

**T.C.**  
**ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ**  
**İZZET BAYSAL TIP FAKÜLTESİ**  
**PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GASTROİNTESTİNAL SİSTEM KARSİNOMLARINDA**  
**EZH2'NİN E-KADERİN, KI67 VE P53 EKSPRESYONLARI**  
**VE KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. HİLAL AHSEN**

**BOLU-2012**



**T.C.**  
**ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ**  
**İZZET BAYSAL TIP FAKÜLTESİ**  
**PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GASTROİNTESTİNAL SİSTEM KARSİNOMLARINDA**  
**EZH2'NİN E-KADERİN, KI67 VE P53 EKSPRESYONLARI**  
**VE KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. HİLAL AHSEN**

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ**  
**Prof. Dr. Çetin BORAN**

**BOLU-2012**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresinde bilgi ve deneyimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum, değerli hocam anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Fahri YILMAZ'a, patoloji nosyonumuzun gelişmesinde büyük pay sahibi olan, beceri ve deneyimlerinden yararlandığım, yetişmemde emeği geçen değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Çetin BORAN'a, birikimlerini bizlerle paylaşan ve desteklerini bizlerden esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Gülzade ÖZYALVAÇLI'ya tezime katkılarından dolayı değerli hocam Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Aysu KIYAN'a, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım Dr. Gülan AKTAŞ ve Dr. Hüsna BAYRAKDAR'a, laboratuvarımızda beraber emek harcadığımız biolog arkadaşlarım Hatice KÜLKÖYLÜOĞLU, Yasemin KARAKAYA ve Arzu ÇITAK'a, bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip annem Fadim KURŞUN'a ve babam Ertuğrul KURŞUN'a ve fedakarlıkla her zaman yanımda olduğunu bildiğim sevgili eşim Osman AHSEN'e ve varlığıyla hayatımıza anlam katan biricik oğlum Mehmet AHSEN'e teşekkür eder, saygı ve sevgilerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	<b>vii</b>
<b>İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)</b>	<b>viii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>10</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>11</b>
2.1. Anatomi ve Histoloji	
2.1.1. Mide	
2.1.2. Kolon ve Rektum	
2.2. Epidemiyoloji	
2.2.1. Mide karsinomları	
2.2.2. Kolorektal karsinomlar	
2.3. Etyopatogenez	
2.3.1. Mide karsinomları	
2.3.2. Kolorektal karsinomlar	
2.4. Morfolojik Özellikler ve Sınıflama	
2.4.1. Mide karsinomları	
2.4.2. Kolorektal karsinomlar	
2.5. Evreleme	
2.5.1. Mide karsinomları	
2.5.2. Kolorektal karsinomlar	
2.6. Prognostik Faktörler	
2.6.1. Mide karsinomları	
2.6.2. Kolorektal karsinomlar	
2.7. EZH2	
2.8. P53	
2.9. E- KADERİN	
2.10. Ki67	

<b>3. MATERYAL VE METOD</b>	<b>27</b>
3.1. İmmünohistokimya	
3.2. İstatiksel Yöntemler	
<b>4. BULGULAR</b>	<b>29</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>38</b>
<b>6. ÖZET VE SONUÇ</b>	<b>44</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>46</b>

## ÖZET

### **Hilal AHSEN, Gastrointestinal Sistem Karsinomlarında EZH2' nin E-kaderin, Ki67 ve p53 Ekspresyonları ve Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkisi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Bolu, 2012**

İleri tetkik ve tedavi olanaklarına rağmen gastrointestinal sistem (GİS) karsinomları, en sık öldüren malign tümörler arasında yer almaları dolayısıyla önemlerini ve güncelliklerini korumaktadırlar. GİS karsinomlarında en önemli prognostik faktör invazyon derinliği ve metastazın bulunup bulunmamasıdır. Bu prognostik faktörlere ilave olarak başka pek çok farklı bağımsız prognostik faktörlerde tanımlanmıştır. Bir gen transkripsiyon repressörü olan EZH2'nin (enhancer of zeste homolog) aşırı ekspresyonunun, pek çok malign tümörde biyolojik malignensi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. EZH2'nin p53, Ki67 ve E-kaderin gibi tümör gelişimi ile ilişkili diğer genlerle de ilişkisinin olduğu iddia edilmektedir.

Biz çalışmamızda GİS karsinomlarında EZH2 ekspresyonunun, E-kaderin, Ki67 ve p53 ekspresyonları ile klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini araştırarak bu yolla, EZH2'nin GİS karsinomlarında prognostik bir markır olarak kullanılıp kullanılmayacağını ortaya koymayı amaçladık.

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı arşivinden seçilen 2002–2012 yıllarına ait 90 adet mide ve kolorektal karsinom olgusu retrospektif olarak değerlendirmeye alındı. Karsinomların 30 tanesi mide, 60 tanesi kolorektal yerleşimliydi. Olguların ana tümör dokusu ile metastatik tümör dokusuna ait parafin bloklarından uygun olanlarına immünohistokimyasal olarak EZH2, p53, Ki67 ve E-kaderin çalışıldı.

Mide ve kolorektal karsinomlarda EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi incelediğinde hem yaygınlığın hemde yoğunluğun ileri evre, metastatik ve kötü differansiye olgularda artmış olduğu görüldü. EZH2'nin diğer immünohistokimyasal markırlarla olan ilişki incelediğinde ise p53 ve Ki67 ile aralarında pozitif bir korelasyon mevcuttu. EZH2 ile E-kaderin arasında korelasyon negatifti ancak oldukça zayıftı. Çalışmamızda ayrıca mide ve kolorektal karsinomlarda ana tümör dokusu ile metastatik tümör dokusunda EZH2,

p53, Ki67 ve E-kaderin boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu araştırıldı. Hem mide hem de kolorektal karsinomlarda E-kaderin boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun ana tümör dokusunda daha fazla olduğu görüldü. EZH2, p53 ve Ki67 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu ise metastatik tümör dokusunda daha belirgindi.

Çalışma sonunda EZH2'nin klinikopatolojik parametrelerle ve diğer immunohistokimyasal markırlarla olan ilişkisi dikkate alındığında bu markırın prognozun belirlenmesinde kullanılabileceği görüldü. Aynı zamanda EZH2, diğer immunohistokimyasal markırlarla birlikte tümör progresyonunun geldiği aşama hakkında da bize bir fikir vermektedir.



## ABSTRACT

Despite the advanced examination and treatment opportunities; they continue to be significant today due to the fact that gastrointestinal system (GIS) carcinomas are among the most mortal malign tumors. Depth of invasion and metastasis are the most important prognostic factors in GIS carcinomas. In addition to these, many different independent prognostic factors such as serum CEA level, microscopic type and bcl-2 expression have been identified. In spite of such many prognostic factors determined, clinical and molecular heterogeneity observed in colorectal cancers requires the search for new prognostic factors.

The overexpression of EZH2, a receptor of gene transcription (enhancer of zeste homolog) is associated with biological malignancy in many malignant tumors. It has been observed that E-cadherin, an adhesion molecule in class of tumor suppressor gene, has negative correlation with EZH2 in prostate carcinoma. In addition, it is argued that the EZH2 is associated with other genes such as p53 and Ki67 in tumor development.

In this study, we aimed to research relationship of EZH2 expression with E-cadherin, Ki67 and p53 expressions and clinicopathologic parameters in GIS carcinomas, and to reveal whether or not EZH2 can be used as prognostic marker in the GIS carcinomas.

A total of 90 cases of gastric and colorectal resection materials, comprising 60 cases with colorectal resection and 30 cases with gastric resection were included in this study. Clinicopathologic parameters such as metastasis, stage and grade for each case were determined. Parafin sections were obtained and stained with EZH2, p53, Ki67 and E-cadherin immunohistochemically.

When examined the relationship of EZH2 staining extensiveness and intensity with clinicopathologic parameters in gastric and colorectal carcinomas, it has been observed that both extensiveness and intensity have increased in advanced stage, metastatic and poorly differentiated cases. When examined the relation of the EZH2 with other immunohistochemical markers, there was positive correlation between EZH2 and p53, and between EZH2 and Ki67. The correlation between EZH2 and E-cadherin was negative but extremely weak. In our study, the staining extensiveness

and intensity of the EZH2, p53, Ki67 and E-cadherin were also examined in metastatic tumor tissues and main tumor tissues. It appears that the staining extensiveness and intensity of E-cadherin was higher in the main tumor tissues in both gastric and colorectal carcinomas. The staining extensiveness and intensity of the EZH2, p53 and Ki67 was higher in metastatic tumor tissues.

At the end of the study, when considered relationship of EZH2 with clinicopathologic parameters and other immunohistochemical markers, it has been observed that this marker can be used in determination of the prognosis. At the same time, EZH2 can give us an opinion about the degree of tumor progression together with other immunohistochemical markers.

## 1. GİRİŞ

Kanser gelişiminin temelini normal bir hücrenin malign bir hücreye dönüşerek kontrolsüz çoğalması oluşturur. Normal bir hücrenin malign bir hücreye dönüşmesi için ise hücre genomunda bir takım değişiklikler ve mutasyonların olması gerekmektedir. Malign bir tümör gelişimi sonrasında da çoğunlukla rastlantısal şekilde mutasyonlar devam etmektedir. Yeni oluşan mutasyonlarla bazı onkogenler aktifleşirken bazı supresör genler devre dışı kalmaktadır. Zaman geçtikçe bu mutasyonların birikimi ile tümör progresyonu gerçekleşmekte tümörün invazyon ve metastaz yapma kabiliyeti ortaya çıkmakta ya da artmaktadır. Bu şekilde tümörün biyolojik davranışını bu moleküler değişiklikler tayin etmektedir. Hangi moleküler değişikliğin hangi tümörün biyolojik davranışı üzerine etki ettiğinin açığa çıkarılması yönünde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Başka bir deyişle tümörlerin prognozlarını etkileyen moleküler değişikliklerin tesbitini amaçlayan, pek çok araştırma yapılmaktadır.

Bizim çalışmamız da tümörlerde moleküler ya da genetik değişikliklerin irdelenmesi, bu değişikliklerin prognoz tahmininde kullanılmasının sağlanmasını amaçlamaktadır. Tümörün biyolojik davranışının tahmin edilmesi olgunun tedavisinin düzenlenmesine yardımcı olacak, bu ise yaşam süresini ve yaşam kalitesini arttıracaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Anatomi ve Histoloji

#### 2.1.1. Mide

Mide, sindirim kanalının en geniş yeri olup özefagus ile duodenum arasında yer alır (1). Kardial, fundus, korpus, antrum ve pilor olmak üzere beş anatomik bölüme oluşur (2).

Mide duvarı gastrointestinal kanalın diğer bölümlerine benzer şekilde mukozal, submukozal, muskularis propria ve serozadan oluşur. Midenin iç yüzeyi kaba pililerden oluşur. Bu mukozal ve submukozal katlantıları midede longitudinal olarak uzanırlar. Muskular tabaka ise dışta longitudinal, içte sirküler liflerden oluşur. Son bölümde kas lifleri çok fazla gelişerek pilorik sfinkteri oluştururlar. Mideyi en dıştan saran serozal tabaka peritondur (2).

#### 2.1.2. Kolorektal

Kalın bağırsaklar ortalama 1.5 m uzunluğundadır ve ileumun sonundan anüse kadar uzanırlar. Kolon; asenden kolon, transvers kolon, desenden kolon ve sigmoid kolon olmak üzere dört bölüme ayrılır (1). Ortalama 40 cm uzunluğunda olan sigmoid kolon 3. sakral vertebra hizasında rektumda sonlanır. Rektum yaklaşık 12 cm uzunluğundadır. Kolonun diğer kısımlarında görülen tenya ve haustralar burada kaybolur. Ayrıca bu bölümde appendiks epiploika ve mezokolon da yoktur (1,2).

Kalın bağırsak mukozal, submukozal, muskularis propria ve serozal olmak üzere dört tabakadan oluşur. Rektum mukozası kalın bağırsağın diğer bölümlerine oranla daha kalın, damardan zengin ve alttaki tabakaya daha gevşek olarak tutunmuştur (1).

## 2.2. Epidemiyoloji

### 2.2.1. Mide Karsinomları

Mide karsinomu dünyada erkeklerde ikinci, kadınlarda dördüncü en sık görülen tümördür. Görülme oranı ülkeler arasında belirgin farklılıklar göstermekle birlikte en sık görüldüğü yerler Japonya, Kolombiya, Finlandiya, Polonya, İzlanda, Rusya, Şili ve Çin'dir. Yüksek risk bölgelerinden düşük risk bölgelerine göç eden topluluklarda birinci jenerasyonda yüksek riskin korunduğu, ikinci jenerasyondan itibaren riskin yerel nüfusun risk düzeyine düştüğü gözlenmiştir. Bunun aksine riskin düşük olduğu bölgelerden yüksek insidansa sahip bölgelere göç edenlerde ise insidans kademeli olarak artmaktadır (3-5).

30 yaşından önce mide karsinomu seyrek görülmekle birlikte daha ileri yaş gruplarında sıklık giderek artar. Genç erişkinlerde erkek / kadın oranı yaklaşık 1'ken, 50 yaş üzerindeki nüfusta erkek / kadın oranı 2/1 olur (3).

Tanımı Lauren tarafından yapılan intestinal tip mide karsinomunun görülme oranı yaş ile artar ve kadınlardan daha çok erkeklerde görülür, diffüz tip ise intestinal tipe göre daha kötü prognozlidir ve genç erişkinlerde görülür (4). Erkek kadın oranı eşittir. Bu açıklamalardan mide karsinomunun birbirinden tamamen ayrı iki tipi olduğu anlaşılmaktadır (6).

### 2.2.2. Kolorektal Karsinomlar

Kolon karsinomunun da dünyadaki coğrafik dağılımı farklılık göstermektedir. En yüksek ölüm oranı ABD, Avustralya, Yeni Zelanda ve Batı Avrupa ülkeleridir. Meksika, Kuzey Amerika ve Afrika'da oran daha düşüktür. Kolorektal karsinom oranındaki coğrafi farklılıkların nedeni, başta diyet alışkanlıkları olmak üzere çevresel faktörlerdir (4).

Kolon karsinomları organ tümörleri içinde dünyada görülme sıklığı açısından üçüncü sıradadır (4). Kolorektal karsinom en sık 60-70 yaşları arasında pik yapar. Olguların %20'sinden daha azı 50 yaşın altındadır. Genç yaş grubunda kolorektal karsinom olması durumunda altta yatan genetik geçişli kolorektal karsinom sendromları veya ülseratif kolit gibi durumlar akla gelmelidir (6). Rektumdaki lezyonlarda erkek/kadın oranı 1.2/1 iken, daha proksimalde yerleşen tümörlerde cinsiyet farkı yoktur (4)

## 2.3. Etyopatogenez

### 2.3.1. Mide Karsinomları

Çevresel faktörler (diyet, düşük sosyoekonomik yaşam, sigara), kişisel faktörler (kronik gastrit, parsiyel gastrektomi hikâyesi, gastrik adenomlar) ve genetik faktörler (A kan grubu, ailede gastrik kanser öyküsü, herediter nonpolipozis kolorektal kanser sendromu (HNPCC), familyal gastrik karsinom) mide karsinomu gelişimindeki major faktörlerdir (7, 8).

Beslenme ve mide kanseri arasında direkt ve önemli bir ilişki vardır. Beslenme alışkanlığı, midede mikroçevre değişikliklerinin temelinde yatan etkidir. Protein malnutrisyonu, aşırı tuzlu gıda alımı, talk tozları gibi fiziksel iritanlar ve tütsülenmiş yiyecekler gibi kimyasal iritanların atrofik gastrit oluşturduğu bilinmektedir. Yine nitratlar, safra asitleri, A ve C vitamin eksikliklerinin intestinal metaplazi oluşturduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir(7, 8).

Helikobacter pilori (HP) enfeksiyonu, mide karsinomu gelişimindeki riski 5-6 kat artırır. HP sadece mide yüzey epitelinin üzerindeki mukus içerisinde bulunmaktadır. Bakteri tarafından üretilen çözünür ürünlerin ve / veya bakterinin oluşturduğu iltihabi infiltrasyonun karsinogenezde rolü olduğuna inanılmaktadır. HP zemininde zamanla atrofi, intestinal metaplazi, displazi ve nihayet karsinom gelişimi ortaya çıkmaktadır. Kronik inflamasyon ve HP'nin üreaz ile üreden ürettiği serbest amonyak mukozal hücre proliferasyonunu arttırmakta ve bu nedenle genomik mutasyon riski artmaktadır. Artmış oksidatif stres ve serbest oksijen radikalleri bir sonraki adımda DNA hasarını tetiklemektedir. Mide karsinomunun yüksek olduğu toplumlarda HP enfeksiyonu da sık görülmektedir. HP enfeksiyonlarının tümünün karsinom ile sonuçlanmaması, muhtemelen konağın bakteriye karşı cevabındaki farklılıklara bağlıdır (3, 4, 5, 9).

Genel olarak kronik atrofik gastritler, otoimmün gastrit, intestinal metaplazi, pernisiyöz anemi, Menetrier hastalığı (hiperplastik gastropati), kronik peptik ülser, parsiyel mide rezeksiyonu ve epitel displazileri mide karsinomu riskini arttırlar (3-5, 9, 10)

Diffüz tip karsinomlar ile karakterize familyal mide karsinomu sendromlarının temelinde, germ hücre serilerindeki E-kaderin mutasyonları bildirilmiştir (6).

### **2.3.2. Kolorektal Karsinomlar**

Kolorektal karsinomların patogeneğinde çevresel ve genetik faktörler rol oynar. Diyetle yoğun rafine karbonhidrat ve kırmızı et alımı, A, C ve E vitamin gibi antioksidanların eksiklikleri intestinal florayı, kimyasal dengeyi, sonuçta luminal içeriği değiştirerek kanser insidansını artırır. Lümendeki bakterilerin etkisi ile dekonjuge safra asitlerinden sekonder safra asitleri oluşmaktadır. Sekonder safra asitleri olan bütirat ve kısa zincirli yağ asitleri prokanserojendir. Sebze, meyve, bol lif ve folat, karoten, C vitamini, flavonoid gibi vitaminlerin ve antioksidanların alınımının karsinogenezi baskıladığı bilinmektedir. Tütün kullanımının ise kanser riskini direkt arttırdığı bilinmektedir (5, 11).

Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) sendromları %100 kanser sebebidir. Lynch sendromunda (HNPCC), DNA hatalı eşleşme tamir genlerindeki mutasyonlar sonucu mide, kalın bağırsak endometrium, over, üreter, beyin, ince bağırsak, hepatobiliyer sistem ve deri gibi organ ve dokularda kanser sıklığı artar. Gençlerde gelişen kolon karsinomlarında radyasyon, ülseratif kolit, FAP gibi altta yatan primer bir patoloji aranmalıdır (5, 11).






## **2.4. Morfolojik Özellikler ve Sınıflama**

### **2.4.1. Mide Karsinomları**

Mide karsinomları %50-60 pilor ve antrum, %25 kardia, kalan kısımda korpus ve fundusta yerleşirler. İnvazyon derinliğine göre mide karsinomu, perigastrik lenf düğümü tutulumu göz ardı edilerek, mukoza ve submukozada sınırlı kalıyor ise erken mide karsinomu olarak tanımlanır. Karsinom submukoza ve kas tabakasını aştığında ilerlemiş mide karsinomu olarak değerlendirilir. Tüm karsinomlar erken lezyonlar olarak başlar, ileri karsinoma dönüşürler (2,3).

Mide karsinomları makroskopik olarak ilk kez 1926'da Bormann tarafından sınıflanmıştır. İlerlemiş mide karsinomlarında bu sınıflamanın değişik uyarlamaları, erken mide karsinomlarında da Japon Gastroenteroloji ve Endoskopi Topluluğunun makroskopik sınıflaması kullanılmaktadır (Tablo 2.1) (2,3).

**Tablo 2.1: Gastrik karsinomların makroskopik sınıflaması (3)**

<b>İlerlemiş Mide Karsinomları İçin BORMANN Makroskopik Sınıflaması, 1926</b>	
Tip I Polipoid	
Tip II Fungatif	
Tip III Ülsere	
Tip IV İnfiltratif	
<b>İlerlemiş Mide Karsinomları İçin STOUT Makroskopik Sınıflaması,1953</b>	
Fungatif	
Penetran	
Yüzeyel yayılım	
Linitis plastika	
Bu özelliklere sahip olmayanlar	
<b>Erken Mide Karsinomları İçin Japon Gastroenteroloji ve Endoskopi Topluluğunun Makroskopik Sınıflaması, 1972</b>	
Tip I Kabarık	
Tip IIa Hafif kabarık	
Tip IIb Düz	
Tip IIc Hafif çökük	
Tip III Çökük	

Gastrik karsinomların yıllar içinde değişen farklı histolojik sınıflamaları yapılmıştır. Bunlar arasında Lauren sınıflaması, intestinal ve diffüz tip karsinomların tümörögenizde farklı patogenetik temele sahip karsinomları temsil etmesi açısından ayrı bir öneme sahiptir. Lauren'e göre intestinal tip karsinomlar prekürsör lezyonlardan gelişirler. Tüm gastrik karsinomların %70'i intestinal tiptir. Makroskopik görünüşleri genelde polipoiddir. Histolojik olarak mide duvar boyunca ekspansif büyüme paterninde yayılan, intestinal bezlere benzeyen tübüler yapılardan oluşurlar. Diffüz tip karsinomlar ise glanduler ya da duktuler yapı oluşturmaksızın



birbirinden ayrı duran, desmoplastik stroma içine gömülmüş karsinom hücrelerinden oluşurlar ve infiltratif yayılırlar (2-4). 1977'den beri tümörün histolojik tipine dayalı olan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflaması kullanılmaktadır (Tablo 2.2) (4,5).

**Tablo 2.2: Gastrik karsinomların histolojik sınıflaması (4,5)**

<b>LAUREN, 1965</b>	<b>WHO, 2000</b>
İntestinal tip	Adekarsinom
Diffuz tip	İntestinal tip
<b>MING, 1977</b>	Diffuz tip
Ekspansif	Papiller adenokarsinom
İnfiltratif	Tubuler adenokarsinom
<b>Japon Gastroenteroloji ve Endoskopi Topluluğu, 1981</b>	Müsinöz adenokarsinom
Papiller karsinom	Taşlı yüzük hücreli karsinom
Tubuler karsinom	Adenoskuamöz karsinom
Az differansiye karsinom	Skuamöz hücreli karsinom
Müsinöz adenokarsinom	Küçük hücreli karsinom
Taşlı yüzük hücreli karsinom	Undifferansiye karsinom
	Diğerleri

#### **2.4.2. Kolorektal Karsinomlar**

Kolorektal karsinomların %55'i rektosigmoid kolon, %22'si çekum ve çıkan kolon, %11'i transvers kolon, %6'sıda inen kolon yerleşimlidir. Makroskopik tipleri için özel bir sınıflama olmamakla birlikte mide karsinomları için tanımlanan alt tipler kolorektal karsinomlarda da uygulanır. 1-2 cm çapındaki karsinomlar adenomlar gibi görülebilirler. Daha büyük karsinomlarda ise farklı büyüme paternleri mevcuttur (2,3,5).

Çekum ve çıkan kolon tümörleri genelde polipoiddir ve obstrüksiyondan daha çok kanama, anemi gibi semptomlarla gelirler. Transvers kolon ve sol kolon tümörleri ise genellikle ülseratif-infiltratif morfolojidedir. Barsak duvarını çepeçevre sardıklarında peçete halkası şeklinde obstrüksiyon yaparlar (2, 3, 5, 9-12).

Kolorektal bölge yerleşimli kanserlerin yaklaşık olarak %85-90'ı adenokarsinom histolojisindedir (Tablo 2.3). Adenokarsinomların klasik tipinde uygulanan grade'leme sistemi, primer olarak tümör gland içeriğinin solid alanlar ile lümen oluşturmayan hücre kordon ve adalarının oranına dayanmaktadır (Tablo 2.4)(9).

Adenokarsinomların büyük bir kısmı oldukça iyi differansiyedir. Tipik olarak, yüksek mitotik aktiviteye sahip, malign kolumnar, daha az oranda küboidal veya poligonal epitel hücreleri ile döşeli, kolay tanınabilen orta-büyük boyutlarda düzensiz glandlardan oluşmaktadır. Gland lümenlerinde sıklıkla eozinofilik mukus ile nükleer ve selüler debris bulunur. Tümör, solid alanlardan oluşuyor ya da minimal gland formasyonu gösteriyorsa 'undifferansiye' olarak klasifiye edilir (4, 9).

**Tablo 2.3: Kolorektal karsinomların histolojik sınıflaması (4)**

<b>WHO, 2000</b>
Adenokarsinom
Müsinöz adenokarsinom
Taşlı yüzük hücreli karsinom
Skvamöz hücreli karsinom
Adenoskuamöz karsinom
Küçük hücreli karsinom
Medüller karsinom
Undifferansiye karsinom

**Tablo 2.4: Kolorektal Adenokarsinomlarda Gradeleme (9)**

Grade	Differansiyasyon	Kriter	AJCC
<b>G1</b>	İyi differansiye	> %95 gland formasyonu	Low grade
		Glandlar (>%75) büyük oranda düzgün	
		Yüksek grade'li sitolojik atipi yoktur	
<b>G2</b>	Orta differansiye	%50–95 gland formasyonu	Low grade
<b>G3</b>	Kötü differansiye	< %50 gland formasyonu	High grade
<b>G4</b>	Undifferansiye		High grade

## 2.5. Evreleme

### 2.5.1. Mide Karsinomları

Günümüzde evrelemede tümör, lenf düğümü ve metastaz (TNM) kriterlerinden oluşan sistem kullanılmaktadır (Tablo 2.5 ve 2.6) (4).

Uzak metastazların bazıları, supraklavikuler lenf düğümünde Virchow nodülü, göbekte deri altında Sister Mary Joseph nodülü, overlerde Krukenberg tümörü gibi özel adlar ile anılır (4).

Gastrik karsinomların primer tedavisi cerrahidir. Prognostik faktörlerin farklılıklarına göre tedaviye adjuvan kemoterapi ve radyoterapi eklenmektedir. 5 yıllık hastaliksız yaşam cerrahi ile tedavi edilmiş erken gastrik karsinomlarında % 90-95'ken ileri gastrik karsinomlarda bu oran % 10-15'tir (7).

**Tablo 2.5: Mide karsinomlarında TNM evrelemesi (4)**

<b>TNM Evrelemesi</b>	
<b>T= Primer tümör</b>	
Tx	Primer tümörün bulunamadığı durum
T0	Primer tümörün gösterilemediği durum
Tis	Karsinoma in situ
T1	Lamina propria (1a) veya submukoza (1b) invazyonu
T2	Muskularis propria (2a) veya subseroza (2b) invazyonu
T3	Seroza invazyonu
T4	Komşu organ invazyonu
<b>N= Bölgesel lenf düğümleri</b>	
Nx	Bölgesel lenf düğümlerinin bulunamadığı durum
N0	Bölgesel lenf düğümü metastazı yok
N1	1-6 lenf düğümünde metastaz
N2	7-15 lenf düğümünde metastaz
N3	15'den fazla lenf düğümünde metastaz
<b>M= Uzak metastaz</b>	
Mx	Uzak metastazın bulunmadığı durum
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

**Tablo 2.6: Mide karsinomlarında TNM evreleme grupları (4)**

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre 1A	T1	N0	M0
Evre 1B	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre 2	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre 3A	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
Evre 3B	T3	N2	M0
Evre 4	T4	N1,2,3	M0
	T1,2,3	N3	M0
	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

### 2.5.2. Kolorektal Karsinomlar

Kolorektal karsinomun evresi prognostik açıdan en önemli belirleyicidir. Dukes ve Kirklin tarafından önerilen sınıflamanın modifikasyonu olan ve 1954'de Astler ve Coller tarafından tanımlanan evreleme sistemi en sık kullanılan sistem olmuştur. Bugün ise en yaygın biçimde kullanılan sistem TNM sınıflaması olup Amerikan Kanser Cemiyeti evreleme sistemi kullanılmaktadır (Tablo 2.7 ve 2.8). Kullanılan sistem ne olursa olsun, cerrahi rezeksiyon sırasında ki evre ile 1 yıllık, 5 yıllık ve 10 yıllık yaşam süreleri arasında kuvvetli bir ilişki vardır (2).

**Tablo 2.7: Kolorektal karsinomlarda TNM evrelemesi (4)**

<b>TNM Evrelemesi</b>	
T= Primer tümör	
Tx	Primer tümörün bulunamadığı durum
Tis	Primer tümörün gösterilemediği durum
T0	Karsinoma in situ
T1	Tümör invazyonu submukozada
T2	Tümör invazyonu muskularis propriada
T3	Tümör invazyonu subserozada
T4	Tümör invazyonu komşu organlarda
N= Bölgesel lenf düğümleri	
Nx	Bölgesel lenf düğümlerinin bulunamadığı durum
N0	Bölgesel lenf düğümü metastazı yok
N1	1-3 lenf düğümünde metastaz
N2	4 ve 4'den fazla lenf düğümünde metastaz
M= Uzak metastaz	
Mx	Uzak metastazın bulunmadığı durum
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

**Tablo 2.8: Kolorektal karsinomlarda Dukes ve TNM evreleme grupları (4)**

<b>DUKES</b>	<b>TNM</b>			
	Evre 0	Tis	N0	M0
Evre A	Evre 1	T1	N0	M0
		T2	N0	M0
Evre B	Evre 2	T3	N0	M0
		T4	N0	M0
Evre C	Evre 3	Herhangi bir T	N1	M0
			N2	M0
	Evre 4	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

## 2.6. Prognostik Faktörler

### 2.6.1. Mide Karsinomu

Mide karsinomlarının prognozları pek çok faktörle ilgilidir:

**Tümör evresi:** En önemli bağımsız prognostik faktör tümörün evresidir. Tümörün makroskopik görüntüsü önemlidir. Polipoid, büyük intraluminal kitle yapan tümörlerin duvarda invazyon yapma sıklıkları daha düşüktür. Serozal invazyon, ileri evre belirleyicilerden biri olup kötü prognostik faktördür. İnvazyon derinliği arttıkça metastaz riski artmaktadır. T1 tümörlerde 5 yıllık sağkalım %95, T2 tümörlerde 5 yıllık sağkalım %40-80, T3 tümörlerde 5 yıllık sağkalım %11-50'dir (5).

**Bölgesel lenf nodu tutulumu:** Lenf düğümü tutulumu en önemli bağımsız prognostik kriterlerden biridir. Lenf düğümü tutulumu olmayan hastalarda 5 yıllık sağkalım insidansı %50 üzerindedir. N1 tümörlerde 5 yıllık sağkalım %44, N2 tümörlerde 5 yıllık sağkalım %30, N3 tümörlerde 5 yıllık sağkalım %11'dir (5).

**Lokalizasyon:** 5 yıllık sağkalım gösteren hastaların %80'inde tümöral lezyon midenin distal yarısındadır. Tümöral lezyon özofagogastrik bileşke ve kardia-fundusta ise uzun sağkalım beklenmez (5).

**Tümör boyutları:** Çap arttıkça invazyon derinliği ile de ilişkili olarak prognoz kötüye gider. 10 cm üzerindeki tümörlerde 5 yıllık sağkalım %0'dır (5).

**Lenfovasküler ve Perinöral invazyon:** Lenfatik invazyon varlığında 5 yıllık sağkalım %17 iken, kan damarı invazyonu varlığında 5 yıllık sağkalım %0'dır. Perinöral invazyon görülmeyen tümörler perinöral invazyona sahip tümörlerden daha iyi prognoza sahiptir (5).

**Mikroskopik tip ve histolojik grade:** İntestinal tip tümörler diffüz tip tümörlerden daha iyi prognoza sahiptir. Ayrıca adenoskuamöz, anaplastik, küçük hücreli ve nöroendokrin tümörler gibi yüksek gradeli tümörlerde prognoz daha kötü olduğu ileri sürülmektedir. CAP ( College of American Pathologists)'a göre ise küçük hücreli karsinom hariç mikroskopik tip evreden bağımsız olarak prognoza etkisizdir. Her evrede histolojik derece sağkalıma etkilidir. 5 yıllık sağkalım az differansiye tümörlerde %15, iyi differansiye tümörlerde %43'dür (5).

**Tümör sınırları:** Ekspansif ve çevresini iterek büyüyen tümörlerde prognoz iyidir. İnfiltratif tümörler ise kötü prognozludur (5).

**Hastanın yaşı:** Mide karsinomları tanıda gecikme ve diffüz hastalığın daha sık görülmesinin sonucu olarak gençlerde kötü prognoza sahiptir (5).

**İnflamatuvar reaksiyon:** Tümör ve normal doku arasındaki sınırdaki yer alan iltihabi infiltrasyonun varlığı iyi prognoz işaretidir (5).

**p53 protein:** p53 geninin ürünü olan proteinin fazla yapımı, sağkalımda azalma ile ilişkilidir. Bazı çalışmalarda ise böyle bir ilişkinin olmadığı ileri sürülmektedir (5).

**DNA ploidi ve hücre proliferasyon hızı:** DNA ploidi ve hücre proliferasyon hızı, mide karsinomu prognozunu değerlendirmede güvenilir göstergelerdir. DNA ploidisinde artış metastaz sıklığı ile koreledir (5).

### 2.6.2. Kolorektal Karsinom

Kolorektal karsinomların prognozu ile ilgili klinik ve patolojik parametreler oldukça fazladır. Bu prognostik faktörler American Joint Committee (Amerikan Kanser Cemiyeti) kolorektal çalışma grubu tarafından kategorilere ayrılmıştır. Bunlar sırası ile aşağıda özetlenmiştir (5).

**Evre:** İleri evre, kolorektal karsinomlarda en önemli kötü prognoz faktörüdür (5).

**Bölgesel lenf nodu tutulumu:** 4 ve 4'den fazla lenf nodunda metastaz TNM evrelemede üçüncü evre olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda 6 ve üzerinde lenf nodu tutulumu olan hastaların 5 yıllık sağkalım oranı %10 iken, 16 ve üzerinde lenf nodu tutulumu olan tüm hastaların 5 yıl içerisinde eksitusu bildirilmektedir (5).

**Serum CEA seviyeleri:** Tedavi ve takiplerde kullanılan serum CEA seviyeleri, 5 ng/ml üzerinde, artmış tümör evresi ile ilişkili kabul edilmektedir(5).

**Histolojik grade:** Tümörün grade'i ve prognozu arasındaki ilişkiyi düşük grade'li paternin oranı belirlemektedir (5).

**Vasküler ve perinöral invazyon:** İleri hastalığın bir göstergesi olarak varlıkları kötü prognoz işaretidir (5).

**Cerrahi sınırlar:** Kolonda radyal cerrahi sınırdaki tümör varlığı, mezorektumu çepeçevre saran cerrahi sınırlarda tümörün sınıra 2 mm'den yakın olması kötü prognoz kriteridir (5).



**Tümör sınırları ve inflamatuvar reaksiyon:** Çevresini iterek büyüyen ve normal doku ile arasında lenfoplazmositer hücre infiltrasyonu (lenfosit mantosu) bulunan tümörler, infiltratif büyüyen ve lenfosit mantosu olmayan tümörlere göre daha iyi prognozlu olarak kabul edilmektedirler (5).

**Mikroskopik tümör tipi:** Müsinöz adenokarsinomlar, taşlı yüzük hücreli karsinomlar, anaplastik karsinomlar sıradan adenokarsinoma göre kötü prognozlu, medüller karsinomlar ise daha iyi prognozludurlar (5).

**Onkogen ekspresyonu:** K-ras mutasyonu, nüks ile gelen hastalarda daha sık bulunmaktadır. p53 geninin ürünü olan proteinin fazla yapımının prognoz ile ilişkili olmadığı ileri sürülmektedir (5).

## 2.7. EZH2

EZH2, PcG (Polykomb Grup) protein ailesinin bir üyesidir ve 7. kromozom üzerinde bulunur. PcG ailesi proteinler, epigenetik transkripsiyonal repressör proteinlerdir. Bu proteinler hedef genin inaktivasyonu veya silinmesinde aktif görev alırlar. Söz konusu hedef genler, hücre ölümü, hücre siklus regülasyonu, hücre yaşlanması, differansiyasyonu ve kanser gelişimi ile ilgilidirler (13, 14).

EZH2 aynı zamanda histon lizin metil transferaz olarakta bilinir ve hücre gelişiminin embriyonik gen ekspresyonları ve çeşitlenmesi evresinde yüksek bir ekspresyon paternine sahiptir. Dokuların matürasyonu ve differansiyasyonu ile birlikte ekspresyonu azalmaktadır (15).

Karsinoma, lenfoma, malign melanoma ve yumuşak doku sarkomları gibi pek çok kanserde EZH2'nin aşırı eksprese edildiği bildirilmektedir. EZH2'nin aşırı ekspresyonu tümör progresyonu ve agresif tümör davranışı ile ilişkilidir (15, 16).

## 2.8. P53

P53 geni kromozom 17p13.1 üzerinde yerleşmiştir. Resmi ismi Tp53 ve protein ürünü ise p53'tür. Tümörlerin %50'sinde p53 mutasyonu vardır. Kansere bağlı ölümlerin üç önde gelen nedeni olan akciğer, kolon ve meme karsinomları da dahil olmak üzere hemen her kanserde p53 gen aktivitesinde homozigot kayıp bulunur. Çoğu olguda inaktivasyon oluşturan mutasyonlar somatik hücreler tarafından kazanılmıştır ve her iki p53 alelini de etkiler. Daha az sıklıkla bazı

bireylerde tek mutant allel kalıtsal geçer ve ikinci allelde spontan mutasyona uğrayarak tümör gelişir. Li-Fraumeni sendromu olan böyle bireylerin 50 yaşına kadar malign bir tümör geliştirme olasılığı genel popülasyondan 25 kat daha fazladır. P53 geninin wild tipi normal fonksiyonel tiptir. Normal hücrelerde bazal seviyede yapılı ve kısa ömürlü olup, ömrü 6–20 dakikadır. Mutant tipin ömrü ise 3–6 saat olup immünohistokimyasal olarak dokularda saptanabilir (17-21).

P53 proteininin major fonksiyonel etkinliği DNA hasarına yanıt olarak hücre siklusunu durdurması ve apoptozu başlatmasıdır. DNA hasarı oluştuğunda p53'ün yapımı artar, yıkımı azalır. Yapımı artan p53 hücre siklusunu p21 üzerinden durdurur ve hücre tamir genlerince tamir edilir. Tamir edilemez ise proapoptotik genleri uyararak apoptozu yönlendirilir ve mutasyonun yeni oluşacak hücrelere taşınması önlenir. p53'ün DNA tamirinde ATM (ataxia-telangiectasia-mutation) ve ATR (ataxia-telangiectasia and Rad3 related ) ile de ilişkisi vardır. Bunlar hasar durumunda hem p53 hemde DNA tamir genleri transkripsiyonlarını arttırırlar (20, 21).

P53 ayrıca onarım sürecine DNA onarımı ile ilgili proteini kodlayan GADD45'in transkripsiyonunu direkt olarak uyararak katkı sağlar. DNA tamiri gerçekleşirse, p53 MDM2'yi artırarak kendi yıkımını sağlar ve böylece hücre siklusunu bloke olmaktan kurtarır (21).

Daha öncede bahsedildiği gibi p53 homozigot kayıp olursa DNA hasarı onarılamaz, bölünen hücrelerde mutasyonlar kalıcı olur ve hücre malign transformasyona giden tek yönlü bir yola girer. Eğer bir tümörde p53 mutant ise kemoterapi ile oluşturulan DNA hasarına bağlı oluşması gereken apoptoz aksar ve bu tümörün kemoterapi ve radyoterapi tedavisine nisbeten dirençli olması beklenir. Şöyle ki: Bu tip tedaviler DNA'da tamiri mümkün olmayan hasar yani mutasyon oluşturarak tümör hücrelerini öldürür. Bunda p53 apoptoz yolu ile ölüme aracılık eder. p53 mutant olduğunda tümör hücreleri apoptozu yönlendirilemez (21).

## 2.9. E-kaderin

Kaderinler, E-kaderin, P-kaderin ve N-kaderin olmak üzere üç alt gruba ayrılır (22). E-kaderin, kalsiyum bağımlı homotipik etkileşim yoluyla (hem reseptör hem de ligand özelliğine sahip) epitelyal hücre-hücre adezyonunun baş mediatörüdür ve 120 kilo dalton ağırlığında bir transmembran glikoproteindir. Öncelikle hücrenin lateral duvarında bulunur ve hücre-hücre epitelyal adezyonda ve epitelin doku bütünlüğünün sağlanmasında kilit rol oynar (23, 24).

Kaderin genleri tümör süpresör genler olarak değerlendirilirler ekspresyonlarında ve fonksiyonlarında defekt olması, malign hücrelerin orjinlerinden uzaklaşmasına, daha hareketli ve invaziv fenotipe kavuşmalarına ve sonuçta metastaz yapmalarına yol açar (23).E-kaderinin hücre yüzey ekspresyonunun azalması özefagus, kolon, meme, over ve prostat kaynaklı olanlar dahil olmak üzere birçok kanser tipinde görülmüştür (25). E-kaderin genindeki 'germ line' mutasyonlar familial gastrik karsinoma yatkınlık oluşturabilir. Diffüz tipteki gastrik kanserlerde değişen oranlarda gen mutasyonu ve azalmış E-kaderin ekspresyonu görülür (21).

Kaderinler ekstraselüler alanda kalsiyumun bağlanabileceği bölgeler içerirler. İntraselüler alanda ise sitoplazmik hücre adezyon kompleksi diye adlandırılan kateninler ile uyumlu bağlantı bölgeleri mevcuttur (26). Kaderinler hücre içinde  $\beta$ -katenin ile bağlantılıdır. Bir arada koordinasyon içinde işlev yaparlar. Katenin genlerindeki mutasyonlarda sekonder olarak E-kaderin ekspresyonunu azaltır. Sonuç olarak hücre-hücre adezyonu bozulur (27, 28).

## 2.10. Ki67

Ki67 antijeni, hücre nükleusuna lokalize, yaklaşık 320 kDa-360 kDa olan iki adet polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Hücre siklusunun G0 fazı dışında tüm fazlarında bulunan nonhiston nükleer proteindir. Ki67 hem normal hücrenin hem de neoplastik hücrenin aktif proliferasyonunu göstermektedir (29).

Günümüze kadar farklı tümör dokularında Ki67 ekspresyonu çalışılarak tümörün proliferasyonu ve mitotik aktivitesi araştırılmaya çalışılmıştır (30). Birçok sistem tümörlerinde (meme, akciğer, özefagus, böbrek ve prostat kanseri, malign melanom, nonhodgkin lenfoma, glial tümörler) yüksek Ki67 oranı, kötü prognostik faktör olarak gösterilmiş olup biyolojik agresiflik ve hastalık seyri ile ilişkili bulunmuştur (31,32).

### 3. MATERİYAL VE METOD

Bu çalışmada Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı'na gönderilerek karsinom tanısı almış 2002–2012 yıllarına ait 90 adet mide ve kolorektal rezeksiyon materyalleri retrospektif olarak değerlendirmeye alındı. Karsinomların 30 tanesi mide, 60 tanesi kolorektal yerleşimliydi. Olgulara ait yaş, cinsiyet, tümöral kitlenin boyutu ve tümörün evresi gibi bilgiler arşivden derlendi.

Çalışmaya dahil edilen olguların H&E kesitleri arşivden çıkarılarak yeniden incelendi. Mide karsinomları Lauren sınıflamasına göre diffüz tip ve intestinal tip olarak iki gruba ayrıldı. Kolorektal karsinomlar WHO sınıflamasına göre iyi, orta ve kötü derecede differansiye olmak üzere üç gruba ayrıldı.

Ayrıca hem mide hem kolorektal karsinomlar için olgular metastatik ve nonmetastatik olarak katagorize edildi.

Olgularda tümörün histopatolojik evreleri (T) tespit edilerek T1- T2 olgular erken evre, T3- T4 olgular ise ileri evre olarak gruplandırıldı.

#### 3.1. İmmünohistokimya

Olguların ana tümör dokusu ile metastatik tümör dokusuna ait parafin bloklarından immünohistokimyasal çalışma için uygun olanlar seçildi.

EZH2 (Epitomics, Burlingame, California), p53 (Thermo, Fremont, CA), Ki67(Thermo, Fremont, CA) ve E-kaderin (Thermo, Fremont, CA) ile boyama yapılabilmesi için ana tümör ve metastatik tümör dokusu bloklarından 4 mikron kalınlığında kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen kesitler hidrasyondan sonra sitrat buffer içerisinde farklı derecelerde toplam 20 dakika kaynatılıp 20 dakika soğumaya bırakıldı.

Sonrasında kesitlerin endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu ile bloke edildi. Kesitlere protein bloğu uygulanarak kesitler p53 ve Ki67 primer antikoruyla 40 dakika, E-kaderin primer antikoruyla 60 dakika oda ısısında ve EZH2 primer antikoruyla 1 gece +4 derecede buzdolabında inkübe edildi.

Bunun ardından biotinylated goat anti-polyvalent ve Steptavidin peroksidase ile kesitler 15'şer dakika inkübe edildi. TBS (Tris-buffer saline)'de yıkandıktan sonra

renklendirici olarak 3.3'- diaminobenzidin (DAB) içeren kit (Thermo, Fremont, CA) kullanıldı. Son olarak Mayer's hematoksilen ile kesitler 2 dakika süreyle boyandı.

### 3.1.1 İmmünohistokimyasal Değerlendirme

EZH2, p53 ve Ki-67 için nükleer boyanma dikkate alındı. Boyanma yaygınlığı değerlendirilirken toplam 1000 hücre sayılarak pozitif boyanan nükleusların yüzdesi tespit edildi. Hiç boyanma yok ise skor '0', boyanan hücre sayısı % 25'in altında ise skor '1', %25-50 arasında ise skor '2', %50-75 arasında ise skor '3', %75'in üzerinde ise skor 4 olarak derecelendirildi. Boyanma yoğunluğu negatif (0), zayıf (1), orta (2) ve kuvvetli (3) olarak sınıflandırıldı.

E-kaderin için sadece membranöz boyanma dikkate alındı. Boyanma yaygınlığına boyanan alanda ki hücrelere bakılarak semikantitatif olarak 0 (boyanma yok), 1 (<%25), 2 (%25-50), 3 (%50-75) ve 4 (>%75) şeklinde skor verildi. Boyanma yoğunluğu ise 0 (negatif), 1(zayıf), 2(orta) ve 3(kuvvetli) olarak tanımlandı.

EZH2 ve K67 için pozitif kontrol olarak tonsilla palatina dokusu kullanıldı. p53 için glioblastoma multiforme ve E-kaderin için meme dokusuyla beraber memenin lobüler karsinomu pozitif kontrol olarak tesbit edildi. Negatif kontrol olarak TBS, primer antikorlar yerine ikame edildi.

### 3.2. İstatistiksel Yöntemler

EZH2'nin boyanma yaygınlık ve yoğunluğunun klinikopatolojik parametrelerle (differansiyasyon, evre ve lenf nodu metastazı) ilişkisi Mann-Whitney U testi ile araştırıldı. EZH2'nin boyanma yaygınlık ve yoğunluğunun tümör çapı ile ilişkisi için ise Kendall korelasyon testi kullanıldı.

Mide ve kolorektal karsinomlarda EZH2'nin boyanma yaygınlık ve yoğunluğu ile p53, Ki67 ve E-kaderin boyanma yaygınlık ve yoğunlukları arasındaki ilişki Kendall korelasyon analizi ile araştırıldı.

İmmünohistokimyasal markırların boyanma yaygınlık ve yoğunluğu yönünden ana tümör dokusu ile metastatik tümör dokusu arasındaki farkın istatistiksel analizi için ise Wilcoxon testi kullanıldı.

## 4. BULGULAR

Mide karsinom olgularının yaşları 43-86, kolorektal karsinoma olgularının yaşları ise 39-84 arasında değişiyordu. Ortalama yaş mide karsinomlarında 69.6 iken, kolorektal karsinomlarda 66.7 idi. Mide karsinom vakalarının 21 (%70.0)'i erkek, 9 (%30.0)'u kadın iken kolorektal karsinom vakalarının 40 (%66.7)'i erkek, 20 (%33.3)'si kadındı.

Mide karsinomlarının 15 (%50.0)'i intestinal tip, 15 (%50.0)'i ise diffüz tipte adenokarsinom histolojisindeydi. Bu grup içerisinde 4 (%26.7)'ü taşlı yüzük hücreli karsinom tipindeydi. İntestinal tiptekilerin 6 (%40.0) tanesi iyi differansiye adenokarsinom, 7 (%46.7) tanesi orta derecede differansiye adenokarsinom ve 2 (%13.3) tanesinde kötü differansiye adenokarsinom idi. Kolorektal karsinomların ise 38 (%63.3)'i iyi differansiye adenokarsinom, 19 (%31.6)'u orta derecede differansiye adenokarsinom ve 3 (%5.1)'ü kötü differansiye adenokarsinom idi.

AJCC sınıflamasına göre mide karsinomlarının 2 (%6.7)'si evre 1'de, 6 (%20.0)'sı evre 2, 19 (%63.3)'u evre 3 ve 3 (%10.0)'ü evre 4'de yer almaktadır. Kolorektal yerleşimli olanların ise 4 (%6.7)'ü evre 1'de (TNM), 9 (%15.0)'u evre 2, 43 (%71.7)'ü evre 3 ve 4 (%6.6)'ü evre 4'dür. Evre 1 ve 2 erken evre olarak bir grupta, evre 3 ve 4 ise ileri evre olarak diğer bir grupta toplandı. Buna göre mide karsinomlarının 8 (%26.7)'i erken, 22 (%73.3)'si ileri evre, kolorektal karsinomların ise 13 (%21.7)'ü erken, 47 (%78.3)'si ileri evreydi.

Lenf nodu tutulumu ise mide karsinomlarının 24 (%80.0)'ünde mevcuttu. Midede lenf nodu metastazı gösteren vakaların 12 tanesi diffüz tip adenokarsinomdu. Kolorektal karsinom vakalarında ise 13 (%21.7)'ünde lenf nodu tutulumu izlenirken, 47 (%78.3) olguda lenf nodu metastazı yoktu.

### 4.1. Mide Karsinomlarında İmmünohistokimyasal Markırların Boyanma Yaygınlığı ve Yoğunluğu

Mide karsinomlarında EZH2, p53, Ki67 ve E-kaderin boyanma yaygınlık ve yoğunluklarına ilişkin değerler tablo 4.1 ve 4.2' de görülmektedir. EZH2 boyanma yaygınlığına bakıldığında yüksek skorlu boyanan olgu sayısının daha fazla olduğu görüldü. E-kaderinde ise düşük skorlu boyanan olgular daha fazlaydı. İstatiksel olarak iki markır arasında zayıfta olsa negatif bir korelasyonun olduğu dikkati çektir

( $T_b = -0.20$ ). EZH2 boyanma yoğunluğu ve E-kaderin boyanma yoğunluğu arasında yine benzer şekilde negatif korelasyon gözlemlenirse de bu istatistiksel olarak son derece zayıf bir korelasyona tekabül ediyordu ( $T_b = -0.07$ ).

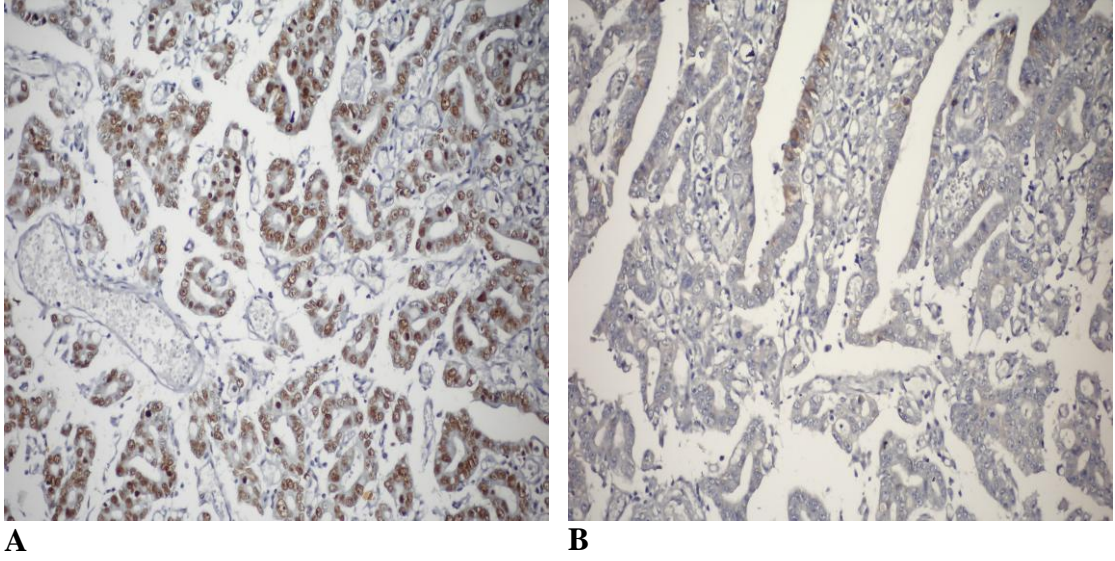
**Tablo 4.1: Mide Karsinomlarında İmmünohistokimyasal Boyanma Yaygınlığı**

	Negatif n(%)	(<%25) n(%)	(%25-50) n(%)	(%50-75) n(%)	(≥%75) n(%)
<b>EZH2</b>	2 (6.7)	2 (6.7)	7 (23.3)	11 (36.7)	8 (26.6)
<b>p53</b>	8 (26.6)	8 (26.6)	2 (6.7)	4 (13.5)	8 (26.6)
<b>Ki67</b>	–	1 (3.3)	6 (20.0)	11 (36.7)	12 (40.0)
<b>E-kaderin</b>	8 (26.6)	13 (43.3)	4 (13.5)	5 (16.6)	–

Mide karsinomlarında EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun p53 ve Ki67 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu arasında ki ilişki incelediğinde doğru orantılı bir artışın olduğu gözlemlendi. Ancak EZH2 ile p53 ve Ki67 rasındaki bu pozitif korelasyon istatistiksel olarak zayıf bir korelasyona tekabül ediyordu (p53 ve Ki67 için sırasıyla boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu korelasyon katsayıları:  $T_b = 0.12$  ve  $0.10$ ;  $T_b = 0.16$  ve  $0.14$ ).

**Tablo 4.2: Mide Karsinomlarında İmmünohistokimyasal Boyanma Yoğunluğu**

	Negatif n(%)	Zayıf n(%)	Orta n(%)	Şiddetli n(%)
<b>EZH2</b>	2 (6.7)	–	4 (13.5)	24 (79.8)
<b>p53</b>	8 (26.6)	4 (13.5)	10 (33.3)	8 (26.6)
<b>Ki67</b>	–	–	10 (33,3)	20 (66,7)
<b>E-kaderin</b>	8 (26.6)	6 (20.0)	6 (20.0)	10 (33.3)



**Resim 1: İntestinal tip mide adenokarsinom olgusunda EZH2 ve E-kaderin immün reaksiyonu. Kahverengi boyanma pozitif reaksiyonu gösteriyor. (A) EZH2 ile tümör hücre nükleuslarının tamamında (skor 4) şiddetli boyanma görülmekte. (B) Aynı olguda E-kaderin boyanma yaygınlığının ileri derecede azaldığı (skor 1) görülmekte (immunperoksidaz, x200).**

#### **4.2.Kolorektal Karsinomlarda İmmünohistokimyasal Markırların Boyanma Yaygınlığı ve Yoğunluğu**

Kolorektal karsinomlarda EZH2, p53, Ki67 ve E-kaderin boyanma yaygınlık ve yoğunluklarına ilişkin değerler tablo 4.3 ve 4.4' de görülmektedir. EZH2, p53 ve Ki67 için vakaların boyanma dağılımının genel itibariyle skor 3 ve 4'de toplandığı dikkati çekmiştir. EZH2 ile Ki67 aralarındaki pozitif korelasyon boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu yönünden orta şiddetteydi (Ki67 için sırasıyla boyanma yaygınlık ve yoğunluğu korelasyon katsayıları:  $T_b = 0.28$  ve  $0.30$ ). EZH2 ile p53 arasında boyanma yaygınlık ve yoğunlukları bakımından son derece zayıf bir pozitif korelasyon mevcuttu (p53 için sırasıyla boyanma yaygınlık ve yoğunluğu korelasyon katsayıları:  $T_b = 0.09$  ve  $0.12$ ). E-kaderin ile EZH2 arasındaki korelasyon ise negatifti ancak oldukça zayıftı (E-kaderin için sırasıyla boyanma yaygınlık ve yoğunluğu korelasyon katsayıları:  $T_b = -0.005$  ve  $0.25$ ).

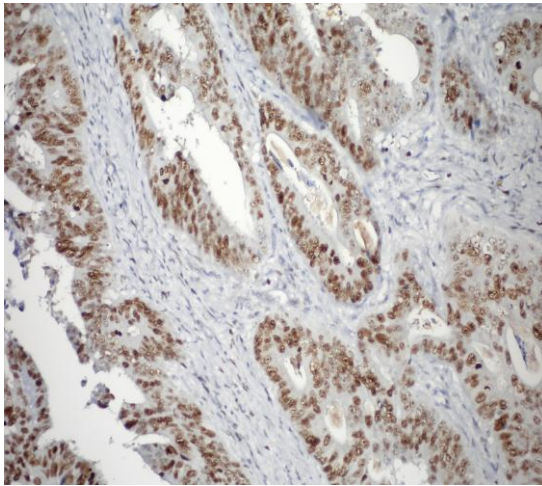


**Tablo 4.3: Kolorektal Karsinomlarda İmmünohistokimyasal Boyanma Yaygınlığı**

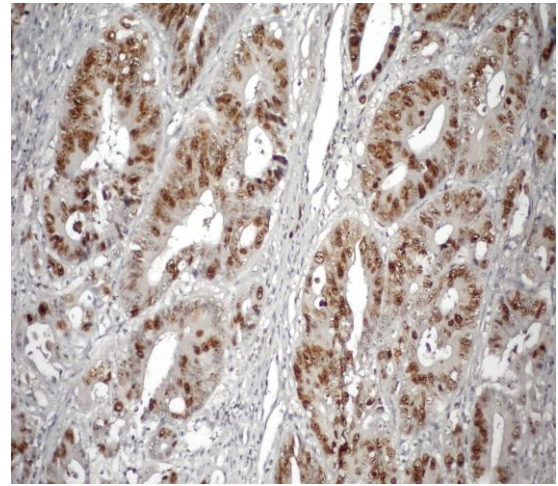
	Negatif n(%)	(<%25) n(%)	(%25-50) n(%)	(%50-75) n(%)	(≥%75) n(%)
<b>EZH2</b>	2 (3.3)	–	5 (8.3)	37 (61.7)	16 (26.7)
<b>p53</b>	10 (16.7)	8 (%13.3)	4 (6.7)	6 (10.0)	32 (53.3)
<b>Ki67</b>	2 (3.3)	–	1 (1.7)	17 (28.3)	40 (66.7)
<b>E-kaderin</b>	7 (11.7)	6 (10.0)	23 (38.3)	20 (33.3)	4(6.7)

**Tablo 4.4: Kolorektal Karsinomlarda İmmünohistokimyasal Boyanma Yoğunluğu**

	Negatif n(%)	Zayıf n(%)	Orta n(%)	Şiddetli n(%)
<b>EZH2</b>	2 (3.3)	–	18 (33.0)	40 (66.7)
<b>p53</b>	9 (15.0)	4 (6.7)	21 (35.0)	26 (43.3)
<b>Ki67</b>	2 (3.3)	–	6 (10.0)	52(86.7)
<b>E-kaderin</b>	7 (11.7)	1 (1.7)	16 (26.7)	36 (59.9)



**A**



**B**

**Resim 2: Orta derecede differansiye kolorektal adenokarsinom olgusunda EZH2 ve Ki67 immün reaksiyonu. Kahverengi boyanma pozitif reaksiyonu gösteriyor. (A) EZH2 ile tümör**

hücre nükleuslarının tamamında (skor 4) şiddetli boyanma görülmekte. (B) Aynı olguda Ki67 ile de benzer tarzda boyanma izlenmekte (immunperoksidaz, x200).

### 4.3. EZH2 Ekspresyonunun Mide ve Kolorektal Karsinomlarda Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkisi

#### 4.3.1. Mide Karsinomları

EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun mide karsinomlarında klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi incelendi. Lenf nodu metastazı mevcut olan vakaların ortalama boyanma yaygınlığı skoru 3.0 iken, lenf nodu metastazı yapmamış olan vakaların ortalama boyanma yaygınlığı skorunun 1.5 olduğu görüldü. EZH2 boyanma yaygınlığı yönünden lenf nodu metastazı mevcut olan ve olmayan vakalar arasındaki tespit edilen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.01$ ). Boyanma yoğunluğu bakımından lenf nodu metastazı yapan olguların ortalama boyanma yoğunluğu skoru yapmayanlara kıyasla daha yüksekti (lenf metastazı mevcut olan ve olmayan olguların sırasıyla ortalama boyanma yoğunluğu skoru: 2.83 ve 2.0). Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ( $p = 0.43$ ).

İleri evreye sahip gruptaki olguların % 90'ı skor 3 ve üzerinde boyanma yaygınlığı gösterirken erken evre vakalarının %75'i skor 3 ve üzerinde boyanma yaygınlığına sahipti. Ancak aralarındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 0.20$ ). İleri evre vakaların ortalama boyanma yoğunluğu skoru 2.82 iken erken evre vakaların ortalama boyanma yoğunluğu skoru 2.25'di. Ancak boyanma yoğunluğu bakımından da evreler arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamsızdı ( $p = 0.66$ ).

EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu yönünden mide karsinomunun intestinal ve diffüz tipleri incelediğinde, intestinal tipte ortalama boyanma yaygınlık skorunun 2.27, diffüz tipte ise 3.13 olduğu görüldü. EZH2 boyanma yaygınlığı yönünden bu iki tip arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.05$ ). Boyanma yoğunluğu bakımından diffüz tip adenokarsinom olgularının ortalama boyanma yoğunluğu skoru intestinal tiptekilere kıyasla daha yüksekti (intestinal ve diffüz tip olguların sırasıyla ortalama boyanma yoğunluğu skoru: 2.53 ve 2.80). Ancak boyanma yoğunluğu bakımından differansiyasyon grupları arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamsızdı ( $p = 0.90$ ).

Mide karsinomlarında EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun tümör boyutu ile ilişkisi araştırıldı. Tümör boyutu arttıkça EZH2 boyanma yaygınlığının da arttığı dikkati çekti. Ancak izlenen bu pozitif korelasyon istatistiksel olarak anlamlı değildi. EZH2 boyanma yoğunluğu için ise böyle bir artış izlenmedi (Tümör boyutu için sırasıyla EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu korelasyon katsayıları:  $T_b = 0.006$  ve  $0.00$ ).

#### 4.3.1. Kolorektal Karsinomlar

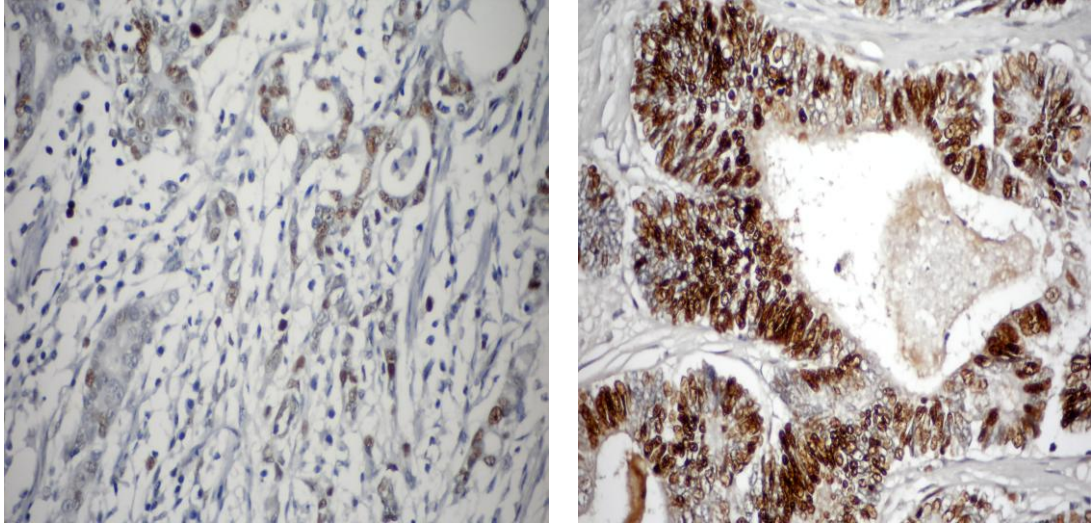
Kolorektal karsinomlarda EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun tümör boyutu, differansiyasyon, lenf nodu ve evre ile olan ilişkisi incelendi. İyi differansiye olgular bir grupta, orta ve kötü differansiye olgular diğer bir grupta toplanarak bu iki grup arasındaki farka bakıldığında kötü differansiye olguların (orta + kötü differansiye olgular) ortalama boyanma yaygınlık ve yoğunluğu skoru iyi differansiye olanlara kıyasla daha yüksekti (kötü ve iyi differansiye olguların sırasıyla ortalama boyanma yaygınlık ve yoğunluğu skoru:  $3.14$  ve  $3.04$ ;  $2.68$  ve  $2.55$ ). Ancak boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu yönünden differansiyasyon grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0.05$ ). İleri evre vakaların ortalama boyanma yaygınlık skoru  $3.13$  iken erken evre vakaların ortalama boyanma yaygınlık skoru  $2.92$  idi. Ancak boyanma yaygınlığı bakımından evreler arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamsızdı ( $p > 0.05$ ). Boyanma yoğunluğu bakımından da evreler arasında bir fark yoktu ( $p > 0.05$ ). Lenf nodu metastazı mevcut olguların ortalama boyanma yaygınlık ve yoğunluğu skoru mevcut olmayanlara kıyasla daha yüksekti. Ancak boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu yönünden lenf nodu metastazı mevcut olan ve olmayan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0.05$ ).

Kolorektal karsinomlarda EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu ile tümör boyutu arasında negatif bir korelasyon saptandı. İzlenen bu negatif korelasyon istatistiksel olarak anlamlı değildi (tümör boyutu için sırasıyla EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu korelasyon katsayıları:  $T_b = -0.22$  ve  $-0.05$ ).

#### 4.4. Mide ve Kolorektal Karsinomlarda Ana Tümör Dokusu ile Metastatik Tümör Dokusunda İmmünohistokimyasal Markırların Boyanma Yaygınlığı ve Yoğunluğu

Mide karsinomlarında ana tümör dokusu ile metastatik tümör dokusu arasında EZH2, p53, Ki67 ve E-kaderinin boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu incelendi. Ana tümör dokusunda EZH2'nin ortalama boyanma yaygınlık skoru 2.70 metastatik lenf nodunda 3.29'du. Ancak aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 0.14$ ). Boyanma yoğunluğu bakımındanda ana tümör ve metastatik odak arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ( $p = 0.13$ ). E-kaderin ortalama boyanma yaygınlık skorunun ana tümör dokusunda 1.2 metastatik lenf nodunda ise 0.29 olduğu, ortalama boyanma yoğunluk skorunun ise ana tümör dokusunda 1.6 metastatik lenf nodunda 0.29 olduğu izlendi. Boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu yönünden aradaki bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.01$  ve  $p < 0.01$ ). P53 ve Ki67 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu metastatik odakta ana tümöre göre daha belirgin olsa da aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı (p53 ve Ki67 için sırasıyla boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu:  $p = 0.75$  ve  $0.76$ ;  $p = 0.41$  ve  $0.31$ ).

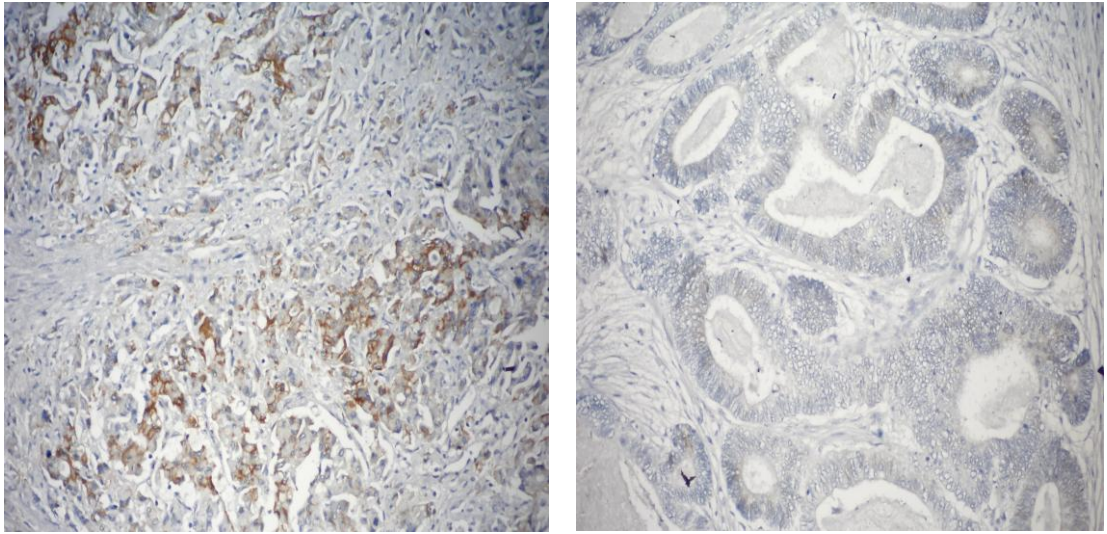
Kolorektal karsinomlarda da ana tümör dokusu ile metastatik tümör dokusu arasında EZH2, p53, Ki67 ve E-kaderinin boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu incelendi. p53 ortalama boyanma yaygınlık skorunun ana tümör dokusunda 2.7 metastatik tümör dokusunda ise 3.0 olduğu izlendi. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p = 0.04$ ). p53 için ana tümör dokusundaki ortalama boyanma yoğunluk skoru ise 2.07 iken metastatik odaktaki ortalama boyanma yoğunluk skoru 2.31'di. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ( $p = 0.48$ ). E-kaderin ortalama boyanma yaygınlık skorunun ana tümör dokusunda 2.13 metastatik tümör dokusunda 1.31 olduğu saptandı. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p = 0.03$ ). E-kaderin için ana tümör dokusundaki ortalama boyanma yoğunluk skoru 2.35 metastatik odaktaki ortalama boyanma yoğunluk skoru 1.54 olsa da fark istatistiksel olarak anlamsızdı ( $p = 0.059$ ). Metastatik tümör dokusunda EZH2 ve Ki67 için ortalama boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu skoru ana tümör dokusuna kıyasla daha yüksekti. Ancak aralarındaki bu fark anlamlı değildi (EZH2 ve Ki67 için sırasıyla boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu:  $p = 0.70$  ve  $1.00$ ;  $p = 0.31$  ve  $1.00$ ).



A

B

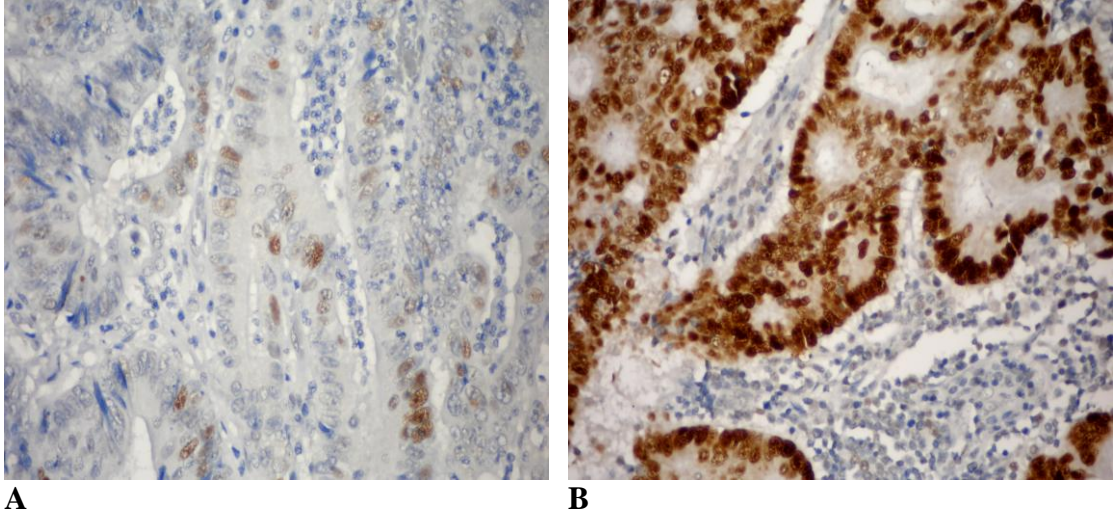
**Resim 3: İntestinal tip mide adenokarsinom olgusunda EZH2 immün reaksiyonu. Kahverengi boyanma pozitif reaksiyonu gösteriyor. (A) Ana tümör dokusunda hücre nükleuslarının %25-50'sinde (skor 2) orta şiddette boyanma görülmekte. (B) Aynı olgunun metastatik tümör dokusunda daha yaygın (skor 4) ve şiddetli boyanma izlenmekte (immunperoksidaz, x400).**



A

B

**Resim 4: İntestinal tip mide adenokarsinom olgusunda E-kaderin immün reaksiyonu. Kahverengi membranöz boyanma pozitif reaksiyonu gösteriyor. (A) Ana tümör dokusunda hücrelerin %50-75'inde (skor 3) orta şiddette boyanma görülmekte. (B) Aynı olgunun metastatik tümör odağında boyanma yaygınlığının ileri derecede azaldığı (skor 1) görülmekte (immunperoksidaz, x200).**



**A** **B**

**Resim 5: Orta derecede differansiye kolorektal adenokarsinom olgusunda p53 immün reaksiyonu. Kahverengi boyanma pozitif reaksiyonu gösteriyor. (A) Ana tümör dokusunda hücre nükleuslarının %25-50'sinde (skor 2) orta şiddette boyanma görülmekte. (B) Aynı olgunun metastatik tümör dokusunda daha yaygın (skor 4) ve şiddetli boyanma izlenmekte (immunperoksidaz, x400).**

## 5.TARTIŞMA

GİS karsinomları, Batı'da akciğer ve meme karsinomlarından sonra en sık ölüme neden olan malignite grubunu oluşturmakta ve insidansı birçok ülkede artış göstermektedir. Bu nedenle önem ve güncelliklerini korumaktadırlar (2).

GİS karsinomlarında en önemli prognostik faktör invazyon derinliği ve metastazın bulunup bulunmamasıdır. Bu prognostik faktörlere ilave olarak serum CEA yüksekliği, mikroskopik tip ve Bcl-2 ekspresyonu gibi pek çok farklı bağımsız prognostik faktörler tanımlanmasına rağmen, GİS kanserlerinde gözlenen klinik ve moleküler heterojenite yeni prognostik faktör arayışını zorunlu kılmaktadır (5).

Kanser hücrelerindeki genetik mutasyonlar hücrelerde protein kayıpları veya birikimleriyle sonuçlanabilmektedir. Hücrelerde biriken veya kayba uğrayan bu proteinler hücresel proliferasyonda artış veya neoplastik hücrelerin yayılması gibi istenmeyen etkilere neden olabilmektedir (2). Mide ve kolon karsinomlarında disregülasyona uğramış böylesi proteinler arasında en önemlileri p53, Ki67 ve E-kaderin proteinleridir. Bu proteinlerin genlerindeki mutasyonların, GİS karsinomlarında prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. EZH2 ise son yıllarda kanser araştırmalarında ve kanserlerin biyolojik davranışlarının belirlenmesinde önem kazanmaya başlamıştır.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, EZH2'nin artmış ekspresyonlarının birçok insan tümöründe tespit edildiği ve artmış EZH2 seviyesinin kanser saldırganlığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Son çalışmalarda benzer şekilde EZH2'nin aşırı ekspresyonunun endometriyum, prostat, mesane ve meme karsinomları ile lenfoma ve malign melanoma gibi birçok kanserde önemli prognostik parametrelerle ilişkili olduğu raporlanmıştır. Buna göre EZH2 tümör saldırganlığını belirlemede yeni bir markır ve molekülü hedef alan tedaviler için aday olabilir denilmiştir (33-43).

Bizde çalışmamızda, EZH2 ekspresyonunu, literatürde birçok çalışmada prognostik önemi ortaya konmuş olan p53, Ki67 ve E-kaderin ekspresyonları ve prognostik önemi olan bazı klinikopatolojik parametreler ile karşılaştırıp bu yolla EZH2'nin GİS karsinomlarında prognostik bir markır olarak kullanılıp kullanılmayacağını ortaya koymayı amaçladık.

Prostat kansinomlarında, Varambally ve arkadaşları (44) cDNA mikroarray analiz yöntemini kullanarak EZH2'nin aşırı ekspresyonunun tümör progresyonu ile korele olduğunu gösterilmişlerdir. Karanikolas ve arkadaşlarının (45) yaptığı çalışmada ise, prostat kanserlerinde evre ile EZH2'nin artmış ekspresyonu arasında güçlü pozitif bir korelasyonun olduğu saptanmıştır. EZH2'nin GİS kanserlerindeki malign transformasyon ve progresyon üzerine olan etkisi hakkında ise çok az bilgi vardır (33). Son yıllarda özellikle mide kanseri üzerine ilişkin yapılan çalışmalar dikkate değerdir. Bunlardan Matsukawa ve arkadaşları (46), EZH2 ekspresyonunun tümör boyutu, invazyon derinliği, lenfatik ve venöz invazyon, lenf nodu metastazı ve stage gibi prognostik faktörler ile korele olduğunu gözlemlemişlerdir. Artmış EZH2 ekspresyonuna sahip mide kanserli hastaların düşük ekspresyona sahip olanlardan daha kötü prognoza sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bizim çalışmamızda mide kansinomlarında EZH2 boyanma yaygınlığı lenf nodu metastazı olan grupta artmış olarak tespit edildi. Buna göre EZH2 ile daha yaygın boyanan mide kansinomlarının metastaz yapma ihtimalinin daha fazla olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun evre ile olan ilişkisine baktığımızda, ileri evreye sahip grupta EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun istatistiksel olarak anlamsız olsa da erken evreye kıyasla daha yüksek olduğunu saptadık. Bu bulgu tümör progresyonu ile birlikte EZH2 ekspresyonunda gittikçe arttığını göstermektedir.

EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu yönünden mide kansinomlarında intestinal ve diffüz tipler arasındaki fark incelendiğinde EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun diffüz tipte artmış olduğunu gözlemledik. Literatürde EZH2 ile histolojik tipler arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışma olmamakla birlikte bu iki histolojik tipin hem patogenetik temel hem de prognostik açıdan birbirinden ne kadar farklı olduğu bilinmemektedir. 2012 yılında Liu ve arkadaşlarının (47) yaptıkları bir araştırmada diffüz tip mide kansinomunun intestinal tipe kıyasla daha kötü prognoza sahip olduğu bir kez daha gösterilmiştir. Diffüz tip mide kansinomlarında EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun daha fazla olmasından hareketle, EZH2'nin kötü prognozu göstermede yardımcı faktörlerden biri olabileceğini söyleyebiliriz.

Mimori ve arkadaşlarının (48) kolon ve rektal kanserler üzerinde yaptıkları çalışmada EZH2'nin hem kolon hemde rektal kanserlerde bir onkogen ve kötü



prognozu işaret eden bir markır olduğuna inanılıyordu. Wang ve arkadaşları (49) ise 2010 yılında yaptıkları 119 kolorektal karsinom vakasından oluşan araştırmalarında kolorektal tümör lokalizasyonu ile EZH2 ekspresyonu arasında bir ilişki bulamamışlar da, EZH2 artmış ekspresyonunun malign fenotip ve kötü prognoza işaret ettiğini saptamışlardır. Bizde çalışmamızda EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun differansiyasyon, lenf nodu metastazı ve evre ile olan ilişkisini incelediğimizde istatistiksel olarak anlamsız olsa da EZH2 ekspresyonunun metastatik olgularda, kötü differansiye olgularda ve ileri evre olgularda daha yüksek olduğunu gözlemledik. Bu konuda yapılacak yeni çalışmalar EZH2'nin kolorektal karsinomlarındaki anlamı ve önemini netleştirecektir.

P53 genindeki değişiklikler insan tümörlerinde en sık rastlanan genetik değişikliktir (50). Normal fonksiyona sahip p53 geni tümör oluşumunu baskılar (51,52). Literatürde, p53 gen mutasyonunun birçok insan tümöründe kötü prognozla ilişkili olduğunu öne süren pek çok çalışma vardır. Bu çalışmalarda p53'ün artmış seviyelerinin akciğer, meme, mesane, prostat ve kolorektal karsinomlarda önemli prognostik faktörler ile olan ilişkisi gösterilmiştir (53-58). Yamaguchi ve Starzynska'nın (59,60) kolorektal karsinomlar üzerine yaptıkları çalışmalarda p53 ile pozitif reaksiyon gösteren tümörlerde daha fazla nüks saptanmış ve p53'ün lokal nüks riski yüksek hastaları belirlemek için kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Mide ve kolorektal karsinomlarda evre ve lenf nodu metastazı en güvenilir prognostik parametrelerdir (61-63). Joypaul ve arkadaşları (64) gibi birçok araştırmacı prognostik olarak önemli buldukları p53 ekspresyonu ile evre arasında anlamlı bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Yonemura ve arkadaşları gibi daha birçok araştırmacı da lenf nodu metastazı ile p53 ekspresyonunun korele olduğunu bildirmektedir (65-68). Bizim çalışmamızda EZH2 ile p53 gen ekspresyonları arasında zayıfta olsa pozitif bir korelasyon saptadık. Dolayısıyla bu pozitif korelasyon EZH2'nin tümör progresyonu ile birlikte ekspresyonun arttığını ve kötü prognoza işaret ettiğini bize göstermesi bakımından önemlidir.

Çoğalan hücrelerde eksprese edilen Ki67, tümörlerin prognozunu göstermede kullanılan bir proliferasyon belirleyicisidir (69). Ki67 antikoru, siklusun G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> ve M fazlarındaki hücrelerin nükleusunda miktarı artan bir proteindir. Ki67 çeşitli tümörlerde çalışılmış ve prognoz ile ilişkisi araştırılmıştır. Meme kanserli hastalarda

yapılan bazı çalışmalarda Ki67 proliferasyon indeksi ile önemi bilinen birçok prognostik faktör (histolojik derece, tümör çapı, lenf nodu durumu) arasında ilişki olduğu saptanmıştır (70,71). Ayrıca Wright ve Bush (72,73) gibi birçok araştırmacının mesane üzerine yaptıkları çalışmada Ki67 immunreaktivite indeksinin prognostik faktör olarak kabul edilebileceğini belirtmişlerdir. Mide ve kolorektal karsinomlarda Ki67'nin prognostik önemi olduğunu ortaya koyan çalışmalar da bulunmaktadır (69,74-76). Kyzer ve arkadaşları (76) 30 kolorektal karsinom rezeksiyon materyalinde Ki67 indeksinin evre, lenf nodu metastazı, tümör çapı, tümör differansiyasyonu, cinsiyet ve yaş gibi çeşitli parametrelerle ilişkisini değerlendirmişlerdir. Ki67 indeksi ile lenf nodu metastazı arasında korelasyon bulmuşlar, ancak diğer parametreler arasında bir ilişki saptamamışlardır. Mide ve kolorektal karsinomlar ile ilgili başka çalışmalarda, yüksek proliferasyon indeksi kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (77).

P53 mutasyonu ve Ki67 ile tespit edilen yüksek proliferasyon indeksinin kötü prognoz ile ilişkisini göz önüne aldığımızda EZH2 ile p53 ve Ki67 ekspresyonlarının karşılaştırılması ve korelasyonuna bakılması EZH2'nin tümörün biyolojik davranışı üzerine etkisi hakkında bize bir fikir verecektir. Literatürde dolaylı yoldan mide tümörlerinde bu tarz karşılaştırmalar yapılmıştır. Mide kanserli hastalardan oluşan 47 vakalık bir çalışmada, EZH2 ekspresyonunun Ki67 ve p53 ekspresyonu ile güçlü korelasyona sahip olduğu ve artmış ekspresyonunun uzak metastaz ve intestinal tip mide kanseri ile de yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir (78,79). Bundan yola çıkarak EZH2 ekspresyonunun artmış seviyelerinin kötü prognoz ile ilişkili olabileceği söylenmiştir. Ayrıca yakın zamanlarda yapılan mide kanserli hastalardan oluşan 138 vakalık başka bir çalışmada EZH2 ile p53 ve Ki67 arasındaki bu pozitif korelasyonu destekleyen veriler elde edilmiştir (33).

Çalışmamızda EZH2 ekspresyonunun mide ve kolorektal karsinomlarda p53 ve Ki67 ekspresyonları ile ilişkisini inceledik. Kolorektal karsinomlarda EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun Ki67 ile pozitif korelasyon gösterdiğini tespit ettik. Bu bulgu literatürde geçen sınırlı sayıdaki çalışma ile benzerlik arz ediyordu. Aynı tümörlerde p53 ile EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu açısından yine

pozitif bir korelasyon olsa da bu korelasyon son derece zayıftı. Mide karsinomlarında ise EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu açısından p53 ve Ki67 ile arasında yine zayıfta olsa pozitif bir korelasyon olduğunu tesbit ettik.

Malign epitelyal hücrelerdeki intersellüler kohezyon kaybının invazyon ile ilişkisi yaklaşık 60 yıl önce ilk defa Coman tarafından tanımlanmıştır (80). Bir adezyon molekülü olan E-kaderin, nerdeyse her türlü epitelyal malignensinin invazyon ve metastazında önemli bir rol oynar ve dolayısıyla invazyonu süprese eden gen olarak adlandırılır. Bu yüzden E-kaderin fonksiyonunda meydana gelen kayıp malign fenotip ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (81-85). Meme ve prostat karsinomları başta olmak üzere birçok organ tümöründe E-kaderin ekspresyonundaki azalmanın patolojik evre, uzak metastaz, rekürrens ve sağ kalım ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır (86-89). Mide ve kolorektal karsinomlarında da E-kaderin ekspresyonunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi birçok çalışmada araştırılmıştır. Stanculescu ve arkadaşları (83) 2011 yılında yaptıkları çalışmada 60 mide karsinom materyalinde E-kaderin ekspresyonunun kötü prognostik parametrelerle (invazyon derinliği, lenfatik invazyon ve lenf nodu metastazı) ilişkisini değerlendirmişler ve hastalığın ileri aşamalarıyla birlikte E-kaderin ekspresyonunun gittikçe azaldığı görülmüştür. Bu azalma lenf nodu metastazı ve invazyon derinliği gibi prognostik parametrelerle negatif bir korelasyona sahiptir. Dorudi ve arkadaşları (90) 72 kolorektal karsinom vakası üzerine yaptıkları çalışmada immünohistokimyasal yolla E-kaderin ekspresyonunu değerlendirmişler ve evresi yüksek olan daha agresif tümörlerde E-kaderin ekspresyonunda belirgin azalma izlemişlerdir. Başka bir çalışmada Schuhmacher ve arkadaşları (91) 29 kolorektal karsinom vakasında E-kaderin ekspresyonunu değerlendirmişler ve invazyon ve metastazla ilişkili bulmuşlardır. Bu çalışmalardan hareketle E-kaderin ekspresyonunu prognostik bir parametre olarak aldığımız bizim çalışmada hem kolorektal karsinomlarda hem de mide karsinomlarında E-kaderin boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu ile zayıf da olsa negatif korelasyona sahip olduğu görüldü yani EZH2'nin artmış ekspresyonu kötü prognoza işaret etmekteydi.

Bizim çalışmamızda olduğu gibi birçok çalışmada EZH2 ile E-kaderin ekspresyonları arasında negatif ilişki bulunmuştur. Prostat karsinomu üzerine yapılan

bir çalışmada EZH2 ekspresyonunun arttığı durumlarda E-kaderin ekspresyonunun azaldığı da gösterilmiştir (15). Bu negatif korelasyonun bu kadar bariz olmasının nedenleri üzerinde çalışmalar da yapılmış ve EZH2'nin E-kaderin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (15,92,93). Bu baskılamayı, tümör hücrelerindeki histon H3 metilasyonuna aracılık ederek yapmaktadır (93). E-kaderindeki bu azalma ise tümör invazyonuna ve metastazına yol açmaktadır denilmiştir. Bunun yanı sıra prostat karsinomu üzerine yapılan bir diğer çalışmada EZH2 ekspresyonunun arttığı durumlarda E-kaderin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (15).

Ayrıca, metastatik odağın ana tümör kitlesinden tümör progresyonu olarak daha ileride olup olmadığını anlamak için yaptığımız karşılaştırmada ana tümör dokusu ile metastatik tümör dokusu arasında EZH2, p53, Ki67 ve E-kaderin boyanma yaygınlıkları ve yoğunlukları açısından araştırma yapıldı. Hem mide hem de kolorektal karsinomlarda E-kaderin hariç diğer üç markırın hem boyanma yaygınlığı hemde yoğunluğunun metastatik odakta fazla olduğu izlendi. E-kaderin boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu ise ana tümör dokusunda fazla idi. Ancak bu farklar çoğunlukla istatistiksel olarak anlamsızdı. İstisna olarak mide karsinomlarına ait metastatik tümör dokularında p53 ve ana tümör dokularında ise E-kaderin boyanma yaygınlığının fazlalığı istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu sonuçlara göre ana tümöral kitleye kıyasla metastatik odaktaki tümöral dokunun progresyonunun daha fazla olduğunu söyleyebiliriz.

## 6. ÖZET VE SONUÇ

2002–2012 yılları arasında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı'nda incelenen 90 olgu çalışma kapsamına alındı. Bu olguların 30'u mide adenokarsinom 60'ı kolorektal adenokarsinom tanısı almıştı.

Olgular yeniden değerlendirilerek mide karsinomları intestinal ve diffüz tip adenokarsinom, kolorektal karsinomlar ise iyi, orta ve kötü differansiye adenokarsinom olarak ayrıldı. Ayrıca hem mide hem kolorektal karsinomlar için olgular metastatik ve nonmetastatik olarak katagorize edildi.

Olgularda, immunohistokimyasal olarak EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi yanı sıra p53, Ki67 ve E-kaderin ekspresyonları ile ilişkisi araştırıldı. Ayrıca EZH2, p53, Ki67 ve E-kaderin boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu yönünden ana tümör ve metastatik tümör dokuları arasındaki fark araştırıldı.

Mide karsinomlarında EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun lenf nodu metastazı ile ilişkisi incelendiğinde lenf nodu metastazı mevcut olgularda EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun daha fazla olduğu izlendi. Kolorektal karsinomlarda ise EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun lenf nodu metastazı ile ilişkisi incelendiğinde lenf nodu metastazı mevcut olgularda EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun daha fazla olduğu görüldü. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı.

Mide karsinomlarında EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun evre ile ilişkisi incelendiğinde ileri evre vakalarda EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun daha fazla olduğu görüldü. Kolorektal karsinomlarda EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun evre ile ilişkisi incelendiğinde ileri evre vakalarda EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun daha fazla olduğu görüldü. Ancak hem mide hem de kolorektal karsinomlar için gruplar arası EZH2 ekspresyon farklılıkları istatistiksel olarak anlamsızdı.

Mide karsinomlarında EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu ile intestinal ve diffüz tipler arasındaki ilişki incelendiğinde diffüz tip adenokarsinom vakalarında EZH2 boyanma yaygınlığının daha fazla olduğu görüldü. EZH2 boyanma yoğunluğu açısından bir fark saptanmadı. Kolorektal karsinomlarda EZH2 boyanma yaygınlığı

ve yoğunluğunu kötü differansiye olgularda iyi differansiye olanlara göre artmış olarak tespit ettik. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı.

Çalışmamızda mide ve kolorektal karsinomlarda EZH2 ile p53, Ki67 ve E-kaderin arasında boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu yönünden ilişki incelendi. Mide karsinomlarında EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu ile E-kaderin boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu arasında zayıfta olsa negatif bir korelasyonun olduğu dikkati çekti. EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu ile p53 ve Ki67 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu arasında ise pozitif bir korelasyon izlendi ancak bu zayıf bir korelasyona tekabül ediyordu.

Kolorektal karsinomlarda EZH2 ile Ki67 arasındaki tespit edilen pozitif korelasyon boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu yönünden orta şiddetteydi. EZH2 ile p53 arasında ise boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu bakımında son derece zayıf bir pozitif korelasyon mevcuttu. Kolorektal karsinomlarda EZH2 ile E-kaderin arasında korelasyon negatifti ancak oldukça zayıftı.

Çalışmamızda ayrıca mide ve kolorektal karsinomlarda ana tümör dokusu ile metastatik tümör dokusu arasında EZH2, p53, Ki67 ve E-kaderin boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu araştırıldı. Hem mide hem de kolorektal karsinomlarda E-kaderin boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun ana tümör dokusunda daha fazla olduğu görüldü. EZH2, p53 ve Ki67 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu ise metastatik tümör dokusunda daha belirgindi.

Çalışma sonunda mide ve kolorektal karsinomlarda EZH2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunun ileri evre, lenf nodu metastazı mevcut ve kötü differansiye olgularda artmış olarak izlenmesi bu markırın prognozunu belirlemede kullanılabileceğini gösterdi. EZH2, prognostik markır olarak kullanılabilecek diğer immunohistokimyasal markırlarlada ilişkili idi. Özellikle Ki67 ile aralarında pozitif bir ilişki mevcuttu. Bu bulgularda EZH2'nin prognostik bir göstergeç olabileceğine işaret etmektedir.

## 7.KAYNAKLAR

1. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. baskı Güneş Kitabevi, Ankara, 2001: 241-244, 251-257.
2. Liu C, Crawford JM. Gastrointestinal Sistem. In: Kumar V, Abbas A.K, Fausto N, Robins and Cotran Hastalığın Patolojik Temeli. Sav A, Özdamar Ş.O çeviri editörü, Güneş Tıp Kitapevi, 2009: 810–826.
3. Fenoglio- Presier CM, Noffsinger AM, Stemmerman GN, Lantz PE, Listrom MB, Rilke FO. Gastrointestinal Pathology An Atlas and Text. 3rd ed. Philadelphia, New York: Lippincott-Raven Publishers; 2008: 233–273, 899–1036.
4. Hamilton SR, Aaltonen LA. World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System. Lyon: IARC; 2000: 38–52, 103–143.
5. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. Edinburgh, London, Philadelphia: Elsevier; 2004: 776–855.
6. Crawford JM, Kumar V. Ağız Boşluğu ve Gastrointestinal Sistem. In: Kumar V, Cotran RS, Robins SL. Robins Temel Patoloji. Çevikbaş U. çeviri editörü, 7th ed. Nobel Tıp Kitapevi, 2003: 582–585.
7. Demirer T, İcli F, Uzunalımoğlu Ö, Kucuk Ö. Diet and Stomach Cancer Incidence. Cancer 1990 (65): 2344–2348.
8. Kono S, Hirohata T. Nutrition and Stomach Cancer. Cancer Causes and Control 1996 (7): 41–55.
9. Redstan M. Epithelial Neoplasms of the Large Intestine. In: Odze RD, Goldblum JR, Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas. 2th ed. Philadelphia, PA: Saunders 2009:597–637.
10. Cooper HS. Intestinal Neoplasms. In: Mills SE, Corter D, Greenson JK, Oberman HA, Reuter V, Stoler MH. Stenberg's Diagnostic Surgical Pathology. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2004: 1543–1601.
11. Ogino S, Brahmandam M, Cantor M et al. Distinct Molecular Features of Colorectal Carcinoma with Signet Ring Cell Component and Colorectal Carcinoma with Musinous Component. Mod Pathol 2004; 19: 59–68.

12. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders 2010: 259–330,763–831.
13. Lee HW, Choe M. Expression of EZH2 in Renal Cell Carcinoma as a Novel Prognostic Marker. *Pathol Int* 2012; 62: 735–741.
14. He LJ, Cai MY, Xu GL et al. Prognostic Significance of Overexpression of EZH2 and H3k27me3 Proteins in Gastric Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2012; 13: 3173–3178.
15. Chang CJ, Hung MC. The Role of EZH2 in Tumour Progression. *Br J Cancer* 2012; 106: 243–247.
16. Varambally S, Cao Q, Mani R et al. Genomic Loss of MicroRNA–101 Leads to Overexpression of Histone Methyltransferase EZH2 in Cancer. *Science* 2008; 322: 1695–1699.
17. Koçak N, Yıldırım Hİ, Yıldırım Cing S. p53 ve p53 Gen Ailesi Üyeleri Olan P63 ve P73'ün Hücresel İşlevleri. *Dicle Medical Journal* 2011;38:530–535.
18. Varley JM, Evans DGR, Birch JM. Li-Fraumeni Syndrome-a molecular and clinical review. *Brit J Cancer* 1997; 76: 1–14.
19. Yılmaz E, Altunok V. Kanser ve p53 Geni. *AVKE Dergisi* 2011; 1: 19–23.
20. Haris CC. Structure and Function of the p53 Tumor Suppressor Gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Nat Can Inst* 1996; 88: 1442–1455.
21. Stricker TP, Kumar V. Neoplasia In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robins and Cotran Hastalığın Patolojik Temeli. Sav A, Özdamar Ş.O çeviri editörü, Güneş Tıp Kitapevi 2009: 298–304.
22. Saygılı Ö, Gültekin F. Hücre Adezyon Molekülleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 1999; 19: 362–365.
23. Okegawa T, Pong R, Li Y, Hsieh J. The Role of Cell Adhesion Molecule in Cancer Progression and its Application in Cancer Therapy. *Acta Biochim Pol* 2004; 51(2): 445–457.
24. Khoursheed MA, Mathew TC, Makar RR et al. Expression of E-cadherin in Human Colorectal Cancer. *Surg J R Coll Surg Edinb Irel* 2003;1(2):86–91.
25. Hirohashi S, Kanai Y. Cell Adhesion System and Human Cancer Morphogenesis. *Cancer Sci* 2003; 94: 575–581.



26. Birchmeier W, Behrans J. Cadherin Expression in Carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198: 11–26.
27. Ghadimi BM, Behrens J, Hoffmann I et al. Immunohistological Analysis of E-cadherin,  $\alpha$ , $\beta$  and  $\gamma$  Catenin Expression in Colorectal Cancer: Implications for Cell Adhesion and Signaling. *Eur J Cancer* 1999; 35: 60–65.
28. Ikeguchi M, Makino M, Kaibara N. Clinical Significance of E-cadherin – Catenin Complex Expression in Metastatic Foci of Colorectal Carcinoma. *J Surg Oncol* 2001; 77: 201–207.
29. McCluggage WG. Immunohistochemistry as a Diagnostic Aid in Cervical Pathology. *Pathology* 2007; 39: 97–111.
30. Vizio D, Demichelis F, Simonetti S et al. Skp2 Expression is Associated with High Risk and Elevated Ki67 Expression in GIST. *BMC Cancer* 2008; 8: 134.
31. Bai M, Agnantis NJ, Kamina S, Demou A et al. In Vivo Cell Kinetics in Breast Carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 276–283.
32. Demirbağ RN, Batur Ş, Tarlacı A, Bilgili AM, Ersözlü T. Larinks Skuamöz Hücreli Karsinomlarında Ki67 Ekspresyonu ve Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkisi. *Haseki Tıp Bülteni* 2005; 43: 58–62.
33. Choi JH, Song YS, Yoon JS, Song KW, Lee YY. Enhancer of Zeste Homolog2 Expression is Associated with Tumour Cell Proliferation and Metastasis in Gastric Cancer. *Journal Compilation APMIS* 2010; 118: 196–202.
34. Tonini T, Bagella L, D'Andrilli G et al. EZH2 Reduces the Ability of HDAC1- Dependent pRb2/p130 Transcriptional Repression of CyclinA. *Oncogene* 2004; 23: 4930–4937.
35. Kleer CG, Cao Q, Varambally S et al. EZH2 is a Marker of Aggressive Breast Cancer and Promotes Neoplastic Transformation of Breast Epithelial Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 11606–11611.
36. Raaphorst FM, Mijer CJ, Fieret E et al. Poorly Differentiated Breast Carcinoma is Associated with Increased Expression of the Human Polycomb Group EZH2 Gene. *Neoplasia* 2003; 5: 481–488.

37. Sudo T, Utsunomiya T, Mimori K et al. Clinico-pathological Significance of EZH2 mRNA Expression in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92: 1754-1758.
38. Weikert S, Christoph F, Kollermann J et al. Expression Levels of the EZH2 Polycomb Transcriptional Repressor Correlate with Aggressiveness and Invasive Potential of Bladder Carcinomas. *Int J Mol Med* 2005; 16: 349-353.
39. Arisan S, Buyuktuncer ED, Palavan-Unsal N et al. Increased Expression of EZH2, a Polycomb Group Protein, in Bladder Carcinoma. *Urol Int* 2005; 75: 252-257.
40. Raaphorst FM, Von Kemenade FJ, Blokzijl T et al. Coexpression of BMI-1 and EZH2 Polycomb Group Genes in Reed-Sternberg Cells of Hodgkin's Disease. *Am J Pathol* 2000; 157: 709-715.
41. Visser HP, Gunster MJ, Kwin-Nelemans HC et al. The Polycomb Group Protein EZH2 is Upregulated in Proliferating, Cultured Human Mantle Cell Lymphoma. *Br J Haematol* 2001; 112: 950-958.
42. Dukers DF, Von Galen JC, Giroth C et al. Unique Polycomb Gene Expression Pattern in Hodgkin's Lymphoma and Hodgkin's Lymphoma-Derived Cell Lines. *Am J Pathol* 2004; 164: 873-881.
43. Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K et al. EZH2 Expression is associated with High Proliferation Rate and Aggressive Tumour Subgroups in cutaneous Melanoma and Cancers of the Endometrium, Prostate and Breast. *J Clin Oncol* 2006; 24: 268-273.
44. Varambally S, Dhanasekaron SM, Zhou M et al. The Polycomb Group Protein EZH2 is Involved in Progression of Prostate Cancer. *Nature* 2002; 419: 624-629.
45. Karanikolas BDW, Figueiredo ML, Wu L. Comprehensive Evaluation of the Role of EZH2 in the Growth, Invasion and Aggression of a Panel of Prostate Cancer Cell Lines. *The Prostate* 2010; 70: 675-688.
46. Matsukawa Y, Semba S, Kato H et al. Expression of the Enhancer of Zeste Homolog 2 is Correlated with Prognosis in Human Gastric Cancer. *Cancer Sci* 2006; 97: 484-491.

47. Liu L, Wang ZM, Ji J et al. A Cohort Study and Meta-Analysis between Histopathological Classification and Prognosis of Gastric Carcinoma. *Anticancer Agents Med Chem* 2012; 157: 327–349.
48. Mimori K, Ogawa K, Okamoto M et al. Clinical Significance of Enhancer of Zeste Homolog 2 Expression in Colorectal Cancer Cases. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 376–380.
49. Wang C-G, Ye Y-J, Yuan J et al. EZH2 and STAT6 Expression Profiles are Correlated with Colorectal Cancer Stage and Prognosis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2421–2427.
50. Porter PL, Gown AM, Kramp SG, Coltrera MD. Widespread p53 Overexpression in Human Malignant Tumors. *Am J Pathol* 1992; 140: 145–153.
51. Levine JA. p53, the Cellular Gatekeeper for growth and Division. *Cell* 1997; 88: 323–331.
52. Dowel PS, Hall AP. The p53 Tumour Suppressor Gene and Tumour Prognosis: is There a Relationship? *J Pathol* 1995; 177: 221–224.
53. Brookstein R, MacGregor D, Hilsenbeck SG et al. P53 is Mutated in a of Advencestage Prostate Cancer. *Cancer Res* 1993;53: 3369–3373.
54. Navone NM, Troncoso P, Pisters LL et al. P53 Protein Accumulation and Gene Mutation in the Progression of the Human Prostate Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1657-1669.
55. Aprikian AG, Sarkis AS, Fair WR et al. Immunohistochemical Determination of p53 Protein Nuclear Accumulation in Prostatic Adenocarcinoma. *J Urol* 1994; 151: 1276–1280.
56. Saini Y, Paakkö P, Nuorva K et al. Comparative Analysis of p53 Protein Immunoreaktivty in Prostatic, Lung and Breast Carcinomas. *Virch Arch Pathol Anat* 1992; 421: 223–228.
57. Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE et al. Prognostic Value of p53 Nuclear Overexpression in Patients with Invasive Bladder Cancer Treated with Neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1384–1390.

58. Wagner U, Savter G, Moch H et al. Patterns of p53, erb-2 and EGF-r Expression in Preamalignant Lesions of the Urinary Bladder. *Human Pathol* 1995; 26: 970–978.
59. Yamaguchi A, Kurasaka Y, Fushida S et al. Expression of p53 Protein in Colorectal Cancer and its Relationship to Short-term Prognosis. *Cancer* 1992; 70: 2778–2784.
60. Starzynska T, Bramley M, Marlicz K et al. Accumulation of p53 in Relation to Long-term Prognosis in Colorectal Carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepato* 1997; 9: 183–186.
61. Gurzu S, Jung J, Mezei T, Pavai Z. The Correlation Between the Immunostains for p53 and Ki67 with bcl-2 Expression and Classical Prognostic Factors in Colorectal Carcinomas. *Rom J Morphol Embryol* 2007; 48: 95–99.
62. Maehara T, Tamoda M, Hasuda S et al. Prognostic Value of p53 Protein Expression for Patients with Gastric Cancer-multivariate Analysis. *Br J Cancer* 1999; 79: 1255–1261.
63. Ichiyashi Y, Oiwa H, Tomisaki S et al. Overexpression of p53 is Associated with Growth Pattern and Prognosis in Advanced Gastric Cancer. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 546–553.
64. Joypaul BY, Hopwood D, Newman EL et al. The Prognostic Significance of the Accumulation of p53 Tumor Suppressor Gene Protein in Gastric Adenocarcinoma. *Brit J Cancer* 1994; 69: 943–946.
65. Yonemura Y, Takamura H, Ninomiya I et al. Interrelationship between Transforming Growth Factor Alpha Epidermal Growth Factor Receptor in Advanced Gastric Cancer. *Oncology* 1992; 49: 157–161.
66. Sanz-Ortega J, Steinberg SM, Mora E et al. Comparative Study of Tumor Angiogenesis and Immunohistochemistry for p53, c-erbB2, c-myc and EGFRas Prognostic Factor in Gastric Cancer. *Histol Histopathol* 2000;15: 455–462.
67. Iochim E, Goussia A, Stefanou D, Agnantis NJ. Expression of p53 Protein in Gastric Cancer: an Immunohistochemical Study with Correlation to Proliferative Activity. *Anticancer Res* 1997; 17: 513–517.

68. Lee WJ, Shun CT, Hong RL et al. Overexpression of p53 Predicts Shorter Survival in Diffuse Type Gastric Cancer *Br J Surg* 1998; 85: 1138–1142.
69. Brown DC, Gatter KC. Ki67 Protein: the Immaculate Deception. *Histopathol* 2002; 40: 2–11
70. Lee AK, Wlley B, Loda M et al. DNA Ploidy, Proliferation and Neoncogene Protein Overexpression in Breast Carcinoma. *Mod Pathol* 1992; 5: 61–67.
71. Barbareschi M, Leonardi E, Mouri FA et al. p53 and c-erbB2 Protein Expression in Brest Carcinoma. An Immunohistochemical Study Including Correlation with Receptor Status, Proliferating Markers and Clinical Stage in Human Breast Cancer. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 408–418.
72. Wright C, Mellon K, Thomas D. Expression of Retinoblastoma Gene Product and p53 Protein in Bladder Carcinoma: Correlation with Ki67 Index. *Br J Urol* 1995; 75: 173–179.
73. Bush C, Price P, Norton J et al. Proliferation in Human Bladder Carcinoma Measured by Ki67 Antibody Labelling. *Br J Cancer* 1991; 64: 357–360.
74. Kefeli M, Karagöz F, Baroş S ve ark. Kolorektal Karsinomlarda E-kaderin ve Ki67 Ekspresyonunun Evre, Histolojik tip ve Derece ile İlişkisi. *Türk Patoloji Dergisi* 2005; 21: 8–10.
75. Al-Moundhri MS, Nirmala V, Al-Hadabi I et al. The Prognostic Significance of p53, P27, HER-2/neu and Ki67 Proteins Expression in Gastric Cancer: a Clinicopathological and Immunohistochemical Study of 121 Arab Patients. *J Surg Oncol* 2005; 91: 243–252.
76. Kyzer S, Garden PH. Determination of Proliferative Activity in colorectal Carcinoma Using Monoclonal Antibody Ki67. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 322–325.
77. Oshima CT, Iriya K, Forones NM. Ki67 as a Prognostic Marker in a Colorectal Cancer but not in Gastric Cancer. *Neoplasma* 2005; 52: 420–24
78. Mattioli E, Vogiatzi P, Sun A et al. Immunohistochemical Analysis of pRb2/p130, VEGF, EZH2, p53, P16, P27, P21, Ki67 Expression Patterns in Gastric Cancer. *J Cell Physiol* 2007; 210: 183–191.

79. Matsukawa Y, Semba S, Kato H et al. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is Correlated with Poor Prognosis in Human Gastric Cancer. *Cancer Sci* 2006; 97: 484–491.
80. Coman DR. Decreased Mutual Adhesiveness a Property of Cells from Squamous Cell Carcinoma. *Cancer RS* 1944; 1: 625–629.
81. Saad AA, Awed NM, Abd Eklerim NNA et al. Prognostic Significance of E-cadherin Expression and Peripheral Blood Micrometastasis in Gastric Carcinoma Patients. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 3059–3067.
82. Tsanou E, Peschos D, Batistatou A et al. The E-cadherin Adhesion Molecule and Colorectal Cancer. *A Global Literature Approach Anticancer Research. Anticancer Res* 2008; 28: 3815–3826.
83. Stanculescu D, Margaritescu CL, Stepan A et al. E-cadherin in Gastric Carcinomas Related to Histological Prognostic Parameters. *Rom J Morphol Embryol* 2011; 52: 1107–1112.
84. Uchikado Y, Okumura H, Ishigami S et al. Increased Slug and Decreased E-cadherin Expression is Related to Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer. *Gastric Cancer* 2011; 14: 41–49.
85. Li Y, Chen C, He Y et al. Abnormal Expression of E-cadherin in Tumour Cells in Associated with Poor Prognosis of Gastric Carcinoma. *J Surg Oncol* 2012; 106: 304–310.
86. Brzozowska A, Sodolski T, Duma D et al. Evaluation of Prognostic Parameters of E-cadherin Status in Breast Cancer Treatment. *Ann Agric Environ Med* 2012; 19: 541–546.
87. Van Gils MP, Hessls D, Hulsbergen-van de Kaa CA et al. Detailed Analysis of Histopathological Parameters in Radical Prostatectomy Specimens and PCA3 Urine Test Result. *Prostate* 2008; 68(11): 1215–1222.
88. Buhmeida A, Pyrhönen S, Laato M, Collan Y. Prognostic Factors in Prostate Cancer. *Diagn Pathol* 2006; 1: 1–15.
89. Van Oort IM, Tomita K, von Bokhoven A et al. The Prognostic Value of E-cadherin and the Cadherin Associated Molecules Alpha, Beta, Gamma-Catenin and p120ctn in Prostate Cancer Specific Survival: a Long-term Follow-up Study. *Prostate* 2007; 67: 1432–1438.

90. Dorudi S, Sheffield JP, Poulsam R et al. E-cadherin Expression in Colorectal Cancer. An Immunohistochemical and Insitu Hybridization Study. *Am J Pathol* 1993; 142: 981–986.
91. Schuhmacher C, Becker I, Oswald S et al. Loss of Immunohistochemical E-cadherin Expression in Colon Cancer is not Due to Structural Gene Alterations. *Virchows Arch* 1999; 434: 489–495.
92. Su IH, Dobenecker MW, Dickinson E et al. Polycomb Group Protein EZH2 Controls Actin Polymerization and Cell Signaling. *Cell* 2005; 121: 425–436.
93. Fujii S, Ochiai A. E-cadherin of Zeste Homolog 2 Downregulates E-cadherin by Mediating Histone H3 Methylation in Gastric Cancer Cells. *Cancer Sci* 2008; 99: 738–746.