



**T.C.**

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**POSTOPERATİF KONKOMİTAN  
KEMORADYOTERAPİ İLE TEDAVİ EDİLEN EVRE II -  
III REKTUM KANSERLİ OLGULARDA NUCLEOLAR  
ORGANIZER REGION ( NOR ) PROTEİNLERİNİN  
PROGNOSTİK ÖNEMİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Mete GÜNDOĞ**

**KAYSERİ – 2008**



**T.C.**

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**POSTOPERATİF KONKOMİTAN  
KEMORADYOTERAPİ İLE TEDAVİ EDİLEN EVRE II -  
III REKTUM KANSERLİ OLGULARDA NUCLEOLAR  
ORGANIZER REGION ( NOR ) PROTEİNLERİNİN  
PROGNOSTİK ÖNEMİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Mete GÜNDOĞ**

**Danışman**

**Yrd. Doç. Dr. Oğuz Galip YILDIZ**

**KAYSERİ – 2008**

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	iii
KISALTMALAR .....	iv
TABLO LİSTESİ .....	vi
ŞEKİL LİSTESİ .....	vii
RESİM LİSTESİ .....	viii
ÖZET .....	ix
SUMMARY .....	xi
<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
2.1. REKTUM KANSERİ.....	3
2.1.1. Kolorektal Kanser İnsidans ve Epidemiyolojisi .....	3
2.1.2. Rektum Anatomisi.....	4
2.1.3. Kolorektal Kanser Etyolojisi .....	6
2.1.4. Kolorektal Kanserlerin Patolojik Sınıflaması.....	7
2.1.5. Kolorektal Kanserlerde Evreleme: .....	8
2.1.6. Rektum Kanserinin Tedavisi .....	10
2.1.7. Kolorektal Kanserlerde Prognostik Faktörler.....	18
2.2. HÜCRE SİKLUSU.....	19
2.2.1. NOR Bölgeleri.....	21
2.2.2. NOR'ların Gümüş Nitrat ile Boyanması .....	21
2.2.3. Kanser Hücresinde NOR Proteinleri .....	21
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>23</b>

3.1. GEREÇLER .....	23
3.2. YÖNTEM .....	25
3.2.1. Hasta Gruplarının Belirlenmesi .....	25
3.2.2. Preparat Hazırlama .....	26
3.2.3. NOR Boyama .....	26
3.2.4. NOR Alanlarının Bilgisayar Programı İle Ölçülmesi .....	27
3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM .....	32
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>33</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....</b>	<b>46</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>51</b>
KABUL ONAY SAYFASI .....	60

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada ve uzmanlık eğitimim süresince bana emeği geçen başta tez danışmanım Yrd.Doç.Dr. Oğuz Galip Yıldız'a, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Başkanı Doç.Dr. Bünyamin Kaplan'a, öğretim üyelerinden Doç.Dr. Serdar Soyuer'e, Uzm.Dr. Okan Orhan'a, Medikal Onkoloji Bilim Dalı'ndan Doç.Dr. Metin Özkan'a, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Doç.Dr. Işın Soyuer'e, tez sırasında boyama ve değerlendirme işlemlerinde yardımcı olan Tıbbi Biyoloji Uzmanı Nalan İmamoğlu Şirvanlı'ya, istatistik değerlendirmede yardımcı olan Biyoistatistik Uzmanı Ferhan Elmalı'ya ve Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda görev alan tüm mesai arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, her konuda bana yardımcı olan sevgili eşime, oyun oynama saatlerinden feragat ederek babasına bu tezi hazırlama fırsatı veren değerli oğlum Batuhan'a, bana desteklerini esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim...

## KISALTMALAR

<b>5-FU</b>	: 5- Fluorouracil
<b>°C</b>	: Santigrat Derece
<b>A.B.D</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>AJCC</b>	: American Joint Committe on Cancer
<b>AgNO3</b>	:Gümüş nitrat
<b>AgNOR</b>	: Nükleolar Gümüş Boyama
<b>AP</b>	: Anterior-Posterior
<b>APC</b>	: Adenomatöz Poliposis Cancer
<b>APR</b>	: Abdomino-Perineal Rezeksiyon
<b>AR</b>	: Anterior Rezeksiyon
<b>ark.</b>	: Arkadaşları
<b>CEA</b>	: Carsinoembriyonik Antigen
<b>CRM</b>	: Sirkumferensiyel rezeksiyon sınırı
<b>DCC</b>	: Deleted in Colorectal Cancer
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>FA</b>	: Folinik Asit
<b>FAP</b>	: Familyal Adenomatöz Poliposis
<b>Go</b>	: Dinlenme fazı
<b>GITSG</b>	: Gastrointestinal Tümör Study Group
<b>GSK</b>	: Genel Sağkalım
<b>Gy</b>	: Gray
<b>HSK</b>	: Hastalıksız Sağkalım

<b>KRT</b>	: Kemoradyoterapi
<b>KT</b>	: Kemoterapi
<b>LAR</b>	: Low Anterior Rezeksiyon
<b>LEV</b>	: Levamizol
<b>LİNAC</b>	: Lineer Hızlandırıcı
<b>LN</b>	: Lenf Nodu
<b>M</b>	: Mitoz
<b>MeCCNU</b>	: Semustin
<b>MCC</b>	: Mutated Colorektal Cancer
<b>mRNA</b>	: Mesenger Ribonükleik Asit
<b>MV</b>	: Milyon volt
<b>NCI</b>	: Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute)
<b>NIH</b>	: Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institute of Health)
<b>NOR</b>	: Nükleolus organizier region
<b>NORa/ TNa</b>	: Toplam AgNOR Alanı/ Çekirdekçik alanı
<b>PA</b>	: Posterior- Anterior
<b>PCNA</b>	: Proliferatif Cell Nükleer Antijen
<b>rDNA</b>	: ribozomal deoksiribonükleik asit
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>rRNA</b>	: ribozomal ribonükleik asit
<b>RT</b>	: Radyoterapi
<b>TAA/ÇA</b>	: Toplam AgNOR Alanı/ Çekirdekçik alanı
<b>TME</b>	: Total Mezorektal Eksizyon
<b>tRNA</b>	: Tranfer Ribonükleik Asit
<b>S</b>	: Sentez

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1.5.1:</b> TNM Evreleme Sistemi.....	9
<b>Tablo 2.1.5.2:</b> Rektum Kanserinde Evreleme.....	10
<b>Tablo 4.1:</b> Olguların Genel Özellikleri.....	34
<b>Tablo 4.2:</b> Olguların NORa/TNa değerleri ve NORa Sayı Değerleri.....	35
<b>Tablo 4.3:</b> NORa/TNa ve NORa sayı Ortalama ve Ortanca Değerleri .....	36
<b>Tablo 4.4:</b> NORa/TNa ile NORa değerlerinin Vasküler ve Perinoral İnvazyonla İlişkisi .....	36
<b>Tablo 4.5:</b> NORa/TNa ile Lenf Nodu Arasındaki İlişki .....	37
<b>Tablo 4.6:</b> NORa sayısı ile Lenf Nodu Arasındaki İlişki .....	37
<b>Tablo 4.7:</b> NORa/TNa ve NORa ile Yerel-Bölgesel Yineleme Arasındaki İlişki.....	37
<b>Tablo 4.8:</b> NORa/TNa ile HSK ve GSK ile ilişkisi.....	40



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.2.1: Rektumun Lenfatik Zinciri ve Duvar Yapısı.....	5
Şekil: 2.2.2: Rektum Anatomisi (D: derin, S: yüzeysel, Sc: subkutan) .....	6
Şekil: 2.1.6.1: Anterior Rezeksiyon.....	12
Şekil: 2.1.6.2: Low Anterior Rezeksiyon .....	12
Şekil: 2.1.6.3: Abdominoperineal Rezeksiyon (Miles Operasyonu) .....	13
Şekil: 2.6.4: Işınlanan Alanların Simulasyon Filmi; AP/PA ve Lateral Alanlar .....	17
Şekil: 2.6.5: RT Ön Alan (AR ve APR için) .....	17
Şekil: 2.6.6: RT Lateral Alan (AR ve APR için).....	18
Şekil:4.1: 5FU/FA ile UFT Alan Olgularda Hastalıksız Sağkalım Eğrisi.....	38
Şekil 4.2: 5FU/FA ve UFT Alan Olgularda Genel Sağkalım Eğrisi.....	39
Şekil 4.3: NORa/TNa ile Hastalıksız Sağkalım Arasındaki Korelasyon .....	39
Şekil 4.5: NORa/TNa Değeri ile Genel Sağkalım Arasındaki Korelasyon .....	40
Şekil 4.6: NORa sayısı ile Hastalıksız Sağkalım Arasındaki Korelasyon .....	41
Şekil 4.7: NORa sayısı ile Genel Sağkalım Arasındaki Korelasyon .....	41
Şekil 4.8: NORa/TNa Değerine Göre Gruplar Arası Hastalıksız Sağkalım Eğrisi.....	42
Şekil 4.9: NORa/TNa Değerine Göre Gruplar Arası Genel Sağkalım Eğrisi .....	43
Şekil 4.10: NORa Sayısına Göre Gruplar Arası Hastalıksız Sağkalım Eğrisi .....	44
Şekil 4.11: NORa Sayısına Göre Gruplar Arası Genel Sağkalım Eğrisi .....	45

## RESİM LİSTESİ

<b>Resim 3.2.4.1.</b> Analiz İşleminde Kullanılan Işık Mikroskobu – Video Kamera - Bilgisayar Düzenegi .....	28
<b>Resim 3.2.4.2.</b> Analiz İşleminde Kullanılan Program ve Analiz Edilecek Olan Çekirdek .....	29
<b>Resim 3.2.4.3.</b> NOR Bölgeleri Belirlenmiş Tümör Hücresi Çekirdeği .....	30
<b>Resim 3.2.4.4.</b> NOR Bölgeleri Hesaplanmış Tümör Hücresi Çekirdeği .....	30
<b>Resim 3.2.4.5.</b> Çekirdek ve NOR Bölgeleri Belirlenmiş Tümör Hücresi Çekirdeği .....	31
<b>Resim 4.1.</b> AgNOR Boyama Yapılmış Tümör Dokusu.....	33

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada; postoperatif kemoradyoterapi uygulanan evre II-III rektum kanserli hastalarda, gümüşle boyanan Nucleolar Organizer Region (AgNOR) proteinlerinin prognostik önemi araştırıldı.

**Gereç ve Yöntemler:** Mayıs 2003 - Temmuz 2006 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kemal Dedeman Onkoloji Hastanesi'nde rektum kanseri tanısı ile tümör yatağına ve pelvik lenf nodlarına 50,4 Gy (1.8Gy/gün, 28 fraksiyon) radyoterapi ve 5FU temelli kemoterapi uygulanan 30 hastanın, parafin bloklanmış doku örneklerinden alınan 3µm'lik kesitlere gümüş boyama tekniği uygulandı. Hücrelerin mikroskoptaki görüntüleri video kamera aracılığıyla bilgisayar ortamına aktarıldı. *AgNOR sayısı/Çekirdek* ve *AgNOR alanı/Çekirdek alanı* değerleri bulundu. Olgular yerel-bölgesel yineleme, hastalıksız sağkalım, genel sağkalım yönünden incelendi. İstatiksel analizler SPSS 15,0 paket programı ile yapıldı.

**Bulgular:** Düşük NORa sayılı grup (<1,55) ve yüksek NORa sayılı grup (>1,55) arasında hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (sırasıyla p=0,195 ve p=0,139). Düşük NORa/TNa'lı grup (*NORa alanı toplamı/çekirdek alanı* < 9,02) ve yüksek NORa/TNa'lı grup (*NORa alanı toplamı/çekirdek alanı* > 9,02) arasında hem hastalıksız sağkalım hem de genel sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p=0,0001) ve yüksek NORa/TNa'lı grup prognostik olarak daha olumsuz bulundu. NORa/TNa ile yerel-bölgesel yineleme arasında ilişki tespit edilirken (p=0,02), NORa/TNa ile lenf nodu metastazı (p=0,296), vasküler invazyon (p=0,863), perinoral invazyon (p=0,236) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamadı. NORa sayısı ile lenf nodu metastazı (p=0,456), vasküler invazyon (p=0,087), ve perinoral invazyon (p=0,847) arasında istatistiksel olarak anlamlı bulgu saptanmadı. Pearson Korelasyon analizinde; NORa/TNa ile genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım arasında korelasyon tespit edildi (sırasıyla p=0,019, p=0,001) ve yine NORa sayısı ile genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım arasında da korelasyon saptandı (sırasıyla p=0,035, p=0,028).

**Sonuçlar:** NORa/TNa ile yerel-bölgesel yineleme, hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım arasında anlamlı bir ilişki bulundu ve yüksek NORa/TNa'lı olgularda prognoz anlamlı şekilde kötü idi. Yine NORa sayısı ile hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım arasında anlamlı bir ilişki bulundu. Sonuç olarak kolorektal kanserlerde hem hücre proliferasyonun bir belirteci hem de prognostik faktör olarak AgNOR proteinleri, kullanışlı ve güvenilir bir parametre olabilir.

**PROGNOSTIC IMPORTANCE OF NUCLEOLAR ORGANIZER REGION ( NOR ) IN STAGE II-III RECTAL CANCER TREATED WITH POSTOPERATIVE CHEMORADIOTHERAPY**

**SUMMARY**

**Introduction:** In this study, we intended to reveal the prognostic importance of AgNOR proteins on the patients, with stage II-III rectum cancer treated with chemoradiotherapy.

**Materials and Methods:** Silver staining technic was applied to the 3µm section collected from the parafin blocked tissues on 30 patients treated with 5-FU based chemotherapy and 50,4 Gy (1,8 Gy/day, 28 fractions) external beam radiotherapy to the pelvic lymph nodes and tumor beds in rectum cancer patients treated between May 2003 – June 2006 at University of Erciyes, Kemal Dedeman Oncology Hospital. The microscopic displays of the cells were transferred in to the computer medium via video camera. *AgNOR Quantity/nucleus* and *AgNOR area/nucleus area* values were found. The facts are analysed in terms of locoregional recurrence(LRR), disease free survival (DFS) and overall survival (OS). The statistical analysis was accomplished by SPSS 15.0 package programme.

**Results:** Between with low NORa score (<1,55) and high NORa score (>1,55) patients no statistical difference was found in terms of DFS and OS (respectively p= 0,195 and p= 0,139). In terms of both DFS and OS, patients with low NORa/TNa (*AgNOR area/nucleus area* <9,02) and high NORa/TNa (*AgNOR area/nucleus area*>9,02) there were statistical difference (p=0,0001) and patients with high NORa/TNa the prognosis was worse (p<0.05). The correlation LRR and NORa/TNa is revealed (p=0,02). There wasn't any statistically significant difference between NORa/TNa and lymph node metastasis (p=0,296), vascular invasion (p= 0,863) and perineural invasion (p= 0,236). And also there wasn't any statistically significant difference between NORa score and lymph node metastasis (p=0,456), vascular

invasion ( $p=0,087$ ), perineural invasion ( $p=0,847$ ). There was statistically significant correlation between NORa/TNa and OS, and DFS (respectively  $p= 0,035$ ,  $p= 0,028$ ).

**Conclusions:** There was a statistically significant correlation between the value of NORa/TNa and OS, DFS, and LRR and patients with high NORa/TNa, prognosis was worse. And also there was a statistically significant correlation NORa quantity and DFS, and OS. Consequently, in colorectal cancers, AgNOR proteins should be a safe and usable parameter for prognosis and indicator of cell proliferation.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm kanser olgularının yaklaşık % 10 kadarını kolorektal kanserler oluşturmaktadır. Dünyada yılda yaklaşık bir milyon kişiye kolorektal kanser tanısı konulmakta ve yaklaşık 500.000 kişi kolorektal kanserden dolayı hayatını kaybetmektedir. Tümör patogenezinin daha iyi anlaşılması, tıbbi ve cerrahi ilerlemeler ve tarama yöntemlerindeki ilerlemelerle hastaların sağkalım oranları artırılsa da kolorektal kanserler; günümüzde halen önemli bir onkolojik problem olmaya devam etmektedir. Prognoz, tümör rektumun distaline doğru yerleştikçe ve tümörün evresi ilerledikçe daha kötüye gitmektedir. Evre II-III rektum kanserinde 5 yıllık sağkalım %33-70 arasında değişmektedir. Yalnız cerrahi ile tedavi edilen bu evredeki olgularda yüksek yerel-bölgesel yinleme oranları görülmektedir. Evre II-III rektum kanserlerinde yüksek lokal ve sistemik relaps nedeni ile adjuvant tedavilerin uygulanması kaçınılmazdır.

NORs (Nucleolar Organizer Regions) terimi, insanda ve diğer ökaryotlarda kromozom üzerinde “çekirdekçik oluşturan DNA bölgeleri” ni ifade eder. Bu bölgeler, ribozomal RNA sentezledikleri için ribozomal DNA (rDNA) bölgeleri olarak da bilinirler. NOR boyama, çeşitli bitki ve hayvan dokularında interfaz yada hücre döngüsünün herhangi bir evresinde nükleolus (çekirdekçik) oluşturan bölgeleri görülebilir hale getirmek için kullanılan bir boyama tekniğidir. Bu tekniğe, “Gümüş boyama (silver staining)” da denir. Arjirofilik non-histon asidik proteinlerin özel bir grubu NOR’larla aynı bölgelere yerleşim gösterirler ve böylece NOR’ların gümüş nitrat boyama prosedürü tarafından oldukça açık ve hızlı bir şekilde görünmesine izin

verirler. NOR'larda bulunan bu proteinler, gümüş boyama tekniği ile boyandığında hücre çekirdeği içerisinde siyah-kahverengi benekler halinde görülebilmektedirler. Gümüşle boyanan NOR'lar AgNORs, Arjirofilik NOR'larla birleşmiş olan proteinler de AgNOR proteinleri olarak adlandırılırlar.

İnterfazda transkripsiyonel olarak aktif olan NOR'lar, gümüş boyama ile gösterilebilmektedir. Ribozomal genlerin gümüş boyanabilirliği ile transkripsiyonel aktiviteleri arasında pozitif bir ilişki vardır. Başka bir ifadeyle, gümüş nitratla NOR bölgelerinin boyanması, çekirdekçik aktivitesi ve hücre çoğalması hakkında bilgi verir. NOR bölgelerinin sayısı ve büyüklüğü, hücre tipi ve farklılaşma derecesi ile ilgilidir ve hücre çoğalma hızını yansıtır. Tümör hücrelerinin proliferatif aktiviteleri arttığında, AgNOR sayısının da proliferatif aktiviteye ilişkin bir parametre olarak arttığı bilinmektedir. Artan AgNOR sayıları artan aktif tümör hücrelerini yansıtır. Bu özellik halen malign potansiyeli belirlemek için kullanılmaktadır. Malign hücrelerde NOR'lar, çekirdekçiklerden ayrılarak çekirdek içerisine yayılma eğilimindedirler. AgNOR ile kolorektal kanserlerin prognozu arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmalarda çelişkili sonuçlar bulunmuştur. AgNOR ile kolorektal tümörlerin değerlendirildiği çalışmalarda; AgNOR sayısı, tümörün invazyon derinliği ve karaciğer metastazı ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir. AgNOR sayısını temel alan çalışmalar; lenf nodu metastazı, yerel-bölgesel yineleme, ve diğer uzak metastazlar ile AgNOR'u ilişkilendirmede yetersiz kalmaktadır. Literatürdeki birçok çalışmada AgNOR'lar sayı olarak değerlendirilmiş fakat, bu çalışmaya karar verildiği zamana kadar *AgNOR'ların alanı/çekirdek alanı* karşılaştırılması ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmadaki amacımız, rezektable (evre II-III) rektum kanserlerinde postoperatif kemoradyoterapi uygulanan olgularda NOR proteinlerini sayı ve NOR alanı/çekirdek alanı ile değerlendirmek ve prognostik özelliklerini daha detaylı olarak ortaya çıkarmaktır.



## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. REKTUM KANSERİ**

Kolorektal kanserler hem erkeklerde hem de kadınlarda oldukça sık görülen bir kanser türü olması nedeniyle önemli onkolojik sorunlardan birisidir. Çevresel ve luminal multifaktöriyel etyolojiye sahip kolorektal tümörler, somatik ve herediter mutasyonların sebep olduğu “genetik bir hastalık” olarak tanımlanmaktadır (1). Kolorektal karsinomlar bir öncü lezyonu izlemeksizin gelişip 1 cm çapa gelmeden invaziv hale geçtiğinde “De-Novo tip” olarak adlandırılır. Hiperplazi, adenom ve karsinom gibi kademeli olarak geliştiği durumlarda ise “öncül lezyonu izleyen karsinom tipi” olarak tanımlanmaktadır.

#### **2.1.1. Kolorektal Kanser İnsidansı ve Epidemiyolojisi**

Kolorektal kanserler endüstrileşmiş toplumlarda akciğer kanserlerinden sonra ikinci sıklıkla görülür ve tüm kanserlerin %10’ini, gastrointestinal kanserlerin %75’ini oluştururlar (2). Genel olarak, kolorektal kanser oranı Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.)’nde 100.000’de 14 olarak ilk sıralarda yer almaktadır. Yeni Zelanda, Avustralya ve bir çok Avrupa ülkesinde daha sık görülürken Asya ve Güney Amerika ülkelerinde daha az sıklıkla görülmektedir (3). Kolorektal kanserlerde tanı yaşı ortalama 62 olmakla birlikte, risk yaşı 50-75 arası değişir. Yaş ilerledikçe risk oranı yükselir (4). Kolon kanserinde genelde cins ve ırk faktörü dikkati çekmezken, rektum kanserinde beyaz ırkın baskın olduğu gözlenir (5). Ülkemizde kesin veriler olmamasına karşın, eldeki verilerle kolorektal karsinomaların tüm malign tümörler arasında kadınlarda 3., erkeklerde 8. sırayı aldığı belirlenmiştir (6,7).

### 2.1.2. Rektum Anatomisi

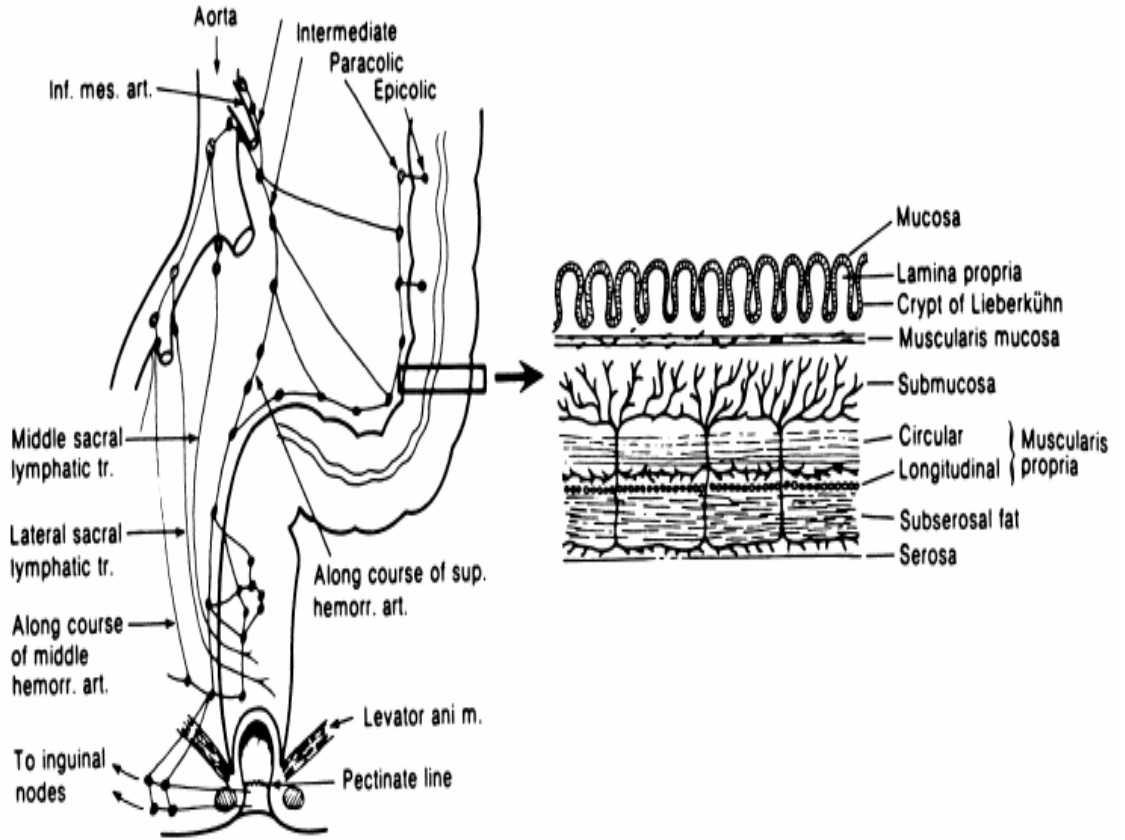
Rektum 12- 15 cm, uzunluğunda sigmoid kolon ile anal kanal üst sınırı arasında yer alan, gastrointestinal sistemin son parçasıdır. Anatomik olarak alt, orta ve üst segment olarak üç kısma ayrılır. Dentate çizgiden itibaren 5 cm'lik bölüm alt segmenti, 5 – 10 cm'lik bölüm orta segmenti ve 10 -15 cm'lik kısım da üst segmenti oluşturur (Şekil 2.2.2).

Rektum frontal ve sagittal planda eğrilikler gösterir. Başlangıcından itibaren aşağı inerken, sakrum ve koksiksin eğriliğini izleyerek fleksura sakralis adı verilen eğriliği yapar. Diafragma pelvisden geçerek *canalis analis* ile öne doğru devam eder. Anorektal bileşkede barsağın öne dışbükey olan eğriliğine *fleksura perinealis* denir. Anal kanal alt ucunu rektal muskuler tabaka üzerinde levatör ani kasının insersiyonu oluşturmaktadır (8).

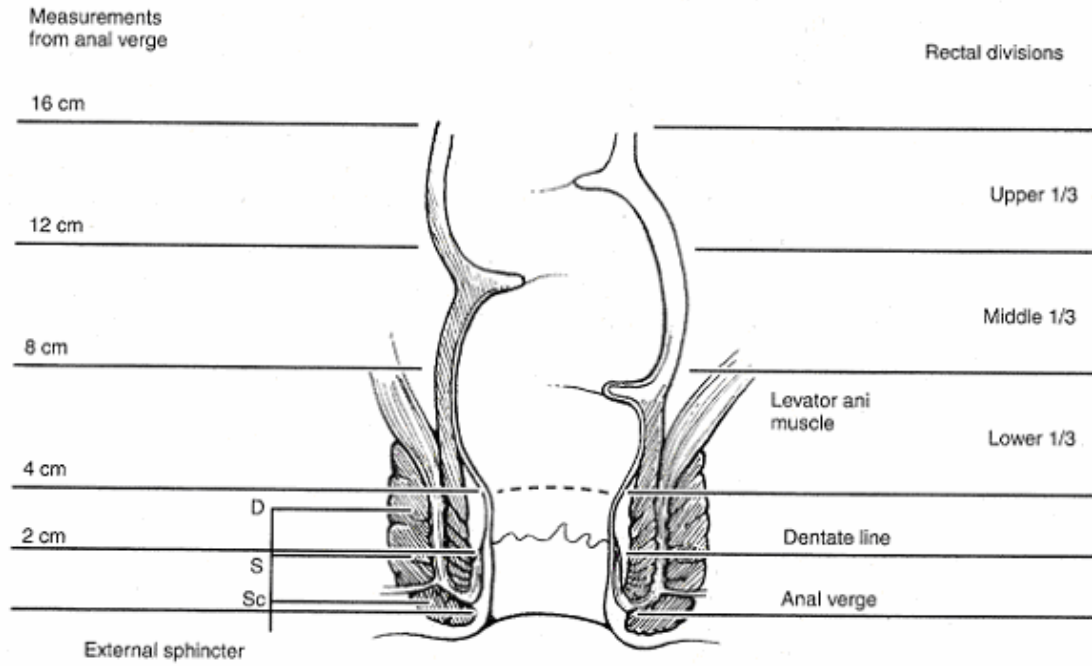
Rektumun komşulukları:

Rektum arkada 3., 4. ve 5. sakral vertebra ve koksiks, superior rektal arter ve ven, piriform kas, sakral pleksus, sempatik trunk, koksigeal kas ve levatör ani ile komşuluk gösterir. Öndeki komşulukları erkek ve kadında farklıdır. Erkeklerde rektum mesanenin fundusu ve vezikula seminalisin üst bölümünden *excavatio rectovesicalis* ile ayrılır. Bu periton kıvrımının altında ise mesane ve vesicula seminalisin alt bölümleri, ductus deferensler, ureterlerin terminal parçaları ve prostat ile komşudur. Kadında periton kıvrımının üstünde uterus, vaginanın üst parçası, *excavatio rectouterina* ve içerisinde ileumun kıvrımları rektumun önünde yer alır. Periton kıvrımının altında ise rektum, önde vaginanın alt bölümü ve serviks ile komşuluk yapar. Ekstraperitoneal rektumun önünde *Denonvilliers fasyası* yer alır ki bu erkeklerde rektovezikal septum, kadınlarda rektovaginal septumdur. Rektum, mezorektum adı verilen yağ dokusu ile çevrilidir. Mezorektum lenf nodları, damarlar ve birkaç fibröz septa içerir ki, bu alan cerrahi bir yöntem olarak kullanılan total mezorektal eksizyon (TME) için sirkumferensiyel rezeksiyon sınırını (*circumferential resection margin: CRM*) oluşturmaktadır. Rektum duvar katmanlarını içten dışa mukoza, submukoza, muskularis propria ve perirektal yağ doku oluşturmaktadır (Şekil 2.2.1).

Üst rektumun lenfatik yolları; süperior rektal damarları takip ederek inferior mezenterik lenf nodlarına, orta ve alt rektumun lenfatik yolları orta rektal damarlar boyunca devam eder ve internal iliak lenf nodlarına dökülür. Rektumun alt kısmı ve anal kanal üst kısmı, inferior rektal ve internal pudental kan damarlarına eşlik eder ve sonunda internal iliak lenf nodlarına drene olurlar. Alt rektum kanserleri ve anal kanala uzanım gösteren tümörler yüzüyel inguinal lenf nodlarına metastaz yapabilirler (9).



Şekil 2.2.1: Rektumun Lenfatik Zinciri ve Duvar Yapısı



**Şekil: 2.2.2:** Rektum Anatomisi (D: derin, S: yüzeyel, Sc: subkutan)

### 2.1.3. Kolorektal Kanserlerin Etiyolojisi

Kolorektal kanser patogeneğinde kırmızı et ve yağ oranından zengin yüksek kalorili beslenmenin, antioksidan, antimutajen, antineoplastik vitamin ve eser elementlerden yoksun, lifsel komponenti olmayan beslenme alışkanlığının önemli rolü vardır. Endojen ve eksojen karsinojenik etkenler, hatalı beslenmeye bağlı koruyucu maddelerin eksikliği, mukoza epitel hücrelerinin rejenerasyon direncinin ve mukus kalitesinin kaybına yol açmaktadır. Tüm bu faktörler barsak epiteli ile direkt temasta olan intraluminal mikrofloranın ve içeriğinin değişmesine, epitel hücre membranlarında yağ asit oranlarının yükselmesine ve lipid peroksidasyon radikallerinin artmasına neden olurlar (10,11).

Diyetteki yağ oranı ile kolorektal kanser riski arasındaki ilişkiyi inceleyen bir epidemiyolojik araştırmada, Anglosakson ülkeleri ile Japonya diyetindeki yağ oranı ve distal kolon kanseri insidansı yönünden araştırılmıştır. Distal kolon kanseri insidansının yüksek olduğu Anglosakson ülkelerinde günlük kalorinin % 40-45'i doymuş ve doymamış yağlardan sağlanmaktadır. Distal kolon kanser insidansının düşük olduğu Japonya'da ise bu oran % 10- 15 olup çoğunluğu doymamış yağlardan esas olarak da balık yağından sağlanmaktadır (12).

Famlyal polipozis veya ailesel adenomu olanlarda kolorektal karsinom daha fazla görülmektedir. Kolorektal karsinomların % 10 -15'i ailesel eğilimi olan kişilerde görülür. Moleküler genetik çalışmalar, adenomanın karsinomaya dönüşümünde erken dönemde ras gen mutasyonu ve 5q kromozomunda allelik delesyonu olduğunu göstermiştir. İlerlemiş tümörlerde ise 17q ve 18q kromozomlarında tümör supresör genlerin kaybı gösterilmiştir (13). Protoonkogen ras mutasyonunun kolon karsinomalarının % 40-50'sinde olduğu bildirilmektedir (14). Ras geni 12. kromozomun üzerinde yer alır ve 21 kd'luk bir protein kodlar. Bu protein hücre membranından sitoplazmaya doğru sinyal üretiminde önemli bir rol oynar (15).

Kolon kanserinde ras geninden başka diğer onkogenlerdeki mutasyon oranları myc geninde % 2, erb-b2 geninde % 4, myb geninde % 9 ve src geninde % 6'dır (16).

Famlyal Adenomatöz Polipozis (FAP) sendromundan sorumlu *Adenomatöz Polipozis Cancer* (APC) geni bir tümör supresör genidir. Bir diğer süpresör gen de *Mutated Colorectal Cancer* (MCC) genidir. MCC geni APC geni gibi 5. kromozomun üzerinde yer alır. Kolon kanserinde MCC gen mutasyonu %15 civarındadır (15).

Diğer bir tümör supresör gen p53 genidir. 17. kromozomun kısa kolu üzerinde yer alır. p53 genindeki mutasyon ve delesyonlar kolorektal karsinomlar dışında bir çok kanserde tespit edilmiştir. Kolorektal karsinomlarda da p53 mutasyonu sık görülmektedir. Moleküler biyolojik olarak incelenen kolon kanserlerinin %75'inde bir p53 allel kaybı tespit edilmiştir (15, 17).

#### **2.1.4. Kolorektal Kanserlerin Patolojik Sınıflaması**

-Adenokarsinom

- İyi diferansiye
- Orta diferansiye
- Kötü diferansiye

-Mucinz adenokarsinom

-Taşlı yüzük hücreli karsinom (Linitis Plastika)

- Skirz tip

- Lenfangiozis tip
- Skvamöz diferansiasyon gösteren tip
- Adenoskuamöz
  - Pür skuamöz
- Saydam hücre komponentli karsinom
- Bazaloid karsinom
- Koriokarsinamatöz diferansiasyon gösteren adenokarsinom
- Nöroendokrin diferansiasyon gösteren karsinom
- Nöroendokrin tümörler
- İyi diferansiye (Karsinoid Tümör)
  - Nöroendokrin karsinom
  - Küçük hücreli karsinom

#### **2.1.5. Kolorektal Kanselerde Evreleme**

Tümör invazyonunun prognostik önemi ilk kez 1930'da Chutbert Esquire Dukes tarafından ifade edilmiş olup, 1932'de yeniden gözden geçirilmiştir (18). Dukes rektal tümörlerin invazyon derinliğini A'dan C'ye sınıflandırmıştır. Buna göre Evre A'da karsinom rektum duvarında sınırlıdır. Evre B'de ekstrarektal dokulara uzanım vardır fakat lenf nodu metastazı (LN) yoktur. Evre C'de lenf nodu metastazı vardır. Dukes 1944'de bu klasifikasyonu modifiye etmiştir. Lenfatik invazyonun olduğu inferior mezenterik arterin bağlandığı düzeyde lenf nodu metastazı olmayan olguları C1, arter kökünde metastaz olan olguları C2 olarak adlandırmıştır. Klinikopatolojik modifiye Dukes sınıflamasına ilave edilen D kategorisi ise, omental implantasyon, peritoneal yayılım ve potansiyel cerrahi kürü engelleyecek alanlara yayılmış tümörü temsil etmektedir. Daha sonraları Dukes sınıflaması geliştirilerek tüm kolonu, dissemine metastazı, diferansiasyon, tümör morfolojisini ve histopatolojisini içeren subgruplara bölünmüştür (19-21).

Astler ve Coller 1954 yılında barsak duvarında tümör derinliğinin önemine dayanarak B ve C'yi iki alt gruba ayırarak Modifiye Astler Coller (MAC)

sınıflamasını oluşturmuşlardır. B1 ve C1’de kanser barsak duvarına sınırlı iken, B2 ve C2’de kanser barsak duvarını aşmıştır. Bu sistemde uzak metastaz bildirilmediğinden Turn-bull ve ark. karaciğer, akciğer vb. gibi organlarda metastaz olan hastaları D evresi olarak bildirmişlerdir.

Son olarak American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından TNM evrelemesi değerlendirilmiştir. 2002 yılında bu sınıflama tekrar revize edilerek son halini almıştır (22). (Tablo 2.1.5.1)

**Tablo 2.1.5.1: TNM Evreleme Sistemi**

Primer Tümör (T);

Tx : Primer tümör belirlenememiş

T0 : Primer tümöre dair delil yok

Tis : Karsinoma in situ

T1 : Tümör submukozaya invaze

T2 : Tümör muscularis propriaya invaze

T3 :Tümör muscularis propriadan subserozaya doğru veya non- peritonealize perikolik veya perirektal dokulara invaze

T4 : Tümör diğer organ ve yapılara direkt invaze olmuş ve/veya visseral peritonu perforasyon etmiş

Regional Lenf Nodları (N);

Nx : Regional lenf nodları belirlenemiyor

N0 : Regional lenf nodları yok

N1 : 1-3 Perikolik veya perirektal lenf nodu metastazı

N2 : 4’ten fazla perikolik veya perirektal lenf nodu metastazı

Uzak metastaz (M);

Mx : uzak metastaz varlığı bilinmiyor

M0 : uzak metastaz yok

M1 : uzak metastaz var

**Tablo 2.1.5.2:** Rektum Kanserinde Evreleme

	<b>TNM(AJCC 2002)</b>	<b>MAC</b>	<b>DUKES</b>
<b>EVRE 0</b>	Tis	-	-
<b>EVRE I</b>	T1NOMO	A	A
	T2NOMO	B1	A
<b>EVRE IIA</b>	T3NOMO	B2	B
<b>EVRE IIB</b>	T4NOMO	B3	B
<b>EVRE IIIA</b>	T1-T2N1M0	C1	C
<b>EVRE IIIB</b>	T3-T4N1M0	C2,C3	C
<b>EVRE IIIC</b>	herhangi TN2M0	C1,C2,C3	C
<b>EVRE IV</b>	herhangi T herhangiNM1	D	-

### 2.1.6. Rektum Kanserinin Tedavisi

Rektum kanserleri hala önemli bir onkolojik problem olmaya devam etmektedir. Erken rektum kanserlerinin prognozu çok iyi olmakla beraber, tümör rektumun distaline uzandıkça ve evresi ilerledikçe prognozu daha kötüye gitmektedir. Kolon kanserinden farklı olarak, rektum tümörlerinde lokal ve bölgesel yinelenmeler önemli bir sorundur. Serozal bariyerin olmaması lokal invazyona katkıda bulunmaktadır. Yine proksimal ve distal cerrahi sınırlar uygun olsa bile, anatomik kısıtlamalar nedeniyle geniş tümörsüz lateral (radyal, sirkumferansiyel) sınırların bırakılmaması ileri sürülmektedir (23-25).

Cerrahi ana tedavi modalitesi olmakla birlikte evre II – III rektal kanserli olguların yüksek lokal ve sistemik relaps potansiyeline sahip olmaları nedeni ile kaçınılmaz olarak adjuvan tedaviye gereksinim duyulmaktadır. T3 ve daha ileri rektal kanserlerde kombine tedavi modalitelerinin uygulanması standart tedavi haline gelmiştir (26).

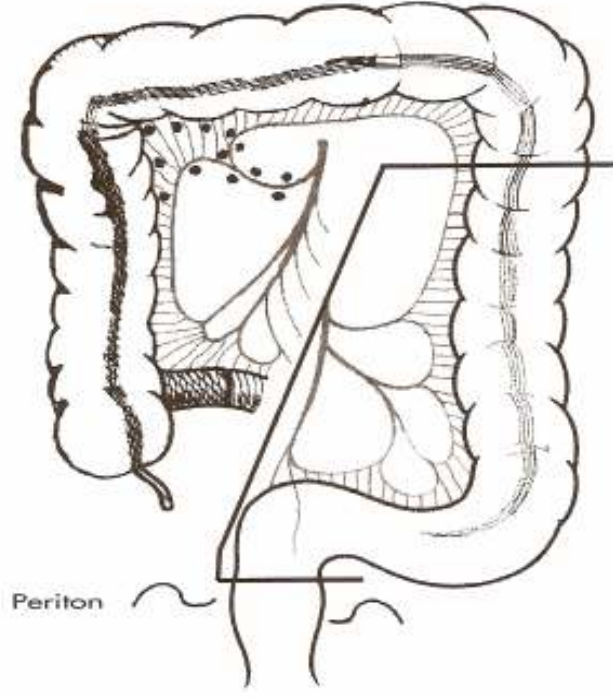


### **Rektal kanserlerde cerrahi tedavi:**

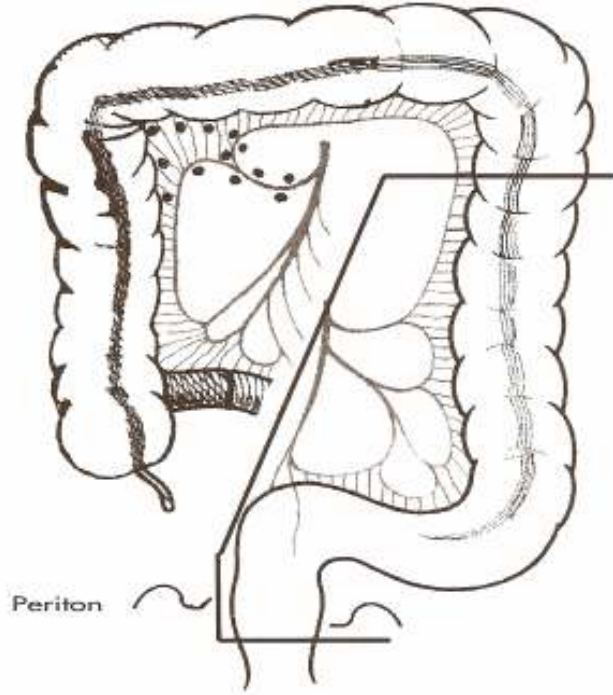
1739'da Faget rektum kanserini perine yolu ile çıkarmaya çalışmıştır (Lockhart-Mummery ameliyatı ve posterior eksizyon). 1833'de Reybard ilk sigmoid rezeksiyonu yapmıştır. 1839'da kolostomi palyatif işlem olarak uygulanmıştır. 1875'de Kocher rektum kanserini sakral yoldan (Kraske ameliyatı tekniği) çıkarmıştır. 1883'de Czerny abdominal ve perineal yoldan rektum amputasyonunu gerçekleştirmiştir (Miles ameliyatı). 1895'de Paul ve 1903'de Mikulicz; eksteriorizasyon, proksimal kolostomi ve birkaç gün sonra kapatılması biçiminde Paul-Mikulicz yöntemini gerçekleştirmişlerdir. 1931'de Devine transvers kolostomi ve 2- 3 hafta sonra da sol kolon veya proksimal rektumun intraperitoneal rezeksiyonu yöntemini uygulamıştır (modern anterior rezeksiyon-Mayo Kliniği ameliyatı, Dixon ameliyatı). 1953'de Lloyd – Davies ve arkadaşları hiçbir proksimal kolostomi olmaksızın; rezeksiyon ve hemen anastomoz yaptıkları hastalarını sunmuşlardır (27-30).

Genel olarak rektum kanserinde;

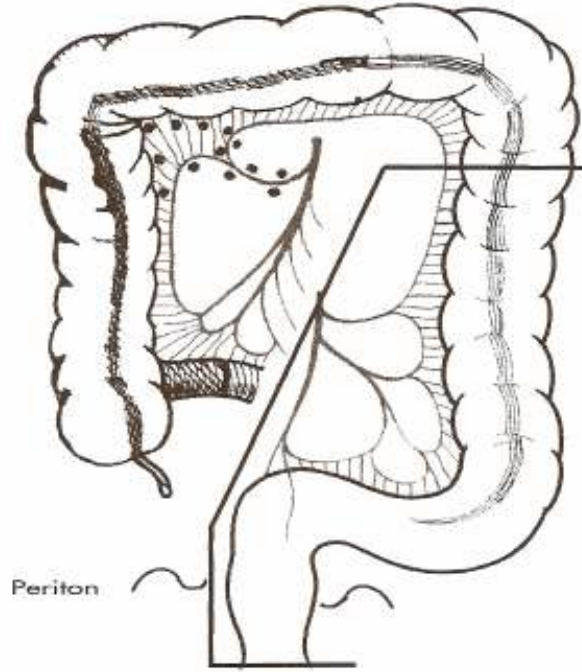
- Sfinkter koruyucu yöntemler
  1. Anterior Rezeksiyon (Mayo ameliyatı – Dixon Ameliyatı) (Şekil : 2.1.6.1)
  2. Low Anterior Rezeksiyon (Şekil : 2.1.6.2)
  3. Abdominosakral Rezeksiyon
  4. Pull-through Rezeksiyonu
- Sfinkteri ortadan kaldıran yöntem
  1. Miles ameliyatı (abdomino-perineal rezeksiyon) (Şekil : 2.1.6.3)



Şekil: 2.1.6.1: Anterior Rezeksiyon



Şekil: 2.1.6.2: Low Anterior Rezeksiyon



**Şekil: 2.1.6.3:** Abdominoperineal Rezeksiyon (Miles Operasyonu)

#### **Rektal Kanselerde Kemoterapi:**

Kolorektal kanserde en etkili tek ajan 1957 yılında Wisconsin Üniversitesi'nde Heidelberg ve ark. tarafından sentezlenmiş bir pirimidin analogu olan 5-Fluorouracil (5-FU) ve onun deoksiribozidi olan floxuridine (FUdR)'dir (31). 5-FU biyomodülasyonunda en başarılı uygulama folinik asit (FA) ile yapılanıdır. Redükte folatlar hücre içerisinde timidilat sentetaz enzimi ile stabil bir kompleks oluşturarak 5-FU sitotoksitesini artırır (31). Rektum kanserinin adjuvan tedavisinde, 5-FU'ün aynı zamanda radyoduyarlaştırıcı olduğunun gösterilmesi kemoterapi (KT) ve radyoterapi (RT)'nin birlikte yapılması yönünde büyük bir avantaj sağlamıştır (32,33). Evre II-III rektal kanserli olgularda postoperatif RT ile eşzamanlı 5-FU temelli kemoradyoterapi (KRT)'nin etkinliğini gösteren iki majör prospektif, randomize klinik çalışma mevcuttur. 1975 yılında başlayan GITSG-7175 (Gastrointestinal Tumor Study Group) çalışmasında 202 hasta; sadece cerrahi (kontrol), radyoterapi, kemoterapi (5FU/MeCCNU[Semustine]), kemoterapi (5FU/MeCCNU) + radyoterapi (radyoterapinin ilk 3 ve son 3'gününde 5-FU 500/mg/m<sup>2</sup>) kollarına ayrılmıştır. Medyan 80 ay sonunda, kontrol grubunda %55 oranında yerel-bölgesel yineleme görülürken kombine kemoradyoterapi kolunda

%33 (en düşük) bulunmuştur ( $p<0.009$ ) (34). Yedi yıllık izlem sonunda yine kemoradyoterapi kolunda genel sağkalım avantajı gözlenmiştir (35). 1979 yılında NCCTG (North Central Cancer Treatment Group) ve Mayo kliniği 79-47-51 çalışmasında 204 olgu RT ve RT+KT grubuna ayrılmıştır. Yedi yıllık izlem sonunda kombine tedavinin hem hastaliksız sağkalım hem de genel sağkalım yönünden daha üstün olduğu gösterilmiştir (36,37). Daha sonra yapılan GITSG ve Intergroup çalışmalarında MeCCNU'nun etkisi araştırılmış ve bu ilacın kombine model tedavinin bir parçası olmadığı ve uzun infüzyon 5-FU'in bolus tedaviye üstün olduğu sonucuna varılmıştır (38-40). 1984 yılında ABD'de 5-FU- LEV(Levamizol)'ü test etmek için INT-0035 çalışması başlatılmış ve Eylül 1989'da 3 yıllık sonuçları elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre 5-FU-LEV ile yerel-bölgesel yinelemelerde %41 azalma ( $p<0,0001$ ) mortalitede % 34 azalma ( $p=0,006$ ) bildirilmiştir (41). Bu ilk 3 yıllık sonuçlara dayanarak ABD Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) Ekim 1989'da Duke's C olgular için 5-FU+LEV kemoterapisini standart tedavi olarak kabul ettiklerini bildiren bir bildiri yayınlamışlardır. Diğer yandan 5-FU + FA kombinasyonu 5-FU+LEV ve 5-FU+LEV+FA kombinasyonlarıyla karşılaştırılmıştır. Bunlardan NSABP C-04 (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) çalışmasında 6 kür 5-FU + yüksek doz FA, 1 yıl 5-FU+LEV ve levamizolün 1 yıl 5-FU+yüksek doz FA'nın 6 kür verildiği üç kol karşılaştırılmış ve hem hastaliksız sağkalım (HSK), hem de genel sağkalım (GSK) açısından bir fark bulunamamıştır (42). INT-0089 çalışmasında bu üç kola düşük doz folinik asit eklenerek 4 kol karşılaştırılmıştır. Dört kol arasında anlamlı bir sağkalım farkı gösterilememiştir. 6 kür 5-FU + düşük doz FA kombinasyonu gerek 5-FU+LEV ve gerekse de 5-FU + yüksek doz FA rejimine eşdeğer bulunmuştur. 5-FU+FA rejimine levamizol eklenmesinin bir yararı gösterilememiştir (43). Bu bulgular ışığında 5-FU+ düşük doz FA standart tedavi olarak yerini almıştır. 2004 yılında yayınlanan MOSAIC (The Multicenter International Study for Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer) çalışmasının 3 yıllık sonuçlarında; lenf nodu pozitif kolon kanserli olgularda 5-FU+FA rejimine oxaliplatinin eklenmesi hastaliksız sağkalımda avantaj sağladığı için, rektal kanserli olgularda da oxaliplatin adjuvan tedavide kullanılmaya başlanmıştır (44).

ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) 1990 konsensüs toplantısında, rektum kanserinde kolondan farklı olarak hem evre II, hem de evre III olgularda adjuvan tedavi önerilmiştir ve tercih edilen kombine tedavi programı KT+RT+KT'dir (26).

### **Rektal Kanserlerde Radyoterapi:**

Multidisipliner yaklaşım içinde RT genellikle adjuvan tedavi olarak KT ile birlikte veya KT olmaksızın, preoperatif veya postoperatif olarak yerini almaktadır. Adjuvan tedavide RT'nin kullanılmasıyla yerel-bölgesel yinleme oranlarında azalma sağlanmıştır, genel sağkalım üzerine olan etkisi ise halen tartışmalıdır.

- **Preoperatif Radyoterapi:**

Preoperatif radyoterapinin avantajları; cerrahi sırasında oluşacak tümör hücre ekilmesinin önlenmesi, oksijenlenmenin iyi olması nedeniyle radyoduyarlılığın artması, tümör hacminin küçültülmesi ile rezektabilitenin artması, ince barsak komplikasyonlarının azalması, APR operasyonu yerine sfinkter koruyucu bir cerrahi girişime olanak sağlaması olarak özetlenebilir.

Literatürde preoperatif RT ile ilgili 12 randomize çalışma vardır. Bu çalışmaların hepsinde RT tek başına kullanılmıştır. 7 çalışmada lokal kontrol açısından istatistiksel anlamlı fark bulunurken, hem İsveç çalışmasında (n:1110) hem de Stockholm II (n:557) çalışmasında her iki gruba preop 5×500 cGy uygulanmış ve sadece cerrahi uygulanan grup ile karşılaştırılmıştır. 2 çalışmada da genel sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (45,56).

RT ve KT kombinasyonlarında elde edilen başarılı sonuçlar, preoperatif dönemde de kemoradyoterapinin kullanılabilirliğini gündeme getirmiştir. Yapılan çalışmaların sonucunda preoperatif KRT'nin sadece preoperatif RT'ye üstün olduğu gösterilmiştir. Yanıt oranı RT kolunda %6-%11 iken, KRT kolunda %20-%29 oranındadır (57-61).

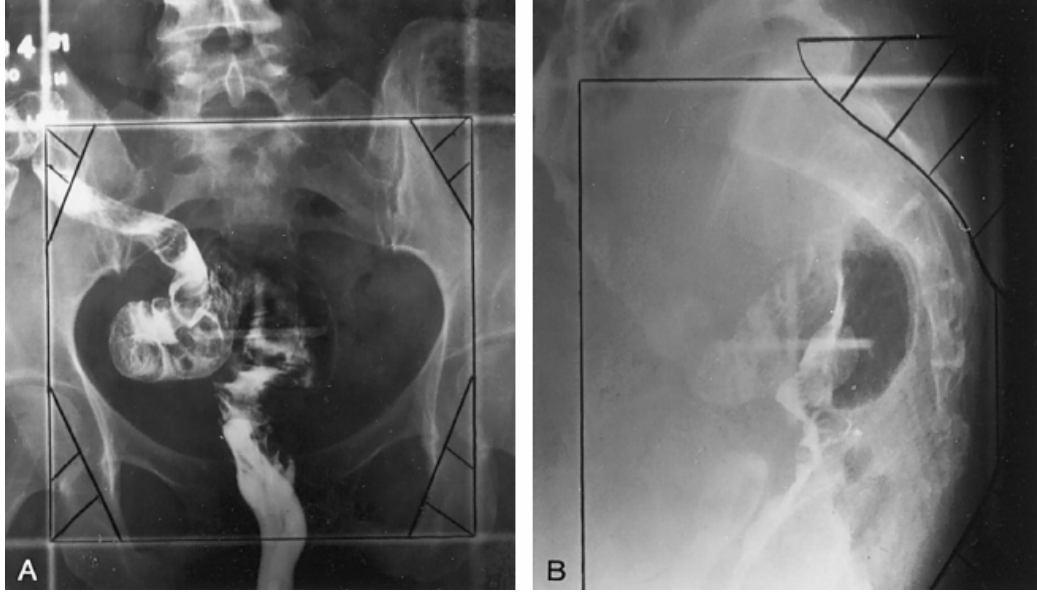
- **Postoperatif Radyoterapi**

Postoperatif radyoterapinin avantajları; patolojik evrenin bilinmesi, cerrahi sırasında tümör yatağına klipsler konularak boost tedavisinin sınırlı alana verilmesi şeklinde özetlenebilir.

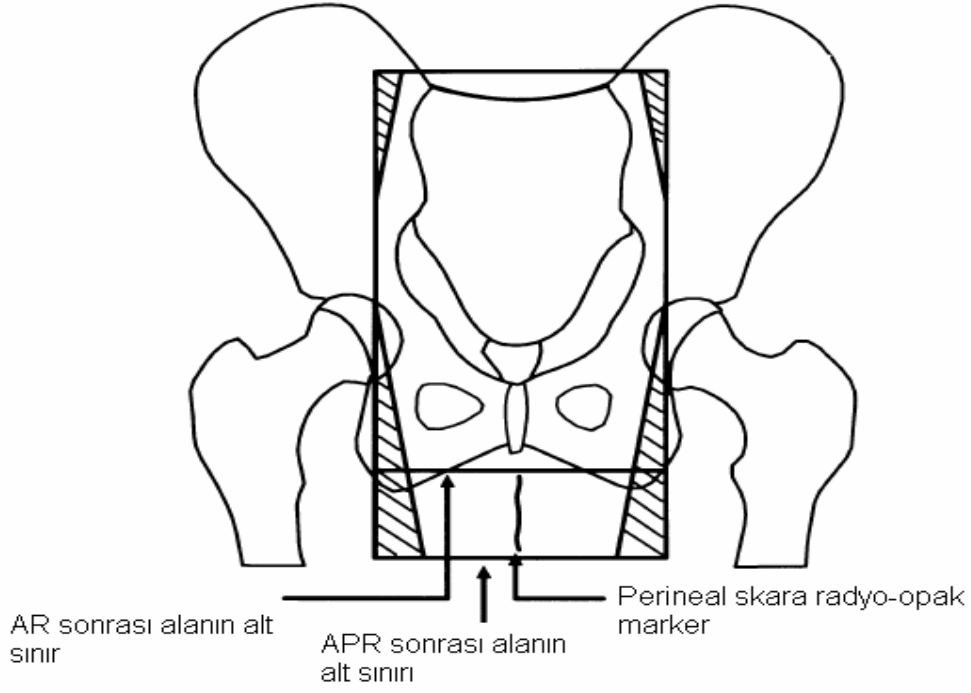
Rektum kanserinin klinik davranışı göz önünde bulundurularak lokal kontrol yanında sistemik hastalığın da kontrol altında tutulması görüşü ağırlık kazanmıştır. Özellikle A.B.D.'de yapılan randomize çalışmalarda adjuvan kemoradyoterapi protokollerinin diğer kollara daha üstün olduğu bildirilmiştir (32,33,36,37).

#### Radyoterapi Tekniği:

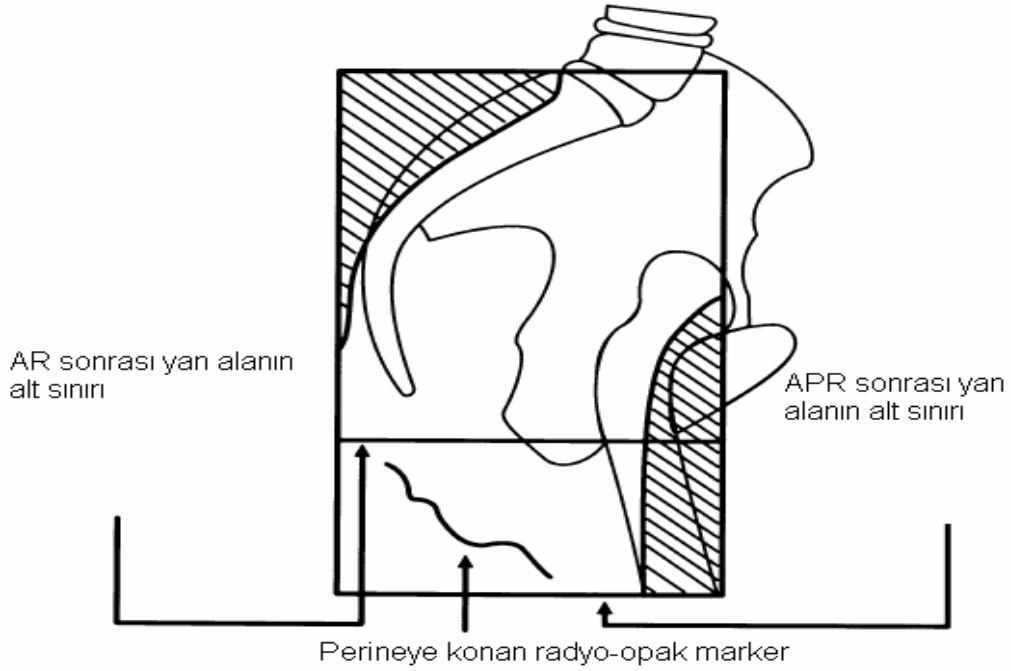
Primer tümör volümü ve bölgesel lenf nodlarını tedavi etmek amacıyla; başlangıçta daha büyük alanları içeren bir tedavi portalını takiben gerektiğinde sadece tümör yatağını tedavi etmek için, daha küçük alanlara geçilmelidir. AP/PA alanların genişliği, pelvik girişi 2 cm sınırla kapsamalıdır. Üst sınır genellikle sakral promontoryum seviyesinin 1,5 cm yukarisındadır. Anterior rezeksiyon uygulanan hastalarda alt sınır genellikle obturatör foramenin altıdır. APR uygulanan hastalarda perine RT sahasına dahil edilmelidir (Şekil:2.6.4) (Şekil:2.6.5) (Şekil:2.6.6). Perinenin ışın sahasına dahil edildiği uygulamalarda yerel-bölgesel yineleme %23'lerden %2-3 seviyelerine düşürülmüştür. Mümkün olduğunca ince barsakları korumak amacıyla hasta yüz üstü yatar pozisyonda tutulmalı ve yan alanlar tedaviye dahil edilmelidir. Yan alanların arka sınırı sakral kemiğin en az 1,5 – 2 cm arkasında olacak şekilde ayarlanmalıdır. Lokal ileri hastalıkta, tümörün sinir kökleri boyunca gelişebilecek yerel-bölgesel yinelemeleri önlemek için tüm sakral kanal saha içine dahil edilmelidir. Rektumun alt 1/3'ü, önde vagen duvarı veya prostat ile birleşiktir ve distal tümörlü hastalarda ışın sahasına dahil edilmelidir. Tümör yatağı ve bölgesel lenf nodlarını içeren geniş alanlara uygulanacak doz; 1,8 Gy/gün total 45 Gy/5 hafta şeklinde olmalıdır. Boost tedavisi (daha dar alandan ek doz uygulama) BT kesitlerine veya konulan klipslere göre belirlenir. Eğer ince barsaklar alan dışına çıkarılamıyorsa doz 50,4 Gy'le sınırlanmalıdır.



Şekil: 2.6.4: Işınlanan Alanların Simulasyon Filmi; AP/PA ve Lateral Alanlar



Şekil: 2.6.5: RT Ön Alan (AR ve APR için)



Şekil: 2.6.6: RT Lateral Alan (AR ve APR için)

### 2.1.7. Kolorektal Kanselerde Prognostik Faktörler

#### Patolojik prognostik faktörler:

En önemli prognostik faktörler tümörün invazyon derinliği ve lenf nodu tutulumudur. Tümörün prognozu ile histopatolojik tipi ve diferansiyasyon derecesi arasında mutlak bir bağlantı vardır. Sağkalım iyi diferansiye, tubuler ve papiller komponentleri baskın olan tümörlerde daha uzundur. Az diferansiye ve küçük hücreli kanserlerde ise prognoz belirgin şekilde kötüdür (62,63-). Erken evrelerde lenfatik invazyon prognoz açısından büyük bir anlam taşımamaktadır. Ancak, ileri evrelerdeki tümörlerde tümör dokusunda ve çevresinde yaygın lenfatik invazyonun sağkalım açısından belirgin olumsuz etki gösterdiği gözlemlenmiştir (64). Barsak cidarı içinde venöz invazyonun saptanması prognozu oldukça olumsuz etkileyen bir bulgudur. Sağkalım üzerinde de olumsuz etkisi vardır. Perinöral invazyon tümör evresinin ilerlemiş olduğunu belirten bir bulgu olarak yorumlanmaktadır (62, 65).

Metastatik lenf nodu sayısının yüksek oranda olması, tümör apikalinde ve/veya mezenter damar köklerinde metastaz görülmesi ve periganliyoner yayılım kötü prognostik kriterlerdir (64, 66).



### Moleküler Prognostik Faktörler:

- Tümör proliferasyon belirleyicileri
  1. AgNOR
  2. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)
  3. Ki 67
  4. Fraksiyone Allel Kaybı (FAL)
- Onkogen-Protoonkogen Aktivasyonları
  1. K-ras
  2. N-ras
- Tümör Süpressör Gen Değişiklikleri
  1. Adenomatöz Polipozis Cancer (APC) geni
  2. Mutated in Colorectal Carsinoma (MCC) geni
  3. p53 geni
  4. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) geni
- Carcinoembriyonic Antijen (CEA)
- Tümör Assoiciated Glycoprotein (TAG-72)

## **2.2. HÜCRE SIKLUSU**

Yetişkinlerde toplam hücre sayısının tahminen  $10^{12}$  -  $10^{13}$  civarında olduğu, bütün bu hücrelerin tek bir hücreden, yani döllenmiş yumurta hücresinden meydana geldiği bilinmektedir. Bu hücrede genetik materyal olan DNA'nın replikasyonu ve replike olan DNA'nın hücre bölünmesi esnasında eşit miktarda yavru hücrelere geçmesi ile mümkün olmaktadır (67,68). Hücrelerin büyük bölümü sürekli bölünme halinde olmadıklarından mitotik bölünme tamamlandıktan sonra dinlenme fazına (Go fazı) geçerler ve yaşamlarının büyük bir kısmını bu fazda geçirirler. Başka bir ifade ile hücre siklusu, iki mitotik bölünme arasındaki devredir. Mitoza gidecek hücreler, yeni DNA sentezi ve bir çok hücre bileşeninin normal hücre siklusunun yaklaşık

%90'ını oluşturan interfaz safhasına girerler. İnterfaz üç safhadan gerçekleşir (68-70).

- 1) G<sub>1</sub> fazı (G=Gap): Bu safhada hücrede RNA ve protein sentezi yapılır
- 2) S fazı (S= Sentez): DNA replikasyonu başlar, RNA sentezi devam eder, protein sentezi ise maksimuma ulaşır.
- 3) G<sub>2</sub> fazı: DNA sentezi durmuştur. RNA ve protein sentezi ise G<sub>1</sub> fazında olduğu kadardır.

İnterfaz süresince protein sentezi ribozomlarda yapılmaktadır. Protein sentezinde görev alan üç tane RNA molekülü vardır. Bunlar mRNA, tRNA, rRNA'dır (70). Ribozomal RNA'nın majör fonksiyonu yapısaldır ve çekirdekçik tarafından sentezlenir. Çekirdekçikte sentezlenen rRNA'lar burada spesifik ribozomal ve non-ribozomal proteinlerle birleşerek pre-ribozomal molekülleri oluştururlar. Bu moleküller çekirdekçikten serbest bırakılırlar ve nükleer por kompleksinden geçerek protein sentezinde önemli rol oynadıkları sitoplazma içerisine taşınırlar (71,72).

### **Nükleolus (Çekirdekçik)**

Hücre çekirdeği içinde, rRNA'ların sentezlendiği ve ribozomal alt ünitelerin oluşturulduğu bölgelerdir (73). Çekirdekçik stoplazmik organellerden farklı olarak bir membran ile çevrili değildir ve hücrede nükleer membrana yakın lokalizasyon gösterir. Bu şekilde ribozomların sitoplazmaya transportunda kolaylık sağlandığı düşünülmektedir (74).

Çekirdekçik dıştan içe üç bölgeden oluşur (75);

- 1- İpliksi merkez: DNA, RNA polimeraz I ve diğer proteinleri içeren açık boyanan transkripsiyon bölgeleridir.
- 2- Yoğun ipliksi bölge : Gümüşle boyanabilen proteinlerin yanı sıra, DNA ve RNA'nın ikisini de içeren merkezin çevresinde yoğun boyanan bir bölgedir. Bu bölge RNA sentez bölgesidir.
- 3- Granüllü bölge: Çekirdekçiğin en dış çevresindeki bölgesidir. RNA transkriptlerinin olgun bir biçimde hazırlandığı bölgedir.

Çekirdekçik, ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü boyunca geniş ölçüde yapısal değişikliklere maruz kalır (76). Çekirdekçiğin hacmi, aktivitesi ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Bu nedenle, farklı hücrelerde farklı büyüklükte olabileceği gibi, aynı hücre içinde de büyüklüğü değişebilmektedir (73).

### **2.2.1. Nor Bölgeleri**

Çekirdekçiği oluşturan bölgeler, insanda bulunan 5 çift akrosentrik kromozomun (D ve G grup) yani 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozom çiftlerinin kısa kollarındaki ikincil boğumlarda bulunurlar. Bu bölgeler ribozomal RNA sentezledikleri için ribozomal DNA (rDNA) bölgeleri olarak da bilinirler (77-79).

### **2.2.2. NOR'ların Gümüş Nitrat ile Boyanması**

Gümüş nitrat, 1800'lü yılların sonlarından beri sitolojik bir boya olarak kullanılmaktadır.

Kromozom preparatlarında AgNOR boyama (nucleolar gümüş boyama) ilk olarak Carleton tarafından gösterilmiştir. Goodpasture ve Bloom sitogenetik preparatlarda çekirdekçik oluşturan bölgeleri ortaya çıkarmak için AgNOR boyama tekniğini geliştirmişlerdir. Bu teknik, Howell ve Black tarafından 1980 yılında basitleştirilerek ışık mikroskopunda ve elektron mikroskopunda NOR bölgelerini saptamışlardır (80). Platon ve ark.1986'da boyama tekniğini modifiye ederek rutin kullanım alanına sokmuşlardır (81). Gümüş boyama tekniği, asidik bir ortamda gümüş nitratın NOR proteinleri tarafından metalik gümüşe indirgenmesi esasına dayanır (82). Ancak gümüş nitratı metalik gümüşe indirgeyen asıl madde, rDNA veya rDNA olmayıp sadece rRNA transkripsiyon yeri ile ilişkili asidik proteinlerdir. Bu proteinler nükleolin (C 23), B 23, ve RNA polimeraz I'dir (83). Gümüşle boyanan bu proteinler çekirdekçik içindeki ribozomal genlerin işaretleridir ve metafazdaki NOR bölgelerinin interfazdaki karşılığıdır (79, 80, 82, 84).

### **2.2.3. Kanser Hücresinde NOR Proteinleri**

Kanser hücresindeki çekirdekçik morfolojisinin anormal yapısı uzun zamandır bilinmektedir.

Bu hücrelerin en önemli özelliklerinden biri aşırı ve kontrolsüz hücre çoğalmasıdır. Kanser hücresinde çekirdekçik yapıları sıklıkla büyümüş ve düzensiz olarak görülür.

Bush ve ark. 1979 yılında kanser hücresi çekirdekçiğindeki değişikliklerin önemli bir sitolojik parametre olabileceğini bildirmişlerdir (85). Gümüş nitratla NOR bölgelerinin boyanması ile çekirdekçik aktivitesi ve hücre çoğalması hakkında yeni bilgiler edinilmiştir. 1981 Yılında Jordon ve ark. Aktinomisin D ile rRNA sentezinin inhibisyonu sonucu NOR bölgelerinin belirgin şekilde azaldığını ortaya koymuşlardır (86). Devamlı bölünen hücrelerde ribozomal biyosentezin artışına paralel olarak interfazdaki NOR bölgeleri de artar (86,87). Normal hücrelerden kanser hücrelerine dönüşüm sırasında protein sentezi artar. Bu amaçla hücre içinde rRNA sentezlenir. Bununla birlikte çekirdekçiklerin sayısı ve miktarı da artar. Bu artış hücrenin interfaz süresince G<sub>1</sub>'den S fazına geçerken olur (83,84,87). NOR bölgelerinin sayısı ve büyüklüğü hücre tipi ve farklılaşma derecesi ile ilgilidir ve hücre çoğalma hızını yansıtır. Bu nedenle de malign tümörleri benign tümörlerden ayırmada kullanılabilir (76,84,87,88). Tümör patolojisinde, NOR proteinlerinin sayısal ölçümünün hücrenin proliferatif aktivitesini değerlendiren bir parametre olduğu kabul görmüştür (89).

## **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **3.1. GEREÇLER**

#### **Demirbaş Malzemeler**

1. Etüv (Heto/Cell Hause 200)
2. Su banyosu (Termal)
3. Vorteks (Janke&Kunkel VF2)
4. Mikroskop (Nikon Labophot 2, Olympus model CHK)
5. Fotomikroskop (Olympus)
6. Manyetik karıştırıcı (Janke&Kunkel)
7. Hassas terazi (Kern S 2000)
8. Derin dondurucu (Uğur Derby)
9. Buzdolabı (Arçelik)
10. Zaman ayarlayıcı
11. Dispenser (Brand-Dispensette)
12. pH metre (NEL Mod 821)
13. Mikroskop ataşmanlı video kamera (Sony CCD-IRIS siyah beyaz video kamera SSC-M370CE)
14. Bilgisayar (Escort pentium II)

15. Kamera adaptörü (Sony YS-W130P)
16. Mikrotom (Leica RM 2155)

### **Sarf Malzemeler**

1. Giemsa (Merck, 540040512)
2.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, 9021622)
3.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Merck, K1690176)
4. Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)
5. Metanol (Merck, 502K5275408)
6. Lamel yapıştırıcı (Entellan®, Merck, 640171987)
7. İmmersiyon yağı (İmmersiol®, Merck, 09403569)
8. Alkol (% 96'lık saf alkol, Tekel)
9. Aseton (Merck, K11415613)
10. Ksilol (Merck, 207K03755385)
11. NaCl (Merck, 2448989)
12. KCl (Merck, 340TA611835)
13.  $\text{AgNO}_3$  (Carlo Erba, 320904)
14. Etanol (Merck, K21078586)
15. Jelatin (Merck, 5214525)
16. Formik asit (Merck, K30486663)
17. pH Universal İndikatör pH 0-14 (Merck)
18. Distile su
19. Çeşitli cam laboratuvar malzemesi
20. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü (Grainer, polystrene)
21. Filtre kâğıdı (Whatman Filter Papers 25mm)
22. Enjektör 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 20ml, 50ml (Sterijen)

23. Pastör pipeti
24. Lam (Objektträger)
25. Lamel (Menzel-Glasser 24x32mm)
26. Alüminyum Folyo
27. Mikrotom bıçağı (MB-35 premier 35°/80 mm)

## **3.2. YÖNTEM**

### **3.2.1. Hasta Gruplarının Belirlenmesi**

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim Dalı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirildi. Mayıs 2003 - Temmuz 2006 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kemal Dedeman Onkoloji Hastanesi'ne rektum kanseri tanısı ile başvuran, abdominoperineal rezeksiyon (APR), low anterior rezeksiyon (LAR) veya LAR/koloanal anastomoz yapılmış, parsiyel fiksasyon, komplet stenoz veya muskuler invazyondan birini içeren lokal ileri evre (T3-T4) veya lenf nodu metastazı (LN+) yapmış tümürlü 30 olgu çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil olan tüm olgular pelvik eksternal radyoterapi aldı. Tedavi alanı; tümör yatağı, internal ve external iliak lenf nodları ve presakral lenf nodu bölgelerini kapsadı. Tümör dozu multiple alan izosentrına göre hesaplandı. Total doz 45 Gy olacak şekilde 25 fraksiyonda 5 gün/hafta, 1.8 Gy/gün dozunda planlandı. Tüm hastalara pelvik bölge radyoterapi 4 alan tekniği ( AP/PA ve iki lateral alan) ile uygulandı. Geniş alan pelvik radyoterapi sonrası hastalara primer tümör yatağına 5.4 Gy boost tedavisi uygulandı. Perine boost alanına dahil edilmedi. Yaklaşık 10 × 10 cm veya 12 × 12 cm'lik alanlar primer tümörün lokalizasyonu ve büyüklüğüne göre belirlendi. Boost tedavisi için de ince barsakların maksimum korunabilmesi amacıyla 4 alan box tedavisi tercih edildi. Hem pelvik radyoterapi hem de boost tedavisi için *lineer accelerator* (LINAC) ile minimum 6 MV photon enerjisi kullanıldı. Tüm hastalara 5-FU temelli kemoterapi uygulandı. Hastaların parafin bloklanmış tümör doku örnekleri Patoloji Anabilim Dalı arşivinden sağlandı.

### 3.2.2. Preparat Hazırlama

Parafin bloklu rektum tümörlü doku örneklerinden patoloji departmanında mikrotom yardımı ile 3 µm'lik kesitler alınmıştır. Boyama işlemi sırasında dokuların lamdan düşmemesi için 59° C 'de 2 saat etüvde kaldıktan sonra yaklaşık bir gün (24 saat) 37°C'lik etüvde bekletilmiştir.

Etüvden çıkarılan kasetler;

- Soğuk Ksilol 15 dakika (Deparafinizasyon)
- Soğuk Ksilol 15 dakika (Deparafinizasyon)
- Soğuk Ksilol 15 dakika (Deparafinizasyon)
- %99'lük etanol 15 dakika
- %99'lük etanol 15 dakika
- %90'lık etanol 10 dakika (Rehidratasyon)
- %70'lik etanol 10 dakika (Rehidratasyon)
- %50'lik etanol 10 dakika (Rehidratasyon)

serilerinden geçirilmiş ve AgNOR boyama işlemine hazır hale getirilmiştir.

### 3.2.3. NOR Boyama

Kullanılan çözeltiler

**%50'lik Gümüş Nitrat çözeltisi** (Ağırlık/ağırlık olarak ~%33'lük): 1 g AgNO<sub>3</sub> (Gümüş Nitrat)'ın 2 ml distile su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Çözelti +4 °C ve karanlıkta saklanmıştır.

**%1'lik Formik asit çözeltisi:** 1 ml formik asitin üzeri distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

**%2'lik jelatinli formik asit çözeltisi:** Oda sıcaklığında % 98'lik formik asit içinde 2 g jelatinin çözülmesi ve 100 ml'ye tamamlanmasıyla, % 2'lik jelatin elde edilmiştir. Elde edilen karışım filtre kağıdından süzölmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Gümüş Boyama solüsyonu: %50'lik AgNO<sub>3</sub>'den 1 ml ve %2'lik formik asitten 0.5 ml alınarak, ışık görmeyen etrafı aliminyum folyo ile kaplanmış bir steril kültür tüpü



içerisinde karıştırılarak hazırlanmıştır. Gümüş boyama işlemi her kullanımda tekrar hazırlanmıştır.

**%2'lik Giemsa çözeltisi:** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisinden 49 ml, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisinden 51 ml alınarak elde edilen 100 ml'lik çözeltinin 2 ml'si atılarak 2 ml giemsa eklenip, kurutma kağıdıyla süzülerek hazırlanmıştır.

### **NOR Boyama İşlemi**

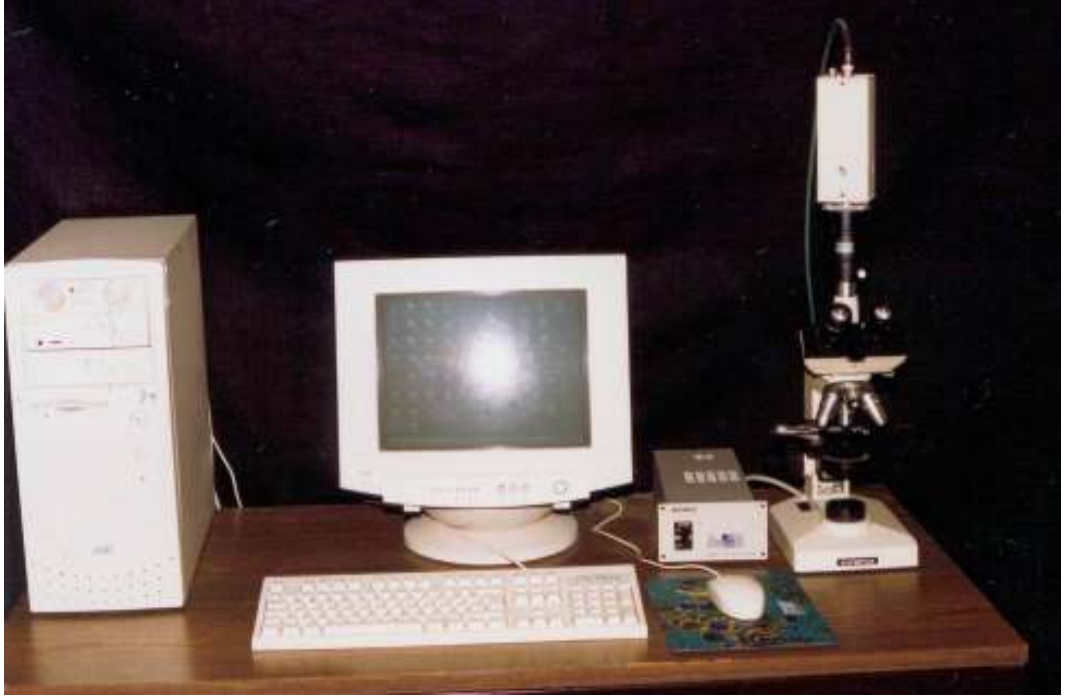
%50'lik etanol içinde bulunan preparatların AgNO<sub>3</sub> solüsyonunu daha iyi alabilmesi için ~5 dakika musluk suyunda bekletildikten sonra, 1-2 dakika havada kurutulmuş ve distile su ile ıslatılmış kurutma kağıdının bulunduğu petri kabının içine yerleştirilerek üzerlerine % 50'lik AgNO<sub>3</sub> solüsyonundan pastör pipeti ile 5-6 damla damlatılıp ve üzerleri lamel ile kapatılmıştır. Daha sonra hızlı bir şekilde petri kabının kapağı kapatılarak, etrafı ışık almayacak şekilde aliminyum folyo ile iyice sarılarak 37°C deki etüvde 15-18 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda etüvden çıkarılan preparatlar üzerlerindeki lameller düşünceye kadar distile su ile yıkanmıştır. Preperatlar % 2'lik giem sada 8-10 saniye tutulduktan sonra fazla bekletilmeden havada kurduğunda dokuların parçalanması nedeni ile buzdolabında kurutma işlemi yapıp, ksilole batırıldıktan sonra entellan ile kapatılmıştır.

### **3.2.4. NOR Alanlarının Bilgisayar Programı İle Ölçülmesi**

Tümör dokusuna ait hücrelerin çekirdekleri içindeki NOR alanları; Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı için Delphi dilinde yazılmış olan bilgisayar programı ile ölçülmüştür.

### **Görüntülerin Elde Edilmesi**

Analiz işleminde kullanılacak olan çekirdeklerin görüntüleri ışık mikroskobundan (100×10 büyütme) bilgisayar ortamına bir video kamera (Sony SSC-M370E) aracılığı ile aktarılmıştır (Şekil 3.2.4.1). Kameradan alınan görüntüler, analizi yapılmak üzere Bitmap türü resim formatında bilgisayarda saklanmıştır.



**Resim 3.2.4.1.** Analiz İşleminde Kullanılan Işık Mikroskobu – Video Kamera - Bilgisayar Düzenegi

### **Görüntülerin Standardizasyonu**

Görüntülerin analizi için Delphi dilinde yazılan bir bilgisayar programı kullanılmıştır. Analiz işlemine başlamadan önce elde edilen resimlerdeki ışık yoğunluğunun birbirlerinden farklı olduğu göz önünde bulundurularak görüntü yoğunluğunun standardizasyonu için eşitlik 3.1 uygun bir algoritmayla resim üzerindeki bütün noktalara uygulanmıştır.

$$P_s = [(P_o - P_{min}) / (P_{max} - P_{min})] \times 255$$

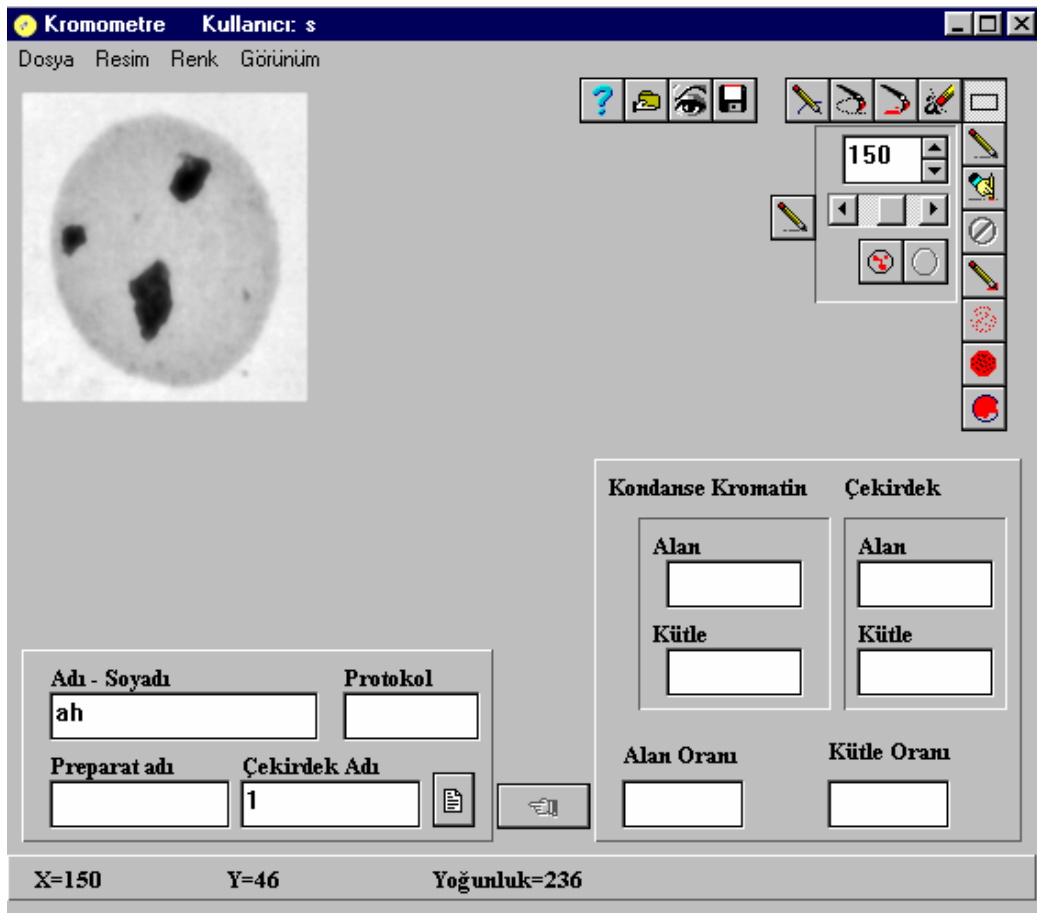
Eşitlikte  $P_s$  noktanın standardize edilmiş değerini,  $P_o$  noktanın asıl değerini,  $P_{max}$  resim üzerinde en yüksek parlaklık değerine sahip noktanın değerini,  $P_{min}$  resim üzerinde en düşük parlaklık değerine sahip noktanın değerini göstermektedir.

### **Görüntülerin Analizi**

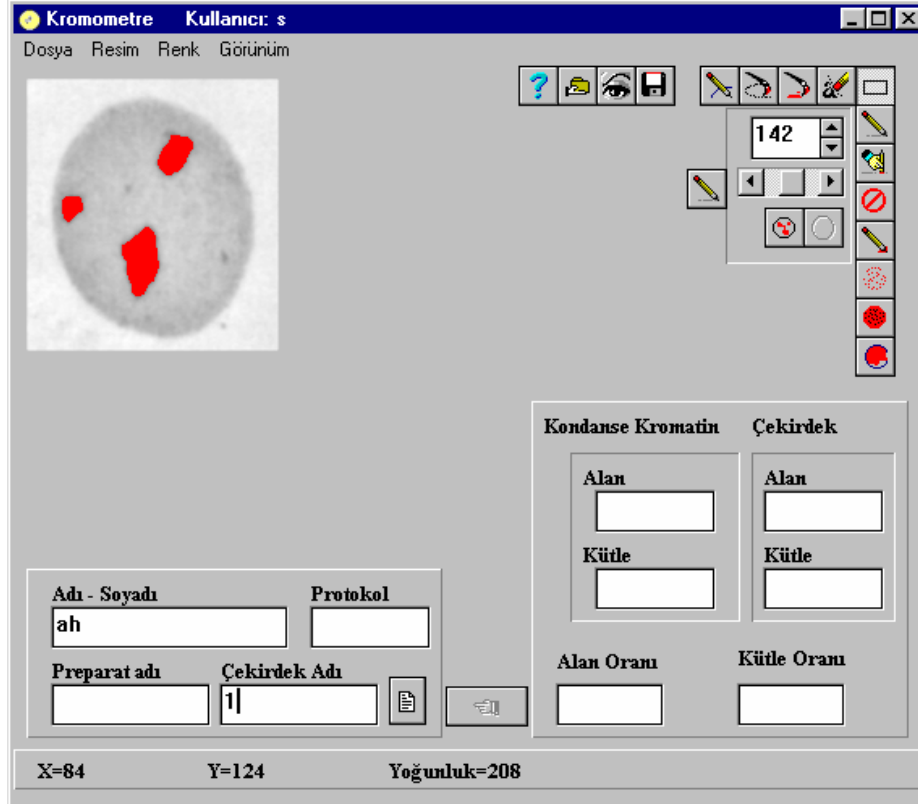
Standardize edilen görüntüler aynı programla analiz edilmişlerdir. Analiz işleminde kullanılan programın görüntüsü Resim 3.2.4.1’de görülmektedir.

**a) NOR Bölgelerinin Belirlenmesi:** Analiz programı yardımıyla NOR içeren bölgelerin seçimi için programa bir eşik değer girilerek bu eşik şiddetine uygun bir

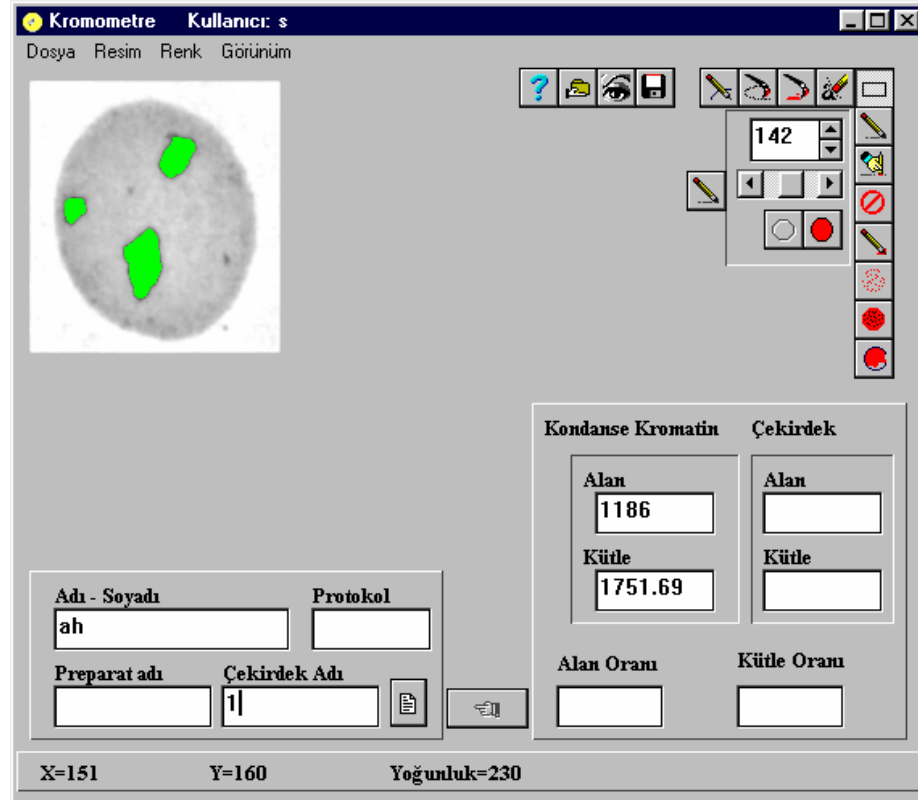
şekilde çevresindeki noktalardan daha yoğun olarak ayrılan noktaların belirlenmesi sağlanmıştır. Bu yolla seçilen bölgeler dışında NOR bölgesi olduğu düşünülen bölgeler ise programdaki çeşitli araçlar sayesinde seçime dahil edilmiş veya fazla seçilmiş olan bölgeler seçimin dışında bırakılmıştır. NOR bölgelerinin belirlenmesinde bilgisayar programı yol gösterici olarak kabul edilip analiz yapan kişinin kararları esas alınmıştır. Resim 3.2.4.2, NOR bölgeleri belirlenmiş bir tümör hücresi çekirdeğini göstermektedir. Daha sonra belirlenen bu NOR bölgeleri hesaplanarak, çekirdek alanının belirlenmesine geçilmiştir. Resim 3.2.4.3 NOR bölgeleri hesaplanmış bir tümör hücresi çekirdeğini göstermektedir.



**Resim 3.2.4.2.** Analiz İşleminde Kullanılan Program ve Analiz Edilecek Olan Çekirdek

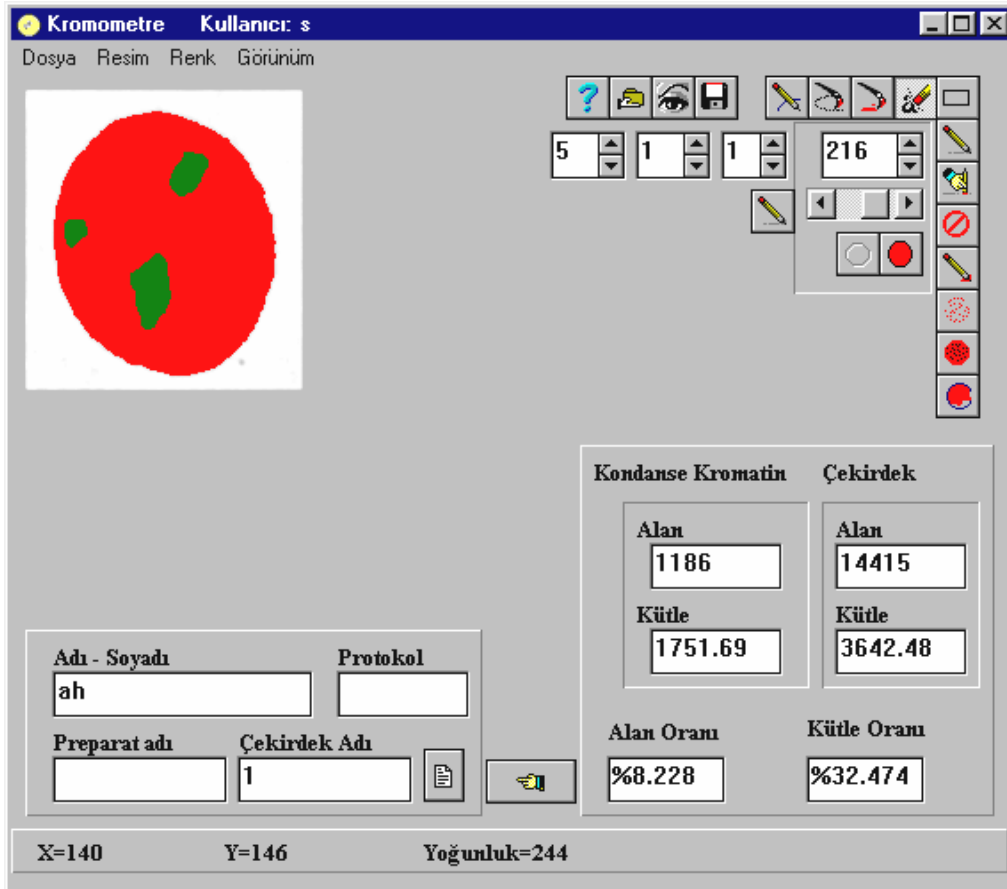


Resim 3.2.4.3. NOR Bölgeleri Belirlenmiş Tümör Hücresi Çekirdeği



Resim 3.2.4.4. NOR Bölgeleri Hesaplanmış Tümör Hücresi Çekirdeği

**b) Çekirdek Alanının Belirlenmesi** : Çekirdek alanının belirlenmesi için de NOR bölgesinin belirlenmesine benzer bir yol izlenerek verilen eşik değere göre bilgisayarın çekirdek bölgesini seçmesi istenmiştir. Özellikle sitoplazma gölgesi bulunduran bazı görüntülerde çekirdeğin ayırt edilmesi oldukça güç olduğundan bu tür görüntülerde çekirdeğin sınırları elle çizilip programın belirlenen alanı çekirdek bölgesi olarak görmesi sağlanmıştır. Resim 3.2.4.4. çekirdek ve NOR bölgeleri belirlenmiş bir tümör hücresi çekirdeğini göstermektedir.



**Resim 3.2.4.5.** Çekirdek ve NOR Bölgeleri Belirlenmiş Tümör Hücresi Çekirdeği

**c) Parametrelerin Hesaplanması** : Çalışmamızda bu ölçümlerin parametresi olarak, NOR yüzey alanının bütün çekirdek yüzey alanına oranı kullanılmıştır. Bu parametrenin hesaplanması için kullandığımız bilgisayar programı sayesinde öncelikle NOR bölgesi olarak belirlenen bölgedeki nokta sayısı ve çekirdek bölgesi olarak belirlenen bölgedeki nokta sayısı hesaplanarak, içerisine NOR bölgesinin de dahil olduğu çekirdek alanına göre NOR alanının yüzde oranı hesaplanmıştır.

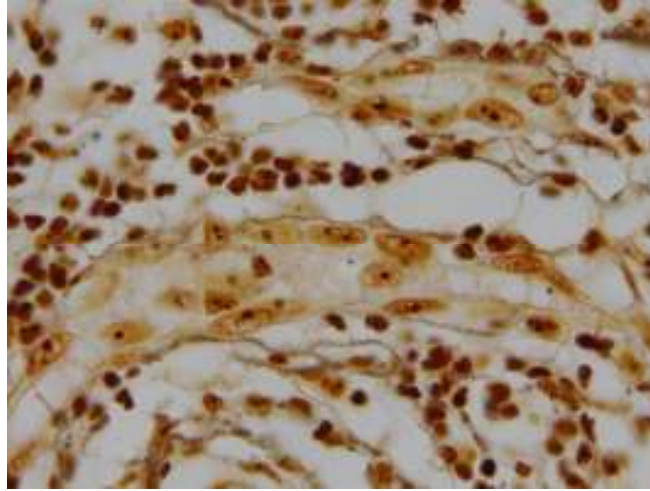
Ölçümü yapılan hücrelerin büyüklükleri çalışmamızda önemli bir role sahip olduğu için bütün hücrelerin büyüklükleri de  $\mu\text{m}$  olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplama için yapılan kalibrasyon işleminde 100 hücrenin çapları mikrometre seviyesinde ölçülüp bu hücrelerin bilgisayardaki görüntülerinin yatay ve düşey eksendeki nokta sayısı göz önünde bulundurularak  $1\mu\text{m}^2$  büyüklüğündeki alan için 56.53 değerinde bir kalibrasyon katsayısı hesaplanarak çekirdek alanları  $\mu\text{m}^2$  türünden ifade edilmiştir. Elde edilen alan değerinden bu alana sahip olan dairenin çapı  $\mu\text{m}$  türünden hesaplanmıştır. Hesaplanan bu çap değerleri mikrometre ile yapılan ölçümlerle karşılaştırılarak ölçülen değerlere oldukça yakın değerlerde bulunduğu tespit edilmiştir.

### **3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM**

Veriler SPSS 15.0 for Windows (Statistical Package for the Social Sciences) istatistik paket programında değerlendirildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğine Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. İki grup karşılaştırmalarında Bağımsız İki Örnek T Testi, üç ve daha fazla grup karşılaştırılmalarında Tek Yönlü Varyans Analizi kullanıldı. İki nicel değişken arasındaki ilişkiye Pearson Korelasyon Analizi ile bakıldı. İki nitel değişkenin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. Gruplar arası sağkalım eğrilerinin karşılaştırılmasında Kaplan-Meier Testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık  $p<0.05$  değeri olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Araştırma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kemal Dedeman Onkoloji Hastanesi'nde tedavi edilen rektum kanseri tanılı evre II-III 30 olgunun parafin blokları üzerinde AgNOR boyama yöntemi uygulanarak yapıldı (Resim 4.1 ).



**Resim 4.1:** AgNOR Boyama Yapılmış Tümör Dokusu

18 (% 60)'ı erkek, 12 (% 40)'si ise kadın olan olguların medyan yaşı 56 (76-26) idi. Olguların 11 olguya (% 36,7) APR, 5 (% 16,7) tanesine AR ve 14 (% 46,7) tanesine LAR operasyonu uygulanmıştı. 12 (% 40) olguda lenf nodu metastazı saptandı. 27 (% 90) olgunun patolojik tanısı adenokarsinom iken 3 (% 10) olguda taşlı yüzük hücreli karsinom saptandı. Vasküler invazyon 8 (% 26,7) olguda saptandı. 2 (% 6,7) olguda vasküler invazyonun durumu belirlenemedi. Perinöral invazyon 11 (% 36,7)'sinde saptandı. 2 (% 6,7) olguda perinöral invazyonun durumu belirlenemedi.

Kemoterapi rejimi olarak 13 (% 43,3) olgu 5-FU/FA alırken, 17 (% 56,7)’si UFT/oral folinik asit rejimini aldı. Altı (% 20) olguda yerel-bölgesel yineleme saptandı. Uzak metastaz 11 (% 36,7) olguda gözlemlendi. Olguların ilk metastaz yeri incelendiğinde; 2 olguda beyin metastazı, 1 olguda omentum metastazı, 1 olguda inguinal lenf nodu metastazı, 4 olguda akciğer metastazı, 2 olguda karaciğer metastazı görülürken, 1 olguda hem akciğer hem de karaciğer metastazı aynı anda saptandı. (Tablo 4.1)

**Tablo 4.1: Olguların Genel Özellikleri**

	N	%
<b>Cinsiyet</b>		
E	18	60
K	12	40
<b>Operasyon</b>		
APR	11	36,7
AR	5	16,7
LAR	14	46,7
<b>LN Metastazı</b>		
N0	18	60
N1	6	20
N2	3	10
N3	3	10
<b>Patoloji</b>		
Adenoca	27	90
Taşlı yüzük hücreli ca	3	10
<b>Vasküler İnvazyon</b>		
VI +	20	66,7
VI -	8	26,7
Bilinmeyen	2	6,7
<b>Perinoral İnvazyon</b>		
PNI +	17	56,7
PNI -	11	36,7
Bilinmeyen	2	6,7
<b>Kemoterapi</b>		
5FU/FA	13	43,3
UFT	17	56,7
<b>Yerel-Bölgesel Yineleme</b>		
lokal nüks +	6	20
lokal nüks -	24	80
<b>Uzak Metastaz</b>		
uzak metastaz +	11	36,7
uzak metastaz -	19	63,3

Olguların ortalama NORa/TNa değeri  $9,0260 \pm 3,68$  ve ortalama NORa sayısı  $1,5530 \pm 0,76$  olarak bulundu. NORa/TNa değeri 9,02’den büyük olan olgular; büyük NORa/TNa değerli grup ve 9,02’den küçük olgular küçük NORa/TNa değerli grup olarak ikiye ayrıldı. Yine NORa değeri 1,55’den büyük olgular; büyük NORa’lı grup,



1,55'den küçükler ise küçük NORa'lı grup olarak ikiye ayrıldı. Tüm olguların NORa/TNa değeri ve NORa sayıları Tablo 4.2 ve Tablo 4.3 'de gösterildi.

**Tablo 4.2:** Olguların NORa/TNa değerleri ve NORa Sayı Değerleri

	NORa/ TNa±SS(%)	NORa Sayı±SS
H1	8,3591±4,98	1,47±0,79
H2	5,6239±4,08	1,33±0,66
H3	6,1840±2,91	1,55±0,88
H4	7,4584±3,15	1,89±0,95
H5	5,6783±2,53	1,59±0,73
H6	7,6777±3,90	1,61±0,82
H7	10,6580±3,67	1,52±0,67
H8	8,4125±3,55	1,21±0,45
H9	7,2282±2,92	1,53±0,78
H10	9,9563±3,15	1,30±0,57
H11	10,6876±4,24	1,83±0,86
H12	8,3840±3,15	1,52±0,73
H13	8,8113±3,43	1,44±0,65
H14	10,4448±3,62	1,53±0,65
H15	7,0463±2,79	1,43±0,70
H16	11,1910±4,16	1,49±0,71
H17	9,1907±3,29	1,32±0,52
H18	9,4098±3,85	1,93±1,00
H19	6,2554±3,02	1,53±0,86
H20	13,1600±5,08	1,14±0,51
H21	6,5068±3,06	1,76±0,81
H22	10,7680±4,13	1,72±0,87
H23	12,3147±3,37	1,28±0,58
H24	9,0694±4,03	1,35±0,62
H25	11,9972±3,71	1,67±0,87
H26	8,3427±4,19	1,45±0,72
H27	8,8513±3,20	1,69±0,90
H28	4,8560±2,51	1,36±0,52
H29	12,1686±4,64	2,14±1,12
H30	14,0891±6,11	2,01±1,33

**Tablo 4.3:** NORa/TNa ve NORa sayı Ortalama ve Ortanca Değerleri

	<b>NORa/TNa</b>	<b>NORa sayı</b>
<b>Ortalama</b>	9,0260±3,68	1,5530±0,76
<b>Ortanca</b>	8,8313 (4,86-14,09)	1,5250 (1,14-2,14)

Olguların NORa/TNa ve NORa sayı değerlerinin; vasküler invazyon ve perinöral invazyonla ilişkisi değerlendirildiğinde hem NORa/TNa hem de NORa sayılarıyla istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik gösterilemedi (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4:** NORa/TNa ile NORa değerlerinin Vasküler ve Perinöral İnvazyonla İlişkisi

	NORa/TNa±SS(%)	p	NORa Sayı±SS	P
Vasküler invazyon +	8,62±1,65	0,863	1,65±0,17	0,087
Vasküler invazyon -	8,78±2,38		1,48±0,23	
Perinöral invazyon +	8,12±1,47	0,236	1,52±0,18	0,847
Perinöral invazyon -	9,13±2,48		1,53±0,25	

Lenf nodu metastazı olan olgularla lenf nodu metastazı olmayan olgular arasında; NORa/TNa değerleri bakımından karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterilemedi ( $\chi^2=1.094$ ,  $p=0,296$ ). Yine lenf nodu metastazı olan olgularla lenf nodu metastazı olmayan olgular, NORa sayısı yönünden karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterilemedi ( $\chi^2=0,556$ ,  $p=0,456$ ). (Tablo 4.5 ve Tablo 4.6)

**Tablo 4.5:** NORa/TNa ile Lenf Nodu Arasındaki İlişki

	NORa/TNa		Toplam
	Düşük Grup	Yüksek Grup	
LN metastazı –	11	7	18
LN metastazı +	5	7	12
Toplam	16	14	30

$$\chi^2=1,094, p=0,296$$

**Tablo 4.6:** NORa sayısı ile Lenf Nodu Arasındaki İlişki

	NORa Sayı		Toplam
	Düşük Grup	Yüksek Grup	
LN metastazı –	10	8	18
LN metastazı +	5	7	12
Toplam	15	15	15

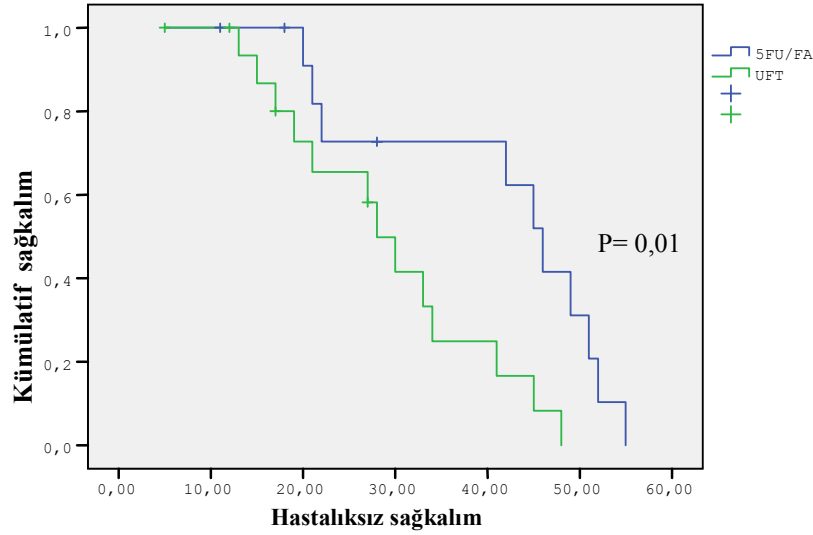
$$\chi^2= 0,556, p=0,456$$

Olguların NORa/TNa değerleri ile yerel-bölgesel yineleme arasındaki ilişki incelendiğinde; NORa/TNa değeri ile yerel-bölgesel yineleme arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunurken ( $p= 0,020$ ); NORa sayısı ile değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterilemedi ( $p= 0,671$ ). (Tablo 4.7)

**Tablo 4.7:** NORa/TNa ve NORa ile Yerel-Bölgesel Yineleme Arasındaki İlişki

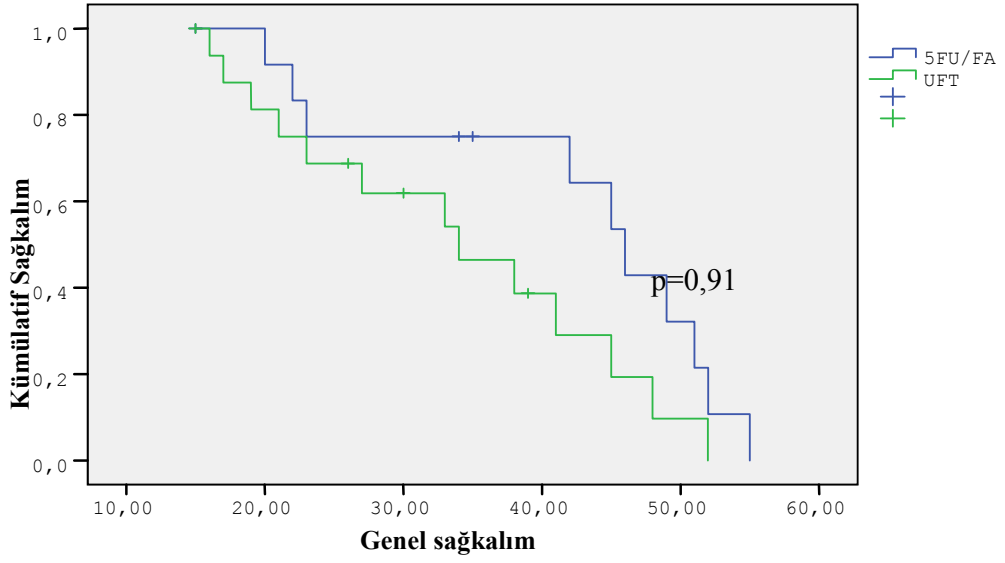
Yerel-Bölgesel Yineleme		n	ortalama±SS	p
NORa/TNa	yok	24	8,5309±2,308	0,020
	var	6	11,0067±1,543	
NORa Sayı	yok	24	1,5625±0,212	0,671
	Var	6	1,5159±0,349	

Olguların ortalama hastaliksız sağkalım süreleri  $29,733\pm14,393$  ay, genel sağkalım süreleri ise  $33,766\pm12,837$  aydı. Olguların ortanca hastaliksız sağkalım süresi 27,5 (5-55) ay, ortanca genel sağkalım süresi ise 34 (15-55 ) aydı. Kemoterapi olarak 5FU/FA alan olguların ortalama hastaliksız sağkalım süresi  $41,052\pm4,088$  ay, ortanca hastaliksız sağkalım süresi ise 46,000 ( 40,107- 51,893) aydı. Kemoterapi olarak UFT alan olgularda ise; ortalama hastaliksız sağkalım süresi  $29,4\pm3,055$  ay, ortanca hastaliksız sağkalım süresi ise 28 (23,283- 32,817) aydı. İki grup arasında hastaliksız sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.( $p=0,01$ ),(Şeki4.1)



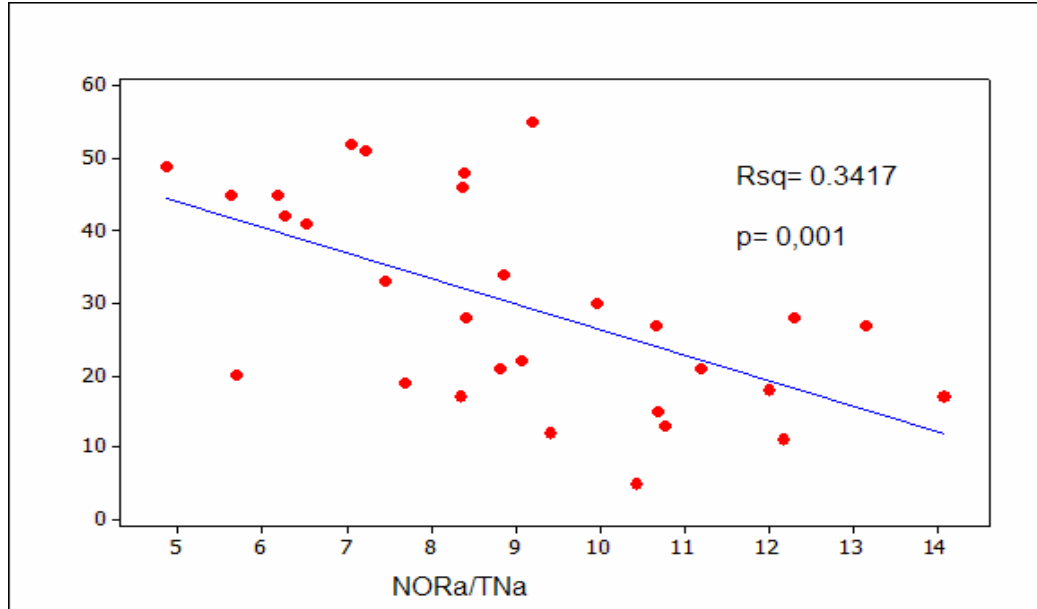
**Şeki 4.1:** 5-FU/FA ile UFT Alan Olgularda Hastaliksız Sağkalım Eğrisi

Kemoterapi olarak 5-FU/FA alan olgularda ortalama genel sağkalım süresi  $41,84\pm3,762$  ay iken, ortanca genel sağkalım süresi 46 (40,240 – 51,760) aydı. Kemoterapi olarak UFT alan olgularda ise ortalama genel sağkalım süresi  $33,960\pm3,203$  ay iken, ortanca genel sağkalım süresi 34 (21,714 – 46,286) aydı. Gruplar arasında genel sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.( $p= 0,91$ )



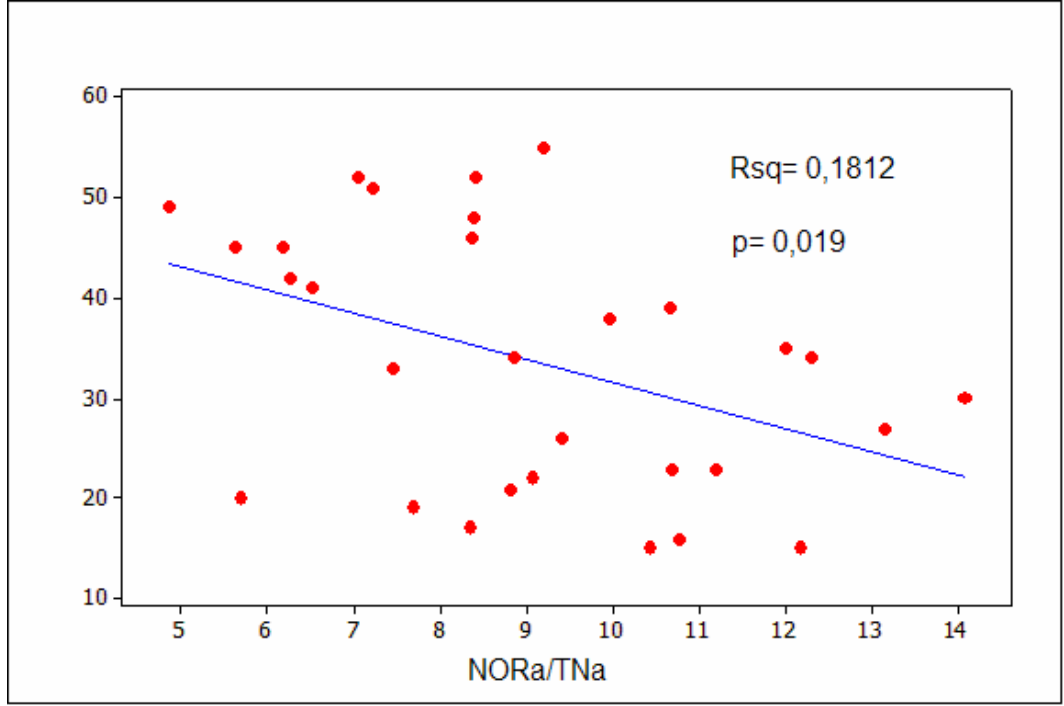
**Şekil 4.2:** 5-FU/FA ve UFT Alan Olgularda Genel Sağkalım Eğrisi

Tüm olguların NORa/TNa değerinin hastalısız sağkalım süresi ile ilişkisinin incelendiği korelasyon testlerinde; NORa/TNa değeri ile hastalısız sağkalım süresi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ( $p=0,001$ )(Şekil 4.3).



**Şekil 4.3:** NORa/TNa ile Hastalısız Sağkalım Arasındaki Korelasyon

NORa/TNa değeri ile genel sağkalım arasında korelasyon testlerinde benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı. (Şekil 4.4 ).

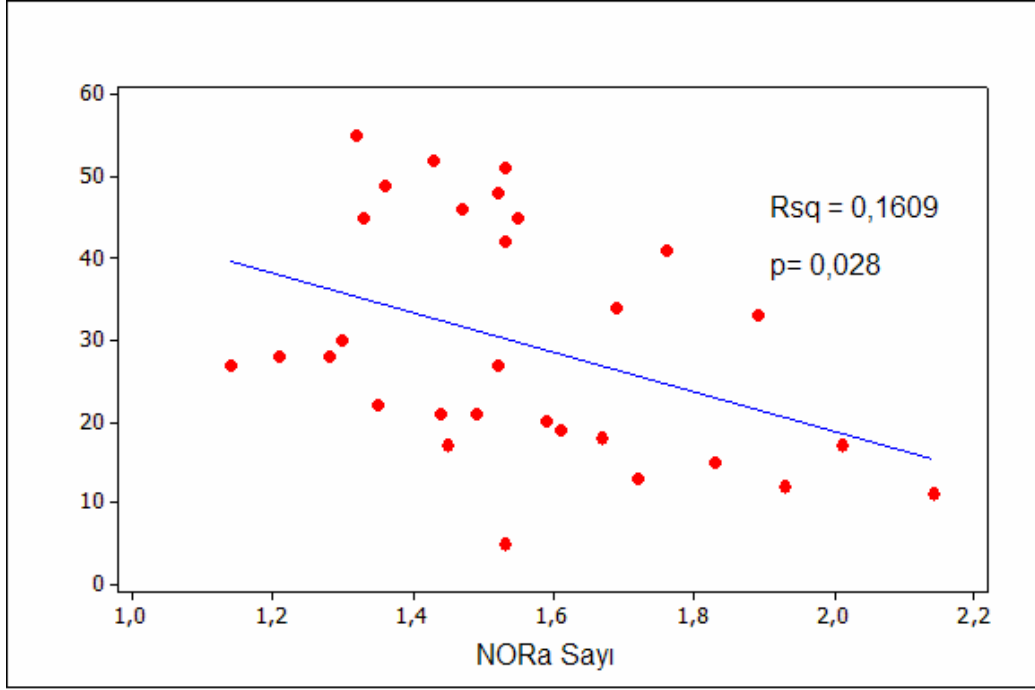


**Şekil 4.5:** NORa/TNa Değeri ile Genel Sağkalım Arasındaki Korelasyon

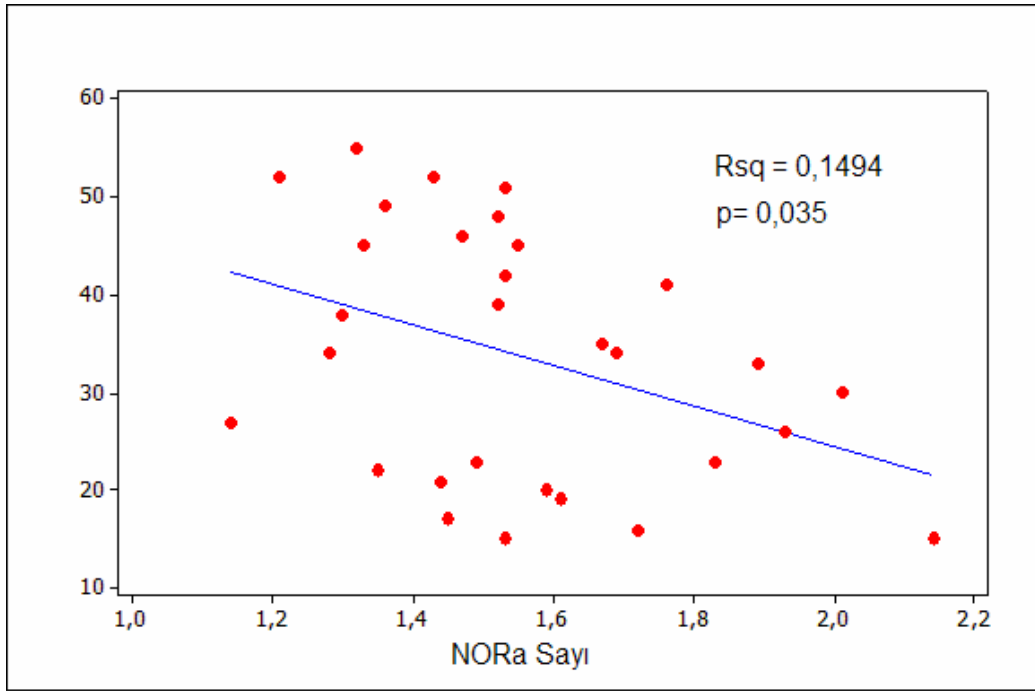
Olguların NORa sayısı ile hastalısız sağkalım süresi incelendiğinde ise, korelasyon testlerinde NORa sayısı ile hastalısız sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (Şekil 4.6). Olguların NORa sayısı ile genel sağkalım süresi incelendiğinde , benzer şekilde NORa sayısı ile genel sağkalım arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olduğu saptandı (Şekil 4.7). Olguların NORa/TNa ve NORa sayı değerlerinin, hem hastalısız sağkalım hemde genel sağkalım ile olan ilişkisi tablo 4.8' de gösterilmiştir.

**Tablo 4.8:** NORa/TNa ile HSK ve GSK ile ilişkisi

		Pearson Correlation	
		r	p
NORa/TNa	Hastalısız Sağkalım	-0,585	0,001
	Genel Sağkalım	-0,426	0,019
NORa sayı	Hastalısız Sağkalım	-0,401	0,028
	Genel Sağkalım	-0,387	0,035



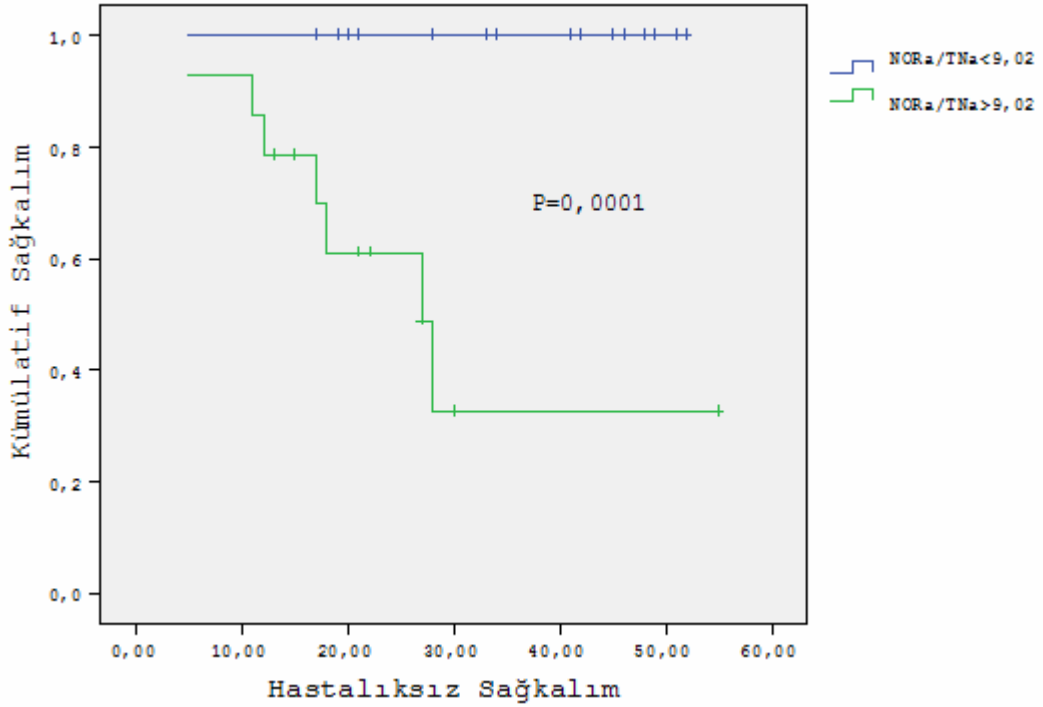
**Şekil 4.6:** NORa sayısı ile Hastaliksız Sağkalım Arasındaki Korelasyon



**Şekil 4.7:** NORa sayısı ile Genel Sağkalım Arasındaki Korelasyon

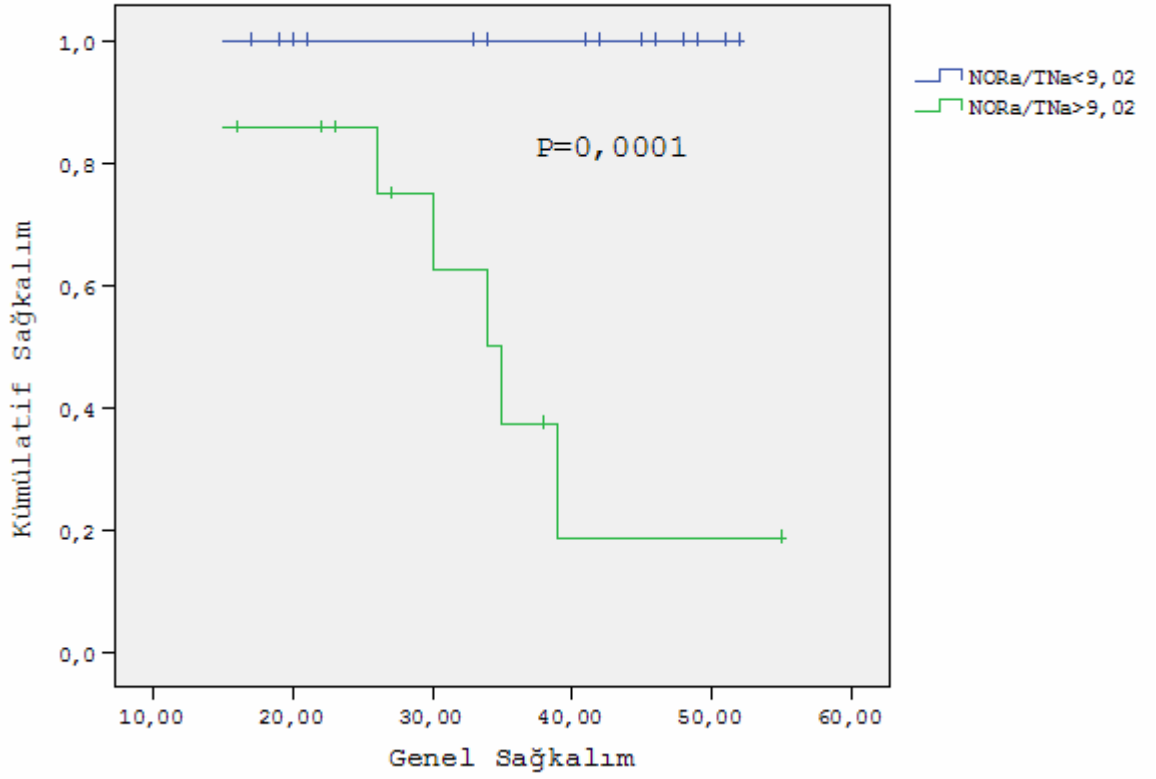
Ortalama NORa/TNa değeri 9,02'den daha aşağı olan olgular düşük NORa/TNa'lı grup, 9,02'den daha büyük olan olgular ise yüksek NORa/TNa'lı grup olarak ikiye

ayrıldı. Gruplar lenf nodu metastazı, kemoterapi rejimi, vasküler invazyon ve perinoral invazyon açısından *chi square* ( $\chi^2$ ) testi ile, tümör invazyon derecesi yönünden ise *Mann-Whitney U* testi ile değerlendirildi ve istatistiksel olarak, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı. İki grup hastalısız sağkalım ve genel sağkalım yönünden *Kaplan-Meier Metodu* kullanılarak değerlendirildi. Hastalısız sağkalım yönünden incelendiğinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p=0,0001$ , Şekil 4.8). İki grup genel sağkalım açısından değerlendirildiğinde ise; yine genel sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p=0,0001$ , Şekil 4.9).



**Şekil 4.8:** NORa/TNa Değerine Göre Gruplar Arası Hastalısız Sağkalım Eğrisi

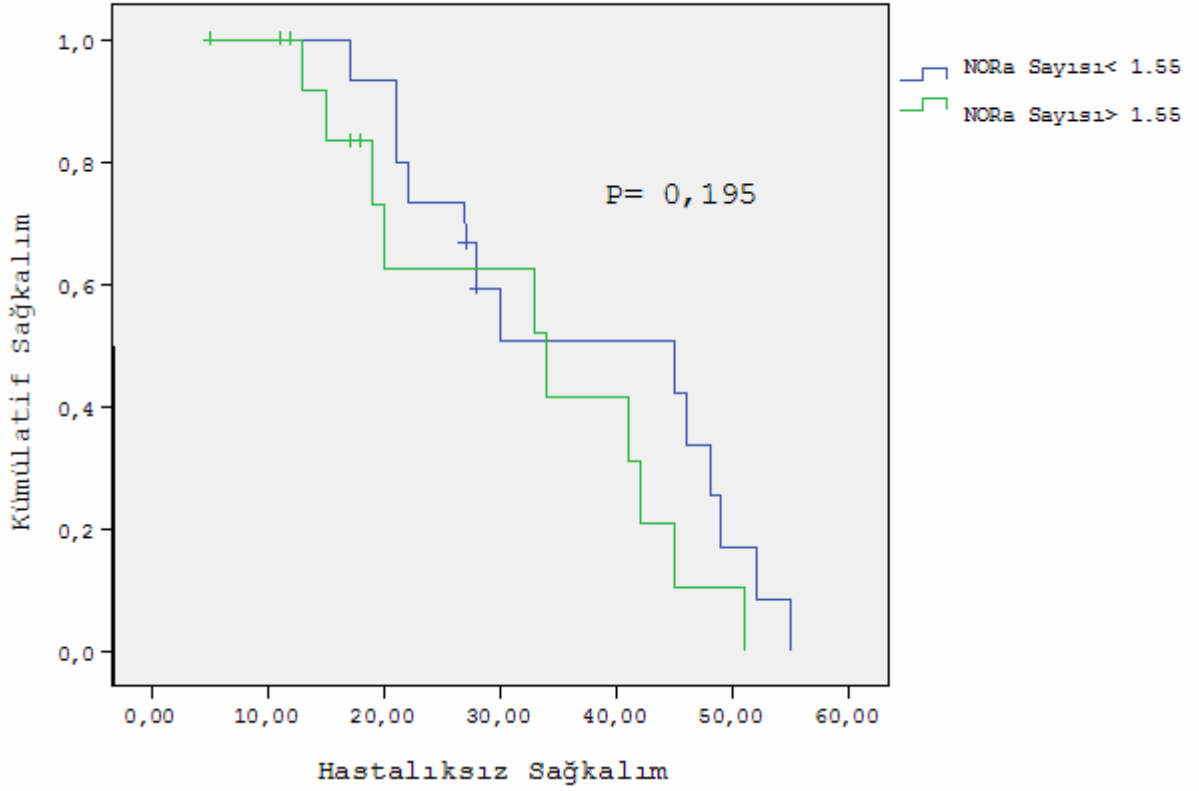




**Şekil 4.9:** NORa/TNa Değerine Göre Gruplar Arası Genel Sağkalım Eğrisi

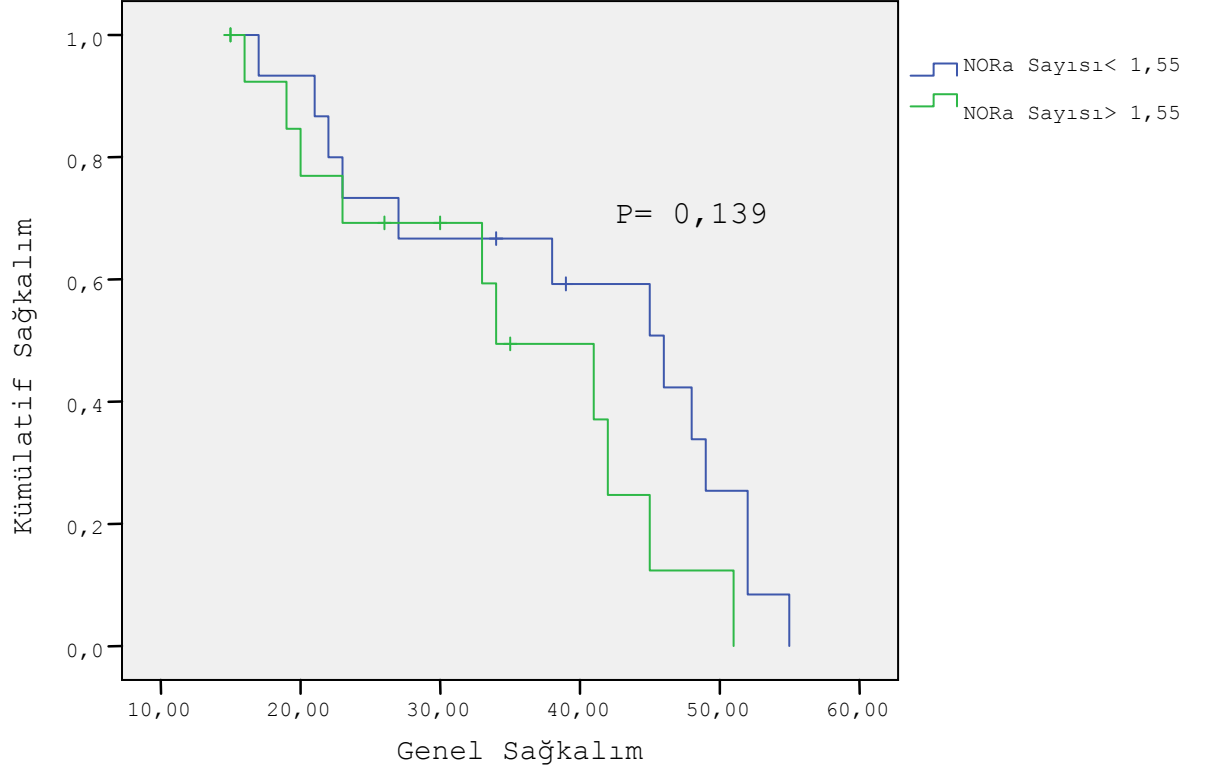
Yüksek NORa/TNa'lı grupta 7 olguda ölüm olayı gözlenirken; düşük NORa/TNa'lı grupta hiç ölüm olayı gerçekleşmediğinden dolayı, hem hastaliksız sağkalım hem de genel sağkalım için ortalama veya ortanca sağkalım değeri istatistiksel olarak değerlendirilemedi.

Olgular NORa sayısı yönünden incelendiğinde; NORa sayısı 1,55'den küçük olanlar küçük NORa'lı grup, NORa sayısı 1,55'den büyük olanlar ise büyük NORa'lı grup olarak ikiye ayrıldı. Küçük NORa'lı grup için ortalama hastaliksız sağkalım  $36,787 \pm 3,656$  ay, ortanca hastaliksız sağkalım ise 45 (18,089-71,911) ay olarak saptandı. Yüksek NORa'lı grup için ortalama hastaliksız sağkalım  $36,787 \pm 3,656$  ay, ortanca hastaliksız sağkalım ise 34 (13,344 – 54,656) ay olarak saptandı. İki grup arasında hastaliksız sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $\chi^2= 1,676$ ,  $p=0,195$ ). Grupların hastaliksız sağkalım eğrisi şekil 4.10'da gösterildi.



**Şekil 4.10:** NORa Sayısına Göre Gruplar Arası Hastaliksız Sağkalım Eğrisi

Düşük NORa'lı grup için ortalama genel sağkalım  $39,524 \pm 3,557$  ay, ortanca genel sağkalım ise 46,00 (33,336 – 58,664) ay olarak bulundu. Yüksek NORa'lı grup için ortalama genel sağkalım  $34,755 \pm 3,465$  ay, ortanca genel sağkalım ise 34 (23,470 – 44,530) ay olarak bulundu. Düşük NORa'lı ve yüksek NORa'lı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $\chi^2=2,190$ ,  $p=0,139$ ). Gruplar arası genel sağkalım eğrisi şekil 4.11'de gösterildi.



**Şekil 4.11:** NORa Sayısına Göre Gruplar Arası Genel Sağkalım Eğrisi

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Tümör patolojisindeki NOR (Nükleolus Organize Edici Bölge) analizlerinin pratik olarak uygulaması, 1986 yılında NOR'larla ilgili proteinleri belirlemek amacıyla basit argirofilik teknik (AgNOR yöntemi) tanımlandığında başlamıştır (90). NOR'lar bir hücredeki protein sentezinin düzenlenmesinde merkezi öneme sahip olup, büyüklük ve sayıları hem hücre çoğalma hızı hakkında bilgi verir hem de malign transformasyon sırasında değişiklik gösterebilir. İnterfazdaki AgNOR miktarı ve hücre çoğalması arasındaki ilişkinin gösterilmesi, AgNOR miktarının malign tümörler için etkin bir belirteç olabileceği gözlemi desteklemektedir. AgNOR analizlerinde gözle değerlendirme yönteminin subjektif olduğu, buna karşılık AgNOR alan analizlerinin daha gerçekçi ve daha verimli olduğu ileri sürülmüştür (91, 92). AgNOR prognozun bir belirteci olarak kabul edilebilir. Hastaların farklı risk gruplarına ayrılmalarına izin veren ve farklı tedavilerden fayda sağlanmasına olanak sağlayan diğer prognostik faktörlerle kıyaslandığında; AgNOR da istatistiksel olarak önemli bir değere sahiptir (90).

Eminović ve ark; NORa sayısını değerlendirdiği çalışmada (n=94) bu yöntemin tek başına prognostik faktörle ilişkilendirilemeyeceğini ifade etmişlerdir. NORa sayısı ile yaşam süresi arasında herhangi bir ilişki bulamamışlardır. Ancak NORa sayısı ile tümör diferansiasyonu arasında ilişki bulmuş ve kolorektal karsinomdan adenomu ayırt etmek için güvenilebilir olacağını ifade etmişlerdir (93).

40 kolorektal karsinomlu hasta ile yapılan bir çalışmada; NORa değerinin kolorektal noeplazmlar için, hücre proliferasyonunun direkt bir parametresi gibi görünmediği ve

AgNOR'un hücre proliferasyonunun bir belirteci olarak değerinin sorgulanabilir olduğu ifade edilmiştir (94).

60 Kolorektal kanserli olgu üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise AgNOR sayısı ile flow sitometrik DNA analizi karşılaştırılmıştır. DNA indeksi, invazyon derinliği ve lenf nodu metastatazi ile ilişkilendirilirken; AgNOR sayısı ilişkili bulunamamıştır. Yine bu çalışmada hem DNA indeksi hem de AgNOR sayısı ile hastaların yaşam süreleri ile bir ilişkili bulunamamıştır (95).

Yine Japonya'da yapılan bir çalışmada (n=47); tümör dokusundaki NORa sayısı ile normal dokudaki NORa sayısı arasında anlamlı fark saptanmış fakat bunun prognoz ve diğer histopatolojik faktörlerle ilişkisi bulunamamıştır (96).

Öfner, 5-FU temelli kemoterapi alan evre II-IV kolorektal kanserli 64 hasta(47 hasta evre II-III, 17 hasta evre IV) ile yaptığı çalışmada ; hastaları NOR alanı  $4,8\mu\text{m}^2$ 'den küçük (düşük riskli grup) ve NOR alanı  $4.8\mu\text{m}^2$ 'den büyük (yüksek riskli grup) olarak ikiye ayırmıştır. 24 düşük riskli hastadan 2 tanesinde relaps gözlenirken, yüksek riskli 23 hastadan 10'unda relaps tespit etmiştir ve istatistiksel olarak aradaki fark anlamlıdır. Yine evre IV 17 hasta ortanca 12 aylık takipten sonra değerlendirilmiştir. Yüksek riskli gruptaki 10 hasta ölürlen, düşük riskli gruptaki hastaların hepsi hayatta bulunmuş ve tedaviye parsiyel veya tam cevap vermişlerdir (97).

52 kolorektal kanserli (Duke's A-D) hastada yapılan başka bir çalışmada, hastalar NORa sayısı 3,83'den küçük olanlar düşük AgNOR'lu grup ve 3,83'den büyük olanlar ise yüksek AgNOR'lu grup olarak ikiye ayrılmışlardır. Yaşam süreleri karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Yine NORa sayısı ile invazyon derinliği, peritoneal metastaz ve karaciğer metastazi arasında pozitif bir ilişki tespit edilmiştir (98).

NORa sayısına ilaveten NOR alanının hücre çekirdeğine oranının (NORa/TNa) da değerlendirildiği bu çalışmada; ortalama NORa/TNa değeri  $9,0260\pm 3,6807$  ve ortanca NORa/TNa değeri  $8,8313\pm 3,5850$  olarak bulundu. Ortalama NORa sayısı  $1,5530\pm 0,7610$  ve ortanca NORa sayısı  $1,5250\pm 0,7300$  olarak bulundu. NORa/TNa değeri 9,02'den az olan hastalar düşük NORa/TNa'lı grup, 9,02'den fazla olan hastalar ise yüksek NORa/TNa'lı grup olarak ikiye ayrıldılar. Benzer şekilde NORa

sayısı 1,55'den az olan hastalar düşük NORa'lı grup, NORa sayısı 1,55'den fazla olan hastalar yüksek NORa'lı grup olarak ikiye ayrıldı.

Literatürde NORa sayısı ile vasküler invazyon arasında bir ilişki gösterilememiştir. Bizim çalışmamız da literatürle uyumlu olarak NORa sayısı ile vasküler invazyon arasında bir ilişki saptanmadı ( $p=0,087$ ). Literatürde NORa/TNa'nın değerlendirildiği bir çalışma olmamakla beraber bizim çalışmamızda; NORa/TNa ile vasküler invazyon arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik bulunamadı ( $p=0,863$ ).

Yine literatürde NORa sayısı ile perinoral invazyon arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. NORa sayısı ile perinoral invazyon arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bizim çalışmamızda da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $p=0,847$ ). NORa/TNa'nın değerlendirildiği başka bir çalışmaya literatürde rastlanmadı. Bu çalışmada NORa/TNa ile perinoral invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ( $p=0,236$ ).

Literatürde lenf nodu metastazı ile NORa sayısı arasında anlamlı bir ilişkinin bulunmadığına dair çalışmalar mevcuttur (96-98). Bu çalışmada da lenf nodu metastazı ile NORa sayısı arasında, literatürle benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik saptanmadı ( $\chi^2=0,556$   $p=0,456$ ). NORa/TNa ile lenf nodu metastazı arasındaki ilişkiyi araştıran başka bir çalışma literatürde saptanmadı. Bu çalışmada NORa/TNa ile lenf nodu metastazı arasındaki ilişki de araştırıldı ancak, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $\chi^2= 1,094$   $p=0,296$ ).

Bu çalışmada NORa sayısı ile yerel-bölgesel yineleme arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmazken ( $p=0,671$ ), NORa/TNa ile yerel-bölgesel yineleme arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ( $p=0,020$ ).

Olguların 13 (%43,3)'ü 5-FU/FA kemoterapi rejimini alırken; 17 (%56,7)'si UFT/oral Folinik Asit kemoterapi rejimini almıştır. 5-FU/FA alan olguların ortalama genel sağkalım süresi  $41,845\pm 3,762$ , ortanca genel sağkalım süresi 46,000 (40,240-51,760) ay olarak saptandı. UFT/oral Folinik Asit alan olguların ortalama genel sağkalım süresi  $33,960\pm 3,203$  ve ortanca genel sağkalım süresi 34,000 ( 21,714-46,286) ay olarak bulundu. İki kemoterapi rejimi karşılaştırıldığında istatistiksel

olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p=0,091$ ). Ancak hastalıksız sağkalım açısından iki kemoterapi rejimi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı( $p=0,01$ ).

Literatürde prognostik faktör olarak NORa sayısı değerlendirildiğinde sonuçlar çelişkilidir. Bu çalışmada NORa sayısı sağkalım açısından korelasyon testleri ile incelendiğinde; NORa sayısı ile hastalıksız sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ( $p=0,028$ ). Yine NORa sayısı ile genel sağkalım arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik bulundu ( $p=0,035$ ). Literatürde sağkalım ile NORa/TNa'nın değerlendirildiği başka bir çalışmaya rastlanmadı. Bu çalışmada NORa/TNa değerinin incelendiği korelasyon testlerinde; NORa/TNa değeri ile hastalıksız sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ( $p=0,001$ ). Genel sağkalım ile NORa/TNa arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ( $p=0,019$ ).

Bu çalışmada olgular NORa sayılarına göre; düşük NORa sayılı ve yüksek NORa sayılı olmak üzere iki gruba ayrıldı. Literatürdeki bazı benzer çalışmalarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sağkalım farkları gözlenirken bazı çalışmalarda da istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. Bu çalışmada da gruplar hem hastalıksız sağkalım hem de genel sağkalım açısından Kaplan-Meier testi ile değerlendirildiğinde; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (sırasıyla  $p=0,195$ ,  $p=0,139$ ). Korelasyon testlerindeki anlamlı ilişki sağkalım analizlerine yansımamakla beraber bu sonuç da literatürdeki bazı çalışmalarla uyumludur. Bu sonucu olgu sayısının daha az olması ve takip süresinin kısa olması etkiliyor olabilir.

NOR oluşturan bölgelerin  $\mu\text{m}^2$  olarak alan değerinin incelendiği çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızda; NOR oluşturan bölgelerin alanı, aynı çekirdeğin alanına oranlanmış (NORa/TNa) ve % değer olarak bir sayı bulunarak morfometrik bir çalışma yapılmıştır. NORa/TNa ile değerlendirme yapılan başka bir çalışma da literatürde bulunamadı. NORa/TNa değerine göre iki gruba ayrılan olgular, Kaplan-Meier testi ile analiz edildiğinde; gruplar arasında hem hastalıksız sağkalım hem de genel sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p=0,0001$ ).

Tümör hücresinde artan NOR proteinleri, rDNA bölgelerinin daha fazla miktarda aktif olmasıyla ve buna bağlı olarak ribozomlarda daha fazla miktarda protein

senteziyle ilişkilidir. Bu proteinler tümörün daha fazla aktif olması, invazyon yeteneğinin artması ve metastaz oluşturma potansiyelinin artışında rol alıyor olabilir. Bu durum NOR alanı büyük tümörlerde daha kötü prognozu açıklayabilir.

Genel olarak proliferasyon indeksi yüksek olan tümörler hem kemoterapiye hem de radyoterapiye daha duyarlıdır. Buna bağlı olarak bu tümörlerin kemoterapiden ve radyoterapiden daha fazla fayda göreceği düşünülür. Bir proliferasyon belirteci olarak AgNOR incelendiğinde; düşük NORa/TNA değerine sahip olguların uygulanan tedaviden daha fazla yarar sağladıkları gözlenmektedir. Aksine tüm ölüm ve yerel-bölgesel yineleme olayları NORa/TNa değeri yüksek olgularda gözlenmektedir ve bu hastalar hem kemoterapiden hem de radyoterapiden daha az yarar görmektedirler. Öfner'in çalışmasında; 5-FU temelli kemoterapi alan evre IV olgularda da, düşük riskli grupta kısmi cevap veya tam cevap elde edilirken, yüksek riskli grupta ölüm olayları anlamlı şekilde fazladır (97). Bununla ilişkili olarak da NORa/TNa yüksekliği kemoterapi resistansı ile ilgili başka parametrelerle de ilişkili olabilir ve özellikle 5-FU temelli kemoterapinin etkinliğini gösteren bir belirteç olarak da kullanılabilir.

Sonuç olarak; kolorektal tümörler son yıllarda gelişen yeni tedavi ajanlarına rağmen hem sosyal ve ekonomik hem de onkolojik bir problem olmaya hâla devam etmektedir. Bir çok prognostik faktör değerlendirilmekle beraber günümüzde en önemli faktör, tümör invazyon derinliği ve lenf nodu metastazını içeren evreleme sistemidir. Gümüş boyama yöntemi ile boyanan NOR bölgelerinin kolorektal kanserler için; prognostik faktör olarak incelenmesinde; NORa sayı değeri bazı verileri açıklamakta yetersiz kalmaktadır. NOR bölgelerinin alanının hücre çekirdeğine oranlandığı morfometrik analizler, prognostik bir faktör olarak kolorektal kanserler için daha güvenli ve daha verimli gözükmektedir. Kolorektal kanserlerde AgNOR'un tedavi etkinliğine ve prognoza etkisini daha net olarak gösterebilmek için; daha büyük serili ve daha uzun takip süreli çalışmalara ihtiyaç vardır.



## KAYNAKLAR

1. Burt RW, Bishop DT, Cannon-Albright L. Population Genetics of Colonic Cancer. *Cancer*, 1993;70: 1719-1722
2. Boring CC, Squires and Tong T. Cancer Statistics. *CA Cancer J, Clin.* 1993;43/1: 7-26
3. Küçüksu N.M. Hacettepe Tıp Fakültesi Onkoloji Bölümü Klinik Onkoloji. 1996;301-306
4. Fenoglio - Preiser CM, Pascal RR, Perzin KH, Tumors of the Large and Small İntestine. *AFIP Fascicle*, 1990;2'nd Senes
5. Levin K, Dozois R, Epidemiology and Large Bomel Cancer. *World J of Surgery*. 1991;15: 562 -567
6. Bilir N. Cancer Frequency in Turkey. *Cancer*, 1981;11:93
7. Bilir N. Cancer Occurance in Developing Cantries İnternational Agency for Research on Cancer. *IARC Scientific Publ No:75*. Lyon 1986;303
8. Wogl TJ, Pepios W, Mack MG. Et al. Accurarcy of staging rectal tumors with contrast enhanced transrectal MR Imaging *AJR Am J. Roentgenol* 1997;168: 1427-1434
9. Marterson JA Jr, Gundersson LL. Colon and Rectum, İn. Perez CA, Bradly LW, eds *Principles and practice of Radiation Oncology*, 3'rd edition. Philadelphia; Lippincoft-Raven,1998;1489-1510
10. Fredriksson M, Bengtsson N-O, Hardell L, Axelson O. Colon Cancer, Physical Activity and Occupational Exposures; Case -Contral Study. *Cancer*, 1985;63: 1838-1842
11. Levin B. Nutrition and Colocectal Cancer, *Cancer*. 1992;70: 1723-1726
12. Dinçol D. Diyet. Vitaminler ve Kanser Güncel Gastroenteroloji. *Ocak* 1997;38-46

13. Sono T, Smith LS, and Contor CR. Immno - PCR very sensitive antigen dedectien by means of specific antibody- DNA conjugates. *Science*, 1992;258: 120-122
14. Dia Mendis E.P. *Clinical Chimica Acta*, 1997;257: 157-180
15. Karvar S. Molecular biology of colon Cancer. *Türk J Gastroenterol*, 1995;69: 280 – 284
16. Meltzer SJ, Ahnen DJ, Battfora H, Yokota J, and Cline MJ. Proto- oncogene abnormalites in colon cancers and adenomatous polyps.*Gastroenterology*, 1987;92: 1174-1180
17. Daniel C. Chung. Molecular Prognostic Markers and Colorectal Cancer. *The Search goes on Gastroentroenterology* 1998;114:1330-1338
18. Dukes C. E. The classfication of cancer of the rectum. *J. Pathol Bacterial*.1932;35: 323
19. Meyenberg C,Hunch Boni RA, Bertschinger P, et al. Endoskopik ultrasound and endorectal magnetic resonance imaging: A prospective,comperative study for preoperative staging and follow-up of rectal cancer. *Endoscopy*. 1995;27:469-479
20. 20. Zagoria RJ, Schlarb CA, Ott DJ, et al. Assesment of rectal tumor Infiltration utilizing endorectal MR imaging and comparision with endoscopic rectal sonography. *J Surg Oncol*. 1997;64:312-317
21. Schnall MD, Furth EE, Rosato EF, Kressel HY. Rectal tumor stage correlation of endorectal MR imaging and pathologic findings. *Radiology*. 1994;190:709-714
22. Grene FL, Stewart AK, Norton HJ. A new TNM staging strategy for node-positive (stageIII) colon cancer: an analysis of 50,042 patients. *Ann Surg*. 2002;236(4): 416-421
23. Macdonald JS, Avelrod R. Adjuvant therapy of colon and rectal cancer. In Ahlgren D, Macdonald JS (eds) *Gastrointestinal Oncology*, JB Lippincott Company.1992;383-395

24. Venook A, Goodnight J, Kumar S, et al. Practice guidelines for colorectal cancer. *The Cancer Journal from Scientific American* 1996;2:3A(suppl):23-36
25. Moertel CG; Chemotherapy for Colorectal Cancer. *N Eng J. Med.* 1994; 330:16:1136-1142
26. NIH Concensus Conference. Adjuvant therapy with colon and rectal cancer. *JAWA*, 1990;264(11):1444-1450
27. Keighley MRB and William NS. *Surgery of Anus, Rectum and Colon.* W.B Saunders Company. London,1993
28. Goligher J. *Surgery of the Anus Rectum and Colon.* 5'th Edition, Bailiere Tindal London,1984
29. Carman ML. *Colon and Rectal Surgery* Lippincott Company, Philadelphia, 1984
30. Andican A. *Maingot Abdominal Operasyonlar,çeviri.* Nobel Tıp Kitabevi İstanbul, 1989.
31. Heilderberg CG, Chaudhuri NK, Dannenberg P, et al. Fluorinated pyrimidines. A new Class of tumor inhibitory compounds. *Nature*, 1957;179:663-666
32. Vietti T, Eggerding F, Aaleriote F. Combined effect of Xradiation and 5-Fluorouracil on survival of transplanted leukemic cells. *J Natl Cancer Inst.* 1971;47:865-870
33. Moertel CG, Childs DS Jr, Reitemeier RJ, et al. Combined 5-Fluorouracil and supervoltage radiation therapy of locally unresectable gastrointestinal cancer. *Lancet*, 1969;2:865-867
34. Gastrointestinal Tumor Study Group; Prolongation of the disease-free interval in surgically treated rectal carcinoma. *N Engl J Med*; 1985;312: 1465-1472.
35. Douglass HO,Jr Moertel CG, Mayer RJ, et al. Survival after postoperative combination treatment of rectal carcinoma. *N Engl J Med.* 1986;315:1294-1295.

36. Kroak J, Moertel C, Wieand H, et al. Radiation versus sequential chemotherapy radiation- chemotherapy. A study of the North Central Cancer Treatment Group, Duke University and the Mayo Clinic (Abstr). Proc ASCO 1986;5:82
37. Kroak JE, Moertel CG, Gunderson LL, et al. Effective surgical adjuvant therapy for high risk rectal carcinoma. N Engl J Med.1991;324:709-715
38. Gastrointestinal Tumor Study Group Radiation Therapy and fluorouracil with or without MeCCNU for the treatment of patients with surgically adjuvant adenocarcinoma of the rectum (Abstr). Proc ASCO,1990;9:106
39. O'Connell M, Wieand H, Krook J, et al. Lack of value for MeCCNU as a component of effective rectal cancer surgical adjuvant therapy,interim analysis of intergroup Protocol 86:47-51 (Abstr), Proc ASCO,1991;1:134
40. O'Connell M, Martenson JA, Wie and HS, et al. Improving adjuvant therapy for rectal cancer by combining protracted-Infusion Fluorouracil with radiation therapy after curative surgery. N Engl J Med, 1994;331:502-507
41. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma. N Engl J Med, 1990;322:352-358
42. Wolmark N, Rockette H, Mamounas EP, et al. The relative efficacy of 5-FU+leucovorin (FU-LV), 5-FU+levamisole(FU-LEV), and 5-FU+leucovorin+levamisole (FU+LV+LEV) in patient with Duke's B and C carcinoma of colon; first report of NSABP C-04 (Abstr). Proc ASCO, 1996;15:25
43. O'Connell MJ, Laurie JA, Kahn M, et al. Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high-risk colon cancer. J Clin Oncol, 1998;16:1:295-300
44. Thierry A, Corrado B, Lamia MB, Matilda N, Josep T, Tamas H, Clare T, Marta Z, Philip C, John B, Isabella TF, and Aimery de Gramont for the Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon

- Cancer. *N Eng J Med*, 2004;350;23:2343-2351
45. Rider WD, Palmer JA, Mahoney LJ, et al; Preoperative irradiation in operable cancer of the rectum: report of the Toronto Trial. *Can J Surg* 1977;20:335-338
  46. Duncan W. Adjuvant radiotherapy in rectal cancer: the MRC Trials. *Br J Surg* 1985;72:59-62
  47. Roswit B, Higgins GA Jr., Keehn R. Preoperative irradiation for carcinoma of the rectum and rectosigmoid colon: report of a National Veterans Administration randomized study. *Cancer* 1975;35:1597-1602
  48. Higgins GA, Humprey EW, Dwight RW, et al: Preoperative radiation and surgery for cancer of the rectum: Veterans Administration Surgical Oncology Group trial II. *Cancer* 1986;58:352-359
  49. Gerard A, Buyse M, Nordlinger B, et al: Preoperative radiotherapy as adjuvant treatment in rectal cancer. Final results of a randomized of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Ann Surg* 1988;208:606-614
  50. Horn A, Halvorsen JF, Dahl O. Preoperative radiotherapy in operable rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1990;33:823-828
  51. Marsh PJ, James RD, Schofield PF. Adjuvant preoperative radiotherapy for locally advanced rectal carcinoma . Result of a prospective randomized trial. *Dis Colon Rectum* 1994;37:1205-1214
  52. Cedermark B, Johansson H, Rutqvist H, et al:The Stockholm I trial of preoperative short term radiotherapy in operable rectal cancer: a prospective randomized trial. *Cancer* 1995;75:2269-2275
  53. Stocholm Colorectal Cancer Study Group. Randomized Study on preoperative radiotherapy in rectal carcinoma. *Ann Surg Oncol* 1996;3:423-430.
  54. Goldberg PA, Nicholls RJ, Porter NH, et al. Long-term results of a randomized trial short-course low-dose adjuvant pre-operative radiotherapy for rectal cancer: reduction in local treatment failure. *Eur J Cancer* 1994;30:1602-1606

55. Medical Research Council Rectal Cancer Working Party. Randomized trial of surgery alone versus radiotherapy followed by surgery for potentially operable locally advanced rectal cancer. *Lancet* 1996;348:1605-1610
56. Pahlman L, Glimelius B, Cedermark B, et al: Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Eng J Med* 1997;336:980-987
57. Myerson RJ, Michalski JM, King ML, et al: Adjuvant radiation therapy for rectal carcinoma, predictors of outcome. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 1995;32:41-50
58. Rich TA, Skipper JM, Ajani JA et al: Preoperative infusional chemoradiation for stage T3 rectal cancer. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 1995;32:1025-1029
59. Chan RS, Tyler DS, Anscher MS, et al. Preoperative radiation and chemotherapy in the treatment of adenocarcinoma of the rectum. *Ann Surg* 1995;221:779-787
60. Minsky BD, Cohen AM, Kemeny N, et al: Enhancement of radiation induced downstaging of rectal cancer by 5FU and high dose leucovorin chemotherapy. *J Clin Oncol* 1992;10:79-84
61. Willet CG. The role of radiation therapy and 5-fluorouracil in colon and rectal cancer. *Semin Radiat Oncol* 1997;7:300-305
62. Rosia J. Gastrointestinal Trect in Ackerman's Surgical Pathology, 8 end Edition. J Rossai (ed) Mosby st.Louis 1996;589-781
63. Griffin MP, Bergstralh EJ, Coffey RJ, Bearth RW Jr., Melton LJ M. Predictors of survival after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 1987;60:2318-2324
64. Shirouzu K, Isomoto M, Morodomi T and Kakegama T. Carcinomatous Lymphatic Permatation. *Cancer* 1995;75:4-10
65. Lapertosa G, Baracchni P, Fulcheri E, Tanzi R. Prognostic value of the immunocytochemical detection of extramural venous invasion in Dukes colorectal adenocarcinomas, A Preliminary Study. *Am J Pathol*, 1989;135:939-945

66. Patt DJ, Brynes RK, Vandiman JW, Coppleson LW. Mesocolic Lymph Node is an important prognostic indicator for patients with carcinoma of the sigmoid colon. An immunomorphologic Study. *Cancer* 1975;35:1388-397.
67. Junguera LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology* (8th ed.). USA: Appleton Lange 1995; 48
68. Kart A. Kromoznmların ince yapısı. *Katkı* 1985; 7: 533 – 539
69. Demirtaş H. *Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ders Notları*. Erciyes Üniversitesi Yayınları No:90, Kayseri 1996 ; 55 – 56, 165 – 169
70. Günalp A, Ayfer Ş, Lüleci G ve ark. *Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı*(II. Baskı). Meteksan Yayınları No: 17, Ankara 1986 ; 63 – 69
71. Scheer U, Xia B, Merkert H, et all. Looking at christmas trees in the nucleolus. *Chromosoma* 1997; 105: 470-480
72. Lee W, Kim Y, Lee KY, et al. AgNOR of human interphase cells in relation to acrocentrik chromosomes. *Cancer Genet Cytogenest* 1999; 113: 14-18
73. Alberts B. *Molecular Biology Of The Cell* (3nd ed) In: Chapter 8: The Cell Nucleus. Nev York, USA: Garland Publishing,Inc. 1994 pp 335-400
74. Schwarzacher HG, Wachtler F, The functional significanse of nucleolar structures. *Anneles de Genetigue* 1991; 34: 151-160
75. Hiliker AJ and Appels R. The arrangement of interphase choromosomes: Structural and functional aspects.*Exp Cell Res* 1989, 185: 297-318
76. Verdun DH, Hubert J, Bourgeois CA, et al. Ultrastructural localization of AgNOR stained proteins in the nucleolus during structures. *Chromosoma* 1980; 79: 349-362.
77. Lindner LE, Improvements in the Silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 439-445
78. Wachter F, Hopman AHN, Wiegant J, et al. On the pozition of nucleolus organizer regions (NORs) in the interphase nuclei. *Exp Cell Res* 1986; 167: 227-240
79. Schwarzacher HG, Mikelsaar AV, Schnedl W. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenet Cell Genet* 1978; 20: 24-39

80. Biliński S.M. and Bilińska B. A new version of the AgNOR technique. A combination with DAPI staining. *J Histochem.* 1996;28: 651- 656
81. Platon D, Menager M, Jeannesson P, et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986; 18: 5-14
82. Robert FI, Junera HR, Geraud G, et al. Three dimensional organization of the ribosomal genes and AgNOR proteins during interphase and mitosis in PtK1 cells studied by confocal microscopy. *Chromosoma* 1993;102: 146-157
83. Underwood JCE, Giri DD. Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *Journal of Pathology* 1998; 155: 95-96
84. Goessens G. Nucleolar structure. *Int Rev Cytol* 1984; 84:
85. Busch H, Daskal Y, Gyorkey F. Silver staining of nucleolar granules in tumor cells. *Cancer Res* 1979; 39: 857-863
86. Jordan EG and McGovern JH. Nucleolar organizer regions. *J Cell Sci.* 1981; 52: 373
87. Wozniak ZM, Usson Y, Parazza F, et al. Quantitative analysis of three dimensional distribution for AgNOR proteins during interphase in leukemic cell. *Cytometry* 1996; 24:14-26
88. Crocker J and Egan MJ. Nucleolar organizer regions in pathology. *Br J Cancer* 1992;65: 1-7
89. Crocker J. Nucleolar organizer regions. *Curr Top Pathol* 1990; 82: 91-149
90. Pich A, Chiusa L, Margaria E . Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* 2000; 31: 133-141
91. Wai Pak M, Fai To K, Huai Chen M, Yuen Lo S, Kuen Lam P et al. Morphometric Analysis of Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Nasopharyngeal Carcinoma. *Head Neck.* 2000;22: 760-764
92. Chen Maohuai MD, CK Lee J, Lo S et al. Argyrophilic Nuclear Organizer Regions in Nasopharyngeal Carcinoma and Paraneoplastic Epithelia. *Head Neck* 2003;25:395-399



93. Senija Eminović-Behrem, Zlatko Trobonjača, Mladen Petrovečki, Renata Dobi-Babić, Milivoj Dujmović, Nives Jonjić. Prognostic Significance of DNA Ploidy Pattern and Nucleolar Organizer Regions(AgNOR) in Colorectal Cancer. *Croatian Medical Journal* 2000;41(2):154-158
94. Losi L, DiGregorio C, Fante R, Migaldi M, Roncucci L, Pedroni M, Ponz de Leon M, Trentini GP. Argyrophilic nucleolar organizer regions and bromodeoxyuridine and 3[H]- thymidine labelling indices in colorectal cancer. *Cell Prolif.* 1995;28(9):471-480
95. Adachi Y, Kido A, Mori M, Matsushima T, Shimono R, Inoue T, Sugimachi K. Nucleolar DNA content and nucleolar organizer regions in colorectal cancer. *J Surg Oncol .* 1995;Jul;59(3):177-180
96. Nishi Y, Takano Y, Kakita A. Analyses of PCNA and AgNOR on advanced colorectal cancer as predictive indicators of the prognosis. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1994;95(11):797-806
97. Öfner. In situ standardised AgNOR analysis: a simplified method for routine use to determine prognosis and chemthrapy efficiency in colorectal adenocarcinoma. *Micron* 2000;31: 161-164
98. Shiro Nakae, Takeshi Nakamura, Ryuichiro Ikegawa, Hiroshi Yoshioka, Junko Shirono, Yoshiki Tabuchi. Evaluation of Argyrophilic Nucleolar Organizer Region and Proliferating Cell Nuclear Antigen in Colorectal Cancer. *Journal of Surgical Oncology* 1998; 69:28-35

T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Mete GÜNDOĞ'a ait 'POSTOPERATİF KONKOMİTAN KEMORADYOTERAPİ İLE TEDAVİ EDİLEN EVRE II-III REKTUM KANSERLİ OLGULARDA NUCLEOLAR ORGANIZER REGION ( NOR ) PROTEİNLERİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ' adlı uzmanlık tezi, jürimiz tarafından Radyasyon Onkolojisi Ana Bilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih : 17/04/2008

imza

Başkan : Doç. Dr. Bünyamin KAPLAN

.....

Üye : Doç. Dr. Serdar SOYUER

.....

Üye : Doç. Dr. Işın SOYUER

.....

Üye : Doç. Dr. Metin ÖZKAN

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Oğuz Galip YILDIZ

.....