



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA KAN
GUANİL SİKLAZ-C VE SİTOKERATİN 20
DÜZEYLERİNİN HASTALIK EVRESİ, PROGNOSTİK
PARAMETRELER VE TEDAVİYE YANITLA İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Muhammet Akif ŞAHİN
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Celalettin CAMCI

TEMMUZ-2009

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA KAN
GUANİL SİKLAZ-C VE SİTOKERATİN 20
DÜZEYLERİNİN HASTALIK EVRESİ, PROGNOSTİK
PARAMETRELER VE TEDAVİYE YANITLA İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Muhammet Akif ŞAHİN
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Celalettin CAMCI**

**Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından
T.F.09.11 proje numarası ile desteklenmiştir.**

I. ÖNSÖZ

Tezimi hazırlamamda büyük emeği olan değerli tez danışmanı hocam Prof. Dr. Celalettin Camcı'ya, Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım başta bölüm başkanım Prof. Dr. Celalettin Usalan olmak üzere bölümümüzün diğer kıymetli hocalarına, öğrencilik ve asistanlık eğitimimim bir kısmında birlikte çalışabildiğim merhum Prof. Dr. Fikret Demirci hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Her istediğimde rahatlıkla kapısını çalabildiğim ve tezimin her aşamasında yardımını esirgemeyen Tıbbi Biyolog Dr. Serdar Öztuzcu'ya ve Biyolog Esmâ Özkara'ya teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimimde acı-tatlı anları paylaştığım asistan arkadaşlarıma, servisimizin tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Her türlü zorluğu beraberce göğüslediğimiz hep yanımda olan çok değerli eşim Dr. Handan Haydaroğlu Şahin'e, ayrıca son bir yıldır hayatıma kattığı sonsuz mutluluk ve sevgi için biricik kızım Selin'e, evlatları olmaktan onur duyduğum, hiçbir karşılık beklemeden maddi ve manevi desteklerini her zaman arkamda hissettiğim, babam, annem ve kardeşlerime ayrı ayrı sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Muhammet Akif ŞAHİN

Gaziantep, 2009

II. İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
KISALTMALAR	IX
TABLO LİSTESİ	X
ŞEKİL LİSTESİ	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolorektal Tümörler	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Anatomi	3
2.1.3. Etyoloji	4
2.1.3.1. Yaygınlık	4
2.1.3.2. Genetik Faktörler	5
2.1.3.2.1. Familial Adenomatöz Polipozis	6
2.1.3.2.2. Hereditör nonpolipöz kolorektal kanserler	6
2.1.3.3. Diyet, Endojen ve Eksojen Karsinojenler	7
2.1.3.4. Mesleki Faktörler	8
2.1.3.5. İdiopatik İnflamatuvar Barsak Hastalıkları	8
2.1.3.6. Üreterosigmoidostomi, İleostomi ve Anastomozlar	9
2.1.4. Kolorektal Tümör Tipleri	9
2.1.5. Adenom - Karsinom İlişkisi	10
2.1.6. Klinik Bulgular	12
2.1.7. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Bulgular	12
2.1.8. Moleküler Genetik	13

2.1.9. Tümör Yayılımı ve Metastaz	14
2.1.10. Evreleme	14
2.1.10.1. Astler-Coller Sınıflandırması	14
2.1.10.2. TNM Sınıflandırması	14
2.1.11. Tanı	18
2.1.11.1. Fizik Muayene	18
2.1.11.2. Baryumlu Kolon Grafisi	18
2.1.11.3. Rektosigmoidoskopi	18
2.1.11.4. Kolonoskopi	19
2.1.11.5. Laboratuvar	19
2.1.12. Tedavi	19
2.1.12.1. Rektum Kanserlerinde Adjuvan Tedavi	20
2.1.12.2. Kolon Kanserlerinde Adjuvan Tedavi	20
2.1.13. Prognoz	20
2.1.13.1. Yaş	20
2.1.13.2. Cinsiyet	21
2.1.13.3. Serum CEA düzeyi	21
2.1.13.4. Tümör lokalizasyonu	21
2.1.13.5. Birden fazla tümör odağı varlığı	21
2.1.13.6. Lokal yayılım	21
2.1.13.7. Tümör boyutu	21
2.1.13.8. Obstruksiyon	21
2.1.13.9. Perforasyon	21
2.1.13.10. Tümör sınırları ve inflamatuvar reaksiyon	21
2.1.13.11. Vasküler invazyon	22
2.1.13.12. Perinoral invazyon	20
2.1.13.13. Mikroskopik tümör tipi	20
2.1.13.14. Asiner morfoloji	20
2.1.13.15. Nöroendokrin hücre varlığı	20
2.1.13.16. Müsin ile ilişkili antijenler	20
2.1.13.17. Hücre proliferasyonu	20
2.1.13.18. Lenf nodu tutulumu	20

2.1.13.19. Evre	23
2.1.13.20. Anjiogenez	23
2.2. Serbest Tümör Hücrelerinin Kanserdeki Yeri	23
2.3. Guanil Siklaz-C Tanımı Ve Kanserle İlişkisi	24
2.4. Sitokeratin 20 Tanımı Ve Kanserle İlişkisi	27
3.GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1.Çalışmanın Tanımı	30
3.2.Hastaların Seçimi	30
3.2.1.Çalışmaya dahil edilme kriterleri	30
3.2.2.Çalışma dışı bırakılma kriterleri	30
3.3. RNA İzolasyonu	31
3.4. Ters Transkriptaz PCR Yöntemi ile cDNA eldesi	31
3.5. PCR Aşaması	32
3.6. Primer ve Probların Tasarımı	32
3.7. Real-Time PCR Tepkimesi	33
3.8. CK20 Gen İfadesi Tayini	33
3.8.1. Human PBGD (porphobilinogen deaminase)	33
3.8.2. Human Cytokeratin 20(CK20)	33
3.9. CEA ve CA19.9 Tespiti	34
3.10. İstatistiksel Analizler	34
4.BULGULAR	35
5.TARTIŞMA	45
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	56
7.KAYNAKLAR	58

V. ÖZET

KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA KAN GUANİL SİKLAZ-C VE SİTOKERATİN 20 DÜZEYLERİNİN HASTALIK EVRESİ, PROGNOSTİK PARAMETRELER VE TEDAVİYE YANITLA İLİŞKİSİ

Dr. Muhammet Akif ŞAHİN

Uzmanlık Tezi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Celalettin CAMCI

Temmuz-2009, 76 sayfa

Guanil Siklaz C (GC-C), sadece normal intestinal mukoza hücrelerinde, primer ve metastatik kolorektal kanserlerde (KRK) eksprese edilir. Bu çalışma, KRK'li hastalarda kan GC-C ve sitokeratin 20 (CK20) mRNA düzeylerinin hastalığın evresi, prognostik parametreler ve tedaviye yanıtla ilişkisini belirlemek amacıyla yapıldı.

Çalışmaya, KRK tanılı 49 hasta ile 41 sağlıklı kişi alındı. Plazma GC-C ve CK20 mRNA seviyeleri RT-PCR yöntemiyle ölçüldü.

Tüm hastaların ve kontrol grubunun ortalama GC-C ve CK20 değerleri arasında ilişki saptanmadı ($p>0.05$). Metastatiklerin başlangıç GC-C ve CK20 değerleri kontrol grubuna göre yüksek saptandı (GC-C; $p=0.00$, CK20; $p=0.143$). Kemoterapi sonrası regresyon gözlenenlerde GC-C düzeylerinde azalma ($p=0,00$), progresyon olanlarda artma ($p=0.019$) saptandı. CK20; regrese olanlarda başlangıç değerine göre azalmadı ($p=0.062$), ama progrese olanlarda arttı ($p=0.041$). Hastaların başlangıç GC-C ile CEA ($p>0.05$), CK20 ile CEA ($p>0.05$) ve CA19.9 ($p>0.05$) değerleri arasında korelasyon saptanmazken sadece GC-C ile CA19.9 ($p=0.00$) değeri birbiriyle koreleydi.

Regresyon olanlarda GC-C ile CEA ($p=0.00$), GC-C ile CA19.9 ($p=0.00$), CK20 ile CEA ($p=0.00$), CK20 ile CA19.9 ($p=0.00$) değerleri birlikte azalış, progresyon olanlarda ise GC-C ile CEA ($p=0.00$), GC-C ile CA19.9 ($p=0.012$), CK20 ile CEA ($p=0.00$) ve CK20 ile CA19.9 ($p=0.035$) değerleri birlikte artış saptandı.

Sonuç olarak; KRK'de CEA, CA19.9 düzeyleri ile CK20 mRNA, GC-C mRNA'nın tespitinin erken evre hematogen yolla yayılarak progrese olan lezyonların belirlenmesinde kullanılabilir. Böylece erken evre KRK'li hastaların nüks gelişecek olan alt grubu için kür imkânı sağlanabilecektir. Metastatik hastalıkta tedaviye yanıtız hastaların erken belirlenerek yüksek tedavi maliyetlerinin azaltılması yanı sıra hastalara farklı tedavi seçeneklerinin daha erken uygulanması ile daha etkili tedavilerin uygun zamanda yapılabilmesi mümkün olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Guanil Siklaz C, Sitokeratin 20, Progresyon, Regresyon

VII. ABSTRACT

THE LEVEL OF GUANYL CYCLASE C AND CYTOKERATIN 20 IN PERIPHERAL BLOOD OF COLORECTAL CANCER PATIENTS ASSOCIATED WITH STAGE, PROGNOSTIC PARAMETERS AND REPLY TO THERAPY

Dr. Muhammet Akif ŞAHİN

Residency Thesis, Department of Internal Medicine

Supervisor: Prof. Dr. Celalettin CAMCI

July-2009, 76 pages

Guanylyl cyclase C (GC-C) is expressed exclusively in normal intestinal mucosal cells, and primary and metastatic colorectal cancers (CRC). This study aims to determine the level of GC-C and Cytokeratin 20 (CK20) in peripheral blood of CRC patients associated with stage, prognostic parameters and reply to therapy.

In this study, we included 49 CRC patients and 41 healthy controls with similar age and sex. Plasma GC-C and CK20 levels are measured by RT-PCR method.

A correlation between GC-C and CK20 values of all patients and control group could not be detected ($p>0.05$). Outset GC-C and CK20 values of the metastatic patients were higher in relation to control group (GC-C; $p=0.00$, CK20; $p=0.143$). After chemotherapy, a reduction in GC-C levels of the ones who had regression ($p=0.00$), and an increasement were detected in the ones who had progression ($p=0.019$). CK20 did not decrease in the

regressed ones in relation to outset values ($p=0.062$), but it increased in progressed ones ($p=0.041$).

There were no correlations between the values of outset GC-C and CEA ($p>0.05$), CK20 and CEA ($p>0.05$), and CA19.9 ($p>0.05$), but the values of GC-C and CA19.9 ($p=0.00$) were correlated. In regressed ones, the values of GC-C and CEA ($p=0.00$), GC-C and CA19.9 ($p=0.00$), CK20 and CEA ($p=0.00$), CK20 and CA19.9 ($p=0.00$) showed a decrease, and in progressed ones the values of GC-C and CEA ($p=0.00$), GC-C and CA19.9 ($p=0.012$), CK20 and CEA ($p=0.00$) ve CK20 and CA19.9 ($p=0.035$) showed increasement.

As a result, in CRC CEA, CA19.9 levels and CK20 mRNA can be used in detecting the lesions progressed by hematogenous way in early phase. In this way, a cure possibility for subgroup of the patients with CRC, which will be relapse, can be provided. In metastatic illnesses, reducing the treatment costs by early determining of the patients not responding to the treatment, as well as applying the treatments in convenient times by employing different treatment options earlier will be possible.

Key Words: Guanylyl cyclase C, Cytokeratin 20, Progression, Regression

IX. KISALTMALAR

- AJCC** → American Joint Committee Of Cancer
- APC** → Adenomatöz Polipozis Geni
- CA 19.9** → Kanser Antijen 19.9
- CEA** → Karsinoembriyjenik Antijen
- CK** → Sitokeratin
- FAP** → Familyal Adenomatöz Polipozis
- GC-C** → Guanil Siklaz-C
- GİS** → Gastrointestinal Sistem
- HNPCC** → Herediter Non-polipozis Kolorektal Kanser
- HPCC** → Herediter Polipozis Kolorektal Kanser
- IHC** → İmmünohistokimyasal
- KRK** → Kolorektal Kanser
- KT** → Kemoterapi
- MRD** → Minimal Rezidüel Hastalık
- PCR** → Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- PLAP** → Plesental Alkelen Fosfataz
- RT-PCR** → Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- STH** → Serbest Tümör Hücresi
- TNF** → Tümör Nekrotizan Faktör
- TNM** → Tümör- Nod- Metastaz

WHO → Dünya Sağlık Örgütü

X. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kolorektal karsinogenez aşamaları

Tablo 2. TNM evre gruplaması ve diğer sistemler ve sağkalım ile ilişkisi

Tablo 3. House keeping gen ve hedef genlerin primer dizileri ve problemleri

Tablo 4. Hasta ve kontrol gruplarının sosyodemografik özelliklerine göre Dağılımı

Tablo 5. Tüm hastaların KT öncesi ve sonrası GC-C, CK20, CEA, CA19.9 değerleri ve sosyodemografik özellikleri

Tablo 6. Kontrol grubundaki vakaların GC-C ve CK20 değerleri

Tablo 7. Hastaların sosyodemografik özelliklerinin ve TNM sınıflamasına Göre evrelerine ve hastalık tipine göre dağılımı

Tablo 8. Tüm hastalara uygulanan KT'lerin evrelere göre dağılımı

Tablo 9. Çalışmamızda Regresyon sağlanan hastaların GC-C, CK20, CEA ve CA19-9 değerlerinin toplu istatistiksel analizi

Tablo 10. Çalışmada Progresyon olan hastaların GC-C, CK20, CEA ve CA19.9 değerlerinin toplu istatistiksel analizi

Tablo 11. Evre- 4 KRK'li hastaların tanı sırasındaki GC-C ve CK20 Değerlerinin kontrol grubuyla istatistiksel analizi

Tablo 12. Tüm hastaların tanı anındaki GC-C, CK20, CEA ve CA19.9 değerlerinin istatistiksel analizi

Tablo 13. Dong ve arkadaşlarının çalışmasına göre markırların kombinasyonu ile vaka saptama oranları

XI. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kolon Anatomisi

Şekil 2. Adenom–Karsinom gelişim süreci

Şekil 3. İntestinal sekresyonun regülasyon mekanizması

Şekil 4. Hastaların tümör yerleşim yeri ve yaşa göre dağılımı

Şekil 5. Çalışmaya katılan hastaların TNM evreleme sistemine göre dağılımı

Şekil 6. Hastalık tipine göre klinik gidişatın gösterildiği Şema

1. GİRİŞ

Kolorektal kanserler (KRK) gastrointestinal sistemin (GİS) en sık görülen tümörleridir. Dünyada her yıl ortalama 800.000 yeni KRK tanısı konulmaktadır bu da tüm kanserlerin yaklaşık %10'u kadardır. KRK'lere bağlı yıllık mortalite ise 450.000 civarı olarak tahmin edilmektedir (1).

T.C Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı'nın yaptığı istatistiklere göre KRK, akciğer kanseri, meme kanseri ve mide kanserini takiben 4. sırada yer almaktadır. Sağlık Bakanlığının verilerine göre ülkemizde KRK görülme sıklığı %6.2 dir. Hastaların %59'u erkek, %41'i kadındır (E/K= 1.44). Erkeklerde akciğer kanseri, mesane kanseri, mide kanseri ve larinks kanserinden sonra 5. sırada yer alırken, kadınlarda over ve meme kanserini takiben 3. sırada yer almaktadır (2).

KRK'lerin klasik tedavisinde ana strateji lezyonun tamamının çıkarılmasıdır. Buna rağmen radikal rezeksiyon sonrası rezidü mikrometastaz odaklarının sebep olduğu nüksler olmaktadır. Klasik morfolojik tanı yöntemleri bu rezidü mikrometastazları saptamada yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle genetik tanı yöntemleri geliştirilmektedir (3).

Tanı anındaki kanserin evresi, sadece prognozu belirlemez aynı zamanda adjuvan kemoterapi (KT) alacak hastaları seçme konusunda da bize rehberlik eder. Lenf nodu tutulumunun klinik önemine rağmen, bölgesel lenf nodu mikrometastazlarını değerlendirebilecek sensitif ve spesifik teknikler mevcut değildir.

Mikroskopik rezidüel hastalıklar günümüzdeki histolojik yöntemlerle tespit edilemezler ve bu okült mikrometastazlar kanser hastalarındaki tedavi başarısızlığının en önemli sebebidir (4). Sistemik dolaşımdaki tümör hücrelerinin (STH) ve tanımlanması hassas moleküler biyoloji bazlı tekniklerin gelişimini gerektirmiştir (5,6).

Pek çok tümörün büyük miktarlarda DNA'yı kana salmalarının keşfi, kandaki tümör hücresi kaynaklı DNA'ların yapısal anormalliklerini tespit için polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) kullanımına öncülük etmiştir (7,8).

Guanil siklaz-C (GC-C); barsak mukoza hücrelerinin fırçamsı kenarlarında eksprese edilen, elektrolit ve sıvı sekresyonuna aracılık eden bir reseptördür (9-11).

GC-C sadece duodenumdan rektuma kadar olan barsak mukoza hücrelerinde sentezlenmektedir, barsak dışı başka bir dokuda sentezlenmemektedir (12-16). GC-C sekresyonu barsak mukoza hücrelerinin malign transformasyona uğradığı dönemde de devam etmektedir. Malign transformasyon sonrası KRK'in primer bölgesinden ve metastaz bölgelerinden GC-C sekresyonu devam etmektedir (17). Bununla birlikte GC-C GİS dışından köken alan tümörlerden sekrete edilmemektedir (12,14-18).

Sitokeratinler (CK) intrasitoplazmik iskeletin komponentlerindedir. Molekül ağırlıklarına ve izoelektrik noktalarına göre sınıflandırılmış 30'dan fazla çeşiti olan bir polipeptit ailesidir (19). CK'ler dokulara spesifik olarak dağılmıştır. Bundan dolayı immünohistokimyasal yöntemlerle çeşitli tümörlerin orjin aldığı dokuları saptamada kullanılmaktadırlar (20).

CK20 GİS epiteli için en tipik olanıdır. Yapılan bir çalışmada CK20 mRNA ile lenf nodu metastazı arasında bir ilişki kurulmuştur, bu da CK20 ekspresyonunun KRK'lerde önemli derecede spesifik olduğunu göstermektedir (3).

Bu çalışmada amaç, KRK'li hastalarda kan GC-C mRNA ve CK20 mRNA düzeylerinin hastalığın evresi, prognostik parametreler ve uygulanan tedaviye yanıt ile ilişkisini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Tümörler

2.1.1. Epidemiyoloji

KRK'ler, gelişmiş ülkelerde akciğer ve meme karsinomalarından sonra en sık ölüme neden olan malignite grubunu oluşturmakta ve insidansı birçok ülkede artış göstermektedir. KRK'de beş yıllık yaşam şansı tüm hastalar için ortalama %40 kadardır. Dünyada her yıl ortalama 800.000 yeni KRK tanısı konulmaktadır bu da tüm kanserlerin yaklaşık %10'u kadardır (1).

Yapılan otopsi çalışmalarında 50 yaş ve üzeri vakalarda;

- %0.5-2 oranında İnvaziv KRK
- %1-1.6 oranında İn situ karsinom
- %7-10 oranında 1 cm ve üzerindeki büyüklükte bir adenom
- % 25- 40 oranında herhangi boyutta adenom bulunma şansı vardır (21-24).

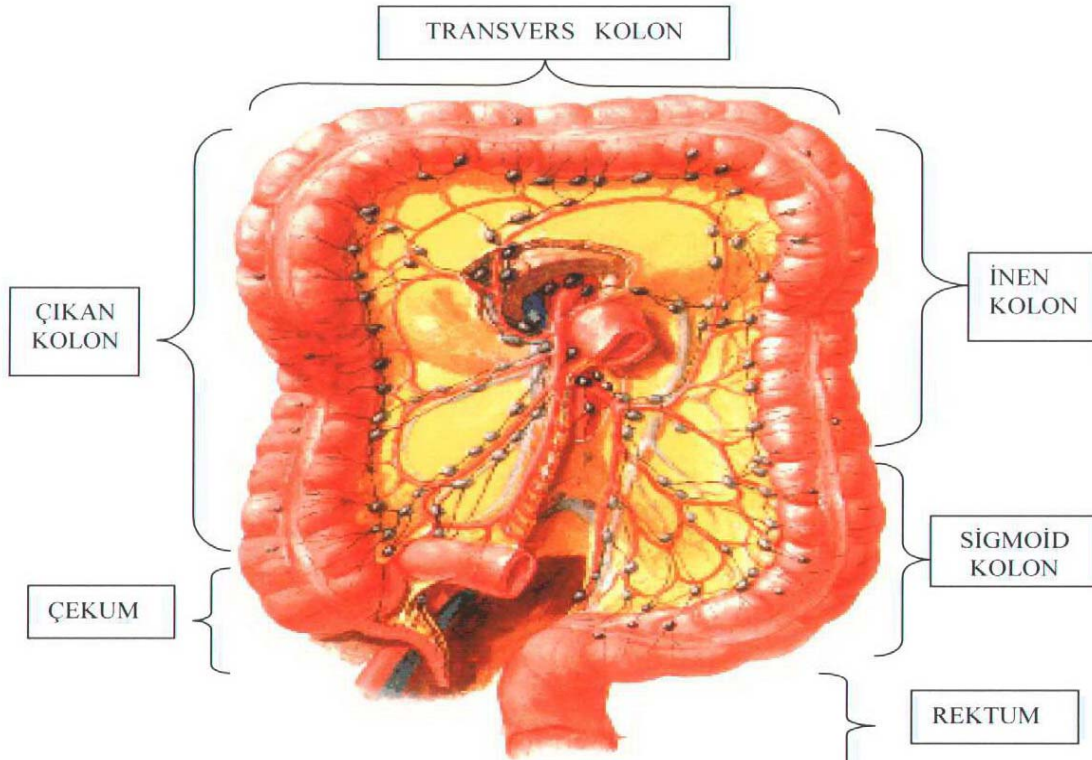
Daha çok ileri yaş grubu olan bu kanser türü 50 yaşından sonra artmakta ve 60-70 yaşlarında en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Ortalama yaş erkeklerde 63, kadınlarda 62'dir. Rektal bölgedeki tümörlerde kadın/erkek oranı 2/1 iken daha proksimalde yer alan tümörlerde cinsiyet farkı bulunmaz. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre biraz daha fazla iken kadınlarda mortalite oranı daha yüksektir. Ortalama olarak tüm KRK'lerin %25'i çekum ve çıkan kolonda, %25'i rektum, sigmoidde ve inen kolonda, %10'u transvers kolonda, %8'i çıkan kolonda, %12'si çekumda yerleşim gösterir. Senkron kanser, birden fazla bölgede aynı anda malignite bulunması durumu olup hastaların yaklaşık %2-5'inde görülür.

2.1.2. Anatomi

Kalın barsak (Şekil 1); ileumun bitiminden anüse kadar uzanır ve ortalama 150 cm uzunluğu ile sindirim kanalının 1/5'ini oluşturur. Kalın barsaklar periton içinde ve retroperitoneal alanda karaciğer, dalak, mide, duodenum, ince barsaklar, böbrekler,

üreterler ve mesane gibi çok sayıda organla komşuluk gösterir. İnce barsaklardan farklı olarak longitudinal kas liflerinin yoğunlaşmasıyla oluşan tenyalara (tenya libera, tenya omentalis, tenya mezokolika), yağ dokusundan oluşan yaprak şeklinde periton ile örtülü 'appendices epiploica'lara ve sirküler kas liflerinin oluşturduğu fonksiyonel ceplenmeler olan haustralara sahiptirler. Kalın barsak ince barsaktan daha geniştir ve ileum-çekum birleşme yerinde kalın barsak içeriğinin ince barsağa geçişini engelleyen ileoçekal valv olarak adlandırılan bir kapak bulunur.

Kalın barsak çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum olmak üzere bölümlere ayrılmıştır (Şekil 1).



Şekil-1:Kolon Anatomisi (Netter)

2.1.3. Etyoloji

2.1.3.1. Adenomlar

Kolon ve rektumun adenom veya adenomatöz polipi benign bir gelişmedir. Polipler pediküllü (saplı), sesil (düz) ya da yarı sesil (kalkık) şekilde olabilir. Baskın komponente göre tubuler adenom, tubulovillöz adenom ve villöz adenom olarak sınıflandırılırlar. Genelde çıkarılan tüm adenomatöz poliplerin %65-80'i tubuler, %10-25'i tubulovillöz ve sadece %5-10'u pür villöz adenomdur. KRK hastalarının çoğunda, benign adenomun kanser öncülü olduğu kabul edilmektedir (25).

Normal barsak mukozasından adenom, adenomdan da kanser gelişme süreci oldukça değişkendir. Adenom-karsinom sürecinde kolon mukozası aşamalardan geçerek sonuçta invaziv kansere dönüşür. Bazı faktörler normal epiteli uyararak bölünmekte olan farklılaşmamış hücrelerin kriptlerden ayrılıp villusların yüzeyine geçmesine neden olur. Bu hücrelerin mukozaya yüzeyinde sürekli proliferasyonu sonucu polip, diğer deyişle adenom oluşur. Poliferasyon sürerken bez yapıları giderek normal dokuya daha az benzerlik gösterirler ve zamanla bu düzensiz büyüme muskularis mukozayı geçip submukozayı invaze ederek invaziv kanser haline gelir. Aynı zamanda submukozayı invaze eden tümör lenfatik yolla metastaz potansiyeli kazanır (25,26).

Adenom-karsinom sürecine yönelik epidemiyolojik ve morfolojik pek çok çalışma yapılmıştır. Adenomların kansere dönüşme riski polipin çapı, sayısı, histolojik tipi ve atipi derecesi ile bağlantılıdır. Kolon kanserli hastalarda kolon adenomuna daha sık rastlanmaktadır. Kanserli hastaların %30'unda senkron polip bulunmaktadır. Büyük poliplerde küçük poliplere kıyasla daha sık kanser ya da ağır displaziye rastlanır. 2 cm üzerindeki adenomların %60'ı villöz adenomdur. Villöz adenomlarda kanser bulunma riski %40 iken; tubulovillöz adenomlarda %22, tubuler adenomlarda ise %5'dir. 2 cm üzerindeki villöz adenom, tubulovillöz adenom ve tubuler adenomda kanser riski sırasıyla %53, %46 ve %35 dir (25-27). Polipektominin kanser insidansını azalttığı gösterilmiştir (25).

2.1.3.2. Genetik Faktörler

KRK'lerin yaklaşık %10-15'inin familial olduğu ve 200 kişiden birinin kalıtsal KRK'e neden olan yüksek risk gen alleleri taşıdığı sanılmaktadır. Ayrıca sporadik kanserlerin %15'inde aynı genlerin sorumlu olabileceği düşünülmektedir (25).

KRK'lerin herediter özellikleri birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir. İlk kez 1913 yılında Aldred S. Warthin, bazı ailelerde kanser sıklığının fazla olduğunu fark etmiştir. Son yıllarda KRK'in genetiği hakkında önemli ilerlemeler elde edilmiştir.

Bu ilerlemelerin çoğu Familyal Adenomatöz Polipozis (FAP) ve Herediter Nonpolipöz Kolorektal Kanser (HNPCC) gibi ailesel KRK'ler üzerinde yapılan çalışmalar sonucu olmuştur (26).

Herediter KRK'ler; herediter polipöz kolorektal kanserler (HPCC) ve herediter nonpolipöz kolorektal kanserler (HNPCC) olarak adlandırılırlar. HPCC; polipozis zemininden gelişen KRK'lerdir. Sporadik vakalara oranla daha genç yaşlarda görülürler. Senkron ya da metakron KRK'ler şeklinde görülür. Polipozis zemininde gelişen KRK'ler; FAP, Gardner (epidermal inklüzyon kistleri, kemikte osteomalar ve kolonik polipler), Turcot (kolonik polipler ve beyin tümörleri) ve Herediter flat (yassı) adenom sendromunda olduğu gibi otozomal dominant geçiş gösteren sendromlarda daha sık görülmektedir (26,27).

2.1.3.2.1. Familyal Adenomatöz Polipozis (FAP): Kolonda 100'ün üzerinde adenomatöz polip bulunması ya da FAP ailesi bireylerinden birinde herhangi bir sayıda adenom saptanması ile tanı konur. Sorumlu olan genetik defekt 5. kromozom üzerinde q21 lokusunda bulunmaktadır. Bu gen APC (adenomatöz polipozis geni) olarak adlandırılır (25).

2.1.3.2.2. Herediter Nonpolipöz Kolorektal Kanserler (HNPCC); Polipozis sendromları ile ilişkisiz olup Lynch sendromu olarak adlandırılırlar. Özelliği otozomal dominant bir kalıtım modeli göstermesi, KRK gelişme yaşının erken olması, kanserlerin çoğunlukla sağ tarafta yerleşik olması, senkron ve metakron kanser eğiliminin bulunmasıdır. Bunlar kolon dışı tümörlerle birlikte olup olmamalarına göre 2 alt gruba ayrılır.

Lynch-I, kanser sıklıkla proksimal kolonda olup o aile içinde bölgeye özgündür ve o ailede oluşacak tek tip tümördür. Otozomal dominant geçiş gösterir, senkron ya da metakron olabilir.

Lynch-II, kolorektal, endometrial, gastrik, üst üriner traktüs, over ve diğer kanser tipleri ile karakterizedir (25,26).

HNPCC tanısı için en geniş kabul gören tanımlama 'Amsterdam kriterleri' olarak geçen 'International Collaborative Group on Hereditary Non poliposis Colorectal Carcinoma' (ICG-HNPCC) esasları şu şekilde belirtilmiştir:

- En az üç akrabada histolojik olarak kanıtlanmış KRK bulunması, bunlardan biri diğerlerinden biri ile birinci dereceden akraba olması
- KRK'lerin en az iki jenerasyonda bulunması
- Hastalardan en az birine 50 yaşından önce KRK tanısının konulması (25-27).

HNPCC hastalarındaki kanserler sporadik KRK'e göre daha sık az diferansiye ve müsinözdür. Taşlı yüzük tipi de bu tümörlerde daha sıktır. Bu sıklıkla kötü prognozla birlikte görülen bulgulara rağmen, HNPCC bulunan hastalarda prognoz aynı patolojik evredeki sporadik KRK'lere göre daha iyidir (25).

2.1.3.3. Diyet, Endojen ve Eksojen Karsinojenler

Diyetin KRK oluşumunda önemli bir etiyolojik faktör olduğu sanılmaktadır. Obezite, özellikle abdominal obezite ve artmış vücut kitle indeksi, KRK riski ve mortalitesinde artışla ilişkilidir. Doymamış hayvansal yağlar, yüksek doymuş bitkisel yağlar içeren düşük lifli ve yüksek kalorili beslenme kolonik mukozada kanser gelişimini uyarabilen birtakım değişikliklere sebep olur. Kolon mukoza epitel hücrelerinin rejenerasyon direncinin ve mukus kalitesinin kaybına neden olur. İntraluminal mikroflora ve içeriği değişip, epitel hücre membranlarında yağ asit oranının yükselmesine, lipid peroksidasyon radikallerinin artmasına yol açar. Ayrıca sitokinler, prostaglandinler, interlökinler, tümör nekroz faktör-alfa (TNF) ve nitrik oksit gibi iltihabi mediyatörler mukoza epitel destrüksiyonunun kalıcı hale gelmesine neden olur. Bazı çalışmalar diyetdeki belli elementlerin neoplazik gelişmeleri önleyici olduğunu göstermektedir. Selenyum, dithiothionlar, thioeterler, terpenler ve karotenoidlerin kolon mukoza yüzeyindeki serbest oksijen radikallerini indirgeyerek 'antikarsinojen' etki gösterdikleri olasıdır (25-27).

Halen araştırma aşamasında olan diğer bazı potansiyel karsinojenler; safra asitleri (kenodeoksikolik asit gibi), gıda katkı maddeleri, alkol ve iyonize edici radyasyondur (25).

Safra asitinin barsakta artması ile KRK arasında ilişki olduğunu gösterdikten sonra sekonder safra asiti artışına yol açan kolesistektominin de etken olabileceği

ileri sürülmüştür. Servikal, uterin ya da prostatik tümör nedeniyle radyoterapi alan hastalarda, en sık rektal tümörler gelişir (28).

2.1.3.4. Mesleki Faktörler

Tahta ve metal tozları, plastik, gaz, organik çözücüler, çimento, cam elyafına ve asbeste maruz kalan çalışanlar arasında diğer solid tümörlerle birlikte KRK gelişme riski artmıştır.

2.1.3.5. İdiopatik İnflamatuvar Barsak Hastalıkları

İnflamatuvar barsak hastalığı, özellikle ülseratif kolitte pankoliti olan hastalarda kanser insidansı 10 yıldan sonra yılda %1'dir (25). Ülseratif kolit, nedeni tam olarak açıklanamayan idiyopatik kronik inflamatuvar barsak hastalığıdır. Aktif periyotlar sırasında alevlenen kriptit, kript abseleri ve ülserasyonun neden olduğu hızlı proliferasyon ve rejenerasyon, zamanla displazinin eklenmesi ile kalıcı hale gelir. Kolonoskopik muayeneler sırasında erken dönemde displazinin saptanması zor olduğundan kanserler sıklıkla ileri evrede yakalanır. Yaklaşık %35'i Duke's C ve D tümörlerdir (25-27). Crohn hastalığı olan hastalarda KRK riski 20 yılda yaklaşık %7'dir (25).

2.1.3.6. Üreterosigmoidostomi, İleostomi ve Anastomozlar

Üreterosigmoidostomisi olan hastalarda, sigmoid kolonda KRK geliştiği gösterilmiştir. Bu bileşkede, transisyonel hücreli karsinomlar, indiferansiye karsinomlar, juvenil ve/veya adenomatöz polipler gelişebilir (27).

2.1.4. Kolorektal Tümör Tipleri

Kolorektal tümörlerde histolojik tipler (WHO);

- **Epitelyal tümörler**

- **-Adenom**

- Tubuler
- Villöz
- Tubulovillöz

- Serrated

-İntra-epitelyal neoplazi (displazi)

- Kronik inflamatuvar hastalıkla ilişkili
- Düşük dereceli glandüler intraepitelyal neoplazi
- Yüksek dereceli glandüler intraepitelyal neoplazi

-Karsinom

- Adenokarsinom
- Müsinöz adenokarsinom
- Taşlı yüzük hücreli karsinom
- Küçük hücreli karsinom
- Adenoskuamöz karsinom
- Medüller karsinom
- İndiferansiye karsinom

-Karsinoid (iyi diferansiye endokrin neoplazm)

- EC-hücre, serotonin üreten tümör
- L-hücre, glukagon benzeri peptid ve PP/PYY üreten tümör
- Diğerleri

-Mikst karsinoid-adenokarsinom

-Diğerleri

- **-Epitelyal dışı Tümörler**

-Lipom

-Leiomyom

-Gastrointestinal stromal tümör

-Leiomyosarkom

-Anjiosarkom

-Malign melanom

-Diğerleri

-Malign lenfoma

- Marjinal zon B-hücreli lenfoma
- Mantle hücreli lenfoma
- Diffüz büyük B-hücreli lenfoma
- Burkitt lenfoma
- Diğerleri

Sekonder tümörler

Polipler

-Hiperplastik (metaplastik)

-Peutz-Jeghers

-Juvenil

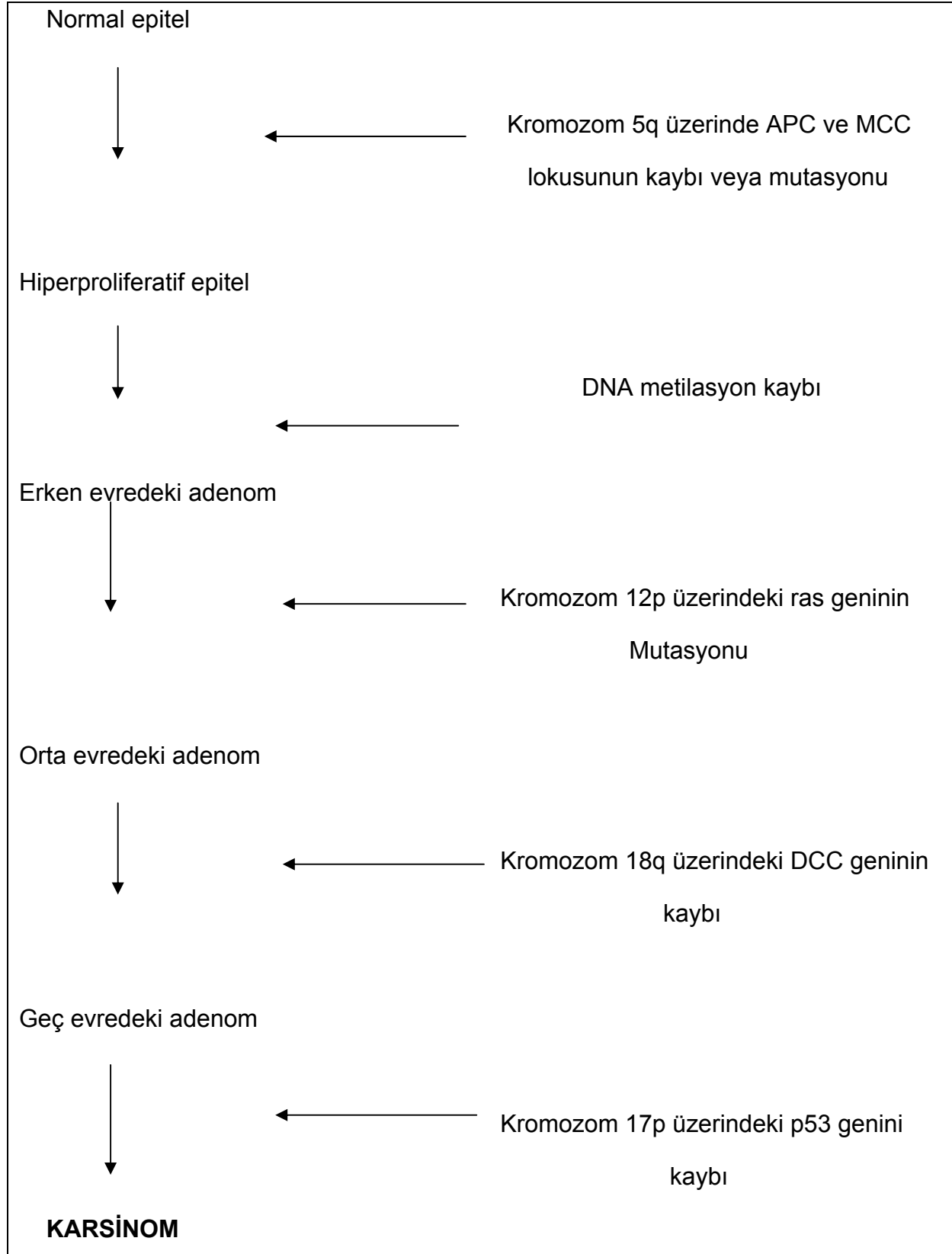
2.1.5. Adenom - Karsinom İlişkisi

Kolorektal adenokarsinomların önceden varolan adenomlar veya displazi alanlarından geliştiğine dair güçlü deliller vardır (29).

- Adenom ve karsinomların barsaktaki dağılımları benzerdir.
- Kolon karsinomunun yoğunlukta olduğu şehirlerde adenom ve karsinomun prevalans oranı korelasyon gösterir.
- Adenomlu hastalarda karsinom sıklığı artmıştır.
- Karsinom içeren kolonlarda adenomlar artmış sıklıktadır.
- Hastanın artan yaşıyla, atipi derecesinin ve invaziv kanser alanlarının artması
- Laboratuvar hayvanlarında adenom ve karsinomun oluşturulabilmesi
- Endoskopik olarak çıkarılan adenomlar ile beklenen karsinom insidansının azaltılması
- Tüm FAP'li hastalarda, adenomlu kolon çıkartılmadığı sürece kanser gelişmesi
- Adenom alanları dışında in-situ karsinomun yokluğu
- Adenom ve karsinom arasında direk geçiş alanları bulunması
- Endoskopik olarak adenomu belirlenen hastalarda, tedavi kabul etmemeleri sonucunda zamanla aynı bölgede invaziv karsinom gelişmesi
- Adenomatöz ve karsinomatöz dokuda aynı kromozomal yapının bulunması
- Adenom ve karsinomların enzim paternlerinin benzerliği
- Benign adenomların DNA içeriği normal kolon ve kanser arasındadır (29).

Adenoma karsinoma şeklinde oluşan aşamalı kolorektal karsinogenez, Vogelsteinn'in belirttiği gibi, Tablo 1'de gösterilmiştir (30,31).

Tablo 1. Kolorektal karsinogenez aşamaları (30,31).



2.1.6. Klinik Bulgular

KRK'in bulgu ve semptomları farklı ve nonspesifiktir. En sık semptomlar, rektal kanama, barsak alışkanlığında değişme ve karın ağrısıdır. Semptomların dikkat çekici olup olmaması veya semptomların türü, tümörün yeri ve boyutu ile ilişkilidir. KRK'ler yıllarca asemptomatik de kalabilirler. Çekum ve sağ kolondaki kanserler genelde halsizlik, yorgunluk ve demir eksikliği anemisi ile kendilerini gösterirler. Sol taraftaki lezyonlar ise, gizli kanama, barsak alışkanlıklarının değişimi ya da sol alt kadranda kramp şeklinde ağrı gibi şikayetlere neden olurlar. Postmenopozal bir kadın ya da erişkin bir erkekte demir eksikliği anemisi oluşursa KRK'den kuşkuyla ilgili gerekli tanı araştırmaları yapılmalıdır (25,27,32,33).

Alt kadranda ağrısı daha dar olan sol kolon tümörlerinde görülür. Ağrı kramp tarzındadır, dışkılamadan sonra hafifleyebilir. Bu hastalarda büyük olasılıkla barsak alışkanlığında değişme ve dışkıda parlak kırmızı kan görülür (25,32).

Kalın barsak kanserinin daha az sıklıkla rastlanan semptomları kilo kaybı ve ateştir. Kilo kaybı hiçbir zaman KRK'in tek belirtisi değildir.

Septisemi, nadir olmakla birlikte kalın barsak tümörünün herhangi bir evresinde oluşabilir; Streptokokus bovis bakteriyemisi KRK varlığının kuvvetli bir göstergesidir (25).

KRK'li hastaların önemli bir kısmı kalın barsak obstrüksiyonu ve perforasyonunun akut semptomları ile ortaya çıkabilir. Kolon perforasyonu özellikle yaşlı hastalarda yüksek kanser olasılığını gösterir.

Hastaların yaklaşık %5'inde primer tümör sessiz kalabilir ve hastalarda kemik ağrıları, sarılık, patolojik kırıklar, nörolojik bulgular, tromboflebitler ve deri nodülleri gibi metastaz bulguları görülebilir. Sigmoid kolon veya inen kolon ile mesane arasında kolovezikal fistül, transvers kolon tümörlerinde mideye fistül (gastrokolik fistül), rektum tümörlerinde üretra veya vajene fistül gelişimi görülebilir (25,27,32,34).

2.1.7. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Bulgular

Histokimyasal olarak KRK'lerin büyük bir çoğunluğu musin ile pozitif boyanırlar (35). İmmunhistokimyasal olarak ise değişmez şekilde keratin reaktivitesi gösterirler. Genel olarak CK20 ile pozitif boyanırken CK7 ile reaktivite göstermezler.

Bu durum KRK'lerin akciğer ve over gibi diğer adenokarsinomlardan ayrımında oldukça önemlidir. Benzer şekilde karsinoembriyjenik antijen (CEA) reaktivitesi de

KRK'ler için kuraldır. Adenokarsinomda CEA ile boyanma olmaması kolonun primer tümörü_tanısından uzaklaştırır. İmmunhistokimyasal patern ile serum seviyeleri arasında iyi bir korelasyon vardır, ancak tümörün evre ve diferansiasyonu arasında ilişki yoktur (34,35).

Tümörle ilişkili glikoprotein (TAG-72); monoklonal antikor B 72.3 ile tanımlanır. Bu antikor, invaziv KRK'lerin %100'ünde bulunmasının yanısıra hiperplastik ve adenomatöz poliplerin büyük bir çoğunluğunda hatta normal mukozada da bulunur (34-36).

Tümörle ilişkili başka bir antijen olan LEA (Large external antigen) tümör dokusunda ve KRK'li hastaların serumlarında gösterilmiştir (35).

KRK'ler kan grubu izoantijen kaybı ve HLA-A,B,C ekspresyonu gösterir. İyi diferansiye tümörlerde daha güçlü immunreaktivite izlenir (34,35).

KRK'lerin büyük çoğunluğu hCG ile reaktivite gösterir. Bu özellik, musinöz ve kötü diferansiye tümörlerde daha belirgin görülür. PLAP (Plasental alkalen fosfataz) %10 vakada pozitif bulunmuştur (35).

Ultrastrüktürel olarak KRK'lerin belirgin bir özelliği, mikrofilament birikimlerinin hücre membranına dik olarak yerleşmesi ve fırçamsı kenarlara doğru girmesidir. Bu özellik tanıda yardımcıdır fakat diagnostik değildir. Aynı zamanda mide, ince barsak, safra kesesi ve pankreasın intestinal tip adenokarsinomlarında da görülür (34-37).

2.1.8. Moleküler Genetik

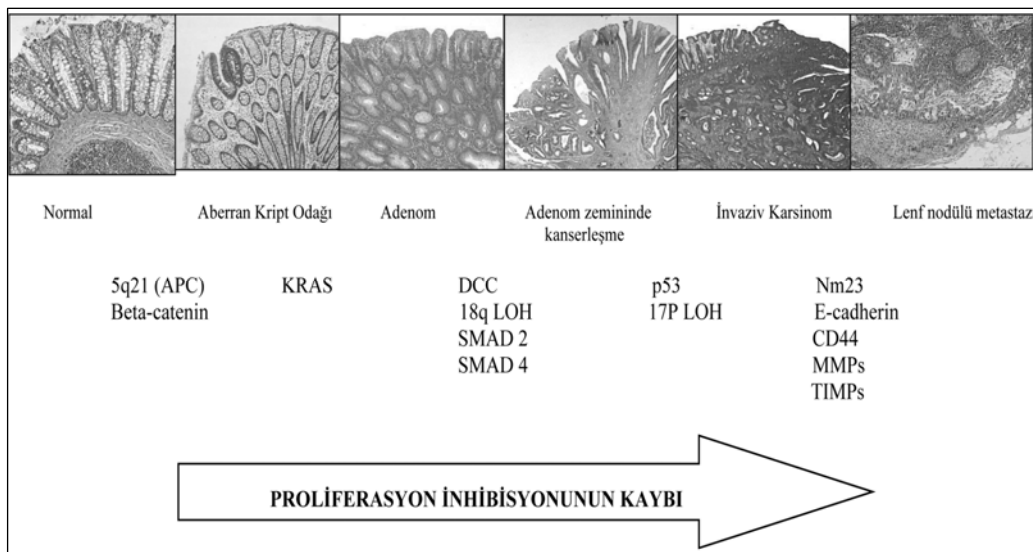
Kalın barsağın ailesel karsinomlarının çeşitli tiplerinin tanımlanmasıyla bu tümörlerle ilişkili bazı genetik değişiklikler de keşfedilmiştir. Bunu, sporadik KRK'lerde meydana gelen somatik mutasyonların gösterilmesi takip etmiştir. Bu genlerin en önemlileri APC, mismatch tamir genleri, P53, k-ras ve DCC'dir (35,37).

Spesifik olarak, DNA mismatch tamir genlerinin kaybı sonucu mikrosatellit adı verilen tekrarlayan kısa DNA dizileri, DNA replikasyonu sırasında dengesizleşir ve bu durum tekrarlayan dizilerde devam ederek mikrosatellit dengesizliği oluşturur. Mikrosatellit dengesizlik, hatalı DNA mismatch tamirinin moleküler işaretidir.

Mikrosatellit dizilerinin çoğu genlerin kodlama yapmayan bölgeleri üzerinde bulduklarından bu genlerde meydana gelen mutasyonlar zararsızdır (Şekil 2). Bununla birlikte, bazı mikrosatellit dizileri, hücre büyümesinin regülasyonu ile ilişkili genlerin kodlama yapan bölgelerinde yer alırlar. Bu genler arasında tip II TGF-beta reseptörü ve BAX'da vardır. TGF-beta sinyalizasyonu kolon epitel hücrelerinde büyümeyi engeller. BAX geni ise apoptoza neden olur. Mismatch tamir genlerinin kaybı, bu genlerde ve diğer büyüme regülasyonu yapan genlerde mutasyonların birikmesine ve KRK'lerin ortaya çıkmasına yol açar. Mismatch tamir defektinden kaynaklanan tümörlerde, proksimal kolon yerleşimi, müsinöz histoloji ve lenfosit infiltrasyonu gibi bazı morfolojik özellikler de tespit edilmiştir. Bu tümörler genel olarak, aynı evredeki APC/Beta-catenin yolundan kaynaklanan tümörlerden daha iyi prognoza sahiptirler (35,37,38). KRK'lerin patogeneğinde önemli rol oynayan diğer bir grup molekül E-kaderin ve katenindir. Beta-katenin APC proteini ile ilişkilidir ve adenom karsinom sürecinin tüm evrelerinde regülasyonu bozulmuştur. E-kaderin ve alfa-katenin ekspresyonu lokal invazyon ve metastaz ile korelasyon gösterir (34,35).

P53 mutasyonu moleküler tekniklerle KRK'lerin önemli bir kısmında tespit edilmiş olup; bu anormal gen ile kodlanan ve immunhistokimyasal tekniklerle ortaya konan proteinlerin aşırı üretimi p53 mutasyonu ile korele bulunmuştur (35,37,38).

Ras onkojen mutasyonları, KRK'lerin az bir kısmında özellikle de metastatik grupta görülür. Bu genin ekspresyonu immunhistokimyasal olarak gösterilebilir. C-myc onkojen ekspresyonu artışı ise vakaların %90'ında görülür (37).



Şekil 2. Adenom-Karsinom gelişim süreci

KRK'lerin artmış proliferasyon aktivitesi Ki-67 ve PCNA boyaları, AgNOR sayımı ve basit mitotik sayım ile S fazının tespitine dayalı olarak ölçülebilir. Bu tür sayımlar mikroskopik olarak tespit edilen grade ile çok korele değildir ancak kendine ait prognostik önem taşır (35,37,38).

2.1.9. Tümör Yayılımı ve Metastaz

Tüm KRK'ler çevre dokulara direkt olarak invazyon ile ya da lenfatikler ve kan damarları ile metastaz yaparak yayılırlar. Metastatik yayılım en sık bölgesel lenf düğümleri ve karaciğerde görülür. Lenf düğümü metastazı, az diferansiye alanlar içeren ve yüksek infiltratif büyüme paterni gösteren tümörlerde daha sıktır. Lenf bezinde tutulum varsa, lenf bezinin yakınındaki dokuların incelenmesi gerekir. Bu, tümörün lenf düğümü kapsülünü aşarak çevre venlere invazyonunu tespit açısından önemlidir (34,35,39).

Lenf düğümünün mikrometastazı; kademeli hematoksilen eosin kesitler, immünohistokimyasal olarak CK ve diğer markerlerin boyanması, CK19/20 için ya da mutant K-ras geni için PCR tekniğiyle tespit edilebilir (34,35). Karaciğer metastazı kan damarı invazyonunun yaygın bir göstergesidir (35).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; KRK'li hastalarda GC-C mRNA, histopatolojik tanıdan bağımsız olarak lenf düğümlerindeki mikrometastazların değerlendirilmesini sağlayabilmektedir. Burada asıl önemli olan ise RT-PCR yöntemiyle, lenf nodunda GC-C mRNA saptanması KRK'lerin mortalitesini direkt olarak etkilediğinin gösterilmiş olmasıdır (40,41).

Diğer sık görülen metastaz bölgeleri; periton, akciğer ve overlerdir. Over metastazının insidansı, KRK'in rezeksiyonu sırasında postmenopozal kadınlarda bilateral oofektomi yapmayı gerektirecek kadar yüksektir. Daha nadir metastaz bölgeleri santral sinir sistemi, kemik, testis, uterus ve oral kavitedir (34-36,38,39).

2.1.10. Evreleme

KRK'lerde evreleme sistemi ancak tümör rezeke edildikten ve cerrahi eksplorasyonla anatomik inceleme sonrası yayılma boyutu belirlendikten sonra uygulanabilir. Tanı anındaki kanserin evresi, sadece prognozu belirlemez aynı

zamanda adjuvan KT alacak hastaları seçme konusunda da bize rehberlik eder. Evrelemenin diğer bir amacı ise yaşam süresini öngörmektir.

KRK'ler ilk kez Cuthbert Dukes tarafından 1929'da bir evreleme sistemiyle değerlendirilmiş olup bu sistemin modifiye şekli geliştirilmiştir. Bu sistem orijinal olarak rektal kanser için tanımlanmış daha sonra tüm kolon için kullanılmış ve geniş kullanım alanı bulmuştur. Bu sistem prognozla ilgili olup survi ile lokal tümör derinliği, yayılımı ve nodal metastaz arasında ilişki kurmaktadır. KRK'lerin tedavilerinin düzenlenmesi ve prognozlarının belirlenmesi amacıyla histoloji, makroskopi, uzak ve yakın metastaz kriterleri dikkate alınarak birtakım evrelendirmeler yapılmıştır. Bunların en önemlileri Dukes, Astler-Coller ve American Joint Committee'nin TNM sınıflamasıdır (Tablo 2).

2.1.10.1. Astler-Coller sınıflandırması: Duke's sınıflamasının modifikasyonu ile yapılmıştır.

A → Mukozada sınırlı tümör

B1 → Lenf nodu metastazı olmadan muskularis propriaya kadar tümör tutulumu

B2 → Lenf nodu metastazı olmadan barsak duvarını aşan tümör tutulumu

C1 → Barsak duvarını aşmamış tümör ile beraber lenf nodu metastazı

C2 → Barsak duvarını aşmış tümör ile beraber lenf nodu metastazı

D → Uzak organ metastazı

2.1.10.2. TNM Sınıflandırması:

Primer Tümör (T):

Tx → Primer tümör bilinmeyen

T0 → Primer tümör olmayan

Tis → İn situ karsinoma

T1 → Tümör mukoza ve submukozadadır.

T2 → Tümör muskularis propriadadır.

T3 → Tümör tüm barsak duvarını tutmuştur.

T4 → Tümör serozayı aşmış çevre dokuları tutmuştur.

Bölgesel Lenf Nodu (N):

Nx → Lenf nodu bilinmeyen

N0→ Lenf nodu metastazı olmayan

N1→ Perikolik veya perirektal 1-4 lenf nodu metastazı

N2→ Perikolik veya perirektal 5 ve daha fazla lenf nodu metastazı

N3→ Ana arter kökünde lenf nodu metastazı

Uzak Metastaz (M):

Mx→ Uzak metastazı bilinmeyen

M0→ Uzak metastazı olmayan

M1→ Uzak metastazı olan

Tablo 2. TNM evreleme ve diğer evreleme sistemlerinin karşılaştırılması ve sağkalım ile ilişkisi

TNM evrelemesi	TNM kriteri	Dukes	Astler-Coller	5 yıllık sağ kalım oranları
Evre 0	Tis, N0, M0	A	A	%100
Evre 1	T1, N0, M0	A	B1	%90
	T2, N0, M0	A	B1	%80
Evre 2	T3, N0, M0	B	B2	%45
	T4, N0, M0	B	B2	%55
Evre 3	Herhangi bir T N1-3, M0	C	C1/ C2	%40
Evre 4	Herhangir bir T Herhangi bir N M1	D	D	> %5

2.1.11. Tanı

2.1.11.1. Fizik Muayene: Dikkatli bir fizik muayenenin KRK tanısında önemi büyüktür. Batın muayenesinde palpabl kitle tespit edilebilir. İnguinal bölgede lenfadenomegali olup olmadığı kontrol edilmelidir. Ayrıca tüm hastalara mutlaka rektal tuşe yapılmalıdır. KRK'lerin %60'ının rektosigmoid bölgede yerleşim gösterdiği düşünülürse, rektal muayenenin önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

2.1.11.2. Baryumlu Kolon Grafisi: KRK tanısında en sık kullanılan tanı yöntemlerinden biridir. Çift kontrast kolon grafisi daha doğru sonuçlar verir. Baryumlu grafi çekilmeden önce barsak temizliği çok iyi yapılmalıdır. Yine de bazı lezyonlar atlanabilir. Hatalı değerlendirmeler %15 oranında görülebilir.

2.1.11.3. Rektosigmoidoskopi: KRK'lerinin yaklaşık %55-60'ı rektosigmoid bölgede lokalizedir. Bu nedenle rektosigmoidoskopinin tanıda önemi büyüktür. Fleksibl sigmoidoskop ile 60 cm'lik kolon kısmı incelenebilir. Ayrıca lezyondan biyopsi alma imkânı da sağlar.

2.1.11.4. Kolonoskopi: Kolonun fiberoptik endoskop ile incelenmesi bütün kolonun görüntülenmesine imkân veren çok önemli bir tetkiktir. Lezyondan biyopsi almanın yanı sıra kolonun başka bir yerinde patoloji olup olmadığının tespit edilmesine imkân verir. Ayrıca radyolojik olarak şüpheli lezyonların kesin tanısında da önemli bir yer tutar.

Hastalığın evresinin belirlenmesi için diğer tetkiklerden yararlanılır. Karaciğer ve abdominal lenf nodu tutulumunu belirlemek amacıyla batın ultrasonografisi ve bilgisayarlı tomografi, üreter ve böbrek invazyonunu belirlemek için IVP çekilmelidir. Akciğer ve kemik metastazlarını araştırmak için akciğer grafisi ve kemik sintigrafisi tetkikleri yapılmalıdır.

2.1.11.5. Laboratuvar: CEA ilk kez 1965'de kolon kanserli dokularda ve insan fetus barsağında tespit edilmiştir. KRK'li hastaların %97'sinde yüksek bulunmuştur. Uzun süre sigara içenlerde, inflamatuvar barsak hastalıklarında, meme ve prostat kanserlerinde de CEA seviyeleri yükselebilir. CEA'nın KRK'lerin erken tanısında yeri yoktur. Ancak hastaların izlenmesinde faydalıdır.

Ameliyat sonrasında giderek yükselen CEA seviyesi nüks veya metastaz açısından anlamlıdır. Ayrıca prognostik bir değeri vardır. Artmış CEA seviyelerinin yüksek rekürrens oranını gösterdiği bildirilmektedir (35-37).

CA 19.9 da KRK'lerde tümör belirleyici olarak kullanılmaktadır. Ancak CEA'e üstünlüğü kanıtlanamamıştır.

2.1.12. Tedavi

KRK'lerin tedavisinde tümörün yerleşimine ve evrelemeye göre cerrahi, KT ve radyoterapi uygulanır. Tedavideki altın standart cerrahidir. Cerrahi esnasında metastaz saptanırsa, kanama ve obstrüksiyon gibi komplikasyonları önlemek için palyatif amaçla primer tümörün rezeksiyonu yapılır.

KRK'lerde patolojik evreye bağlı olarak yüksek lokal rekürrens ve uzak metastaz yapma potansiyeli nedeni ile adjuvan tedavi gerekli olmuştur. KRK'lerde tümörün davranış şekli ve nüks bölgesi tümörün ilk yerleşim yerine göre değişiklik göstermektedir. Peritoneal katlantının üzerinde batın içi boşlukta yer alan kolonda tedavi başarısızlığı lokal tümör yatağından ziyade tüm karını kapsar. Peritoneal katlantı altında kalan rektum kanserlerinde ise lokal nüks insidansı daha yüksek olmaktadır. Farklı klinik davranış göstermeleri nedeni ile primer cerrahi sonrası kolon ve rektum kanserlerine adjuvan yaklaşım farklı olmaktadır.

2.1.12.1. Rektum Kanserlerinde Adjuvan Tedavi

Tek başına küratif cerrahi sonrası karşılaşılan lokal-bölgesel başarısızlık ve buna bağlı olarak azalan genel ve hastaliksız sağ kalım oranları nedeniyle rektum kanseri tedavisinde radyoterapi önemli bir yere sahiptir ve halen güncelliğini korumaktadır.

Rektum kanserlerinde radyoterapi lokal-bölgesel nüksleri engellemek için postoperatif olarak, büyük tümörleri cerrahi rezeksiyona uygun hale getirmek ve rezektabl olgularda tümör hacmini azaltarak organ koruyucu cerrahiyi mümkün kılmak için preoperatif (neoadjuvan), lokal ileri evre veya medikal inoperabl olgularda primer (definitif) olarak, metastatik tümörlerde de lokal semptomlara yönelik olarak palyatif amaçlarla uygulanmaktadır.

Tam cerrahi rezeksiyon sonrası yüksek oranda lokal veya sistemik başarısızlık ve düşük sağ kalım oranı beklenen hastalar adjuvan tedavi için adaydır. Rektal duvar boyunca primer tümörün uzanımı ve lenf nodları tutulumu veya her ikisinin bir arada olması bölgesel ve sistemik başarısızlık için yüksek risk faktörüdür. Muskularis propria ve perikolik yağ dokusu invazyonu olan, komşu yapılarda ve lenf nodlarında tutulum bulunan, cerrahi sınırı salim olmayan veya yetersiz bulunan olgularda postoperatif radyoterapi endikasyonu vardır.

2.1.12.2. Kolon Kanserlerinde Adjuvan Tedavi

Kolon kanserlerinde patolojik evre ve lokal başarısızlığın tam rezeksiyon sonrası sağ kalım üzerinde etkili parametrelerdir. Lokal-bölgesel başarısızlık riski hastalığın lokal yaygınlığına yani tümörün patolojik evresine bağlıdır. Barsak duvarını aşmamış erken evre tümörlerde cerrahi rezeksiyon yeterli olup, adjuvan tedavilere gereksinim yoktur. Modifiye Astler-Coller B3 ve C3 evresindeki hastalar, acil operasyona alınan vakalar, perfore vakalar adjuvan KT almalıdır.

2.1.13. Prognoz

Çoğu geniş serilerde KRK'lerin, küratif rezeksiyondan sonra 5 yıllık sağ kalım oranı %40-60 arasındadır. Rekürrenslerin %71'i ilk iki yılda, %91'i beş yılda meydana gelir (35-37).

KRK'lerde kliniko-patolojik prognostik faktörler şunlardır:

2.1.13.1. Yaş: Çok genç ve çok yaşlı hastalarda görülen tümörler kötü prognozla ilişkilidir. Gençlerdeki kötü prognoz, tanıdaki gecikme, zeminde ülseratif kolit varlığı, taşlı yüzük hücreli ve müsinoz karsinomların daha sık görülmesi ile ilişkilidir (34-36,39,42).

2.1.13.2. Cinsiyet: Yapılan çalışmalarda prognoz, kadınlarda erkeklerden biraz daha iyi olduğu saptanmıştır (32-36).

2.1.13.3. Serum CEA düzeyi: 5.0 ng/ml'den yüksek serum CEA seviyelerinin, tümörün evresinden bağımsız olarak prognoz üzerine kötü etkisi olduğu gösterilmiştir (35-37).

2.1.13.4. Tümör lokalizasyonu: Prognoz üzerine etkisi tartışmalıdır. Yapılan bir çalışmada, sol kolon karsinomlarının daha iyi prognozlu olduğu, sigmoid kolon ve rektumda olanların ise kötü seyirli olduğu gösterilmiştir.

Başka bir çalışmada ise tümör lokalizasyonunun prognostik öneminin minimal olduğu sonucu elde edilmiştir (34-36).

2.1.13.5. Birden fazla tümör odağı varlığı: KRK'ler multifokal olabilirler. Sekron ya da metakron malignitesi olan hastaların sağ kalım oranı, soliter KRK'li hastalarinki ile benzerdir (35).

2.1.13.6. Lokal yayılım: Polipte insidental olarak yakalanmış fokal mikroskopik karsinomda, tümör genelde mukoza ve submukozaya sınırlı olduğundan prognoz çok iyidir. Tümör, serozaya yayıldığında ve bölgesel lenf bezlerini tuttuğunda prognoz kötüleşir (34-36,39).

2.1.13.7. Tümör boyutu: Tümör boyutu ile prognoz arasında korelasyon olmasına rağmen, bunun güvenilir prognostik faktör olmasını engelleyecek kadar çok istisnası vardır. Tümör boyutu ve lenf nodu metastazı ilişkisi de benzer şekilde zayıftır (35,37).

2.1.13.8. Obstruksiyon: Dukes'a göre evrelenen bazı serilerde obstruksiyon, bağımsız kötü prognostik faktör olarak bulunmuştur (35).

2.1.13.9. Perforasyon: Barsak duvarında yaygın tümör invazyonu sonucu oluşan perforasyon prognozu kötüleştirmektedir (35).

2.1.13.10. Tümör sınırları ve inflamatuvar reaksiyon: Ekspansif sınırlı ve tümör ile komşu doku arasında inflamatuvar yanıt oluşturan tümörler daha iyi prognozludur. Bazı tümörler barsak duvarı içinde lateral olarak yayıldığı için, proksimal-distal ya da lateral sınırlarda tümör kalmamasına özen gösterilmelidir. Bu durumda büyük olasılıkla lokal nüks gelişir. Rektal karsinomlarda barsak duvarı boyunca lokal yayılım, kanıtlanmış prognostik göstergedir. Total mezorektal rezeksiyon sonrası tümör, radial cerrahi sınıra 2 cm'den yakınsa lokal nüks olasılığı artar (35,36).

Belirgin peritümöral lenfosit infiltrasyonu ve Crohn'a benzer şekilde müküler tabaka ya da perikolik dokuda lenfoid agregat varlığı iyi prognozla ilişkilendirilmiştir.

Tümör stromasının eosinofiller ve S-100 protein eksprese eden dentritik hücreler ile infiltrasyonu da iyi prognoz göstergesidir (35,36).

2.1.13.11. Vasküler invazyon: Vasküler invazyon varlığında, beş yıllık sağ kalım süresi belirgin azalma gösterir. Bu ektramural damarlarda olduğu zaman, barsak duvarında lokalize olanlardan daha önemli prognostik bulgudur. Lenfatik invazyon, kan damarı invazyonundan daha az önem taşımakla birlikte ileri evre hastalarda yaygın olarak bulunması durumunda prognozu kötüleştirir (34-37,39).

2.1.13.12. Perinoral invazyon: Perinoral invazyon genellikle ilerlemiş hastalığa işaret eder ve diğer kötü prognostik bulgularla birlikte olma eğilimindedir (34-36).

2.1.13.13. Mikroskopik tümör tipi: Tümörün prognozu ile histopatolojik tipi ve diferansiyasyon derecesi arasında kuvvetli bir ilişki vardır. Musinoz karsinom, taşlı yüzük hücreli karsinom ve anaplastik karsinom klasik adenokarsinomlara göre kötü prognozludur (35).

2.1.13.14. Asiner morfoloji: Mikroasiner büyüme paterni, bağımsız bir prognostik faktör olmamakla birlikte kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (35).

2.1.13.15. Nöroendokrin hücre varlığı: Adenokarsinomlarda endokrin hücre varlığının prognoz yönünden olumsuz etkisi olduğu bildirilmiştir (35-37).

2.1.13.16. Müsin ile ilişkili antijenler: Müsin ile ilişkili olan sialyl-Tn ve sialyl-Lewis(x) antijenlerini eksprese eden karsinomlar daha agresif klinik seyir gösterirler (35).

2.1.13.17. Hücre proliferasyonu: Hücre siklusunun S-fazında ölçülmüş yüksek proliferatif aktivitenin kötü prognozla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (35).

2.1.13.18. Lenf nodu tutulumu: Tümör lenf düğümlerine yayıldığında beş yıllık sağ kalım oranı belirgin bir düşüş gösterir. Tutulan lenf bezi sayısının fazla olması, bunların tümör apikalinde ve mezenter damar köklerinde olması ve perikapsüler yayılım bulunması kötü prognoz göstergesidir.

Pozitif lenf nodu sayısı 6'dan fazla ise beş yıllık sağ kalım oranı %10'dan daha azdır. İmmunhistokimyasal ya da moleküler tekniklerle tespit edilen mikrometastazlar da kötü prognozla ilişkilendirilmekle birlikte bu konu halen tartışmalıdır. Parakortikal immunoblastlar ve/veya sinus histiyositlerinde artma şeklinde hücrel immunité bulguları izlenen lenf düğümü olan KRK'li hastaların sağ kalımı, bu değışiklikleri içermeyenlere göre daha uzundur (35-37,39,43).

2.1.13.19. Evre: KRK'lerde prognozu belirlemede en önemli bulgu, lokal yayılıma, lenf nodu tutulumuna ve uzak metastaz olup olmadığına dayanan evrelemedir (35-37,39,43).

2.1.13.20. Anjiogenez: Neovaskülarizasyon, tümör büyümesinde kritik bir rol oynar. Mikrodamar düzeyinin yüksekliği kötü prognostik faktör olarak yorumlanmıştır. KRK'lerde birbirinden bağımsız çalışmalarda anjiogenezin, nüks gelişimini öngördüğü ve sağ kalımda azalma ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (35-37,43).

2.2. Serbest Tümör Hücrelerinin Kanserdeki Önemi

Hematolojik malignensilerin tedavisinde, periferal kanda minimal rezidüel hastalığın (MRD) saptanması bizlere çok büyük açılımlar kazandırmıştır (44). Solid tümörler konusunda ise kanda STH'lerinin varlığının metastatik yayılım için gerekli (45,46) fakat yeterli olmadığı konusunda tartışmalar halen sürmektedir (47). Periferik kandaki STH'leri ilk olarak 19. yy'da T.R. Asworth tanımlamış ve S. Paget çoğalabilir seçici metastatik tümör hücrelerinin hedef organlara yerleşmesi olarak ifade edilen "seed and soil" hipotezini ortaya atmıştır. Bu hipotez, solid tümörlerin farklı moleküler yapı ve metastatik potansiyellere sahip genetik olarak heterojen alt hücre popülasyonlarından oluştuğuna işaret eden bir model olarak halen geçerliliğini korumaktadır (48,49).

Mikroskopik rezidüel hastalık günümüzdeki histolojik yöntemlerle tespit edilemezler ve bu okült mikrometastazlar kanser hastalarındaki tedavi başarısızlığının en önemli sebebidir (4). STH'lerin malign doğası tümöre özgü kromozomal farklılıklar (50) ile diğer genetik değışikliklerin tanımlanmasıyla (51,52) ve ayrıca in vitro ortamda kanser hücresine benzer şekilde davranmalarının tespiti ile ortaya konmuştur (53). Günümüz verilerine göre malign hücreler kemik iliği (47,54-58) ve lenf nodlarına (58-61) yerleşmekte, Mocellin'in önerdiği ismiyle solid tümörlerin

“lökemik fazi” (46) olarak nitelendirilebilecek şekilde periferik kan dolaşımına katılabilmektedir (50,53,62-65). Bu teoriye göre karsinomlu hastaların periferik kanlarında STH tespiti klinik (66,67), prognostik (68-75) ve teropotik açıdan (76-80) potansiyel bir öneme haizdir. Bu da gösteriyor ki bu hücreleri tespit edebilecek yeterli sensitivite ve spesifiteye sahip metodların geliştirilmesi gerekmektedir. Sistemik dolaşımdaki STH’lerinin pek çoğunun yok edilmesi (5,6) ve periferik kandaki miktarlarının çok düşük olması nedeniyle hassas moleküler biyoloji bazlı tekniklerin gelişimini gerektirmiştir. Genel kabule göre STH’ler dolaşımda konvansiyonel metodlarla tespit edilemeyecek derecede küçük sayılarda bulunmaktadır. STH’ler, yaklaşık $1 \times 10^{5-7}$ periferik kan mononükleer hücresinde 1 tane tümör hücresi olacak şekilde saptanabilmektedirler.

Pek çok tümörün büyük miktarlarda DNA’yı kana salmalarının keşfi, kandaki tümör hücresi kaynaklı DNA’ların yapısal anormalliklerini tespit için PCR kullanımına öncülük etmiştir (7,8). Alternatif olarak, reverse transcription PCR (RT-PCR) tümör doku-spesifik gen ekspresyonlarını tespit için kullanılmıştır. RT-PCR, diğer tanımlama metodlarıyla ilişkili olarak ortaya çıkan sensitivite azlığı probleminin üstesinden gelebilir ancak epitelyal-spesifik mRNA seçimi zordur. Bu alandaki çalışmalar çoğunlukla meme kanseri ile yapılmıştır ve KRK’le ilgili sadece birkaç çalışma vardır (81-91). Yakın zamandaki Zieglschmid ve arkadaşlarının yapmış olduğu derlemede belirttiği gibi (92), epitelyal-spesifik mRNA belirteçlerini saptamaya yönelik metodlarının bu noktada güvenilir olmadığı ve ek çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucu çıkmıştır.

2.3. Guanil Siklaz-C Tanımı Ve Kanslerle İlişkisi

GC-C; barsak mukoza hücrelerinin fırçamsı kenarlarında eksprese edilen ve elektrolit ve sıvı sekresyonuna aracılık eden bir reseptördür (9-11). GC-C sadece duodenumdan rektuma kadar olan barsak mukoza hücrelerinde sentezlenmektedir. Barsak dışı başka bir dokuda sentezlenmektedir (12-16). GC-C sekresyonu barsak mukoza hücrelerinin malign transformasyona uğradığı dönemde de devam etmektedir. GİS dışından bir yerden köken alan tümörlerden sekrete edilmemektedir (12,14-18).

Malign transformasyon sonrası KRK’in primer bölgesinden ve yeri fark etmeksizin metastaz bölgelerinden GC-C sekresyonu devam etmektedir (17). Diğer

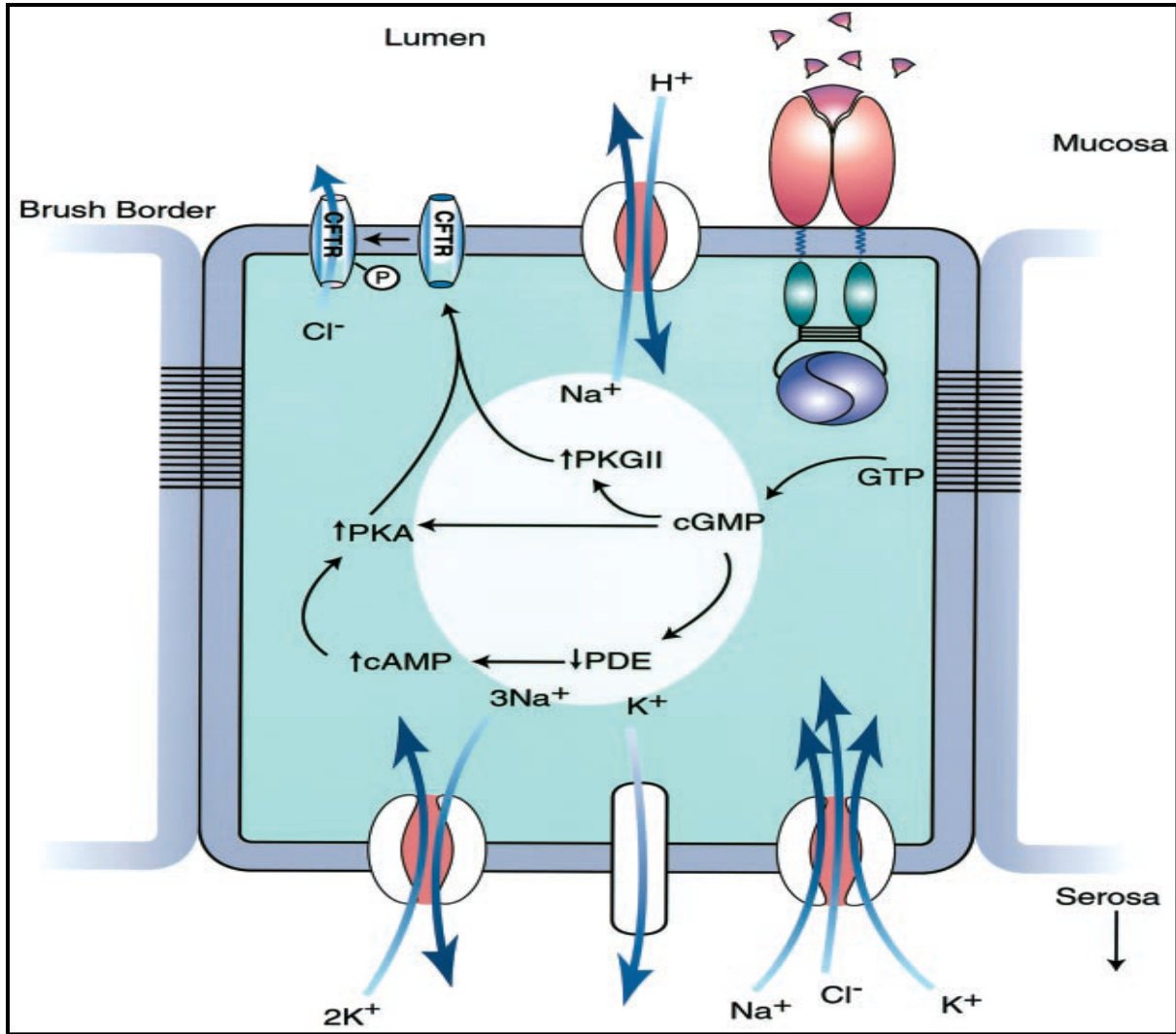
yandan 2000'li yılların başında tanımlanan hücre proliferasyonu düzenleyici rolleriyle birlikte bakteriyel enterotoksinler, GC-C bazlı kalsiyum bağımlı bir sinyal yolu aracılığıyla kolon karsinomu hücrelerini baskıladığı saptanmıştır. Endojen GC-C ligandları, guanilin ve üroguanilin normal barsakta bu yolu aktive edip, kript-villus eksenini boyunca enterositlerin proliferasyondan diferansiyasyona geçişini sağlıyor olabilir (93) Ek olarak, bu gözlemler, Enterotoksijenik Escherichia Coli'nin endemik olduğu coğrafi bölgelerde görülen KRK direncine olası mekanistik bir yaklaşım sunabilir.

Isıya dayanıklı enterotoksinler, bakteriler tarafından salınan normal intestinal fiziolojiyi düzenleyen mekanizmaları bozan moleküler taklidin bir örneğidir. Isıya dayanıklı enterotoksinler guanilin ve uroguanilini içeren geniş bir peptid ailesinin üyeleridir. GC-C agonistleri endojen olarak memeli barsağında üretilir (94-97). Sekans homolojisini paylaşan bu peptidler zincir içi disülfid bağlarıyla sabitlenmiş tersiyer yapıdadırlar ve (pato) fizyolojik etkilerini GC-C'ye bağlanıp cGMP salınımını uyararak göstermektedirler. Mide, duodenum ve jejunumda yüksek oranda sentezlenen uroguanilin, asidik pH'da guanilinden 100 kat daha potenttir (98,99). Karşıt olarak ileum ve kolonda daha sık olan guanilin pH 8.0 civarında uroguanilinden 4 kat daha güçlüdür (98,99).

Guanilin'e benzer peptidler ve GC-C her ne kadar intestinal sistemde sıvı ve elektrolit dengesi üzerinde düzenleyici bir etki gösterse de bu reseptörün normal intestinal fiziolojideki kesin rolü belirsizliğini korumaktadır. GC-C geniş bir filogenetik ekspresyon sergiler ve bu durum korunumu düzenleyen evrimsel bir baskının varlığını düşündürmektedir. Barsakta GC-C, kript-villus eksenini boyunca ekspresse edilir ve en yoğun olarak enterositlerin proliferasyondan diferansiyasyona geçtiği villus'un orta kısmından ekspresse edilmesi GC-C'nin bu geçişte düzenleyici bir rol oynadığını düşündürmektedir (100,101). Ayrıca GC-C ekspresyonu, KRK varlığındaki guanilinin azalması durumunda da yüksek oranda korunmuştur. Ek olarak oral uroguanilin, kolon kanseri fare modellerinde polip formasyonunu azaltmaktadır. Birlikte ele alındığında, bu gözlemler, GC-C ve enterosit proliferasyonunun düzenlenmesi arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir.

KRK'in epidemiyolojisinde çeşitli faktörler gösterilmesine rağmen (102,103), barsaktaki endojen GC-C ligandların ekspresyonunun azalmasını takiben epitelyal hücrelerin neoplastik transformasyonu ile karakterize bu antiproliferatif yolun varlığı

anlamlıdır (104-106). Ayrıca KRK'lerce GC-C'nin kendisinin ve akışın devamını sağlayacak efektörlerinin korunumu, bu sinyal kaskadının tekrar sağlanması ve tümör supresör fenotipin devamı açısından terapötik bir hedef oluşturur. Bununla birlikte GC-C ligandlarının veya kalsiyum gibi efektörlerin oral olarak verilmesi intestinal neoplazmin önlenmesi ve/veya KRK metastazlarının tedavisi için bir yaklaşım sunar (107-110) (Şekil 3).



Şekil 3. İntestinal sekresyonun regülasyon mekanizması

Primer tümörden köken alan ve uzak metastazlara yol açtığı düşünülen STH'leri, hastaların prognozunda önemli rol oynamaktadır.

Sonuç olarak bunların saptanması; evrelemede, prognozun belirlenmesinde ve tedavinin planlanmasında önemli rol oynamaktadır.

STH'leri uzak metastazları oluşturmada ve hastalığın tekrarlamasında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle dolaşımdaki STH'lerini saptamak hem prognozun belirlenmesinde hem de cerrahi sonrası adjuvan tedavinin planlanmasında önemli rol oynamaktadır. Dolaşımdaki STH'lerini saptamak için birçok teknik uygulanmıştır. Bunlar immüno-histokimyasal teknikler, ELİSA, filow sitometri ve RT-PCR gibi yöntemleri kapsamaktadır.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar göstermiştir ki kandaki STH'lerini saptamada RT-PCR yöntemi diğer alışlagelmiş sitolojik ya da immünohistokimyasal yöntemlere göre daha duyarlı bulunmuştur (111,112).

RT-PCR yöntemiyle periferik kanda saptanan GC-C mRNA, hastalığın progresyonunu erken dönemde saptanmasında ve prognozun belirlenmesinde histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlere göre daha fazla yarar sağlamaktadır (113).

Yapılan tüm bu çalışmalar göstermiştir ki; KRK'li hastalarda GC-C mRNA, histopatolojik tanıdan bağımsız olarak lenf düğümlerindeki mikrometastazların değerlendirilmesini sağlayabilmektedir. Burada asıl önemli olan ise RT-PCR yöntemiyle, lenf nodunda GC-C mRNA saptanması KRK'lerin mortalitesini direkt olarak etkilediğinin gösterilmiş olmasıdır (47,114).

RT-PCR ile kanda GC-C mRNA analizi, daha önce gösterilmiş olan lenf nodlarındaki mikrometastazların saptanmasında sensitivite ve spesifitesi sayesinde, belki de hastalığın evrelemesindeki yanılma oranlarını azaltabilir (115).

Benzer şekilde, periferik kandaki GC-C mRNA ekspresyonunu saptayarak KRK nedeniyle opere olan hastalarda rekürrensleri önceden tahmin edebiliriz (115). Periferik kandan elde edilen GC-C mRNA'nın ekstraintestinal dokulara metastaz yapmış KRK'lerin saptanmasında kullanılması önerilmiştir (116).

2.4. Sitokeratin 20 Tanımı ve Kanslerle İlişkisi

CK'ler; intrasitoplazmik iskeletin komponentlerindedir. Molekül ağırlıklarına ve izoelektrik noktalarına göre sınıflandırılış 30'dan fazla çeşidi olan bir polipeptit ailesidir (19). CK'ler iki gruba ayrılırlar:

Tip I CK'ler asidik proteinlerden oluşur ve CK9'dan CK23'e kadar olan CK'leri içerirler. Tip II CK'ler alkalidirler ve CK1'den CK8'e kadar olan CK'ler bu gruba girerler (117).

Tüm CK'ler, 1A, 1B, 2A ve 2B gibi dört helikal segmentten meydana gelen benzer molekülleri içerirler. Ayrıca, ligand segmentleri adı verilen L1, L2 ve L12 gibi kısa non-helikal segmentlerle ayrılırlar. Temel CK'lerde helikal ve değişken segmentler arasında H1 ve H2 gibi varolan segmentler bulunurken ekstremitelerde, V1 ve V2 gibi değişken segmentler bulunmaktadır (117-119).

CK'lerin hepsi dokulara spesifik olarak dağılmıştır. Bu sebepten dolayı immünohistokimyasal yöntemlerle çeşitli tümörlerin köken aldığı dokuları saptamada yararlıdırlar (20).

CK6 ve CK16 epidermiste, hiperproliferasyon görülen durumlarda (sedef hastalığı veya epiteliyal tümör) eksprese edilmektedirler, bu yüzden hiperproliferatif CK olarak da adlandırılırlar. Epidermis, interferon gamma, epiteliyal büyüme faktörü (EGF) ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi sitokinler tarafından ultraviyole radyasyonu ile uyarıldığında CK6'nın deneysel indüksiyonu gösterilmiştir. Daha sonra ise CK19 da indüklenmekte ve CK ekspresyonunun dinamik durumu ortaya konmaktadır (120,121).

Patolojik olarak lenf nodu metastazı saptanmayan vakalarda immünohistokimyasal yöntemlerle aynı lenf nodlarında mikrometastazlar gösterilebilir. Bu durum kanserin rekürensisi ve prognozuyla direk ilişkilidir (122). Asıl zor olan karaciğerdeki mikrometastazları göstermektir. STH'lerinin kanda dolaştığı KRK'li hastalarda karaciğerinde içinde bulunduğu uzak organ metastazları yüksek sıklıkta görülmektedir. Bu da dolaşımdaki STH'lerinin tespitinin kanserin rekürenslerine yardımcı olacağına işaretidir (20).

CK20 gastrik ve bağırsak epitelyumunda, ürothelyumda ve merkel hücrelerinde eksprese edilen tip I keratindir. CK20 olgun enterositlerin ve goblet hücrelerinin majör hücresel proteinidir ve özellikle gastrik ve barsak mukozasında eksprese edilirler. Aynı zamanda kolon, mide, pankreas adenokarsinomlarında eksprese edilirler ve musinöz over tümörlerinde, transizyonel hücre ve merkel hücrelerinde bulunurlar. Skuamöz hücre karsinomlarında, göğüs, akciğer ve endometriyumun adenokarsinomlarında, musinöz olmayan over tümörlerinde ve küçük hücre karsinomlarında bulunmazlar.

CK20 ekspresyonu diferansiyasyonla ilişkilidir ve süperfisiyal veya intermediate hücrelerde sınırlıdır. Mesane kanser hücrelerinde bu restriksiyon kaybolur ve CK20 ekspresyonu her katmanda görülebilir (123). CK20 immunositolojisi "transisyonel hücreli karsinom"un özellikle evre T1, grade 2 ve 3 tümörleri ortaya çıkarmada standart sitolojiden daha hassastır. Non-invaziv papiller transisyonel hücreli karsinom da CK20 ekspresyonunun dağılımı incelenmiş ve tümör rekürensini önceden haber verdiği bulunmuştur. İdrar örnekleri alınan mesane kanserli olgularda CK20 mRNA'nın, normal ürotelyal doku veya normal idrar örneklerine göre dikkate değer bir şekilde yüksek düzeylerde eksprese edildiği gösterilmiştir (124).

Malign tümörlerin köken aldığı hücre ve doku tipini saptamada CK ailesi özellikle CK7 ve CK20 önemli yer tutmaktadır. Mesela CK7 primer akciğer adenokarsinomunda %97-100, primer kolon adenokarsinomunda %5-7 oranında eksprese edilmektedir. Tam tersi olarak CK20 primer akciğer adenokarsinomunda %7-10 oranında, primer kolon adenokarsinomunda %92-100 oranında eksprese edildiği rapor edilmiştir (125-127).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmanın tanımı

Bu kesitsel klinik çalışmada KRK'li hastalarda periferik kanda GC-C ve CK-20 mRNA düzeyleri ile hastalık evresi, prognostik parametreler ve tedaviye yanıt arasında ilişki olup olmadığını araştırdık. Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurulu 07/08/2008 tarih ve 08-2008/150 sayı numaralı onayı alınarak yapıldı. Tüm hastalar çalışma hakkında bilgilendirildi ve yazılı olurları alındı.

3.2. Hastaların seçimi

Çalışmaya Ağustos 2008 ile Aralık 2008 tarihleri arasında histopatolojik olarak KRK tanısı alan ve Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniğine başvuran 49 hasta alındı. Aynı yaş ve cinsiyet dağılımına sahip sağlıklı 41 kişi kontrol grubu olarak seçildi.

3.2.1. Çalışmaya dahil edilme kriterleri

- ✓ Erken evre ve metastatik KRK tanısı almış hastalar
- ✓ ECOG PS 0-2 arasında olanlar
- ✓ Kemoterapi alması için gerekli laboratuvar ve fizik muayenesi uygun değerlendirilmiş olanlar
- ✓ Beklenen yaşam süresi 1 yıl ve üzerinde olanlar
- ✓ Çalışmaya katılmak üzere gönüllü olur vermiş olanlar

3.2.2. Çalışma dışı bırakılma kriterleri

- ✓ Beklenen yaşam süresi 6 ay veya daha kısa olanlar
- ✓ Merkezi sinir sistemi metastazı saptananlar
- ✓ Kemoterapi süresince tedaviye uyum sağlama problemi olacağı düşünülenler
- ✓ ECOG PS 3-4 olan hastalar

Hastaların tüm muayeneleri poliklinikte aynı doktor tarafından yapıldı. Ek şikâyetleri sorgulandı. Poliklinik şartlarında fizik muayeneleri yapıldı.

3.3. RNA izolasyonu

Kan örneklerinden RNA izolasyonu High Pure RNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak yapıldı. Örnekler hücre sayısı 1×10^6 hücreye ayarlanarak PBS (fosfat tampon çözeltisi) ile 200 μL 'ye sulandırıldı. Üzerine 400 μL lysis/binding tampon (4.5 M guanidine-HCl, 50 mM tris-HCl, triton X-100, pH 6.6) eklenerek 15 saniye vorteksledi. Karışım polipropilen filtreli tüplere aktarıldı ve 15 saniye 8000xg hızda santrifüj edilerek filtreden geçen kısım atıldı. 90 μL DNase tamponu (1M NaCl, 20 mM tris-HCl, 10 mM MnCl₂, pH7,0) ve 10 μL DNase I (10 KU) karışımı hazırlanarak filtre üzerine dökülüp 15 dakika oda ısısında bekletildi.

Filtre üzerine 500 μL birinci yıkama çözeltisi (5 M guadin hidroklorid, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6) eklenerek 15 saniye 8000xg hızda santrifüj edilerek filtreden geçen kısım atıldı. Filtre üzerine 500 μL ikinci yıkama çözeltisi (20 mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7.5) eklenerek 15 saniye 8000xg hızda santrifüj edilerek filtreden geçen kısım atıldı. Filtre üzerine yine 200 μL ikinci yıkama çözeltisi eklenerek 2 dakika 13000xg hızda santrifüj edilerek filtreden geçen kısım atıldı. Filtre yeni bir toplama tüpüne geçirilerek üzerine 100 μL steril çift distile su eklenerek 8000xg hızda santrifüj edilip filtreden geçen kısım toplandı. Elde edilen RNA UV spektrofotometre ile ölçüldü.

3.4. Reverse Transkriptaz PCR Yöntemi ile cDNA eldesi

RNA örneklerden cDNA sentezi First Strand cDNA sentez (AMV) kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak yapıldı. Reaksiyon için 2 μL 10x reaksiyon tamponu (100 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8.3), 4 μL MgCl₂ (25 mM), 2 μL deoksinükleotid karışımı (dATP, dCTP, dTTP, dGTP, her birinden 10 mM), 2 μL random primer (0.02 A260 ünite/ μL), 1 μL RNase inhibitör (50 ünite/ μL), 0.8 μL AMV reverse transkriptaz, 1 μL örnek RNA, 7,7 μL distile su karışımı hazırlandı. Karışım tehne PCR cihazına koyularak 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 60 dakika, 99°C'de 5 dakika ve 4°C'de 5 dakika bekletildi. Elde edilen cDNA -80°C'de çalışma yapılıncaya kadar saklandı.

3.5. PCR Aşaması

Göreceli gen sayımında, çalışılacak her örnek için iki farklı karışım hazırlanır. Karışımlardan ilki “house keeping” gen adı verilen ifadesi sabit gen primerlerini içerirken, ikincisi ifadesi ölçülecek gene ait primerleri içerir. Yani tüm örnekler hem incelenecek genle hem de ‘housekeeping gen’le çoğaltım yapılır. Bu ikinci örnek iç kontrol olarak da adlandırılmaktadır. PCR sonunda araştırılan genin değeri, iç kontrol genin değerine oranlanarak ölçülür ve düzenlenir. PCR sonucu elde edilen ürünlerin gerçek PCR ürünü olup olmadığı “erime eğrisi” yöntemi ile kontrol edilmelidir. Erime ısı (T_m), bir çoğalma ürünü genin %50’sinin denatüre olduğu sıcaklık değeridir ve bu değer genin dizisine ve %GC oranına bağlı olarak farklılık gösterir. Erime eğrisi yöntemi de bu özellikten yararlanarak, PCR sonunda elde edilen çoğalma eğrilerinin gen ürünü mü yoksa primer dimer ya da ortam kirliliğine bağlı bir eğri olup olmadığını belirler.

3.6. Primer ve Probların Tasarımı

Hedef genlerin ifade tayini için Tablo 3’de verilen primer ve problar tasarlandı. Primer ve probların tasarımı için www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl web sayfası kullanıldı. Buradan elde edilen diziler Pubmed NCBI nükleotid dizileri ile karşılaştırılarak doğrulukları tespit edildi. Primerler IDT (Integrated DNA Technologies, Belçika) firmasına sentezletirildi. Çalışmada Universal Probe Library (UPL) probları kullanıldı (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya). UPL probları 8-9 nükleotidlik kısa dizileri olarak, kilitli nükleotid (Locked Nucleic Acid; LNA) teknolojisi kullanılmıştır.

Tablo 3. House keeping gen ve hedef genlerin primer dizileri ve probları

Gen	Primer Dizisi	UPL Probe	NCBI nükleotid no
HPRT 1	5'-tgacctgatttatttgcatacc-3' 5'-cgagcaagacggttcagtcct-3'	Probe 23	NM_000194.1
GGC	5'-gcattggagttcactctggtc-3' 5'-aatagacaataacgagcatcttg-3'	Probe 67	NM_004963.2

3.7. Real-Time PCR Tepkimesi

Real time PCR tepkimesi için 14 µL distile su, 0,2 µL UPL probe (10 µM), 0.4 µL forward primer (10 µM), 0.4 µL reverse primer (10 µM), 4 µL Lightcyler Taqman master (faststart Taq DNA polimeraz, tampon, MgCl₂, dNTP karışımı), 1 µL örnek cDNA karışımı hazırlandı. Hazırlanan karışım kapiller tüplere aktarıldı. Kapiller tüpler LightCycler® 2.0 real time PCR cihazına yerleştirildi. 95°C'de 10 dakika denatürasyon yapıldı. Daha sonra 45 döngü amplifikasyon için 95°C 10 s denatürasyon, 60°C 30 s anealing, 72°C 1 s ekstansiyon yapıldı. Son aşamada bir döngü 40°C 30 s tutulup PCR sonlandırıldı.

3.8. CK20 gen ifadesi tayini

3.8.1. Human PBGD (porphobilinogen deaminase)

Elde edilen cDNA'ların housekeeping gen (porphobilinogen deaminase) düzeylerini belirlemek için Light Cycler (ROCHE) kullanılarak RT (Real-Time) - PCR yapıldı. 1 Human PBGD (porphobilinogen deaminase)(ROCHE) kiti kullanıldı. 10 µL'lik PCR karışımı için; 6 µL H₂O, 2 µL primer set, 2 µL Fast Start DNA Master Sybr Green I (premixed) (10 µL Fast start enzyme ve 64 µL Fast Start Reaction mix) kullanıldı. Light Cycler kapillere 10 µL'lik PCR karışımı ve 10 µL cDNA ilave edildi. Light Cycler kapiller 750 rpm'de 5 sn. spin yapıldı. Light Cycler kapiller, Light Cycler rotoruna yerleştirildi. 95°C'de 10 dakika denaturasyon sonrasında 35 döngü amplifikasyon için denaturasyon (95°C 10 sn), anealing (68°C 10 sn), ekstansiyon (72°C 16 sn) yapıldı.

3.8.2. Human Cytokeratin 20(CK20)

Human CK20 (ROCHE) kiti kullanıldı. 10 µL'lik PCR karışımı için; 6 µL H₂O, 2 µL primer set, 2 µL Fast Start DNA Master Sybr Green I (premixed) (10 µL Fast start enzyme ve 64 µL Fast Start Reaction mix) kullanıldı. Standart Light Cycler kapillere 10 µL'lik PCR karışımı, 1:10, 1:100, 1:1000 oranlarında dilüsyon serilerinden 10 µL eklendi. Negatif kontrol Light Cycler kapillere, 10 µL'lik PCR karışımı ve 10 µL H₂O ilave edildi. Hasta grubu Light Cycler kapillere 10 µL'lik PCR karışımı ve 10 µL cDNA ilave edildi. Light Cycler kapiller 750 rpm'de 5sn. spin yapıldı.

Light Cycler kapiller, Light Cycler rotoruna yerleştirildi. 95°C`de 10 dakika denaturasyon sonrasında 45 döngü amplifikasyon için denaturasyon (95°C 10 sn), anealing (68°C 10 sn), ekstansiyon (72°C 16 sn) yapıldı.

3.9. CEA ve CA19.9 tespiti

Hastaların periferik kanlarından Immulite 2000 cihazı kemiluminesens yöntemi ile CEA ve CA19.9 tespiti yapıldı.

3.10. İstatistiksel analizler

Verilerin kaydı ve istatistiksel analizlerde SPSS 13.0 programı kullanıldı. Sonuçlarda sürekli sayısal değişkenler için ortalama±standart deviasyon (SD) verildi. Karakter değişkenler için değişkenlerin yüzdesi verildi. İstatistiksel analizde parametrik test için uygun olmayan şartlarda non-parametrik testler kullanıldı. İki bağımsız grup arasındaki karşılaştırmalar, sayısal değişkenlerde Wilcoxon Signed Ranks Testi ve Mann-Whitney U–testi ile yapıldı. Gerekli yerlerde Pearson’s korelasyon testi kullanıldı. Değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi olarak $p<0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'nda takip edilen 27'si rektum kanseri ve 22'si ise kolon kanseri tanısı olan toplam 49 hasta alındı. Kontrol grubunda ise 18'i kadın 23'ü erkek olmak üzere toplamda 41 tane daha önceden bilinen kronik bir hastalığı olmayan ve ailesinde bilinen bir kanser öyküsü bulunmayan gönüllüler alındı.

Çalışmaya alınan hastaların yaşları 31 ile 78 arasında olup, ortalama yaş 53.65 ± 12.17 yıl olarak saptandı. Kontrol grubunda ise en küçük yaş 37, en büyük yaş 80 olmak üzere ortalama yaş 52.27 ± 10.63 ' idi. Çalışmaya alınan hastaların 15'i kadın, 34'ü erkekti. Hastaların hastalık tipine, evresine ve cinsiyete göre dağılımı Tablo 4'de görülmektedir. Hasta grubunun tedavi öncesi GC-C mRNA kopya sayısı ortalaması 3.508 ± 17.702 ' idi. Kontrol grubundaki 41 kişi GC-C mRNA değeri sıfır olarak saptandı (Tablo 5,6,7, Şekil 4).

49 hastanın KT öncesi CK20 mRNA kopya sayısı ortalaması 3.508 ± 17.702 , kontrol grubundaki 41 vakanın 7'sinde CK20 mRNA değeri sıfırın üzerindeydi ve kontrol grubunun CK20 mRNA ortalaması 5.499 ± 12.279 idi.

Tablo 4. Hasta ve kontrol gruplarının sosyodemografik özelliklerine göre dağılımı

	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
Sayı	49	41
Yaş (yıl)	53.65 ± 12.17	52.27 ± 10.63
Cinsiyet (K/E)	15 / 34	18 / 24
GCC mRNA (kopya sayı ort.)	3.508 ± 17.702	0.000
CK 20 mRNA (Kopya sayısı)	3.183 ± 14.698	5.499 ± 12.279

Tablo 5. Tüm hastaların KT öncesi ve sonrası GC-C mRNA, CK20 mRNA, CEA, CA19.9 değerleri ve sosyodemografik özellikleri

Hasta no	Evre	Cevap	GC-C 0	GC-C 3	CK20-0	CK20-3	CEA-0	CEA-1	CA19.9-0	CA19.9-1
1	4	R	4.51	0.00	0.00	0.00	5094.00	460.00	582.00	159.00
2	4	R	0.00	0.00	0.00	0.00	20.00	11.50	8.00	13.90
3	3	R	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	3.29	4.00	7.70
4	4	R	0.00	0.00	0.00	0.00	56.00	3.00	67.00	12.00
5	3	R	2.26	0.00	1.85	0.00	1.00	2.00	5.00	0.00
6	2	R	0.20	0.00	2.38	0.00	2.00	3.00	0.00	0.00
7	4	R	0.00	0.00	0.00	0.00	7.00	5.00	14.00	9.00
8	3	R	0.00	0.00	0.00	0.00	3.00	2.00	5.00	8.00
9	4	R	0.12	0.24	0.00	0.55	2870.00	30.00	0.00	0.00
10	4	R	123.97	0.39	0.78	0.00	8.00	28.00	384.00	296.00
11	4	R	0.64	0.00	1.85	0.00	21.00	9.00	0.00	22.00
12	2	R	1.78	0.25	0.00	0.00	11.00	2.00	240.00	6.00
13	3	R	3.61	0.00	0.00	0.00	18.00	1.00	54.00	24.00
14	2	R	5.48	0.00	25.70	0.00	3.00	4.00	10.00	10.00
15	3	R	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	3.00	14.00	57.00
16	2	R	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	2.00	11.00	0.00
17	4	R	0.00	0.00	0.00	0.00	4.00	22.00	0.00	55.00
18	4	R	0.07	0.00	100.00	0.00	3.00	2.00	3.00	18.00
19	2	R	0.06	0.00	0.00	0.00	6.00	2.00	18.00	11.00
20	2	R	0.57	0.00	2.56	0.00	3.00	3.00	18.00	0.00
21	2	R	0.12	0.00	0.00	0.00	5.00	3.00	0.00	7.00
22	4	R	13.30	0.00	0.00	7.86	28.00	17.00	6.00	0.00
23	2	R	1.23	0.00	0.00	0.00	3.00	3.00	0.00	0.00
24	3	R	1.05	0.00	0.00	0.00	5.00	4.00	0.00	3.00
25	4	R	0.33	0.00	0.31	0.00	22.00	131.00	65.00	38.00
26	4	R	0.52	0.00	0.00	0.00	2.00	2.00	0.00	0.00
27	3	R	2.50	0.71	0.52	0.00	9.00	2.60	22.00	23.00
28	3	R	0.08	0.10	0.00	0.00	3.00	31.00	0.00	9.00
29	3	R	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	5.00	0.00	0.00
30	2	R	1.28	0.00	0.00	0.00	34.00	30.70	25.00	22.60
31	4	P	0.00	0.64	0.00	1.85	13.00	21.00	9.00	0.00
32	2	P	0.00	0.10	0.00	1.20	85.00	171.00	87.00	3587.00
33	4	P	0.00	0.09	0.00	12.20	3.00	157.00	12.00	360.00
34	4	P	0.00	0.91	13.03	0.00	460.00	363.00	159.00	173.00
35	2	P	1.23	0.42	0.01	0.00	7.00	9.00	22.00	15.00
36	3	P	0.00	0.28	0.00	0.03	2.00	3.00	7.00	8.00
37	4	P	0.14	0.14	1.69	3.54	3.00	6.00	15.00	26.00
38	2	P	0.00	1.50	0.00	4.27	4.00	1.00	0.00	0.00
39	4	P	0.62	0.00	0.00	5.44	4.00	42.00	52.00	511.00
40	2	P	0.00	4.45	0.00	0.00	4.00	6.00	8.00	0.00
41	4	P	0.00	0.00	0.00	12.10	6.00	27.00	12.00	0.00
42	2	P	0.00	1.10	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	9.00
43	4	P	0.00	0.02	0.00	0.00	40.00	47.00	7.00	40.00
44	4	P	1.09	2.90	0.47	1.56	99.00	111.00	0.00	0.00
45	4	P	2.90	1.98	1.56	1.67	834.00	1754.00	0.00	17.00
46	1	P	0.00	0.07	0.00	100.00	2.00	3.00	6.00	6.00
47	2	P	0.00	0.53	0.00	0.26	4.00	2.00	17.00	0.00
48	4	P	0.06	1.75	3.26	0.00	1.00	4.00	8.00	3.00
49	4	P	2.16	9.34	0.00	0.00	15.00	97.00	0.00	0.00

P: Progresyon, **R:** Regresyon, **GC-C 0:** KT öncesi GC-C, **GC-C 3:** 3. KT sonrası GC-C, **CK20-0:** KT öncesi CK20, **CK20-3:** 3. KT sonrası CK20, **CEA-0:** KT öncesi CEA, **CEA-1:** 3. KT sonrası CEA, **CA19.9-0:** KT öncesi CA19.9, **CA19.9-2:** 3. KT sonrası CA19.9

Tablo 6. Kontrol grubundaki vakaların GC-C ve CK20 mRNA değerleri

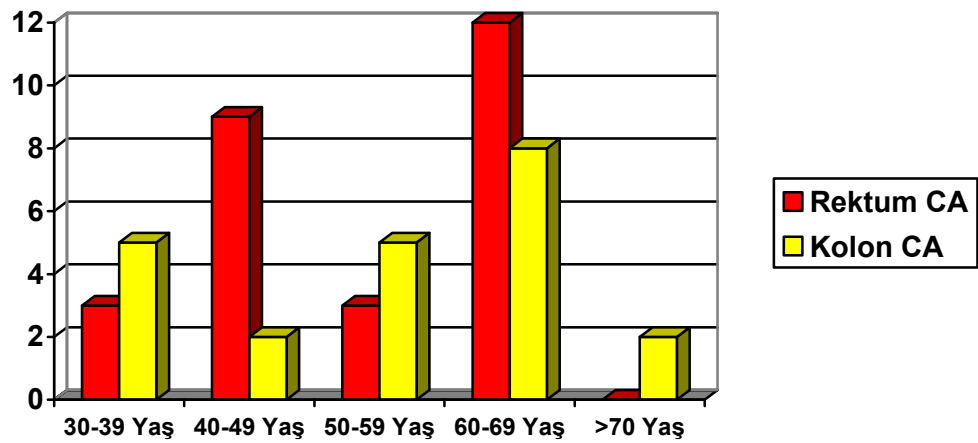
Kontrol No	GC-C	CK20
1	0.00	0.00
2	0.00	0.00
3	0.00	0.00
4	0.00	0.00
5	0.00	0.00
6	0.00	0.00
7	0.00	0.00
8	0.00	0.00
9	0.00	0.00
10	0.00	32.77
11	0.00	0.00
12	0.00	0.00
13	0.00	0.00
14	0.00	0.00
15	0.00	32.77
16	0.00	0.00
17	0.00	29.63
18	0.00	0.00
19	0.00	32.05
20	0.00	0.00
21	0.00	0.00
22	0.00	0.00
23	0.00	33.09
24	0.00	0.00
25	0.00	32.68
26	0.00	32.48
27	0.00	0.00
28	0.00	0.00
29	0.00	0.00
30	0.00	0.00
31	0.00	0.00
32	0.00	0.00
33	0.00	0.00
34	0.00	0.00
35	0.00	0.00
36	0.00	0.00
37	0.00	0.00
38	0.00	0.00
39	0.00	0.00
40	0.00	0.00
41	0.00	0.00

Çalışmaya dahil edilen hastaların TNM evreleme sistemine göre dağılımında evre 1'de sadece 1 hasta, evre 2'de 16 hasta, evre 3'te 9 hasta ve evre 4'te ise 23 hasta bulunmaktadır.

Tablo 7. Çalışmaya alınan hastaların TNM sınıflamasına göre evreleri ve hastalık tipine göre dağılımı.

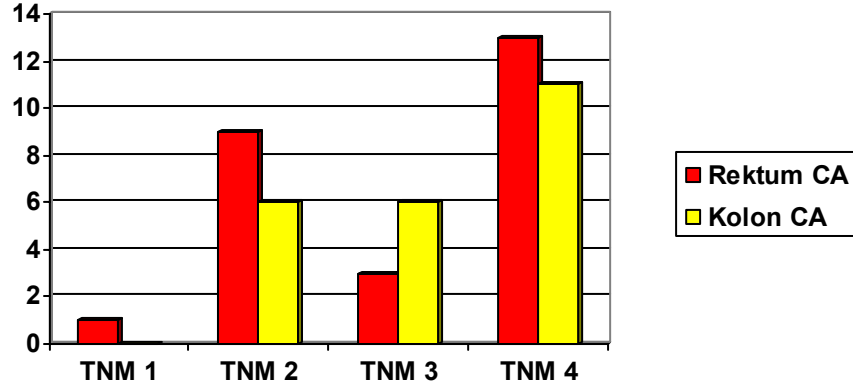
	<u>Kolon Kanseri</u>		<u>Rektum Kanseri</u>		<u>Toplam</u>	
	N	%	N	%	N	%
<u>Cinsiyet</u>						
Kadın	5	22.7	10	37	15	30.6
Erkek	17	77.3	17	63	34	69.4
<u>TNM Evresi</u>						
1	0	0	1	3.7	1	2.1
2	6	27.2	10	37.1	16	32.6
3	5	22.8	4	14.8	9	18.4
4	11	50.0	12	44.4	23	46.9
Toplam	22	100.0	27	100.0	49	100.0

Çalışmaya katılan hastaların yaşa ve hastalık tipine göre dağılımı incelendiğinde beklenen oranlara yakın değerler saptandı.



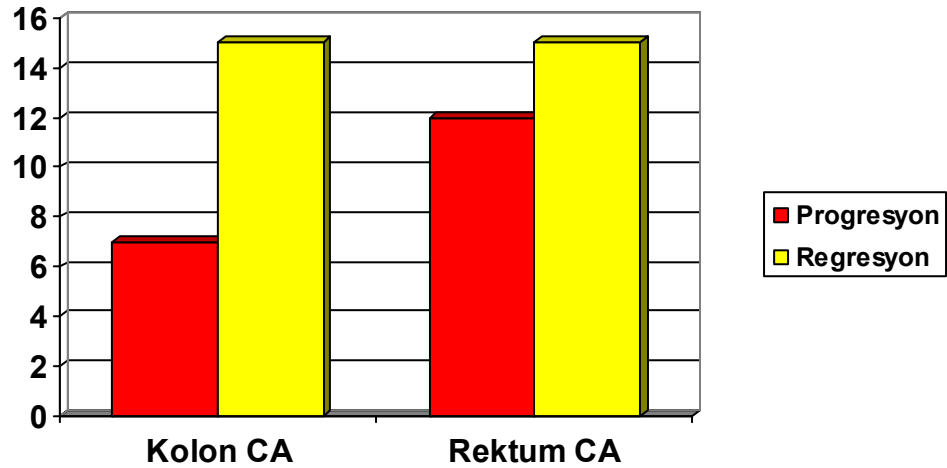
Şekil 4. Hastaların tümör yerleşim yeri ve yaşa göre dağılımı.

Çalışmaya katılan hastaların TNM evrelemesine göre dağılımı Şekil 5'de görülmektedir.



Şekil 5. Çalışmaya katılan hastaların TNM evreleme sistemine göre dağılımı

Çalışmaya katılan 27 rektum kanserli hastanın tedavi sonrası 12'sinde progresyon, kalan 15'inde ise regresyon saptandı. Yine çalışmaya katılan 22 kolon kanserli hastada tedavi sonrasında 7'sinde progresyon saptanırken, 15'inde regresyon saptandı. Bu bulgular Şekil 6'da özetlenmiştir.



Şekil 6. Hastalık tipine göre klinik gidişatın gösterildiği şema

KRK'li tüm hastalara uygulanan tedavilerin topluca dağılımının gösterildiği tablo aşağıdadır (Tablo 8). Çalışmamıza erken evre hastalardan sadece yüksek riskli olanlar alındığı için tablodan da görüldüğü gibi bu gruptaki hastalara KT uygulanmıştır.

Tablo 8. Tüm hastalara uygulanan KT'lerin evrelere göre dağılımı.

Tedavi Şekli	Evre-1	Evre-2	Evre-3	Evre-4
Folfox	0	3	5	3
Folfox+Bevacizumab(B)	0	0	0	4
Folfiri	0	1	1	0
Folfiri + B	0	0	0	4
KRT	0	12	3	2
Campto + Irinotekan	0	0	0	1
Mitomycin + UFT + FA	0	0	0	2
Xelox	1	0	0	4
Xelox + B	0	0	0	1
UFT + B	0	0	0	1
Xeloda	0	0	0	1

Hastalara uygulanan tedavilerle kısmi veya tam cevap sağlanan yani regresyon elde edilen 30 hastadaki KT öncesi periferik kandaki GC-C mRNA değeri ile 3. kür KT sonrası periferik kandan elde edilen GC-C mRNA değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptanmıştır ($p=0.000$).

CK20 mRNA için aynı parametrelere bakıldığında 49 hastanın tedavi sonrasında regresyon sağlanan 30'unda KT öncesi ve 3. kür KT sonrası alınan periferik kanlarındaki CK20 mRNA değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0.062$).

Tedavi ile regresyon sağlanan 30 hastanın 3. kür KT sonrası periferik kanlarından elde edilen GC-C mRNA ve CEA değerleri arasındaki korelasyona bakıldığında her iki parametre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0.000$). Yine aynı hasta grubunda 3. kür sonrası periferik kandaki GC-C mRNA ile CA19.9 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur ($p=0.000$). Tedavi ile regresyon sağlanan 30 hastanın 3. kür KT sonrası periferik kanlarından elde edilen CK20 mRNA ile CEA değerleri arasında ($p= 0.000$) ve CK20 mRNA ile CA19.9 değerleri arasında da korelasyon saptanmıştır ($p= 0.000$) (Tablo 9).

Tablo 9. Çalışmamızda regresyon sağlanan hastaların GC-C, CK20, CEA ve CA19.9 değerlerinin toplu istatistiksel analizi.

	- X ± SE	Wilcoxon Signed Ranks Testi p değeri
GCC-0 → GCC-3	5.456+22.541 → 0.563±0.154	(p= 0.000)
CK20-0 → CK20-3	4.531±18.629 → 0.280±1.435	(p= 0.062)
GCC-3→ CEA-1	0.563±0.154 → 27.569±85.240	(p= 0.000)
GCC-3→ CA19.9-1	0.563±0.154 → 27.040±59.319	(p= 0.000)
CK20-3→ CEA-1	0.280±1.435 → 27.569±85.240	(p= 0.000)
CK20-3→ CA19.9-1	0.280±1.435 → 27.040±59.319	(p= 0.000)

Tedavi sonrasında progresyon saptanan toplam 19 hastada ise KT öncesi ve takip eden 3. kür KT'den sonra alınan periferik kanlarındaki GC-C mRNA değerleri için yapılan istatistiksel çalışmada artış yönünde anlamlı bir ilişki saptandı (p= 0.019). Tedavi sonrası progresyon olan 19 hastasında KT öncesi ve 3. kür KT sonrası alınan kanlarındaki CK20 mRNA değerlerinde de benzer şekilde artış yönünde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki elde edildi (p=0.041).

Tedavi sonrası progrese olan bu 19 hastanın 3. kür KT sonrası elde edilen GC-C mRNA ve CEA değerleri arasında pozitif yönde bir ilişki saptanmıştır (p= 0.000). Yine tedavi sonrası progresyon gösteren hastaların 3. kür KT sonrası elde edilen GC-C mRNA ve CA19.9 değerleri için yapılan istatistiksel çalışmada da anlamlı pozitif korelasyon gözlemlendi (p= 0.012) (Tablo 10).

Tedavi sonrası progresyon olan 19 hastada 3. kür KT'den sonra elde edilen CK20 mRNA ile CEA değerleri arasında ($p=0.000$) ve CK20 mRNA ile CA 19.9 değerleri arasında anlamlı bir korelasyon bulundu ($p= 0.035$).

Tablo 10. Çalışmada tedavi sonrası progresyon olan hastaların GC-C, CK20, CEA ve CA19.9 değerlerinin toplu istatistiksel analizi.

	$\bar{X} \pm SE$	Wilcoxon Signed Ranks Testi p değeri
GCC-0 → GCC-3	0.431 \pm 0.838 → 1.380 \pm 2.254	(p= 0.019)
CK20-0 → CK20-3	1.053 \pm 3.026 → 7.581 \pm 22.695	(p= 0.041)
GCC-3 → CEA-1	1.380 \pm 2.254 → 148.684 \pm 399.249	(p= 0.000)
GCC-3 → CA19.9-1	1.380 \pm 2.254 → 250.263 \pm 819.898	(p= 0.012)
CK20-3 → CEA-1	7.581 \pm 22.695 → 148.684 \pm 399.249	(p= 0.000)
CK20-3 → CA19.9-1	7.581 \pm 22.695 → 250.263 \pm 819.898	(p= 0.035)

Çalışmaya katılan 49 hastanın 23 tanesi TNM sınıflamasına göre evre 4 olarak saptandı. Bu 23 hastanın ilk KT öncesi alınan GC-C mRNA değerleri 41 kontrol grubundan elde edilen GC-C mRNA değerlerinden anlamlı yüksek bulundu ($p=0.000$). KT öncesi CK20 mRNA değerleriyle kontrol grubundan elde edilen CK20 mRNA değerleri arasında ise anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0.143$) (Tablo 11).

Tablo 11. Evre-4 KRK'li hastaların tedavi öncesi GC-C ve CK20 değerlerinin kontrol grubuyla istatistiksel analizi.

	– X ± SE	Mann-Whitney Testi p değeri
Evre-4 GCC-0 → Kontrol GCC	6.540±25.758 → 0.00	(p = 0.000)
Evre-4 CK20-0→Kontrol CK20	5.435±20.816 → 5.499±12.279	(p = 0.143)

Tedaviye rağmen progresyon olan 19 hastanın TNM sınıflamasına göre dağılımı şu şekilde idi: evre 1'de 1 hasta, evre 2'de 6 hasta, evre 3'te 1 hasta ve Evre 4'te 11 hasta vardı. Progrese olan bu 19 hastanın başlangıç GC-C mRNA değerlerinden sadece 6'sında yüksek değer saptanmış ve bu 6 hastanın 5'i 4. evrede iken sadece 1 hasta 2. evrede idi. Başlangıçta evre 2 olarak değerlendirilen bu hastada KT sonrası yapılan tetkiklerde daha önceden var olmayan karaciğer metastazı geliştiği saptanmıştır.

Çalışmaya katılan tüm hastaların 1. KT öncesi ve 3. KT sonrası periferik kanlarından CEA ve CA 19.9 değerleri tespit edildi. Buna göre tüm hastaların ilk tanı sırasındaki GC-C mRNA ile CEA değerleri arasında anlamlı korelasyon saptanamazken (p=0.946); GC-C mRNA ile CA19.9 arasında kuvvetli ilişki saptandı (p= 0.000).

Hasta grubunda CK20 mRNA ile CEA ve CA19.9 arasındaki ilişki incelendiğinde; CK20 mRNA ile CEA (p= 0.784) ve CA19.9 (p= 0.764) değerleri arasında ilişki yoktu.

Tüm hastaların tedavi öncesi GC-C mRNA, CK20 mRNA, değerleriyle CEA ve CA19.9 değerlerinin karşılaştırılması tablo 12'de topluca gösterilmiştir.

Tablo 12. Tüm hastaların ilk kür KT öncesi GC-C, CK20, CEA ve CA19.9 değerlerinin istatistiksel analizi.

	– X ± SE	Pearson Correlations (p değeri)
GCC-0 → CEA-0	3.507±17.702 → 200.795±830.959	(p= 0.946)
GCC-0 → CA19.9-0	3.507±17.702 → 40.426±103.627	(p= 0.000)
CK20-0 → CEA-0	3.183±14.698 → 200.795±830.959	(p= 0.784)
CK20-0 → CA19.9-0	3.183±14.698 → 40.426±103.627	(p= 0.764)

5. TARTIŞMA

Epidemiyolojik çalışmalara göre, KRK'lerde son yıllardaki gelişmelere rağmen 5 yıllık yaşam süreleri, hastalığın yüksek metastatik potansiyeli nedeniyle oldukça düşüktür (%40–50)(128). Tümör evresi en önemli prognostik gösterge olmasına rağmen, evre 1 hastalar da kaybedilmektedir. Bu gerçekte, primer solid tümörden metastatik hücrelerin yayılımının hastalığın çok erken dönemlerinde başladığını düşündürmektedir (129-131).

Tanı anındaki kanserin evresi, sadece prognozu belirlemez aynı zamanda adjuvan KT alacak hastaları seçme konusunda da bize rehberlik eder. Lenf nodu tutulumunun klinik önemine rağmen, bölgesel lenf nodu mikrometastazlarını değerlendirebilecek sensitif ve spesifik teknikler mevcut değildir.

STH'lerin malign doğası tümöre özgü kromozomal farklılıklar (50) ile diğer genetik değişikliklerin tanımlanmasıyla (51,52) ve ayrıca in vitro ortamda kanser hücresine benzer şekilde davranmalarının tespiti ile ortaya konmuştur (53). CEA (132), Lenfatik Homing Reseptör CD44 (133), çeşitli CK'ler (134) ve GC-C'inde (41) içinde olduğu çeşitli mRNA'lar periferik kandaki STH'lerini saptamak için potansiyel belirleyiciler olarak değerlendirilmiştir.

RT-PCR yöntemini kullanarak CK20 mRNA saptanması KRK'li hastalarda lenf nodlarındaki sessiz mikrometastazları saptamada kullanılmaktadır (134-136). Fakat CK20 mRNA'nın kolay kontaminasyonu ve sağlıklı bireylerin kanlarında da mRNA transkripsiyonu olması bu yöntemin dezavantajlarıdır. CK20 mRNA ekspresyonu pek çok KRK ve metastaz olgusunda tespit edilmiş (137), önceleri kısıtlı kullanıma sahipken (138) RT-PCR'la tespiti KRK hastalarında okült metastazların tanımlanması için kullanılmaktadır (135,136,139). Fakat Litle ve arkadaşlarının çalışmasında

CK20 mRNA transkripsiyonu (139) ve protein ekspresyonunun sağlıklı kontrollerin kanında da tanımlanması, mikrometastatik hücrelerin tespitinde kullanımını sorgulatır hale gelmiştir (140).

Bizim çalışmamızda da 41 sağlıklı kontrol grubunun 7'sinde CK20 mRNA pozitif olarak saptandı. CEA mRNA'da KRK'li hastaların kanlarındaki STH'lerini saptamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Mori ve arkadaşları (141) ve Yamaguchi ve arkadaşları (142) KRK dokusundan drene olan kanda PCR yöntemi ile CEA mRNA pozitifliğinin kötü prognozla ilişkili olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte tümörün erken evresinde çoğu zaman CEA ekspresyonunun olmaması ve diğer malign ve malign olmayan birçok durumda da eksprese olması, dolaşımdaki STH'lerinin saptanmasında CEA'ni kullanılabilir bir belirteç olmaktan uzaklaştırmaktadır.

Literatürde şimdiye kadar genel olarak kanda veya lenf nodlarında GC-C ve CK20 mRNA'nın tespitinin tanı sırasındaki yeri ve tedavi seçimi ve bunların düzeyine göre prognoz tayinleri ve bunların sağlıklı kontrol gruplarıyla karşılaştırılması ilgili çalışmalar yapılmıştır. Wei-Shone Chen ve arkadaşları (143) ; KRK tanılı hastalarda laparoskopi sırasında dolaşımdaki STH'lerinin miktarındaki dinamik değişimlerini ve bu STH'lerin miktarındaki değişimlerin kliniğe yansımalarını kandaki GC-C mRNA düzeylerini RT-PCR ile ölçmek suretiyle araştırmışlar ve hastaların laparoskopi öncesi ve laparoskopi esnasında alınan kanlardaki GC-C mRNA düzeylerinde anlamlı bir değişiklik saptanmazken; post-operatif alınan yüksek GC-C mRNA seviyesi olanlarda sıfır veya düşük olanlara göre prognozun daha kötü olduğunu gözlemlemişler.

Waldman ve arkadaşlarının (41) yapmış olduğu retrospektif bir analizde ise rekürren hastalık gelişmiş ve histopatolojiyle nodu tutulumu yok olarak belirlenmiş tüm hastaların lenf nodlarında GC-C mRNA'nın pozitif olduğunu bulmuşlarken CEA bu hastaların sadece birinin lenf nodunda pozitif olarak tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada metastatik KRK'li hastaların tümör dokularının tümünde GC-C mRNA pozitif bulunurken CEA ekspresyonu bakıldığında tümör dokularının %30'undan daha azında CEA varlığı saptanmıştır. Bu bilgiler GC-C mRNA'nın KRK hücrelerinden CEA'ya göre daha sık ve daha fazla eksprese

edildiği önermesini desteklemektedir.

Tracy ve arkadaşlarının (144) çalışmasında ise 24 tane evre 4 KRK tanısı almış hasta ile 24 tane sağlıklı kontrol grubu alınmış, hasta grubunun hepsinin kanında GC-C mRNA yüksek saptanmış. Bu beklenen bir sonuç olmakla beraber ilginç olan 24 kişilik sağlıklı kontrol grubunun hepsinin periferik kanlarında da GC-C mRNA'nın pozitif saptanmasıdır. Bunun üzerine Tracy ve arkadaşları GC-C mRNA pozitif olan kontrol grubunun kanlarını plazma, beyaz küre, eritrosit, trombosit ve mononükleer hücreler diye alt gruplara ayırıp tekrar incelediklerinde sadece CD 34(+) hücrelerde GC-C mRNA pozitif olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmanın aksine bizim çalışmamızdaki 41 sağlıklı kontrol grubunun hiçbirinde GC-C mRNA için pozitif bir değer saptanmamıştır. Ayrıca Tracy ve arkadaşlarının çalışmasında 24 tane evre 4 KRK hastasının kanında GC-C mRNA pozitif saptanırken bizim çalışmamızda 49 hastanın 23 tanesi evre 4'tü ve bunların 14 tanesinin ilk kür KT öncesi alınan kanlarında GC-C mRNA yüksek bulundu.

Birbe Ruth ve arkadaşlarının (145) çalışmasında ise, histopatoloji ile tespit edilememiş tümör içeren 24 lenf nodunda GC-C mRNA'nın immuno-histokimyasal tespiti ile kanser metastazının varlığı gösterilmiştir. Bu yüksek sensitivite ve spesifite, GC-C mRNA'nın immunohistokimyasal tespitinin, KRK'li hastaların evrelemesinde kullanılabilir yararlı bir teknik olduğu görüşünü desteklemektedir.

Solmi ve arkadaşlarının (146) çalışmasında ise; 2 tane KRK tanısı almış (biri evre 2 diğeri evre 4) hasta ile 4 tane sağlıklı kontrol grubundan hem kan hem de kolon mukoza örneği alınmış, kolon örneği ile kan örneğinin karşılaştırıldığı, kanser ve normal durum gözetilerek çeşitli tiplerde karşılaştırmalar yapılmış ve yapılan analiz neticesinde kolon hücrelerinde kan hücrelerine kıyasla aşırı eksprese edilen tek sabit bir gen bulunamamıştır.

Lenfatik mikrometastazların prognoz üzerine etkisi halen tam olarak açıklanamamış değildir (147). Bazı çalışmalar, mikrometastazların sonuçlar üzerine kötü etkisi olduğunu gösterse de bazı çalışmalarda ise böyle bir korelasyon gösterilememiştir (148-172).

Bu çalışmaların çoğunda örneklem boyutunun küçük olması ve standart tekniklerin kullanılmaması; mikrometastazların göz ardı edilmesi ve genel epitelyal antijenler nedeniyle (evreleme bunlara göre yapıldığı için) yalancı pozitif bir evrelemenin yapılmış olması ihtimalini akla getirmektedir. Evre 2 KRK'li hastalarda adjuvan KT'nin kullanılmasını destekleyen randomize çalışmalardan elde edilmiş kanıtlar yoktur. Ancak evre 3 vakalarda KT'nin belirgin etkisinin görülmesi, yüksek riskli evre 2 hastalar için de KT'nin gözden geçirilmesini desteklemektedir (173).

American Joint Committee on Cancer (AJCC)'in yapmış olduğu çalışma evre 2 (N0) KRK'li hastalarda lenf nodu mikrometastazların prognostik etkisini inceleyen ilk metaanalizdir. RT-PCR gibi moleküler teknikler kullanılarak yapılan üst evrelemelerde hastaların %37'sine N0 yerine N0 (mol+) tanısı konmuş ve bu durum hastaların %18.7'sinde yaşam süresini 3 yıl etkilemiştir. Moleküler olarak mikrometastazlar tespit edilen (RT-PCR +) hastalarda 3 yıllık yaşam oranı %78 iken, moleküler olarak mikrometastaz tespit edilmeyen hastalarda 3 yıllık yaşam oranı ise %97 bulunmuştur ($P < 0.001$). Seri kesitleme ve immünohistokimyasal boyama gibi histolojik teknikler sonucu N0 hastaların %32'sinin N1 veya N0(i+) olduğu anlaşılmıştır. İmmünohistokimyasal boyama ile tanımlanan mikrometastazların hastaliksız yaşam süresi ve toplam yaşam süresi üzerine kötü etkileri olduğu gösterilse de bu, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Iddings ve arkadaşlarının (147) metaanalizinde ise 15 yıl boyunca yapılan birçok çalışmada, rutin histolojik değerlendirme ile nodal tutulum saptanamayan KRK'li hastalarda (N0), lenfatik mikrometastazların prevalansı ve prognostik değeri incelenmiştir. Tüm çalışmalarda, lenf nodları, immunhistokimya ve seri kesitleme ve/veya RT-PCR ile incelenerek evrelendirilmiştir. Daha önce lenf nodu N0 olarak evrelenen vakaların moleküler tekniklerle tekrar evrelenmesi sonucu relaps için daha yüksek risk bulunan bir alt grubun olduğunu göstermiştir. RT-PCR ile tespit edilen mikrometastazların, toplam yaşam süresinde klinik ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu

gösterilse de immünohistolojik boyama metoduyla tespit edilen mikrometastazlarda böyle anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Bu bulgular şaşırtıcıdır. Eğer lenfatik mikrometastazlar, prognozu etkileyen biyolojik olarak önemli bir gösterge ise, o zaman hem immunhistokimyasal hem de moleküler teknikler, yüksek riskli N0 hastaları tanımlanabilmeye imkânı tanır olmalıdır. Sınırlı nodal örnekleme, bu metaanalizde immünohistokimyasal metoduyla tespit edilen mikrometastazların, yaşam süreleri üzerine anlamlı bir etkisinin olmamasını açıklayabilir.

Özetle Iddings ve arkadaşlarının (147) yapmış olduğu bu metaanaliz, KRK'de mikrometastazların klinik anlamı olduğunu desteklemektedir. RT-PCR ile mikrometastaz olduğuna dair kanıt elde edilen hastalarda yaşam oranları, moleküler mikrometastazı olmayanlara kıyasla belirgin olarak daha düşüktür ($p<0.001$).

Carrithers ve arkadaşlarının (17); sadece evre 3 ve evre 4 hastalarda GC-C mRNA transkripsiyonunun tespit edildiğini bildiren çalışmanın aksine Bustin ve arkadaşlarının çalışmasında (174) pre-op kan örneklerinde hastalık evresiyle GC-C mRNA kopya sayısı arasında bir korelasyon gösterilemedi. Bizim çalışmamızda ise 41 kontrol grubundan hiçbirinde GC-C mRNA pozitifliği saptanmazken, 49 hastadan ise 28'inde (23 evre 4 hastanın 14'ünde, 26 erken evre hastanın 14'ünde) GC-C mRNA yüksek bulundu.

Bustin ve arkadaşlarının (174) yaptığı çalışmada KRK hastalarının peri-operatif kan örneklerinde hastalık evresiyle CK19 ve CK20 mRNA ekspresyonu arasında bir korelasyon saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda da CK20 için benzer sonuç elde edilmiş hastalık evresi ile CK20 ekspresyonu arasında ilişki saptanmamıştır.

Şu ana kadar anlattığımız GC-C mRNA ve CK20 mRNA için yapılan literatür çalışmalarının hepsi ya KRK'li hastaların lenf nodlarıyla yapılmış ya da tanı amaçlı veya tanı sırasındaki değerlerine göre prognoz tahminine yöneliktir. Bizim çalışmamızda ki amacımız ise KRK'li hastalarda kan GC-C ve CK20 mRNA düzeyinin hastalığın evresi, prognostik parametreleri ve uygulanan tedaviye yanıt ile ilişkisini incelemektir.

Çalışmamızda tüm evredeki hasta grubunun tedavi öncesi GC-C mRNA düzeyleri ile kontrol grubunun GC-C mRNA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.208$). Kontrol grubundaki tüm hastalarda GC-C mRNA değerinin 0 olmasına rağmen bu sonucun elde edilmesinin 2 sebebi var. Birincisi hasta grubundaki GC-C mRNA değerine ait standart sapmanın çok yüksek bulunması (Standart sapması:17.703), ikinci sebep ise hasta grubunun yarısına yakın kısmının erken evre olmasıdır. Hasta grubu içinden sadece evre 4 olanların tanı sırasındaki GC-C mRNA değerleri ile kontrol grubu GC-C mRNA değerleri arasında yüksek bir fark saptanmıştır ($p=0.000$). Bu sonuç ise GC-C'nin metastatik hastalarda kanda saptanabilirliği ile açıklanabilir.

Çalışmamızda tüm hasta grubunun tedavi öncesi CK20 mRNA değerleri ile kontrol grubunun CK20 mRNA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0.425$). Bununda iki sebebi bulunmaktadır. Birincisi GC-C'de olduğu gibi standart sapma çok yüksek bulundu (Standart sapması: 14.698). İkinci sebep ise kontrol grubundaki yüksek CK20 mRNA düzeyleridir. Hatırlanacağı üzere Bustin ve arkadaşlarının çalışmasında da (174) operasyon öncesi kan örneklerindeki CK20 mRNA düzeyleri, ile sağlıklı kontrollerdeki düzeyler ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemiştir. Yine bizim çalışmamızda evre 4 KRK'li hastaların tedavi öncesi CK20 mRNA düzeyleri ile kontrol grubunun CK20 mRNA düzeyleri arasında ise yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.143$).

Çalışmamızdaki tüm KRK'li hastaların tedavi öncesi GC-C mRNA değeri ile aynı hastaların tedavi öncesi CEA değerleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.946$). Bunun sebebi olarak hasta grubumuzdaki GC-C mRNA'nın metastatik olmayan olgularda kanda eksprese olmamasından kaynaklanabilir. Tüm hastaların tedavi öncesi GC-C mRNA değerleri ile aynı hastaların tedavi öncesi CA 19.9 değerleri arasında istatistiksel olarak kuvvetli anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0.000$). Literatürde buna benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yine tüm hastaların tedavi öncesi CK20 mRNA değerleri ile CEA değerleri ve CK20 mRNA değerleri ile CA 19.9 değerleri karşılaştırılmış ve aralarında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (sırasıyla; $p=0.784$, $p=0.764$).

Literatürde buna benzer bir sonuca rastlanılmamıştır.

Çalışmamızın hipotezini analizlerde hastaları bu bölümde tedavilerden alınan cevaplara göre regresyon sağlanan ve progresyon olanlar diye iki gruba ayırdık. Tedavi ile regresyon sağlanan 30 hastanın tedavi öncesi GC-C mRNA değerleri ile 3. kür KT'den sonra alınan GC-C mRNA değerleri arasında istatistiksel olarak kuvvetli negatif korelasyon saptandı ($p=0.000$). Literatürde buna benzer bir bulgu yoktur.

Tedavi ile progrese olan 19 KRK'li hastanın tedavi öncesi GC-C mRNA değerleri ile 3. kür KT'den ortalama 1 hafta sonra alınan GC-C mRNA değerleri arasında pozitif korelasyon saptandı ($p=0.019$). Yine literatürde buna benzer bir sonuca rastlanmamıştır.

GC-C için yaptığımız bu çalışmayı CK20 içinde yaptık. Tedavi sonrası regresyon sağlanan hastaların tedavi öncesi CK20 mRNA değerleri ile 3. kür KT sonrası elde edilen CK20 mRNA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmazken ($p=0.062$), tedavi sonrası progrese olan hastaların tedavi öncesi CK20 mRNA değerleri ile 3. kür KT sonrasındaki CK20 mRNA değerleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0.041$). Literatürde benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır. KRK'li hastaların tedavi öncesi CK20 mRNA değerleri ile tedavi boyunca saptanacak CK20 mRNA değerleri arasındaki değişimlerle klinik regresyon öngörülemez ama progresyonu saptamada yardımcı olabilir.

Tümör belirteçlerinin KRK tanı sırasında kombinasyonlar halinde kullanımı ile ilgili daha önceden yapılmış çalışmalar vardır. Bunların ortak sonucu CEA, CK20 ve CK19 mRNA'ları, PCR yöntemi kullanılmak suretiyle başarıyla kullanılabilir (135,175-177). Bizde çalışmamızda Real Time RT-PCR yöntemini kullandık. Real Time RT-PCR; PCR'ın yüksek etkinliğini, DNA probunun spesifitesi ve spektral analizin yüksek sensitivitesiyle isabetli kantifikasyonunu birleştiren bir kantitatif nükleotid tayin tekniğidir. Dong ve arkadaşlarının çalışmasındaki (178) ilginç bir bulgu KRK'li hastalarda kanda, CEA, CK20 ve CK19 mRNA ekspresyonunun erken evrelerde relatif olarak daha yüksek bulunmasıdır. Bizim çalışmamızda ise bu çalışmanın tam aksine

TNM evresi arttıkça CK20 mRNA ve CEA düzeyi yükselmiştir.

Aynı durum GC-C mRNA için de geçerlidir. Dong ve arkadaşlarının çalışmasındaki (178) saptamada belirtildiği gibi tümör belirteçlerinin birlikte değerlendirilmesi, düşük pozitiflik oranı probleminin çözümüne katkıda bulunabilir. Tek bir tümör belirleyici yerine 2 veya 3 belirleyiciye birlikte bakmak ile en yüksek pozitiflik oranına ulaşılmıştır (Tablo 13).

Tablo 13. Dong ve arkadaşlarının çalışmasına göre tümör belirleyicilerin kombinasyonu ile vaka saptama oranları

	n	Markırların kombinasyonu saptama oranları	p değeri
CEA+CK19	42	22 (52.4%)	p<0.05
CEA+CK20	42	21 (50.0%)	p<0.05
CK19+CK20	42	23 (54.8%)	p>0.05
CEA+CK19+CK20	42	25 (59.5%)	p<0.05

Yine Dong ve arkadaşları (178) çalışmalarında CEA, CK20 ve CK19 mRNA'larının spesifitesinin, konvansiyonel RT-PCR'a kıyasla daha anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit edilmiş (178). Bu sonuçlar, aynı belirleyicilerin RT-PCR ile tespit edildikleri önceki çalışmalarla uyumludur. Real-time PCR'ın yüksek spesifitesine karşın pozitif tespit oranı, konvansiyonel RT-PCR'a kıyasla düşük bulunmuştur.

Değişik çalışmalarda 5 yıllık takibi olan KRK'li hastaların retrospektif analizlerinde hastalardaki operasyon öncesi yüksek CEA, CK20 ve CK19 mRNA düzeylerinin, daha düşük 5 yıllık yaşam oranlarıyla ilişkili iken, operasyon öncesi düşük değerlerin daha iyi yaşam oranlarına sahip oldukları bildirilmiştir (179,181,182).

Çalışmamızdaki hasta gruplarında CEA ve CA19.9 değerlerine de

bakıldı. Tedavi sonrası regresyon sağlanan hastaların 3. kür KT sonrası GC-C mRNA değerleri ile CEA ve CA19.9 değerleri arasında kuvvetli bir ilişki saptanmıştır (sırasıyla; $p=0.000$, $p=0.000$). Literatürde buna benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Tedavi sonrası regrese olan hastalar için GC-C mRNA ve CEA değerlerinde birlikte düşüş gözlenmiştir. Yine tedavi ile regresyon sağlanan hastaların 3. kür KT sonrası periferik kanlarından elde edilen CK20 mRNA ve CEA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0.000$). Literatürde buna benzer bir çalışma yoktur Bu sonuçlara dayanarak KT alan KRK tanılı hastalarda tedavi sırasında ve bitimindeki GC-C ve CK20 mRNA ile CEA değerlerinde düşüş saptanırsa hastanın tedaviye iyi cevap vereceğini öngörebiliriz.

Tedavi sonrası progrese olan hastaların 3. kür KT sonrası GC-C mRNA ve CEA değerleri ile CK20 mRNA ve CEA değerleri arasında üçünde de artış yönünde anlamlı bir ilişki saptanmıştır (sırasıyla; $p=0.000$, $p=0.000$). Literatürde buna benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yine benzer şekilde KT alan KRK tanılı hastalarda tedavi boyunca GC-C ve CK20 mRNA ile CEA değerlerinde artış saptanırsa hastalığın prognozunun kötü olacağını tahmin edebiliriz.

Çalışmamızda tedavi sonrası regresyon sağlanan hastaların 3. kür KT'lerinden sonra elde edilen CK20 mRNA ve CEA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0.000$). Literatürde buna benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Tedavi sonrası regrese olan hastalar için CK20 mRNA ve CEA değerlerinde bir düşüş elde edilmiştir. Bu sonuca istinaden KT alan KRK tanılı hastalarda tedavi sırasında ve bitimindeki CK20 mRNA ve CEA değerlerinde tanı sırasındaki alınan değerlere göre düşüş saptanırsa hastanın tedaviye iyi cevap vereceğini tahmin edebiliriz.

Benzer şekilde tedaviye rağmen progrese olan hasta grubunda ise 3. kür KT sonrası periferik kanlarından elde edilen GC-C mRNA ve CA19.9 değerleri arasında anlamlı ilişki vardı ($p=0.012$).

3. kür KT sonrası elde edilen CK20 mRNA ve CA19.9 değerleri arasında hem regresyon gözlenen hastalarda (negatif korelasyon, $p=0.000$) hem de progresyon gözlenen hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır

(pozitif korelasyon, $p=0.035$).

Tedavi sonrası progrese olan hastalarda tedavi sırasındaki ve sonrasındaki CK20 mRNA ve CA19.9 değerlerinde artış saptanmıştır. Literatürde benzer çalışmalar bulunmamaktadır.

Dong ve arkadaşlarının çalışması (178), hastalığın sadece tanı aşamasında yapılmış olmasından dolayı bizim çalışmadan farklı olmakla beraber tümör belirleyiciler tek tek kullanımına kıyasla ikili veya üçlü kombinasyonlarının kullanımı ile nüks edecek hastaları erken dönemde öngörmeye, rutin histopatolojik yöntemlerle saptanamayan mikrometastazların saptanması ile evrelemenin daha doğru yapılmasına ve buna bağlı olarak daha uygun tedavi yaklaşımları sayesinde küratif tedaviye olanak sağlayabilir.

Tümör belirteçlerinin birlikte değerlendirilmesi, düşük pozitiflik oran probleminin çözümüne katkıda bulunabilir. Tek bir belirteç yerine 2 veya 3 belirtece bakılarak en yüksek pozitiflik oranına ulaşılabilir.

(1) KRK'de tümör belirleyicilerin birlikte analizi ile metastaz ve/veya rekürrens gelişecek hastaların öngörülmesi ve terapötik sonuçları izlemeye yardımcı olur. Serumda CEA, CA19.9, CK20 mRNA ve GC-C mRNA düzeylerindeki değişiklikler; metastaz/rekürrensi veya progresyonu yansıtır.

(2) KRK'de yüksek riskli hastaların belirlenmesinde erken belirleyici olarak kullanılabilir. Dukas A veya B hastalarında kanda artmış CEA, CA19.9, CK20 mRNA ve GC-C mRNA ekspresyonu, hastalık progresyonu veya relaps yönünden yüksek risk faktörü olarak değerlendirilmelidir ve bu nedenle bu hastalara adjuvan KT vermek ve yakından izlemek gerekir. Bu konu ile ilgili klinik çalışmaların yapılması gereklidir.

Sonuç olarak KRK'li hastalar da periferik kanda CEA, CA19.9, CK20 mRNA ve GC-C mRNA'nın kantitatif RT-PCR ile tespitinin, erken evre hematojen yayılan ve daha sonra metastaz veya rekürrense dönüşebilen lezyonların belirlenmesinde kullanılabilir. Bu sayede hala klinik önemini yitirmemiş olan erken evre KRK'li hastaların nüks gelişecek olan alt grubu için kür imkanı sağlanabilecektir.

Ayrıca metastatik KRK'li hastalarda kullanımları sayesinde tedaviden

fayda görmeyen hasta grubunun daha erken belirlenerek yüksek olan tedavi maliyetlerinin azaltılması yanı sıra hastalara farklı tedavi seçeneklerinin daha erken uygulanması ile daha etkili tedavilerin uygun zamanda yapılabilmesi mümkün olabilecektir.

Yukarıdaki tezimizin geçerliliğini ortaya koyacak daha geniş hasta grubunun incelendiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. KRK'li hastalarda tanı sırasında periferik kandan elde edilen GC-C düzeyi kontrol grubuna göre yüksek saptandı fakat standart sapması yüksek olduğu için istatiksel olarak anlamlı bulunmadı (SS=17.702, $p=0.208$).
2. Hastalarda tanı anındaki CK20 mRNA düzeyi ile kontrol grubu arasında fark saptanmadı ($p=0.425$).
3. Metastatik hastalardaki GC-C mRNA düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($p=0.000$).
4. Metastatik hastalardaki CK20 mRNA düzeyi kontrol grubu ortalamasından farklı değildi ($p=0.143$).
5. Tüm hastaların KT öncesi CA19.9 ile CK20 mRNA arasında ($p=0.764$) ve CEA ile CK20 mRNA ve GC-C mRNA arasında (sırasıyla $p=0.784$, $p=0.946$) arasında anlamlı ilişki gözlenmezken sadece GC-C mRNA ile CA19.9 arasında korelasyon saptandı ($p=0.000$).
6. Tedavi ile regresyon sağlanan hastalarda KT sonrasındaki GC-C mRNA düzeylerinde tedavi öncesi değerlere göre belirgin düşüş saptandı ($p=0.000$).
7. Tedavi ile regrese olan hastalarda KT öncesi ve sonrasında periferik kandan elde edilen CK20 mRNA düzeyleri arasında korelasyon yoktu ($p=0.062$).
8. Tedavi ile regrese olan hastalarda GC-C mRNA ile CEA ve CA19.9 düzeylerinde birlikte düşüş saptandı (sırasıyla; $p=0.000$, $p=0.000$).
9. Tedavi ile regrese olan hastalardaki KT sonrası CK20 mRNA ile CEA ve CA19.9 düzeylerinde birlikte azalma saptandı (sırasıyla; $p=0.000$, $p=0.000$).
10. Tedavi sonrasında progrese olan hastalarda KT sonrasındaki GC-C mRNA ve CK20 mRNA düzeyleri tedavi öncesi değerlerine göre belirgin yüksek saptandı (sırasıyla; $p=0.019$, $p=0.041$).

11. Tedavi sonrası progrese olan hastalarda GC-C mRNA ile CEA ve CA19.9 düzeylerinde tedavi öncesi değerlere göre birlikte bir artış saptandı (sırasıyla; $p=0.000$, $p=0.012$).
12. Tedavi sonrası progrese olan hastaların periferik kanlarından elde edilen CK20 mRNA ile CEA ve CA19.9 düzeylerinde belirgin bir artış saptandı (sırasıyla; $p=0.000$, $p=0.035$).
13. Progrese olan 19 hastadan sadece 6'sının başlangıç GC-C düzeyi yüksekti. Bunlardan beşi metastatik iken sadece biri Evre 2'idi. Bu erken evre olan hastada ise KT sonrası başlangıçta olmayan karaciğer metastazı saptandı.
14. GC-C mRNA, CK20 mRNA, CEA ile CA19.9 ekspresyon düzeylerinin tespiti tedaviye yanıtı belirlemede güvenilir birer parametre olarak kullanılabilirler.
15. Ayrıca evre 2 hastalarda tedavi edilmesi gereken alt grubun belirlenmesinde de bu parametrelerin kullanılabilirliği araştırılmalıdır.
16. Metastatik hastalarda GC-C mRNA, CK20 mRNA, CEA ile CA19.9 kullanımları sayesinde tedaviden fayda görmeyen hasta grubunun daha erken belirlenerek yüksek olan tedavi maliyetlerinin azaltılması yanı sıra hastalara farklı tedavi seçeneklerinin daha erken uygulanması ile daha etkili tedavilerin uygun zamanda yapılabilmesi mümkün olabilecektir.
17. Tezimizin geçerliliğini ortaya koyacak daha geniş hasta grubunun incelendiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics, CA Cancer J Clin. 1999;49(1):33-64.
2. T.C Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı Yayın No:582.
3. Katsumato K, Tetsua S, Yasuharu M, Masuyuki H, Akihika T, Tatsuya A et al. Detection and Evaluation of Epithelial Cells in the Blood of Colon Cancer Patients Using RT-PCR. Int J Clin Oncol. 2006;11:385-389.
4. Deans GT, Parks TG, Rowlands BJ, Spence RA. Prognostic factors in colorectal cancer. Br J Surg. 1992;79:608-613.
5. Tarin D, Price JE, Kettlewell MG, Souter RG, Vass AC, Crossley B et al. Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. Cancer Res. 1984;44:3584-3592.
6. Glaves D, Huben RP, Weiss L. Haematogenous dissemination of cells from human renal adenocarcinomas. Br J Cancer. 1988;57:32-35.
7. Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. Nature Med. 1996;2:972-974.
8. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. Nature Med. 1996;2:1035-1037.
9. Gyles CL. Escherichia coli cytotoxins and enterotoxins. Can J Microbiol. 1992;38:734-746.
10. De Jonge HR. The localization of guanylate cyclase in rat small intestinal epithelium. Febs Lett. 1975;53:237-242.
11. Guarino A, Cohen MB, Overmann G. Binding of E coli heat-stable enterotoxin to rat intestinal brush borders and to basolateral membranes. Dig Dis Sci. 1987;32:1017-1026.

12. Guerrant RL, Hughes JM, Chang B. Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: Studies of tissue specificity, potential receptors, and intermediates. *J Infect Dis.* 1980;142:220-228.
13. Carrithers SL, Parkinson SJ, Goldstein S. *Escherichia coli* heat-stable toxin receptors in human colonic tumors. *Gastroenterology.* 1994;107:1653-1661.
14. Krause G, Bayerl A, Heim JM. Distribution of membrane bound guanylyl cyclases in human intestine. *Gut.* 1994;35:1250-1257.
15. Cohen MB, Guarino A, Shukla R. Age-related differences in receptors for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in the small and large intestine of children. *Gastroenterology.* 1988;94:367-373.
16. Guarino A, Cohen MB, Giannella RA. Small and large intestinal guanylate cyclase activity in children: Effect of age and stimulation by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Pediatr Res.* 1987;21:551-555.
17. Carrithers SL, Barber MT, Biswas S. Guanylyl cyclase C is a selective marker for metastatic colorectal tumors in human extraintestinal tissues. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93:14827-14832.
18. Carrithers SL, Parkinson SJ, Goldstein SD. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin receptors: A novel marker for colorectal tumors. *Dis Colon Rectum.* 1996;39:171-181.
19. Albers KM. Keratin biochemistry. *Clin Dermatol.* 1996;14(4):309-320.
20. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology.* 2002;40(5):403-439.
21. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 1998;48(1):6-29.
22. Rickert RR, Auerbach O, Garfinkel L, Hammond EC, Frasca JM. Adenomatous lesions of the large bowel: an autopsy survey. *Cancer.* 1979;43(5):1847-57.

23. DiSario JA, Foutch PG, Mai HD, Pardy K, Manne RK. Prevalance and malignant potential of colorectal polyps in asymptomatic, average-risk men. *Am J Gastroenterol.* 1991;86(8):941-5.
24. Rex DK, Sledge GW, Harper PA. Colonic adenomas in asymptomatic women with a history of breast cancer. *Am J Gastroenterol.* 1993;88(12):2009-14.
25. Kodner IJ, Fry RD, Fleshman JW, Birnbaum EH, Read TE. Principles of Surgery (Cerrahinin İlkeleri). Türkçe çeviri editörü; Geçim İ.Ethem. 7th ed. Antıp. 2004:1283-1394.
26. Dizdaroğlu F. Sindirim sistemi tümörleri. Edit. Topuz E, Aykan NF, Demir C. Patoloji.1.baskı, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları; 1998:373-458.
27. Rosai J. Ackerman's Surgical Pathology. In Rosai J. Gastrointestinal Tract, Large Bowel. 9th ed, Mosby Company; China, 2004:776-823.
28. Dahl J, Greenson JK. Histology for Pathologist. In: Mills S.E. Colon. 3th ed. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, 2007:627-643.
29. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE. Other Tumours of the Large İntestine, Chapter 41, İn: Gastrointestinal and Oesophageal Pathology, ed. Whitehead R, Churchill Livingstone, New York 2 th ed, pp:863-905, 1995.
30. Rosai J. Large Bowel, Chapter 11. İn Ackerman's Surgical Pathology, ed Rosai J. St Louis. Mosby ;729-799, 8 th, 1996.
31. Topuz E, Aykan FN. Sindirim Sistemi Kanseri İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 373-475, 1998.
32. Ensari A. Temel Patoloji. Edit. Mocan Kuzey G, Özdamar ŞO, Zergeroğlu S. İnce ve Kalın Barsak Hastalıkları. Güneş Kitabevi, 2007:427-441.
33. Kumar V, Fausto N, Abbas A. Robbins Pathology Basis of Disease. The Gastrointestinal Tract. 7th ed, W.B.Saunders Company; Philadelphia, 2004:828-870.

34. Cooper HS. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. In: Mills SE, Carter D, Oberman HA, Reuter V, Stoler M. Intestinal Neoplasm. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, 2004;1543-1601.
35. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. In: Rosai J. Gastrointestinal Tract, Large Bowel. Mosby, 2004;1(9):776-855.
36. Jass JR. Diagnostic Histopathology of Tumours. In Fletcher CDM, Livingstone C. Tumours of the Small and Large Intestines (Including the Anal region). 2000;1:369-409.
37. Redston M. Surgical Pathology of the GI tract, Liver, Biliary tract, and Pancreas. 1 st ed: Saunders, 2004;1:441-472.
38. Crawford JM, Kumar V. Robbins Temel Patoloji. In Cevikbaş U. Ağız Boşluğu ve Gastrointestinal Sistem. 7. ed, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2003:563-590.
39. Dalton P, Chandrasoma P. Gastrointestinal Pathology. In: Chandrasoma P. Colorectal Malignant Neoplasm. 1st ed. Stamford Connecticut: Appleton&Lange, 1999:339-364.
40. Waldman SA, Cagir B, Rakinic J. Use of guanylyl cyclase C for detecting micrometastases in lymph nodes of patients with colon cancer. Dis Colon Rectum. 1998;41:310-315.
41. Cagir B, Gelmann A, Park J, Fava T, Tankelevitch A, Bittner EW, et al. Guanylyl cyclase C Messenger RNA is a biomarker for recurrent stage II colorectal cancer. Ann Intern Med. 1999;131:805-12.
42. Khorana AA, Ryan CK, Cox C, Eberly S, Sahasrabudhe DM. Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with stage II and stage III colon carcinoma. Cancer. 2003;97:960-8.
43. Hamilton Sr, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. In: Hamilton SR, Aaltonen LA. Tumours of Colon and Rectum. 1 st ed, Lyon, France: IARC Press; 2000:103-143.

44. Paietta E. Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept? *Bone Marrow Transplant.* 2002;29:459-465.
45. Hunter KW. Host genetics and tumour metastasis. *Br J Cancer.* 2004;90:752–755.
46. Mocellin SU, Keilholz CR, Rossi D. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med.* 2006;12:130–139.
47. Vlems FA, Ruers TJ, Punt CJ, Wobbes T. Relevance of disseminated tumour cells in blood and bone marrow of patients with solid epithelial tumours in perspective. *Eur J Surg Oncol.* 2003;29:289–302.
48. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:448–456.
49. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:453–458.
50. Fehm T, A. Sagalowsky, E. Clifford, P. Beitsch, H. Saboorian, D. Euhus et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res.* 2002;8:2073–2084.
51. Austrup F, Uciechowski C, Eder B, Bockmann B, Suchy, G Driesel et al. Giesing, Prognostic value of genomic alterations in minimal residual cancer cells purified from the blood of breast cancer patients, *Br J Cancer.* 2000;83:1664–1673.
52. Soria JC, Gauthier LR, Raymond E, Granotier C, Morat L. Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 1999;5:971–975.
53. Reinhold U, Ludtke-Handjery HC, Schnautz S, Kreysel HW. The analysis of tyrosinase-specific mRNA in blood samples of melanoma patients by RTPCR is not a useful test for metastatic tumor progression, *J Invest Dermatol.* 1997;108:166–169.
54. Fehm T, Becker S, Bachmann C, Beck V, Gebauer G. Solomayer, Detection of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers. *Gynecol Oncol.* 2006;103:942–947.

55. Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation, *Cancer*. 2006;107:885–892.
56. Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M, Schrodell A, Willeke F, et al. Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes blood and bone marrow, *Clin Cancer Res*. 1999;5:1830–1836.
57. Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, Karesen R. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer*. 2006;118:2013–2019.
58. Conzelmann M, Dieterle CP, Linnemann U, Berger MR. Cytokeratin 20 and guanylyl cyclase C mRNA is largely present in lymph node and liver specimens of colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2003;107:617–28.
59. Sonoda H, Yamamoto K, Kushima R, Okabe H. Detection of lymph node micrometastasis in gastric cancer by MUC2 RT-PCR: usefulness in pT1 cases. *J Surg Oncol*. 2004;88:63–70.
60. Ji XQ, Sato H, Tanaka H, Konishi Y. Real-time quantitative RT-PCR detection of disseminated endometrial tumor cells in peripheral blood and lymph nodes using the LightCycler System. *Gynecol Oncol*. 2006;100:355–360.
61. Kong SL, Salto-Tellez M, Leong AP, Chan YH, Koay ES. Discordant quantitative detection of putative biomarkers in nodal micrometastases of colorectal cancer: biological and clinical implications. *J Clin Pathol*. 2005;58:839–844.
62. Guadagni F, Kantor J, Aloe S, Carone MD, Spila A, D'Alessandro R, et al. Detection of blood-borne cells in colorectal cancer patients by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA: longitudinal analyses and demonstration of its potential importance as an adjunct to multiple serum markers. *Cancer Res*. 2001;61:2523–2532.
63. Chen XM, Chen GY, Wang ZR, Zhu FS. Detection of micrometastasis of gastric carcinoma in peripheral blood circulation, *World J Gastroenterol*. 2004;10:804–808.

64. Hampton R, Walker M, Marshall J, Juhl H. Differential expression of carcinoembryonic antigen (CEA) splice variants in whole blood of colon cancer patients and healthy volunteers: implication for the detection of circulating colon cancer cells. *Oncogene*. 2002;21:7817–7823.
65. Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol*. 2004;5:79–88.
66. Hardingham JE, Hewett PJ, Sage RE, Finch JL, Nuttall JD. Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and A. Gervasoni. *Cancer Letters* 263 (2008) 267–279 275 in patients with benign bowel disease. *Int J Cancer*. 2000;89:8–13.
67. Iinuma H, Okinaga K, Egami H, Mimori K, Hayashi N. Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2006;28:297–306.
68. Guller U, Zajac P, Schnider A, Bosch B, Vorburger S, Zuber M. Disseminated single tumor cells as detected by real-time quantitative polymerase chain reaction represent a prognostic factor in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Ann Surg*. 2002;236:768–775 (Discussion 775–776).
69. Vogel I. Disseminated tumour cells. Their detection and significance for prognosis of gastrointestinal and pancreatic carcinomas, *Virchows Arch*. 2001;439:109–117.
70. Fujita S, Kudo N, Akasu T, Moriya Y. Detection of cytokeratin 19 and 20 mRNA in peripheral and mesenteric blood from colorectal cancer patients and their prognosis. *Int J Colorectal Dis*. 2001;16:141–146.
71. Weigelt B, Bosma AJ, Hart AA, Rodenhuis S. Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2003;88:1091–1094.
72. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:781–791.

73. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:1420–1430.
74. Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V, Jackson S, Fritsche HA, Islam R, et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden, *Clin Breast Cancer*. 2007;7:471–479.
75. Soeth E, Grigoleit U, Moellmann B, Roder C, Schniewind B. Detection of tumor cell dissemination in pancreatic ductal carcinoma patients by CK 20 RT-PCR indicates poor survival. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131:669–676.
76. Smerage JB, Hayes DF. The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer. *Br J Cancer*. 2006;94:8–12.
77. Lobodasch K, Frohlich F, Rengsberger M, Schubert R, Dengler R. Quantification of circulating tumour cells for the monitoring of adjuvant therapy in breast cancer: an increase in cell number at completion of therapy is a predictor of early relapse. *Breast*. 2007;16:211–218.
78. Braun S, Hepp F, Kentenich CR, Janni W, Pantel K, Riethmuller G. Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res*. 1999;5:3999–4004.
79. Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Coombes, Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol*. 2000;18:1432–1439.
80. Cristofanilli M, Mendelsohn J. Circulating tumor cells in breast cancer: advanced tools for “tailored” therapy, *Proc Natl Acad Sci*. 2006;106:17073–17074.
81. Douard R, Wind P, Sales JP, Landi B, Berger A. Long-term prognostic value of detection of circulating colorectal cancer cells using CGM2 reverse BMC Cancer 2006, 1471-2407/6/250 Page 9 of 9 transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Surgery*. 2006;139:556-562.

82. Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, Sreter L, Tulassay Z. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2001;7:4080-4085.
83. Guo J, Xiao B, Zhang X, Jin Z, Chen J, Qin L et al. Combined use of positive and negative immunomagnetic isolation followed by real-time RT-PCR for detection of the circulating tumor cells in patients with colorectal cancers. *J Mol Med.* 2004;82:768-774.
84. Smirnov DA, Zweitzig DR, Foulk BW, Miller MC, Doyle GV, Pienta KJ et al. Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res* 2005;65:4993-4997.
85. Lloyd JM, McIver CM, Stephenson SA, Hewett PJ, Rieger N. Identification of early-stage colorectal cancer patients at risk of relapse post-resection by immunobead reverse transcription-PCR analysis of peritoneal lavage fluid for malignant cells. *Clin Cancer Res.* 2006;12:417-423.
86. Fournier MV, Guimaraes da Costa F, Paschoal ME, Ronco LV, Carvalho MG. Identification of a gene encoding a human oxysterol-binding protein-homologue: a potential general molecular marker for blood dissemination of solid tumors. *Cancer Res.* 1999;59:3748-3753.
87. Aquino A, Prete SP, Balduzzi A, Formica V, Fossile E, Bonmassar L, et al. Treatment of peripheral blood with staurosporine increases detection of circulating carcinoembryonic antigen positive tumor cells. *Int J Cancer* 2002;100:119-121.
88. Clarke LE, Leitzel K, Smith J, Ali SM, Lipton A. Epidermal growth factor receptor mRNA in peripheral blood of patients with pancreatic, lung, and colon carcinomas detected by RT-PCR. *Int J Oncol.* 2003;22:425-430.
89. Cillo U, Navaglia F, Vitale A, Molari A, Basso D, Bassanello M, et al. Clinical significance of alpha-fetoprotein mRNA in blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta.* 2004;347:129-138.
90. Dandachi N, Balic M, Stanzer S, Halm M, Resel M, Hinterleitner TA, et al. Critical evaluation of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA in colorectal cancer patients. *J Mol Diagn.* 2005;7:631-637.

91. Giribaldi G, Procida S, Ulliers D, Mannu F, Volpato R, Mandili G, et al. Specific detection of cytokeratin 20-positive cells in blood of colorectal and breast cancer patients by a high sensitivity real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. *J Mol Diagn.* 2006;8:105-112.
92. Zieglschmid V, Hollmann C, Bocher O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2005;42:155-196.
93. Pitari GM, Guglielmo Di, Park MD. Detection of lymph node micrometastasis in gastric cancer by MUC2 RT-PCR. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98:7846-7851.
94. Currien MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89:947-951.
95. Hamra FK, Forte LR, Eber SL, Pidhorodeckyj NV. Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90:10464-10468.
96. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci.* 1997;22:307-312.
97. Forte LR, Eber SL, Fan X, London R. Lymphoguanlylin: cloning and characterization of a unique member of the guanylin peptide family. *Endocrinology.* 1999;140:1800-1806.
98. Hamra FK, Eber SL, Chin DT. Regulation of intestinal uroguanylin/guanylin receptor-mediated responses by mucosal acidity. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94:2705-2710.
99. Forte LR. Guanylin regulatory peptides: structures, biological activities mediated by cyclic GMP and pathobiology. *Regul Pept.* 1999;81:25-39.
100. Krause WJ, Freeman RH, Eber SL, Hamra FK. Distribution of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin/guanylin/uroguanylin receptors in the avian intestinal tract. *Acta Anat.* 1993;153:210-219.

101. Krause WJ, Freeman RH, Eber SL, Hamra FK. Guanylyl cyclase receptors and guanylin-like peptides in reptilian intestine. *Gen Comp Endocrinol.* 1997;107:229–239.
102. Wilmink AB. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1997;40:483–493.
103. Briskey EN, Pamies RJ. Colorectal cancer: update on recent advances and their impact on screening protocols. *J Natl Med Assoc.* 2000;92:222–230.
104. Cohen MB, Hawkins JA, Witte DP. Guanylin mRNA expression in human intestine and colorectal adenocarcinoma. *Lab Invest.* 1998;78:101–108
105. Notterman DA, Alon U, Sierk AJ, Levine AJ. Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res.* 2001;61:3124–3130.
106. Birkenkamp-Demtrode K, Lotte Christensen L, Harder Olesen S. Constitutive NF-kappaB DNA-binding activity in AML is frequently mediated by a Ras/PI3-K/PKB-dependent pathway. *Cancer Res.* 2002;62:4352–4363.
107. Shailubhai K, Yu HH, Karunanandaa K, Wang JY. Uroguanylin treatment suppresses polyp formation in the *Apc(Min/+)* mouse and induces apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via cyclic GMP. *Cancer Res.* 2000;60:5151–5157.
108. Buset M, Lipkin M, Winawer S, Swaroop S, Friedman E. Inhibition of human colonic epithelial cell proliferation in vivo and in vitro by calcium. *Cancer Res.* 1986;46:5426–5430.
109. Penman ID, Liang QL, Bode J, Eastwood MA, Arends MJ. Dietary calcium supplementation increases apoptosis in the distal murine colonic epithelium. *J Clin Pathol.* 2000;53:302–307.
110. Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van der Meer R. Red meat and colon cancer: dietary haem, but not fat, has cytotoxic and hyperproliferative effects on rat colonic epithelium. *Carcinogenesis.* 2001;22:1653–1659.

111. Pantel K, Hosch SB. Molecular profiling of micrometastatic cancer cells. *Ann Surg Oncol*. 2001;8:18–21.
112. Zehentner BK. Detection of disseminated tumor cells: strategies and diagnostic implications. *Expert Rev Mol Diagn*. 2002;2:41–48.
113. Tsavellas G, Patel H, Allen-Mersh TG. Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer. *Br J Surg*. 2001;88:1307–1320.
114. Waldman SA, Cagir B, Rakinic J, Fry RD, Goldstein SD, Isenberg G et al. Use of guanylyl cyclase C for detecting micrometastases in lymph nodes of patients with colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 1998;41:310-315.
115. Chen WS, Chieng MY, Hwang JL, Jacqueline ML, Jen KL. Impact of Circulating Free Tumor Cells in the Peripheral Blood of Colorectal Cancer Patients during Laparoscopic Surgery. *World J Surg*. 2004;28:552-557.
116. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002;40(5):403-439.
117. Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14:110-22.
118. Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Lizuka H. Lessons from disorders of epidermal differentiation-associated keratins. *Histol Histopathol* 2002;17:331-8.
119. Smith FJD. The molecular genetics of keratin disorders. *Am J Clin Dermatol*. 2003;4:347-364.
120. Bernerd F, Del Bino S, Asselineau. Regulation of keratin expression by ultraviolet radiation: differential and specific effects of ultraviolet B and ultraviolet A exposure. *J Invest Dermatol*. 2001;117:1421-9.
121. Hattori N, Komine M, Yano S, Kaneko T, Hanakawa Y, Hashimoto K, et al. Interferon-gamma a strong suppressor of cell proliferation, induces upregulation of K6, one of the inflammatory- and proliferation-associated keratins. *J Invest Dermatol*. 2002;119:403-10.

122. Rickert RR, Auerbach O, Garfinkel L, Hammond EC, Frasca JM. Adenomatous lesions of the large bowel: an autopsy survey. *Cancer* 1979;43(5):1847-57.
123. Harnden P, Allam A, Joyce AD, Patel A, Selby P, Southgate J, et al. Cytokeratin 20 expression by non-invasive transitional cell carcinomas: potential for distinguishing recurrent from non-recurrent disease. *Histopathology*. 1995;27:169–174.
124. Christoph F, Muller M, Schostak M, Soong R, Tabiti K, Miller K, et al. Quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA expression in bladder carcinoma by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Urology*. 2004;64:157–61.
125. Tot T. Cytokeratins 20 and 7 as biomarkers: usefulness in discriminating primary from metastatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 2002;38(6):758-763.
126. Chu P, Wu E, Weiss LM. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol*. 2000;13(9):962-972.
127. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006;27:95-125.
128. Khair G, Monson JR, Greenman J. Epithelial molecular markers in the peripheral blood of patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007;50:1188–1203.
129. Wittekind C, Neid M. Cancer invasion and metastasis. *Oncology*. 2005;69(1):14–16.
130. Kohn EC, Liotta LA. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res*. 1995;55:1856–1862.
131. Gray JW. Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors. *Cancer Cell*. 2003;4:4–6.
132. Gerhard DS, LaBuda MC, Bland SD. Initial report of a genome search for the affective disorder predisposition gene in the old order Amish pedigrees: chromosomes 1 and 11. *Am J Med Genet*. 1994;54:398–404.

133. Wong AH, Tam NW, Yang YL. Physical association between STAT1 and the interferon-inducible protein kinase PKR and implications for interferon and double-stranded RNA signaling pathways. *EMBO J.* 1997;16:1291–1304.
134. Denis AL, Guido M, Adler RD. Antiphospholipid antibodies and pregnancy rates and outcome in in vitro fertilization patients. *EMBO J.* 1997;67:1084–1090.
135. Funaki NO, Tanaka J, Itami A. Detection of colorectal carcinoma cells in circulating peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction targeting cytokeratin-20 mRNA. *Life Sci.* 1997;60:643–652.
136. Dorudi S, Kinrade E, Marshall NC. Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancer. *Br J Surg.* 1998;85:98–100.
137. Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol.* 1992;140:427–447.
138. Moll R, Zimbelmann R, Goldschmidt MD, Keith M, Laufer J. The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation* 1992;53:75–93.
139. Denis MG, Lipart C, Leborgne J, Lehur PA, Galmiche JP, et al. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 1997;74:540–544.
140. Little VR, Warren RS, Moore D, Pallavicini MG. Molecular cytogenetic analysis of cytokeratin 20-labeled cells in primary tumors and bone marrow aspirates from colorectal carcinoma patients. *Cancer.* 1997;79:1664–1670.
141. Mori M, Mimori K, Inoue H. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 1995;55:3417–3420.
142. Yamaguchi K, Takagi Y, Aoki S. Significant detection of circulating cancer cells in the blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction during colorectal cancer resection. *Ann Surg.* 2000;232:58–65.

143. Chen WS, Chung MY, Liu JH, Liu JM, Lin JK. Impact of Circulating Free Tumor Cells in the Peripheral Blood of Colorectal Cancer Patients during Laparoscopic Surgery. *World J Surg.* 2004;28(6):552-7.
144. Fava TA, Desnoyers R, Schulz S, Park J, Weinberg D, Mitchell E et al. Ectopic Expression of Guanylyl Cyclase C in CD34+ Progenitor Cells in Peripheral Blood. *J Clin Oncol.* 2001;19:3951-3959.
145. Birbe R, Palazzo JP, Walters R, Weinberg D, Schulz S, Waldman SA et al. Guanylyl cyclase C is a marker of intestinal metaplasia, dysplasia, and adenocarcinoma of the gastrointestinal tract. *Hum Pathol.* 2005;36(2):170-9.
146. Solmi R, Ugolini G, Rosati G, Zanotti S, Lauriola M, Montroni I, et al. Microarray-based identification and RT-PCR test screening for epithelial-specific mRNAs in peripheral blood of patients with colon cancer *BMC Cancer.* 2006;20;6:250.
147. Iddings D, Ahmad A, Elashoff D, Bilchik A. The Prognostic Effect of Micrometastases in Previously Staged Lymph Node Negative (N0) Colorectal Carcinoma: A Meta-analysis. *Ann Surg Oncol.* 2006;13(11):1386-92.
148. Adell G, Boeryd B, Franlund B. Occurrence and prognostic importance of micrometastases in regional lymph nodes in Dukes B colorectal carcinoma: An immunohistochemical study. *Eur J Surg.* 1996;162:637-42.
149. Broll R, Schauer V, Schimmelpenning H. Prognostic relevance of occult tumor cells in lymph nodes of colorectal carcinomas: An immunohistochemical study. *Dis Colon Rectum.* 1997;40:1465-71.
150. Clarke G, Ryan E, O Keane JC, Crowe J, MacMathuna P. The detection of cytokeratins in lymph nodes of Dukes B colorectal cancer subjects predicts a poor outcome. *Eur J Gastro Hepatol.* 2000;12:549-52.
151. Cutait R, Alves VA, Lopes LC. Restaging of colorectal cancer based on the identification of lymph node micrometastases through immunoperoxidase staining of CEA and cytokeratins. *Dis Colon Rectum.* 1991;34:917-20.

152. Davidson BR, Sams VR, Styles J, Deane C, Boulos PB. Detection of occult nodal metastases in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 1990;15;65:967–70.
153. Greenson JK, Isenhardt CE, Rice R, Mojzisek C, Houchens D, Martin EW Jr et al. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Dukes B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49: correlation with long-term survival. *Cancer*. 1994;73:563–9.
154. Haboubi N, Clark P, Kaftan S. The importance of combining xylene clearance and immunohistochemistry in the accurate staging of colorectal cancer. *J R Soc Med*. 1992;85:386–8.
155. Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A, Kato Y, Nakamori S, Imaoka S, et al. Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. *Lancet*. 1995;345:1257–9.
156. Isaka N, Nozue M, Doy M, Fukao K. Prognostic significance of perirectal lymph node micrometastases in Dukes B rectal carcinoma: an immunohistochemical study by CAM5.2. *Clin Cancer Res*. 1999;5:2065–8.
157. Jeffers MD, O'Dowd GM, Mulcahy H, Stagg M, O'Donoghue DP, Toner M, et al. The prognostic significance of immunohistochemically detected lymph node micrometastases in colorectal carcinoma. *J Pathol* 1994;172:183–7.
158. Makin C, Bobrow L, Nicholls J. Can immunohistology improve detection of lymph-node metastases in large-bowel cancer? *Dis Colon Rectum*. 1989;32:99–102.
159. Mori M, Mimori K, Inoue H. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 1995;55:3417–20.
160. Nakanishi Y, Atsushi O, Yamauchi Y. Clinical implications of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancers. *Oncology*. 1999;57:276–80.

161. Nakamori S, Kameyama M, Furukawa H. Genetic detection of colorectal cancer cells in circulation and lymph nodes. *Dis Colon Rectum*. 1997;40(10):S29–36.
162. Nicholson AG, Marks CG, Cook MG. Effect on lymph node status of triple leveling and immunohistochemistry with CAM 5.2 on node negative colorectal carcinomas. *Gut*. 1994;35:1447–8
163. Noura S, Yamamoto H, Miyake Y. Immunohistochemical assessment of localization and frequency of micrometastasis in lymph nodes of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8:759–67.
164. Bergström C, Palmqvist R, Denekamp J, Oberg A, Tavelin B, Stenling R. Are lymph node micrometastases of any clinical significance in Dukes stage A and B colorectal cancer? *Dis Colon Rectum*. 1998;41:1244–9.
165. Palma RT, Waisberg J, Bromberg SH, Simão AB, Godoy AC. Micrometastasis in regional lymph nodes of extirpated colorectal carcinoma: immunohistochemical study using anti-cytokeratin antibodies AE1/AE3. *Colorectal Dis*. 2003;5:164–8.
166. Sasaki M, Watanabe H, Jass JR, Ajioka Y, Kobayashi M, Matsuda K, et al. Occult lymph node metastases detected by cytokeratin immunohistochemistry predict recurrence in “node negative” colorectal cancer. *J Gastroenterol*. 1997;32:758–64.
167. Tschmelitsch J, Klimstra D, Cohen A. Lymph node micrometastases do not predict relapse in stage II colon cancer. *Ann Surg Oncol*. 2000;7:601–8.
168. Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, Yamaguchi K, Hirabayashi Y, Kitano S et al. Pattern of lymph node micrometastases and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2001;8:300–4.
169. Yamamoto H, Miyake Y, Noura S, Ohnishi T, Takayama O, Ikenaga M et al. Clinical significance of micrometastasis to lymph nodes in gastrointestinal tract cancers. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2001;28:776–83.
170. Noura S, Hirofumi Y, Ohnishi T. Comparative detection of lymph node micrometastasis of stage II colorectal cancer by reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2002; 20:4232–41.

171. Nieroda CA, Arnold MW, Barbera-Guillem E, Martin EW. Micrometastasis and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1998;339:223–8.
172. Rosenberg R, Hoos A, Mueller J, Baier P, Stricker D, Werner M, et al. Prognostic significance of cytokeratin-20 reverse-transcriptase polymerase chain reaction in lymph nodes of node-negative colorectal cancer patients. *J Clin Oncol.* 2002;20:1049–55.
173. Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22:3408–19.
174. Bustin SA, Gyselman VG, Williams NS, Dorudi S. Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br J Cancer.* 1999;79(11-12):1813-20.
175. Miura M, Ichikawa Y, Tanaka K, Kamiyama M, Hamaguchi Y, Ishikawa T, et al. Real-time PCR (TaqMan PCR) quantification of carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Anticancer Res.* 2003;23(2B):1271-1276.
176. Kijima M, Togo S, Ichikawa Y, Miura M, Yamagishi S, Matsuo K, et al. Clinical significance of serum CEA protein and CEA mRNA after resection of colorectal liver metastases. *Anticancer Res.* 2005;25(2B):1327-1332.
177. Holdenrieder S, Holubec L Jr, Topolcan O, Finek J, Stieber P. Circulating nucleosomes and cytokeratin 19-fragments in patients with colorectal cancer during chemotherapy. *Anticancer Res.* 2005;25(3A):1795-1801.
178. Dong X, Li XF, Zheng S, Jiang WZ. Quantitative real-time RT-PCR detection for CEA, CK20 and CK19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006;7(6):445-51.
179. Dandachi N, Balic M, Stanzer S, Halm M, Resel M, Hinterleitner TA, et al. Critical evaluation of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA in colorectal cancer patients. *Mol Diagn.* 2005;7(5):631-637.

180. Ishida H, Miwa H, Tatsuta M, Masutani S, Imamura H, Shimizu J, et al. Ki-67 and CEA expression as prognostic markers in Dukes' C colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2004;207(1):109-115.
181. Rosenberg R, Hoos A, Mueller J, Nekarda H. Impact of cytokeratin-20 and carcinoembryonic antigen mRNA detection by RT-PCR in regional lymph nodes of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2000;83(10):1323-1329.