

T.C.  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Patoloji Anabilim Dalı

KOLOREKTAL KARSİNOMLARDA p53 GEN  
EKSPRESYONUNUN KLİNİK VE HİSTOPATOLOJİK  
PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ

103482

Dr. Nermin KARAHAN

103482

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç.Dr. Özden ÇANDIR

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
BOKÜ MANTASYON MERKEZİ

2001-İSPARTA

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>2</b>
<b>MATERYAL METOD.....</b>	<b>33</b>
<b>BULGULAR.....</b>	<b>36</b>
<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>44</b>
<b>SONUÇ.....</b>	<b>51</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>52</b>
<b>İNGİLİZCE ÖZET.....</b>	<b>53</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>54</b>

faktörlerle ilişkilidir (2, 3). Kolon kanserlerinin % 98'ni adenokarsinomlar oluşturur (2).

Bütün kolorektal kanserler genetik değişiklikler göstermektedir (2, 3). Kolon karsinogenezinde oluşan genetik değişiklikler birden fazla basamaklıdır. Genomdaki değişikliklerin tamamının birikimi ile neoplazi oluşur (4, 5).

Rutin çalışmalarda; kolon kanserlerinin tanısı histopatolojik olarak ışık mikroskobu ile konulur. Son yıllarda gen düzeyindeki etyoloji ve patogenezi anlamak için tümöre spesifik genler üzerinde çalışılmıştır.

Bizim çalışmamızda immünohistokimyasal olarak Türk popülasyonundaki kolon kanserlerinin p53 genindeki mutasyonları, bu mutasyonların prognostik faktörlerle korelasyonunu araştırdık.

## GENEL BİLGİLER

### KOLONUN ANATOMİSİ

Kalın bağırsaklar 1.5 m uzunluğunda olup ileumun sonundan anüse kadar uzanır (6). Kolon dört bölüme ayrılır;

- 1- Çıkan kolon
- 2- Transvers kolon
- 3- İnen kolon
- 4- Sigmoid kolon (6, 7).

**Çıkan Kolon:** Çekumdan daha dar olan çıkan kolon, yaklaşık olarak çekumdan itibaren 15 cm uzunluğundadır (7). Aşağıda çekumun üst kenarından başlar, yukarıda karaciğerin sağ lobunun alt yüzünde regio lateralis lumbalis dekstra'da sola ve öne doğru kıvrılarak transvers kolon olarak devam eder. Bu kıvrım yeri fleksura koli dekstra olarak tanımlanır. Alt sınırı planum transtuberulare'de, üst sınırı ise planum transplorikum ile planum subkostale arasındadır. Arka yüzü dışında etrafı periton ile örtülüdür. Ön yüzü, karın ön duvarı ve ince bağırsak kısımları ile temas eder. Arka yüzü, fascia iliaca, musculus kuadratus lumborum ile musculus transversus abdominisin aponevrozu ve sağ böbreğin ön yüzünün alt dış kısmı ile komşudur (6, 7).

**Transvers Kolon :** Kolonun en uzun ve en hareketli bölümüdür. Uzunluğu yaklaşık 50 cm kadardır. Flexura koli dekstra'dan başlar, regio



umbilikalıs'den geçerek regio lateralis sinistra'ya, buradan da yukarı doğru uzanarak regio hipokondriaka sinistra'da sonlanır. Burada dalağın ön-alt ucu altında, birden arkaya ve aşağı doğru dönerek fleksura koli sinistra'yı oluşturur. Transvers kolonun sağ ucunun arka yüzü peritonsuzdur. Mezokolon transversum, yukarıda pankreasın ön kenarına tutunur. Transvers kolonun üst yüzü karaciğer, safra kesesi, midenin büyük kurvaturu ve dalağın dış kenarı ile; alt yüzü ince bağırsak kıvrımları ile; ön yüzü omentum majus'un arka yüzü ve karın ön duvarı ile; arka yüzü duodenumun pars descendens'i, kaput pankreatis, mezokolon trasversumun buna yakın olan bölümü ve bazı ince bağırsak kıvrımları ile komşuluk yapar (7).

**İnen Kolon :** Yaklaşık 25 cm uzunluğundadır. Fleksura koli sinistra'dan başlar, regio koi sinistra'da aşağı doğru uzanır. Sol böbreğin ön yüzünün dış kenarının alt yarısında aşağı doğru uzanır, böbreğin alt tarafında ise musculus psoas majör ve musculus kuadrutus lumborum arasındaki olukta ilerleyerek krista iliaka'ya gelir. Buradan iče ve aşağı doğru kıvrılarak musculus iliakus'un önüne geçer ve küçük pelvis'in girişinde sigmoid kolon ile birleşir. İnen kolonun her tarafının peritonla örtülü olduğu durum sık olarak görülür (6, 7).

**Sigmoid Kolon:** Yaklaşık 40 cm uzunluğundadır, fakat boyu çok varyasyon gösterir. Bir S harfi şeklinde kıvrım gösteren sigmoid kolon normalde küçük pelviste bulunur. Fakat bazı durumlarda kısmen karın boşluğuna da girer. Küçük pelvis girişinde inen kolonun bir devamı olarak başlar, bir iki kıvrım yaptıktan sonra üçüncü sakral omur hizasında rektumla birleşir. Sigmoid kolonun her tarafı peritonla örtülüdür ve mezokolon sigmoideum aracılığı ile pelvis duvarına asılmıştır. Dış tarafta arteria ve vena iliaka eksterna ,nervus obturatorius, kadınlarda ovaryum, erkeklerde duktus deferens ve pelvis'in lateral duvarı ile komşudur. Arkada, sol tarafın arteria ve vena iliaka interna, ureter, musculus priformis ve plexus sakralis ile komşudur. Aşağıda erkekte

mesane'nin kadında uterus ve mesane'nin üzerine oturmuş durumdadır. Yukarıda ve sağ tarafta ileum'un son kıvrımlarıyla komşuluk yapar (7).

Sigmoid kolon'un pozisyonu ve şekli aşağıdaki durumlara bağlı olarak oldukça varyasyon göstermektedir;

1-Sigmoid kolon'un uzunluğuna

2-Mezokolon sigmoideum'un uzunluk durumuna

3-İçindeki içeriğin miktarına, (dolu olduğu zaman karın boşluğuna yükselir, boşalınca tekrar pelvis boşluğuna iner).

4-Rektum, mesane ve uterus'un doluluk ve boşluk durumuna, (bu organlar dolu ise sigmoid kolon yukarı yükselir, boşaldıklarında tekrar aşağıya iner) bağlı olarak varyasyon gösterir (7).

**Rektum:** Ortalama 12 cm uzunluğundadır. Rektum sigmoid kolondan bazı farklılıklar gösterir; sigmoid kolonda görülen haustra koli, apendises epiploika ve mezenter rektumda yoktur. Sigmoid kolonda bulunan tenia koli'ler ise henüz sigmoid kolon üzerinde iken rektuma 5 cm kalana kadar önde ve arkada yerleşmiş olan iki band şekline dönüşerek rektumun da üzerinde devam eder. Rektumun sadece üst 2/3'ü periton ile örtülüdür.

Rektumun iç yüzünü döşeyen mukoza diğer kalın bağırsak bölümlerine oranla daha kalın, damardan zengin ve altındaki tabakaya daha gevşek olarak tutunmuştur. Longitudinal kas lifleri tüm duvara yayılmıştır fakat daha ziyade ön ve arka yüzde daha yoğundur. Rektumun arkada ve orta planda alt üç sakral vertebra, koksiks, arteria ve vena sakralis media ve arteria ve vena rektalis süperiorun dalları ile komşuluk yapar. Orta hattın her iki yanında musculus priformis, alt üç sakral ve koksigeal spinal sinirlerin ön dalları ve musculus koksigeus ile komşudur (7).

## KOLON ve REKTUMUN HİSTOLOJİSİ

Gastrointestinal kanalda baştan başa karakteristik dört tabaka bulunur.

1-Mukoza

a-Lamina epitelialis

b-Lamina propria

2-Muskularis mukoza

3-Submukoza

4-Muskularis eksterna

5-Seroza (8).

**Mukoza:** Kalın barsak mukozası rektal kısmı hariç katlanma göstermez. Mukoza yumuşak bir yüzeye sahiptir, ne sirküler plikalar ne de villuslar içerir (8).

Kalın barsağın lamina propriası Lieberkühn kriptaları adı verilen mukozanın baştan başa tam kalınlığı boyunca uzanan çok sayıda tubuler glanddan oluşur. Glandları döşeyen epitel basit kolumnar epitel olup intestinal yüzeyden invajinasyonlar gösterir. Kolonun luminal yüzeyinin mikroskopik seviyede araştırmasında; kriptlerin açıldığı düzenli bir dizilim paternine sahip olduğu görülmüştür (8). Yüzey epiteli absorbtif ve goblet hücrelerinden ibarettir. Kolondaki absorbtif hücreler Na ve H<sub>2</sub>O emiliminden sorumludur. Epitel hücrelerinin bazal kısmından Na'nın aktif transportunu takiben su pasif olarak emilir (9). Goblet hücreleri depolanmış ve sekrete mukus granülleri sentezler. Goblet hücreleri nükleusları bazal yerleşimli H&E boyasıyla sitoplazmaları boş görülen hücrelerdir (10).

Basit kolumnar epitle döşeli olan kript epiteli heterojen hücre popülasyonu içerir. Kriptlerin içerisinde matür absorbtif hücreler, goblet hücreleri, immatür prekürsör hücreler, enteroendokrin hücreler bulunur. Enteroendokrin hücreler genellikle absorbtif ve goblet hücrelerin karşısında kutuplaşmıştır. Absorbtif ve goblet hücreleri altı günde bir, enteroendokrin

hücreler dört haftada bir, kriptlerin lüminal yüzeyindeki epitel hücreleri beş günde bir rejenere olur.

**Lamina propria:** Kolonun lamina propriası bazı temel komponentler içerir.

Bunlar;

- Kollajen tabaka
- Kusursuz gelişmiş GALT (Gut- Associated Lymphatic Tissue)
- İyi gelişmiş perikriptal fibroblast tabakası
- Lenfatik damarların yokluğudur.

Lamina propria, gevşek kollajen lifleri arasına yerleşmiş hücrelerin çeşitli türlerini içerir. Nadiren düz kas ve sinir lifleri vardır. Çeşitli sayıda plazma hücreleri belirgin olarak bulunur. Kolonik mukozadaki plazma hücrelerinin ana protein üretimi immünglobulin A'dır. Bununla birlikte İg G, İg M ve İg E de sentezler (10). Normal bireylerde bu tabakanın kalınlığı 5 µm'dir. Hiperplastik kolon poliplerinde bu kalınlık üç kat artar (8).

GALT terminal ileumun devamı olarak kalın bağırsağın lamina propriasında bulunur. Burada ince bağırsaktan daha iyi gelişmiştir. Kolondaki immün sistemin aşırı gelişmesi olasılıkla çok miktarda belirti verir ve mikroorganizmalar, metabolizmanın zararlı son ürünleri normalde lümende bulunur. Kolonik kriptler arasındaki lamina propriada lenfatik damarlar yoktur. Lenfatik damarlar, muskularis mukoza etrafında bir ağ oluşturur. Lamina propriada lenfatik damarların yokluğu kolon kanserlerinin metastazının yavaş olmasının altında yatan önemli bir bulgudur. Lenfatik damarlar muskularis eksterna etrafında bir ağ oluşturduğu gibi submukozada da bulunur (8).

**Submukoza:** Lamina propriadaki bir çok hücresel oluşumlar submukozada da bulunur. Bunlar; lenfosit, plazma hücreleri, makrofajlar ve fibroblastlardır. Submukozada Meissner pleksusu vardır. Submukoza içinde vasküler yapılar boldur (10).

**Muskularis Eksterna:** İte sirküler dışta longitüdüinal kas tabakasından oluşur (10). Muskularis eksternanın dıştaki longitudinal tabakası birbirine eşit mesafede 3 banttandır (8). Kolonda muskularis eksternanın dış tabakası tenia coli adı verilen ve makroskopik olarak da görülen longitüdüinal kas bantlarından oluşmuştur. Rektumda düz kasın dış longitüdüinal tabakası ince bağırsaktakine benzer üniform bir kalınlıktadır (8). Auerbach pleksusu sirküler ve longitüdüinal kas tabakaları arasında bulunur (10).

**Seroza:** Kolonun intraperitoneal kısımlarında serozada apendiks epiploika adı verilen yağ dokusundan oluşmuş küçük asılı uzantılar bulunur (11).

**Rektum:** Rektumun histolojisi kolon histolojisine benzer. Dış longitüdüinal kas tabakası ince bağırsaklarda olduğu gibi kalın bir tabakadır (8).

Anal bölgede mukozal membran rektal Morgagni sütunları denilen bir dizi longitüdüinal katlanma gösterir. Anüsün yaklaşık 2cm yukarısında intestinal mukozanın yerini çok katlı yassı epitel alır. Bu bölgenin lamina propriasında büyük venlerin oluşturduğu bir pleksus vardır (9).

## **KOLON TÜMÖRLERİNİN DAĞILIMI**

Kalın bağırsaktaki tüm kanserlerin %98'i adenokarsinomlardır. Kolorektal karsinomlar hemen hemen her zaman adenomatöz bir polip zemininden çıkar.

Kolorektal karsinomların dağılımları aşağıdaki gibidir.

- Çekum ve çıkan kolon % 38
- Transvers kolon %18
- İnen kolon %8
- Sigmoid kolon % 35
- Multiple yerleşimli olanlar % 1

Karsinomların %99'u tek oluşur ve sıklıkla kaynaklandıkları adenomatöz lezyonu yok ederler. Birden fazla karsinom mevcut ise bunlar genellikle kolonun değişik bölgelerinde birbirinden uzak yerleşim gösterirler (2).

### **Kolon Tümörlerinin Sınıflaması**

Kolorektal karsinomanın tek ve en önemli göstergesi tanının konduğu sıradaki tümörün yayılım aşamasıdır. 1954'de ASTLER ve COLLER tarafından tanımlanan evreleme sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistem, DUKES ve KIRKLİN tarafından öne sürülen sınıflamaların bir modifikasyonudur (12).

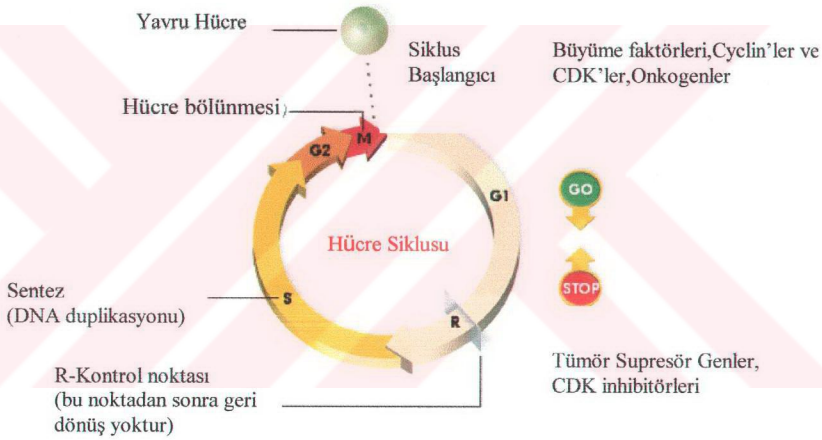
## Kolon Karsinomlarında ASTLER-COLLER Sınıflaması

<b>Tümör Evresi</b>	<b>Neoplazmların Histolojik Özellikleri</b>	<b>5 Yıllık Sağ Kalım</b>
A	Mukozada sınırlı	%100
B1	Muskülaris propriaya kadar uzanmış, ama aşmamış.Lenf ganglionları negatif.	%67
B2	Muskülaris propriayı aşmış Lenf ganglionları negatif	%54
C1	Muskülaris propriaya kadar uzanmış, ama aşmamış.Lenf ganglionları pozitif	%43
C2	Muskülaris propriayı aşmış Lenf ganglionları pozitif	%22
D	Uzak metastatik yayılım	Son derece düşük

**Hücre Siklusu:** Hücre büyüme siklusu dört evreden oluşur;

- 1- G1 (DNA sentezi öncesi)
- 2- S (DNA yapımı)
- 3- G2 (mitoz öncesi)
- 4- M (mitoz) (2, 19).

Hücre siklusunun basit bir şeması ise aşağıdadır



**Şekil 1.** Hücre siklusu

Hücre eğer bölünmüyorsa yani hücre siklusu dışında ise Go aşamasındadır. Organizmanın hücreleri, rejeneratif kapasiteleri ve hücre siklusu ile olan ilişkilerine göre üç gruba ayrılır.

1- Sürekli bölünen hücreler: Bunlara labil hücreler de denir. Bir mitozdan diğerine kadar hücre siklusunu izlerler ve yaşam boyunca çoğalarak ölen



hücrelerin yerlerini alırlar. Örneğin; derinin stratifiye skuamoz hücreleri, vaginal, ağız boşluğu ve serviksin çok katlı yassı epitelleri vücuttaki tüm ekzokrin organların kübik salgı kanal epitelleri, sindirim kanalı, uterus ve fallop tüplerinin kolumnar epiteli, üriner kanalın değici epiteli, dalak, kemik iliği ve hemopoetik doku hücreleri.

2- Sessiz hücreler: Bunlara stabil hücreler de denir. Normalde düşük çoğalma düzeyindedirler. G0 evresinde bulunurlar, bir sitümülasyonun varlığında hızlı çoğalabilme kapasiteleri vardır. Hücre kaybı olunca bölünme ve doku düzenlenmesini sağlayan uygun uyararla G1 evresine geçerler. Bu hücreler hangi dokuya aitlerse o dokuyu yeniden oluşturma gücündedirler.

3- Bölünmeyen hücreler: Bunlara permanent hücreler de denir. Bu hücreler intrauterin gelişimin bir noktasında ortaya çıkar ve doğumdan sonraki yaşamda mitoz bölünme göstermezler. Ganglion hücreleri, iskelet ve kalp kası hücreleri bu grubun temel üyeleridir (2, 19).

## **KANSERİN MOLEKÜLER TEMELİ**

Ölümçül olmayan genetik hasarlar karsinogenezin temelini oluştururlar. Bu genetik hasarlar kimyasallar radyasyon ya da virüsler gibi çevresel faktörler ya da kalıtsal olarak kazanılabilir (2).

Kanserin oluşumunun genetik hipotezine göre tümör kitlesi aslında bu genetik hataya sahip olan tek bir hücreden oluşur (2).

Kanser işte böyle mutasyona uğramış birey hücrelerin, etraflarındaki hücrelerin hayatları pahasına kontrolsüz bir şekilde çoğaldıkları, ama sonunda bir parçası oldukları organizmanın ölümüne neden olarak onunla birlikte öldükleri bir hastalıktır.

Kanser hücreleri ve onların bölünerek oluşturdukları yeni hücreler normalde bulunan kontrol mekanizmalarını aşarak onlara rağmen ürerler ve normalde diğer hücreler için ayrılmış olan bölgeleri işgal edip buralara yerleşirler. Kanser hücrelerinin hızlı bölünebilmenin yanı sıra bu hücrelerin vücutta düzenli olarak meydana gelen hücre özelleşmesi ve hücre ölümünü de kendi çıkarlarına uygun şekilde kullanacak özellikler edinmeleri gerekir. Kanserlerin çoğu tek bir anormal hücrenin çoğalmasından ortaya çıkar. Bu tek hücrenin anormal ve kontrolsüz çoğalacak olan hücre haline gelmesi muhtemelen hücrenin DNA dizisinde oluşan bir değişiklikten kaynaklanır. Bunu düşünmeye yol açacak en önemli sebeplerden biri kanserojen maddelerin büyük çoğunluğunun DNA'ya zarar verdikleri ve mutasyona yol açtıklarının bilinmesidir. Hücrelerde oluşan mutasyonların kansere yol açtığı bilindiği gibi bir hücrenin kanserleşebilmesi için birden fazla birbirinden bağımsız mutasyonlar taşınması gerektiği de bilinmektedir.

Şimdiye kadar yapılmış birçok çalışma ve gözlem tümör gelişiminin şu şekilde meydana geldiğini göstermektedir: Görünüşe göre kanserler başlangıçta mutasyona uğramış tek bir hücreden oluşmuş bir grubun arka arkaya mutasyon ve doğal seleksiyona uğramaları sonucunda gerçekleşir. Kanser bu şekilde evrimi büyük oranda şans faktörü içerir ve çok uzun zaman alır. Kanser evrim hızını belirleyen ana faktörler şunlardır:

- 1- mutasyon hızı,
- 2- vücuttaki hücre sayısı,
- 3- hücrelerin bölünme hızı
- 4- hücrelerin sahip oldukları mutasyon sayesinde daha çok sayıda üreyerek diğer normal hücreler üzerine kazandıkları avantaj.

İşte tüm bu faktörlerin etkisini artırıp, hızlandıracak her türlü olay kanser olasılığını artırır (13).

Kanser hücreleri kanser gelişiminin her aşamasında edindikleri mutasyonlarla yeni özellikler kazanırlar. Çevreye, etraflarındaki damarlanmayı

arttıracak maddeler salgılamak, ya da metastaz yapabilmek için onları buldukları dokulara bağlı tutan molekülleri üretmeyerek hareket etmek için serbest hale gelmek ve sonra da doku içersinde hareket edebilmek için bağdokuyu parçalayabilecek enzimler üretebilmeleri gerekir. Bunların yanı sıra bu hücrelerin geliştirebilecekleri ve olayları hızlandırabilecek mutasyonlardan biri de hücrenin mutasyon oranını arttıracak mutasyonlardır. Bu mutasyonlar genelde hücrede DNA tamiri mekanizmasında meydana gelir ve tahmin edileceği üzere normal bir hücrede meydana gelen mutasyonların çoğu tamir edilirken, kanser oluşturacak hücrelerde artan bir hızla mutasyonlar birikir ve bir sonraki jenerasyona aktarılır (14).

Buna bağlı olarak kanser hücrelerinde sıklıkla sayı, şekil ve yapısal anormallikler gözlenir (14). Hücre bölünmesinde önemli iki zaman vardır: Siklus başlangıcı ve R-kontrol noktası. Siklus başlangıcında sıklusa devam edilip edilmeyeceğine karar veren faktörler şekil 1’de sıralanmıştır (“Git” yönündekiler devam edilmesini “Dur” yönündekiler durulmasını sağlayan sinyaller). R noktası ise bölünme sırasında herşeyin yolunda olup olmadığının kontrol edildiği noktadır ki bir sorun olması durumunda bölünme durdurulur ve sorun düzeltilirse devam edilir, kalıcı sorunlar durumunda ise apoptoz başlatılabilir (14, 19).

Bu olaylarda görevli olan genleri başlıca ikiye ayırabiliriz:

1-hücre bölünmesini arttırıcı olanlar,

2-hücre bölünmesini inhibe edenler.

Bununla bağlantılı olarak kontrolsüz hücre bölünmesi ve yayılmasına neden olacak iki genel mekanizma vardır. Birincisi hücre çoğalmasını arttıran genleri hiperaktif yapan mutasyonlardır. Bu tür mutasyonların dominant etkisi vardır. Yani bir hücredeki iki kopyadan yalnız birinin bile bu tür bir mutasyona uğraması bu etkiyi yapmak için yeterlidir. Bu şekilde aktive edilen genlere onkogen denir. Bu genlerin normal hallerine de proto-onkogen denir. İkinci mekanizma ise, hücre bölünmesini inhibe eden bir geni inaktive etmektir. Bu tür mutasyonlar genelde resesif’dirler, yani etkinin

gerçekleşebilmesi için hücrede bulunan iki kopyanın da bu tür bir mutasyona uğraması gerekir. Tek mutasyon durumunda bir tanesi inhibe etme görevini yapamasa da diğeri yapacak olduğundan ikisinin birden fonksiyonunu yitirmesi gerekir. Bu tür genlere tümör baskılayıcı genler denir. Tümör baskılayıcı genlerin bir kopyasının inhibe edici bir mutasyona uğramış halinin nesilden nesile taşınması bu genin ilgili olduğu kanser için yüksek riskin kalıtsal taşınmasına yol açar (4).

Araştırmacılar uzun yıllardır onkogenleri ve tümör baskılayıcı genleri ortaya çıkarmaya çalışmaktadırlar. Bu genlerin bazıları sadece belirli doku çeşidine özel olup yalnız bu dokularda görülen kanserlerde rol oynarlarken bazıları ise daha temel bir göreve sahip olup vücuttaki hemen her hücrede bulunurlar. Böyle durumlarda bu tür genlerin mutasyonları bir çok değişik kanserlerde sıklıkla rastlanır. p53 bu tür bir gen olup insanlarda ortaya çıkan kanserlerin %50'sinden fazlasında mutasyona uğradığı tespit edilmiştir (4, 20).

## **Onkogenler ve Kanser**

Onkogenler yani kansere neden olan genler protoonkogenlerden yani hücrelerde normal büyüme ve diferansiyasyonu sağlayan genlerden oluşur. Bu onkogen genler ilk olarak virüslerde bulunmuştur. Ancak daha sonra bunların sekansına baktıklarında bunun hemen hemen aynısını insan hücrelerindeki DNA'larda da bulmuşlardır. Bundan da o virüslerin aslında konak hücrenin DNA'larından bir parçayı rekombinasyonla değiştirip aldıkları sonucu çıkarılmıştır. İlk önce virüslerde buldukları için bu onkogenler virüslerdeki ismiyle anılır gibi. Önceleri kanserin bu virüsler tarafından bulaştırıldığı sanılmış, ancak çoğu kanserin virüslerden kaynaklanmadığı anlaşılmış daha sonra şu soru akla gelmiştir: acaba virüslerden kaynaklanmayan tümörlerde onkogenik DNA sekansları var mı? Sonraları birkaç değişik insan tümöründen

DNA izole edip bunu fare fibroblast hücrelerine transplant ettiklerinde bu hücrelerin neoplastik hücre özelliğini kazanmaya başladığını saptamışlardır. Buradan edinilen sonuca göre; spontan bir şekilde ortaya çıkan kanserlerin DNA'larının onkogene benzer ya da onkogen sekansları olduğu ortaya çıkmıştır. Bu transforme eden aminoasit dizilerin bir çoğunun ras protoonkogeninin homoloğu olduğu ortaya çıkmıştır (2, 20).

### **Onkogenlerin Protein Ürünleri**

Onkogenler, onkoprotein denilen proteinleri kodlarlar ve bu proteinler iki istisna dışında normal protoonkogen ürünlerine benzerler.

- 1- Onkoproteinlerin önemli düzenleyici elemanları yoktur.
- 2- Transforme olmuş hücrelerde onkoproteinlerin üretimi için büyüme faktörü yada diğer dış sinyallere ihtiyaç yoktur. Onlardan bağımsız olarak sürekli üretilirler.

Bu onkogenleri anlamak için normal hücre çoğalmasının sırasını incelendiğinde;

- 1- Hücre membranındaki spesifik reseptöre büyüme faktörünün bağlanması
- 2- Büyüme faktörünün reseptörünün geçici yada kısıtlı bir miktar aktivasyonu bu reseptörün de sitoplazma membranı iç kısmında bulunan sinyal iletilici proteinleri aktive etmesi
- 3- Bu sinyalin sitoplazma boyunca ikincil mesajcılar aracılığı ile iletimi
- 4- DNA'da transkripsiyonu başlatacak çekirdekdeki düzenleyici faktörlerin indüksiyonu ve aktivasyonu
- 5- Hücre siklusuna giriş ve ilerleyiş ve sonuç olarak bölünme gerçekleşir.



Bu temel bilgiye dayanarak onkogenlerin ve onkoproteinlerin normal hallerinden nasıl bu hale geldiklerini anlayıp, onların sinyal iletimi kaskadındaki rollerine dayanarak gruplanabilir (2).

**Onkogenlerin Aktivasyonu:** Protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümü şu iki geniş katagoride özetlenebilir.

1- Genin yapısında değişiklik oluşması ve bu şekilde anormal gen ürünü onkoprotein yani anormal fonksiyonu olan protein üretilmesi .

2- Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde değişiklikler olması; artırılmış yada uygunsuz miktarda yapısal olarak normal olan büyümeyi arttırıcı proteinlerin üretilmesi.

Protoonkogenlerin onkogenlere dönüşmesine neden olan yapısal ve düzenleyici faktörlerdeki değişiklikler şu şekilde özetlenebilir;

- a- Nokta mutasyonu
- b- Kromozomların yeniden yapılanması; translokasyon ve inversiyon
- c- Gen amplifikasyonu (2, 20).

**Tümör supresör genler:** Protoonkogenler hücre büyümesini destekleyici proteinler üretirken tümör supresör genler hücre çoğalmasını engelleyecek ürünler üretirler. Tümör supresör genlerin fonksiyonu büyümeyi engelleyerek hücre büyümesini düzenlemektir, tümör oluşmasını engellemek değildir. Bu genlerin kaybı bir çok insan tümöründe anahtar rolü oynadığı için tümör çalışmaları sonucunda; ilk bulduklarında bu genlere tümör supresör geni ya da antionkogen denilmiştir.

İlk çalışılan tümör supresör geni retinoblastomadır. Bu çalışmalar sonucunda retinoblastomaların %60'ı sporadik %40'ı kalıtsal olduğu ortaya çıkmıştır. Kalıtsal ve sporadik olarak iki değişik şekilde ortaya çıkışı açıklamak için iki-vuruş (two-hit) hipotezi ortaya atılmış, buna göre kalıtsal retinoblastomada; bir genetik değişiklik kalıtsal olarak anne-babadan birinden alınır ki bu ilk-vuruşdur (first-hit). İkinci mutasyon sporadik olarak

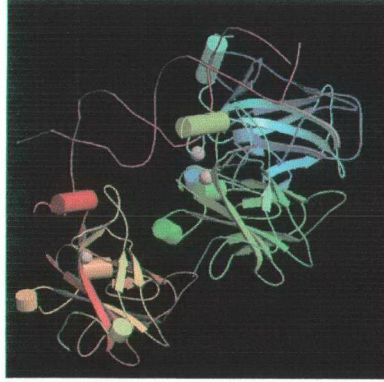
ortaya çıkar, bu da ikinci-vuruşdur (second-hit). Sporadik retinoblastomada ise iki mutasyonda aynı hücrede sporadik bir şekilde görülür, daha sonra bu hücrede tümör oluşturur (2, 19).

**Tümör supresör genlerin protein ürünleri:** Büyümeyi inhibe eden faktörlerin de aynı büyüme faktörleri gibi, bir sinyal ileti sistemleri olduğu düşünülmektedir. Mitojenik sinyallere benzer şekilde büyüme inhibe eden sinyallerin de hücre dışında başlayıp reseptörler, sinyal ileten proteinler, hücre siklusunu ve nükleer transkripsiyonu düzenleyen faktörleri kullanarak görevlerini yaptıkları düşünülmektedir.

En sonunda; bütün pozitif ve negatif sinyaller nükleusda toplanırlar ve burada bölünme ya da bölünmeme kararı verilir. Bununla bağlantılı olarak bazı tümör supresör genlerinin ürünleri nükleusda bulunurlar. Başlıca tümör supresör genler şunlardır:

- Rb geni
- p53 geni
- BRCA-1 veBRCA-2 genleri
- APC geni
- VHL geni
- NF-1 ve NF-2 geni
- PTEN geni
- WT-1 geni
- DCC geni (2)

**P53 Geni:** P53 geni ilk defa 1979 yılında Lane ve Crawford, bunların hemen arkasından da Linzer ve Levine tarafından nükleer fosfoprotein olarak tanımlanmıştır. David Lane ise immunhistokimyasal yöntemlerle insan tümörlerinde p53 genini göstermiştir (13, 14, 15, 16, 17, 18, 23, 25). P53 geni 17. kromozomun kısa kolu üzerinde 17p13-1 pozisyonunda bulunan bir tümör supressor genidir (şekil 2). 16.20 kb uzunluğunda olan bu gen 11 eksondan oluşmaktadır. 2 ve 11 eksonda bulunan DNA kısmı 8-10 kb uzunluğunda olup kodlama yapamaz. (11, 16, 17).

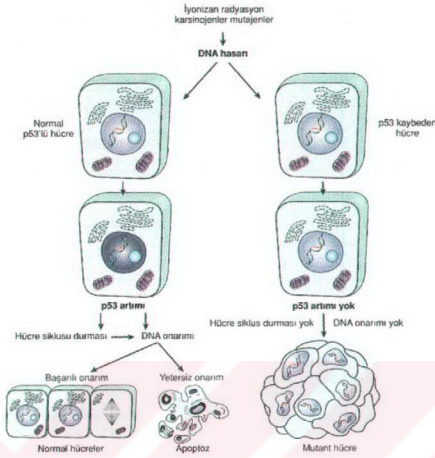


**Şekil 2.** p53 proteininin DNA ile oluşturduğu kompleksin kristalografisi ile bulunan üç boyutlu yapısı.

P53 geninin iki tipi vardır. Wild tip p53 normal fonksiyonel tiptir. Kısa ömürlü olup, 6-20 dakika kadardır (17, 21, 22). Dokularda saptanması zordur(15, 18, 24, 25). Diğer tip ise mutant tip olup ömrü 3-6 saat kadardır ve wild tipten daha uzun ömürlüdür. İmmunhistokimyasal olarak dokularda kolayca saptanır.

P53 genindeki değişiklikler insan tümörlerinde en sık rastlanan genetik değişiklikler olma özelliğini taşır (17, 20, 21, 23). İlk tanımlandığı yıllarda sadece bir onkogen olarak görev yaptığı düşünülen p53 geninin daha sonraları sadece mutant formunun anormal hücre büyümesinde rol oynadığı, normal p53 geninin ise tümör oluşumunu baskıladığı anlaşılmıştır. Kolon, meme, akciğer, mesane, endometrium gibi birçok organın epitelyal tümörleri yansıra mezenkimal, nöronal ve lenfoid kökenli çeşitli tümörlerde p53 geninin homozigot kaybı saptanmıştır (17, 18, 21, 22, 23, 24, 25).





**Şekil 3.** Genom bütünlülüğünün devamında p53 geninin rolü

İlk olarak Volgelstein, kolorektal kanserlerde 17. kromozomda p53 geninin mutasyona uğradığını göstermiştir (26, 27). Çeşitli mutasyonlar sonucu normal hücrelerde eksprese edilen p53 geninin iki allelden biri kaybolmaktadır (18, 26, 27). P53 gen kaybı nokta mutasyon, delesyon, rearranjman, insersio ile olmaktadır. P53 geninde görülen en büyük mutasyon şekli nokta mutasyondur (27). Gen mutasyonları özellikle DNA'ya spesifik bağlanma bölgeleri olan 100-300 aminoasit bölgeleri arasında gelişir (27).

P53 genini diğer tümör baskılayıcı genlerden ayıran en önemli özellik, tümör baskılayıcı fonksiyonunun kaybı için hücrede tek bir allelin inaktivasyonunun yeterli olmasıdır. Bunun nedeni bazı mutant P53 proteinlerinin hücresel heat shock protein "hsc 70" ile bağlanması, bunlara normal p53 proteininin de bağlanıp uzun yarı ömürlü fonksiyon görmeyen

kompleksler oluşturmaktadır. Bunun sonucunda mutant p53 proteinini normal p53 proteinini inaktive etmiş olur. Bir mutant ve bir normal allel taşıyan hücre hiç fonksiyonel p53 proteinini yokmuş gibi davranır. Bu tip mutasyonlara “dominant negatif”denir çünkü mutant allel dominant olarak davranır ve normal allelin fonksiyonunu engeller (15, 16, 17, 27). Nokta mutasyon sonucunda konformasyon değişikliği olan p53 proteininin yarı ömrü 3-6 saate kadar uzar ve bu nedenle normal p53’den farklı olarak immünohistokimyasal olarak saptanır (13, 15, 26, 28).

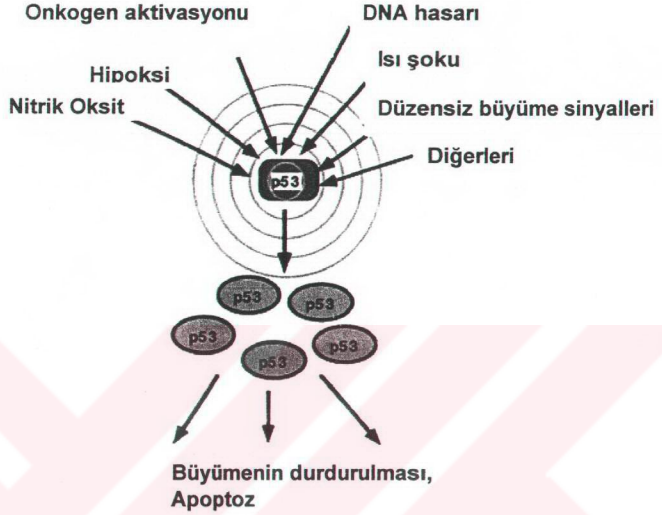
P53 hücrede normal koşullarda bazal seviyede ve inaktif halde bulunur. Fizyolojik şartlar altında yaşam süresi 20 dakika gibi oldukça kısadır ve yubikütün aracılığı ile proteolize uğrar. Hücre bölünmesine ya da hücrenin hayatını sürdürmesine müdahale etmez. Normal bölünen hücrede p53’ün bazal seviyede bulunmasının sebebi hatayı farkedebilecek kadar bazal seviyede olması yeterlidir. p53’ün seviyesinin bu şekilde düşük fakat sabit bir seviyede tutulması p53’ün MDM2 adlı proteinle olan döngü halindeki ilişkisi sayesinde sağlanır. Yani p53’ü bazal seviyede tutan MDM2 proteindir (4, 13, 17, 22, 32, 33).

Çeşitli stres koşulları p53’ün hızla aktive eder. P53’ü aktive edici sinyallere örnek olarak hipoksi, DNA hasarı, düzensiz büyüme sinyalleri, onkogenler, ısı şoku, nitrik okside maruz kalma gibi örnekler verilebilir. p53 özellikle DNA hasarına hızla tepki verip DNA’nın tamirini sağlayacak mekanizmaları aktive edebilir. P53, DNA’nın ve genel anlamda genomun içerdiği bilginin olduğu gibi korunmasını sağlaması nedeniyle “genomun gardiyanı” adını almıştır (şekil 3).

Stres koşullarında p53 miktarı hızla artar ve p53 aktif hale gelir. p53’ün miktarının artması hem yarı ömrünün arttırılması ile hem de yüksek oranda p53 mRNA’sından protein translasyonu yapılması sayesinde sağlanır.

P53’ün aktivitesinin 2 temel etkisi :

- 1-Hücre siklusunun bloke edilerek büyümenin durdurulması
- 2-Apoptozis (şekil 4) (4, 15, 18, 22).

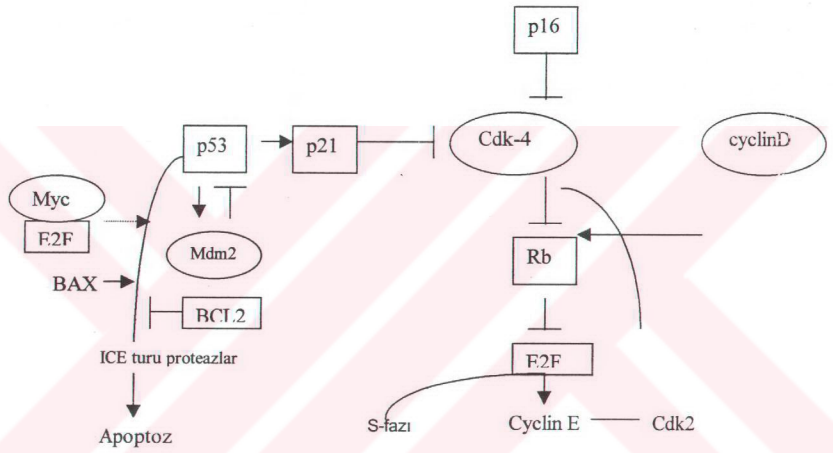


Şekil 4. P53 gen etkileşim modeli

P53 üzerine etki ettiği ana mekanizma p16, CyclinD, cdk4 ve Rb'den oluşan ve hücre bölünmesi sırasında G1'den S fazına geçişi kontrol eden mekanizmadır. Kanserlerin %25'inde bu dört proteinden birinde mutasyon görülmektedir. Rb proteini E2F proteinine bağlanarak, E2F'nin asıl görevi olan DNA'ya bağlanmasını engeller. E2F DNA'ya bağlanarak, hücre siklusunu devam ettirmek için gerekli olan cyclin ve cdk'lerin mRNA'larının üretimini sağlar (şekil 5). Dolayısıyla Rb hücre bölünmesini engelleyici bir proteindir. Cdk4'ün görevi ise Rb'yi inhibe etmektir. Cdk4, Rb'ye bağlanarak

Rb'nin E2F'ye bağlanmasını engeller böylece hücre bölünmesi için gerekli cyclin ve cdk'ler E2F'nin DNA bağlanıp bu genlerden mRNA üretilmesini sağlaması sayesinde gerçekleşir. Cdk4'e etki eden 3 değişik protein vardır : cyclinD p16, p21.

P21, p53 tarafından aktive edilmiş olup cdk4'ü inhibe eden bir proteindir. p53 stres anında p21'in üretimini artırır ve bu şekilde hücre siklusunu durdurur. Buna hücrenin G1 fazında tutuklanması denir.



**Şekil 5.** P53'ün etki mekanizması

P21 yüksek oranlarda üretildiğinde PCNA adlı proteine de bağlanmak suretiyle, PCNA'nın DNA'nın polimerizasyonundaki görevini inhibe eder. PCNA'nın başka bir görevi ise DNA'nın tamirinde aldığı roldür, fakat bu p21 tarafından inhibe edilmez.

P53'ün G2 fazında hücrenin tutuklanmasında da rol oynayabileceğine dair bir takım bilgiler mevcuttur. Hücredeki kromozomların yavru hücrelere eşit bir şekilde dağıtılmasından sorumlu mekanizmada aksaklık olması durumunda p53 aktive edilir ve hücre bölünmesi bu aşamada durdurulur. Bu da p53'e genomun gardiyanı denilmesini destekleyen başka bir korunma mekanizmasıdır: eksik ya da ekstra kromozomlu hücrelerin üretilmesi bu şekilde önlenmiş olur (2,4,15,17, 22).

Sonuçta; P53 DNA'daki hasarı bilinmeyen mekanizmalarla hisseder ve DNA'nın tamirinin hücre siklusunun G1 aşamasında bloke edilmesi ve DNA tamir genlerinin aktive ederek gerçekleştirir.Yani hücre siklusunu G1 aşamasında durdurur. DNA tamir genlerini aktive eder,böylece yaratılan zamanda meydana gelen hasarın tamirini sağlar ve siklusu kaldığı aşamadan devam ettirir. Zarar görmüş DNA'sı olan ve bunu tamir demeyen hücre P53 tarafından apoptoza gönderilir. Bu aktivitesinden dolayı P53'e "genom gardiyanı" denir (2, 15, 17, 18, 22).

P53'ün homozigotik kaybı durumunda hasar görmüş DNA tamir edilemez ve hücre içerisinde mutasyonlar sabitlenir. Sonuçta hücre malign transformasyona doğru giden tek yönlü bir yola girmiş olur.

P53'ün tümör oluşumunu engelleyici bir görevi daha yakın zamanda bulunmuştur. DNA hasarının yanı sıra, hipoksi de P53'ü aktive edebilir. Tümör angiogenezi tümör hücrelerinin büyümesi için kritik önem taşır. Hipoksiye giren tümör hücrelerinin eğer normal P53 genleri varsa apoptoza giderler. Fakat P53 genleri mutasyona uğramışsa o zaman hipoksik tümör hücreleri apoptoza dirençli hale gelir.

Somatik ve kalıtsal mutasyonların yanısıra P53 geninin fonksiyonu başka mekanizmalarla da inaktiv hale getirilir. Rb proteininde olduğu gibi, bazı DNA virüslerinin trasforme eden proteinleri, P53'e bağlanıp P53'ün parçalanmasına sebep olabilirler. Normalde P53'ün aktivitesini azaltan, P53'e bağlanan MDM2 proteini birtakım yumuşak doku sarkomalarında gen amplifikasyonu sonucu çok miktarda üretilir. MDM2, P53'ün hızla



parçalanmasını sağlayarak bir onkogen olarak davranır (2, 4, 13, 14, 15, 18, 32, 33, 53, 65).

P53'ün DNA hasarına cevap olarak apoptozisi kontrol etmesinin birtakım teorik ve pratik uygulamaları vardır. Kanser tedavisinde kullanılan radyasyon ve kemoterapi etkilerini tümör hücrelerinin DNA'sında hasar yaparak apoptozise neden olmak suretiyle gerçekleştirirler. Ancak bunun gerçekleşmesi için o hücrelerde normal P53 geninin bulunması lazımdır. Buradan da anlaşıldığı gibi, normal P53 geni taşıyan tümörler radyoterapiye mutant P53 geni taşıyan tümörlerden daha hassastır. Örneğin; testis teratokarsinomu ve çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisi normal P53 geni taşır. Oysa, akciğer ve kolon karsinomları sıklıkla P53 mutasyonu taşır, bu nedenle kemoterapi ve radyoterapiye dirençlidir (17, 34, 35, 44).

P53'ün bulunuşundan buyana 20 yıl geçmesine rağmen P53 yakın zamana kadar hem yapısal hem fonksiyonel olarak türünün tek çeşidi olarak biliniyordu. 1997'nin sonlarına doğru P53'ün kardeşi sanılan P73 geninin bulunuşuyla bu durum değişti. P73 kromozomunun 1p36'da lokalizedir ve P53'e birçok yönden benzeyen bir DNA bağlanma bölgesi vardır. P53'e benzer şekilde uygun koşullar altında hücre siklusunun durdurulması ve apoptozise neden olabilir. 1p36 lokasyonunun delesyonu; nöroblastoma, hepatoselüler, kolon, meme, renal pelvis ve üreter, over tümörlerinde bulunmuştur (2, 5, 15, 29, 30, 31, 34, 53, 54, 56, 58, 60, 62, 63, 64).

## **Apoptozis ve P53 Gen Aile Üyelerinin Apoptozisdeki Rolü**

Apoptozis hücrenin programlı ölümü, genetik bir programın hücreyi ölüme götürmesidir. Apoptozis, hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri programlı aktif RNA/Protein sentezine ve enerjiye gereksinim gösteren fizyolojik bir mekanizma olarak kabul edilir (34, 35, 36, 37).

Apoptozis, normal gelişim için esas olup bu işlemdeki bir bozukluk embriyonik ölümden, kanser gelişim riskine kadar değişen bir spektrumda sorunlara neden olur (36).

Cohen ve Duke 1984'de protein ve RNA sentezinin kimyasal inhibisyonunun apoptozisin engellediğini göstererek, apoptozisin aktif bir süreç olduğunu ispatlamışlardır. 1992'de Williams ve arkadaşları bir nematod olan *Caenorhabditis Elegans*'ta yapılan çalışmalarla apoptozun aktif ve genetik kontrol altında olduğunu kesinleştirmiş ve memeli hücrelerinde de genetik kontrolün önemini göstermişlerdir (36).

**Apoptozisin morfolojisi:** Işık mikroskobu ile geç dönem değişiklikler tanımlanabilmekte ise de en iyi elektron mikroskobu ile görüntülenir. Buna göre;

1-Yüzey organellerinin kaybı: Mikrovilluslar, bağlantı noktaları ortadan kalkar, hücrenin komşularıyla bağlantısı kesilir.

2-Hücre büzülmesi: Apoptozis sırasında hücre büzülmeye, sitoplazma yoğunlaşmaya başlar ve organeller sıkışık bir hal alır.

3-Kromatin yoğunlaşması: Apoptozis ışık mikroskobunda da seçilen en belirgin bulgusudur. Nükleus endojen endonükleazların etkisi ile membranın çevresinde yoğunlaşır,yuvarlağımsı kütleler haline gelir ve nükleus parçalanarak ayrılır.

4-Sitoplazmik vakuolizasyon ve apoptotik cisimciklerin oluşması: Hücrede membran dışına doğru vakuolizasyon olur ve takiben vakuol

hücreden ayrılırken birçoğunda nükleus organel parçaları vardır ve “apoptotik parça” denilen cisimcikler halindedir (2, 36, 37).

Apoptozisin kontrolü; hücrede çevresel, gelişimsel, yaşamsal genetik sinyaller ile olur.

**Apoptozisi uyaranlar:** Yaşamsal faktörlerin ortadan çekilmesi, potent apoptotik sinyaller oluşmasına neden olur. Çevresel apoptotik sinyallerden olan sitotoksik T lenfositleri apoptozise neden olur (36). Isı şoku, radyasyon, viral enfeksiyonlar, serbest oksijen radikalleri, sitotoksik ilaçların varlığı gibi durumlarda hücreyel büyüme kontrol bozukluğu, hücreyel hasar oluşumu, hücre-hücre veya hücre-substrat ilişkisinin bozulması halinde apoptozis organizmanın bir savunma mekanizması olarak devreye girer (2, 4, 36).

**Apoptozisin baskılayıcılar:** Koloni sitümüle edici faktörler ve interlökinler, eritropoetin apoptozisin hücre bazındaki en önemli inhibitörleridir. EBV, Herpes virüs, E179 Adenovirus özellikle Bcl-2 gen ailesi üzerinde apoptozisi engeller (36).

Apoptozis yapan genler proapoptotik genler olarak tanımlanır: Bunlar, bak, bax, bcl-xs, bad, bid, bik, bim, hrk

Apoptozisi engelleyen genler antiapoptotik genler olarak tanımlanır: Bunlar, bcl-2, bcl-xl, bcl-w, mcl-1 (34, 36, 38).

P53 gen ürünleri apoptozisin kontrolünde rol alan multipl genlerin indükleyicisi olarak bilinir (34). P53'ün apoptoza yol açabilmesi için çeşitli faktörlerin bir araya gelmesi gerekir. Örneğin DNA'nın hasar gördüğü durumlarda ve hücreye yaşaması yönünde az, hatta hiç sinyal gelmediği durumunda ya da bir onkogenin hücreyi bölünme siklusuna girmeye zorlaması durumunda, p53 aracılığı ile apoptoz başlatılabilir. P53'ün apoptoza başlatabildiği uzun süredir bilindiği halde, bunu hangi mekanizma ile yaptığı yakın zamanda bulunmuştur (34, 35, 38). P53 aktive olur, hücre siklusunu G1 fazında durdurur, DNA tamiri için gereken emirleri verir. Eğer DNA başarılı bir şekilde tamir olursa cmyc aktif hale gelir ve P53 miktarını azaltarak hücre siklusunu kaldığı yerden devamını sağlar. Ancak hücre büyümesi için ters



yönde dışarıdan sinyaller almaya devam ederse yani hücreye çelişkili sinyaller gelirse hücre apoptozisi başlatır (2). P53deki değişiklikler kanserin direk etkisi değildir. Ancak P53'e bağlı hücrelerin DNA hasarında kontrol cevabında bir defekt olduğunda bu hücreler malign transformasyon için yüksek risk oluştururlar (37).

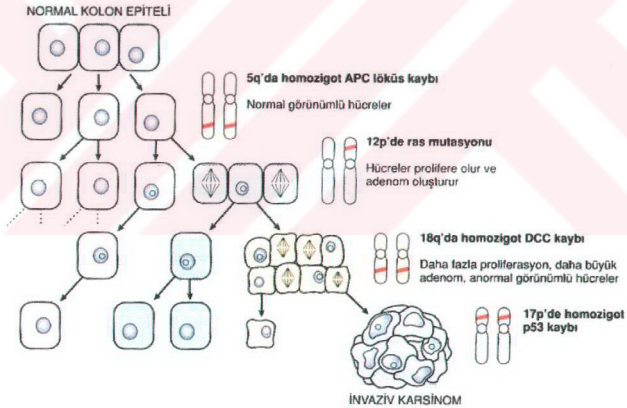
P53 geni; bir çok gen ile ilişki içinde genom bütünlüğünü kontrol eden, bu bütünlükte bir sorun olduğu zaman hücreyi mitoz girmekten alıkoyarak diğer sinyal ve genlerin yardımı ile gen onarımı veya hücre diferansiyasyonunu sağlamakta veya hücreleri apoptozise sürüklemektedir (2, 5, 34, 35). P53 gen ürünleri transkripsiyondan bağımsız olarak da apoptozisi indükleyebilmektedir (34). P53'ün transkripsiyona bağımlı ve bağımsız apoptozis fonksiyonları hücre tipine göre değişebilmektedir (34, 35). Büyümenin durması veya apoptoz etyolojisindeki faktörlerden hücre tipindeki farklılıklar, DNA hasarı sonrası apoptoz giden hücreler ve normal diploid fibroblastlar hücre siklusu durmasında önemli rol oynarlar. Bazı onkogenlerin ekspresyonu apoptoz oluşumunu büyüme durmasından daha çok etkilemektedirler (35).

## **KOLOREKTAL KARSİNOGENEZİS**

Bütün kolorektal karsinomlar genetik değişiklikler göstermektedir. Bu değişiklikler karsinogenezisin genel mekanizmasını anlamaya yönelik araştırmaların başlıca konularındandır. Birinci olarak, kolorektal tümörler, tümör supresör genlerin mutasyonel inaktivasyonu ile birleşmiş onkogenlerin mutasyonel aktivasyonlarının bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünüldü. İkincisi; 5 genden en az 4'ündeki mutasyonlar malign bir tümör oluşumu için gereklidir. Vogelstein ve arkadaşları, bir yıl sonra da Sasaki ve arkadaşları kolorektal karsinomlarda üzerinde tartışılan 4 genetik değişikliği

5q,17p,18q'nun ras gen mutasyon ve delesyonları olduğu bulunmuşlardır (39, 40). Bundan daha az değişiklikler benign tümöregenezis için yeterlidir. Üçüncüsü; genetik değişiklikler sıklıkla tercih edilen bir sekansda meydana gelse de, değişikliklerin total birikimi tümörün biyolojik niteliğinden sorumludur. Dördüncüsü; bazı tiplerde mutant tümör supresör genleri heterozigot durumundayken bile fenotipik bir etki gösterebilir. Bu da bazı tümör supresör genler hücresel düzeyde resesif olmadığını düşündürmüştür (40, 41, 42)

Kolorektal kansinonların %75'inde 17p kromozomunun büyük bir kısmının kaybı bulunmuştur (2, 4, 5, 7, 43, 50). Allel kaybının en yaygın olduğu ikinci alan 18q'dur. Bu da tüm kolorektal kansinonların %70'inde bulunmuştur.



Şekil 6. Kolorektal kansinomu gelişimi için moleküler model

## Kolorektal Karsinogenezis ile İlgili Olan Genler

### 1-P53 Geni

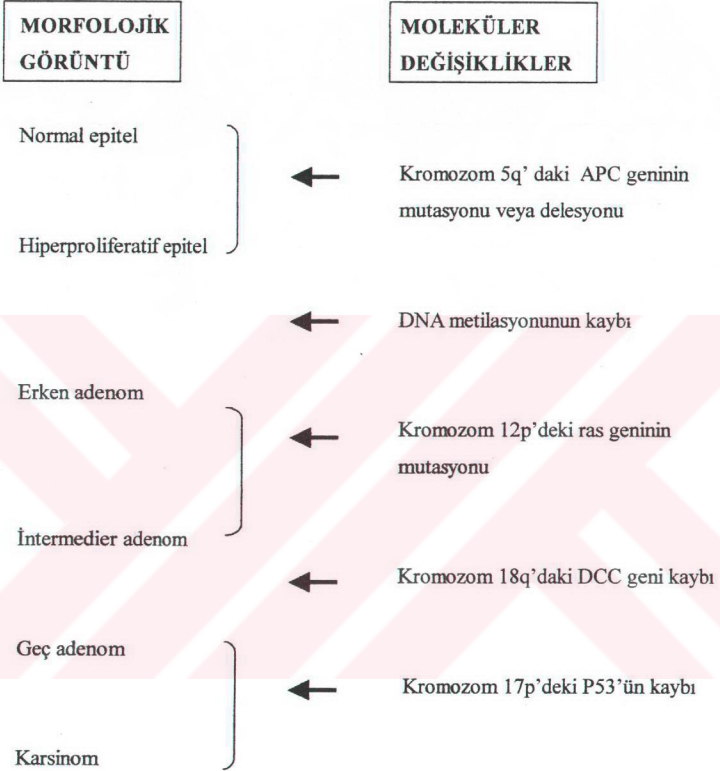
**2-Adenomatöz Polipozis Koli Geni (APC):** APC geni tümör supresör genidir. Tümör supresör genlerin görevli olabileceği başka bir potansiyel alan büyümeyi arttırıcı sinyallerin miktarında azaltma yapımının düzenlenmesidir. APC geni bu kategoridedir. APC’de gözlenen mutasyon, sporadik kolon kanserlerinin gelişiminde meydana gelen bir olaydır. APC genindeki mutasyonlar benign tümörler yani daha sonra karsinoma gelişebilen tümörlerde de görülmüştür. APC geninde bir mutant allel ile doğmuş olan bireyler yüzlerce hatta binlerce adenomatöz polipleri daha onlu –yirmili yaşlarda iken geliştirirler. Bu vakalara familial polipozis koli denir. Hemen her vakada bu poliplerden bir ya da daha fazlası malign transformasyona uğrayıp kolon karsinomuna neden olur. Diğer tümör supresör genlerde olduğu gibi tümör gelişimi için APC geninin iki kopyasının olmaması gerekir. Böylece büyümeyi arttırıcı sinyaller azaltılmamış olur, artar. APC geninin iki kopyası da kaybedilir yada bozulursa adenoma oluşur. Adenomalarda kanser oluşması için birkaç ek mutasyonunda olması gerekir. Familial polipozisin yanı sıra ailesel olmayan kolorektal karsinomların ve sporadik adenomaların % 70–80’ ninde de APC geninin homozigotik kaybı görülür. Bu durum APC’nin kaybının kolon tümörlerinin patogeneğinde etkili olduğunu güçlü bir şekilde ortaya koyar (2, 43, 45, 48, 50).

**3-Kolon Karsinomada Delesyon Geni (DCC):** Kromozomun 18q21 de lokalizedir. İnsan kolon ve rektum karsinomlarında sıklıkla delesyona uğradığı için DCC geni bir tümör süpresör gen adayı olarak kabul edilir. DCC proteinin yapısı diğer hücre-hücre, hücre-matriks arası etkileşimlerde görevli hücre yüzeyi moleküllerine benzer. DCC proteini kolon mukozasında yaygın olarak eksprese edilen hücre adezyon molekülüdür. Kolon kanserlerinin %70-75’inde ekspresyonu azalmıştır veya yoktur (46, 50).

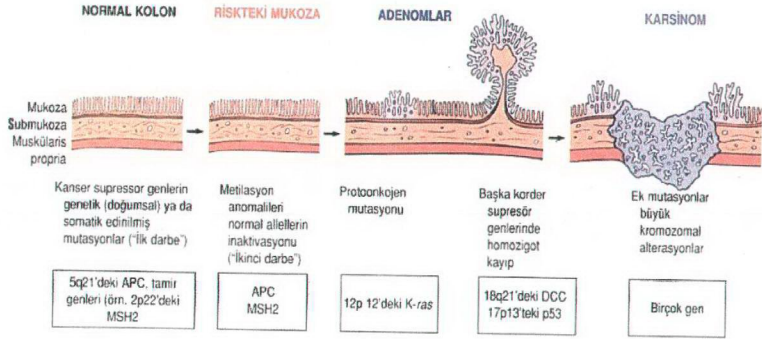
**4-Herediter Nonpolipozis Kolon Karsinomu Geni (HNPCC):** DNA tamir mekanizması ile ilişkili 4 genden herhangi birinde meydana gelen kalıtsal mutasyonlar HNPCC ailesel sendromlarından sorumludurlar (2, 48, 50, 51).

**5-Metilasyon Anomalileri:** Kolon tümörlerinde erken tanınan bir değişimde, DNA'daki metil grupların kaybıdır (2, 51).

**6-K-ras Geni:** K-ras geni adenomlarda ve kolon kanserlerinde en çok rastlanan aktive onkogendir. K-ras proteini intrasellüler sinyal transdüksiyonunda rol oynar ve 1 cm'den küçük çaplı adenomların %50'sinde mutasyona uğramıştır (2, 50). Ras gen mutasyonlarının kolorektal tümörlerin oluşumunda başlatıcı olay olduğu düşünülmüş, ras gen mutasyonlu adenomların ras gen mutasyonsuz adenomlardan daha hızlı ilerleyerek tümöre yol açtığı saptanmıştır (şekil 7, 8) (2, 5, 43, 51).



**Şekil 7.** Kolorektal kansinomların adenom-karsinom sekansı içindeki evrimini gösteren moleküler model



**Şekil 8.** Adenom-karsinom sekansında morfolojik ve moleküler değişimlerin şeması



## MATERYAL VE METOD

**Olgu Seçimi:**1998-2001 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde hemikolektomi yapılmış olan 32 kolorektal adenokarsinomlu olgu retrospektif olarak değerlendirildi.

**Rutin İncelemeler:** Her olguda tümörün büyüklüğü gözönüne alınarak her 1cm<sup>3</sup> için 1x0.5 cm boyutlarında doku örnekleri alınmıştır. Bu şekilde en küçük tümörden 3 en büyük tümörden 15 örnekleme yapılmıştır. Tüm kesitler %10'luk formolde tespit edilmiş rutin takipten sonra parafine gömülmüş ve Hemotoksilen- Eosin ile boyanmıştır. Işık mikroskobu ile değerlendirildikten ve mikroskobik subtipleri tayin edildikten sonra Asler-Coller sınıflamasına göre evrelendirmeleri yapılmıştır (12).

**İmmünohistokimya:** İmmünohistokimyasal çalışma için her olguda olguyu temsil eden 1 adet parafin blok seçilerek, bunlardan Novobon Slide Tissue Adhezive (Novocastra-UK) ile kaplanmış lamlara dört mikronluk kesitler alındı. Alınan kesitler 37 derecede bir gece etüvde bekletildi. Sonra 56 derecede 1 saat bekletildi. Deparafinizasyon sonrası p53 gen ürünlerine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar (Novocastra-UK) kullanılarak streptavidin-biotin peroksidad yöntemi ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Boyama aşağıdaki işlem basamaklarını içermektedir:

- 1-Deparafinizasyon
- 2-Dehidratasyon (20-30 dakika)
- 3-Distile sudan geçirme işlemi

4-Antijen Retrieval uygulaması için sitrat buffer solüsyonu içinde mikrodalgada iki kez 5'er dakika kaynatma

5-Oda sıcaklığında 15-20 dakika soğutma

6-PBS ile 5 dakika yıkama

7-%3'lük hidrojen peroksidaz ile 15 dakika inkubasyon

8-PBS ile 5 dakika yıkama

9-“Protein blocking solution” ile nonspesifik boyanmanın önlenmesi (30 dakika).

10-Solüsyon fazlasının silinmesi, primer antikor uygulaması. İnkubasyon (90 dakika).

11-PBS ile yıkama (5 dakika).

12-Sekonder antikor uygulaması için Biotinylated Goat Anti-Polyvalent uygulaması (20 dakika).

13-PBS ile yıkama (5 dakika).

14-Streptavidin Peroksidaz kompleksi ile inkubasyon (20 dakika).

15-PBS ile yıkama (5dakika).

16-3,3 Diaminobenzidine Tetrahydrochloride plus kit ile inkubasyon (5dakika)

17-Distile suda yıkama

18-Mayer's hematoksilen ile boyama

19-Distile suda yıkama

20-Alkolden geçirme işlemi

21-Etüvde kurutma

22-Ksilenden geçirme

23- Kapatma işlemi

P53 için nükleer granüler kahverengi kırmızı boyanma pozitif boyanma olarak kabul edildi.

Boyanma şiddeti ve boyanan hücrelerin kesitteki tüm tümör hücrelerine oranı aşağıdaki şekilde derecelendirilmiştir.



Hiç boyanmama: negatif

Tümör hücrelerinin %1-9'unda boyanma: 1 (+) boyanma

Tümör hücrelerinin %10-50'sinde boyanma: 2 (+) boyanma

Tümör hücrelerinin %51-100'ünde boyanma: 3 (+) boyanma

Boyanma yoğunluğu ve boyanma oranı çarpılarak boyanma indeksi saptanmıştır (71).

### **İstatistiksel değerlendirme**

P53 immünohistokimyasal ekspresyonunun tümörün büyüklüğü, evresi, diferansiyasyonu, lenf nodu metastazı, uzak organ metastazı arasındaki ilişki ki-kare, Fisher's exact test, Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test ve logistik regresyon modeli ile değerlendirilmiştir. P=0.05 anlamlılık düzeyi kullanılmıştır.

## BULGULAR

Olguların 20'si erkek, 12'si kadın olup erkeklerin yaş ortalaması 57.9 kadınların yaş ortalaması 56.5 idi. Erkeklerin 14'ünde (%43.7), kadınların 11'inde (%34.4) p53 pozitifliği görüldü. P53 pozitifliği ile olguların cinsiyeti ve yaş ortalamaları arasında istatistiksel korelasyon saptanamadı.

İmmünohistokimyasal yöntemle 32 kolorektal adenokarsinomlu olgunun 25'inde (%78) mutant p53 proteinini pozitif, 7'sinde (%22) mutant p53 proteini negatif olarak saptandı. p53 pozitif 25 olgunun 8'inde p53 (+), 5'inde p53 (++) , 12'sinde p53(+++) bulundu. P53 pozitif olguların yaş ortalamaları 56.2±13.3 iken p53 negatif olguların yaş ortalamaları 63.86±16.18 yıl idi. 65 yaş altında 21 olgunun (%65.6 ) 18'inde p53 pozitif, 65 yaş üzerinde 11 olgunun 7'sinde p53 pozitif izlendi.Yaş ile p53 pozitifliği arasında istatistiksel ilişki saptanamadı (tablo1,2).

**Tablo 1.** Yaş ortalaması ile p53 ekspresyonu arasındaki ilişki

p53	n	Yaş ortalaması	Standart sapma
negatif	7	63,85	16,18
Pozitif +,++,+++	25	55,60	11,87

**Tablo 2.** Cinsiyet ile p53 ekspresyonu arasındaki ilişki

p53	CİNS	
	Kadın n (%)	Erkek n (%)
Negatif	1 (%3.1)	6 (%18.8)
Pozitif(+)	5 (%15.6)	3 (%9.4)
Pozitif (++)	1 (%3.1)	4 (%12.5)
Pozitif (+++)	5 (%15.6)	7 (%21.9)
<b>Toplam</b>	<b>12 (%37.5)</b>	<b>20 (%62.5)</b>

Tümörün lokalizasyonu ile p53 pozitifliğini araştırdığımızda; 25 olguda (%78.1) tümör sol kolonda, 7 olguda (%21.9) sağ kolonda lokalize idi. Sağ kolonda lokalize 7 olgunun 2'sinde (%28.57) p53 negatif, 5'inde (%71.43) p53 pozitif immünreaktivitesi saptandı. Sol kolonda lokalize 25 tümörlü olgudan 5'inde (%20) p53 negatif, 20'sinde (%80) p53 pozitif immünreaktivitesi saptandı. P53 pozitifliği ile tümörün lokalizasyonu arasında istatistiksel ilişki saptanmadı (tablo3).

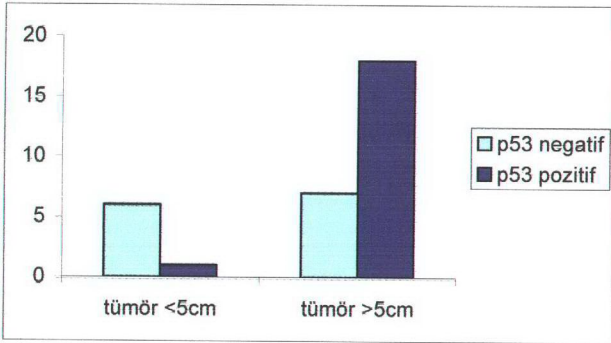
**Tablo 3.** Tümör yerleşim yeri ile p53 ekspresyonu

Tümör yerleşimi	p53		Toplam
	Negatif	Pozitif (+, ++, +++)	
Sağ kolon (proksimal)	2	5	7
Sol kolon (distal-rektum)	5	20	25

Tümörün büyük çapı 5 cm'den küçük olan 13 olgudan 6'sında (%46.15) p53 negatif, 7'sinde (%53.85) p53 pozitif immünreaktivitesi izlendi. Tümör çapı 5 cm'den büyük 19 olgudan 1'inde (%5.26) p53 negatif, 18'inde (%94.74) p53 pozitif bulundu. İstatistiksel olarak bu değerler anlamlı bulundu. Buna göre; p53 pozitif olguların çoğunun 5 cm'den büyük olduğu saptandı (tablo 4, grafik 1).

**Tablo 4.** Tümör çapı ile p53 ekspresyonu arasındaki ilişki

Tümörün büyük çapı	p53		Toplam
	Negatif	Pozitif (+, ++, +++)	
<5 cm	6 (% 46.15)	7 (% 53.85)	13 (% 40.62)
>5cm	1 (% 5.26)	18 (% 94.74)	19 (% 59.38)



**Grafik 1.** Tümör çapı ile p53 ilişkisi

Tümörün evresi ile p53 immünreaktivitesini araştırdığımızda; evre B1 4 olgunun tümünde (%100) p53 pozitifliği bulundu. Evre B2 15 olgunun 3'ünde (%20) p53 negatif, 12'sinde (%80) p53 pozitif bulundu. Evre C1 5 olgudan 3'ünde (%60) p53 negatif, 2'sinde (%40) p53 pozitif izlendi. Evre C2 8 olgudan 1'inde (%12.50) p53 negatif 7'sinde (%87.50) p53 pozitif bulundu.

İstatistiksel olarak tümörün evresi ile p53 pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı (tablo5).

**Tablo 5.** Tümörün evresi ile p53 ekspresyonu arasındaki ilişki

Tümörün Evresi	p53		Toplam
	Negatif	Pozitif (+, ++, +++)	
<b>B1</b>	0	4	4
<b>C1</b>	3	2	5
<b>B2</b>	3	12	15
<b>C2</b>	1	7	8

Tümörün diferansiyasyonu ile p53 pozitifliğini araştırdığımızda; iyi diferansiye 25 olgunun 4'ünde (%16) p53 negatif, 21'inde (%84) p53 pozitif, orta derecede diferansiye 4 olgunun 2'sinde (%50) p53 negatif, 2'sinde (%50) p53 pozitif, kötü diferansiye 3 vakanın 1'inde (%33.33) p53 negatif,

2'sinde p53 pozitif (%66.66) bulundu. Tümörün diferansiyasyonu ile ve p53 pozitifliği arasında ilişki saptanamadı (tablo 6).

**Tablo 6.** Tümörün diferansiyasyonu ile p53 ekspresyonu arasındaki ilişki

Diferansiyasyon	p53			Toplam	
	Negatif	Pozitif (+)	Pozitif (++)		
iyi	4	6	5	10	25
orta	2	2	0	0	4
kötü	1	0	0	2	3

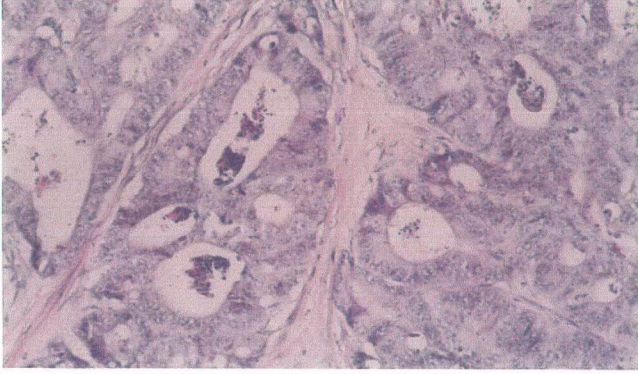
Uzak organ metastazı saptanan 7 hastadan 2'sinde p53 negatif 5'inde p53 pozitif izlendi.Uzak organ metastazı olmayan 25 hastanın 5'inde p53 negatif, 20'sinde p53 pozitif bulundu.Uzak organ metastazı ile p53 pozitifliği arasında istatistiksel bir ilişki saptanamadı.

Lenf nodu metastazı olan 13 olgunun 4'ünde p53 negatif, 9'unda p53 pozitif bulundu. Lenf nodu metastazı olmayan 19 olgunun 3'ünde p53 negatif, 16'sında p53 pozitif bulundu. Bulgular istatistiksel olarak anlamlı değildi (tablo7).

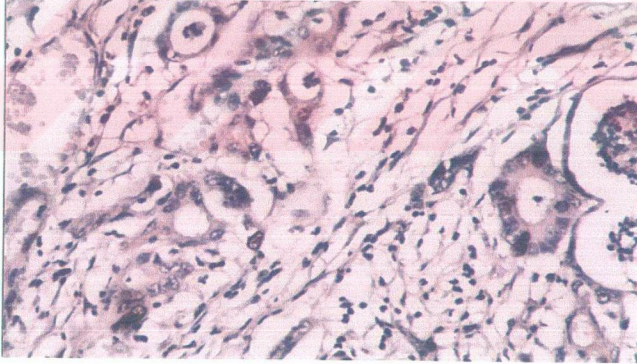


**Tablo 7.** Lenf nodu metastazı ile p53 ekspresyonu arasındaki ilişki

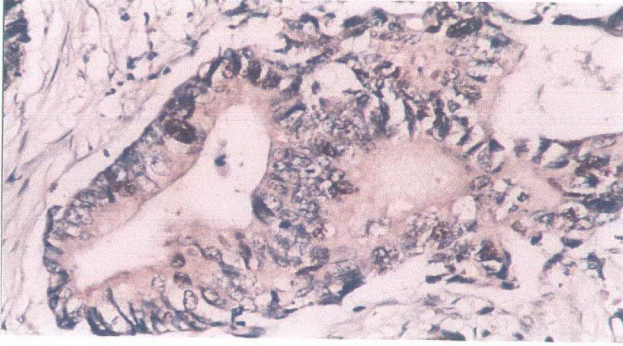
Lenf nodu metastazı	p53		Toplam
	Negatif	Pozitif (+,++,+++)	
<b>Yok</b>	3	16	19
<b>Var</b>	4	9	13



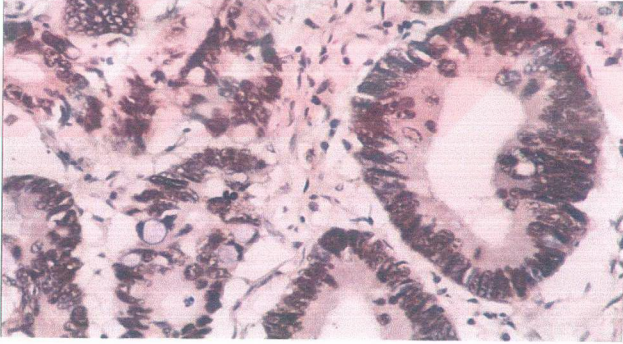
**Fotoğraf 1.** Kolon adenokarsinomu H&E (x100)



**Fotoğraf 2.** Kolon adenokarsinomunda p53 (+) nükleer ekspresyonunu gösteren tümör hücreleri (x 200)



**Fotoğraf 3.** Kolon adenokarsinomunda p53 (++) nükleer ekspresyonunu gösteren tümör hücreleri (x 200)



**Fotoğraf 4.** Kolon adenokarsinomunda p53 (+++) nükleer ekspresyonunu gösteren tümör hücreleri (x 200)

## TARTIŞMA

Kolorektal karsinomlar dünyada ilk beş sırada görülen tümörlerdir (1). 60-79 yaşları arasında pik yaparlar. %20 vakada 50 yaşından önce görülmüştür. Bununla birlikte kolitis ülseroza ,familial polipozisli hastalarda genç yaşta görülebilir (2).

P53 genindeki değişiklikler insan tümörlerinde en sık rastlanan genetik değişikliktir (2, 70). Normal fonksiyon gören p53 geni tümör oluşumunu baskılar (15,17,18). Ancak p53 geninin mutasyona uğramış, tümör baskılayıcı gen olma özelliği ortadan kalkmış olan formu anormal hücre büyümesi ve sonuçta tümöral oluşuma neden olur. Kolorektal karsinom etyopatogenezinde en önemli yeri p53 gen değişiklikleri tutmaktadır (2, 3, 29, 37, 50, 74, 75).

Literatürde çoğu çalışmada p53 gen mutasyonunun kötü prognozla ilişkili olduğunu öne süren pek çok çalışma vardır.

Kolon, akciğer, mesane, meme, karaciğer, özofagus, deri, over karsinomlarında yumuşak doku ve osteojenik sarkomlarda ayrıca lenfoma ve lösemilerde p53 gen mutasyonu sık görülmektedir (70). Yumuşak doku karsinomlarında %30, over kaynaklı tümörlerde %92, akciğer tümörlerinde %50-75, renal karsinomlarda %60, gliomlarda %57 oranında p53 pozitifliği görülmektedir. Tiroid kanseri ve T hücreli lösemilerde p53 gen değişikliği hiç görülmezken beyin ve endometrial tümörlerde p53 gen mutasyonu daha düşük seviyelerde saptanmıştır (44, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 70).

Solid tümörlerde p53 gen mutasyonu en sık kolorektal kanserlerde görülmektedir. Kolorektal karsinomlarda p53 gen mutasyonu hastalığın prognozunu yansıtmada önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir (69, 70, 72, 74, 81).

Primer hepatoselüler karsinomlarda en sık rastlanan mutasyon p53 gen mutasyonudur (54, 56, 58, 62).



Küçük hücreli akciğer karsinomlarında %70 oranında saptanırken diğer akciğer kanserlerinde daha düşük düzeydedir (66, 67).

Meme kanserlerinde p53 gen mutasyonu %23-46 oranında görülebilmektedir (18, 60, 70, 79, 80). P53 pozitifliği saptanan meme tümörlerinde ve özellikle lenf nodu metastazı olanlarda prognozun çok ağır olduğu tespit edilmiştir. P53 gen ekspresyonunun genelde kötü prognoz ve sağ kalım süresinde azalma ile birliktedir (18, 60, 70, 79, 80).

Astroitik tümörlerde yapılan p53 gen mutasyonu çalışmalarında; ileri evrede p53 gen mutasyonuna daha sık oranda saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda Erken evre tümörlerde p53 gen mutasyonunun saptanması prognozun ağır olduğunu göstermiştir (70).

Sarkomlarda p53 gen mutasyonu %30 oranında görülmektedir (65, 70).

Hematolojik malignitelerde p53 gen mutasyonu ilk olarak kronik myeloid lösemi olgularında gösterilmiştir. Hematolojik malignitelerin %11'inde p53 geninde nokta mutasyonu saptanmıştır (44, 70).

Akut myeloblastik lösemili olgularda p53 gen mutasyonu sık görülmektedir. Marshal ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada kronik myelositer lösemili olgularda p53 pozitifliğini %60 oranında bulmuşlar ve bu hastalarda p53 gen mutasyonunun varlığının prognozu etkileyen bir parametre olduğunu saptamışlardır (44).

Rodrigues P53 pozitif lenfomalı olgularda p53 negatif lenfomalı olgulara göre daha kötü bir prognoza sahip olduğunu tespit etmişlerdir (77).

Sauter ve arkadaşları dil tabanından köken alan skuamöz hücreli karsinomların %20'sinde p53 pozitifliği buldu. İlginç olarak p53 pozitif olguların artmış sağ kalım göstergesi olduğu sonucuna vardılar (57).

Prostat kanseri olgularında p53 mutasyon sıklığının %2-17 oranında bulunmuş, p53 mutasyonunun prostat kanseri gelişiminde geç olarak ortaya çıktığı kötü prognoz ve hormonal tedaviye dirençle ilişkili olduğu bildirilmektedir. Ancak p53 tümör baskılayıcı geni ile prostat kanseri arasındaki ilişkiye ait bulgular oldukça çelişkilidir (70).

Bütün bunlar kötü prognozu gösterirken Sauter ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada; p53 pozitif hastalarda sağ kalım süresinin daha uzun olduğunu saptamışlardır (57).

Literatürde gasrointestinal maligniteler içinde; özofagus kanserlerinde %10-80 oranında gastrik karsinomlarda %56.3 oranında pankreas karsinomlarında %37 oranında, hepatoselüler karsinomlarda %19-61 oranında p53 gen değişikli saptanmıştır (54, 56, 58, 70).

Kolorektal tümörlerde p53 gen mutasyonu %12.5-100 oranında saptanmıştır (69, 70, 71, 74, 75, 76, 81, 82). Bizim çalışmamızda % 78 oranında bulduk.

İmmünohistokimyasal olarak p53 proteinin ekspresyonu sıklıkla p53 mutasyonu ile koreledir. Ancak p53 geninde delesyon ile kayıp söz konusu ise, p53 proteini sentezlenemeyeceğinden immünohistokimyasal olarak p53 genindeki delesyonları saptamak mümkün değildir. P53 geninde allel kaybı ile anormal p53 proteinin dokularda immünohistokimyasal yöntemlerle saptanması aynı dönemlerde olmayabilir. Ayrıca immünohistokimyasal p53 pozitifliği gösteren olguların tamamında da gende mutasyon söz konusu değildir (18). Dokuda p53 proteininin görülmesi hücrenin kanserleşmesi için üretimin başladığını prognozun ağır olduğunu düşündürmektedir (78).

P53 ekspresyonunu pozitif kabul edilme sınırı tartışmalıdır. Yapılan çalışmaların çoğunda negatif değer hiç boyanmamadır. Bir çalışmada %10'un altı (+), %10-20 (++), %20'nin üzeri (+++) olarak değerlendirilmiştir (53). Bir başka çalışmada %0 (-), %1-9 (+), %10-50 (++), %51'nin üzeri (+++) olarak değerlendirilmiş (71) bazı çalışmalarda ise %0-5 (-), %6-25 (+), %26-50 (++), %50'nin üzeri (+++) olarak kabul edilmiştir (73). Bir grup araştırmacı ise malign hücrelerin en az %10'u ve üzerini pozitif, %10'un altını negatif olarak değerlendirmiştir (69). Bizim çalışmamızda ise p53 ekspresyonu %0 (-), %1-9 (+), %10-50 (++), %51'nin üzeri (+++) olarak değerlendirdik.

Taze dokuda frozen kesitleriyle yapılan çalışmalarda, formalin ile fikse dokulara göre daha yüksek p53 ekspresyonu oranlarına rastlanmaktadır. Aynı



olgunun hem formalinle fikse hem de frozen çalışması arasında p53 pozitifliği %16 oranında bir fark göstermektedir (47, 78).

Hamelin ve arkadaşları 85 hastayı kapsayan bir çalışmada p53 gen mutasyonunu %52 oranında saptarken, Ayhan ve arkadaşları dokularda %47 oranında mutant p53 protein varlığını tespit etmişlerdir (76, 82). Kolorektal karsinomlu olgularda p53 gen mutasyon oranını en düşük Lin ve arkadaşları saptamıştır (47, 82). Lin, kolorektal karsinomlarda p53 gen mutasyon sıklığını %14.3 oranında bulduklarını ve Çin popülasyonunda kolorektal karsinom etyopatogenezinde tümör supresor gen inaktivasyonu ve onkogen aktivasyonunun etkili faktörler olmadığını öne sürmüştür.

Literatürde p53 gen değişiklikleri ile cinsiyet ve yaş arasında ilişki oldukça sık oranda araştırılmıştır (76, 77, 81). Olgularımızda cinsiyet ile p53 pozitifliği arasında istatistiksel bir ilişki saptanmadı. Bu bulgumuz literatür ile uyum göstermekte cinsiyetin p53 gen değişikliğini etkileyen bir faktör olmadığını düşünmekteyiz.

Yaş kolorektal karsinom prognozunda etkili faktörlerden birisidir. Özellikle 60 yaş ve üzerindeki olgularda prognoz daha ağır seyretmektedir. Araştırmamızda hastaları 65 yaş üstü ve 65 yaş altı olarak iki gruba ayırdığımızda farklı oranlar saptamadık. Bu bulgumuz literatürdeki diğer araştırmalar ile uyum göstermekte ve yaş faktörünün p53 gen değişikliği üzerine etkili olmadığını ortaya koymaktadır.

Tümörün histolojik görünümü ile p53 gen mutasyonu arasındaki ilişki çoğu araştırmalarda gösterilmiştir. İyi diferansiye tümörlerde p53 gen mutasyonu kötü diferansiye tümörlere göre daha yüksek oranda saptanmaktadır (76, 77, 81). Fakat Hamelin ve Ayhan yaptıkları iki ayrı çalışmada tümör diferansiyasyonu ile p53 gen mutasyonu arasında ilişki bulamamışlardır. Biz iyi diferansiye tümörlerde p53 pozitifliğini % 84, kötü diferansiye tümörlerde % 66 oranında saptadık ve istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonuç Hamelin ve Ayhan'ın sonuçları ile uyum göstermekte ve tümörün histolojik

sınıflandırılması ile p53 gen değişikliği arasında bir ilişki olmadığını düşündürmektedir.

Tümörün büyüklüğü ile p53 pozitifliği arasındaki ilişkiyi araştırdığımızda 5cm'nin altındaki 13 tümörlü olgunun 7'sinde p53 pozitifliğini % 53.85 oranında 5cm'den büyük 19 tümörlü olgunun ise 18'inde p53 pozitifliğini % 94.74 oranında saptadık. Tümör büyüklüğü ile p53 immünreaktivitesi arasındaki istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardı ( $p>0.05$ ).

Tümörün yerleşim yeri ile p53 arasındaki ilişki bir çok araştırmada gösterilmiştir (18, 47, 69). Remvikas ve arkadaşları distal kolon adenokarsinomlarında p53 gen mutasyonunu %74.8 oranında proksimal kolon adenokarsinomlarında %42.1 oranında saptamışlardır (69, 82). Hamelin ve arkadaşları p53 gen mutasyonunun distal kolon lokalizasyonlu tümörlerde proksimal kolon lokalizasyonlu tümörlere oranla iki kat daha fazla sıklıkla saptandığı ve bu durumun kolondaki tümör lokalizasyonlarının farklı tümör oluşum mekanizmalarıyla açıklanabileceğini bildirmektedir (76).

Manuel Diez ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; 190 kolorektal karsinomlu olgunu 101'inde (%51.3) dokularda immünohistokimyasal olarak p53 pozitifliği saptamışlar, P53 pozitifliğinin distal kolon tümörlerinde (%58.5) proksimal kolon tümörlerine göre (%41.7) daha yüksek oranda bulmuşlardır (69). Distal kolon tümörlerine göre proksimal kolon tümörlerinde myc protein overekspresyonunun daha fazla gösterilmesi bu görüşü desteklemektedir (76).

Manne ve Sun immünohistokimyasal olarak p53 proteinini proksimal tümörler için ayrı distal tümörler için ayrı analizler yapmışlardır. Bulgular proksimal kolon adenokarsinomlarında p53 pozitifli olguların p53 negatiflere oranla sağ kalım süresinin daha kısa olduğunu ortaya koymuşlardır (69). Sung ise bu araştırmanın tersine p53 proteininin ekspresyonunun daha iyi hasta sağ kalımı ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (61).

Bu araştırmalarda tümörün lokalizasyonuna dayalı çarpıcı bir farklılık gözlenmiştir: distal kolondaki tümörler daha iyi hasta sağ kalımı ve p53 birikiminin varlığı arasında kuvvetli bir ilişki göstermiştir. Fakat proksimal kolon tümörlerinde bu şekilde bulunmamıştır.

Jansson ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, 75 kolorektal karsinomlu olgunun %30'unda p53 gen mutasyonu saptamış, p53 gen mutasyonunu immünhistokimyasal yöntemlerle aynı oranlarda uyumlu olduğunu izlemişlerdir (40).

Valeso ve arkadaşları araştırmalarında 88 kolorektal karsinomun %84'nde p53 immünreaktivitesi saptamışlardır (18).

Diez ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada p53 pozitif kolorektal tümörlerin en yüksek rekürrens riskine sahip olduğu, p53 negatif proksimal tümörlerde rekürrens riski en düşük, p53 negatif distal tümörler ise intermedier rekürrens riskine sahip olduğu bulundu. Bu araştırmanın sonucunda; p53 pozitifliğinin rekürrens ile ilişkili olduğu ve prognozu belirlemede önem taşıdığı anlaşılmıştır (69).

Biz olgularımızda anormal p53 proteinin %78 oranında bulduk. Çalışmamızda p53 pozitifliği, proksimal kolon tümörlerinde ( % 21.9) distal kolon tümörlerinde (% 43.8) rektum tümörlerinde (% 34.3) oranında bulundu ancak farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Literatürde bu güne kadar yapılan çalışmalarda ortak saptanan nokta; tümörün safhası ile gen değişikliği arasında pozitif ilişkidir (82). Ayhan ve arkadaşları hastaları Duke's klasifikasyonuna göre gruplandırmış, p53 gen mutasyon oranını Duke's A'da %75, Duke's B'de %79, Duke's C'de %90 oranında bulmuştur. Hamelin ise p53 gen mutasyonu ile hastanın yaşam süresi arasında pozitif ilişkiye dikkat çekmiştir. Hamelin ortalama 6.2 yıllık süreci kapsayan araştırmasında p53 gen mutasyonu olan olgularda prognozun daha ağır ve hastanın yaşam süresinin daha kısa olduğunu bildirmiştir.

Biz bu çalışmada p53 gen ekspresyonunun, kolorektal adenokarsinomlu olgularda; cinsiyet, yaş, tümörün yerleşim yeri, tümör evresi, tümörün

diferansiyasyonu, lenf nodu metastazı, uzak organ metastazı ile olan ilişkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, tümörün en büyük çapının p53 gen ekspresyonu ile olan ilişkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür(82).



## SONUÇ

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesinde 1998-2001 yılları arasında 32 kolorektal adenokarsinomlu olguda p53 gen ekspresyonu immünohistokimyasal olarak çalışıldı.

P53 gen ekspresyonunun, kolorektal adenokarsinomlu olgularda; cinsiyet, yaş, tümörün yerleşim yeri, tümör evresi, tümörün diferansiyasyonu, lenf nodu metastazı, uzak organ metastazı ile olan ilişkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, tümörün en büyük çapının p53 gen ekspresyonu ile olan ilişkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.



## ÖZET

### **Kolorektal Karsinomlarda p53 Gen Ekspresyonunun Klinik ve Histopatolojik Parametreler İle İlişkisi**

Bütün kolorektal karsinomlar genetik değişiklik gösterir. Kolorektal karsinomlar tümör supresör genlerin mutasyonal inaktivasyonu ile onkogenlerin mutasyonu sonucu ortaya çıkar.

Kolorektal karsinom etyopatogenezinde genetik değişiklikler içerisinde en önemli yeri p53 gen değişiklikleri tutmaktadır.

Çalışmamızda 32 kolorektal adenokarsinomlu olguda bir tümör supresör gen olan p53'ün mutasyonunu immünohistokimyasal yöntemle %78 oranında saptadık.

P53 gen ekspresyonunun kolorektal karsinomlarda prognostik parametreler ile olan ilişkisini araştırdık. Yaş, cinsiyet, tümörün yerleşim yeri, tümörün evresi, tümörün diferansiyasyonu, lenf nodu metastazı, uzak organ metastazı ile olan ilişkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, bununla birlikte tümörün en büyük çapının p53 gen ekspresyonu ile olan ilişkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bulduk.



## **SUMMARY**

### **The Relation of p53 Gene Expression With Clinical and Histopathological Parameters in Colorectal Carcinomas**

All of the colorectal carcinomas shows genetic alterations. Colorectal carcinomas occurs by oncogene mutations and mutational inactivations of tumor suppressor genes.

In colorectal carcinoma etiology and pathogenesis, p53 gene alteration is the most important one of all genetic alterations.

In our study, p53 gene mutations have been studied in 32 colorectal adenocarcinomas. We found p53 mutations in 78 % of them by immunohistochemistry.

We observed the relation of p53 gene expression with prognostic factors in colorectal carcinomas. Age, sex, tumor localizations, tumor stage, tumor differentiation, metastasis of lymph node, metastasis of distinct organ are not meaningful statistically. However was related to p53 gene expression statistically.

## KAYNAKLAR

1. Bekar E. Kolorektal kanserlerde prognostik faktörlerin yaşam süreleriyle ilişkisi. *Türkiye Ekopatoloji Dergisi*, 6 :5-11, 2000.
2. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6<sup>th</sup> Ed., Philadelphia, 1999.
3. Rosai J. Ackerman's Surgical Pathology. 8<sup>th</sup> Ed., New York 1996.
4. Oren M. Regulation of The p53 Tumor Suppressor Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 51: 36031-36034, 1999.
5. Kaelin WG, The Emerging p53 Gene Family. *Journal of The National Cancer Institute*, 91: 594-598, 1999.
6. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. Ankara 1995.
7. Williams L, Bannister H, Berry M, Collins P, Dyson M, Dussek J. M. Gray's Anatomy. 3<sup>th</sup> Ed., 1995.
8. Ross MH, Lynn J, Gordon R, Kaye I. Histology a Text and Atlas. 3<sup>th</sup> Ed., Williams&Wilkins, Baltimore, 464-468,1995.
9. Junquera C, Canerio J, Kelly RO. Basic Histology, Appleton&Lange, 297-300,1995.
10. Sternberg S, Histology for Patologists. 2<sup>th</sup> Ed., Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, 1997.
11. Gartner LP, Hiatt JL, Color Atlas of Histology, Williams&Wilkins, Baltimore, 226, 1990.
12. Astler VB, Collier FA, The Prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Annals of Surgery*, 13: 846-852,1954.
13. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, Molecular Biology of the cell, 3<sup>th</sup> Ed.,Garland Publishing, New york, 1255-1295, 1994.
14. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD Molecular Biology of the cell, 3<sup>th</sup> Ed.,Garland Publishing, New york, 865-901, 1994.
15. Levine JA, Momand J, Finlay CA, The p53 Suppressor gene. *Nature*, 351: 435-455,1991.
16. Nigro MJ, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, ClearyK, Bigner SH, Davidson N, Baylin. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, 340: 705-707,1989.
17. Levine JA. P53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*, 88:323-331,1997.
18. Dowel PS, Hall AP, The p53 tumour suppressor gene and tumour Prognosis: is there a relationship? *Journal of Pathology*, 177:221-224,1995.
19. Tsakonas A, Matthiew D, Notch signaling: cell fate control and signal development, *Science*, 284:770-777, 1999.
20. Finch CE, Tanzi RE, Genetics of aging, *Science*, 278: 407-412,1997.

21. Harris CC, Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies, *Journal of The National Cancer Institute*, 88: 1442-1546,1996.
22. Prives C, Hall PA, An overview of p53 structure and function, *Journal of pathology*, 187:112-126, 1999.
23. Greenbatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC, Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 54: 4855-4877,1994.
24. Lane DP. P53, A dieth in the life of p53. *Nature*, 358: 15-16,1993.
25. Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Whal GM. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell*,70: 923-935,1992.
26. Va Den Berg M, Tiggies AE, Schipper ME, Hartog-jager ECA, Kroes WGM, Walboomers JMM. Expression of the nuclear oncogene p53 in colon tumours. *Journal of Pathology*, 157:1 93-199,1989.
27. Baker S, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger C, Jessup JM, Van Tunen P, Ledbetter DH, Barker D, Nakamura Y, Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas, *Science*, 244:217-220,1989.
28. Hall PA, Lane DP, P53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? *Journal of Pathology*, 172:1-4, 1994.
29. Levrero m, Laurenzi VD, Costanzo A, Sabatini S, Gong J, Wang JYJ, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions, *Journal of Cell Science*,113:1661-1670,2000.
30. Marin MC, Kaelin WG, p63 and p73: old members of a new family, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1470:93-100, 2000.
31. Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I, Ikawa Y, Nimura y, Nakagawara A, Obinata M, Ikawa S. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53, *Ature Medicine*, 4: 839-843, 1998.
32. Haupt Y, Maya R, Kazas A, Oren. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53, *Letters to Nature*,387:295-298,1997
33. Michael H.G, Kubbutat G, Jones S, Karen H. Regulation of p53 stability by Mdm2, *Letters to nature*,387:299-303,1997
34. Saeed M, J Albert, Jr Fornace. Role of p53 family members in apoptosis. *Journal of cellular physiology* 182:171-181 2000
35. Timothy F, Burns S, Wafik S. The p53 pathway and apoptosis. *Journal of cellular physiology*181:231-239 1999.
36. Ovalı E, Apoptozis. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş ktb, Ankara 1998.
37. Augustu L, Dennis A, Cancer progression and p53, 346;1009-112,1995.
38. Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G, Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*, 16:2265-2282, 1998.
39. Sasaki M, Okamoto M, Sato C, Sugio K, Soejima J, Iwama T, Ikeuchi T, Tanomura A, Miyaki M, Sasazuki T, Loss of constitutional heterozygosity in colorectal tumors from patients with familial polyposis coli and those with non-polyposis colorectal carcinoma. *Cancer*,49: 4402-4406,1989.

40. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Eng. J. Med.*, 319: 525-532, 1988.
41. Baker SJ, Fearo ER, Nigro JM, Hamilton S, Barker R, Volgelstein DF. Chromosome 17 deletions and p53 gen mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217-221, 1989.
42. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Boom JH, Volgelstein B. Prevalance of ras gens mutations in human colorectal cancer. *Nature* 327: 293-297, 1987.
43. Scott E, Eric R, Fearon BA, Kasper WF, Tersmette F, Leppert M, Nakamura Y, Stanley R. Allelic loss in colorectal carcinoma. *Jama*, 261:3099-3103, 1989
44. Mori N, Wada M, Yokota J, Terede M, Okada M, Teramura M, Masuda M, Motoji T. Mutations of the p53 tumorsuppressor gene in hematologic neoplasms. *Britis Journal Haematology*, 81: 235-240, 1992.
45. Shibata H, Toyoma K, Shioya H, Takano H, Matsumoto H, Kanamaru R, Noda T, Hirota M, Akiyama T. Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of Apc gene. *Science*, 278: 120-123, 1997.
46. Fazeli A, Stephanie L, Hermiston L, Tighe V, Stoeckli T, Masu K, Gordon IJ, Bronson T. Phenotyp of mice lacking functional deleted in colorectal cancer (DCC) gene. *Nature*, 386:796-804, 1997.
47. Jansson A., Gentile M., Feng-Sung X. P53 mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 acculumation. *Cancer* 92:338-341, 2001
48. Karina A, Wilgenbus P, Semb H, Christofori G. Acausal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, 392:190-193, 1998.
49. Li H, Salovaara R, Aaltonen A, Shibata D. Telomerase activity is commonly detected in hereditary nonpoliposis colorectal cancer. *American Journal of the pathology*. 148: 1075-1079, 1996.
50. Fearon R, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorogenesis. *Cell*. 61:759-767, 1990.
51. Farr CJ, Easty DJ, Powell SC, Paraskeva CA. Study of ras gene mutations in colonic adenomas from familial poliposis coli patients. *Oncogene*, 3 :673-678, 1988.
52. Capaulade C, Luis M, Carlier K, Lecluse Y, Tetaud C, Mishal Z, Wiels J. Apoptosis of tumoral and lymphoid cells is induced by both mdm2 and p53 antisense oligodeoxynucleotides. *Neoplasia*, 97:1043-1049, 2001.
53. Hashimoto H., Sue Y, Saga Y, Tokumitsu M, Yachiku S. Roles of p53 and mdm2 in tumor proliferation determination of the prognosis of transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Journal of urology*, 7: 457-463, 2000
54. Tannapfel A, Wasner M, Krause K, Geissler F, Katalinic A, Hauss J, Mössner J, Engeland K, Wittekind C. Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 91:1154-1158, 1999.
55. Zwahlen D, Mario P, Tobias J, Grob J, Cajot F, Martin F, Fmk D, Tobler Aebi S. Differetial expression of p73 slice variants protein in benign malign ovarian tumours. *Cancer*. 88: 66-70, 2000.
56. Tannapfel A, Engeland K, Weinans L, Katalinic A, Hauss J, Mösner J, Wittekind Ch. Expression of p73, a novel protein related to the p53 tuour

- suppressor p53, and apoptosis in cholangiocellular carcinoma of liver. *British Journal of Cancer*. 80:1069-1074, 1999.
57. Nylander K, Cotaes JP, Hall A. Characterization of the expression pattern P63 and p53 in benign and malignant oral epithelial lesions. *Cancer*, 87:368-372, 2000.
  58. Hamada K, Koyama T, Shimizu K, Ikawa S, Kawate S, Yokota J, Ohwada S, Morishita Y. Absence of p51 mutation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 148: 161-164, 2000.
  59. Park JB, Lee JS, Kim J, Lee HC, Park JH. Frequent alteration p63 expression in human primary bladder carcinomas. *Cancer*, 60:3370-3374, 2000.
  60. Ioachim E, Malamou V, Sebesti A, Kamina A, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of bcl-2 protein in breast lesions: correlation with bax, p53, Rb, c-erb-b2, egfr and proliferation. *Anticancer Research*, 20:4221-4226, 2000
  61. Sung JC, Zheng Y, Quddus RM, Kang X., Zhangs ZF, Lauchan SC. P53 as significant prognostic marker in endometrial carcinoma. *Gynecol Cancer* 10: 119-127, 2000
  62. Herath I., Kew CM., Whitehall J, Wals DM., Jas R., Khanna K, Young J, Graeme A, Leggett A, P73 is up regulated in a subset of hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 31: 601-605, 2000.
  63. Heerlein M, Ninci E, Ikenberg H, Brandstetter T, Ihling C, Schwenk I, Iggo R, Bauknecht T, Straub A. Evaluation of methods to detect p53 mutations ovarian cancer. *Oncology*, 60: 176-188 2001.
  64. Sengupta PS, McGown AT, Bajaj V, Slade RJ, Jayson GC, Bromley M, Ward T. P53 and related proteins in epithelial ovarian cancer. *European Journal of Cancer*. 36: 2317-2328, 2000.
  65. Myajima K, Tamiya S, Masuda K, Adachi T, Toyoshiba H., Konomoto T. Relative quantitation of p53 and mdm2 gene expression in leiomyosarcoma ; real time semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Cancer*, 164: 177-188, 2001.
  66. Peifer M. Enhanced:  $\beta$  catenin as oncogene The smoking Gun. *Science*, 275:1752-1758, 1997.
  67. Hensel H, Hau X, Alan Ysakaguchi Y, Naylor LS. Use of the single strand conformation polymorphism technique and PCR to detect p53 gene mutations in smallcell lung cancer. *Science*, 249:912-915, 1990.
  68. Oren M. Lonely no more p53 finds its skin a tumour suppressor haven. *Cell*, 90:829-832, 1997.
  69. Diez M, Medrano M, Mugüerza MJ, Ramos P, Hernandez P, Villeta R, Martin A, Noguerales F, Ruiz A, Granell J. Influence of tumor localization on prognostic value of p53 protein in colorectal adenocarcinomas, *Anticancer*, 20:3907-3912, 2000.
  70. Porter PL, Gown AM, Kramp SG, Coltrera MD. Widespread p53 overexpression in human malignant tumors, *American Journal of Pathology*, 140:145-153, 1992.
  71. Veloso M, Wrba F, Kaseser K, Heinze G, Magalhaes A, Herbst BT. P53 gene status and expression of p53, mdm2, and p21Waf1/Cip1 proteins in colorectal cancer. *Virchows Arch*, 437:241-247, 2000.



72. Giatromanolaki A, Sivridis E, Stathopolous GP, Fountzilias G, Kalafonos HP, Tsamandas A, Vrettou E, Scopa C, Polychronidis A, Simopoulos K, Koukourakis M. Bax protein expression in colorectal cancer: association with p53, bcl-2 and patterns of relaps. *Anticancer*, 21:253-260,2001.
73. Makino M, Yamane N, Taniguchi T, Honboh T, Kurayoshi K, Kaibara N. P53 as an indicator of lymph node metastases in invasive early colorectal cancer. *Anticancer*, 20:2055-2060, 2000.
74. Kyriakos M. The president's cancer, the dukes classification, and confusion. *Arch Pathol Lab Med*,109:1063-1066, 1985.
75. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JKV, Hamilton S, Vogelstein B. P53 gene mutation occur combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer*, 50:7717-7722, 1990.
76. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jego N, Asselian B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 106:42-48,1994.
77. Rodrigezc MA, Ford RJ, Goodarce A, Selvanayagam P, Cabanillas F, Deisseroth AB. Chromosome 17p and p53 changes in lymphoma. *British Journal Hematology*, 79: 575-582, 1991.
78. Chang K, Ding I, Kern FG, Willingham MC. Immunohistochemical analysis of p53 and HER-2/neu Proteins in human tumors. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 39: 1281-1287, 1991.
79. Bertheau P, Steinberg SM, Merino MJ. C-erbB-2, p53, and nm23 gene product expression in breast cancer in young women. *Human Pathology*, 29:323-329, 1998.
80. Barbareschi M, Leonardi E, Mauri FA, Serio G, Palma pd. P53 and c-erbB-2 protein expression in breast carcinomas. *Anatomic Pathology*, 98.408-418, 1992.
81. Campo E, Calle-Martin O, Miquel R, Palacin A, Romero M, Fabregat V, Vives J, Cardeza A, Yague J. Loss of heterozygosity of p53 gene and p53 protein expression in human colorectal carcinomas. *Cancer*,51:4436-4442, 1991.
82. Ayhan A, Yasui W, Yokozaki H, Hisaoito and Ehcitahara. Fanatic abnormalites and expression of p53 in human colon carcinomas. *International Journal of Oncology*, 1:431-437,1992.