

157646

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ELAZIĞ VE YÖRESİNDE GÖRÜLEN KOLOREKTAL KANSERLERDEKİ
KROMOZOMAL DEĞİŞİKLİKLERİN SAPTANMASI

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. HÜSEYİN YÜCE

ŞÜKRİYE DERYA DEVECİ

ELAZIĞ-2004

ONAY SAYFASI


Prof. Dr. Necip ILHAN
Müdür

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Halit ELYAS
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı



Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin YÜCE



Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

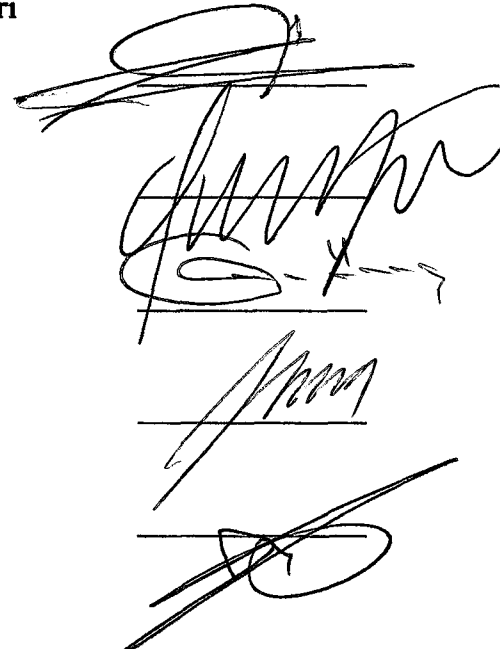
Prof. Dr. Halit ELYAS

Prof. Dr. Osman DOĞRU

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin YÜCE

Yrd. Doç. Dr. Haluk AKIN

Yrd. Doç. Dr. Aziz KARAOĞLU



TEŞEKKÜR

‘Elazığ İli ve yöresinde görülen kolorektal kanserlerdeki kromozomal değişikliklerin saptanması’ isimli yüksek lisans tez çalışmam sırasında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen başta danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Yüce olmak üzere, saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Halit Elyas, Doç.Dr. Halit Canatan ve Yrd. Doç. Dr. Haluk Akın’a ve istatistik bilgilerinden faydalandığım Prof.Dr. Metin Bayraktar’a, vakaların sağlanmasında yardımcı olan Prof. Dr. Osman Doğru ve genel cerrahi asistan ve personeline, çalışma arkadaşım Arş. Görv. Ebru Etem’e, AnaBilim Dalı araştırma görevlilerine ve personeline, tezimi düzenlemede yardımcı olan Dr. Muhterem Aydın’a, maddi ve manevi olarak desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme yürekten teşekkür eder, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamda, FÜBAP-756 numaralı proje kapsamında maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Şükriye Derya DEVECİ

İÇİNDEKİLER

1.ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3.GİRİŞ.....	3
3.1. Kanser.....	3
3.1.1.Onkogenler.....	4
3.1.2.Tümör Baskılayıcı Genler.....	4
3.1.3 DNA TamirGenleri.....	5
3.2. İnce ve Kalın Bağırsak Neoplazmları.....	5
3.2.1. Kolorektal Polipler.....	9
3.2.1.1. Adenomatöz Polipler.....	10
3.2.1.2. Hamartomatoz Polipler.....	10
3.2.1.3 HiperplastikPolipler.....	12
3.2.1.4. Kolorektal Karsinomlar.....	12
3.3. Kolon Kanserlerinde Etkili Olan Tümör Baskılayıcı Genlerin Biyokimyasal Fonksiyonları.....	13
3.4. Kolon Kanserlerinde WNT Yolağında Gerçekleşen Moleküler Değişiklikler	14
3.5. E-Kaderinin β Katenin İle Etkileşimi.....	16
3.6. Kolorektal Kanserlerde Değişime Uğrayan Genlerin Sentezlenmesi.....	17
3.7. Genomik Bütünlüğün Sağlanmasında p53'ün Rolü.....	21
3.8. Tümörlerdeki Karyotipik Değişiklikler.....	21
3.9. Çalışmanın Amacı.....	23
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
4.1. GEREÇ.....	24
4.1.1. Kullanılan Materyallerin Elde Edilmesi.....	24
4.1.2. İnterfaz FISH Preperatların Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonlar.....	26

4.1.3 Dokudan İnterfaz FISH Preperatının Hazırlanması.....	26
4.1.4. Periferik Kandan İnterfaz FISH Preperatının Hazırlanması.....	27
4.1.5. İnterfaz FISH Tekniğinde Kullanılan Solüsyonlar	27
4.1.6. İnterfaz FISH Tekniğinde Kullanılan Gereçler.....	28
4.1.7 Problar.....	28
4.1.8. Klasik Sitogenetik Çalışmasında Kullanılan Solüsyonlar.....	29
4.1.9 Klasik Sitogenetik Çalışmasında Kullanılan Araç ve Gereçler.....	29
4.1.10. Klasik Sitogenetik Çalışmasında Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması.....	30
4.1.11. Periferik Kan Kültür Ortamının Hazırlanması	31
4.2. YÖNTEM.....	31
4.2.1. FISH(Fluoresans <i>in situ</i> Hibridizasyon) Tekniği Uygulaması	31
4.2.1.1. İnterfaz FISH Tekniği İçin Preperatların Ön Hazırlığı	31
4.2.1.2. Prob Hazırlanması.....	31
4.2.1.3. Denatürasyon ve Hibridizasyon.....	31
4.2.1.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkama ve Görüntüleme.....	32
4.2.1.5. FISH Metodu Kullanılarak Delesyon ve Kazanç Tespitinde Kullanılan Kriterler...	33
4.2.2. Sitogenetik Yöntem.....	34
4.2.2.1. Periferik Kandan Hazırlanan Klasik Sitogenetik Metod.....	34
4.2.2.2. GTG Bantlama Yöntemi.....	35
4.3. İstatistik Analizler.....	36
5. BULGULAR.....	37
5.1. Anomalilerin Ortaya Konması İçin FISH Kriterleri.....	37
5.2. Kolorektal Kansere Dokularında İnterfaz FISH İle Periferik Kan Sitogenetik Sonuçların Değerlendirilmesi.....	40
5.3. İstatistik.....	47
6. TARTIŞMA.....	48

6.1. Öneriler.....	54
7. KAYNAKLAR.....	56
8. ÖZGEÇMİŞ.....	62



TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Hastaların kanser tipi, patolojik tanı, tümör lokalizasyonu (TL), tümör-nod-metastaz (TNM), evreleri, yaş, cinsiyetleri ve elde edilebilen materyalleri.

Tablo 2: Kolorektal kanser dokularında p53 geni aberasyonu çalışılan her bir hasta için 500 interfaz hücresinden FISH ile alınan sinyal sayıları.

Tablo 3: Kolorektal Kanser dokularında p53 gen bölgesi için hücrelerin çoğunda interfaz-FISH ile alınan sinyal sayısı ve periferik kan kültürü ile elde edilen hasta karyotipleri

Tablo 4: Periferik Kanları Elde Edilen Vakaların Klasik Sitogenetik Çalışma Sonuçları

Tablo 5: P53 Ve Yaş Arasındaki İlişki



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Adenokarsinomun Patogenezinin Basit Şeması

Şekil 2: Vaka 14’de kolorektal kanser dokusunda interfaz-FISH ile p53 geni için elde edilen hibridizasyon sinyalleri (X 100)

Şekil 3: Vaka 4’de kolorektal kanser dokusunda interfaz-FISH ile p53 geni için elde edilen monozomik sinyal (X 100) .

Şekil 4:Vaka 6’da kolorektal kanser dokusunda interfaz-FISH ile p53 geni için elde edilen dizomik sinyal (X 100)

Şekil 5: Vaka 11’de. kolorektal kanser dokusunda interfaz-FISH ile p53 geni için elde edilen trizomik ve tetrazomik sinyal (X 100)



KISALTMALAR LİSTESİ

AKT: Protein Kinase B/PKB

ACF: Aberrant crypt foci

APC: Adenomatose Polyposis Coli

Cadherin: Kaderin

CAM'S : Cell Adhesion moleculler

CDK: Cycline Dependent Kinase

DCC: Deleted Colon Carcinoma

Dsh: Dishevelled Protein

ENC1: Ectodermal Neural Cortex1

FAP: Familial Adenomatose Polyposis

FISH: Fluorescence *in situ* Hybridization

GIS: Gastro Intestinal System

GSTP1-1: Glutathione S-transferaz pi-1-1

HNPCC: Hereditarian Nonpolyposis Coli

Ki-Ras: Kirsten-ras

LCMDCs: Large cell minimally differentiated carcinomas

LOX : Lysyl Oxiase

MMR: Miss Match Repaire

PAK: p21 activated protein kinase

PK: Periferik Kan

Wnt : Wingless-type frizzled protein receptor signaling

Tcf/ LEF-1: T-cell factor/ enhancer factor-1

TD: Tümoral Doku

ÖZET

Kolorektal kanserler (KRK) dünyada en sık görülen kanserler arasında yer almaktadır. Ortaya çıkmasında ve patogeneğinde görev alan genetik instabilite, genetik değişimlerin birikiminde önemli bir rol oynamaktadır. KRK'da genetik instabilitenin, mikrosatellit instabilitesi ve kromozomal instabilite olmak üzere 2 büyük nedeni vardır. KRK'nın %87'sinde görülen kromozomal instabilite genetik materyalin kaybı ya da kazancıyla ortaya çıkmaktadır. P53 gen delesyonları kolon kanserlerinde yapılan farklı çalışmalarda oldukça düşük düzeylerde bulunmuştur. Bu oran %5-10 arasında değişmektedir. Bu çalışmada kolon ve rektum kanserlerindeki kromozomal değişikliklerin ve Floresans *in-situ* Hibridizasyon (FISH) metodu kullanılarak p53 gen kaybının ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışılan vakaların, 22'si kolon, 6'sı rektum kanseri olmak üzere, toplam 28 vakada, dokuları elde edilebilen 14 hastanın, touching metodu kullanılarak interfaz-FISH preparatları hazırlandı. Periferik kanı elde edilebilen 14 hastada, konvansiyonel sitogenetik çalışması yapıldı. Dokularından interfaz-FISH preparatı hazırlanan vakalarda, p53 lokus spesifik DNA probu kullanılarak interfaz-FISH çalışması yapıldı ve her hasta için 500 hücre incelendi. Hastaların toplam %64'ünde P53 geninin değişmediği, %7'sinde p53'ün kazancı ve %29'unda kaybı gözlemlendi. Hastanın yaşı ve P53 gen değişimi arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p<0.05$). Kanserin evresi ile P53 gen değişimi arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p<0.05$). İnterfaz FISH metodu kanserlerde gen delesyon ve kazancını tespit etmede güçlü bir metottur. P53 gen değişimleri ve KRK arasındaki ilişki hala aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, bu konu ile ilgili immunohistokimyasal ve daha ileri genetik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler:KRK, P53 geni, interfaz FISH, p53 lokus spesifik DNA probu, genetik instabilite, mikrosatellit instabilite.

2. ABSTRACT

Colorectal cancer is one of the most common malignancies worldwide. Genetic instability may play an important role in the accumulation of the large amount of genetic alterations during the pathogenesis of cancer. There are two major forms of genetic instability in colorectal cancers that are chromosomal instability and microsatellite instability. Chromosomal instability are appeared in 87% of colorectal cancers result in gains and losses of genetic materials. P53 gene deletions have been found in low levels in different studies made in colorectal cancers. This ratio changes among 5-10%. We proposed to define P53 gene deletion in colorectal cancers by Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH). We analyzed a total of 28 cases, including 22 colon cancers, and 6 rectum cancers. Slides were performed using touch preparation protocol from 14 tumoral tissue samples. Interphase FISH study is performed using P53 locus specific DNA probe and examined 500 cells for each patient. No change of P53 gene is observed 64% in patients. 7% of cases were obtained the gain of p53 gene and 29% of cases were obtained the allelic loss of p53 gene. We found statistically significant correlation between p53 gene change and cancer phases and between patient ages and p53 gene change. Interphase FISH is a powerful method which could establish gene deletions and gains in cancers. The relation between P53 gene deletion and colorectal cancer is not yet explained. For this reason, further examinations are needed to use of molecular genetic techniques and immunohistochemistry in this subject.

Key Words: CRC, P53 gene, interphase FISH, P53 locus specific DNA probe, genetic instability, microsatellite instability

3. GİRİŞ

3.1. Kanser

Kanser terimi tek bir hastalık adı olmayıp temel nedeni, kontrolsüz büyüme olan habis (malign) tümörlerin tümüne verilen bir addır ve hücre çoğalması sonucu bir kitle (neoplazma) haline gelmektedir. Kanserde temel sorun, hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybolmasıdır ve çoğalma ya da büyüme, genlerin kontrolü altında olduğuna göre genetik faktörler tüm kanser türlerinde etkilidir. Bazı kanser türlerinde primer faktör olarak anormal bir gen sorumlu tutulurken, diğer bazı kanserlerde çevresel faktörler sorumlu tutulmaktadır. Kansere hangi faktör neden olursa olsun tüm kanser türlerinin somatik hücrelerdeki mutasyon ya da mutasyonlar sonucu oluştuğu ve mutasyonların bir seri genin ekspresyonunu etkilediği bilinen bir gerçektir (7).

Bütün neoplasmlar kötü huylu seyir takip etmeyip, erken dönemde fark edilirse başarıyla tedavi edilebilmektedirler. Bu tip tümörler iyi huylu (benign) olarak adlandırılmaktadır. İyi huylu tümörler, genel olarak kaynaklandığı hücre tipi isminin sonuna "oma" son eki eklenerek adlandırılmaktadır (örn; fibroma, adenoma...), kötü huylu tümörlerin isimlendirilmesi de benzer şekilde belirli son ekler kullanılarak yapılmaktadır (örn; sarkom, fibrom, sarkom, karsinom) (48).

Her tümör, hücresel DNA molekülündeki bir yada daha fazla mutasyon sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu şekildeki mutasyonları içeren hücreler 2 yolla malign bir tümör oluşturabilirler. İlk olarak, mutasyon normal olarak hiç veya çok az replike olan bir hücrenin, anormal proliferasyonuna neden olmaktadır. Böylece mutant hücrelerin bir klonu oluşmaktadır. İkinci olarak, mutasyon tüm organizmanın yapısını etkileyecek şekilde de erken embriyogenez aşamalarında oluşmaktadır. Son çalışmalar kanserin ortaya çıkmasında genlerin 3 grubunun rol oynadığını ortaya koymuştur (53).

3.1.1. Onkogenler

Hücre proliferasyonu üzerinde pozitif etkiye sahip olan genlerdir. Normal, yani mutasyona uğramamış formları proto-onkogen olarak adlandırılmaktadır. Pek çok onkogen hücre proliferasyonunu kontrol eden yollarda görev alan proteinleri kodlamaktadır. Bu proteinlerin 4 tipi hücre proliferasyonunu kontrol etmektedir. Bunlar büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, hücre içi iletiler ve nükleer transkripsiyon faktörleridir. Çeşitli nedenlerle aktive olan bir onkogenin aşırı ekspresyonu veya uygun olmayan fonksiyonları gerçekleştirmesi sonucu kanseri oluşturabilecek olan transforme hücreler meydana gelmektedir. Bir tek mutant allel hücrenin fenotipinde etkili olabilir (16).

3.1.2. Tümör Süpressör (Baskılayıcı) Genler

Tümörögenesis sadece onkogenlerin aktivasyonu ile gerçekleşmez. Aynı zamanda diğer genlerinde fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlardan da kaynaklanmaktadır. Tümör baskılayıcı genler olarak bilinen bu genler hücre siklusunun negatif düzenleyicileridir. Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybına neden olan çeşitli mekanizmalar vardır. Bunlar arasında mitotik non-disjunctionla bir kromozomun kaybı, promotör metilasyonu, mutasyonlar ve vahşi tip allelin delesyonu sayılabilir. Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybına neden olan en önemli mekanizmalarından biri heterozigositenin kaybı (loss of heterozygosity; LOH)'dır. Bu tümör baskılayıcı geni taşıyan kromozomun tamamen kaybı veya kromozomun tümör baskılayıcı geni taşıyan kısmının kaybı şeklinde gerçekleşmektedir. Tümör dokusunda heterozigositenin kaybı homozigot veya heterozigot olabilir. Ancak tümör dokularında homozigot kayıplar daha yaygındır (53). Süpressör gendeki ilk mutasyon ya zigotta meydana gelmektedir (mutasyon etkilenmiş ebeveynden veya yeni bir mutasyon taşıyan germ hücresinden yeni nesillere aktarılabilir) ya da ilgili dokudaki tek bir hücrede oluşabilmektedir (somatik mutasyon) (16). İnsanda tümör baskılayıcı fonksiyona sahip pek çok gen vardır.

3.1.3. DNA Tamir Genleri

Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar DNA'nın onarımının gerçekleşmemesine veya yetersiz replikasyonuna neden olurlar. Genetik bilginin integrasyonunu sağlamada genel bir role sahiptirler. Ökaryotlarda en az 5 gen, DNA tamiri ile ilgilidir. Bunlar hMSH2, hMLH1, hMSH6, hPMS1 ve hPMS2'dir (14).

3.2. İnce Ve Kalın Bağırsak Neoplazmaları

İnce bağırsağın uzunluğuna karşın bu segmentteki neoplazmalar kendisinden çok daha kısa olan kalın bağırsaktakilerden sayıca çok daha seyreklerdir. İnce bağırsağın en sık görülen selim tümörü adenomlar (polipler), stroma kökenli tümörler (en çok leiomyomlar) ve lipomlardır. Aşağı doğru inildikçe bunları çeşitli nörojenik, vasküler, hamartomatöz lezyonlar, küçük, polipoid ya da intra mural kitleler oluşturma eğilimi taşırlar. Sayıca ileumda daha fazla olmak üzere, tüm ince bağırsağa yayılmışlardır ve nadiren klinik belirti verirler. Bu belirtilerde tıkaçıcı semptomlar ve intüssepsiyondur. Benign tümörler, kanserlerden daha sık görülürler. İnce bağırsak kanserleri bütün gastrointestinal malignitelerin %1' ni oluşturur. Analizlerin pek çoğunda en fazla adenokarsinom tipi maligniteler görülür. Bunu sırasıyla karsinoidler, lenfomalar ve sarkomlar izler. Benign tümörlerin dağılımının aksine, adenokarsinomlar proksimal düzeylerde (duodenum ve üst jejunum, yarımından fazlası ampulla vateriye yakın); karsinoidler ince bağırsağın herhangi bir bölümünde, ancak daha sık olarak ileumda; sarkom ve lenfomalar daha sık olarak distalde yerleşme eğilimi gösterirler. Bütün maligniteler ilk olarak bölgesel lenf düğümlerine daha sonra karaciğere ve bazen başka taraflara yayılırlar. Sarkomlar, bağırsak duvarında bulunan herhangi bir mezankimal hücreden gelişerek, büyüyüp zaman içinde kitelli neoplazmalara dönüşebilirler (48).

Dünyada en sık görülen kanser tipleri akciğer ve kolon kanserleridir. Bunlar, kanser ölümlerinin %40'ını oluşturmaktadır. Diğer ağır seyirli tipler ise meme, prostat ve pankreas

kanserleridir (64). Cerrahi ve radyoterapi lokalize kanserler için etkili tedavi yöntemi olmakla beraber, günümüzde, tüm vücuda yayılmış kanser hücreleri için kemoterapi uygulanmaktadır. Kemoteropetikler, spesifik ilaçlar olmayıp, vücutta çoğalmakta olan tüm hücreleri etkiledikleri için, normal epitel dokunun da ölümüne sebep olmaktadır. En çok sindirim sistemi, keratinöz doku ve kemik iliği etkilenmektedirler. Bu yan etkilerinden dolayı kemoterapinin etkinliği sınırlıdır. Bu yüzden kanserin tedavisinde moleküler düzeyde daha etkili olabilecek kemoterapetikler araştırılmaktadır. Günümüzde onkogen proteinlerine, özel ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunlar içinde en çok insan kanserlerinde görülen onkogen olan RAS'ın proteinlerine yönelik ilaçlar araştırılmaktadır (16). Kolorektal kanserler yıllar boyunca asemptomatik kalmaktadırlar ve belirgin kanama, dışkılama alışkanlığında değişme ya da sol kolon lezyonlarında kramp şeklinde, sol alt kadran rahatsızlığı oluşturarak dikkat çekerler. Sağ taraftaki kanserlerde, sıklıkla gizli bir sebebe bağlı yorgunluk, ya da halsizlik araştırılırken veya açıklanamayan demir eksikliği anemisi tetkik edilirken saptanırlar. Erkeklerde bu tip bir aneminin, gastrointestinal kanser anlamına gelmesi klinik bir kuraldır. Kadınlarda menstruasyona bağlı kan kaybı, çok sayıda gebelik ve anormal uterus kanamaları bu tip bir anemiye yol açabileceği için durum bu kadar açık olmaz. Hastalık hali, güçsüzlük ve kilo kaybı gibi sistemik belirtiler ancak neoplazma karaciğere ya da başka bir bölgeye atladıktan sonra oluşur. Bu lezyonlar klinik olarak sıklıkla sessiz kaldıkları için, klinik belirtilerden önce, hematojen yayılma olmaktadır (42).

Günümüzde kanserlerin yaklaşık %25'i çekumda ya da çıkan kolonda lokalizedir ve rektum ile distal sigmoidde de benzer bir oran söz konusudur. Geri kalan %25'de inen kolon ve sigmoid proksimalinde lokalizedir; geri kalanlar diğer bölgelerde dağınıktır. Sol taraftaki kolorektal kanserler anüler, peçete halkası şeklinde lezyonlardır ve genellikle lumeni belirgin derecede daraltır ve bazen proksimal bağırsağın distansiyona uğramasına sebep olurlar. Peçete halkası şeklindeki lezyonların sınırları, klasik olarak yukarı doğru toplanmış, kabarcıklı ve serttir ve orta çemberi ülserleşmiştir. Bu neoplazmalar zaman içinde (belki yıllar içinde)

bağırsak duvarını geçerek , subserozal ya da serozal, sert beyaz nodüller şeklinde görülebilirler. Yayılma, özellikle bölgesel lenf düğümleri ve karaciğere ulaşarak sonunda her yere yayılabilir (64).

Sağ kolondaki kanserler, tipik olarak lumen içinde karnibahar şeklinde kitleler olarak büyüyen polipoid bir görünüme sahiptirler. Plak şeklinde ya da ülseratif lezyonlar çok daha seyrekdir. Tümörlerin makroskopik morfolojileri ne olursa olsun, sonunda kolon duvarını aşarak, mezenter ile bölgesel lenf düğümlerine yayılırlar. Ardından da karaciğere ve diğer uzak bölgelere yayılım olabilir. Bu neoplazmalar daha geniş olan çekumda ve fekal akımın daha sıvı olduğu çıkan kolonda oluştukları için, seyrek olarak tıkanmaya yol açarlar. Bu sebeple uzun süre boyunca klinik olarak sessiz kalırlar, ancak belirgin kanamaya sebep oldukları zaman tanınırlar. Kolorektal kanserler, nadiren ülseratif kolitle ilişkili olduklarında, sinsiz bir şekilde infiltratif seyrederek daha fazla agresif, infiltratif olma ve erken bir dönemde yayılma eğilimindedirler. Kolorektumdaki tüm karsinomlar, histolojik olarak %95'i adenokarsinomlar olup, bunların çoğu müsin üretirler.(Müsin de ekstraselüler olarak salgılanır.) Anüse yakın olan bölgedeki tümörler ise sıklıkla skuamatöz hücre diferansiyasyon odaklarına sahiptirler. Seyrek olarak görülen diğer bir tip ise küçük hücreli, diferansiye olmayan karsinomlardır. Bu karsinomlar nöroendokrin hücrelerden kaynaklanabilir. Bu sebeple hormon ve diğer biyoaktif maddeleri üreterek, çeşitli paraneoplastik sendromlar oluşturma potansiyeline sahiptirler. Rektum ve apendikse ait karsinoidler neredeyse hiç metastaz yapmazlar (64).

Bu neoplazmaların tanısı:

- 1-Lavman Opak, Baryumlu Grafi
- 2-Rektosigmoidoskopi,
- 3-Kolonoskopi,
- 4-Bilgisayarlı Tomografi (BT),

5-Biyopsinin dahil olduğu çeşitli metodlara dayanarak konur. Ayrıca, karsino embriyonik antijen (CEA) kan düzeylerinin yükselmesi, tanı açısından ancak tümör belli bir boyuta eriştikten ve yayılma olasılığı çok arttıktan sonra anlamlı düzeylere ulaşır (1). Çok sayıda evreleme sistemleri geliştirilmiştir (48).

Astler Coller Sınıflandırması

A- Evresi: Mukozaya lokalize tümör

B- Evresi: B1 Lenf nodu metastazı olmadan muskularis propriaya kadar tümör tutulumu

B2 Lenf nodu metastazı olmadan muskularis propriayı invaze eden tümör

C-Evresi: C1 Muskularis propriaya kadar lezyon ile beraber lenf nodu metastazı

C2 Muskularis propriayı invaze eden lezyon ile beraber lenf nodu metastazı

D-Evresi: Uzak metastaz

TNM Sınıflandırması

Primer tümör (T)

T1s-İn-situ karsinoma

T1-Submukozaya kadar tutulum

T2-Muskularis propriaya kadar tutulum

T3-Subserozaya kadar tutulum

T4- Tüm duvar veya komşu organ tutulumu

Bölgesel lenf nodu (N)

N0 LN metastazı olmayan

N1 1-3 metastatik lenf nodu

N2 4 veya daha fazla metastatik lenf nodu

Uzak metastaz (M)

M0- Uzak metastazı olmayan

M1- Uzak metastazı olan (32).

EVRE		TNM
0	İnsitu karsinoma	Tis NOMO
I	Muskularis propriaya kadar yayılım	T1, T2 NO MO
II	Tüm bağırsak duvarı tutulumu	T3, T4 NOMO
III	Lenf nodu metastazı varlığı	T, N1, N2, MO
IV	Uzak metastaz varlığı	T N M1 (32).

3.2.1. Kolorektal Polipler

Polipler kolonda lumene doğru çıkıntı yapmış mukozal kabarıklıklardır. Bu çıkıntılar saplı ya da sapsız (sessile) olabilirler. Boyutları 1-2 mm'den 10 cm'ye kadar değişebilir. Tek tek bulunabilecekleri gibi yüzlercesinin hatta binlercesinin bir arada olduğu polipozis koli şeklinde yapılanmaları da mümkündür. Daha çok kolon sol tarafında lokalize olurlar. Klinik olarak çoğunlukla asemptomatik olan polipler histopatolojik yapılarına ve morfolojilerine bağlı olarak kanama, invaginasyon, obstriksiyon, rektal akıntı, sıvı ve elektrolit anomalileri ile kanserleşme gibi değişik belirtilerle ortaya çıkabilirler (32).

Histopatolojik olarak temelde 3 farklı polip mevcuttur;

1- Adenomatöz polipler: Tubuler (%87), Tubulovillöz (%8), Villöz (%5).

Polipozis Koli Sendromları: Familial Adenomatöz Polipozis, Gardner Sendromu, Turcot Sendromu

2-Hamartomatöz Polipler: Peutz-Jeghers Sendromu, Juvenil Polipozis, Cowden Sendromu (GIS polipozis, Tricholemmoma, Meme kanseri, Tiroid hastalık), Cronkhite-Canada Sendromu (GIS polipozis, hiperpigmentasyon, alopesi, tırnak deformiteleri).

3- Hiperplastik Polipler (32).

3.2.1.1. Adenomatöz Polipler

Bunlara adenomalar adı da verilir. Kolon mukozasındaki glandüler epitelin iyi sınırlanmış bir alanında gelişen proliferasyon ve sınırlanamamış hücre bölünmesine işaret eder. Üç farklı morfolojisi olmasına rağmen bu morfolojilerin hepsi de karışık bulunur ve hakimiyet hangi türde ise onun ismini alırlar. Bu üç morfolojide de malignite gelişir. Malignite en sık Villöz yapıda (%40) gelişirken, bunu sırasıyla Tubulovillöz (%22) ve Tubuler (%5) yapı izler. Bunun yanında çap arttıkça malignite riski artar. Yukardaki malignite riski eğer polip çapı 2 cm'nin üzerine çıkarsa sırasıyla %53, %46 ve %35 olur. Genelde ise adenomatöz polipte 1 cm'ye kadar olan poliplerde malignite riski %1.3 iken 1-2 cm arasında % 9.5 ve 2 cm'nin üzerinde %46'dır. Tubuler adenomalar çoğunlukla saplı oldukları halde villöz yapıda olanlar sapsızdırlar (32).

Familial Adenomatöz Polipozis (FAP) yüzlerce polibin geliştiği ailesel bir hastalıktır Bu patolojiye sebep olan gen 5. kromozomun uzun kolunda bulunmuştur ve APC geni olarak isimlendirilmiştir. Hastaların ortalama teşhis yaşı 29'dur. FAP'a bağlı ortalama kanser gelişme yaşı ise 39'dur. FAP'ın ekstrakolonik bulguların eklendiği farklı tipleri de vardır. Bunlardan birisi, Gardner sendromudur. Polipozis koliye ek olarak hastalarda epidermal inklüzyon kistleri ve kemiklerde osteomlar bulunur. Turcot sendromunda ise kolon poliplerine beyin tümörleri eşlik eder ancak oldukça nadir görülen bir durumdur (32).

3.2.1.2. Hamartomatöz Polipler

Peutz-Jeghers Sendromu: Bu sendromda, melanin tarafından oluşturulan mukokütanöz pigmentasyon ve tüm GIS boyunca, intestinal düz kaslarda hamartomlar vardır. Otozomal dominant geçişi olan bu sendromda hastalar meme, serviks, over,

fallopian tüpler, tiroid, akciğer, cilt (Basal Hücreli), pankreas, testis ve safra yollarında kanser gelişme riskini taşırlar. Yine bu hastalarda %2-13 oranında mide, ince barsaklar ve kolonda yerleşen GİS kanserleri gelişme riski vardır. Kanserler, polibi örten ya da onun kenarında bulunan mukoza da gelişebilir. Bu hastalarda GIS kanamaları ya da intusepsiyona bağlı olarak gelişen ileuslar başlıca klinik bulgulardır (32).

Juvenil Polipozis: Çoğunlukla 10 yaşın altındaki çocuklarda görülen bu patoloji daha büyük çocuklarda ve erişkinlerde de görülebilir. Juvenil polipler, barsak duvarında, lamina proprianın fibroblastik stroması içerisinde gelişen glandüler yapıların kistik dilatasyonlarıdır. En yaygın karşılaşılan semptom rektal kanama ve kitlenin dışarı prolabe olmasıdır. Hastaların %10'unda otoamputasyon gelişebilir. Çocukluk çağında rektal kanamanın en sık sebebinin juvenil polipler oluşturur. Poliplerin %60'ı, anal verge'den 10 cm uzaklıkta ve yine en fazla %10'unu, 20 cm'den daha uzakta ve kolonun diğer kısımlarında bulunur (32).

Juvenil polipozisi bulunan çocuklarda ise klinik, soliter lezyon bulunanlara göre, daha farklıdır. Bu hastalarda hematokezyaya ek olarak demir eksikliği anemisi, hipoproteinemia, hipokalemi, halsizlikte tabloya eklenir. Bu duruma kolonun benign ve malign lezyonları ile gastroduodenal poliplerin eşlik etme ihtimali artar. Ancak soliter poliplerle karşılaştırıldığında oldukça nadir görülürler (32).

Cronkhite-Canada Sendromu: Nonfamilial juvenil poliplere hiperpigmentasyon, alopesi ve tırnak deformiteleri gibi epidermal değişikliklerin eklendiği bir sendromdur. Bu hastalarda da rektal kanama ve anemi başlıca yakınmalardır. Diyare ve malabsorbsiyona bağlı vitamin eksiklikleri, hipoproteinemia, sıvı ve elektrolit anomalileri, kilo kaybı ve karın ağrısı, bulantı ve kusma, tat duyusu kaybı ve bazı nörolojik şikayetlere de rastlanabilir. Polipler kolon ve mide de mutlaka beraber bulunurlar. İnce barsaklarda da sıklıkla buldukları düşünülmektedir (32).

Cowden Sendromu: Üç embriyonal hücre tabakasını da ihtiva eden hamartomlardan oluşan otozomal dominant bir defektir. Burada gastrointestinal poliplere ek olarak trikolemmomalar, meme kanseri ve tiroid hastalıkları da beraber bulunur (32).

3.2.1.3. Hiperplastik Polipler

Hiperplastik polipler kolonda oldukça yaygın görülür. Tipik histolojik görünümüleri epitelyal dismaturasyon ve hiperplazidir. Genelde çapları 5mm'yi geçmez. Bunlarda adenomatöz değişiklik görülmez. Klinik olarak anlamı ise açık değildir. Yaş ilerledikçe görülme sıklıkları artar (32).

3.2.1.4. Kolorektal Karsinomlar

Kolorektal kanserlerin yaklaşık %2-3'ünün, Familial Adenomatöz Polipozis Sendromuyla başladığı tahmin edilmektedir. 5q21'de iki tümör supresor gen yer alır. Birincisi Familial Polipozis Coli'de inaktive olan APC geni, ikincisi de birçok kolon kanserinde mutasyona uğrayan MCC genidir. Adenokarsinom gelişimi, çok değişik, çok basamaklı ve ardışık genetik değişimlerin eklemeli etkilerinin rol oynadığı bir olay olarak değerlendirilmektedir (42).

Karsinogenezde rol oynadığı düşünülen tüm genetik değişikliklere karşılık, epidemiyolojik ve çevresel faktörlerin de etkili olduğu düşünülmektedir. En çok dikkati çekilen faktörler diyetle alınan yağ, rafine karbonhidrat alımı, lifli gıdaların alımı ve diyetle A, C, ve E vitaminleri gibi koruyucu vitaminlerin yeterliliğidir. Diyetteki yağ miktarı ile kolorektal kanser atak oranı arasında bağlantılar kurulmuştur. Fazla miktarda yağ alınmasının karaciğerde kolesterol ve safra asitleri sentezini artırdığı ileri sürülmüştür. Bu ürünler kalın bağırsaktaki bakteriyel flora tarafından potansiyel

karsinojenlere çevrilebilir. Bakteri organizmalarının kolonda prolifer olmaları, diyetle yüksek miktarda rafine şeker alınımıyla desteklenir (42).

Diyetteki lif miktarının, daha rafine, lif içeriği düşük gıdalarla beslenen zengin batı toplumundaki kolorektal kanser oranının, lif içerikli daha basit gıdalarla beslenen Asya, Afrika ve diğer fakir bölgelerde yaşayan, daha düşük sosyo ekonomik düzeye sahip insanlardan daha yüksek olmasında, lifin koruyucu bir etki sağladığı düşünülmektedir. Lifin dışkı kütlesini arttırdığı ve karsinojenlerin konsantrasyonunu düşürdüğü düşünülmektedir. Lifler aynı zamanda kalın bağırsağa geçişi de hızlandırır ve mukozanın olası zararlılara maruz kalışını azaltır. Ayrıca bazı lif içerikleri, toksinleri bağlayarak, koruyucu etki sağlayabilirler (64).

3.3. Kolon Kanserlerinde Etkili Olan Tümör Baskılayıcı Genlerin Biyokimyasal Fonksiyonları

Bir transmembran reseptör proteinini kodlayan delesyona uğramış kolon karsinom (deleted in colon carcinoma:DCC) geni, hücre adezyon molekülleriyle yapısal benzerlik göstermektedir. DCC'geninin kaybı veya proteininin fonksiyon görmemesi hücreler arası bağlantıların kaybolmasına yol açmaktadır. Bunun sonucunda kanser hücreleri invazyon yapma ve göç etme yeteneği kazanmaktadırlar. DCC geninin ligandları, komşu hücrelerin yüzeylerinde ya da hücre dışı matrisde bulunan proteinlerdir. İlerlemiş kolorektal kanserlerde, DCC geninin homozigot kaybı sık görülür. Kolon kanserinde oluşan lezyonlar bir dizi evre geçirerek oluşur. Oluşan adenomlar giderek büyür, ardından kolon epitel hiperplazisi oluşur ve sonunda malign transformasyon gelişir. Bu süreçte sırasıyla adenomatöz polipozis koli (APC) geni, DCC geni ve P53 genleri inaktive olmaktadır (Şekil 1) (48).

Ailesel polipozis sendromu dışında, tanımlanan genetik değişikliklerin hiç birisinin kalıtsal olmadığı düşünülmektedir. Neoplastik gelişime çevresel etkilerin katılıp katılmadığı halen kesinlik kazanmamıştır (48, 73).

3.4. Kolon Kanserlerinde Wnt Yolağında Gerçekleşen Moleküler Değişiklikler

β -katenin, bağlı reseptör sinyal sisteminde çok önemli bir habercidir. Wnt protein reseptör bağlı sinyallerin [Wingless-type frizzled protein receptor signaling (Wnt)] fonksiyonları, genomda hücre proliferasyonunu sağlayan çeşitli genleri aktive etmeleridir. Bu da onkojenlerin amplifikasyonlarının başlamasına sebep olmaktadır. β -kateninin net etkisi, sitoplazmada birikim oranına bağlıdır. Varyasyonlarda, genlerin allelik frekansları, β -katenin kolonun malign transformasyonunu engellemektedir. Eğer kesin bir polimorfizm varsa, kolon kanserine yatkınlık durumunda, β -katenin aracılığıyla Wnt sinyalinde proteinlere bağlanma affinitesi azalır (Axin veya adenomatous polyposis coli proteinlerinin β -katenine bağlanma affiniteleri azalır.) (63). İnsan kolon tümörlerinde, axin2 ve hnk2 mRNA ekspresyon değerlerinin yüksek olması, Wnt/ β -katenin sinyalini aktive etmektedir. Wnt/ β -katenin sinyal sisteminde görevli olan gen mutasyonları, kanser tiplerinin gelişiminde anahtar bir rol oynamaktadır (64).

Ektodermal nöral korteks1 (ectodermal neural cortex1: ENC1) geninin ekspresyon düzeyi kolon kanserli dokularda yapılan çalışmalarda yüksek düzeyde bulunmuştur. ENC1, beta katenin/Tcf sistemi tarafından düzenlenmektedir. Bu genlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler, kolon hücrelerinin transformasyonu ile kolorektal karsinogenesinin gelişmesine katkıda bulunmaktadır (70).

Kaderin aile proteinlerinin [E-cadherin (cadherin-1), P-kaderin (cadherin-3) ve OB-kaderin (cadherin-11)], hücresel bağlanma ve hareketliliği düzenledikleri ve tümör supresörler gibi görev yaptıkları ileri sürülmektedir. Bu aile proteinleri kromozom

16q22'de haritalanmıştır. E-kaderin lokusunun allelik inaktivasyonu ve mutasyonu, diffuse gastrik kanserlerde sık görülmektedir. Malignlerde genomun bu bölgesi sık sık delesyona uğramaktadır. Renal, gastrik ve kolonik karsinomalı 30 vakada, kaderin 11 ve E kaderin ekspresyonları incelendiğinde, gastrik kanserde bir allelin ekspresyon kaybı, E cadherin lokusunu sınırlamakta iken, renal karsinomada allelik kayıp gözlenmediği, kolon karsinomada ise E kaderin ve kaderin 11 allellerinin kaybı gözlenmiştir. E kaderin ve kaderin 11'in dolaylı olarak kolorektal kanserlerin patogenezinde rol oynadıkları ileri sürülmektedir (11).

Sporadik veya Familial adenomatöz polyposisli hastalardan alınan ACF(Aberrant crypt foci) biopsi örnekleri genetik değişiklikler gösterir. Magnify endoskopi kullanarak, takip eden kanser ve kolorektal adenomaların, varsayılan öncül lezyonların, ACF biyopsi örneklerinde; APC, K-ras ve β katenin mutasyonları tespit edilmiştir. FAP'da APC, K-ras ve β katenin mutasyonları yer alırken, non-FAP'lı hastalarda bu mutasyonlar tespit edilememiştir. K-ras mutasyonları başlıca ACF'nin düzenlenmesi, oluşumu süresince meydana gelir. Bunu adenomalar takip eder. Bu olaylar APC mutasyonunda gerçekleşir. FAP'da, APC'nin somatik mutasyonu predominant olarak, ACF formasyonu süresince meydana gelir. Bunu K-ras mutasyonu takip eder (59, 49). Sporadik kolorektal karsinoma, adenoma ve ACF'de K-ras mutasyonu ile Glutathione S-transferaz pi(GSTP1-1)'nin ekspresyonundaki artış birbirine yakındır. Ap1 ve Sp1, v-K-ras'ın sorumlu değiştiricidirler. Ap1, GSTP1-1'in promotörüyle etkileşim gösterir. GSTP1-1 ekspresyonu kolorektal adenoma ve karsinomalarda yüksek bulunmuştur. GSTP1-1 aşırı ekspresyonu oldukça makul değerlerde iken, kolorektal adenoma ve karsinomalarda K-ras mutasyonu, AP-1 aktivasyonu nedeniyle etkisi azalmaktadır (39).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kolorektal kanserlerin %68'ini, APC tümör supresör gen ile karakterize olmuş mutasyonların içerdiği, bu mutasyonların, WNT

sinyal sistemini aksatarak, β -kateninin nükleer aşırı ekspresyonuna yol açtıkları tespit edilmiştir. Nükleer β -katenin fonksiyonlarından biri de tümör genlerinde transkripsiyonel aktivatör olmalarıdır. Kolorektal kanserlerde β -katenin, bir major onkoprotein olarak görev yapar. β -kateninin tümör hücrelerindeki nükleer ekspresyonu ise çok yüksektir. β -kateninin aşırı ekspresyonu, APC lokusunda bozukluklara sebep olur. Düzenli gerçekleşen bu olaylar, tümör hücresinde onkoproteinin farklı dağılımına yardımcı olup, çevre dokulardaki invazyon sahasındaki tümör hücrelerinde sinyalin alınmasına, β -kateninin nükleer translokasyonuna sebep olmakla tümörün invazyonunda direkt rol oynayabilirler (19).

3.5. E-Kaderinin B-Katenin İle Etkileşimi

Hücre matris bağlanma (Cell-matrix adhesion) kompleksine, hücre bağlanma molekülleri (cell adhesion molekülleri:CAM'S) aracılık etmektedir. CAM'S'ın bir sayısı, tümör invazyon ve metastazlarının baskılayıcılarıdır. E-kaderin, hücre-hücre adhezyon anahtarı aracılığında CAM'S'ın membran altı proteinlerinin bir grubuyla etkileşimini sağlamaktadır. E-kaderin, α , β ve γ kateninler olmak üzere 3 grupta incelenirler. α , β ve γ kateninler, mikrofilament iskeletine, ankor E-kaderin olarak sunulurlar. E-kaderin ekspresyonu, tümör hücrelerinin invazif ve metastatik yapılarının her ikisiyle ilgilidir. E-kaderin ekspresyonunun kaybı, kanser hücrelerinin invazifliğinde potansiyel bir artışa ve hücresel bağlanmada azalmaya sebep olur. Hücre-hücre bağlanma moleküllerinin düzenlenmesi, etkili kanser hücre davranışına en önemli yaklaşımdır (11).

Sitoplazmik protein olan β -kateninin, E-kaderinle olan interaksyonu, direkt yolla gerçekleşir. β -katenin alfa veya gama kateninden biriyle etkileşerek, kaderin molekülünün fonksiyonel olmasını sağlar. β -katenin, glikojen sentazkinaz 3 β [glycogen

synthasekinase 3 β (GSK3 β) ve tümör supresör gen APC'nin üretimiyle düzenlenmektedir (11).

β -katenin değerleri, Wnt sistemi tarafından, sinyal yoluyla düzenlenir. Wnt proteinler, reseptöre bağlanarak, bir sinyal oluşmasına sebep olurlar. Sinyali sağlayan, sitoplazmik bir protein olan Dishevelled(Dsh) proteindir (Dsh'nin aktivasyonu, Wnt sinyal inhibitleri GSK3 β 'nın aktivitesine ve dolayısıyla serbest β -katenin birikintileriyle sonuçlanır.). Kompleks yapmamış β -katenin değerlerinin serbest birikintileri daha sonra yüksek mobiliteye sahip grup, domain proteinlerle kompleks yapı oluştururlar. Bunlar, transkripsiyon faktörlerinin T-cell factor/ enhancer factor-1(Tcf/ LEF-1) ailesidir (10).

Gastrointestinal alanın sporadik kanserlerinde; Tümör gelişim faktör β reseptör II [Tumor Growth Factor β Receptor II(TGF β RII)], insülin gelişim faktör reseptör [II Insuline Growth Factor Receptore II (IGFR II)] K-ras ve BAX genlerinin mutasyonları ile mikrosatellit alterasyonlar tespit edilmiştir. TGF β RII, IGFR II ve BAX genleri kolon tümörlerinde değişikliğe uğramaktadır. Bu değişiklikler öncelikle TGF β RII, IGFR II ve BAX genlerinin kodlayıcı dizilerin mutasyona uğraması ile meydana gelmektedir (11). Pankreatoblastomayla birlikte, familial ve sporadik adenomatous polyposisli hastalarda yapılan moleküler çalışmalarda, exon 3'de β -katenin ve APC genlerinin mutasyona uğradığı, direkt DNA dizilemesinde ekzon 1'de K-ras, immunohistokimya çalışmasında ise p53 ve Dpc4(Ductuloinsular tumors of the Pancreatic) tümör supresör genleri mutasyona uğramıştır. Bu değişiklikler APC/ β -katenin yolağını etkiler (1).

3.6. Kolorektal Kanserlerde Değişime Uğrayan Genlerin Sentezlenmesi

İnsan kolorektal kanserlerinde, serin-treonin fosfataz 2A'nın beta izoformu [β (PPP2R1B) isoforms of the subunit of the serine-threonine phosphatase 2A (PPP2R1B)] geninin değişime uğradığı tespit edilmiştir. PP2R1B geni, kromozom 11q23 'de lokalizedir. PPP2R1B geni, serin/ threonin protein fosfatazın A subunitini

kodlar. Ayrıca bu gen, tümör supresör gen olup, akciğer ve kolon kanserlerinde etkin olduğu sanılmaktadır. Primer kolorektal kanserli 30 örnekte yapılan moleküler çalışmada, 5 missens mutasyon, 4 kolon kanserli vakada da amino asit substitüsyonu tespit edilmiştir. Bunlar:

Alanin (GCT) → → → → → → → → → Glisin (GGT)

İsolösin (ATA) → → → → → → → → → Lösin (TTA)

Glutamik asit (GAG) → → → → → → → → → Valin (GTG)

Glisin (GGA) → → → → → → → → → Valin (GTA)

Prolin (CCT) → → → → → → → → → Serin (TCT)

Polimorfizm ise lösin (478)'de bulundu. PP2R1B geninin kolorektal kanserlerin bütün tiplerinin gelişiminde inaktive olduğu gösterilmiştir (56). Hata onarım mekanizmasındaki [Miss Match Repair (MMR)] 4 proteinin (hMSH6, hMSH2, hMLH1 ve hPMS2) ekspresyonu ile mikrosatellit instabilitesi yüksek olup, somatik veya epigenetik değişimlerde, hMSH6 inaktivasyonu çok seyrek olarak gözlenmiştir (17).

Kolorektal tümörlerde görevli olduğu sanılan bir başka gen ise lizil oksidaz (Lysyl Oxidase: LOX)'dır. LOX, bakır bağlı bir amino oksidaz olup, hücre gelişiminin düzenlenmesinde görevli bir tümör supresör genidir. LOX geninin kromozomal lokusu 5q23.1'dedir. Kolon kanserinde LOX geninin LOH'unun LOX'un fonksiyonunda azalma veya kayıpla tümör oluşumuna katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Tümör gelişimi boyunca LOX fonksiyonunda azalma veya kayıp, somatik mutasyonların direkt bir sonucu olup, kolon tümör patogenezi ile birlikte (46).

İnce bağırsak kanserlerinde adenokarsinomlar iyi diferansiye olmuşlardır. Kolon karsinomlarının da bu tip tümörler histopatolojik olarak ayırt edilebilir olup, büyük hücreli minimal farklılaşmış karsinomlar [Large cell minimally differentiated carcinomas (LCMDCs)] olarak adlandırılırlar. Yaygın olmayan neoplazmaların patogenezinin iyi anlaşılması için LCMDCs'lerin moleküler özellikleri, kolonun

diferansiye olmuş adenokarsinomlarıyla (DACs) karşılaştırılıp, yaygın olarak görülen tipik kolorektal karsinomlardaki değişiklikler incelendiğinde:

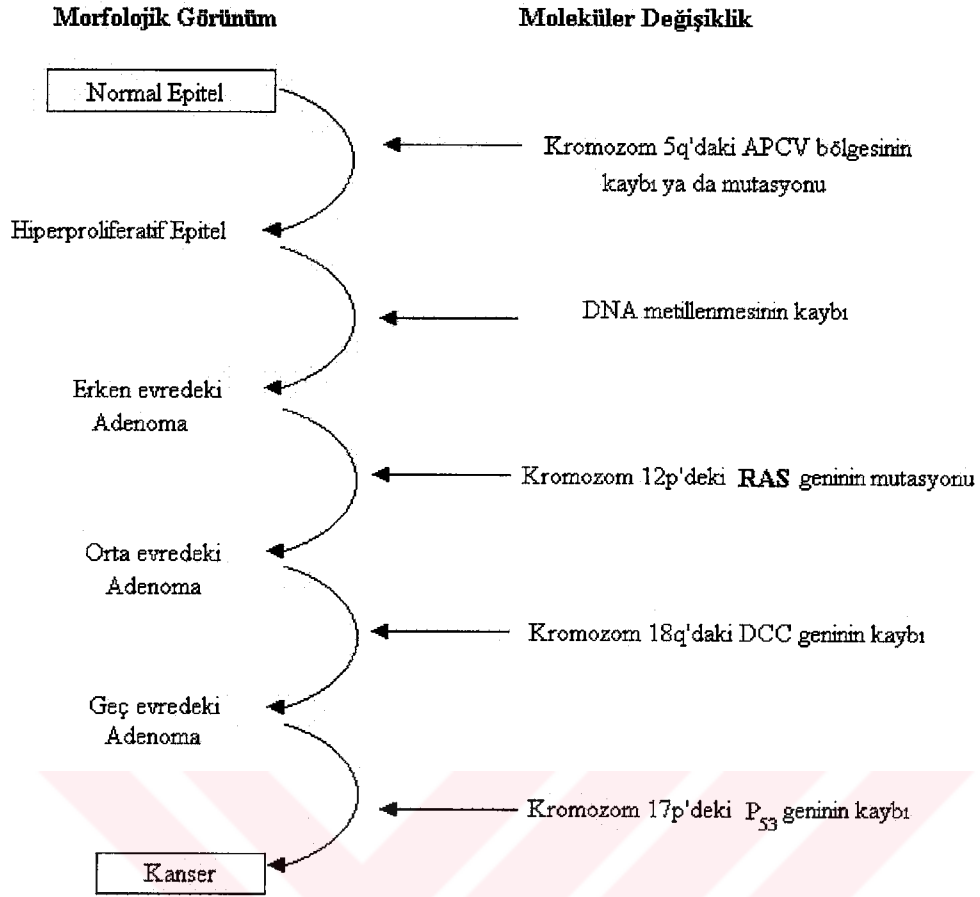
- 1-p53 ve Beta katenin immunreaktivitesinde artış,
- 2-K-RAS gen mutasyonlarında artış,
- 3-Mikrosatellit instabilitesinde artış,
- 4-Kromozom 5q, 17p ve 18q'da heterozigositesinin kaybında artış vardır.

Tümörlerin immunohistokimya açısından değerlendirilmesi yapıldığında, bir homeobox protein olan CDX2'nin eksprese olduğu tespit edilmiştir. CDX2'deki alterasyonlar ve DNA hata onarım defektleri, LCMDCs'lerin gelişiminde kısmi olarak rol oynar. LCMDCs'lerin moleküler patogenezi DACs'lerden farklılık gösterirler (24).

p21 aktive edici protein kinaz(PAK) serin/ threonin kinazlar, RhoGTPaz ailesinin önemli etkileyicilerinden olup, hücre morfolojisi ve motilitesinin düzenlenmesinde görevlidirler. (Hücre transformasyonunda olduğu gibi.) Tümör hücre hatlarında yapılan çalışmalarda PAK4'ün aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. Kinazın aktive olması, serinin glutamik aside mutasyonu ile sonuçlanır (S474E). Fosfospesifik antikorlar, golgi membranında aktive PAK4 karşısındaki Serin474'e etkileyerek, aktive Cdc2 ile birlikte eksprese olurlar. Aktive PAK4(S474E) mutantın ekspresyonu, transforme edici potansiyele sahip olup, NIH3T3 hücrelerin gelişiminde bağımsız yol izler. Diğer bir yolda Kinaz-inaktivite PAK4; HCTII6 kolon kanser hücrelerinin, ankor bağımsız gelişiminde inhibe edici olup, aktive Ras tarafından etkin olarak transforme edilir. PAK4; onkojenik transformasyonda ve Ras'ın görevini yerine getirmesinde gereklidir (13). Kalıtsal polipoz olmayan kolon kanser [Hereditary nonpolyposis colon cancer (HNPCC)]'li hastalardan alınan spermde yapılan moleküler çalışmalarda; hMSH2, hMLH1, ve hPMS2 hata onarım genlerindeki mutasyonun HNPCC'ye sebep olduğu açıklanmıştır. HMSH2 mutasyonlu erkeklerde, hata onarım genlerinin mutasyonları,

kromozomların normal segregasyonlarında ve mayoz da etkili olabileceği ileri sürülmüştür (38).

Gastrointestinal kanser örneklerinde yapılan diğer bir moleküler çalışma da, Gen Chip p53 Assay ve Dual color FISH'dir. Primer tümör örneklerinde ekzon 8'de 273. kodonda, heterozigot nokta mutasyon His.(CAT)→Arg.(CGT), ekzon 6'da ise 217. kodonda, Gly.(GGG)→Val.(GTG) olduğu tespit edilmiştir. Gastrointestinal kanserlerin gelişiminde ve karsinogenezisin gelişimi süresince, p53 mutasyonlarının gerçekleşmesi, kromozom 17'nin delesyonuna neden olur (57). Kolon kanser örneklerinde, kodon 12 ve kodon 13'de Ki-Ras(Kirsten-ras) mutasyonları tespit edilmiştir. Ki-Ras mutasyonlarının oluşmasında, genetik faktörlerin yanı sıra çevre faktörleri ve de hayat koşulları etkili olmuştur. Sigara kullananlarda, aspirin/NSAID'lerin kullanımı, vitamin-mineral ilavelerinin kullanımı, kafein tüketimi Ki-Ras(+) ve Ki-Ras(-) ile meydana gelen tümörlerle birlikte. Bu birliktelik beslenme veya diğer hayat tarzı faktörleriyle karıştırılmamalıdır. Erkekler arasında, fiziksel aktivitenin düşük değerinde olması, Ki-Ras mutasyonlu tümöre sahip olunabileceğini, bayanlarda ise böyle bir durumun söz konusu olmadığını, ancak vücut indeksi (Body Meus Index)'nin yüksek olması, tümörlerin daha yüksek oranda Ki-Ras mutasyonuna sahip olunabileceğini ortaya koymuştur (52). Dış kaynaklı faktörler; lif ve yağ, kalıtım riskin önemli değiştirici etkenlerindedir. Beslenme faktörleri, intestinal bölgenin değişmesine, karsinojenik oluşumun etkilenmesine, intestinal bakteriyel flora yapısının değişmesine, safranin dolaşımına vesafra akışındaki değişikliklere sebep olurlar (71). Ki-Ras mutasyonları, sayılan bu faktörler ve kolon kanseriyle birlikte olup, diğer hastalık şekillerinin ortaya çıkmasına neden olabilirler (18).



Şekil 1: Adenokarsinomun Patogenezinin Basit Şeması

3.7. Genomik Bütünlüğün Sağlanmasında P53'ün Rolü

p53 genomik bütünlüğün sağlanmasında:

- 1-Genotoksik etkenlere karşı hücrel cevabın oluşmasında güçlü bir aracıdır.
- 2-DNA tamirinde ve DNA rekombinasyonunda aktif olarak görev almaktadır.
- 3-DNA hasarında transaktive olma kabiliyeti vardır.
- 4-Tamir işlevinde direkt ve biyokimyasal görevi vardır.
- 5-3'-5' ekzonukleaz aktivitesini inhibe ederek dizi spesifik DNA bağlayıcısının aktivasyonuna yardımcı olur (67).

3.8. Tümörlerdeki Karyotipik Değişiklikler

Onkogenleri aktive eden ya da tümör baskılayıcı genleri inaktive eden genetik hasar, gizli (nokta mutasyonlar) ya da bir karyotipte belirlenebilecek kadar büyük

olabilir. Belirli neoplazmlarda karyotipik anomaliler sık bulunurlar ve tümör hücrelerindeki yapısal anomali tipleri ise şöyledir:

- 1- Dengeli Translokasyonlar,
- 2- Delesyonlar,
- 3- Gen Amplifikasyonunun Sitogenetik Belirtileri' dir.

Kolon adenomlarındaki epitel hücrelerinde çok sayıda genetik değişikliklerin bulunduğu ortaya konmuştur. Bu değişimler iki şekilde olur. Birincisi protoonkogen aktivasyonu, ikincisi de kanser baskılayıcı genlerin kaybıdır. Bu değişimlere katılan K-ras protoonkogeni, 12p'de yer alır. Bununla ilişkili kanser baskılayıcı genler, 5q21'de APC geni, 17p'de P53 geni, 18q'da kolon karsinomunda delesyona uğrayan, DCC geni yer alır. Hafif hücrel displazili küçük adenomlarda, bu değişikliklerin hiç biri bulunmamasına karşılık; ciddi displazi ile karakterize olan daha büyük lezyonlarda ve sık olarak in situ kanser ve de benzer kanser odakları ile ilişkili lezyonlarda bulunmuştur. Ağır hücrel değişiklik gösteren adenomlarda, bu genotipik değişikliklerden bir ya da ikisi bulunur. Bu yüzden adenomlardaki displazi düzeyi ile hücrelerdeki genom değişikliklerinin sayısı arasında doğrudan bir ilişki bulunur (48).

Kolorektal polipli veya kolon kanserli hastaların, birinci derece akrabalarında, periferik kandan yapılan kromozom analizinde, sayısal veya yapısal aberasyonların çok yaygın olduğu tespit edilmiştir. Sayısal anomaliler içerisinde kromozom 7, 11, 13 ve 20'nin kazancı, Y, 4, 18, 21 ve 22. kromozomların kaybı gözlenmektedir. Yapısal yeniden düzenlenmeler ise; 1p13, 1q10, 3p21, 5q11, 7q10, 8q10, 8q11, 12q13, 16q13, 17p11, 20p11, 20p13 ve 20q10 kromozom bandlarında görülür ve sıklıkla 1p, 8p, ve 17p'nin kaybı ve 5p, 6p, 7p, 8q ve 20q'nun kazancına neden olurlar (44).

İnsan kolorektal adenokarsinomlarında; 1, 7, 17 ve 18. kromozomlarda aberasyonlar vardır. Kanser hücrelerinin bir belirteci de anöploididir. Anöploidi, kromozom aberasyonları ve instabilitesiyle karakterizedir. Kolorektal

adenokarsinomlarında sık olarak trizomi7 ve monozomi18 aberasyonları meydana gelir. Yapısal kromozomal aberasyonlar, sporadik kolorektal adenokarsinomlarda, kromozom 1'in kısa kolundaki delesyonlar ise %50 oranında görülmektedir (3).

Kolon kanserli hastalar ve onların birinci derece akrabalarında görülen frajil bölgeler; 2q33, 3p14, 5q21 ve 5q31'de yer aldıkları saptanmıştır. Genel frajil bölgelerin ekspresyonu, kromozomal değişebilirliğin bir göstergesidir. Aynı zamanda genel frajil bölgelerin kırıklar için de tercih noktası olabileceği ve bunların ekspresyonu, insan genomunun kromozomal hasarlarına katkıda bulunabileceği unutulmamalıdır (62).

Çeşitli çalışmalarda, kanser şekillerinin çoğunda, kromozom 3p allelik kayıp meydana geldiği tespit edilmiştir. Kromozom 3p14.2'de, FHIT olarak adlandırılan gen, akciğer kolorektal ve diğer kanserler için tümör supresor gen olarak predispoze olabileceği ileri sürülmüştür (62)

3.9. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, Elazığ ve yöresinde görülen kolorektal kanserlerdeki kromozomal değişikliklerin;

1. Kolorektal karsinoma (KRK)'lı hastalardan alınan periferik kan örneklerinde yapılan sitogenetik analizlerle kromozomal değişikliklerin değerlendirilmesi,
2. Sitogenetik bulguların interfaz-FISH bulgularıyla uyumluluğunun karşılaştırılması,
3. KRK'da kromozom 17'de yer alan p53 genindeki değişikliklerin interfaz-FISH yöntemi ile değerlendirilmesi,
4. Elde edilen sonuçlarla kolorektal kanserlerde kromozom anomalilerin tespitinde interfaz-FISH yönteminin uygulama değerinin araştırılmasıdır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Gereç

4.1.1. Kullanılan Materyallerin Elde Edilmesi

Kolorektal kanser şüphesiyle 2003-2004 tarihleri arasında Fırat Tıp Merkezi ve Elazığ Devlet Hastanesi'nin genel cerrahi kliniklerine başvuran toplam 28 vaka incelemeye alındı. Çalışma materyali olarak ameliyata alınan hematoksilen eosinle patolojik tanısı konan kolorektal kanserli hastaların kolon ve rektum doku örnekleri kullanıldı. Toplam 14 vakada standart interfaz-FISH (Fluoresans *in situ* Hibridizasyon) tekniği kullanılarak değerlendirmeler yapıldı. Dokuları elde edilen hastaların periferik kan örneklerinde ve periferik kanları elde edilebilen 14 hastanın klasik sitogenetik çalışması yapıldı. Tablo1'de hastaların klinik ve patolojik özellikleri verilmiştir.

Hasta No	Patolojik Tanı	Hastaların TNM ve EVRE Sınıflandırması	Yaş ve Cinsiyet	Alınan Materyal
1	Adenokarsinom	TNM1 / Evre IV	57/E	Kan/doku
2	Adenokarsinom	T4NM / Evre II	53/E	Kan/doku
3	Adenokarsinom	TN1M1 / Evre IV	71/E	Kan/doku
4	Adenokarsinom	T3NM / Evre II	49/E	Kan/doku
5	Adenokarsinom	T4NM1 / Evre IV	63/E	Kan/doku
6	Adenokarsinom	TNM1 / Evre IV	68/E	Kan/doku
7	Adenokarsinom	TNM1 / Evre IV	50/D	Kan/doku
8	Adenokarsinom	TNM1 / Evre IV	38/E	Kan/doku
9	İn Situ Karsinom	TNM1 / Evre IV	67/E	Kan/doku
10	Adenokarsinom	TNM1 / Evre IV	73/D	Kan/doku
11	Müsinöz Adenokarsinom	TNM1 / Evre IV	24/D	Kan/doku
12	Adenokarsinom	TNM1 / Evre IV	52/D	Kan/doku
13	Adenokarsinom	T4NM / Evre II	45/E	Kan/doku
14	Adenokarsinom	T4N2M / Evre III	55/D	Kan/doku
15	Adenokarsinom	T4N0M / Evre IV	83/E	Kan
16	Adenokarsinom	T4NM / Evre IV	77/E	Kan
17	Tubulovillöz adenoma	T4NM / Evre II	35/E	Kan
18	Adenokarsinom	TNM1 / Evre IV	56/E	Kan
19	Adenokarsinom	T4N1M1 / Evre IV	55/D	Kan
20	Tubulovillöz adenoma	TNM1 / Evre IV	49/E	Kan
21	Adenokarsinom	TNM1 / Evre IV	45/E	Kan
22	Adenokarsinom	T3NM / Evre II	57/E	Kan
23	Adenokarsinom	T3NM / Evre II	57/E	Kan
24	Adenokarsinom	TNM1 / Evre IV	48/E	Kan
25	Adenokarsinom	TNM / Evre IV	67/D	Kan
26	Adenokarsinom	TNM / Evre IV	54/D	Kan
27	Adenokarsinom	TNM / Evre IV	68/D	Kan
28	Adenokarsinom	T3NM / Evre II	60/D	Kan

Tablo1: Hastaların patolojik tanı, tümör lokalizasyonu (TL), tümör-nod-metastaz (TNM), evreleri, yaş, cinsiyetleri ve elde edilebilen materyalleri.

4.1.2. İnterfaz FISH Preparatların Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonlar

1. Transport Medyum

Medyum 199100 ml

Nöroksin.....1 ml (100 ml Bazal medyumda 1 gr'lık nöroksin tabletlerinin eritilmesiyle hazırlandı)

Amfoterisin B.....2 ml

Penisilin-Streptomisin-Niasin.....5 ml

Yukarıda belirtilen oranlar kullanılarak steril şartlarda hazırlanan transport medyumdan steril, kapaklı tüplere 5 ml konularak +4°C'de saklandı. Çalışmaya alınan vakalara ait dokular ameliyat sırasında steril koşullar altında transport medyum içine alındı.

2. %50, %70, %90 ve %95'lik etil alkol serisi.

3. -20°C metanol.

4. Fiksatif (3:1-Metanol:Asetik Asit)

4.1.3. Dokudan İnterfaz FISH preparatının Hazırlanması

1. Transport besi yerinden petriye aktarılan doku örnekleri makas yardımıyla pens ile tutulabilecek büyüklükte parçalara ayrıldı.

2. Doku sargı bezi arasına konularak hafifçe bastırıldı. Daha sonra pens yardımıyla doku hafifçe lam üzerine bastırılarak hücrelerin yapışması sağlandı.

3. Preparatlar derhal -20°C'deki metanaol içerisine konarak 20 dakika bekletildi.

4. Daha sonra oda ısısındaki fiksatif içersinde 20 dakika bekletildi.

5. %50, %70, %90 ve %99'luk alkol serilerinin her birinde 5 dakika bekletildikten sonra havada kurutulan preparatlar kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı(58).

4.1.4. Periferik Kandan İnterfaz FISH Preperatının Hazırlanması

1. 7ml.hipotonik çözelti steril tüpe konur. Üzerine de 7 damla kan konarak hafifçe alt üst edilerek 37°C'lik benmaride 20 dakika bekletilir.

2. 10 dakika 1250rpm'de santrifüj edilir ve süpernatant atılarak dipteki pellet üzerine 5ml. fiksatif damla damla ilave edilir. Fiksasyon işlemi sıvı beyaz oluncaya kadar yapılır. Sonra da 0.5'e kadar pastör pipeti inilip süpernatant atılarak kalan miktar hafifçe pipetajla karıştırılarak süspansiyon pipete çekilir.

3. Önceden hazırlanarak +4°C'de bekletilen lamlar çıkartılarak nefesle nemlendirilip, hücre süspansiyonu 8-10cm yukardan düz zemine konan lamlara damlatılır. Preparatlar oda sıcaklığında 1 gün yaşlandırılır. Sonrada %70, %85, %100'lük alkol serilerinden geçirilip kurutularak -20°C'ye kaldırılır.

4.1.5. İnterfaz FISH Tekniğinde Kullanılan Solüsyonlar

1. 20xSSC (Standart Sodyum Sitrat) (1 litre)

Sodyum klorür (Merck, Darmstadt, Germany)..... 175,2 gr.

Tri sodyum-sitrat (Merck, Darmstadt, Germany)..... 88,2 gr.

700 ml distile suda eritilerek 1 litreye tamamlandı. pH=5,98'e ayarlandı. Otoklavda sterilize edildi ve buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi.

2. 2XSSC (500 ml)

50 ml 20XSSC solüsyonuna 450 ml distile su ilave edilerek 2XSSC hazırlandı. pH=7'ye ayarlanır.

3. Aseton.

4. %70, %80 ve %100'lük etil alkol serisi.

5. Bir tane %70'lik ve üç tane %50'lik formamide çözeltisi (50 ml). Formamide (HCONH₂, Merck, Darmstadt, Germany)

6. %70'lik formamide..... 35 ml 2XSSC + 15 ml formamide

%50'lik formamide..... 25 ml 2XSSC + 25 ml formamide

Formamid'in toksik olması nedeniyle çözeltiler çeker ocakta hazırlandı.

7. DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole) yüzey boyası (Cytocell, Banbury Business Park Addenbury, Oxfordshire, United Kingdom)

8. PI (Propidium iodide) yüzey boyası (C₂₇H₃₄N₄I₂, Serva, Heidelberg, Germany).

9. NP-40 yıkama solüsyonu (Nonidet NP-40, Abresco, Solon, Ohio, United States).

50 ml 2XSSC solüsyonu içerisine 50µl NP-40 ilave edilerek hazırlandı.

4.1.6.İnterfaz FISH Tekniğinde Kullanılan Gereçler

1. 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri.
2. Mikropipet ve uçları (1, 10 ve 100 µl'lik).
3. 37°C'a ayarlanmış benmari.
4. 65°C'a ayarlanabilen benmari.
5. Plastik şale.
6. Lamel.
7. Rubber solüsyonu (Fixogum Rubber Cement, Marabu, Germany).
8. Floresans mikroskop.
9. İmmersiyon yağı.
10. Şale, petri, pens, sargı bezi, makas yada bisturi ve lam.

4.1.7. Problar

Kromozom 17p13.1(p53) / α-satellit prob (LSI p53 DNA probu, Vysis, USA).

P53 spesifik DNA probu rhodamine ile direk işaretli olup interfaz yaymalarında 17p13.1 bölgesi üzerinde yer alan p53 genindeki değişiklikleri tespit etmek için kullanıldı.

Kromozom 17 α-satellit prob ise fluorescein ile direk işaretli olup kromozom 17 kazancını ve kaybını incelemek için kullanıldı.

4.1.8. Klasik Sitogenetik Çalışmada Kullanılan Solusyonlar

1. Kolşisin (Biological Industries, Israel)
2. Metanol (Merck)
3. Etil Alkol (Merck)
4. McCoys 5A Basal Medyum (Irvine Scientific, California)
5. Newborn Calf Serum (Biological Industries, Israel)
6. L-Glutamin (Sigma, U.S.A, Germany, U.K)
7. Fitohemaglutinin (PHA) solusyonu (Biological Industries, Israel)
8. Penisilin-Streptomisin-Niasin (Biological Industries, Israel)
9. Glasiyel Asetik Asit (Merck)
10. Gimza Boyası (Merck)
11. Söransan Tamponu (pH:6.80)
12. Trypsin Certified (Difco, 1:250)
13. Distile su
14. Entellan
15. Heparin
16. KCL
17. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Dormstadt, Germany)
18. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Dormstadt, Germany)

4.1.9. Klasik Sitogenetik Çalışmada Kullanılan Araç Ve Gereçler

1. Mikroskop
2. Etüv
3. Santrifüj (Hettich Universal)
4. Hassas Elektronik Terazî (Chyo)
5. Enjektörler

6. Pipetler
7. 15 ml.'lik kültür tüpleri
8. Şaleler
9. Mezürler
10. Lam ve lamel
12. UV Lambası (dalga boyları ayarlanabilir)
13. pH metre (Hanna Instruments)

4.1.10. Klasik Sitogenetik Çalışmada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Kolşisin Solüsyonu:

40 mg. Kolşisin 100ml. Distile suda çözülerek hazırlandı.

Hipotonik Solüsyonu:

0.075 M KCL 100 ml. Distile suda çözülerek hazırlandı.

Fiksatif (Tespit Solüsyonu):

1:3 oranında asetik asit: metil alkol (metanol) ile hazırlandı.

Fitohemaglutinin (PHA) solüsyonu:

50 mg. Toz PHA 5ml. Distile suda çözülerek hazırlandı.

Söransan Tamponu (pH=6.80):

18.96 gr. NaH_2PO_4 ve 18.16 gr. KH_2PO_4 1000ml. Distile suda çözüldü. Daha sonra toplam hacim 2000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon 1Normal NaOH veya 1 Normal HCL ile pH=6.80'e ayarlandı.

Gimza Boya Solüsyonu:

5 ml. Gimza boyası watmann no:40 kurutma kağıdı ile süzülüp, üzerine pH'sı 6.80 olan söransan tamponundan 95 ml ilave edilerek hazırlandı.

4.1.11. Periferik Kan Kültür Ortamının Hazırlanması

1. McCoys 5A Basal medium..... 100 ml
2. Newborn Calf Serum.....20ml
3. L-Glutamin.....1 ml
4. Fitohemaglutinin (PHA) solüsyonu.....4.25ml
5. Penisilin-Streptomisin-Niasin..... 1ml

Yukarıda belirlenen oranlar kullanılarak hazırlanan besi yerinden steril, kapaklı tüplere konularak -20°C’de saklandı. Kültür yapılmadan önce besi yeri oda ısısında çözülerek kullanıldı(65).

4.2. Yöntem**4.2.1. FISH (Fluoresans *in situ* Hibridizasyon) Tekniği Uygulaması****4.2.1.1. İnterfaz FISH tekniği İçin Preperatların Ön Hazırlığı**

1. Patolojik inceleme sonucunda elde edilen pozitif vaka preparatlarında, elmas uçlu bir kalemle hibridizasyon alanı işaretlendi.
2. Preparat, şaleye konulan 2XSSC solüsyonunda 37°C’de 15 dakika bekletildi.
3. %70, %85 ve %100’lük alkol serisinde ikişer dakika tutuldu.
4. Asetonda 10 dakika bekletildi.

4.2.1.2. Prob Hazırlanması

Her bir hedef saha için mikrosantrifüj tüpüne 8µl prob kondu. İçinde prob bulunan ependorf tüpler vortekslenerek mikrosantrifüjde çöktürüldü.

4.2.1.3. Denatürasyon ve Hibridizasyon

1. Asetondan çıkarılıp havada kurutulan preparatlar, denatürasyon solüsyonunda (%70’lik formamid) 67°C’de 6 dakika denatüre edildi.

2. Denatüre edilen preparatlar hemen 3 dakika için -20°C 'deki %70'lik alkole alındı.
3. İkişer dakika için %85 ve %100'lük alkol serisinden geçirilerek kurutuldu.
4. Prob 75°C 'lik benmaride preparatlarla eş zamanlı olarak 10 dakika denatüre edildi.
5. Preparattaki hedef alana toplam $8\mu\text{l}$ denatüre prob konularak lamel kapatıldı.
6. Lamelin kenarları rubber solüsyonu ile kapatıldı.
7. Preparatlar $37-40^{\circ}\text{C}$ benmaride yaklaşık 20 saat bekletilerek prob ile hedef

DNA'nın hibridizasyonu sağlandı.

4.2.1.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkama ve Görüntüleme

Yıkama işlemiyle spesifik olarak hibridize olmayan problemlerin ortamdan uzaklaştırılması ile sinyal kalitesinin artırılması sağlandı.

1. Lamelin etrafındaki rubber solüsyonu uzaklaştırıldı.
2. Preparatlar lamellerin düşmesi için 44°C benmaride $2\times\text{SSC}$ solüsyonuna konularak 5 dakika için bekletildi.
3. 44°C benmaride, içinde %50'lik formamid bulunan üç şalenin her birinde 5 dakika tutuldu.
4. 44°C benmaride, içinde $2\times\text{SSC}$ solüsyonunu bulunan iki şalenin her birinde 5 dakika bekletildi.
5. 44°C benmaride, içinde NP-40 yıkama solüsyonu bulunan şalede 5 dakika bekletildi ve havada kurumaya bırakıldı.
6. Hedef alana $8,5\mu\text{l}$ DAPI ve $1,5\mu\text{l}$ PI karışımı eklenerek lamel ile kapatıldı.
7. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de en az 1 saat bekletildikten sonra floresans mikroskopta incelendi.

4.2.1.5. FISH Metodu Kullanılarak Delesyon ve Kazanç Tespitinde Kullanılan Kriterler:

Delesyon ve kazanç tespitinde Xinwei ve arkadaşlarının yaptıkları doku interfaz-FISH çalışması kriterleri:

1. Hücrelerin %20'sinden daha fazlasında p53 probu için 1 sinyal alındığı durumlar p53 geni için monozomik kabul edip, p53 gen kaybı olarak değerlendirmişlerdir. Kontrol grubunda, p53 geni için 1 sinyali hücrelerin %6-14 (ortalama 10.4)'de almışlardır. PA (Pleomorphic adenoma)'larda hücrelerin %17.5-55.5 (ortalama 40.5)'de, CIPA (Carcinoma in Pleomorphic adenoma)'larda hücrelerin %6.7-37.7 (ortalama 15.9)'inde p53 geni için aldıkları tek sinyali monozomik kabul edip p53 gen delesyonu olarak değerlendirmişlerdir.

2. Kontrol grubunda, p53 geni için 3 sinyal; hücrelerin %2-9 (ortalama 5.6)'da almışlardır. PA'larda hücrelerin %3.2-19.1 (ortalama 10.7)'de ve CIPA'da hücrelerin %6.7-37.7 (ortalama 15.9)'de p53 geni için alınan 3 sinyal trizomik kabul etmişlerdir.

3. Kontrol grubunda, p53 geni için 2 sinyal; hücrelerin %79.0-89.0 (ortalama 84)'da alınmıştır. PA'larda hücrelerin %32.5-77.5 (ortalama 48.8)'de ve CIPA'larda hücrelerin %26.5-53.2 (ortalama 40.4)'de alınan 2 sinyal p53 geni için dizomik kabul edilmiştir (68).

Yakut ve arkadaşları yaptıkları doku interfaz-FISH çalışmasında kullandıkları kriterler:

Hücrelerin en az %8'inde p53 probu için alınan tek sinyal, p53 geni için monozomik kabul edip, p53 gen delesyonu olarak değerlendirmişlerdir. p53 geni için hücrelerin en az %8'inde p53 probu için alınan 3 sinyal, p53 gen kopya sayısının kazancı olarak değerlendirmişlerdir (69).

Prob hazırlanması, denatürasyon, hibridizasyon, yıkama ve görüntüleme aşamalarının karanlık ortamda yapılmasına dikkat edildi. Bunun temel nedeni floresan maddelerle işaretli olan problemlerin ışık varlığında renklerinin solması ve bununda sinyal kalitesini etkilemesidir (2, 17).

FISH analizi için interfaz hücrelerinin incelenmesinde floresans mikroskop kullanıldı. Bu mikroskop uni-color FISH için özel olarak filtrelendirilmiştir.

4.2.2. Sitogenetik Yöntem

4.2.2.1. Periferik Kandan Hazırlanan Klasik Sitogenetik Metod

1. Heparinle yıkanmış steril 5ml'lik enjektörle hastalardan 3-4ml venöz kan alınarak daha önceden hazırlanmış, içerisinde 5ml besi yeri olan tüpe 8-10 damla kan ekilir. Tüp birkaç kere alt üst edildikten sonra 37°C'deki etüvde inkübe edilir.

2. Kültürün 70. saatinde 0.01µl(10µg/ml) kolşisin ilave edilerek tüp hafifçe karıştırılarak, etüvde 2 saat inkübe edilir. 72. saatte etüvden çıkarılan deney tüpleri 1250rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant pastör pipetiyle atılarak, pellet üzerinde kalan 1ml'lik sıvı pastör pipetiyle karıştırılır ve üzerine 7ml hipotonik solüsyondan (0.075M KCL) damla damla vorteks üzerinde ilave edilir ve 37°C'de 20 dakika bekletilir. Süre sonunda tekrar 1250rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant atılarak dipteki pellet üzerine 5ml fiksatif damla damla ilave edilir. Tekrar 1250rpm'de 7-10 dakika santrifüj edilir. Bu işlem(fiksasyon 3:1 oranında metanol:asetik asit karışımından oluşur) 3 kez tekrarlanır.

3. Pelletin miktarına göre bir miktar fiksatif (genellikle 0.5ml) bırakılarak süpernatant atılır. Kalan miktar hafif pipetajla karıştırılır ve süspansiyon pipete çekilir.

4. Önceden temizlenmiş ve üzerine ad, soyadı, tarih ve sıra no'ları yazılmış olan lamlar kuvvetli nefesle nemlendirilir. Hücre süspansiyonu 8-10cm yukarıdan 45°C açı ile lam üzerine damlatılarak preperat hazırlanır. Preperatlar oda sıcaklığında bir hafta yaşlanmaya bırakılır. FISH metodunda kullanılacak preperatlar ise bir gün oda sıcaklığında yaşlandırılır. Daha sonra %70, %85, %100'lük alkol serilerinden geçirilerek -20°C'ye kaldırılır.

5. En az 5gün yaşlanan preperatlardan metafazı iyi olanlar mikroskopta seçilerek GTG bantlama metodu ile boyanır.

4.2.2.2. GTG Bantlama Yöntemi

1. En az 5 gün yaşlanan preperatlardan metafazı iyi olanlar mikroskopta seçilerek bantlama için ayrıldı.

2. Tripsin oda ısısında çözülerek (1.2 gr/L) buzdolabında +4°C'de bekletildi.

3. Daha önceden pH=6.80'de söransan tamponu hazırlandı(oda ısısı).

4. Bantlama işlemi üç aşamada gerçekleştirildi.

a) Tripsin solüsyonu (+4°C).....12"

b) Söransan tamponu (oda ısısı).....1.30"

c) Gimza %5'lik solüsyonu (oda ısısı).....4'

Bantlanan preperatlar önce musluk suyundan sonra distile sudan geçirildi. Oda ısısında kurutmaya bırakıldı. Kuruyan preperatlar entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı ve incelemeye alındı.

Kromozom analizi için preperatlar, ışık mikroskobunda 1000 büyütme ile immersiyon yağı kullanılarak incelendi. Her bir vakadan en az 25 metafaz analiz edildi. Kromozomal anormallikler International System For Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 1995'e göre incelendi.

4.3. İstatistik Analizler

Veriler SPSS (Statistical Packages of Social Sciences, SPSS for Windows, Version 9.0, Inc, Chicago, IC, USA) programına kaydedilmiştir. Hata kontrolleri, tablolar ve istatistik analizler yine bu programda yapılmış ve aritmetik ortalamaları standart sapma ile gösterilmiştir. Mann-Whitney Testi hasta yaşı ve kromozomal aberasyonlar arasındaki ilişkinin ortaya konması için kullanıldı. Spearman korelasyon Testi hem hasta yaşı ve p53 gen değişimleri arasındaki ilişkinin hem de kanserin evresi ve p53 gen değişimleri arasındaki ilişkinin ortaya konması için yapıldı.



5. BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 28 kolorektal kanserli vakadan kolon-rektum dokuları elde edilebilen 14 vakanın dokularında interfaz FISH tekniği, periferik kanlarında klasik sitogenetik çalışma yapıldı. Periferik kanları elde edilen 14 vakada ise sitogenetik çalışma yapıldı. Tüm vakaların yaş ortalaması 55 (24-83) (Standart sapma 10,46) olarak belirlendi. FISH çalışması için 8 vakanın periferik kan ve doku interfaz FISH preparatları kontrol olarak kullanıldı. Vakaların 22'si kolon, 6'sı rektum kanseri idi. FISH yöntemi, dokuları elde edilebilen 14 kolorektal kanserli vakada başarı ile uygulanmıştır. Hastaların 14'ü polipoid, 7'si nonpolipoid kolon kanserli, 6'sı rektum kanserli, 1' i çekum kanserli hasta idi. Hastalardan sadece 2'sinde aile hikayesi mevcuttu.

Hastaların 19'u (%68,9) erkek, 9'u (%31,1) kadındı. Hastaların yaş ortalaması 55 idi. Aneusominin tanımlanması için hücrelerin çoğunda görülen sinyal sayısı kriter alındı.

5.1. Anomalilerin Ortaya Konması İçin FISH Kriterleri

Probun sinyal yeterliliğinin test edilmesi için 7 kan ve 7 kolorektal kanserli doku interfaz preparatında üretici firmanın prosedürüne uygun olarak standart interfaz-FISH çalışması uygulandı. Her preparatta toplam 500 hücredeki sinyaller sayıldı. Kan preparatlarında hibridizasyon yeterliliği % 95'den daha yüksekti. Normal dokulardan yapılan interfaz FISH preparatlarında prob için hibridizasyon yeterliliği %92' den daha yüksekti.

Çalışmaya alınan bazı vakalarda kullanılan prob için standart olarak uygulanan doku interfaz FISH çalışmasında, sinyal yeterliliği, diğer hastalarla karşılaştırıldığında daha düşüktü. Her vaka için 1 preparata FISH uygulandı ve her preparatta 500 hücredeki ortalama sinyal sayısı hesaplandı.

Adenokarsinomlarda hücrelerin çoğunda görülen sinyal sayısı p53 probu için temel sinyal sayısı olarak kabul edilmiştir.

Kontrol ve adenokarsinomlarda 500 hücredeki ortalama sinyal sayıları hesaplandı.

Tablo 2 ve 3' de kromozom 17p13.1 bölgesinde yer alan p53 geni için 2 sinyalin alındığı durumlar normal (dizomik) olarak değerlendirilirken, 1 ve 3 sinyalin alındığı durumlar anormal yani monozomik ve trizomik olarak değerlendirilmiştir.



Hasta No	Sinyal Sayısı					
	1	2	3	4	5	6>
1	140	350	10	0	0	0
2	269	225	4	2	0	0
3	125	370	15	0	0	0
4	360	120	16	4	0	0
5	39	420	25	14	0	2
6	66	413	26	3	0	2
7	64	432	4	0	0	0
8	11	452	23	13	1	0
9	32	426	36	6	0	0
10	28	384	69	13	6	0
11	65	282	150	5	0	0
12	31	444	20	3	0	2
13	64	420	16	0	0	0
14	22	435	33	7	1	2

Tablo 2: Kolorektal kanser dokularında p53 gen aberasyonu çalışılan her bir hasta için 500 interfaz hücresinden FISH ile alınan sinyal sayıları.

5.2. Kolorektal Kanser Dokularında İnterfaz-FISH İle Periferik Kan Sitogenetik

Sonuçların Değerlendirilmesi

Hasta No	Hücrelerin çoğunda görülen sinyal sayıları ve %'leri	Hastaların periferik kan karyotipleri
1	1(%28) 2(%70)	46,XY
2	1(%53.8) 2(%45)	46,XY
3	1(%25) 2(%74)	46,XY, del(14p ⁻)
4	1(%72.4) 2(%24)	46,XY
5	1(%7.8) 2(%84)	46,XY
6	1(%13.2) 2(%82.6)	46,XY
7	1(%12.8) 2(%86.4)	46,XX
8	1(%2.2) 2(%81.4)	46,XY
9	1(%6.4) 2(%85.2)	46,XY
10	1(%5.6) 2(%76.8) 3(%13.6)	46,XX
11	1(%13) 2(%56.4) 3(%30)	46,XX, 17qh(+)
12	1(%6.2) 2(%88.5)	46,XX
13	1(%12.8) 2(%84)	46,XY
14	1(%4.4) 2(%87)	46,XY

Tablo3: Kolorektal Kanser dokularında p53 gen bölgesi için hücrelerin çoğunda interfaz-FISH ile alınan sinyal sayısı ve periferik kan kültürü ile elde edilen hasta karyotipleri

Yakut ve arkadaşlarının yaptıkları doku interfaz-FISH çalışmasındaki kritere göre, hücrelerin çoğunda alınan 2 sinyal sayısı dizomik kabul edilip değerlendirilmedi, bu kriter temel

alınmıştır (69). Vaka 1'de hücrelerin %70'inde, vaka 3'de hücrelerin %74'ünde, vaka 5'de hücrelerin %84'ünde, vaka 6'da hücrelerin %82.6'sında, vaka 7'de hücrelerin %86.4'ünde, vaka 8'de hücrelerin %81.4'inde, vaka 9'da hücrelerin %85.2'sinde, vaka 10'da hücrelerin %76.8'inde, vaka 11'de hücrelerin %56.4'ünde , vaka 12'de hücrelerin %88.5'inde, vaka 13'de hücrelerin %84'de vaka 14'de hücrelerin %87'de alınan 2 sinyaller dizomik olarak değerlendirildi.

Vaka 1'de hücrelerin %70'inde dizomik sinyaller alınmasına karşın, hücrelerin %28'de alınan 1 sinyal, monozomik kabul edildi. Bu durum p53 gen delesyonu olarak değerlendirildi. Vaka 1'in periferik kanında yapılan klasik sitogenetik çalışmada, karyotipi; 46,XY bulunmuştur.

Vaka 2'de hücrelerin %45'inde alınan sinyaller dizomik iken, hücrelerin %53.8'inde alınan tek sinyal monozomik kabul edilip, p53 gen delesyonu olarak değerlendirildi. Vaka 2'nin periferik kanında yapılan klasik sitogenetik çalışmada, karyotipi; 46,XY bulunmuştur.

Vaka 3'de hücrelerin %74'ünde dizomik sinyaller alınırken, hücrelerin %25'inde, 1 sinyal alınması, p53 gen delesyonunun var olduğu yönünde değerlendirildi. Vaka 3'ün periferik kanında yapılan klasik sitogenetik çalışmada, karyotipi; 46,XY, del.(14p⁻) bulunmuştur.

Vaka 4'de hücrelerin %72.4'ünde 1 sinyal alınması monozomik kabul edilip, p53 gen delesyonu olarak değerlendirildi. Vaka 4'ün periferik kanında yapılan klasik sitogenetik çalışmada, karyotipi; 46,XY bulunmuştur.

Vaka 6'da hücrelerin %82.6'sında dizomik sinyal, Vaka 7'de, hücrelerin %86.4'ünde dizomik sinyal alınırken, vaka 6'da hücrelerin %13.2'sinde ve vaka 7'de hücrelerin %12.8'inde tek sinyal alınması monozomik kabul edilip, p53 gen kaybının hücrelerin bir kısmında var olduğu yönünde değerlendirildi. Vaka 6 ve 7'nin periferik kanlarında yapılan klasik sitogenetik çalışmada, vaka 6'nın karyotipi; 46,XY, vaka 7'nin karyotipi; 46,XX bulunmuştur.

Vaka 10'da hücrelerin %76.8'de dizomik sinyal alınırken, hücrelerin %13.6'sında 3 sinyal (trizomik) alındı. Trizomik sinyaller, p53 gen kazancı olarak değerlendirildi. Vaka

10'nun periferik kanında yapılan klasik sitogenetik çalışmada ise, karyotipi; 46,XX bulunmuştur.

Vaka 11'de hücrelerin %56.4'de dizomik sinyal alınırken, hücrelerin %30'unda 3 sinyal alınması, p53 gen kazancı, %13'ünde 1 sinyal alınmasını, Xinwei ve arkadaşlarının kriterine göre, p53 geninin delesyonu olarak değerlendirildi. Bu vakanın periferik kanında yapılan klasik sitogenetik çalışmada karyotipi; 46,XX,17q(h+) bulunmuştur. Vaka, grubu içinde en genci idi. Hastanın klinik olarak gastrointestinal ve ürogenital organlarına metastazı mevcuttu. Aile hikayesinde, annesi meme ve over kanseri idi.

Vaka 12'de hücrelerin %84'ünde tek sinyal alınırken, hücrelerin %12.8'de tek sinyal alınması p53 gen delesyonunun var olduğu yönünde değerlendirildi. Vaka 13'ün periferik kanında yapılan klasik sitogenetik çalışmada karyotipi; 46,XY bulunmuştur.

Periferik kanları elde edilebilen vakalarda standart sitogenetik çalışma yapılmıştır. Değerlendirilen vakaların metafazlarında sayısal ve yapısal kromozomal anomalilere 4 vaka dışında rastlanılmadı (Tablo 4).

Hasta No	Hastaların Periferik Kan Karyotipleri
15	46,XY
16	46,XY
17	46,XY
18	46,XY
19	46,XX(%85)/46,XX, t(13;17)(q;p)(%15)
20	46,XY
21	46,XY
22	46,XY
23	46,XY
24	46,XY, 13qh(+) (%85)/46,XY(%15)
25	46,XX
26	46,XX (%90)/47,XX, +21(%10)
27	46,XX
28	46,XY(%90)/45,XY,-13(%10)

Tablo 4: Periferik Kanları Elde Edilen Vakaların Klasik Sitogenetik Çalışma Sonuçları

Periferik kanları elde edilebilen vakalarda yapılan konvansiyonel sitogenetik çalışmada, vakalar; 15: 46,XY, 16: 46,XY, 18: 46,XY, 20: 46,XY, 22: 46,XY, 23: 46,XY, 25: 46,XX, 27: 46,XX karyotipleri bulunmuştur.

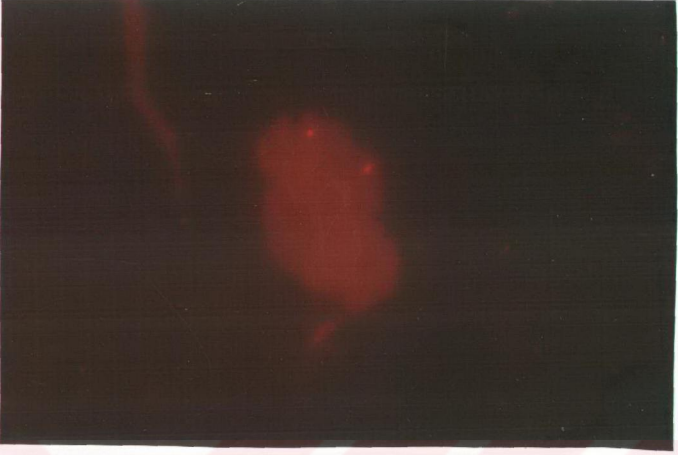
Vaka 21’de kliniği, akciğerde effüzyon ve metastatik lezyonlar, karaciğer metastazı göstermesine rağmen periferik kanda yapılan klasik sitogenetik çalışmasında karyotipi; 46,XY tespit edilmiştir. Yine aile hikayesinde annesi mide kanseri, amcası kolon kanseri olan ve hastanın kliniği Familial Polipozis Koli gösteren Vaka 17’ in periferik kanında yapılan klasik sitogenetik çalışmasında, metafazlarında sayısal ve yapısal kromozomal aberasyonlara rastlanmamıştır. Vaka 18’in karyotipi; 46;XY olarak değerlendirilmiştir.

Vaka 19’un, periferik kanında yapılan klasik sitogenetik çalışmada metafazların çoğunluğu 46,XX karyotipini gösterirken metafazların %15’i 46,XX,t.(13;17)(q;p) olarak değerlendirilmiştir. Vaka 19’ un kliniği değerlendirildiğinde, perop karaciğer metastazı ve ileosekal bölgede, porta pelviste tümör ve mide kanseri mevcuttu.

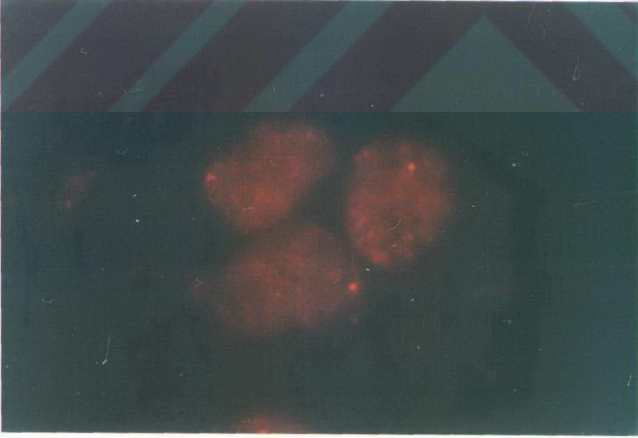
Vaka 24’ de, periferik kandan yapılan klasik sitogenetik çalışmada, değerlendirilen metafazların çoğunda (%85) 13 nolu kromozomun q kolunda artış saptanmıştır. Bu vakanın karyotipi; 46,XY,13 (qh+) olarak değerlendirilmiştir. Vaka 24’ in kliniğinde kolon ve böbreğe metastazı vardı. Hastanın aile hikayesinde kanserli birey yoktu.

Vaka 26’de, periferik kan kültür çalışmasında metafazların % 90’ nında 46,XX, %10’ nunda 47,XX,+21 tespit edilmiştir. Bu vaka kendi isteği doğrultusunda opere edilmemiştir.

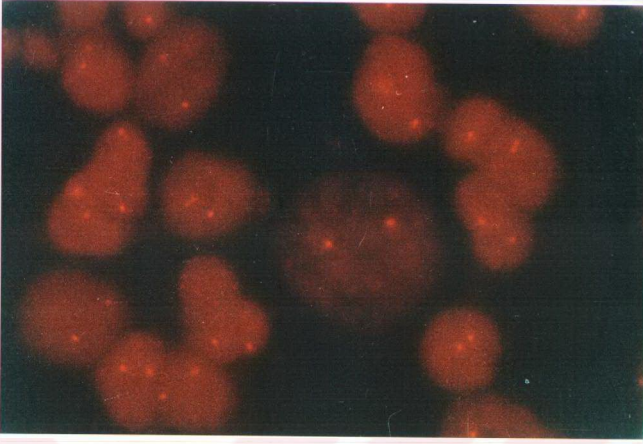
Vaka 28’da periferik kandan yapılan klasik sitogenetik çalışmasında değerlendirilen metafazların çoğunluğunda 46,XY görülürken metafazların %10’nunda 45,XY,-13 tespit edilmiştir. Bu vakanın kliniğinde böbrek metastazı mevcuttu.



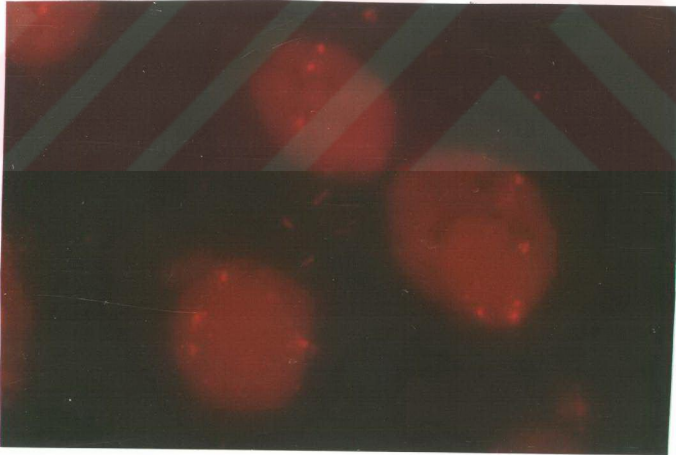
Şekil 2: Vaka 13'de kolorektal kanser dokusunda interfaz-FISH ile p53 geni için elde edilen hibridizasyon sinyalleri (X 100)



Şekil 3: Vaka 4'de kolorektal kanser dokusunda interfaz-FISH ile p53 geni için elde edilen monozomik sinyal (X 100) .



Şekil 4: Vaka 6'da kolorektal kanser dokusunda interfaz-FISH ile p53 geni için elde edilen dizomik sinyal (X 100)



Şekil 5: Vaka 11'de kolorektal kanser dokusunda interfaz-FISH ile p53 geni için elde edilen trizomik ve tetrazomik sinyal (X 100)

5.3. İstatistik

Kolorektal kanserli hastaların yaş ortalaması 55 bulunmuştur. Spearman korelasyon analizi yapılarak, hastanın yaşı ile p53 arasında ($p<0.05$) ve TNM evresi ile p53 arasında anlamlı bir ilişki ($p<0.05$) bulunmuştur.

Hastanın yaşı ile kromozomal aberasyonlar arasındaki ilişki Mann-Whitney testine göre veriler parametrik olmadığı için önemsiz bulunmuştur.

Hastanın yaşı ile p53 geni (%8 ve üzerindeki delesyonlar) arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Hastanın yaşı ile p53 geni (%20 ve üzerindeki delesyonları) arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

	1 sinyal	2 sinyal
55 yaş ve üzeri	-	7
55 yaş ve altı	1	6

Tablo 5: P53 Ve Yaş Arasındaki İlişki.

6. TARTIŞMA

P53 geninin insan kanserlerinin yaklaşık olarak %50'sinde mutasyona uğradığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda premalignant hücrelerde p53 gen mutasyonlarının çok erken dönemde meydana geldiği tespit edilmiştir. P53 gen mutasyonları, benign neoplasmin malignant transformasyonunu başlatmakta, anormal proteinlerin ekspresyonuna neden olabilmektedir. Bunun yanısıra p53 gen mutasyonları p53 gen ekspresyonunun tamamen ortadan kalkmasına neden olabilmektedir. P53 mutasyonlarına sahip kanserlerin, kötü prognoza sahip olduğu gösterilmiştir (19, 34, 37).

Kalitsal nonpolipozis kolorektal kanserli bireylerde hata onarımından (Miss Match Repair) sorumlu olan gen kayıplarının, kanserin erken evrelerinde meydana geldiği tespit edilmiştir. Ayrıca kalitsal nonpolipozisli ve kolorektal kanserli hastalarda mikrosatellit instabilitesinin benzer şekilde erken meydana geldiği tespit edilmiştir (14,30,66).

Apoptozisde görevli olan DCC geni, aday tümör baskılayıcı genlerden biridir. DCC geni apoptozisde, protein fosfotirozin bağlayıcı özelliğe sahip olan DIP13 α ile birlikte görev yapmaktadır (34,35).

Kolorektal adenoma-karsinoma sürecinde, APC gen mutasyonları tek başına kolorektal kanseri başlatamamaktadır. Genlerin epigenetik olarak eksprese olmaması durumunda da kanser meydana gelebilmektedir. Kolorektal kanser oluşumunun, hücre siklusu ve DNA tamirinde görevli olan genlerin sorumlu olduğu gösterilmiştir. Jass ve arkadaşları mikrosatellit instabilitesi gösteren kanserlerin gelişim sürecinin daha hızlı olduğunu, kalitsal nonpolipozis kolili (HNPCC) kanserlerde mikrosatellit instabilitesi ve kromozomal instabilitenin birlikte görüldüğünü tespit etmişlerdir (27).

Birkenkap ve arkadaşları, KRK'daki p53 gen mutasyonlarının aydınlatılmasında, moleküler genetik tekniklere, tedavi hedeflerine ve biyomarkırların tespitine ihtiyaç olduğunu belirtmektedirler (9). Bu çalışmada, kolorektal kanser dokularında yapılan interfaz-FISH sonuçları P53 gen delesyon varlığının ortaya konması için iki şekilde değerlendirilmiştir. İlki,

Yakut ve arkadaşlarının meningiomada p53 gen delesyonlarını tespit etmek için yaptıkları çalışma referans alınmıştır. Çalışmaya göre p53 için hücrelerin %8 ve üzerinde monozomik sinyal alınması durumu delesyon olarak değerlendirilmiştir (69). Buna göre, vaka 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11 ve 13'de p53 gen kaybının olduğu söylenebilmektedir. Ancak vaka 6, 11 ve 12'de hücre sayısının az olması, yüzey boyamasının yetersiz kalması sonucu hücre sınırlarının tam belirlenememesi, değerlendirme sırasında fluoresans mikroskopun ampülünün zayıflaması ve yapılan FISH çalışması sonucunda sinyal kalitesinin iyi olmaması nedeniyle, p53 gen delesyonlarının tespitinde Xinwei ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma kriter olarak alınmıştır. Pleomorfik adenom ve karsinomlarda yaptıkları çalışmada p53 gen kaybını tespit etmek için hücrelerin %20'sinden daha fazlasında monozomik sinyallerin görülmesi gerektiğini belirtmişlerdir (68). İstatistik veriler P53 gen kaybının %8 ve üstü veya %20 ve üstü olmasına göre çok önemli farklılıklar göstermemektedir. P53 gen delesyon kriteri olarak hücrelerin %8 ve üzerinde monozomik sinyal alındığında $p=0.001$ ve hücrelerin %20 ve üzerinde monozomik sinyal alındığında $p=0.002$ değerleri saptanmıştır. P53 gen delesyonu kesin olarak vardır diyebilmemiz için, hücrelerin %20 ve daha fazlasında monozomik sinyallerin alınması gerekmektedir. %8-%20 arasında kalan değerlere, p53 gen delesyonları açısından şüphelye yaklaşılmalıdır. Bu nedenden ve özellikle FISH metodu kullanılarak yapılacak gen delesyon analizlerinde preparasyondaki yeterliliğe bağlı olarak her iki çalışmanın sonucu delesyon kriteri olarak kullanılabilir. Gen delesyonlarının ortaya konması için moleküler genetik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal çalışmalar FISH metodunu desteklemek için kullanılabilir.

KRK'lı hastaların doku interfaz-FISH çalışmasında, vaka 11'de hücrelerin %56.4'de 2 sinyal, %30'unda 3 sinyal, %12'ünde 1 sinyal alınmıştır. Hücrelerin %30'unda alınan 3 sinyal Xinwei ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonuçlarıyla aynıdır. Ancak, Xinwei ve arkadaşları FISH sonuçlarını, immunohistokimya ve moleküler çalışmalarla desteklemişlerdir (68).

Çalışmamızda, immunohistokimya ve moleküler çalışmalar yapılmamasından dolayı FISH sonuçlarını destekleme olanağımız olmamıştır.

Yapılan istatistiki çalışmada, hastanın yaşı ve p53 gen kazancı (delesyonlar %8 ve %20 alındığında) arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0.001$). Vaka 11'deki doku interfaz-FISH çalışmasında sonuçları, hastanın klinik bulguları, aile hikayesi ve erken yaşta kanser görülmesi, p53 gen değişimlerinin, özellikle erken yaşta görülen kolorektal kanserlerde, daha yüksek oranda görüldüğünü göstermektedir. Ancak bulgu, hasta sayısının azlığından dolayı kesin yargılara varmayı engellemektedir.

Forsslund ve arkadaşları, P53 genindeki mutasyonların adenom-karsinom sürecinde belli bir evrede meydana gelmediğini ve KRK'nın ilerlemesinde p53 geninin görev yapmadığını tespit etmişlerdir (22). Kolorektal kanserli hastaların, kolorektal kanser dokularında yapılan interfaz-FISH çalışmasında, vaka 11' de klinik bulgular doğrultusunda normal olarak sinyal alınmaması ya da monozomik sinyaller alınması beklenirken, hücrelerin en az %50'sinde 2 sinyal alınmıştır. Bu vaka, sonuçları ve yukarıda belirtilen özellikleri itibarıyla oldukça tipiktir. Diğer vakaların kliniği göz önüne alındığında FISH çalışmasında p53 geni için monozomik (tek sinyal olması) ve hiçbir sinyal alınmaması beklenirken bunun aksine vakaların çoğunluğunda (2 ve 4 hariç) alınan sinyaller dizomiktir. Çalışma sonuçlarının, Forsslund ve arkadaşlarının sonuçlarıyla benzerlik göstermemesinin nedenleri; KRK'nın patogenezinin ve progresyonunun farklılık göstermesi, hasta sayısının azlığı ve çalışma grubundaki hastaların KRK'nın erken fazlarda olması olabilir.

Janssen ve arkadaşları KRK'nın %50'sinden daha fazlasında Ras geninin mutasyona uğradığını tespit etmişlerdir. Fakat Ras onkoproteinlerinin tümörün ortaya çıkmasında ve ilerlemesindeki rolü hala tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte p53 genin spontan mutasyonu çok sık görülmektedir (26).

Schelwies ve arkadaşları, kolorektal kanserde karaciğer metastazı olan hastalarda apoptozisde görevli olan p53 ve BAX genlerinin prognostik rol oynadığını tespit etmişlerdir.

Kolorektumun primer adenokarsinomlarında p53 ve BAX genlerinin düşük düzeyde eksprese olduğunu göstermişlerdir (50).

Fiorelli ve arkadaşları yaptıkları epidemiyolojik ve in vitro çalışmalarda KRK' nın progresyonunda ve patogeneğinde östrojenlerin direkt olarak rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bunu, 17 β -estradiol E(2)'nin lokal sentezi ile gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir (21). Fawole ve arkadaşları sporadik kolorektal adenokarsinomlarda kromozom 10q' da heterozigosite kaybını tespit etmişlerdir (20). Bamme ve arkadaşları KRK' da FISH çalışmasında, p53 geninin kaybı yanısıra kromozom 1, 7, 13 ve 20' nin kısmi kazançlarını tespit etmişlerdir (8). Cho ve arkadaşları kolorektal adenokarsinomlarda 17p13.1' de yer alan p53 geninin delesyona uğradığını belirtmişlerdir (15). Bu çalışmanın sonuçları,interfaz-FISH çalışmamızda yapılan, kolorektal kanserli vakalar; 1, 2, 3, 4, 6,7, 9, 11, 13'ün sonuçlarıyla tutarlıdır.

Tagawa ve arkadaşları KRK'da FISH ile multiple primer karsinomlarda sitogenetik markır olarak kromozom 17 ve p53 lokus translokasyonunu göstermişlerdir. Karsinogenezin spesifik genetik olaylarla birlikte olabileceğini ileri sürmüşlerdir (56). Kolorektal kanserli vakaların, kolorektal kanser dokularında yapılan interfaz-FISH çalışmasında, özellikle, vaka 10'da hücrelerin %13.6'da, ve vaka 11'de hücrelerin %30'da 3 sinyal alınmıştır. Vaka 10'da preperasyon sırasında yüzey boyamasının yetersiz olması ve hücre sayısının az olmasından dolayı monozomik sinyalli hücre yüzdesi düşük çıkmıştır. Gerçek bir translokasyon, yanlış pozitif sinyaller veya tümör dokusu içerisindeki yüksek proliferasyon indeksi sonucunda sinyal sayısında bir artış olabilirken, FISH yönteminden kaynaklanan hatalar sonucu hücrelerin bir kısmında 3 ve daha fazla sinyal gözlenebilmektedir. Bu nedenle, Xinwei ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma kriter olarak alındığında, P53 gen kazancını kesin söyleyebilmek için hücrelerin en az %20 ve daha fazlasında p53 için trizomik sinyallerin görülmesi gerekmektedir (68).

KRK'lı hastaların doku interfaz FISH çalışmasında, vaka 6'da hücrelerin %13.2'sinde, vaka 7'de hücrelerin %12.8'inde, vaka 11'de hücrelerin %13'ünde ve vaka 13'de hücrelerin

%12.8'inde tek sinyal alınmıştır. P53 gen delesyonu tam anlamıyla yoktur denilemeyeceği kanaatindeyiz. Hücrelerin en az %20 ve daha fazlasında delesyonun tespit edilmiş olması gerekmektedir. Yapılan istatistiki çalışmanın verileri sonucu desteklemektedir (delesyonların %20 ve yukarısı için: $p=0.024$). KRK'nın patogenezinin ve progresyonunun farklılık gösterdiği unutulmamalıdır. Yakut ve arkadaşlarının, Xinwei ve arkadaşlarının yaptıkları doku interfaz-FISH çalışma sonuçları, bu çalışmanın sonuçları ile benzerdir (69, 68).

Aragane ve arkadaşları karaciğer metastazlı KRK' da kromozomal aberasyonları Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon'la [Comparative Genomic Hybridization (CGH)] analiz etmişlerdir. 16 karaciğer metastazlı ve 30 primer KRK' lı hastada; 7p21, 7q31-36, 8q23-24, 12p, 14q24-32, 16p, 20p, 20q, 21q kazanımları olduğunu tespit etmişlerdir. Metastatik tümörlerde 18q12-23'deki kayıpların, 20q kazancıyla birlikte olduğunu bulmuşlardır. Sitogenetik olarak da 18q kaybı, 8q ve 20q kazancı göstermişlerdir (4). Yapılan sitogenetik incelemelerde benzer bulgulara rastlanmamakla beraber karaciğer metastazlı vakaların sayısının azlığı, ve CGH tekniği uygulanamadığından benzer sonuçlara rastlanılmamıştır.

P53 tümör baskılayıcı bir gen olup mutasyonları bir basamak halinde, KRK' nın kompleks gelişiminin geç safhasında meydana gelmektedir. P53 protein fonksiyonunun bozulması, agresif tümör gelişimi ve artmış neovaskülarizasyonla birlikte olabilir. Yabani tip p53' ün kaybına sebep olan genetik değişiklikler anti-angiogenetik kontrolün ve VEGF (vascular endothelial growth factor)' nin ekspresyonunun azalmasına neden olabileceği ileri sürülmüştür (29). Bu çalışmada, Kern ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara benzer anomalilerin sık görülmemesinin bir nedeninin de bu olabileceği kanaatindeyiz.

Parada ve arkadaşları primer ve metastatik kolon kansinomalarındaki sitogenetik bulguları;

a) Sayısal kromozomal anomaliler; kromozom 7, 11, 13 ve 20 kazancı, kromozom 4, 18, 21, 22 ve Y'nin kaybı,

b) Yapısal yeniden düzenlenmeler; 1p13, 1q10, 3p21, 5q21, 5q10, 5q11, 7q10, 8q10, 8q11, 12q13, 16q13, 17p11, 20p13, 20p11 ve 20q10 olarak değerlendirmişlerdir (43).

Metastazı olan vakaların periferik kanlarında yapılan sitogenetik çalışmada, vaka 16'de (46,XY), vaka 18'de (46,XY), vaka 19'da metafazların %14'inde (46,XX,t(13q;17p)), vaka 20'de (46,XY), vaka 21'de (46,XY), vaka 24' de metafazların %85' inde 46,XY,13qh(+) vaka 26'da, metafazların %10'nunda 47,XX,+21'i ve vaka 28'de metafazların %10'da 45,XY,-13 tespit edildi. Çalışılan vaka sayısının az olması ve kanser patogenezinin farklılık göstermesi, Parada ve arkadaşlarının kolorektal kanserli hastaların tümör örneklerinde yaptıkları çalışmadaki sitogenetik bulgularla farklı şekilde sonuçlar elde edilmiştir.

Wang ve arkadaşları 18 KRK' lı hastanın tümör dokularında yaptıkları sitogenetik çalışmada, kromozom 5q delesyonu ve t(13;17)(q;p) saptamışlardır (65). Wang ve arkadaşlarının çalışmasıyla paralel olarak periferik kanda klasik sitogenetik çalışılan, vaka 19' da metafazların %15' inde 46,XX, t(13;17)(q;p) gözlenirken, hastalığın ileri fazında olmasına rağmen kromozom 5q delesyonuna rastlanmamıştır. Özellikle bu vakada periferik kanda bu tip bir translokasyonun bulunması tümördeki bazı karyotipik değişikliklerin kanserli hastaların periferik kan karyotiplenmesiyle de elde edilebileceğini göstermesi açısından oldukça önemlidir.

Morinaga ve arkadaşları ve Yasuo ve arkadaşlarının KRK' lı hastalarda sentromerik problemler kullanarak yaptıkları interfaz-FISH çalışmasında kromozom 17'nin trizomisini, kromozom 11'in monozomisini tespit etmişlerdir. Kromozom 17'nin trizomisi çoğunlukla adenomlarda görülmüştür. Kromozom 17' deki trizomik değişikliklerin;

- a) Adenomaların malignan transformasyonundan,
- b) İntratumoral heterojeniteden kaynaklanabileceği vurgulanmıştır (40, 69).

KRK'lı vakaların, kolorektal kanser dokularında interfaz-FISH çalışması yapılanlardan, vaka 11'de alınan trizomik sinyaller, Wang ve arkadaşlarının KRK'lı hastalarda yaptıkları FISH çalışmasında aldıkları trizomik sinyallerle aynıdır (65).

Plaschke ve arkadaşları benign ve malign KRK' larda yaptıkları çalışmada p53 gen ekspresyon düzeyini immunohistokimyasal metotlar kullanarak değerlendirmişler ve özellikle ilerlemiş safhalarda, p53 boyanmasında artış olduğunu göstermişlerdir (45). Bu sonuç trizomik

sinyallerin alındığı vaka 11'i açıklamada yol gösterici niteliktedir. Özellikle bazı KRK' larda hastalığın ileri dönemlerinde p53 gen delesyonları değil de kromozom 17' nin tüm kazancı veya p53 gen bölgesini içeren bir kazanç gerçekleşebilmektedir. Bu kazanç, genin normalden daha yüksek düzeyde eksprese olmasına yol açabilir. Ancak genin yabancı tip ürün ortaya koyup koymadığı bilinemediğinden, p53' ün bu aşamada fonksiyonelliği hakkında birşey söylenemez. Bu çalışmada sadece, kolorektal kanser dokularından interfaz-FISH çalışılan vaka 4'de, p53 geni için tek sinyal hücrelerin (%72.4)'de alınırken, hücrelerin %24'de 2 sinyal alınması, hücrelerin büyük bir kısmında, p53 geni delesyonu meydana gelirken, hücrelerin bir kısmında da p53 fonksiyon görmektedir. Vaka 1'de hücrelerin (%28)'de, vaka 2'de hücrelerin (%53.8)'de ve vaka 3'de hücrelerin (%25)'de tek sinyal alınması, hücrelerin büyük bir kısmında p53 fonksiyon görürken, hücrelerin bir kısmında ise p53 gen delesyonu gerçekleşebilmektedir.

6.1. Öneriler

Çalışmamızda FISH metodunun solid tümörlerdeki kromozomal ve gen değişimlerinin ortaya konmasında oldukça güçlü bir yöntemdir. Ancak herhangi bir kromozomdaki sayısal ve yapısal değişimlerin tespit edilmesinde kullanılan problemler, lokusa, kromozomun p ve q kollarına ve sentromerik bölgelere spesifik seçilmesi gerektiği kanaatindeyiz. FISH metodu ile delesyon değerlendirilmesi yapılırken, mutlaka değişim indeksi göz önünde bulundurulmalıdır. Çünkü tümör dokusu içerisinde gerçekleşen hızlı proliferasyon sebebiyle, kromatidlerine ayrılan kromozomların varlığı yalancı pozitiflik görülmesine sebep olabilir. Çalışmamıza alınan adenokarsinom vakaları ve periferik kan kültür çalışmalarının karşılaştırılması, p53 gen mutasyonlarının anlaşılmasını sağlamıştır. KRK'da p53 geninin tam delesyonları veya LOH'ü oldukça nadir bulgulardır. FISH metodunun bir dezavantajı, delesyonların tespitinde oldukça spesifik bir metod olmasına karşın gendeki nokta mutasyonlarını ortaya koyamamasıdır. Bu yüzden FISH ile KRK' da p53 gen delesyonları tespit edilemeyen hastalarda moleküler genetik metotlarla p53 gen mutasyonlarının taranması gerekmektedir.

Etyopatogenetik süreci oldukça karmaşık olan kanserlerde, erken evrelerden itibaren değişimi gösterilen P53 gen fonksiyonlarının, diğer kromozomal kazanç ve kayıplarıyla birlikte değerlendirilmesi çalışmadan elde edilen verilerin bilimsel değerini artıracaktır. Çalışmamızda p53 gen değişimleri ve hasta yaşı ile kanserin evresi ve p53 geni arasında bir korelasyonun olduğu tespit edilmiştir. Ancak hasta sayısının azlığından dolayı bu bulguyu destekleyecek daha fazla hasta sayısını içeren çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bunun için P53 geni fonksiyonel değerlendirilmesinde KRK'lı hastalarda pratik ve bilgi verici bir yöntem olan interfaz-FISH çalışmalarının CGH yöntemi ile kombine edilerek, daha geniş vaka içeren gruplarda uygulanması daha güvenilir bilgiler sağlayabilir. P53 geninin KRK'da fonksiyon görmemesinin nedeni hala tam olarak aydınlatılmayı bekleyen bir araştırma sahasıdır.

7. KAYNAKLAR

- 1) Abraham SC, Wu TT, Klimstra DS, Fin LS, Lee JH et al.(2001). Distictive molecular genetic alterations in sporadic and familial adenomatous polyposis- associated pancreatoblastomas: frequent alterations in the APC/ beta-catenin pathway and chromosome 11p. *Am. J. Pathol.*, 159(5), 1619- 162.
- 2) Akiyoma Y., Arai T., Nagasaki H., Yagi O., Nakahata A., Nakajima T., Ohkura Y., Iwai T., Saitoh K., Yuasa Y. (1999). Frequent Allelic Imbalance On Chromosome 18q21 In Early Superficial Colorectal Cancers. *International Journal Of Cancer* 90:1329-1337
- 3) Angela Di Vinci et al. (1999). Intratumor heterogeneity of chromosome 1, 7, 17, and 18 Aneusomies obtained by FISH and association with flow cytometric DNA index in human colorectal adenocarcinomas. *Cytometry* 35: 369-375.
- 4) Aragane H., Sakakura C., Nakanishi M., Yasuoka R., Fujita y., Taniguchi H., Hagiwara A., Yamaguchi T., Abe T., Inazawa J., Yamagishi H. (2001). Chromosomal Aberrations In Colorectal Cancer And Liver Metastases Analyzed By Comperative Genomic Hybridisation *International Journal Of Cancer* 94:623-629
- 5) Aust D., Wilenbucher R., Terdiman J., Ferel L., Chang C., Moore D., Clark A., Baretton G., Lochrs U., Waldman F. (2000). Chromosomal alterations in Ulcerative Colitis-Related And Sporadic Colorectal cancers By Comperative Genomic Hybridisation. *Human Pathology* 31:109-14
- 6) Baharuddin P.,Sud R., Delhanty.J. (1996) Molecular and cytogenetic investigation of the DCC gene in colorectal cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 91, (2), 121.
- 7) Başaran N. (1999). *Tıbbi Genetik. Güneş & Nobel Tıp Kitapevi*, 5-384
- 8) Bamme L., Lothe R., Bandi G., Fenger C., Kronborg O., Heim S. (2001). Assesments Of Clonal Composition Of Colorectal Adenomas By FISH Analysis Of Chromosome 1, 7, 13 and 20. *International Journal Of Cancer*. 92.816-823.
- 9) Birkenkamp K., Christensen L., Olese S., Frederiksen C., Laiho P., Aaltonen L., Sorensen F., Hagemann R., Omtoft T.(2002). Gene Expression In Colorectal Cancer. *Cancer Resarch* 62:43152-4363.
- 10) BrabletzT, Jung A, Hermann K, Gunther K, Hohenberger W, Kirchner T. (1998).Nucleer overexpression of the oncoprotein β -catenin in colorectal cancer in localized predominantly at the invasion front. *Pathology Research and Practice* 194: 701-704.
- 11) Braungart E, Schumacher C, Hartmann E, Nekarda H, Becker KF, Hafler H, Atkinson MJ., Functional loss of E-cadherin and cadherin-11 alleles on chromosome 16q22 in colonic cancer. *The Journal of Pathology*, 187, (5), 530-534, 1999.
- 12) Caligo MA, Ghimenti C, Sensi E, Marchetti A, Bertacca G, Giulianotti et al. (2000). Microsatellite alterations and K-ras, TGF β RII, IGFRII and bax mutations in sporadic cancers of the gastrointestinal tract. *Oncol. Rep.* 7: 1371-1375.

- 13) Callow MG, Clairvoyant f, Zhu S, Schryver B, Whyte DB, Bischoff JR, Jallal B, Smeal T. (2002). Requirement for PAK4 in the anchorage- independent growth of human cancer cell lines. *J. Biol. Chem.*, 277, (11), 550-558.
- 14) Chen Y, Wang J, Fraig M.M, Metcalf S, William R. (20001). Defects of DNA mismatch repair in human prostate cancer. *Cancer Research*, 61:4112-4121.
- 15) Cho K., Vogelstein B. (1992). Suppressor Gene Alterations In The Colorectal Adenoma-Carcinoma Sequence. *Journal Of Cellular Biochemistry* 16:137-141.
- 16) Cooper, M.G., *The Cell*, first edition, A.S.M
- 17) Csiszar K, Fong SF, Ujjfalusi A, Krawetz SA, Salvati EP, Mackenzie JW, Boyd CD. (2002). Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1 in colorectal tumors. *Int. J. Cancer*, 97: 636-642.
- 18) Dave BJ, Hopwood VL, Hughes JI, Mellilo D, Jackson GL, Pathak S. (1993). Nonrandom chromosomal abnormalities in lymphocyte cultures of individuals with colorectal polyps and of asymptomatic relatives of patients with colorectal cancer or polyps *Cancer*, 587-591.
- 19) Davies G., Jiang W., Mason D. (2000). Cell cell adhesion molecules and signaling intermediates and their role in the invasive potential of prostate cancer cells. *The Journal of Urology*, 163:985-992.
- 20) Fawole A., Simpson D., Rajagopal R., Elder J., Holland T., Fryer A., Deakin M., Elder B., Farrel W. (2002). Loss Of Heterozygosity On Chromosome 10q is Associated With Earlier Onset Sporadic Colorectal Adenocarcinoma. *International Journal Cancer*. 99: 829-833.
- 21) Fiorelli G., Picariello., Muartineti V., Tognarini I., Tonelli F., Brandi M. (2002). Estrogen Metabolism In Human Colorectal Cancer Cells. *Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology* 81:281.
- 22) Forslund A., Kressner U., Lonnrth C., Anderson M., Lindmark G., Lundholm K. (2002). P53 mutations In Colorectal Cancers Assessed In Both Genomic DNA And cDNA As Compared To The Presence Of p53 LOH. *International Journal Of Oncology* 21:409-415.
- 23) Freitas R., Brasileiro G., Silva M., Pera S. (2002). Bracken Fern-Induced Malignant Tumors In Rats: Absence Of Mutations In p53, H-ras And K-ras And No microsatellite Instability. *Mutation Research-Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis* 499:189-196.
- 24) Hinoi T, tani M, Lucas PC, Caca K, Dunn RL, Macri E, Loda M, Appelman Hd, Cho KR, Fearon ER. (2001). Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *American Journal Pathology*.159: 2239-2248.
- 25) Irby R., Yeatmen J. (2002). Increased Src Activity Disrupts Cadherin/Catenin-Mediated Homotypic adhesion In Human Colon Carcinoma And Transformed Rodent Cells. *Cancer Research* 62:2669-2674.
- 26) Janssen, Peter K., Morjou E., Fatima, Pinto., Daniel, Sastre., Xavier., Ravilland., Danny., Fouquet., Coralie., Soussi., Thierry., Loward., Daniel., Robine., Sylvie. (2002). Targeted expression Of Oncogenic K-ras In Intestinal Epithelium Causes Spontaneous Tumorigenesis In Mice. *Gastroenterology* 123:492-504.

- 27) Jass J., Youg I., Leggett B. (2002). Evolution Of Colorectal Cancer: Change of Pace Change Of Direction. *Journal Gastroenterology Hepatology* 17:17-26.
- 28) Jibiki M., Tagawa Y., Miyashita K., Hara S., Yasutake T., Nakazaki T., Obatake M., Sawai T., Morinaga M., Akama F. (1993). Detection Of Chromosomal aberration Using Fluorescence In Situ Hybridisation In DNA Diploid Colorectal Carcinomas. *Gan To Kagaku Ryoho* 20:759-62.
- 29) Kern A., Schwartz S., Joubert H., Scheele J., Rudroff C., Mothes H., Kappler M., Bartel F., Richtiges K. (2002). Association Of p53 Mutations, Microvessel Density And Neovascularization In Pairs Of Colorectal Cancers And Corresponding Liver Metastases. *International Journal Of Oncology* 21:243-249.
- 30) Kim K., Salouara R., Mecklin J., Jarvin H., Aaltonen L., Shibata D. (2002). Poly A Deletions In Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer: Mutations Before A Gatekeeper. *American Journal Pathology* 160:1503-6 Cooper G.M.
- 31) Kitay C., Amiel A., Ashur Y., Fejgin M., Harishanu Y., Afanasyev F., Bomstein M. (1999). Hepatocellular Carcinoma. *Clinic Experiment Metastasis* 17:471-9.
- 32) Kodner J.I., Fry D. R., Flesherman W. J., Birnbaum H. E., Read E. T. (1999). *Colon, Rectum, and Anus Principles Of Surgery Seventh Edition* 26:1265-1382
- 33) Korchynskiy O., Landström M., Stoika R., Funa K., Heldin C., Dijke T., Souchelnyskiy S. (1999). Expression Of Smad Proteins In Human Colorectal Cancers. *International Journal Of Cancer* 82:197-202.
- 34) Lesli A., Carey F., Pratt N., Steele R. (2002). The Colorectal Adenoma-carcinoma Sequence *British Journal Of Surgery* 89: 845-860.
- 35) Liu J., Yao F., Wu R., Morgan M., Thorburn A., Finley R., Chen Y. (2002). Mediation Of The DCC Apoptotic Signal By DIP13 alpha. *Journal Biology Chemistry*. 277: 26281-5.
- 36) Liu L., Schwartz S., Davis B., Gerson S. (2002). Chemotherapy-Induced O(6)-Benzylguanine Resistant Alkyltransferase Mutations In Mismatch Deficient Colon Cancer. *Cancer Research*. 62:3070-6.
- 37) Liu M., Gelmann E. (2002). P53 Gene Mutations: Case Study Of A Clinical Marker For Solid Tumors. *Semin Oncology* 29:246-257.
- 38) Martin RH, Gren J, Ko E, Barclay L, Rademaker AW. (2000). Analysis of aneuploidy frequencies in sperm from patients with hereditary nonpolyposis colon cancer and on hMSH2 mutation. *Am.J. Hum. Genet.*, 66: 1149-1152.
- 39) Miyanishi K, Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Nobuoka A, Nakajima T. et al. (2001). Glutathione S-transferase-pi overexpression is closely associated with K-ras mutation during human colon carcinogenesis. *Gastroenterology*. 121:865-874.
- 40) Morinaga M., Tagawa Y., Yasutake T., Miyashita K., Sawai T., Matsumoto Y., Nanashima A., Hatano K., Uchikama T., Fujise N. (1994). Detection Of Chromosomal numerical Aberration In Early Colorectal Carcinomas Using Fluorescence In Situ Hybridisation. *Gan To Kagaku Ryoho* 1:75-81.

- 41) Moriyama H., Susamoto H., Kombara T., Matsubara N., Ikeda M., Baba S., Meltzer S., Lynch H., Shimizu K., Tonaka N. (2002). E2F-4 Mutation in Non Polyposis Colorectal Cancer. *Journal Experiment Clinical Cancer Reseach* 2:185-9.
- 42) Obara K., Yokoyama M., Asano G., Tanaka S. (2001). Evaluation Of Myc And Chromosome 8 copy number In Colorectal Cancer Using Interphase Cytogenetics. *International Journal Oncology* 18:233-9.
- 43) Parada LA, Maranon A, Hallen M, Tranberg KG, Stenram U, Bardi G, Johansson B. (1990). Cytogenetic analyses of secondary liver tumors reveal significant differences in genomic imbalances between and metastatic colon carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2: 328-38.
- 44) Pignone M., Levin B. (2002). Recent Developments In Colorectal Cancer Screening And Prevention. *American Fam Physican* 66:297-302.
- 45) Plaschke J, Kruger S, Pistorius S, Theissig F, Sager HD, Schackert HK. (2002). Involvement of hMSH6 in the development of hereditary and sporadic colorectal cancer revealed by immunostainng is based on germline mutations, but rarely on somatic inactivation. *Int. J. Cancer*. 97: 643-648.
- 46) Ravi R., Bedi A. (2002). Requirement Of BAX For TRAIL/Apo2L-Induced Apoptosis Of Colorectal cancers:Synergism With Sulindac-Mediated Inhibition Of Bcl-X(L). *Cancer Research* 62:1583-716.
- 47) Robbins, K. C. (1992) *Basic Pathology*, fifth edition, W.B. Saunders
- 48) Saha D., Roman C., Beauchamp R. (2002). New Strategies For Colorectal Cancer Prevention And Treatment. *World Journal Surgery* 26:762-6.
- 49) Sawier E., Cerar A., Hanby A., Gorman P. (2002). Molecular Characteristics Of Serrated Adenomas Of The Colorectum. *Gut* 51:200-206.
- 50) Schelwies K., Sturn I., Grabowski P., Scherubl H., Schindler I., Herman S., Stein H., Buhr H., Riecken E., Leitz M., Derken B., Daniel P. (2002). Analysis Of p53/Bax In Primary Colorectal Carcinoma: Low BAX Protein Expression Is A Negative Prognostic Factor In UICC Stage III tumors. *International Journal Cancer* 199:589-96.
- 51) Slattery ML, Anderson K, Curtin K, Ma K, Schaffer D, Edwards S, Samowitz W. (2001). Lifestyle factors and Ki-ras mutations in colon cancer tumors. *Mutat. Res.* 483: 73-81.
- 52) Strachan T., Read P.(1993). *Human Molecular Genetics*.147-478, 466-471.
- 53) Straub B., Müller M., Krause H., Schrader M., Goessl C., Heicappel R., Miller K.(2001). Detection Of Prostate Spesifik Antigen RNA Before and After Radikal Retropubic Prostatectomy And Transurethral Resection Of The Prostate Using 'Light Cycler'-Based Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction.
- 54) Su L., Kohlmann W., Ward P., Lynch P. (2002). Different Familial Adenomatous Polyposis Phenotypes Resulting From Deletions Of The Entire APC Exon 15. *Human Genetics* 111:88-95.
- 55) Suh., Jae H., Lim., So D., Kim., Jin C., Sook H., Kang., Gyeong H. (2002). Comparison Of Clinicopathologic Characteristics And Genetic Alterations Between Microsatellite Instability-Positive And Microsatellite Instability Negative Sporadic Colorectal Carcinomas In Patients Younger Than 40 Years old. *Diseas Of The Colon And Rectum* 45:219-22871.

- 56) Tagawa Y., Nanashima A., Tsuji T., Sawai T., Yamaguchi H., Yasutake T., Nakagoe T., Ayabe H. (1998). Importance Of Cytogenetic Markers For Multiple Primary Carcinomas In Colorectal Cancer: Chromosome 17 and p53 translocation. *Journal Of Gastroenterology* 33:670-677.
- 57) Takagi Y., Futamura M., Yamaguchi K., Aoki S., Takahashi T., Saji S. (2000) Alterations of the PPP2R1B gene located at 11q23 in human colorectal cancers. *Gut*. 47: 268-271.
- 58) Takahashi Y., Nagata T., Asai S., Shintaku K., Eguchi T., Ishi Y., Fuji M., Ishikawa K. (2000). Detection of aberrations of 17p and p53 gene in gastrointestinal cancers by dual (two-color) fluorescence in situ hybridization and GeneChip p53 assay. *Cancer Genet.Cytogenet.* 121: 38-43, 58.
- 59) Takayama T., Ohi M., Hayashi T., Miyanishi K., Nobuoka A et al. (2001). Analysis of K-ras, APC and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*. 121: 599-611.
- 60) Tiemersma E., Kampman E., Bas H., Bunschoten A., Van M., Kok F., Kromhout D. (2002). Meat Consumption, cigarette smoking, and genetic susceptibility In The Etiology Of Colorectal Cancer: Results From A Dutch Prospective Study. *Cancer Causes Control* 13:383-93.
- 61) Tighe A., Johnson V.L.; Albertella M.; Taylor S. S. 2001. Aneuploid colon cancer cells have a robust spindle checkpoint. *EMBO Reports*, 2: 609-614.
- 62) Tunca B., Egeli U., Zorluoğlu A., Yilmazlar T., Yerci Ö., Kızıl A. (2000). The expression frequency of common fragile sites and genetic predisposition to colon cancer. *Cancer Letters*, 152: 201-209.
- 63) Uthoff SM, Eichenberger MR, McAuliffe TL., Hamilton CJ, Galandiuk S. (2001). Wingless-type frizzled protein receptor signaling and its putative role in human colon cancer. *Molecular Carcinogenesis* 31: 56-62.
- 64) Vincent T., Hellman S., Roserburg A. (1993). *Cancer (Principles and Practice of Oncology)*. 30: 929-1005
- 65) Wang L., Li L., Zhou Y., Gao X., Li J. (1992). t(13q;17p) And del.(5q): Possibly Specific Changes In Chinese Patients With Colorectal Cancers. *Cancer Genetics And Cytogenetics* 62:191-196.
- 66) Watanabe T., Wu T., Catalona P., Ueki T., Satriana R., Haller D., Benson A., Hamilton S. (2001). Molecular Predictors Of Survival After Adjuvant Chemotherapy For Colon Cancer. *National English Journal Medical* 344:1196-206.
- 67) Wiesmüller L., Grosse F., Deppert W., Dornreiter I., Albrechtsen N., Janus F. (1999). The Dual Role Model For p53 In Maintaining Genomic Integrity. *Cell Mol. Life Sci.*, 55:12-27.
- 68) Xinwei L, Tatsuo T., Shumin W., Yuka M., Kohsuke S., Fumihiko S. (1997). Detection of Numeric Abnormalities of Chromosome 17 and p53 Deletions by Fluorescence In Situ Hybridization in Pleomorphic Adenomas and Carcinomas in Pleomorphic Adenoma. *Cancer* 79:12.
- 69) Yakut T., Bekar A., Doygun M., Acar H., Egeli U., Ogul E. (2002). Evaluation of Relationship Between Chromosome 22 and p53 Gene Alterations and the Subtype of Meningiomas by the Interphase-FISH technique. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 22:217-225.

- 70) Yan D, Wiesmann M, Rohan M, Chan V, Jefferson AB et al. (2001). Elevated expression of axin 2 and Hnkd mRNA provides evidence that Wnt/ β -catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 14973-14978.
- 71) Yasuo T., Toshihito N., Satoshi A., Kaori S., Teruo E., Yukimoto I., Masahi F., Koichi I. (2000). Detection Of Aberrations Of 17p and p53 Gene In Gastrointestinal Cancers By Dual(Two Color) Fluorescence In Situ Hybridisation And Gene Chip p53 Assay. *Cancer Genetics Cytogenetics* 121:38-43.
- 72) Zhang, X. et al. (2001). Up-regulation of the ectodermal-neural cortex 1(ENC1) gene, a downstream target of the beta catenin/ Tcell factor complex, in colorectal carcinomas. *Cancer Res.* 61: 7722-7726.
- 73) Zimbalist EH, Plumer AR(1995). Genetic and environmental factors in colorectal carcinogenesis. *Dig. Dis.* 13: 365-378.



8. ÖZGEÇMİŞ

17.09.1976 tarihinde Kayseride doğdum. İlk, orta, lise ve üniversite tahsilimi Elazığ'da tamamladım. 2000 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesinden mezun oldum. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında açılan konuk öğrenci statüsünde ders aldım. Daha sonra yüksek lisansa başladım. Aynı bölümde yüksek lisans yapmaktayım.

Şükriye Derya DEVECİ

