

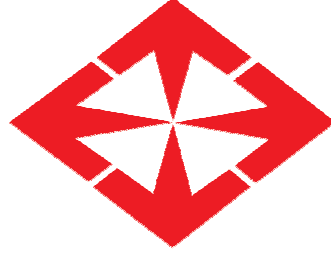
**T.C.  
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADENOM ZEMİNİNDE KOLOREKTAL KARSİNOM  
GELİŞİMİNDE ETKİLENEN YOLAKLAR  
NELERDİR?**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Serap TORU**

**Ankara, 2007**



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

**ADENOM ZEMİNİNDE KOLOREKTAL KARSİNOM  
GELİŞİMİNDE ETKİLENEN YOLAKLAR  
NELERDİR?**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Serap TORU**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Banu BİLEZİKÇİ**

**Ankara, 2007**

25.07.2006 tarih ve K06/96 sayı

**Bu tez çalışması Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından  
desteklenmiştir.**

## ÖNSÖZ

27 Mayıs 2003 tarihinde tanıştım patolojiyle diyebilirim. Hiç aklımda yoktu Patoloji ailesine katılmak, bir süre kararsızlıklar yaşadım. Cesaret gerektiren bir alan olduğunu fark etmiştim.

Bu duygularımı Sayın Hocam Prof. Dr. Beyhan Demirhan ile paylaştım ve ben tekrar TUS'a girmek istediğimi, patolojiyi sevdiğimi ancak çok zor geldiğini söyledim. Hiç unutmuyorum Beyhan Hoca bana "Serapcım elbette sınava girebilirsin, benimle paylaştığın için teşekkür ederim. Ama içimden bir his senin bizimle kalacağını ve iyi bir patolog olacağını söylüyor." dedi. O zaman fark etmemiştim ama sanırım ben o zaman patolog olmak için cesaretlenmişim. Bana bu cesareti verdiği için ve tüm emekleri için Prof. Dr. Beyhan Demirhan'a çok teşekkür ediyorum.

Başkent Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyeleri: Prof Dr. Bülent Celasun, Doç Dr. Banu Bilezikçi, Doç Dr. Handan Özdemir, Yrd. Doç Dr. Ünser Arıkan, Yrd. Doç Dr. Özlem Özen, Öğr. Gör. Nihan Haberal'a, şu anda Başkent Üniversitesi'nde olmayan ancak bir dönem birlikte çalıştığımız Uzm. Dr. Hakan Aydın'a, asistanlık ve kısmen uzmanlığını birlikte geçirdiğimiz Uzm. Dr. Pınar Uyar'a bana kazandırdıkları için teşekkür ediyorum.

Ayrıca istatistiksel değerlendirmede çok büyük destek ve yardımları, ayrıca büyük sabrı için Uzm. Dr. Coşkun Bakar'a çok teşekkür ediyorum.

Ayrıca bu yola birlikte başladığımız sevgili arkadaşlarım Dr. Dinç Süren ve Dr. Aydan Kılıçarslan ile çok şey paylaştık. Yürümeği öğrenen çocuklar gibi düşme kalka, düştüğümüzde birimiz ağlarken diğeri elinden tuttu. Ağlamayı bırakıp ayağa kalkıp tekrar denedik. Sanırım başardık arkadaşlar, her şey için, bana destekleriniz için çok teşekkür ediyorum.

Sonradan aramıza katılan ve kısa sürede sıcak arkadaşlıklar kurduğumuz Dr. Alper Koçbıyık, Dr. Müge Yılmaz, Dr. Aysel Çolak'a teşekkür ederim. Ayrıca en son aramıza katılan Dr. Gülnur Güven ve Dr. Berrin Çaylak ile kısa süre de olsa geçirdiğimiz güzel günler ve paylaşımlarımız için teşekkür ediyorum.

Ayrıca Patoloji Anabilim Dalı'nın sekreterlerine, teknisyenlerine ve personeline teşekkür ediyorum. İmmünohistokimyasal boyamalarda gösterdiği özveri için teknisyenimiz Büşra Okursoy'a ayrıca teşekkür ediyorum.

Birini anlatmak, dostum diyebildiğimi.....

Sevgili Dr. Ruhsen Öncel ve Dr. Müge Yılmaz sizi nasıl anlatabilirim bilmiyorum, en kötü zamanlarda hep yanımda olduğunuz size sıcak dostluğunuz için çok teşekkür ediyorum.

Sevgili dostlarım Dr. Betül Yardım ve Dr. Esin Ata'ya Üniversite 1. sınıfta başlayan ve sıcaklığını hiç kaybetmeyen kardeşçe destekleri için çok teşekkür ediyorum.

Ve tez zamanı geldi. Sevgili tez danışmanım Doç Dr. Banu Bilezikçi; zor günlerimde yanımda olduğunuz gibi tez dönemini de en az endişe ve sıkıntı ile geçirmemi sağladınız. Sıcaklığınız ve bilimsel desteğiniz yanı sıra şefkatiniz için de size çok teşekkür ediyorum. Mikroskop başında sadece tanıya yaklaşımı değil insana insanca yaklaşmayı da öğrettiniz bana. Sizi her düşündüğümde sıcacık bir şeyler hissedeceğim sizden yana....

Ve biricik ailem Halide Toru, Durali Toru ve Tuba Toru;

Her zaman bana destek olup hiç yalnız bırakmadınız. Beni ayakları yere basan ve güçlü bir insan olarak yetiştirdiğiniz için, şefkatinizi, desteğinizi ve bana olan inancınızı hep koruduğunuz için anneciğim ve babacığım size çok teşekkür ediyorum. Hayatıma girdiğinde ilk önce bana paylaşmayı öğreten, küçüklerin de neler yapabileceğini, inançla her şeyin üstesinden gelinebileceğini bana gösteren biricik kardeşim Tuba'ya en iyi dostum olup bana gösterdiği tüm destek ve yardım için çok teşekkür ediyorum.

Ve şu dizeleri tüm okuyucularla paylaşmak istiyorum. Umut olduğu sürece yaşam devam eder.....

## **MUTLULUĐA DOĞRU**

Gün dođacak

Benim sıkıntılarım da dağılacak

Karanlıklar arasında kaldım

Bana bir el uzanıyor

Nurdan

Kalbime dokunuyor

Yumuşacık ve şefkatli

Damarlarımda kanın akışını hissediyorum

Dağların arkasından doğan güneş

Ağaçların yapraklarını yıka

Bugün ben bir başkayım

Ne olur billur suları da yıka

Melek yüzlüm bırak saçlarını

Bırak, dalgalansın rüzgarda

Bırak, güneş senin saçlarını da yıkasın

**Serap TORU**

# İÇİNDEKİLER

**Sayfa No:**

<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>GİRİŞ-AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİ</b> .....	<b>3</b>
<b>GEREÇ-YÖNTEM</b> .....	<b>9</b>
<b>BULGULAR</b> .....	<b>15</b>
<b>TARTIŞMA</b> .....	<b>24</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>28</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>29</b>

## GİRİŞ-AMAÇ

Kolon karsinomu gelişmiş ülkelerde en sık görülen tümörlerden biridir. Zamanla değişen yemek alışkanlığı nedeniyle ülkemizde de oldukça yaygınlaşmıştır. Kolorektal karsinom gelişimi hücre büyümesinde, farklılaşmasında ve apoptozda bozulmalara yol açan genetik değişikliklerin hepsinin birikimiyle olmaktadır (1).

Adenomlar ise maligniteye dönüşebilen benign poliplerdir. Ancak çoğu adenomlar karsinoma dönüşmemektedir. Bu nedenle adenomların karsinomlara dönüşümünü etkileyen ek değişiklikler olmalıdır. Ki-67 bir proliferasyon belirteci olup immünohistokimyasal olarak özellikle yüksek dereceli displazi içeren adenomlarda dışavurumu artmaktadır (2).

Kolon adenokarsinomlarında morfoloji dışında bir çok immünohistokimyasal belirteç ile prognoz arasında ilişki kurulmaya çalışılmıştır. Örneğin "E-cadherin" dışavurumunda azalmanın olduğu olgularda metastaz olasılığının arttığı (3) ve bcl-2 dışavurumunun artmasının kolonik karsinogenezde erken dönemde uyarıcı özelliklerden biri olduğu bildirilmiştir (4).

Kolon adenokarsinomlarının "Human papilloma" Virus (HPV) ile ilişkisi üzerine birçok çalışma yapılmış ve özellikle yüksek risk grubu HPV tipleri, kolorektal adenokarsinomlarda daha yüksek oranda tespit edilmiştir (5-12).

Bu çalışmanın amacı, kolorektal adenokarsinomların öncü lezyonlarından tübüler ve villöz adenomlarda HPV etkisini, p53, c-erb B2 (Her-2/neu), "E-cadherin", bcl-2 ile siklin D1 dışavurumunu, Ki-67 proliferasyon indeksini araştırmak ayrıca bu değerlerin polibin tipi, hastanın yaşı ile ilişkisini normal kolon mukozası ile karşılaştırarak ortaya koymaktır.



## GENEL BİLGİ

### Kolon polipleri:

Kolon ve rektumun benign tümörleri genel olarak polip olarak bilinirler. Polipler yaşlılarda oldukça sık görülmektedir.

Polipler neoplastik ve neoplastik olmayan şeklinde 2 gruba ayrılmaktadır. Neoplastik olmayanlar; hiperplastik polipler ve hamartomatöz polipler (juvenil polip, Peutz-Jegers polipleri)'dir. Neoplastik olanlar ise adenomatöz polip olarak adlandırılırlar. Adenomatöz polipler 40 yaş öncesinde %20-30 oranında görülürken 60 yaş sonrasında bu oran %40-50'lere yükselmektedir. Kadın erkek oranı eşittir.

Küçük, sapsız lezyonlar olarak başlamakta ve lümene doğru büyüyen kitleler halini almaktadır.

Epitelyal yapılarına göre adenomatöz polipler tübüler, villöz ve tübülovillöz olmak üzere 3 gruba ayrılır.

Tübüler adenomların yaklaşık %90'ı kolonda bulunur ancak az oranda mide ve ince bağırsakta da görülebilir. Kolondaki tübüler adenomların %40'ı sağ kolon, %40'ı sol kolon, %20'si rektumda bulunmaktadır. Poliplerin çoğu asemptomatiktir. Makroskopik olarak genellikle 1 cm'nin altında olup küçük tübüler adenomlar düzgün kontürlü ve sessil olma eğiliminde iken daha büyük olanlar sıklıkla lobülerdir ve sap içermektedir (13).

Mikroskopik olarak glandlarda kalabalıklaşma, epitelde katlanma artışı izlenmektedir. Bu lezyonlar iri, hiperkromatik nükleuslu, polarite kaybı gösteren displastik epitel ile

örtülüdür. Epitel müsin içerebilir ya da içermez. Genellikle düşük dereceli displazi göstermekte olup lamina propriyadan keskin sınır ile ayrılmaktadır. Bazen yüksek dereceli displazi ve yer yer mukozada sınırlı malign değişiklikler (intramukozal karsinom) içerebilmektedir. Histolojik olarak sap fibromüsküler doku ve belirgin kan damarlarından oluşur ve sıklıkla normal mukoza ile örtülüdür. Bazen adenomatöz epitel sapa kadar ilerleyebilir.

Villöz adenomlar daha büyük poliplerdir. Tübüler adenoma göre daha az görülmektedir. Daha yaşlı hastalarda görülme eğiliminde olup sıklıkla rektum ve rektosigmoid bölgede izlenmektedir. Olgular genellikle rektum ya da rektosigmoid bölgede kitle etkisi ile, bazen de su-elektrolit kaybı ile gelebilmektedir. Tübüler adenomlara göre daha yüksek oranda malign değişim göstermekte ve bu oran %29 ila %70 arasında değişmektedir.

Makroskopik olarak genellikle sesil ve kadifemsi görünümündedir. Çapı 10 cm'e kadar ulaşabilmektedir. Bazen çevre mukozadan 1-3 cm kabarıklık gösteren karnıbahar benzeri görünüm oluşturabilmektedir.

Mikroskopik olarak yapraksı, parmaksı uzanımlar göstermekte olup normal kolon mukozasının iki katı kalınlığa ulaşmaktadır. Yüzey değişen derecelerde displazi gösteren glandüler epitel ile döşenmektedir. Bazen invaziv karsinom da izlenir. Tübülovillöz adenomlar ise tübüler ve villöz adenomların arasında bir lezyondur. Saplı ya da sesil olabilir. (13-15)

En sık görülen adenomlar tübüler adenomlardır. Bir çok çalışmada adenomların %68-87.1 kadarını tübüler adenomların oluşturduğu bildirilmiştir. Otopsi çalışmalarında 1cm'nin altındaki adenomların yaklaşık %88.8'inin tübüler büyüme paterni gösterdiği saptanmıştır. Tübüler adenomlarda başlangıçta orijinal kript yapısı korunur, sadece epitel adenomatöz

niteliktedir. Lamina propriyada lenfosit, plazma hücresi ve eozinofil lökositler artmış olarak görülebilmektedir. Adenomatöz glandlar büyüdüğünde dallanma, düzensiz yapılanma gösterebilmektedir. Neoplastik yüzey epiteli Ki-67 kuvvetli reaksiyon gösterirken, neoplastik olmayan kript tabanı epiteli zayıf boyanma göstermektedir. Villöz adenomların 1/3'ünde orta-ciddi displazi görülür ve %1.75'inde invaziv karsinom saptanmaktadır. Villöz adenomlar uzun, dallanma göstermeyen parmaklı yapılardan oluşmaktadır. Lamina propriyanın oluşturduğu papiller kor tek sıralı adenomatöz epitel ile örtülüdür. Konishi ve Morson %80 ve daha fazla villöz komponent içeren adenomları villöz adenom olarak adlandırmışlardır. Tübülovillöz adenomlar ise tübüler ve villöz büyüme paterni içeren lezyonlardır. Konishi ve Morson %20-%79 arasında villöz komponent içeren adenomları tübülovillöz adenomlar olarak adlandırmışlardır. Fung ve Goldman ise %35-%75 arasında villöz komponent içeren ve 1 cm'den büyük olan adenomları tübülovillöz adenom olarak adlandırmışlardır. Adenomalar karışık hücre popülasyonuna sahiptir. Değişik farklılaşma gösteren absorbtif hücreler, goblet hücreleri, intermediate hücreler, endokrin hücreler ve Paneth hücreleri izlenmektedir. Çoğu adenomlarda hücreler kısmen farklılaşma gösterir ve immatür mukus üreten hücreler olan oligomukus hücreleri adını alır. Adenomatöz epitelin mukus içeriği değişkenlik göstermektedir. Bazen adenomalarda gerçek goblet hücreleri görülebilmektedir. Bu goblet hücreleri nükleusu kenara itilmiş distrofik goblet hücreleri adını alırlar. Villöz adenomlarda çok sayıda mukus üreten hücreler olur bu nedenle potasyum kaybı görülebilmektedir. Adenomların yaklaşık %59-85'inde endokrin hücreler fark edilebilmektedir. Lezyonların yaklaşık %10'unda Paneth hücreleri ve yaklaşık %4'ünde skuamöz metaplazi görülmektedir. Hemotoksilen-eozin ile supranükleer, eozinofilik sitoplazmik granülleri ile kolayca fark edilmektedir. Adenomdaki Paneth hücreleri neoplastik hücrelerdir. Bazı hücreler hem müsinöz, hem de Paneth hücre değişikliği

gösterebilmektedir. Adenomlarda kemik metaplazisi, melanositler ve gastrik mukoza bulunabilmektedir. Çok sayıda değişik hücre tipinin olması kök hücrelerin çok geniş bir çizgide farklılaşma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Adenomlar oluştuğunda altındaki muskularis mukoza parmaklı uzanımlar göstermekte ve glandlar arası stromaya saçaklanmalar göstermektedir. Adenomlarda yalancı invazyon alanları histolojik olarak tanımlanmaktadır. Adenomlarda yalancı invazyon alanları histolojik olarak tanımlanmaktadır. “Siderogenous desmoplasia” diye adlandırılan görünüm invaziv karsinomdan ayırmada oldukça önemli güçlük yaratmaktadır. Yalancı invazyon lehine yorumlanması gereken bulgular; yüzeydeki adenom ile submukozal glandların devamlılığını görmek veya yüzey epitelini ile benzer olmak, neoplastik glandları çevreleyen lamina propriyanın varlığı, hemosiderin birikimi olması, desmoplazi ve sitolojik malign görünümün olmaması, adenomatöz glandlarla normal glandların karışık görülmesi, submukozada glandların lobüler yapıda olması, muskularis mukozanın belirgin disorganizasyon göstermesidir. Genellikle aşağıya yer değiştiren glandlarda kistik dilatasyon, rüptür, epitelde kayıp ya da atrofi görülebilmektedir. Bazen submukozadaki müsinöz materyal kalsifiye olarak müsin sekrete eden adenokarsinomdan ve yalancı invazyon gösteren adenomlardan ayırmada güçlük yaratabilmektedir. Ayrıca adenomlar çoğu kolorektal karsinomların öncü lezyonlarıdır. Erken lezyonlarda yalancı çok katlanma, immatür, hafif displazi gösteren adenomatöz epitel görülmektedir. İnvaziv karsinoma doğru adenomatöz lezyonlarda artan displastik değişiklikler dikkati çekmektedir. Karsinomlar daha çok büyük adenomlardan gelişme eğilimindedir. Tümörün büyüme şekli, lokalizasyonu ve boyutu kalan adenomda invaziv karsinom gelişme olasılığı ile ilişkili 3 önemli etkidir. Adenomlarda histolojik görünüm düşük dereceli displazi, yüksek dereceli displazi, karsinoma in situ, intramukozal karsinom ve invaziv karsinom olarak tanımlanmaktadır. İntraepitelyal karsinom ya da karsinoma in situ olgularında sitolojik olarak malign hücreler görülürken bazal membran ile sınırlıdır. Karsinoma in situ da

belirgin sitolojik atipi, polarite kaybı, solid displastik hücre yuvaları ve distrofik goblet hücreleri izlenmektedir. Eğer neoplastik hücreler bazal membranı geçerek çevre lamina propriyaya ilerlerse lezyon intramukozal karsinom olarak adlandırılmaktadır. İnteramukozal karsinomda daha fazla glandüler düzensizlik ve glandüler yoğunluk saptanmaktadır. Hem intramukozal karsinom hem de karsinoma in situ tamamen çıkarılması durumunda belirgin metastaz potansiyeli olmadığından ek tedaviye gerek yoktur (16).

#### Kolonda karsinogenezde etkilenen yollar:

Siklin D1/cdk4, siklin D1/cdk6 ve siklin E/cdk2 kompleksi hücre siklusunda G1'den S fazına geçişte ana düzenleyicisi olup kolonda Siklin D1 onkogeninin bir çok basamağında önemli rol oynamaktadır (17).

Ayrıca bcl-2 hem p53 bağımlı hem de p53 bağımsız hücre ölümü yolağını durdurmaktadır. P53 protein anormalliklerinde ise hücre siklusundaki büyümenin durması, hatalı DNA'nın onarımı ve apoptozis bozulmaktadır (18).

Bir çok çalışma göstermiştir ki hücre siklusu ile Ki-67 immünreaktivitesi arasında yakın ilişki vardır. Ki-67 dışavurumu hücre siklusunda G1'in orta ve son kısmında başlar, S fazında artış gösterip G2'de maksimum düzeye ulaşmaktadır. Antijen mitozun bitiminden hemen sonra azalmaya başlamaktadır, yarı ömrü yaklaşık 1 saattir. Bu da Ki-67 dışavurumunun hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Son zamanlarda inflamatuvar bağırsak hastalığı olan olgularda Ki-67 dışavurumu değerlendirilmiş, yüksek dereceli displazi olan mukozada Ki-67 proliferasyon indeksinin normal mukozaya göre yüzeyde belirgin olarak artmış olduğu saptanmıştır (19).

Ayrıca kolorektal kanserlerde c-erb B2, p53 dışavurumu özellikle rektal yerleşimli olanlarda tanımlanmış ve c-erb B2, p53 dışavurumu olan olguların %50'sinden fazlasında vasküler invazyon ve lenf nodu metastazı saptanmıştır (20). Başka bir çalışmada c-erb B-2 pozitifliği olan olgularda tümör evresinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (21).

Yapılan çalışmalarda kolorektal adenokarsinomlarda komşu normal mukozaya göre HPV tip 16 daha fazla saptanmıştır (7). Başka çalışmalarda kolorektal karsinomlarda HPV pozitifliği belirgin derecede yüksek bulunurken komşu normal mukozada çok düşük oranda görülmüş, ayrıca normal mukozalı kontrol grubunda ise negatif bulunmuştur (11). Ayrıca adenokarsinom örnekleri ve diğer normal mukoza örneklerinde HPV enfeksiyonuna PCR ile bakıldığında adenokarsinomlarda daha fazla olduğu dikkati çekmiş, ancak klinikopatolojik görünümü ile ilişkisi görülmemiştir (8).

Oral epitelde HPV'nin E6/E7 proteinin c-erb B-2 ile ko-dışavurumu sonucu "E-cadherin"-catenin kompleksini inhibe ve siklin D1 ve c-myc dışavurumu yeniden düzenlenmektedir (22).

Serviks epitelinde HPV E6 proteini ile birlikte p53, bcl-2, bax, siklin D1, Ki-67 değerlendirildiğinde HPV enfeksiyonunda mutant p53 saptanmış, apoptoz azalmış, Ki-67 proliferasyon indeksi artmış olarak görülmüştür (23).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Başkent Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalına 1995 Ocak-2007 Ocak tarihleri arasında gelen ve polip tanısı alan yaklaşık 1000 adet kolonoskopik biyopsi materyali yeniden değerlendirilmiş; adenomatöz polip (grup1) ve villöz adenomdan (grup 2) oluşan 24'erli gruplar oluşturulmuştur. Epitelinde displastik değişiklikler ve belirgin inflamasyon bulunmayan sadece hafif ödem, konjesyon gibi özgül olmayan bulgular gösteren örneklerden 24 normal kolon mukozası da grup 3 olarak adlandırılmıştır. Gruplar oluşturulurken biyopsi materyallerinin çok küçük olmamasına dikkat edilmiş, üzerinde invaziv karsinom ya da in-situ karsinom gelişenler ile inflamatuvar hücreler immünohistokimyasal boyalar ile yanıltıcı reaksiyon verebildiğinden inflamatuvar reaksiyonu belirgin olan örnekler grubun dışında tutulmuştur. Ayrıca çekumdan splenik fleksuraya kadar olan kısım sağ kolon, splenik fleksuradan sonrası da sol kolon olarak kabul edilmiştir (24). Tüm dokular % 10'luk formalinde tesbit edilmiş, daha sonra dehidrate edilerek parafin bloklara gömülmüştür. Her bir bloktan 3µ'luk kesitler hazırlanarak; tüm örneklerde insitu hibridizasyon ile HPV, immünohistokimyasal (İHK) olarak p53, Ki-67, "E-cadherin", c-erbB-2, bcl-2 ve siklin D1 dışavurumu değerlendirilmiştir. Her üç grubun sonuçları birbiri ile karşılaştırılmıştır.

**Ki-67 immünohistokimyası ve değerlendirilmesi:** %10 tamponlu formolde tespit edilip parafin bloklara gömülmüş olan bloklardan 3µ'luk kesitler poly-L-lizin kaplı lamlara alınmıştır. Bu örnekler 56°C'lik etüvde 1 gece, 5'er dakika 2 defa ksilen, 2 defa alkol ile deparafinize edilmiştir. Ardından sitrat buffer ile 20 dakika antijen retrieval yapılmış, oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakılmıştır. Ardından çeşme suyunda yıkanmış, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 15 dakika mumele edildikten sonra Tris Buffered Saline (TBS; PH: 7.6, 50 µmol Tris

HCl/150 µmol NaCl) ile yıkanıp Ki-67 antikoru (SP6- Neomarkers) eklenerek 2.5 saat antikorda bekletilmiştir. Ardından TBS ile yıkanıp 15 dakika biotin, tekrar TBS, sonra 15 dakika avidin, tekrar TBS uygulanmıştır. AEC kromojende 15 dakika bekletildikten sonra çeşme suyu ile yıkanmıştır. 10 saniye Hemotoksilende bekletildikten sonra tekrar çeşme suyu ile yıkanıp 3-amino, 9-ethyl Carbozole (AEC) kromojen jeli ile kapatılmış değerlendirmeye hazır hale getirilmiştir. Işık mikroskopisinde her örnekte yaklaşık 1000 hücre içinde nükleer boyanma gösteren epitel hücreleri sayılarak proliferasyon indeksleri hesaplanmıştır (25).

**p53 immünohistokimyası ve değerlendirilmesi:** %10 tamponlu formolde tespit edilip parafin bloklara gömülmüş olan bloklardan 3µ'luk kesitler poly-L-lizin kaplı lamlara alınmıştır. Bu örnekler 56°C'lik etüvde 1 gece, 5'er dakika 2 defa ksilen, 2 defa alkol ile deparafinize edilmiştir. Ardından sitrat buffer ile 20 dakika antijen retrieval yapılmış, oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakılmıştır. Ardından çeşme suyunda yıkanmış, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 15 dakika muamele edildikten sonra TBS ile yıkanıp p53 antikoru (DO-7; DAKO Cytomation) eklenerek 2.5 saat antikorda bekletilmiştir. Ardından TBS ile yıkanıp 15 dakika biotin, tekrar TBS, sonra 15 dakika avidin, tekrar TBS uygulanmıştır. AEC kromojende 15 dakika bekletildikten sonra çeşme suyu ile yıkanmıştır. 10 saniye Hemotoksilende bekletildikten sonra tekrar çeşme suyu ile yıkanıp AEC kromojen jeli ile kapatılmış değerlendirmeye hazır hale getirilmiştir.

Işık mikroskopisinde epitel hücrelerinde nükleer P53 dışavurumu değerlendirilmiştir. Epitel hücrelerinin %10'nundan azında ise negatif, %10-50 arası 1+, %50'nin üzeri 2+ olarak kabul edilmiştir (26).

**bcl-2 immünohistokimyası ve değerlendirilmesi:** %10 tamponlu formolde fiske edilip parafin bloklara gömülmüş olan bloklarda 3µ kesitler poly-L-lizin kaplı lamlara alınmıştır.



. Bu örnekler 56°C'lik etüvde 1 gece, 5'er dakika 2 defa ksilen, 2 defa alkol ile deparafinize edilmiştir. Deparafinize edilen kesitler mikrodalga fırında 30 dakika yüksek derecede EDTA ile kaynatılmıştır. Oda ısısında 20dakika bekletildikten sonra çeşme suyu ile yıkanmıştır. Ardından 15 dakika H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de bekletildikten sonra TBS ile yıkayıp 2.5 saat bcl-2 antikor (N1587, DAKO)'da bekletilmiştir. Ardından 15 dakika biotin ile muamele dildikten sonra tekrar TBS, ardından 15 dakika avidinde bekledikten sonra tekrar TBS ile yıkanmıştır. AEC kromojende 15 dakika bekletildikten sonra çeşme suyu ile yıkanmıştır. 10 saniye Hemotoksilende bekletildikten sonra tekrar çeşme suyu ile yıkayıp AEC kromojen jeli ile kapatılmış değerlendirmeye hazır hale getirilmiştir.

Örneklerde ışık mikroskopisinde sitoplazmik boyanma değerlendirilmiştir. Eğer epitel hücrelerinde hiç boyanma yok ise negatif, %1-25 arası 1+, %26-50 arası 2+, %50'nin üzeri 3+ boyanma kabul edilmiştir (27).

**Cyclin D1 immünohistokimyası ve değerlendirilmesi:** %10 tamponlu formolde tespit edilip parafin bloklara gömülmüş olan bloklardan 3µ'luk kesitler poly-L-lizin kaplı lamlara alınmıştır. Bu örnekler 56°C'lik etüvde 1 gece, 5'er dakika 2 defa ksilen, 2 defa alkol ile deparafinize edilmiştir. EDTA (Etilen Diamin Tetra asetik asit, PH:8 )'da 30 dakika antijen retrivalda kaldıktan sonra 20 dakika oda ısısında soğutulmuş ve çeşme suyunda yıkanmıştır. 15 dakika H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'de bekledikten sonra TBS banyosundan sonra Cyclin D1 antikor (SP4- Neomarkers) eklenerek 1 gece oda ısısında bekletilmiştir. Sonra TBS ile yıkayıp 15 dakika biotin ile muamele edildikten sonra tekrar TBS'de yıkayıp, ardından 15 dakika avidin ile muamele edilmiştir. En son yine TBS ile yıkayıp AEC Kromojen damlatılmış, çeşme suyunda yıkayıp hemotoksilende 7 saniye bekletilmiştir. AEC jeliyle kapanarak değerlendirmeye hazır hale getirilmiştir.

Biyopsi örnekleri ışık mikroskopisinde epitel hücrelerinin %5'inin altında nükeer siklin D1 boyanması varsa negatif kabul edilmiştir. %6-25 arası boyanma 1+, %26-50 arası boyanma 2+ %51-75 arası 3+, %76 ve üzeri 4+ kabul edilmiştir (17).

**“E –cadherin” immünohistokimyası ve değerlendirilmesi:** %10 tamponlu formolde tespit edilip parafin bloklara gömülmüş olan bloklardan 3µ'luk kesitler poly-L-lizin kaplı lamlara alınmıştır. Bu örnekler 56°C'lik etüvde 1 gece, 5'er dakika 2 defa ksilen, 2 defa alkol ile deparafinize edilmiştir. Deparafinize edilen kesitler mikrodalga fırında yüksek derecede 30 dakika EDTA'da kaynatılmıştır. Oda ısısında 20 dakika bekletildikten sonra çeşme suyu ile yıkanmıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de 15 dakika bekletildikten sonra TBS ile yıkayıp “E-cadherin” antikor (MS-1475-R7, Neomarkers) damlatılıp 1 gece antikor ile muamele edilmiştir. Ardından TBS ile yıkayıp 15 dakika biotin ile muamele edildikten sonra tekrar TBS'de yıkayıp, ardından 15 dakika avidin ile muamele edilmiştir. En son yine TBS ile yıkayıp AEC Kromojen damlatılmış, çeşme suyunda yıkayıp hemotoksilende 7 saniye bekletilmiştir. AEC jeliyle kapanarak değerlendirmeye hazır hale getirilmiştir.

Örneklerde ışık mikroskopisinde epitel hücrelerinde membranöz boyanma değerlendirilmiştir. Epitel hücrelerinin %10'nundan azında membranöz boyanma var ise negatif, %10-30 arası membranöz boyanma var ise 1+, % 30'un üzerinde membranöz boyanma var ise 2+ kabul edilmiştir (28,29).

**c-erb B2 immünohistokimyası ve değerlendirilmesi:** %10 tamponlu formolde tespit edilip parafin bloklara gömülmüş olan bloklardan 3µ'luk kesitler poly-L-lizin kaplı lamlara alınmıştır. Bu örnekler 56°C'lik etüvde 1 gece, 5'er dakika 2 defa ksilen, 2 defa alkol ile deparafinize edilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de 15 dakika bekletildikten sonra TBS ile yıkayıp Ultra V bloking ile 5 dakika muamele edildikten sonra c-erb B2 antikor (MS-730-P1, Neomarkers) damlatılıp 2 saat antikor ile muamele edilmiştir. Ardından TBS ile yıkayıp 15 dakika biotin

ile muamele edildikten sonra tekrar TBS'de yıkanıp, ardından 15 dakika avidinde bekletilmiştir. En son yine TBS ile yıkanıp AEC Kromojen damlatılmış, çeşme suyunda yıkanıp hemotoksilende 7 saniye bekletilmiştir. AEC jeliyle kapanarak değerlendirmeye hazır hale getirilmiştir.

Işık mikroskopik değerlendirmede epitel hücrelerinde membranöz boyanma değerlendirilmiştir. Skorum ise; hiç membranöz boyanma yok ya da %10'nundan daha az epitel hücresinde membran boyanması var ise negatif, %10'dan fazla epitel hücresinde ancak tam olmayan membranöz boyanma var ise 1+, %10'dan fazla epitel hücresinde hafif-orta derecede tam membranöz boyanma var ise 2+, %10'dan fazla epitel hücresinde kuvvetli membranöz boyanma var ise 3+ kabul edilmiştir (30).

**“Human papilloma” virüs in situ hibridizasyon ve değerlendirilmesi:** %10 tamponlu formolde tespit edilip parafin bloklara gömülmüş olan bloklardan 3µ'luk kesitler poly-L-lizin kaplı lamlara alınmıştır. Bu örnekler 56°C'lik etüvde 1 gece, 5'er dakika 2 defa ksilen, 2 defa alkol ile deparafinize edilmiştir. Şale içinde 25 ml citrat ve 150 ml su karışımında 99°C'lik etüvde 40 dakika bekletilir. Ardından oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakılıp ardından 4 kere su ile yıkanmıştır. %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 20 dakika muamele edilmiş sonra su ile 5 defa çalkalanmıştır. Ardından havada 15 dakika kurutulmuş ve 1 damla HPV antikoru (HPV probe- wide spectrum; DAKO Cytomation) damlatılmış ve üzeri hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamel ile kapatılmıştır. Lamelle kapalı halde 92°C'lik etüvde 10 dakika metale temas ederek bekletilip ardından nemli boyama kabına alınarak 37°C'lik etüvde 13 dakika tutulmuştur. TBS şalesine alınarak lamellerin çıkması beklenip ve açıldıktan sonra temiz TBS şalesinde yıkandıktan sonra 25 µc stringent, 1ml distile su ile hazırlanan Stringent yıkama solüsyonunda 48°C'lik etüvde 25 dakika bekletilmiştir. Ardından TBS'de 5'er dakika 3 defa yıkandıktan sonra

Streptavidin-AP solusyonunda 20 dakika bekletilmiş, sonra 5 dakika TBS ile yıkanmıştır. Sıvının fazlası alınarak BCIP/NBT’de oda ısısında 4 saat bekletilmiş ve ardından distile suda yıkanmıştır. Nükleer fast red ile 5 dakika zemin renklendirildikten sonra ksilen ile kapatılıp değerlendirmeye hazır hale getirilmiştir. Işık mikroskopisinde epitel hücrelerinden en az birinde nükleer boyanma var ise pozitif kabul edilmiştir.

*İstatistiksel değerlendirme;*

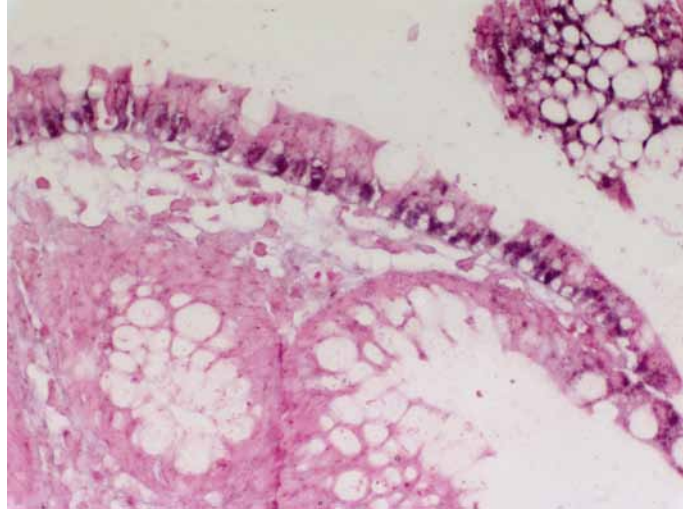
İstatistiksel analizde “SPSS software” (Statistical Package for the Social Sciences, version 11.0, SSPS INC, Chicago, IL, USA) kullanıldı. Grupların sonuçları varyans analizi, Tamhane’s T2 testi , Ki-Kare testi, Kendall sıra korelasyon analizi ve logistik regresyon analizi ile değerlendirilmiştir.

Çalışmaya Hastane Klinik Araştırmalar ve Etik Kurul onayı alındıktan sonra başlanmıştır.

## BULGULAR

Tüm olguların ortalama yaşı 62.3 ( $\pm$  15.7), grup 1'in yaş ortalaması 62.7 ( $\pm$ 10.8), grup 2'nin 68.3 ( $\pm$ 12.7), grup 3'ün 55.9 ( $\pm$ 20.2)'dir. Tanıya göre üç grup arasında yaş dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). Post Hoc değerlendirmede normal grubun yaş ortalamasının diğerlerinden düşük olmasının bu farkı yarattığı görülmüştür.

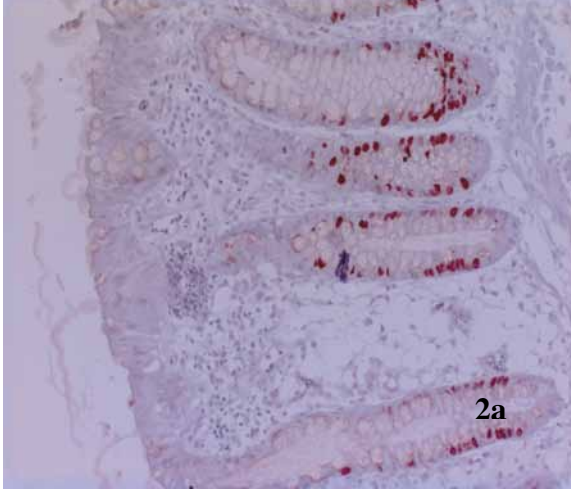
İn situ incelemede çalışmaya aldığımız 72 olgunun 5'i HPV ile boyanma göstermiştir. HPV pozitif olan kolonoskopik biyopsilerin tümü neoplastik polipler olup 4'ü villöz, 1'i tübüler adenomdur (Resim 1). Ayrıca villöz adenomlardan sadece 1'i sağ kolonda iken diğer tüm HPV pozitif poliplerin sol kolonda olduğu dikkati çekmiştir.



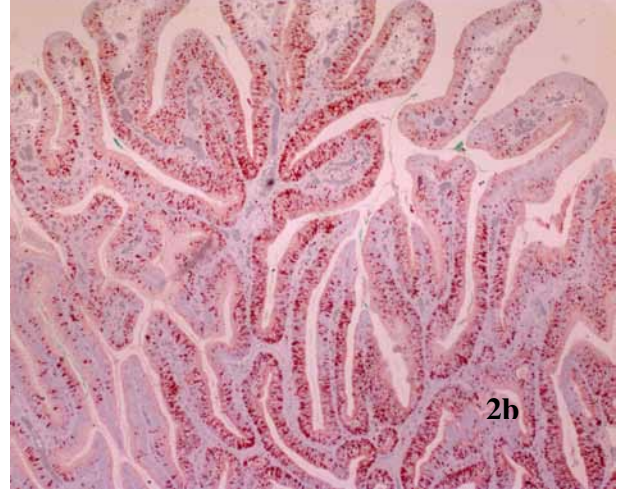
**Resim1.** İn situ hibridizasyon ile nükleer HPV pozitifliği gösteren villöz adenom (x40)

Olguların tamamında yapılan immünohistokimyasal incelemede Ki-67, "E-cadherin", p53 dışavurumunda üç grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ).

Ancak Ki-67 proliferasyon indeksi değerlendirilirken grup 3'te Ki-67 dışavurumunun kript tabanında sınırlı kaldığı (Resim 2a), grup 1 ve 2'de Ki-67 dışavurumunun hem kript tabanı hem de yüzey epitelinde (Resim 2b) olduğu dikkati çekmiştir.

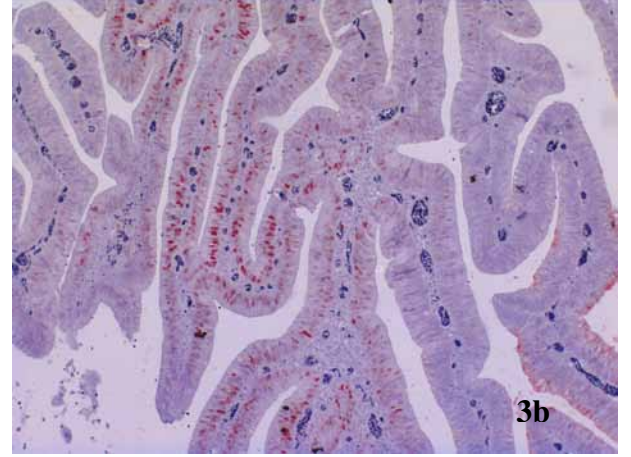
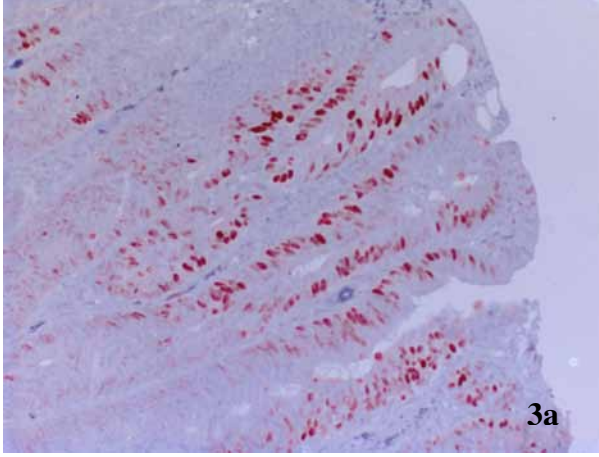


**Resim 2a.** Normal kolon mukozasında (x20) kript tabanında sınırlı immünohistokimyasal nükleer Ki-67 dışavurumu



**Resim 2b.** Villöz adenomda (x10) yüzeye kadar ulaşan immünohistokimyasal nükleer Ki-67 dışavurumu

Siklin D1 dışavurumunun dağılımı değerlendirildiğinde grup 2 ve 3'te dağılım heterojenken grup 1'de homojen bir dağılımın olduğu dikkati çekmiştir (Tablo 1). Ayrıca tanılara göre siklin D1 dışavurumu (Resim 3) değerlendirildiğinde neoplastik poliplerde normal mukozaya göre artmış olduğu izlenmiş, fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) bulunmuştur (Tablo 2).



**Resim 3a.** Tübüler adenom(x20)  
immünohistokimyasal nükleer siklin D1  
dışavurumu

**Resim 3b.** Villöz adenomda (x10)  
immünohistokimyasal nükleer siklin D1  
dışavurumu

**Tablo1.** Tanıya göre siklin D1 dışavurumunun tanımlayıcı dağılımı

Tanı	Mean $\pm$ SD	Median (min-max)
Tübüler adenom	1 $\pm$ 1.2	1(0-4)
Villöz adenom	0.92 $\pm$ 1.2	0.01(0-3)
Normal kolon mukozası	0.38 $\pm$ 0.7	0.01 (0-2)

**Tablo 2.** Siklin D1 dışavurumunun tanılara göre dağılımı

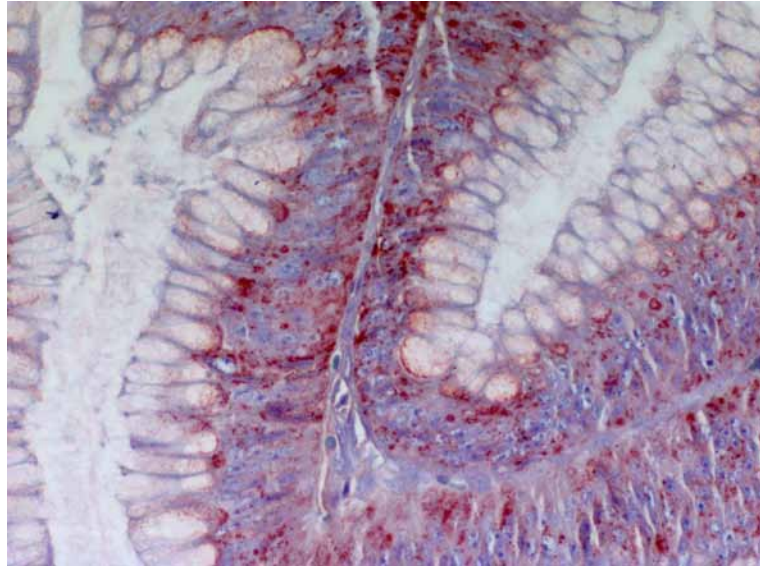
Tanı	Siklin D1 dışavurumu	
	Negatif* Sayı (%)	Pozitif* Sayı (%)
Normal kolon mukozası	19 (%79.2)	5 (%20.8)
Neoplastik polip**	24 (%50)	24 (%50)

\* Skor 0 negatif, skor 1,2,3,4 ise pozitif kabul edilmiştir.

\*\* Tübüler ve villöz adenomlar neoplastik polip başlığı altında toplanmıştır.

*Ki-kare Testi; p<0.05*

Ayrıca c-erb B2 dışavurumu (Resim 4) değerlendirildiğinde; grup 1 ve 2'de grup 3'e göre c-erb B2 dışavurumu artmıştır, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Tablo 3). Tüm değişkenlerin tanı ile ilişkisi logistik regresyon testi (Tablo4) ile değerlendirildiğinde c-erb B2'nin neoplastik polip gelişimi ile ilişkili olduğu saptanmıştır. c- erb B2 dışavurumu ile neoplastik polip gelişme olasılığının 5.1 kat arttığı dikkati çekmiş ve fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) bulunmuştur. Ayrıca c-erb B2 dışavurumunun polip gelişimi ile hafif derecede pozitif korelasyon ( $r = 0.289$ ,  $p<0.05$ ) gösterdiği görülmüştür.



**Resim 4.** Villöz adenomda (x40) immünohistokimyasal granüler, membranöz c-erb B2 dışavurumu



**Tablo3.** Tanılara göre c-erb B2 dışavurumunun dağılımı

Tanı	c-erb B2 dışavurumu		
	Skor 0 Sayı (%)	Skor 1 Sayı (%)	Skor 2 Sayı (%)
Tübüler adenom	13 (%24.5)	11 (%64.7)	0 (%0)
Villöz adenom	18 (%34.0)	4 (%23.5)	2 (%100)
Normal kolon mukozası	22 (%41.5)	2 (%11.8)	0 (%0)

Ki-kare Testi; p&lt;0.05

**Tablo 4 .** Neoplastik polip gelişimini etkileyen faktörlerin logistik regresyon analizi ile incelenmesi**Basamak 1.**

Sabit : -1,374	Beta	OR	% 95 CI	p
HPV	8,727	6165,9	0,0-3,77	0,840
Negatif / Pozitif				
Cinsiyet	0,138	1,1	0,32-4,04	0,262
Kadın / Erkek				
c-erb B2	1,075	2,9	0,46-18,68	0,255
p53	5,672	290,6	0,0-4,72	0,881
Siklin D1	0,504	1,6	0,81-3,37	0,166
“E-cadherin”	0,178	1,2	0,56-2,52	0,640
Ki67	-0,007	0,9	0,96-1,02	0,628
Bcl-2	0,345	1,4	0,52-3,77	0,492
Yaş	0,021	1,0	0,98-1,06	0,321

**Basamak 7.**

Sabit : -0,091	Beta	OR	% 95 CI	p
HPV	7,832	2520,1	0,0-3,56	0,763
Negatif / Pozitif				
<b>c-erb B2</b>	<b>1,628</b>	<b>5,1</b>	<b>1,04-24,84</b>	<b>0,04</b>
Siklin D1	0,530	1,7	0,90-3,17	0,09

OR: “Odds Ratio”

CI: Güvenlik Aralığı (Confidence Interval)

Ayrıca p53 ve “E-cadherin” immünohistokimyasal verilerin tanılarına göre dağılımı sırasıyla tablo 5, 6’da verilmiştir. p53 ve “E-cadherin” dışavurumları sırasıyla resim 5,6’da örneklenmiştir.

**Tablo 5.** p53 dışavurumunun tanılarına göre dağılımı

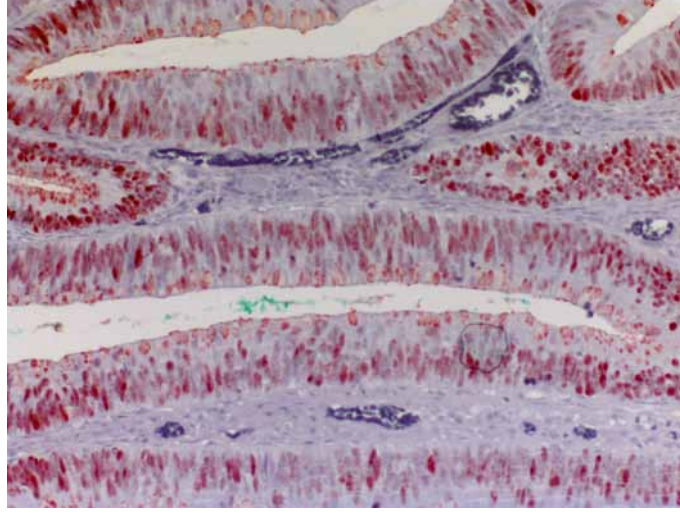
	p53 dışavurumu		
	Skor 0 Sayı (%)	Skor 1 Sayı (%)	Skor 2 Sayı (%)
Tübüler adenom	23 (%33.3)	1 (% 100)	0 (%0)
Villöz adenom	22 (%31.9)	0 (%0)	2 (%100)
Normal kolon mukozası	24 (%34.8)	0 (%0)	0 (%0)

*Ki-kare Testi; p>0.05*

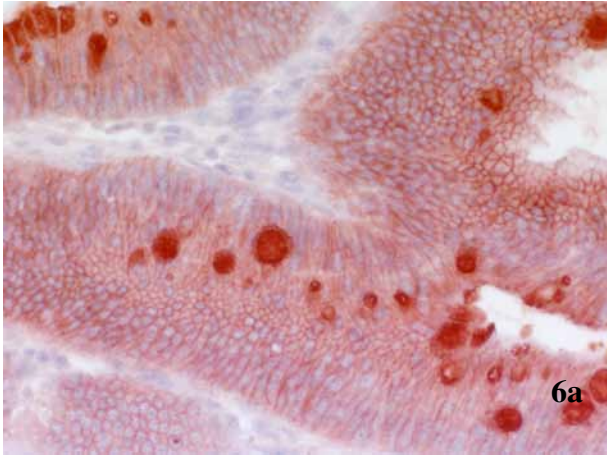
**Tablo 6.** “E-cadherin” dışavurumunun tanılarına göre dağılımı

	E cadherin dışavurumu		
	Skor 0 Sayı (%)	Skor 1 Sayı (%)	Skor 2 Sayı (%)
Tübüler adenom	10 (%27.8)	9 (% 39.1)	5 (%38.5)
Villöz adenom	11 (%30.6)	10 (%43.5)	3 (%23.1)
Normal kolon mukozası	15 (%41.7)	4 (%17.4)	5 (%38.5)

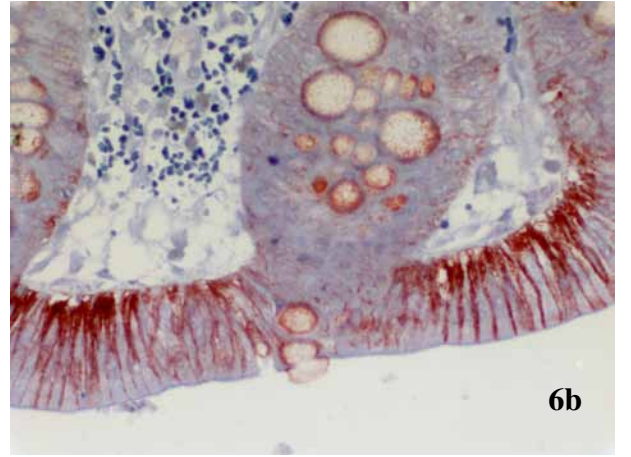
*Ki-kare Testi; p>0.05*



**Resim 5.** Villöz adenomda (x20) immünohistokimyasal nükleer p53 dışavurumu

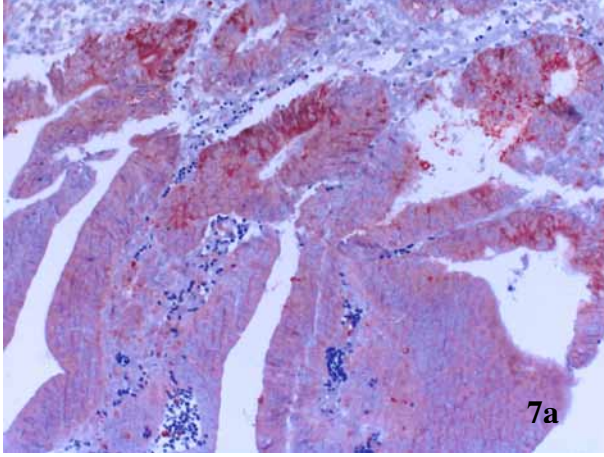


**Resim 6a.** Villöz adenomda (x40), immünohistokimyasal membranöz "E-cadherin" dışavurumu

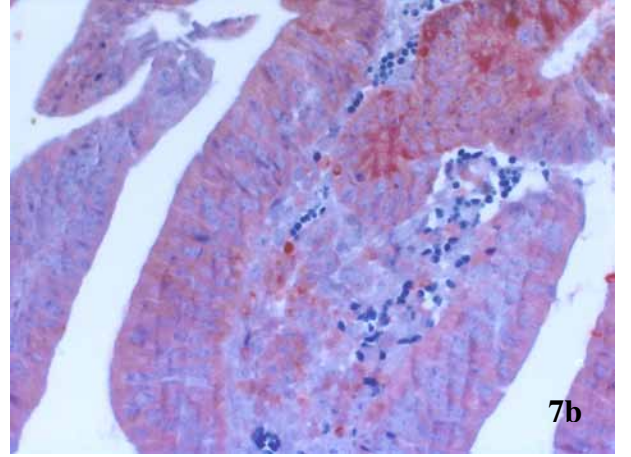


**Resim 6b.** Tübüler adenomda (x40) immünohistokimyasal membranöz "E-cadherin" dışavurumu

bcl-2 dışavurumu (resim 7) değerlendirildiğinde tübüler ve villöz adenomda sitoplazmik bcl-2 dışavurumunun belirgin olarak arttığı ( $p < 0.05$ ) dikkati çekmiş, tanılara göre dağılımı tablo 7'de verilmiştir.



**Resim 7a.** Villöz adenomda (X20) immünohistokimyasal sitoplazmik bcl-2 dışavurumu



**Resim 7b.** Villöz adenomda (x40) immünohistokimyasal sitoplazmik bcl-2 dışavurumu

**Tablo 7.** bcl-2 dışavurumunun tanılara göre dağılımı

Tanı	bcl-2 dışavurumu	
	Negatif* Sayı (%)	Pozitif* Sayı (%)
Tübüler adenom	13 (%25.0)	7 (% 58.3)
Villöz adenom	18 (%34.6)	4 (%33.3)
Normal kolon mukozası	21 (%40.4)	1 (%8.3)
* Skor 0 negatif, skor 1,2,3 ise pozitif kabul edilmiştir.		

*Ki-kare Testi; p<0.05*

Tanıya göre bölgelere dağılımına bakıldığında (Tablo 8) sağ ve sol kolon arasında anlamlı farklılığın olmadığı ( $p>0.05$ ) saptanmıştır. Ancak hem tübüler adenomların (%75) hem de villöz adenomların (%79.2) büyük oranda sol kolonda olduğu dikkati çekmiştir.

**Tablo 8.** Bölgelere göre tanıların dağılımı

Tanı	Bölge	
	Sağ kolon	Sol kolon
Tübüler adenom	6 (%25)	18 (%75)
Villöz adenom	5 (%20.8)	19 (%79.2)
Normal kolon mukozası	4 (%16.7)	20 (%83.3)

*Ki-kare testi;  $p>0.05$*

## TARTIŞMA

Kolorektal karsinom, 3. en sık görülen karsinomdur. Amerikan kanser birliğinin 2004 verilerine göre kolorektal kanserler kanserden ölümlerin yaklaşık %10'nunu oluşturmaktadır (31). Kolorektal karsinogenezde öncü lezyonların olması bir kısmının karsinom gelişmeden önlenmesi için olanak sağlamaktadır. Ayrıca karsinogenezde etkilenen yolakların etkilendiği adenomlarda daha yakın takibin yapılması kanser gelişimi öncesi tanı ve tedavisini mümkün kılabilir.

Literatürdeki çalışmalarda kolorektal karsinom olasılığı yaş ile birlikte anlamlı olarak artmaktadır. Bizim çalışmamızda da neoplastik poliplerin yaş ortalaması normal mukozaya göre belirgin derecede artmıştır. Yaş ile neoplazi gelişme riski arttığı için yakın klinik takip ile kolon karsinomu gelişmeden neoplastik polip aşamasında tedavi sağlanabilir. Böylece hem tam tedavi, hem yaşam kalitesinde artış, hem de pahalı kemoterapiden kurtulmak mümkün olabilir.

Literatürde kolorektal karsinomlarda siklin D1 dışavurumunda artış olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da siklin D1 dışavurumu neoplastik poliplerde normal mukozaya göre artmış, fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu nedenle siklin D1 dışavurumunun varlığı ve hatta skorlanması neoplaziye ve karsinoma gidişte yol gösterici olabilir (32).

Literatürde bcl-2 protein dışavurumu sıklıkla adenomlarda görülürken karsinomlarda %5-55 oranında bildirilmiştir. bcl-2 dışavurumunun tümörün evresi ile ilişkisi saptanmamıştır. Ancak erken dönem karsinogenezde rol alabileceği ifade edilmiştir (20). Sürekli yenilenen

hücrelerde (kolon epiteli gibi) aşırı hücre çoğalmasını kontrol etmede apoptoz önemli bir mekanizmadır. Aynı zamanda hatalı DNA içeren hücrelerin ortadan kaldırılmasında da rol oynamaktadır (1). Bizim çalışmamızda da antiapoptotik özellikteki bcl-2 dışavurumu neoplastik poliplerde normal mukozaya göre artmış olup istatistiksel olarak anlamlı fark yaratmaktadır. Bu nedenle neoplastik polipler üzerinden karsinom gelişiminde bcl-2 yolağının karsinogenezin erken basamaklarından biri olduğu ve bcl-2 dışavurumu olan neoplastik poliplerde yakın takip tümörü erken dönemde yakalama ya da karsinom gelişim öncesi tedavi sağlamada yol gösterici olabilir.

Literatürde kolorektal karsinomda c-erb B2 dışavurumunun artmasının evrenin artması ile doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir (21). Bizim çalışmamızda da c-erb B2 dışavurumunun neoplastik poliplerde anlamlı olarak arttığı görülmüştür. c-erb B2 epidermal büyüme faktörü ailesinden olup, aktivasyonunun neoplazinin büyümesini ve yayılımını doğrudan etkilediği bilinmektedir. Aynı zamanda neoplastik poliplerde de artmış olması karsinogenezde adenomatöz zeminde etkilenen yolaklardan birinin olabileceğini düşündürmektedir. Bir çok çalışmada kolorektal karsinomlarda c-erbB2 dışavurumunun artması hem tümörün evresinin artması, hem de tekrarlama olasılığının artması ile ilişkili olduğu bildirilmiş, bazı çalışmalarda ise kemoterapide göz önünde bulundurulabileceği ifade edilmiştir (20,33). Literatürde prognostik öneme sahip olduğu belirtilen c-erb B2 dışavurumunun artması, bizim çalışmamızda da neoplastik polip gelişme olasılığını 5.1 kat arttırdığı için, karsinom gelişme olasılığını da arttırdığı düşünülebilir.

Ki-67 proliferasyon indeksi anlamlı fark yaratmamakla birlikte, normal mukozada Ki-67 dışavurumunun sadece kript tabanında izlenirken, neoplastik poliplerde yüzey epitelinde de belirgin olarak görülmesi karsinogenez için uyarıcı parametre olarak kabul edilebilir (19).

Literatürde 2003 yılında Furuta ve diğerlerinin yaptığı çalışmada kolorektal karsinomlarda normal kolon epiteline göre “E-cadherin” dışavurumunun azaldığı belirtilmiştir (34). Bizim çalışmamızda ise normal kolon mukozası, tübüler adenom ve villöz adenom arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Bu bulgular “E-cadherin” dışavurumunun kaybının karsinogenezin daha geç aşamalarında gerçekleştiğini düşündürmektedir. Hori ve diğerlerinin 2005 yılında yaptığı çalışmada lenf nodu metastazı olan ve lenf nodu metastazı olmayan kolorektal karsinomlar karşılaştırıldığında “E-cadherin” dışavurumunun lenf nodu metastazı olan grupta belirgin olarak azaldığı belirtilmiştir (35). Bu bilgilerle birlikte değerlendirdiğimizde “E-cadherin” dışavurumunun karsinogenez gerçekleştikten sonra prognoz üzerinde etkili olduğunu, erken dönem karsinogenezde etkili yolaklardan biri olmadığını düşünebiliriz.

Bazı çalışmalarda anal kanser (skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom) ve rektal adenokarsinomlarda p53 dışavurumunda değişiklikler dikkati çekmiş ancak karsinom gelişiminde bu gruplar arasında HPV enfeksiyonu ile ilişki saptanmamıştır (5). Ancak yapılan bir çok çalışmada ise kolorektal karsinomlar ile HPV enfeksiyonu, özellikle de HPV tip 16 ile yakından ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca HPV ilişkili karsinogenezde p53 mutasyonu yolağının etkilenmediği bildirilmiştir. Bu nedenle HPV ilişkili kolorektal karsinomlarda sıradan kolorektal karsinomlardaki p53 yolağı dışında etkilenen farklı basamaklar olduğu düşünülebilir (7-12). Kolorektal karsinomlarla HPV ilişkisi hakkında çok sayıda çalışma yapılmış ancak kolorektal adenomlarla ilgili fazla çalışma yapılmamıştır. 1995 yılında Cheng ve diğerlerinin yaptığı çalışmada özellikle HPV tip 16'nın histolojik tip ile ilişkili olduğu ve villöz adenomlarda belirgin olarak fazla olduğu saptanmıştır. Ayrıca epiteliyal displazinin derecesi ile HPV DNA'nın belirgin olarak ilişkili olduğu bildirilmiştir (36). Bizim çalışmamızda sayı az olmakla birlikte HPV pozitif olan 5 olgunun tümü neoplastik polip olup, sadece biri tübüler adenom, diğerleri villöz



adenomdur. Çalışma grubu genişletilirse HPV enfeksiyonu ile villöz adenomlar arasında literatürdeki gibi anlamlı ilişki bulunabilir. HPV enfeksiyonu ilişkili olgularda aşılama ile karsinom gelişiminden korunulabilir. Böylece şimdilik serviks karsinomunda, sadece kadın popülasyonu için proflaktik olarak kullanılan HPV aşısı (37,38), erkek popülasyonunu da içine alan proflaksi yapılarak kolorektal karsinomların bir kısmı da belki önlenabilir.

Sonuç olarak; Ki-67 dışavurumunda boyanma şeklinin kript tabanında sınırlı kalmayıp yüzey epiteline ilerlemesi, ayrıca Siklin D1, c-erb B2 ve bcl-2 dışavurumunun artması displazik epitelin bir bulgusu kabul edilebilir. Bu da özellikle endoskopik tanısı zor olan ve mikroskopik olarak rejeneratif atipi ile karışabilen düz (flat) adenomlar gibi lezyonların tanısında kullanılabilir. Serviks karsinomunda olduğu gibi aşılama için umutlanmak erken olsa da HPV ile daha geniş serilerde özellikle villöz adenomlarda çalışılması yararlı gözükmektedir.

## ÖZET

Bu çalışmada tübüler ve villöz adenomlarda HPV etkisini, p53, c-erb B2, “E-cadherin”, bcl-2, siklin D1 dışavurumunu ve Ki-67 proliferasyon indekslerini değerlendirmeyi ve bulgularımızın polibin tipi ve hastanın yaşı ile ilişkisini normal kolon mukozası ile karşılaştırmayı amaçladık.

Tüm olguları değerlendirdiğimizde, yaş ortalamasının tübüler ve villöz adenomlarda normal kolon mukozasına göre belirgin olarak yüksek olduğu saptanmıştır ( $p<0.05$ ). İn situ hibridizasyon ile HPV pozitifliği gösteren 5 olgunun 4’ünün villöz adenom, 1’inin ise tübüler adenom olduğunu görülmüştür. Ki-67 proliferasyon indeksi, “E-cadherin” ve p53 dışavurumunun gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Ancak Ki-67 dışavurumunun poliplerde normal mukozadan farklı olarak kript tabanında sınırlı kalmadığı ve yüzeye kadar ulaştığı dikkati çekmiştir. Ayrıca siklin D1, bcl-2 ve c-erb B2 dışavurumu poliplerde normal mukozaya göre artmış olup fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Sonuç olarak siklin D1, bcl-2, c-erb B2 karsinogenezin ilk basamaklarında etkilenen yollar olduğunu düşünebiliriz. Ayrıca Ki-67 dışavurumunun yüzeye kadar ulaşması önemli bulgulardan olabilir. “E-cadherin” dışavurumunun azalması kolon karsinomlarında kötü prognositik faktörlerden biri olmakla birlikte karsinogenezin erken basamaklarında etkilenen yollardan biri olmadığı düşünülebilir. Ayrıca sayı az olmakla birlikte HPV pozitif olan olguların 5’inin de polip olup bunlardan 4’ü villöz adenomdur. Karsinogenezin erken dönem uyarılarından birinin de onkovirüslerden olan HPV olabileceği yönünde daha geniş çalışmalar yapılabilir.

## KAYNAKLAR

- 1- Koornstra JJ, de Jong S, Hollema H, de Vries EGE, Kleibeuker JH. Changes in Apoptosis During The Development of Colorectal Cancer: a Systematic review of the Literature. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*, 2003; 45:37-53.
- 2- Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H. Field Defects in Progression to adenocarcinoma of the Colon and Esophagus. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2000; Vol.3 No. 3.
- 3- Rozivatz E, Becker I, Bamba M, Schott C, Diebold J, Mayr D, Höfler H, Becker K. Neoreexpression of N-cadherin in E-cadherin Positive Colon Cancers. *Int J Cancer*, 2004; 111: 711-719.
- 4- Contu PC, Contu SS, Moreira LF. Bcl-2 Ekspresyon in rectal Cancer. *Arq Gastroenterol*, 2006; 43:24-287.
- 5- Laim, Luo M, Yao J, Chen P. Anal cancer in Chinese: human papillomavirus infection and altered expression of p53. *WJG*, 1998;4(4):298-302
- 6- David P. Ryan, M.D., Carolyn C. Compton, M.D., And Robert J. Mayer, M.D. Carcinoma Of The Anal Canal. *The New England Journal Of Medicine*, 2000; 342 (11): 792-800.
- 7- Zhang J, Ding Y, Zhou Z, Li H, Zhou, Expression of human papillomavirus 16 E7 DNA in patients with colorectal adenocarcinoma. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 2005 Oct;22(5):1024-6, 1044.
- 8- Perez LO, Abba MC, Laguens RM, Golijow CD. Analysis of the colon and rectum: detection of human papillomavirus (HPV) DNA by polymerase chain reaction. *Colorectal Dis*. 2005 Sep;7(5):492-5.

- 9- Buyru N, Tezol A, Dalay N. P53 intronic G13964C variant in colon cancer and its association with HPV. *Anticancer Res.* 2005 Jul-Aug;25(4):2767-9.,
- 10- Buyru N, Budak M, Yazici H, Dalay N. P53 gene mutations are rare in human papillomavirus-associated colon cancer. *Oncol Rep.* 2003 Nov-Dec;10(6):2089-92.
- 11- Zhu Q, Cao J, Li S. Detection of human papillomavirus gene in biopsies from colon carcinoma by PCR. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 1999 Dec;13(4):352-4.
- 12- Bodaghi S, Yamanegi K, Xiao SY, Da Costa M, Palefsky JM, Zheng ZM. Colorectal papillomavirus infection in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Apr 15;11(8):2862-7.
- 13- Rosai J, Edit. Houston M. Rosai & Ackerman's Surgical Pathology, 9<sup>th</sup> edition, Volume One, Part 11, 2004: 776-823.
- 14- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Kotran Pathologic Basis of Disease, Seveth edition, 2005; Chapter 17:828-875.
- 15- Hamilton SR, Aaltonen LA. Tumors of The Digestive System. 1<sup>st</sup> edition. WHO Classification of Tumours, IARC press, 2000, Part 6; 103-137.
- 16- Fenoglio- Preiser CM. Gastrointestinal Pathology An Atlas and Text, Second edition, 1999; Part 20: 909-1068.
- 17- Kouraklis G, Theocharis S, Vamvakas P, Vagianos C, Glinavou A, Giaginis C, Sioka C. Cyclin D1 and Rb protein ekspression and their correlation with prognosis in patients with colon cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 2006; 4:5.
- 18- Bukholm IK, Nesland JM. Protein Expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2, Bax, Cyclin D1 and pRb in Human Colon Carcinomas. *Virchows arch*, 2000; 436:224-228.

- 19- Andersen SN, Rognum TO, Baka A, Clausen OPF. Ki-67: A Useful Marker for The Evaluation of Displasia in Ulcerative Colitis. *J Clin Mol Pathol*, 1998; 51:327-332.
- 20- Demirbaş S, Sücüllü İ, Yıldırım Ş, Çelenk T, Influence of c-er B-2, nm23, bcl-2 and p53 protein markers on colorectal cancer. *Turk J Gastroenterol* 2006; 17(1):13-19.
- 21- Tavangar SM, Shariftabrizi A, Soroush AR. Her/neu over-expression correlates with more advanced disease in Iranian colorectal cancer patients. *Med Sci Monit*, 2005; 11(3): CR123-126.
- 22- Al Moustafa AE, Foulkes WD, Benlimame N, Wong A, Yen L, Bergeron J, Batist G, Alpert L, Alaoui-Jamali MA. E6/E7 proteins of HPV type 16 and ErbB-2 cooperate to induce neoplastic transformation of primary normal oral epithelial cells. *Oncogene*. 2004 Jan 15;23(2):350-8.
- 23- Nair P, Nair KM, Jayaprakash PG, Pillai MR, Decreased programmed cell death in the uterine cervix associated with high risk human papillomavirus infection. *Pathol Oncol Res*. 1999;5(2):95-103.
- 24- Unal H, Selcuk H, Gokcan H, Tore E, Sar A, Korkmaz M, Bilezikci B, Demirhan B, Gur G, Yilmaz U. Malignancy Risk of Small Polyps and Related Factors. *Dig Dis Sci*, 2007: DOI 10.1007/s10620-007-9782-8.
- 25- Suzuki Y, Honma T, Hayashi S, Ajioka Y, Asakura H. Bcl-2 Expression and frequency of Apoptosis correlate with Morfogenesis of Colorectal Neoplasia. *J. Clin. Pathol*. 2002; 55:212-216.
- 26- Zavrides HN, Zizi-Sermpetzogluo A, Panousopoulos D, Athanasas G, Elemenoglou I, Peros G. Prognotic evaluation of CD44 ekspression in correlation with bcl-2 and p53 in colorectal cancer. *Folia Histochemica et cytobiologica*, 2005. Vol.43: 31-36.
- 27- Saleh HA, Jackson H, Khatib G, Banerjee M. Correlatin of bcl-2 Oncoprotein Immunohistochemical Expression with Proliferation Indeks and Histopathologic Parameters in Colorectal Neoplasia. *Pathology Oncology Research*, 1999; Vol 5, No. 4.

- 28- Sun X, Gong Y, Talamonti MS, Rao S. Expression of Cell Adhesion Molecules, CD44s and E-cadherin, and Microvessel Density in Carcinoid Tumors. *Mod pathol*, 2002; 15(12):1333-1338.
- 29- Hori H, Fujimori T, Fujii S, Ichikawa K, Ohkura Y, Tomita S, Ono Y, Imura J, Kuroda Y. Evaluation of Tumor Cell Dissociation as a Predictive Marker of Lymph Node Metastasis in Submucosal Invasive Colorectal Carcinoma. *Dis Colon Rectum*, 2005; Vol. 48, No. 5.
- 30- Rosai J, Edit. Houston M. Rosai & Ackerman's Surgical Pathology, 9<sup>th</sup> edition, Volume Two, Part 20, 2004: 1819.
- 31- S.J. Leedham, S. Schier, A.T. Thliveris, R.B. Halberg, M.A. Newton, N.A. Wright. From gene mutation to tumors-stem cells in gastrointestinal carcinogenesis. *Cell Prolif*. 2005, 38, 387-405.
- 32- Wong NACS, Morris RG, McCondochie A, Bader S, Jodrell DI, Harrison DJ. Cyclin D1 Overexpression in Colorectal Carcinoma in vivo is dependent on  $\beta$ -catenin protein dysregulation, but not k-ras mutation. *J Pathol* 2002; 197:128-135.
- 33- Kruszewski W, Kowara R, Rzepko R, Warezak C, Zielinski J, Gryglewski G, Kopacz A, Jastrzebski T, Paweczyk T. K-RAS Point Mutation, and Amplification of c-myc and c-erb B2 in Colon Adenocarcinoma. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2004; 42(3): 173-179.
- 34- Furuta K, Yoshioka S, Okabe S, Ikeda M, Oginosawa M, Ikeda S, Nakayama Y, Kikuchi M, Hamilton SR. Expressions of Two Adenomatous Poliposis Coli and E-cadherin Proteins on Human Colorectal Cancers. *Virchows Arch*, 2003; 442:266-270.
- 35- Hori H, Fujimori T, Fujii S, Ichikawa, Ohkura Y, Tomita S, Ono Y, Imura J, Kuroda Y. Evaluation of tumor Cell Dissociation as a Predictive Marker of Lymph Node Metastasis in Submucosal Invasive Colorectal Carcinoma. *Dis Colon Rectum*, 2005; 48:938-945.

- 36- Cheng JY, Sheu LF, Lin JC, Meng CL. Detection of Human Papilloma Virus DNA in Colorectal Adenomas. Arch Surg, 1995 Jan; 130 (1):73-6.
- 37- Breitburd F, Coursaget P. Human Papillomavirus vaccines. Cancer Biology, 1999; 9:431-445.
- 38- Eiben GL, Da Silva DM, Fausch SC, Le Poole IC, Nishimura MI, Kast WM. Cervical Cancer Vaccines: Recent Advances in HPV Research. Viral Immunology, 2003; 16(2): 111-121.