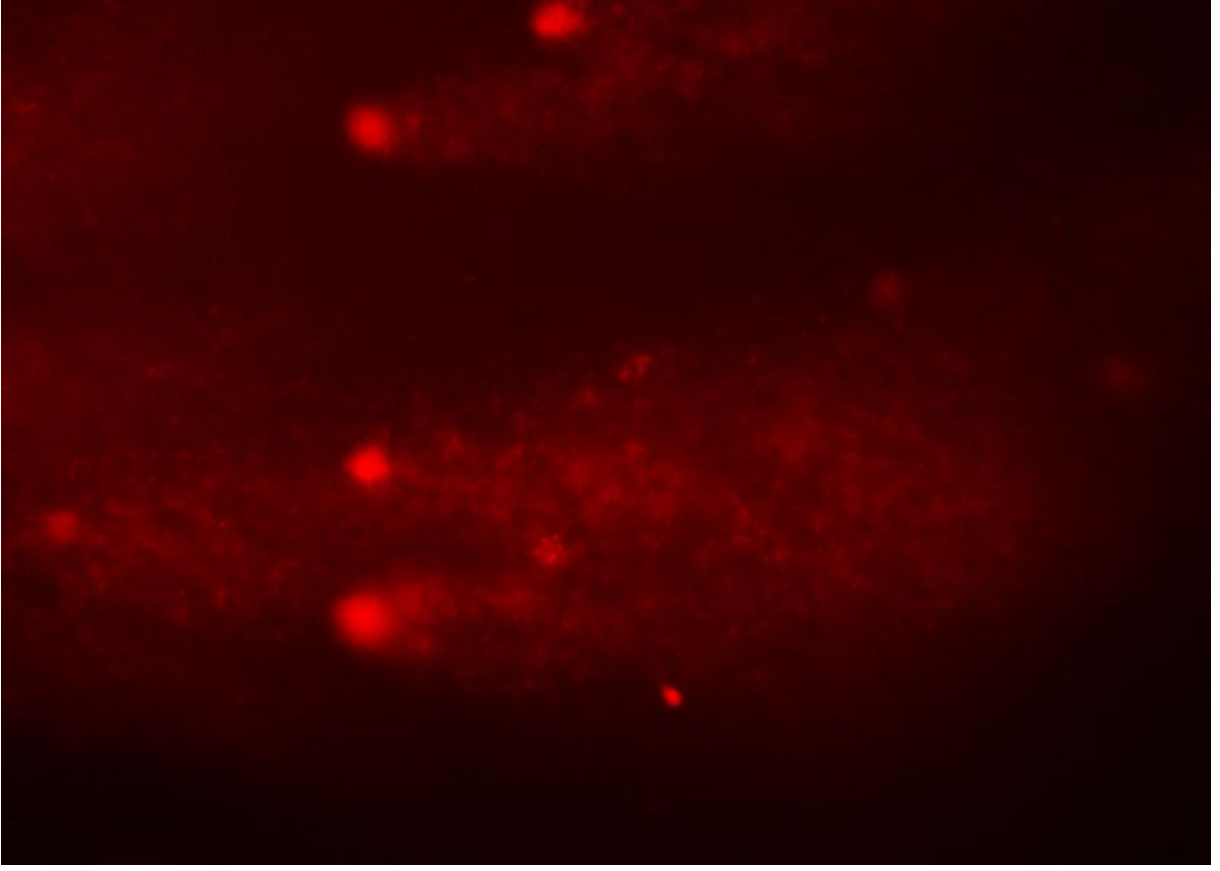
İşlem bitiminde lamalar nötralizasyon tamponuna (0.4 M Tris den 48.5 gram alınır ve distile su ile 1000 ml ye tamamlanır) yerleştirilerek (pH = 7.5) toplam 3 kere 5 er dakikalık periyotlar halinde + 4 derece yıkanarak boyanma aşamasına hazır hale getirilirler.

3.2.1.3 BOYAMA AŞAMASI:

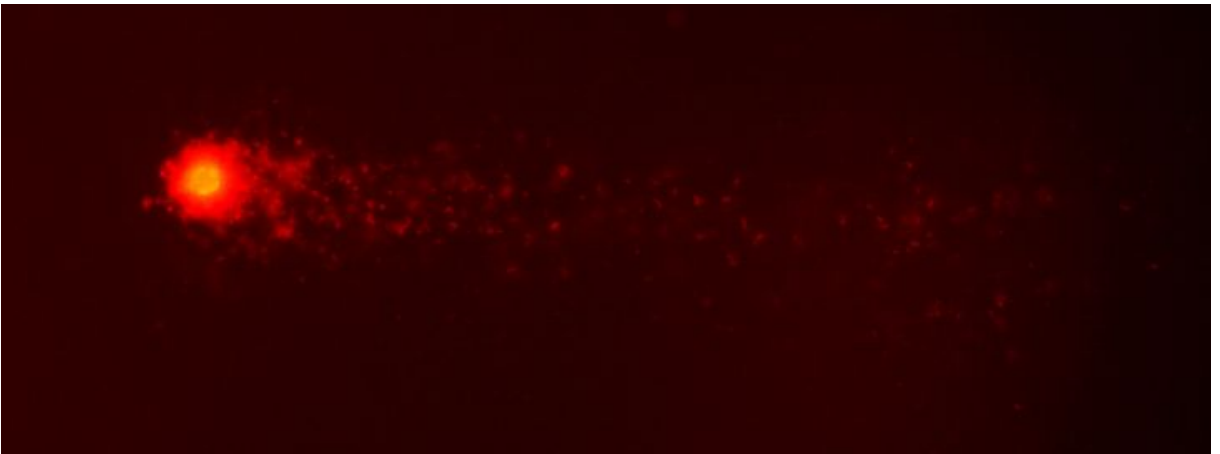
Nötralizasyon işleminden sonra floresan boya olarak kullanılan Etidyum Bromür (5mg Etidyum Bromür 50 ml distile su ile tamamlanır) den 50 mikrolitre kadarı karanlık odada lamaların üzerine mikropipellerle damlatılır ve üzerleri lamellerle kapatılır. Etidyum Bromür ileri derecede toksik ve karsinojen bir materyaldir. İşlem tamamen izole bir ortamda karanlık odada yapılır. Bu lamalar kapalı bir kutu içinde + 4 derece de 10 dakika kadar bekletilir. Sonrasında lamalar karanlık oda da floresan mikroskop yardımıyla incelenir. (Resim 10,11a ve 11b)



Resim 10: Floresan mikroskopi ve Comet ölçüm aşaması.

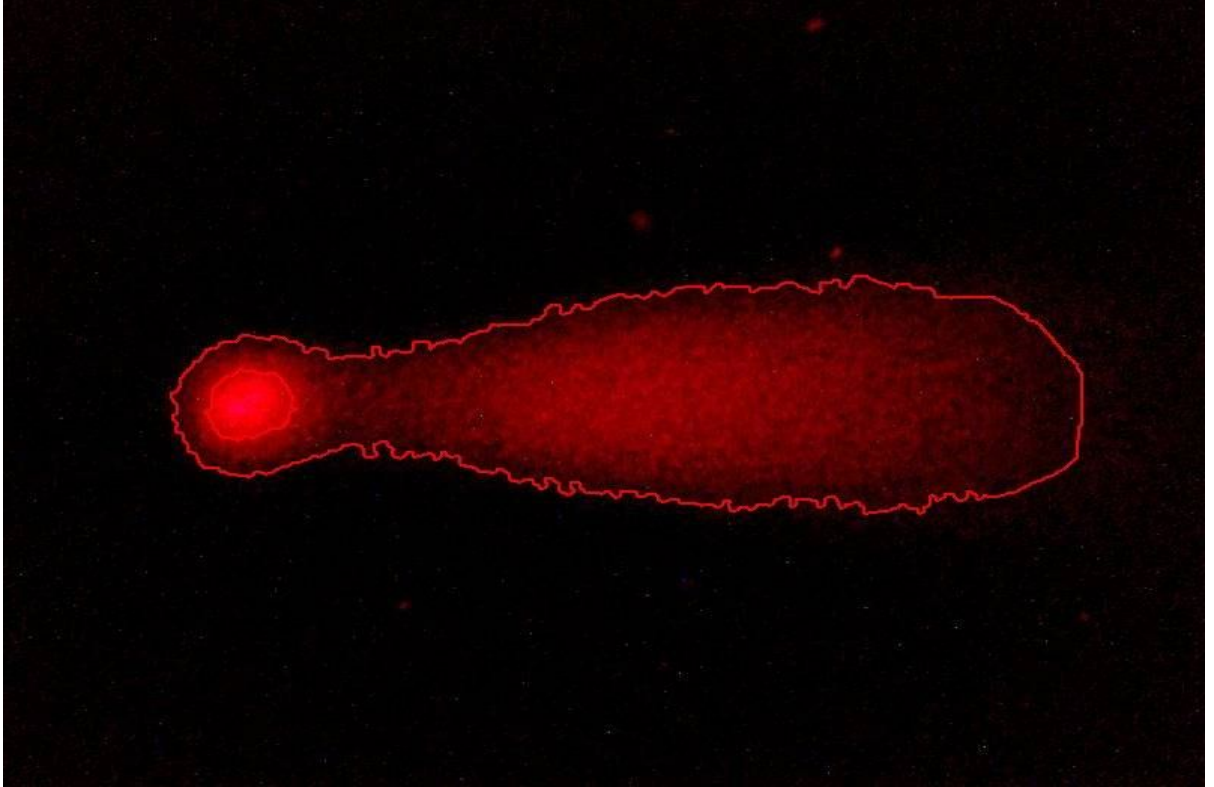


Resim 11a: Floresan mikroskopi altında oluşan comet ve saçılmaların toplu olarak örnek görünümü. (İmmünfloresan mikroskopi, Etidyum bromür, X 40)

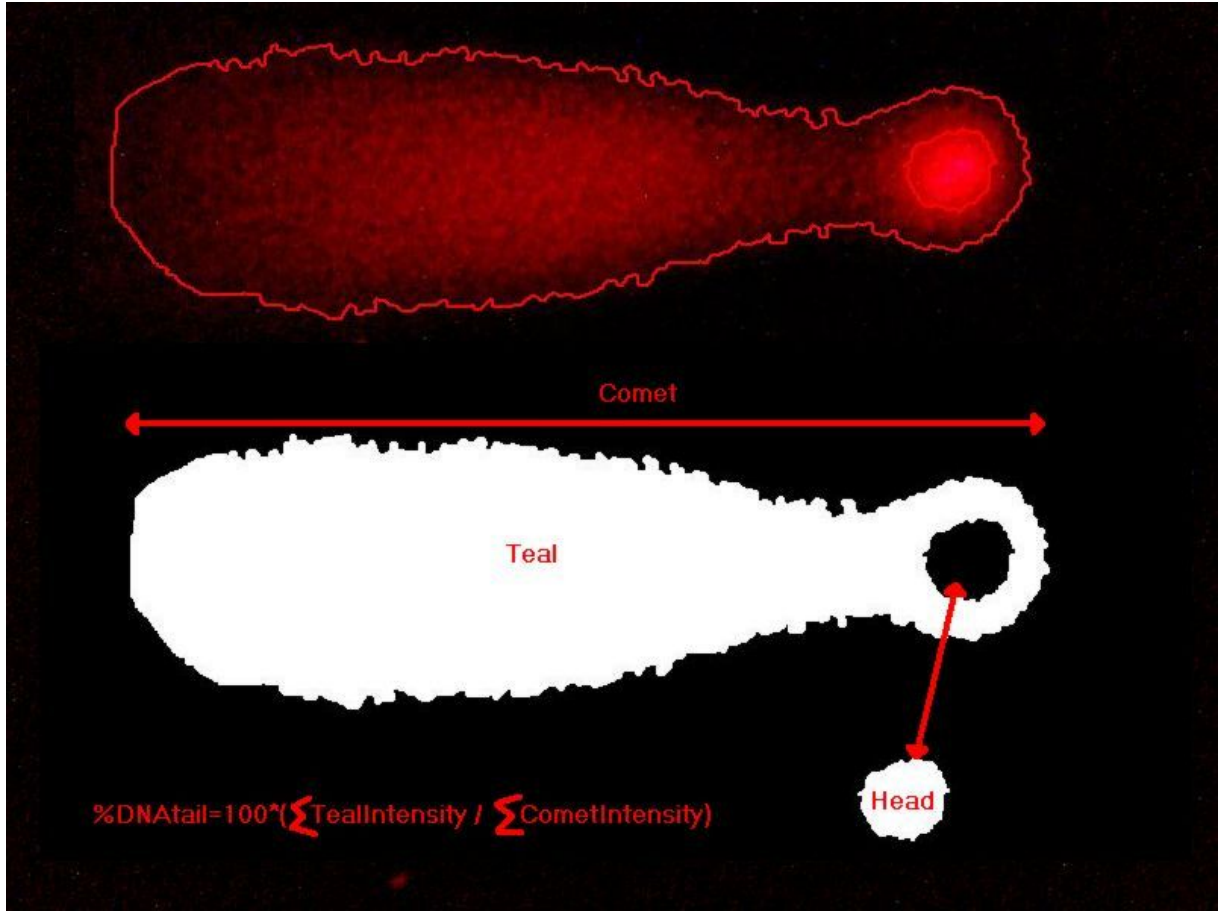


Resim 11b: Floresan mikroskopi altında oluşan comet ve saçılmalardan izole örnek görünümü. (İmmünfloresan mikroskopi, Etidyum bromür, X 40)

Bu incelemede her hastanın her çalışılan lamından ortalama 50 adet olmak üzere saçılma göstermiş olan çekirdekler seçilerek sonrasında hesaplama yapabilmek üzere bilgisayara kayıt edilir.(Resim 12)



Resim 12: Floresan mikroskopisinde seçilen Cometlerin değerlerinin hesaplanması için programın kullanımı. (İmmünfloresan mikroskopu, Etidyum bromür, X 40)



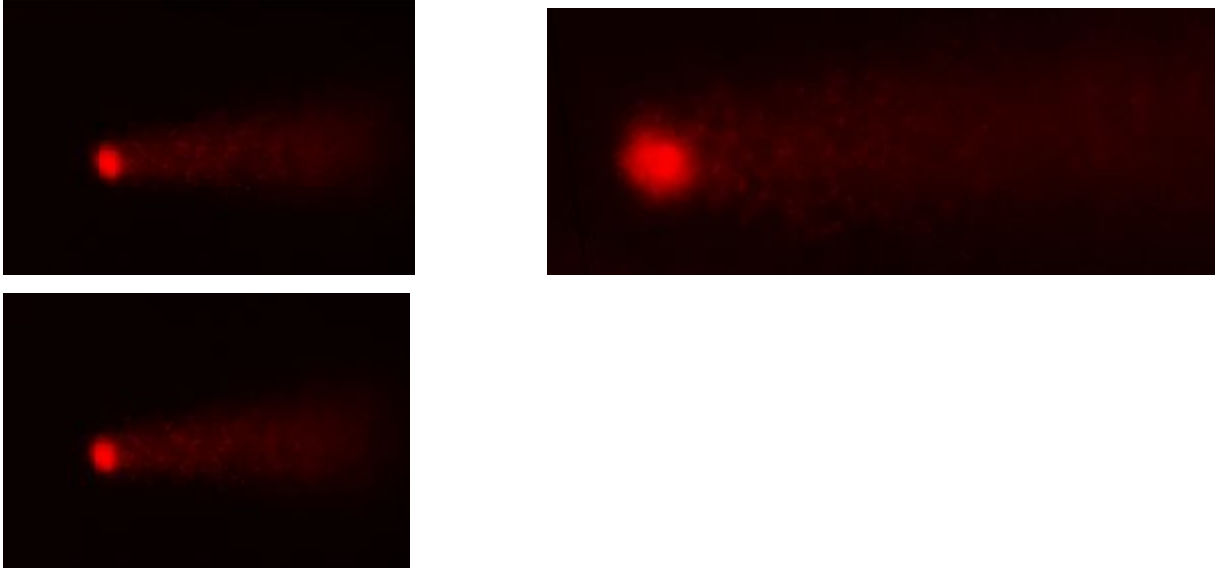
Resim 13: Formülün uygulanma şekli. (İmmünfloresan mikroskopu, Etidyum bromür, X 40)

Bu işlemlerden sonra bilgisayarda BAB Bs Comet Assay yazılımı kullanılarak ölçüm değerleri ve gerekli parametreler hesaplanır (Resim 13). Bu şekilde kolorektal kanserli hastanın normal kanında comet, ışınlanmış kanında comet ve ışınlanıp onarım için bekletilen kanında comet (Challenge) bakılmış olunur. Tüm bu sonuçlar ;

$$\% \text{ DNA REPAIR} = \frac{\% \text{ DNA ışınlanmış comet} - \% \text{ DNA onarılmış comet}}{\% \text{ DNA ışınlanmış comet}} \times 100$$

% DNA ışınlanmış

Formülü ile % DNA onarım kapasitesi hesaplanması için kullanılır. (Resim 13)



Resim 14: Çalışmaya alınmış olunan hastaların cometlerinden örnekler. (immünfloresan boya , X 40)

3.3 PATOLOJİK DEĞERLENDİRİLME:

Tüm hastaların spesimenleri Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na değerlendirilmiştir. Bu hastaların hastanemizden onaylı nihayi patoloji raporları prospektif olarak takip edilmiş ve hastaların çalışma için düzenlenmiş olan kendi dosyalarında izleme alınmıştır.

İmmünohistokimyasal olarak proliferasyon indeksi bakılacak olunan Ki-67 boyası için uygun olacak parafin kesitlerin seçilmesi için; çalışmaya alınmış hastaların tüm preparatları tekrar arşivden çıkartılıp aynı patolog ile beraber tekrar incelenmiş ve en uygun olan bloklar birlikte seçilip çıkartılarak immün boya bu seçilen dokularda çalışılmıştır. Prospektif olarak takip edilen tüm hastaların preparatlarına eksiksiz olarak ulaşılmıştır.

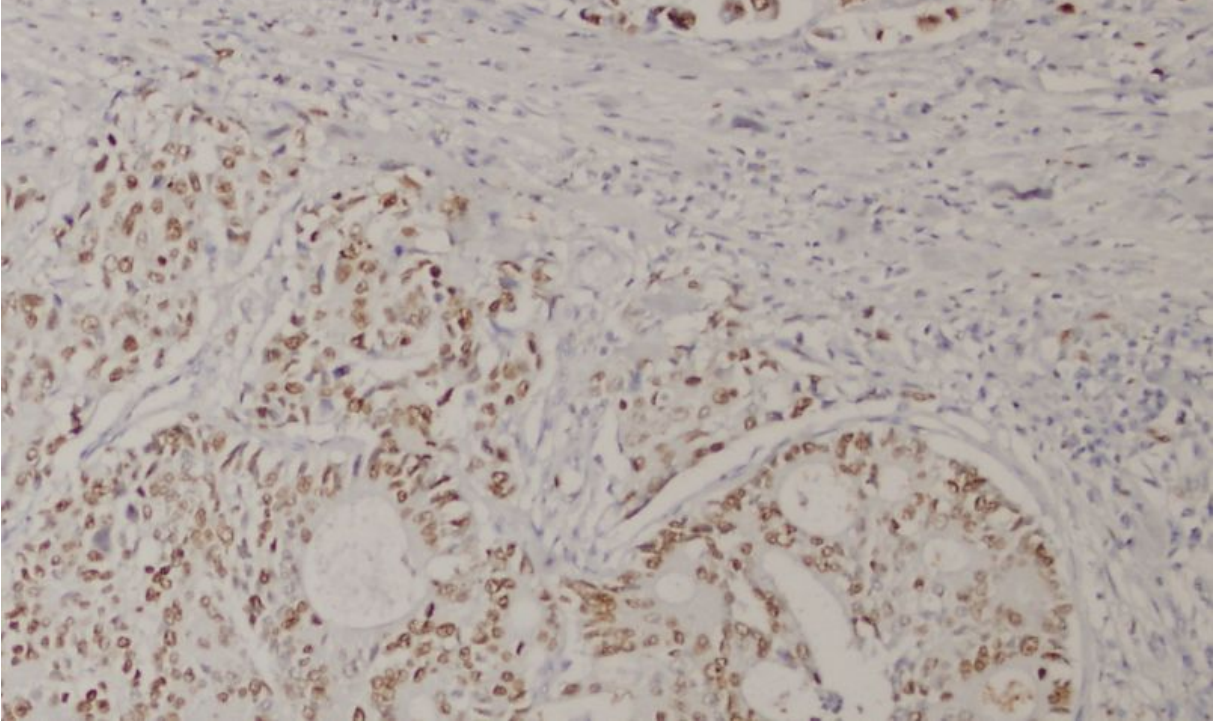
3.3.1 KI-67 İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME:

Çalışmaya dahil edilmiş olunan hastaların patoloji arşivinde saklanmış olan tüm lamaları tekrar değerlendirilmek üzere bir patalog ile tarandı. Hastaların tüm lamaları tekrar incelenerek bu tümör bulunan lamaların içerisinde yoğun infiltrasyon bulunan alanların olduğu kesitler immünboyanma için hazırlanmak üzere seçildi. Hastaların patoloji raporları değerlendirilerek grade , invazyon parametreleri, evreleri gibi parametrelerin varlığı kontrol edildi.

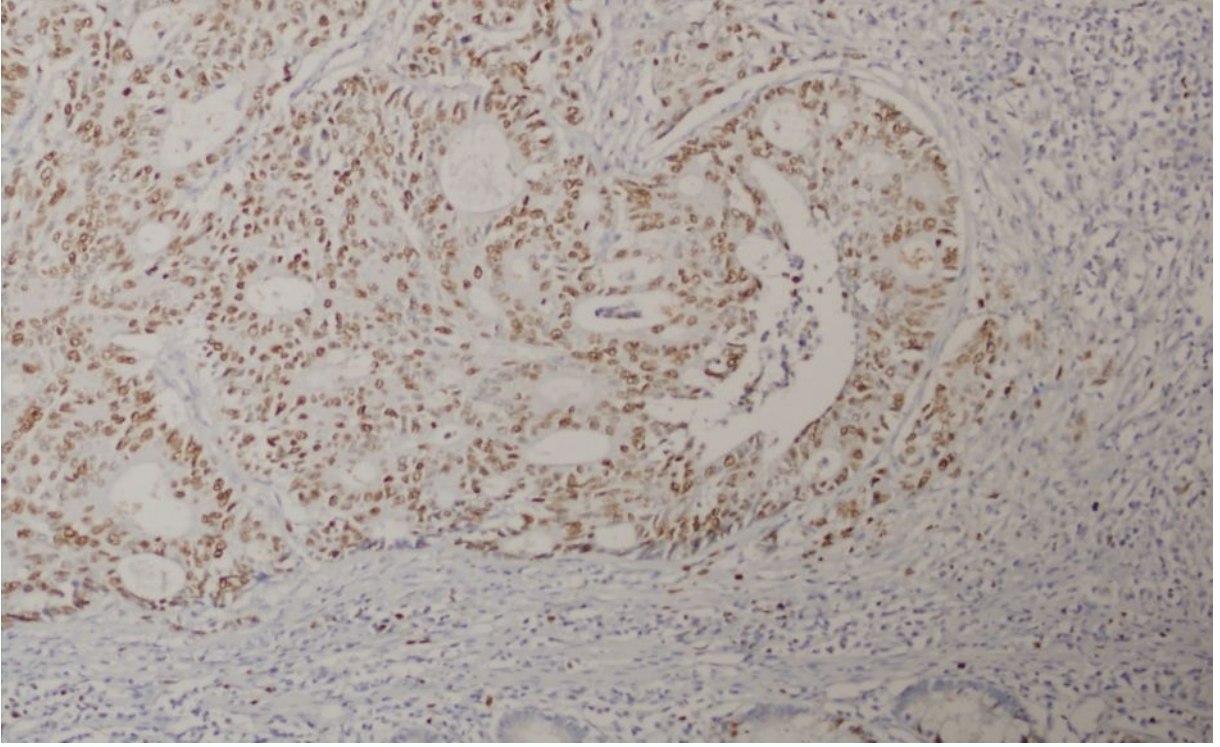
Formalin fikse dokularda, Ki-67 immünekspresyonunu göstermek amacıyla streptavidin biotin peroksidaz immünohistokimya boyama yöntemi uygulandı. Bu yöntemde, parafine gömülü dokulardan, pozitif şarjlı lamalara 3µm kalınlığında kesitler alındı ve 37°C’ de 1 gece deparafinize edildi, ardından üç ayrı ksilende beşer dakika bekletilerek deparafinizasyon tamamlandı. Kesitler iki ayrı %96’lık etanolden geçirildi ve dokudaki endojen peroksidaz aktivitesi %3 H₂O₂ (metanolde) ile baskılandı. Distile su ile yıkanan kesitlere, maskelenen antijenleri açığa çıkarmak amacıyla, mikrodalga fırında pH 6 sitrat tampon çözeltisi ile antijen retrieval işlemi uygulandı. Oda ısısında 20 dakika soğutulan lamalar iki ayrı fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı ve non spesifik boyanmayı engellemek için dokulara 10 dakikalık protein blokajı yapıldı. Blokajın ardından kesitlere 1:200 dilüsyon oranında anti-Ki-67 (Klon SP6, Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA,USA) damlatılarak oda ısısında 60 dakika inkübe edildi. Süre sonunda kesitler iki ayrı PBS ile yıkandı ve biotinlenmiş sekonder antikorda (SensiTek anti-polyvalent HRP kit, ScyTek Laboratories, Utah, USA) 10 dakika bekletildi. Tekrar PBS ile yıkamanın ardından streptavidine peroksidaz (SensiTek anti-polyvalent HRP kit, ScyTek Laboratories, Utah, USA) damlatılarak 10 dakika inkübe edildi. Boyanmayı görünür hale getirmek amacıyla diaminobenzidine (DAB) kromojeni damlatıldı. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer Hematoksilen ile nükleer zıt boyama yapıldı ve etanolden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilene alınarak uygun kapama maddesi ile kapatılan dokular ışık mikroskobunda değerlendirildi.

Hazırlanan tüm preparatlar Marmara Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında tek bir patolog ile beraber semikantitatif olarak değerlendirmeye alınmıştır. Toplam olarak her bir lamdan ortalama 2000 kadar hücre farklı farklı alanlardan sayılarak indeks oluşturulmuş ve bu değerler % 25 - % 75 persentil oranına bakılarak üç ayrı gruba bölünerek değerlendirmeye katılmıştır.

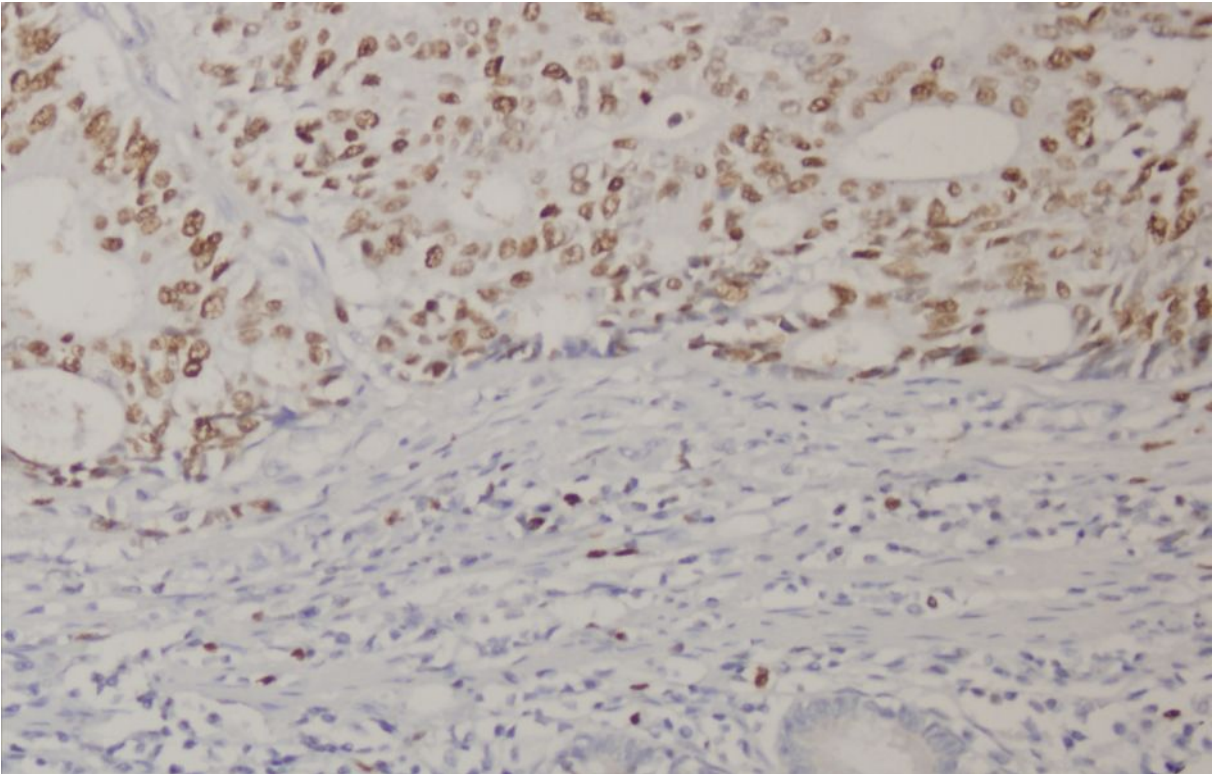
(Resim 15a,b-16a,b-17a,b)



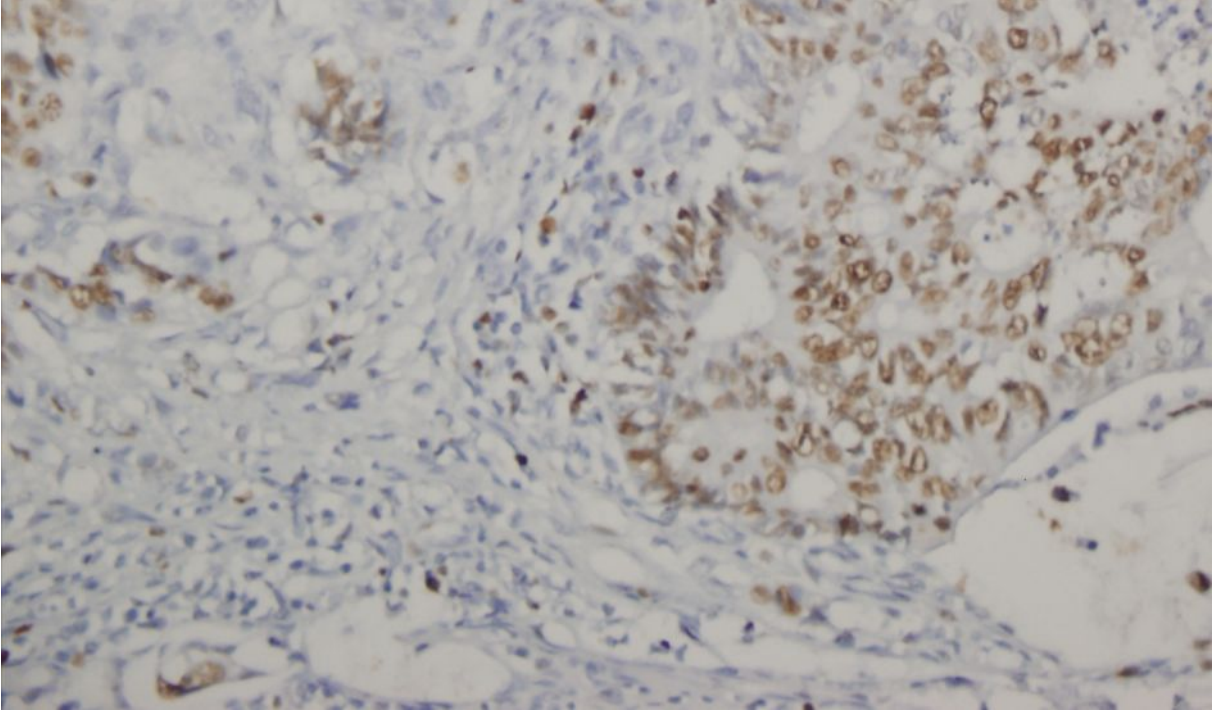
Resim 15a: Tümör immün boyama örneği.(Ki-67 ve H&E, X 10)



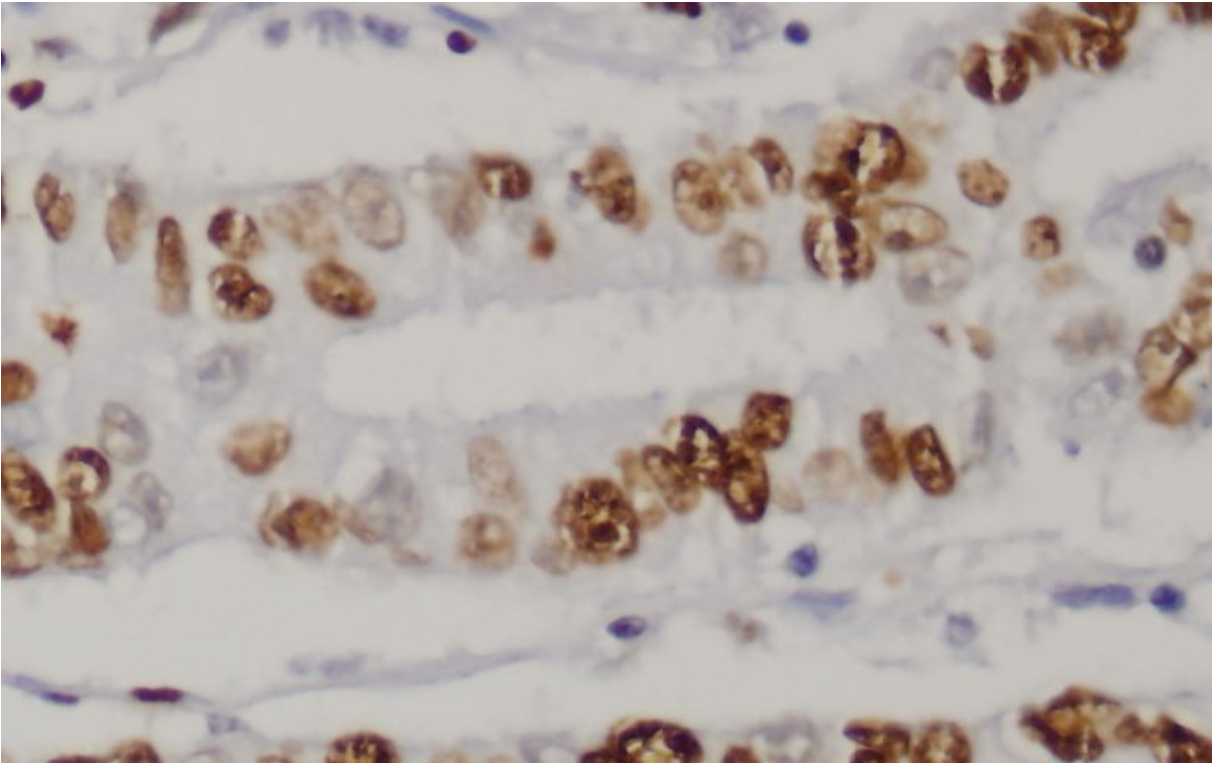
Resim 15b: Tümör immün boyama örneği.(Ki-67 ve H&E, X 10)



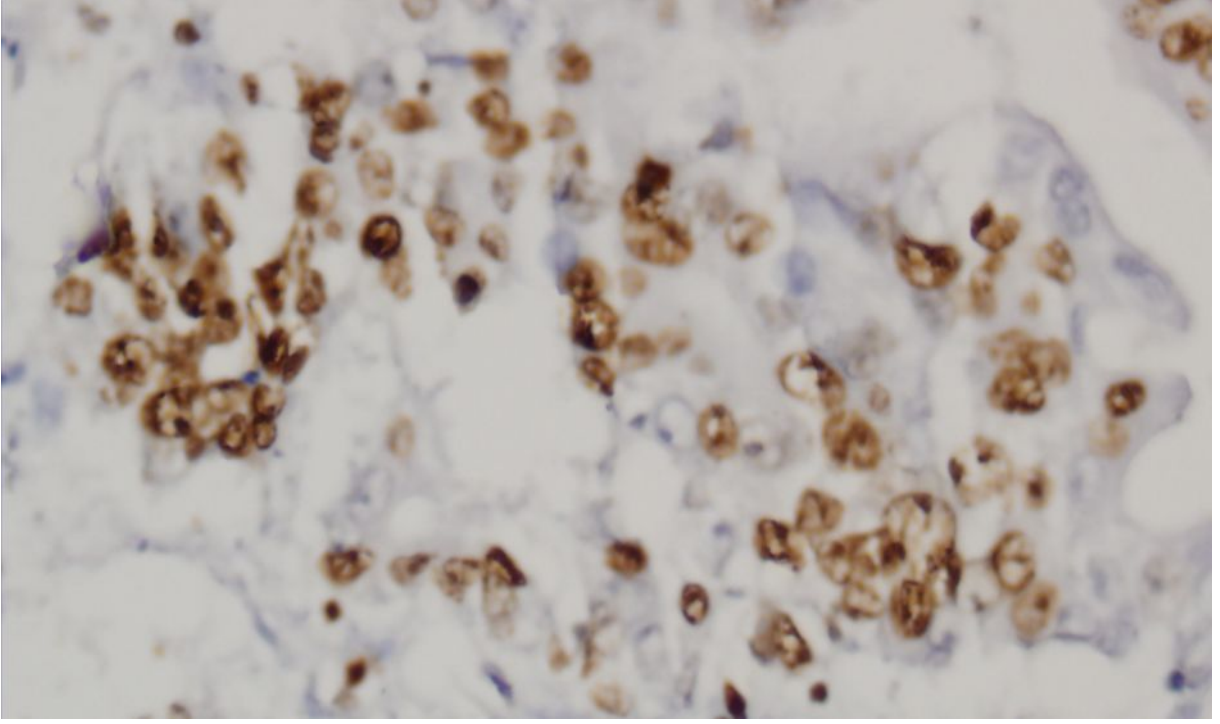
Resim 16a: Tümör immün boyama örneği.(Ki-67 ve H&E, X 20)



Resim 16b: Tümör immün boyama örneği.(Ki-67 ve H&E, X 20)



Resim 17a: Tümör immün boyama örneği.(Ki-67 ve H&E, X 40)



Resim 17b: Tümör immün boyama örneği.(Ki-67 ve H&E, X 40)

4. İSTATİSTİK:

Sonuçların tümü ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Değişkenlerin karşılaştırılmasında Pearson korelasyon testi kullanılmıştır. Klinikopatolojik değişkenlerin karşılaştırılmasında Student's-t test'i kullanılmıştır. Tüm istatistiksel analizler SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, ABD) yardımıyla karşılaştırılmıştır.

5. BULGULAR :

Çalışmaya önceden belirlenmiş kriterlere uygun olan ; 14'ü erkek (% 46.7) ve 16'sı kadın (% 53.3) olmak üzere toplam 30 hasta prospektif ve randomize olarak seçilerek onamları alınarak dahil edildi. Hastaların yaş ortalamaları 66.37 ($\pm$ 10.32) olarak saptandı.

Seçilmiş ve yakın olarak takip edilmekte olunan hastaların ameliyat öncesi klinik evreleme de bakılan CEA değerleri 1.46 μ gr/ml ile 422.30 μ gr/ml arasında saptanıldı. Ortalama değeri 42.85 μ gr/ml olarak bulundu. CEA hormon tahlillerinin hepsi standart olarak hastanemiz merkez laboratuvarında bulunan kalibrasyonu yapılan aletler ve kitler ile çalışılmıştır. CEA'nın normal değerleri ise 0.0 ila 3.4 μ gr/ml olarak hastanemizde kabul edilmektedir. Benzer olarak ameliyat öncesinde hastaların çalışılmış olan DNA onarım kapasitelerine bakıldığında; hastaların mean onarım kapasitesinin, standart deviasyon ile beraber % 44. 49 $\pm$ 5.24 olduğu belirlenmiştir. (Tablo 1)

Ameliyat sonrasında hastaların nihayi patoloji raporlarına bakıldığında çalışmaya alınan hastaların 21'inin (% 70) TNM'ye göre bakıldığında T : 3 olarak raporlandığı saptanılmıştır. TNM'ye göre bu hastalardan 12'ser tanesinin N : 0 ve N : 1 (% 40 ve % 40 sırasıyla) olduğu ; kalan 6 hastanın da N : 2 olduğu (%20) görülmüştür. Patolojik grad'lara bakıldığında bu hastaların 19'unun (% 63.3) grad 2 olarak raporlandığı saptanmıştır. Bunu 10 hasta ile grad 3 (% 33.3) hastalar izlemektedir. (Tablo 1)

Hastaların Evrelemesi hastanemizde AJCC 2002 kataloğuna bakılarak yapılmıştır. Çalışmamızda takip edilmiş olan hastaların Evre'lerine bakıldığında hastaların 22 tanesi Evre III (% 73.3), 7 tanesi Evre II (% 23.3) ve 1 tanesi Evre I (% 3.3) olarak bulunmuştur.(Tablo 1)

Patolojik olarak hastalığın değerlendirilmesinde önemli olduğu bilinen lenfo-vasküler ve perinöral tutulum açısından aynı hastalar değerlendirildiğinde ise hastaların 18 tanesinde (% 60) lenfatik invazyonun; 12 tanesinde de (%40) vasküler invazyonun bulunduğu saptanmıştır. Perinöral invazyonun olduğu ise 8 hastada (% 26.7) saptanmıştır. (Tablo 1)

Hastaların tümörleri üzerinde immün boyama ile Ki-67 uygulanarak bakılan proliferasyon indeksleri (PI) göz önüne alındığında; tümörlerin 16 tanesinin (% 53.3) PI>%66 grubunda (Grup 3) olduğu, ikinci sırada da 9 adet ile PI<%33 (Grup 1) değerine sahip grubun olduğu saptanmıştır.(Tablo 1)

Resim	Yaş	SEX	PI	T	N	GRADE	TNM	LNf-INV	VASK-INV	NRL-INV	CEA	% DNA
	64	E	3	2	1	2	3	-	-	-	59,96	40,9
	52	K	3	3	2	3	3	-	+	-	9,91	50,5
	70	E	3	2	1	2	3	+	-	+	12,19	43,38
	50	K	3	3	2	3	3	+	+	+	2,87	43,5
	59	E	1	1	0	1	1	-	-	-	1,84	47,9
	82	E	3	3	0	2	3	-	-	-	167,2	37,3
	77	E	3	3	1	2	3	+	+	-	4,25	53,95
	51	K	3	3	1	2	3	+	+	-	320,7	35,8
	85	K	3	3	1	3	3	+	+	-	1,46	44,507
	60	K	3	4	0	2	3	-	-	-	1,68	45,029
	77	K	3	4	0	2	3	+	-	-	18,92	50,04
	75	K	1	3	0	2	3	-	-	-	20,5	33,33
	53	K	1	3	1	2	3	-	-	-	2,95	47,61
	72	E	1	3	0	2	2	-	+	-	3,37	38,58
	72	K	3	2	1	2	3	-	-	-	3,48	41,9
	82	K	3	3	1	2	3	+	+	-	1,79	48
	66	E	2	3	2	2	3	+	+	+	17,63	46,25
	56	E	2	3	2	3	3	+	+	-	26,39	49,74
	60	E	3	2	0	2	2	+	-	-	3,32	41,93
	78	K	1	3	0	2	2	-	-	-	7,07	37,7
	69	E	3	3	2	2	3	+	-	-	2,66	42,04
	61	K	1	4	1	3	3	+	+	+	21,68	46,83
	65	K	3	4	0	3	2	+	+	+	6,04	47,25
	54	E	2	3	0	3	2	+	-	+	1,54	46,65
	83	K	2	3	1	2	3	+	+	+	55,06	47,41
	65	K	1	3	0	2	2	-	-	-	13,94	47,8
	60	K	1	3	1	3	3	+	-	-	59,35	44,95
	71	E	3	3	1	3	3	+	-	+	4,27	52,9
	64	E	2	3	2	2	3	+	-	-	422,3	46,5
	58	E	1	3	0	3	2	-	-	-	11,43	34,7

Tablo 1: Elde edilen sonuçların tablosu.

6. TARTIŞMA :

Kolorektal kanserler de gerek ameliyat öncesinde gerekse de ameliyat sonrasında bakılan birçok parametre hastalığın gidişatı ve beklentileri hakkında bilgi vermektedir.

Özellikle neoadjuvan tedavi verilmesi bu kanserlerin bazı alt gruplarının tedavilerinde önemli olmaktadır.⁵³

Çalışmaya katılan hastaların cinsiyete göre dağılımına baktığımızda 14'ü erkek (%46.7) ve 16'sı kadın (%53.3) ve yaş dağılımlarına bakıldığında ise yaş ortalamaları 66.37 (± 10.32) olarak saptandı. Bu değerler genel olarak literatürde kadın; erkek oranı açısından ve yaş dağılımı açısından benzer özellikler taşımaktadır.

Kolorektal kanserli hastalarda preoperatif olarak bakılan Karsinoembriyonik antijenin (CEA) hastalığın resektabilitesi ve evresi ile ilgili preoperatif ön bilgi verdiği bilinmektedir.²⁷ Ancak bizim prospektif randomize olarak yürüttüğümüz çalışmamızda kendi hasta popülasyonumuzda hastalığın TNM Evre'si, grad'ı ve diğer klinikopatolojik değişkenler ile CEA arasında herhangi bir anlamlılık saptanamamıştır. ($p = 0.60$) Bu farklılığa hastanemizin çalışmaya uygun hasta sayısının az olmasından dolayı; grubumuzda bulunan hasta sayısının homojen olarak dağılmamasının (CEA: 1.46 $\mu\text{gr/ml}$ ile 422.30 $\mu\text{gr/ml}$) ve takip ettiğimiz hastaların sayısının ($n:30$) azlığının neden olduğunu düşünmekteyiz. Bu değerlerin ancak hasta sayısının daha homojen seçildiği ve grupların hasta sayılarının daha fazla olması ile literatür'ü destekleyecek düzeye gelmesini beklemekteyiz.

Histolojik olarak derecelendirme (grade) adenokarsinomların bez yapıların varlığı temel alınarak yapılmaktadır.^{56 57 60 61} Grad prognostik değer olarak da kullanılmaktadır.⁵⁷ Bizim çalışmamızda da grad ile tümör'ün statüsü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki ortaya çıkmıştır ($p = 0.010$). Bu durum da literatür'ü desteklemektedir. Histopatolojik değerlendirmede perinöral invazyon patolojik evreleme için gerekli diğer önemli kriterdir. Literatür'e bakıldığında evre arttıkça perinöral invazyon görülme oranının arttığı ve kanserin bölgesel tekrarının arttığı gösterilmiştir.^{57 63} Sonuçlarımıza bakıldığında perinöral invazyon ile tümör'ün grad'ı arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0.043$) bir ilişki olduğu görülmektedir. Aynı zamanda lenfatik invazyon ile perinöral invazyon arasında ($p = 0.006$); lenfatik invazyon ile vasküler invazyon arasında ($p = 0.034$) da anlamlı bir ilişki olduğu görülmektedir.

AJCC ve UICC tarafından geliştirilmiş olan TNM klassifikasyonu tercih edilen evreleme sistemidir. Bu sistemde tümörün penetrasyon derinliği (T), mesenterik nodların bulunup bulunmaması ve sayısı (N), ve uzak metastaz varlığı (M) hesaplamaya katılmaktadır.

⁵¹ Patolojik evreleme cerrahi eksplorasyondan ve spesimenin değerlendirilmesi ile TNM

sistemine göre yapılır. AJCC evreleme (2002) sisteminde evreler duvara penetrasyon, lenfnodu tutulumu göz önüne alınarak altgruplara ayrılmıştır. Bu altgruplarda da sağkalım da farklılıklar olduğu gösterilmiştir.⁵³ Lenfatik invazyonun derecesi ve vasküler invazyonun varlığı TNM evreleme sistemine önemli eklerdir.^{54 55} Bizde çalışmamızda benzer sonuçlara ulaştık.

Proliferasyon indeksi tümörün saldırganlığı ve yayılıma ne kadar yatkın olduğunun belirteci olarak kullanılmaktadır. Patolojik olarak tümör hücresinin proliferasyon miktarının değerlendirilmesi de tümörün davranış paternini bize gösteren değerlerdendir.^{64 65} Çoğu retrospektif çalışmada proliferasyon miktarının tümörün davranışı açısından bize bilgi verdiği ortaya konulmuştur.^{16 17 18} Kolorektal kanserde yüksek PI değerleri ile kötü prognostik değişkenler arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Yüksek PI değerlerinin çeşitli tümörlerin invazyon derinliği, lenf-nodu metastazı ve uzak metastaz ile beraber olduğu çeşitli retrospektif yapılmış çalışmalarla gösterilmiştir. Kolorektal kanserlerin patolojik karakteri olarakta PI ile tümörün diferansiyasyonu, metastatik olması ve lokal invazif olması arasında ilişkiler gösterilmiştir; PI değeri arttıkça tümörün penetrasyon derinliği, lenf nodu metastazı yapma sıklığı ve uzak metastaz yapma sıklığı arasında anlamlı bir ilişki bulunduğu literatürde birçok çalışmada gösterilmiştir.^{19 20 21 22} Proliferasyon markırları (PI) ile kolorektal kanserlerin prognozu arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalarda literatürde bulunmaktadır.^{23 24 25} Bizim çalışmamızda da literatüre benzer olarak hastalığın TNM Evresi ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki ($p = 0.015$) saptanmıştır. Bu literatüre ek bilgi olarak PI değeri ile tümörün histopatolojik olarak lenfatik invazyonu arasında da istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.044$) bir ilişki saptanmıştır.

Tüm bu bulgular beraber olarak incelendiğinde literatürde bu az çalışılmış ve az sayıda yayın yapılmış olan; kolorektal kanserlerin yüksek PI değerleri ile kötü patolojik bulguların birlikteliği konusunda anlamlı bir ilişki olduğu görülmektedir. Bu bulgular literatürde daha önceden yapılmış olunan çalışmalarla da beraberlik göstermektedir.^{19 20 21 22}

DNA hasarı ve onarımı açısından (Comet Assay) bakıldığında literatürde bu konuda genotoksisite ile çok çalışma olduğu görülmektedir. Challenge tekniği mutajenite testleri ile beraber biyogösterge olarak yoğun biçimde kullanılmaktadır.^{88 89 90} Biz çalışmamızda kolorektal kanserli olguların DNA onarım kapasitelerine bakılarak bu onarım miktarı ile klinikopatolojik faktörler arasında öngörülebilir bir ilişki olup olmadığına baktık. Diğer tüm parametreler ile karşılaştırıldığında DNA onarım kapasitesi ile lenfatik invazyon arasında

anlamli ($p=0.026$) bir iliski olduğu saptanildi. Literatürle karşılaştırıldığında hasta popülasyonumuzun ve dağılımının homojen olmaması ve azlığından diğer parametrelerde anlamlılık saptanılmadığını düşünüyoruz.

Tüm dünyada majör bir halk sağlığı problemi olan kolorektal kanserlerin ameliyat öncesinde evrele aşamasında tedaviye yön veren diğer tektiller içine bu genetik parametreyi eklemek amacıyla yapılmış olan bu çalışma hasta sayısı arttırılarak devam ettirilmektedir. Özellikle yeterli sayıda alt gruplar saptanıldığında eğer anlamlı sonuçlar arttırılabilirse rektum kanseri gibi ameliyat öncesinde neoadjuvan tedavinin önemli olduğu gruplar için öngörü açısından faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR :

¹ Göral V: Kolorektal kanser taramasında algoritma. Güncel Gastroenteroloji, 6: 103-109, 2002.

² 2004 KSDB verileri; www.saglik.gov.tr

³ Erarslan E, Türkay C: Kolorektal kanser etyolojisi ve predispozan faktörler. Güncel Gastroenteroloji, 11: 19-26, 2007.

⁴ Polat MH, Caner M: Kolon kanserli hastalarda dermatogliflik bulgular. Ege Tıp Dergisi, 39: 39-44, 2000.

⁵ Muto T, Bussey HJ, Morson BC: The evolution of cancer of the colon and rectum. Cancer 36:2251,1975

⁶ Ellidokuz E, Kundak I, Akpınar H, Okan A, Bektaşer C, Füzün M, Tankurt E, Şimşek İ, Gönen Ö: Kolorektal polip ve kanser lokalizasyonu arasındaki ilişki. Kocatepe Tıp Dergisi, 1: 47-51, 2003.

⁷ Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61:759, 1990.

⁸ Kıyıcı M: Kolorektal kanser kemoprevansiyonunda ursodeoksikolik asit. Güncel Gastroenteroloji, 10(1): 53-63, 2006.

⁹ Foulkes WD, Bolduc N, Lambert D, Ginsburg O, Olien L, Yandell DW, Tonin PN, Narod SA: Increased incidence of cancer in first degree relatives of women with double primary carcinomas of the breast and colon. J. Med. Genet., 33: 534-539, 1996.

¹⁰ Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger C, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. N. Engl. J. Med., 319: 525-532, 1988.

¹¹ Dukes C: The classification of cancer of the rectum. J Pathol. Bacteriol 34:323, 1932.

¹² AJCC Cancer Staging Manual, 6th ed. Greene F, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Eds. Springer Verlag New York, Inc, New York, 2002.

¹³ Greene FL, Stewart AK, Norton HJ: A New TNM staging for node-positive (stage 3) colon cancer: An analysis of 50,042 patients. Ann Surg 236:416,2002.

-
- ¹⁴ Van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* . 51: 716–724, 1998.
- ¹⁵ Hall PA, Richards MA, Gregory WM, d’Ardenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG. The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin’s lymphoma. *J Pathol* .;154: 223–235, 1988.
- ¹⁶ Ramires M, David L, Leitaó D, Seixas M, Sansonetty F, Sobrinho-Simoes M. Ki67 labelling index in gastric carcinomas. An immunohistochemical study using double staining for the evaluation of the proliferative activity of diffuse-type carcinomas. *J Pathol*; 182: 62–67, 1997.
- ¹⁷ Hoos A, Stojadinovic A, Mastorides S, Urist MJ, Polsky D, Di Como CJ et al. High Ki-67 proliferative index predicts disease specific survival in patients with high-risk soft tissue sarcomas. *Cancer* 2001; 92: 869–874
- ¹⁸ Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002; 40: 2–11.
- ¹⁹ Porschen R, Kriegel A, Langen C, Classen S, Hilse M, Lohe B et al. Assessment of proliferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining. *Int J Cancer* 1991; 47: 686–691
- ²⁰ Kubota Y, Petras RE, Easley KA, Bauer TW, Tubbs RR, Fazio VW. Ki-67-determined growth fraction versus Standard staging and grading parameters in colorectal carcinoma. A multivariate analysis. *Cancer*; 70: 2602–2609, 1992.
- ²¹ Diebold J, Dopfer K, Lai M, Lohrs U. Comparison of different monoclonal antibodies for the immunohistochemical assessment of cell proliferation in routine colorectal biopsy specimens. *Scand J Gastroenterol*; 29: 47–53, 1994.
- ²² Kyzer S, Gordon PH. Determination of proliferative activity in colorectal carcinoma using monoclonal antibody Ki67. *Dis Colon Rectum*; 40: 322–325, 1997.
- ²³ Shepherd NA, Richman PI, England J. Ki-67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J Pathol*; 155: 213–219, 1988.

-
- ²⁴ Suzuki H, Matsumoto K, Terabe M. Ki-67 antibody labeling index in colorectal carcinoma. *J Clin Gastroenterol*; 15: 317–320, 1992.
- ²⁵ Saleh HA, Jackson H, Khatib G, Banerjee M. Correlation of bcl-2 oncoprotein immunohistochemical expression with proliferation index and histopathologic parameters in colorectal neoplasia. *Pathol Oncol Res*; 5: 273–279, 1999.
- ²⁶ Valera V., Yokoyama N., Walter B., Okamoto H., Suda T., Hatakeyama K.. *British Journal of Surgery*; 92: 1002–1007, 2005.
- ²⁷ Marchena J, Acosta MA, Garcia-Anguiano F : Use of the preoperative levels of CEA in patients with colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 50:1017, 2003.
- ²⁸ Wogan GN, Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention: recent progress and avenues for future research. *Environ. Health Perspect.*, 98: 167-178, 1992.
- ²⁹ Norppa H, Bonassi S, Hansteen I-L, Hagmard L, Strömberg U, Ossner PR, Boffetta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Fabianová E, Sram RJ, Knudsen LE, Barale R, Fucic A, Chromosomal aberrations and scars as biomarkers of cancer risk. *Mutat. Res.*, 600: 37–45, 2006.
- ³⁰ Rossner P, Boffetta P, Ceppi M, Bonassi S, Smerhovsky Z, Landa K, Juzova D, Sram RJ: Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ. Health Perspect.*, 113: 517–520, 2005.
- ³¹ Albertini RJ, Nicklas JA, O'Neill JP: Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environ. Health Perspect.*, 104(3): 503-510, 1996.
- ³² Baltaci V, Sardas S, Aytac B, Cakar S, Karakaya AE. Assessment of cytogenetic aberrations and comet assay in colorectal adenocarcinomas. *Tumori.*, 89: 305-310, 2003.
- ³³ Gebhart E, Romahn R, Schneider A, Hoffmann M, Rau D, Tittelbachl H, Cytogenetic studies in lymphocytes of patients with rectal cancer. *Environ. Health Perspect.*, Suppl., 101(3): 169–175, 1993.

-
- ³⁴ Bardi G, Sukhikh T, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S: Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 12(2): 97-109, 1995.
- ³⁵ Bardi G, Johansson B, Pandis N, Bak-Jensen E, Orndal C, Heim S, Mandahl N, Andréén-Sandberg A, Mitelman F: Cytogenetic aberrations in colorectal adenocarcinomas and their correlation with clinicopathologic features. *Cancer*, 71: 306-314, 1993.
- ³⁶ Pirc-Danoewinata H, Bull JP, Okamoto I, Karner J, Breiteneder S, Liebhardt A, Budinsky A, Marosi C: Cytogenetic findings in colorectal cancer mirror multistep evolution of colorectal cancer, *Wien. Klin. Wochenschr.*, 108: 752-758, 1996.
- ³⁷ Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C: The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, 3: 695-701, 2003
- ³⁸ Stewen Nius Y, Gorunova L, Jonson T, Larsson N, Höglund M, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F, Gisselsson D: Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *PNAS.*, 102(15): 5541-5546, 2005.
- ³⁹ Jemal A, Tiwari RC, Murray T : Cancer statistics, 2004. *CA cancer J Clin* 54:8, 2004.
- ⁴⁰ Redaelli A, Cranor CW, Okano GJ : Screening, prevention and socioeconomic costs associated with the treatment of colorectal cancer. *pharmacoeconomics* 21:1213, 2003.
- ⁴¹ Ahnen DJ: Genetics of colon cancer. *West J. Med.*, 154: 700-705, 1991.
- ⁴² Sugimura T, Terada M, Yokota J, Hirohashi S, Wakabayashi K: Multiple genetic alterations in human carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, 98: 5-12, 1992.
- ⁴³ Renkonen E, Lohi H, Järvinen HJ, Mecklin J-P, Peltomäki P: Novel splicing associations of hereditary colon cancer related dna mismatch repair gene mutations. *J. Med. Genet.*, 41:1-6, 2004.
- ⁴⁴ Houlston RS: What we could do now: Molecular pathology of colorectal cancer. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.*, 54: 206-214, 2001.

-
- ⁴⁵ Deveci ŞD, Yüce H, Etem E, Doğru O, Özeran İ: Kolorektal kanserlerdeki kromozomal değişikliklerin tespiti. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi, 18: 175-180, 2004.
- ⁴⁶ Peltomaki P: DNA mismatch repair gene mutations in human cancer, Environ. Health Perspect., 105(4): 775–780, 1997.
- ⁴⁷ Herman JG, Umar A, Polyak K, et al: Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 95: 6870, 1998.
- ⁴⁸ Slattery ML, Levin TR, Ma K : Family history and colorectal cancer: predictors of risk. Cancer Causes Control 14:879, 2003.
- ⁴⁹ Johns LE, Houlston RS: A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. Am J Gastroenterol 96:2992, 2001.
- ⁵⁰ Majumdar SA, Fletcher RH, Evans AT: How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. Am J Gastroenterol 94:3039, 1999.
- ⁵¹ AJCC Cancer Staging Manual, 6th ed. Greene F, Page DL, Fleming ID. Eds. Springer Verlag New York, Inc, New York, 2002.
- ⁵² Delbeke D, Martin WH: PET and PET-CT for evaluation of colorectal carcinoma. Semin Nucl Med 34:209, 2004.
- ⁵³ Greene FL, Stewart AK, Norton HJ; A New TNM staging for node-positive (stage 3) colon cancer: An analysis of 50,042 patients. Ann Surg 236:416, 2002
- ⁵⁴ AJCC Cancer Staging Manual, 6th ed. Greene F, Page DL, Fleming ID, et al., Eds. Springer Verlag New York, Inc, New York, 2002.
- ⁵⁵ Saha S, Dan AG, Bilchik AJ, et al: Historical review of lymphatic mapping in gastrointestinal malignancies. Ann Surg Oncol 11(3 suppl):245S, 2004.
- ⁵⁶ Rosai J. Gastrointestinal tract. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, Volume 1. 9th ed. Mosby, 776 855, 2004.

-
- ⁵⁷ Fenoglio- Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Listrom MB, Rilke FO. Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine. In: Gastrointestinal pathology an atlas and text. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers,,: 909-1068, 1999.
- ⁵⁸ Mahapatra AK. 2008 Staging of colorectal cancers. In: On-line seminars and tutorials. <http://www.sgpqi.ac.in/path/seminars/ccastage.html>
- ⁵⁹ Haber MH, Gattuso P, Spitz DJ, David O. Gastrointestinal System. In: Differential diagnosis in surgical pathology. W.B. Saunders Company,,: 105-202, 2002.
- ⁶⁰ Silverberg SG, De Lellis RA, Frable WJ, Li Volsi VA, Wick MR. Neoplastic diseases of the small and large intestines. In: Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology, Volume 2. 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier,,: 1419-1464, 2006.
- ⁶¹ Mills SE, Carter D, Reuter V, Greenson JK, Stoler MH, Oberman HA. Intestinal neoplasms. In: Stenberg's Diagnostic Surgical Pathology, Volume 2. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 1543- 1601, 2004.
- ⁶² Christine A. Iacobuzio-D., Elizabeth M. Epithelial neoplasms of the colorectum. In: Gastrointestinal and Liver Pathology. Churchill Livingstone Elsevier:367-394, 2005.
- ⁶³ Kumar V, Abbas AK, Fausto N. The gastrointestinal tract. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7 th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Company: 857-869, 2005.
- ⁶⁴ Van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. J Clin Pathol; 51: 716–724, 1998.
- ⁶⁵ Hall PA, Richards MA, Gregory WM, d'Ardenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG. The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. J Pathol;154: 223–235, 1988.

-
- ⁶⁶ Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*; 31: 13-20, 1983.
- ⁶⁷ Schwarting R. Little missed markers and Ki-67. *Laboratory Investigation*; 68:597-599, 1993.
- ⁶⁸ Rosai J. Special techniques in surgical pathology. In: Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology*, Volume 1. 9th ed. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto. Mosby 37-91, 2004.
- ⁶⁹ Kramer PJ. Genetic Toxicology. *J Pharm Pharmacol*; 50: 395-405, 1998.
- ⁷⁰ Jena B, Kaul CL, Ramarao P. Genotoxicity Testing, a Regulatory Requirement For drug Discovery and Development: Impact of ICH Guidelines. *Indian Journal of Pharmacology*; 34: 86-99, 2002.
- ⁷¹ Rydberg ve Johanson, Radiation-induced DNA strand breaks and their rejoining in crypt and villous cells of the small intestine of the mouse. *Radiat Res*. 1975 Nov;64(2):281-92. 1978.
- ⁷² Ostling O, Johanson KJ., Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 30;123(1):291-298, 1984.
- ⁷³ Olive PL, DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.* , 75, 395-405, 1999.
- ⁷⁴ Ahnstrom G, Erixon K. Radiation induced strand beakage in DNA from mammalian cells. *Int J Radiat Biol*; 23: 285-289, 1973.
- ⁷⁵ Birnboim HC. Fluorometric analysis of DNA unwinding to study strand breaks and repair in mammalian cells. *Methods Enzymol*; 186: 550-555, 1990.
- ⁷⁶ Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.*, 175(1):184-191. 1988.

-
- ⁷⁷ Faust F., Kassie F., Knasmüller S., Boedeker R.H., Mann M., Mersch-Sundermann V., The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.*, 566, 209-229, 2004.
- ⁷⁸ Collins AR, The Comet Assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol. Biol.*, 203, 163-177
- ⁷⁹ Møller P, The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 98, 336-345, 2006.
- ⁸⁰ Tice RR, Agurell E, Anderson D, and Burlinson B, Hartman A, Kobayashi H. Single Cell Gel/ Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Mutation Research*; 35: 206-221, 2000.
- ⁸¹ Au W.W., Oberheitmann B., Heo M.Y., Hoffmann W., Oh H.Y., Biomarker monitoring for health risk based on sensitivity to environmental mutagens. *Rev. Environ. Health*, 16, 41-64, 2001.
- ⁸² Perera F.P.: Molecular Epidemiology: On the Path to Prevention?, *J.Natl.Cancer Inst.*, 92,602-612, 2000.
- ⁸³ Oberheitmann B., Schafer J., Dally H., Garms A., Frentzel-Beyme R., Hoffmann W., The chromosome-based challenge assay using fluorescence in situ hybridization: a possible test for increased cancer susceptibility, *Mutation Research*, 428, 157-164, 1999.
- ⁸⁴ Au W.W., Wilkinson G.S., Tying S.K., Legator M.S., El-Zein R., Hallberg L., Heo M.Y., Monitoring populations for DNA repair deficiency and for cancer susceptibility, *Environmental Health Perspectives*, 104, 579-584, 1996.
- ⁸⁵ He J.L., Chen W.L., Jin L.F., Jin H.Y., Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation, *Mutat. Res.*, 223-231, 2000.
- ⁸⁶ Portier C.J., Bell D.A., Genetic susceptibility: significance in risk assessment, *Toxicology Letters*, 102-103, 185-189, 1998.

-
- ⁸⁷ Cebulska-Wasilewska A., Response to challenging dose of X-rays as a predictive assay for molecular epidemiology, *Mutat. Res.*, 544, 289-297, 2003.
- ⁸⁸ Baltacı V., Şardaş S., Aytaç B., Çakar S., Karakaya A.E. Assessment of cytogenetic aberrations and comet assay in colorectal cancer. *Tumori.*, 89:305-320-, 2003.
- ⁸⁹ Gebhart E., Romahn R, Schneider A, Hoffman M, Rau D, Tittelbachl H, Cytogenetic studies in lymphocytes of patients with rectal cancer. *Environ. Health Perspect.*, Suppl., 101(3):169-175, 1993.
- ⁹⁰ Bardi G, Johansson B, Pandis N, Bak-jensen E, Orndal C, Heim S, Mandahl N, Andren-Sandberg A, Mitelman F: Cytogenetic aberrations in colorectal adenocarcinomas and their correlation with clinicopathologic features. *Cancer*, 71:306-314, 1993.