

Orijinal Araştırma

Kalın barsak adenom ve adenokarsinomlarında COX-2, β -catenin ve p53 ekspresyonuExpression of COX-2, β -catenin and p53 in Colorectal Adenomas and AdenocarcinomasAbdullah Fahri Şahin¹
¹ Malatya İl Sağlık Müdürlüğü**Özet**

Kalın barsak kanserleri, tüm dünyada kansere bağlı ölümlerden sorumlu akciğer, meme, prostat tümörlerinden sonra dördüncü kanser türüdür. Besin alışkanlıklarının değişmesi ile birlikte, kanser görülme sıklıkları da artmıştır. Çalışmamıza alınan kalın barsak karsinomlu ve adenoma bulunan vakaların klinik prognostik, histolojik özellikleri ve COX-2, β -catenin ve p53 ile immünohistokimyasal olarak boyanma özellikleri araştırıldı. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji laboratuvarında retrospektif olarak incelenen 77'si adenokarsinom, 42'si adenoma tanısı almış 119 olgu çalışma kapsamına alındı. Adenokarsinomların 36'sı iyi, 25'i orta, 16'sı az diferansiye adenokarsinomdu. Adenomların ise 18'i tübülöz, 15'i tübülovillöz, 9'u ise villöz adenomdu. Vakalar WHO'nun derecelendirme ve evreleme sistemine göre sınıflandırıldı. Kalınbarsak kanser ve adenomlarının genel özellikleri, prognostic faktörleri ve COX-2, β -catenin ve p53 immünoaktiviteleri incelendi.

COX-2 ile boyanma şiddeti ve yüzdesi değerlendirildiğinde; COX-2 ekspresyonunda adenokarsinomlarda adenomlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi. Benzer şekilde az diferansiye karsinomlarda COX-2'nin boyanma şiddeti ve yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı artış izlendi. Bu nedenle COX-2'yi kötü prognozu gösteren belirteç olarak değerlendirilmiştir. β -catenin adenokarsinom ve adenomlarda benzer immünoaktivite gösterdi ($p > 0.05$). Adenokarsinomlarda adenomlara göre p53 ile boyanma yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi. Bu nedenle p53'de kötü prognozu gösteren bir belirteç olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Kalın barsak karsinomları, adenomlar, COX-2, β -catenin, p53.

Abstract

Colorectal carcinoma is fourth common malignant tumor after another major causes of deaths from the malign diseases lung carcinoma, prostat carcinoma and breast carcinoma. Colorectal carcinomas incidence rates increased with hereditary changes. In this study, clinical, prognostic and histological properties of colorectal carcinomas and adenomas were investigated by using immunohistochemical markers COX-2, β -catenin and p53.

In this study, we retrospectively investigated 77 colorectal carcinomas and 42 adenomatous polyps at Department of Pathology, Düzce University Medical School. In our study 36, 25 and 16 adenocarcinomas were well, moderate and poorly differentiated, respectively. Adenomas were grouped as tubular adenoma (n=18), tubulovillous adenoma (n=15), villous adenoma (n=9). Cases were classified according to WHO. General and prognostic features of colorectal carcinomas and adenomas were investigated by applying immunoreactivities, namely COX-2, β -catenin and p53.

In our study, adenocarcinomas were expressed COX-2 more than adenomas.

We found that, poorly differentiated adenocarcinomas expressed COX-2 more than well differentiated and moderately differentiated adenocarcinomas. Thus, we thought that COX-2 could be used bad prognostic factor for colorectal carcinomas. β -catenin was similarly expressed at adenocarcinomas and adenomas. In our study, adenocarcinomas were expressed p53 more than adenomas. We found that, poorly differentiated adenocarcinomas expressed p53 more than well differentiated and moderately differentiated adenocarcinomas. Thus, we thought that p53 could be used bad prognostic factor for colorectal carcinomas.

Keywords: Colorectal carcinoma, adenoma, COX-2, β -catenin, p53.

Giriş

Tüm dünyada malign hastalıklara bağlı ölümlerde erkeklerde akciğer ve prostat, kadınlarda akciğer ve meme karsinomundan sonra üçüncü sırada yer alan kolorektal karsinomlar gastrointestinal sistemin en sık rastlanan malign tümörüdür (1). Dünyada yıllık 900.000'den fazla yeni vaka bildirilmekte ve yılda yaklaşık 500.000 kişi kolorektal karsinom nedeniyle kaybedilmektedir (2).

Siklooksijenaz 2 (COX-2) peroksidaz aktivitesiyle, bazı prokarsinojenleri (ör. benzo[a]piren) karsinojenlere çevirebilir (3). Karaciğerde bu tip oksidatif olaylar sitokrom-P450 sistemi tarafından katalizlenir. Bu durumda bazı ksenobiyotikler COX'un peroksidaz aktivitesi sayesinde mutajenlere ko-okside olabilirler. COX'un araşidonik asidi metabolize etmesiyle malondialdehit DNA hasarına yol açabilen mutajenler oluşur (4).

Normal hücresele adezyon kaybı tümör biyolojisinde kritik bir rol oynar. Tümör hücrelerinde hücre-hücre adezyon farklılıkları tümörün gelişme paternini ve kohezyon derecesini yansıtır. Tümör hücrelerinin kontakt inhibisyonunun kaybı, etraf dokuya invazyon ve metastazda ilk adımdır (5). Bu mekanizmada cadherinlerin rolü en fazladır ve adezyon moleküllerinin ana unsurunu oluştururlar. E-cadherin ekstraselüler, trans membran ve intraselüler domainlere (etki alanı) sahiptir. Ekstraselüler domain kalsiyum bağlayıcı bölge içerirken intraselüler domain cateninleri bağlar (5, 6). β -katenin hücrede intrastoplazmik olarak yerleşir ve multifonksiyoneldir (5, 7). Normal epitelyal hücrelerde bazolateral membran boyunca bulunur. β -katenin, E-cadherini hücre iskeletindeki aktini bağlar. Oluşan E-cadherin β -katenin kompleksi sinyal transdüksiyonunda ve gen ekspresyon regülasyonunda rol alır. Yapılan çalışmalarda hücre membranına bağlı E-cadherin ve/veya β -katenin ekspresyonunun azalması ya da tamamen kaybının karsinojenik sürecin başlaması, invazyon ve metastaz yeteneğinin kazanılması ile korele olduğu saptanmıştır (6, 8, 9). Kolorektal tümörler de β -catenin mutasyonları tespit edilmiştir (10-12). Yapılan bazı çalışmalarda E-cadherin ve β -catenin ekspresyonunun azalması ya da kaybı ile grade, stage, tümör progresyonu ve sağ kalım oranında azalma arasında korelasyon saptanmıştır (13). P53 geni 17. kromozomun kısa kolunda (17p) lokalizedir. İnsan kanserlerinde en sık görülen

genetik anomalidir (14, 15). 393 aminoasit içeren, 53 kDa ağırlığında bir tümör süpresör genidir (16). p53 tümör süpresör proteinin transkripsiyonel aktivitesi hücre büyümesi, apoptozis ve tümör ilerlemesinin düzenlenmesinde çok önemlidir. p53 tümör süpresör proteinin mutasyonu kanser orjininde önemli rol oynar (17). İyonize radyasyonun neden olduğu DNA hasarına cevap olarak hücre siklusü ilerlemesi ve apoptozisi kontrol eden yolu düzenleyen p53 aktive olur (18). Birkaç raporda wild tip p53 ekspresyonunun transforme hücre klonunda hücre büyümesini özellikle G1 fazını inhibe edebildiği gösterilmiştir. Wild tipin büyüme süpresör gen olarak fonksiyonu tanımlanmıştır ve birçok kanser hücre klonunda wild tip p53'ün büyümeyi durdurduğu saptanmıştır (19). Mutasyona p53 proteini tümör hücrelerinde intranükleer yerleşmiştir ve immünohistokimyasal olarak tespit edilir. Benign tümörlerde ve borderline tümörlerde genellikle p53 negatiftir (20).

Kolorektal karsinogenezde birden fazla sayıda mutasyonun aşamalı olarak birikiminin görüldüğü farklı yollar vardır (21, 22). Karsinogenezde önemli mekanizmalar arasında hipometilasyon, K-ras (aktifbironkogen), tümör süpresör genin aktivasyonu ve p-53 kaybı vardır. 1990'lı yıllarda yapılan çalışmalar romatoid artritli hastalarda gastrointestinal kanserlerin insidansının az olduğunu göstermiştir (23, 24). Bu hastaların ortak özellikleri NSAİİ kullanmalarıdır. NSAİİ'lerin antineoplastik etkileri uzun süreli aspirin ve diğer bazı NSAİİ'lerin kullanımının kolorektal kanser riskini %40-50 düşürdüğünü gösteren gözlemsel ve epidemiyolojik çalışmalarla desteklenmiştir.

Bu çalışmada kolon adenom ve adenokarsinomlarında, immünohistokimyasal olarak, COX-2, beta-katenin ve p53'ün prognostik önemini araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada Düzce Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda kalın barsak adenokarsinomu tanısı almış 95 adet rezeksiyon ile 24 adet kolonoskopik biyopsi olmak üzere toplam 119 adet kalın barsak adenom ve adenokarsinom materyali retrograd ve anterograd olarak değerlendirilmeye alındı.

Geçmiş yıllara ait olgularda vaka hakkındaki bilgiler raporlardan elde edilip, gerekli olan doku blokları arşivden çıkarıldı. Olgulara ait H&E boyalı tüm arşiv preparatları tekrar değerlendirilerek

immünohistokimyasal çalışma için en uygun bloklar seçildi. İmmünohistokimyasal çalışma için, her vakadan tümör mukoza ilişkisinin örneklendiği birer parafin blok seçildi. Çalışmada COX-2 (Cat. #RB-9072-P, 1.0ml at 200µg/ml, Purified Ab with BSA and Azide, Thermo Fisher, Fremont, CA, USA), p53 Ab-5 Mouse Monoclonal Antibody (Product Code: MS-186-P, Clone DO-7, Thermo Scientific), Beta-cathenin (Cat. #RB-9035-P, 1.0ml at 200ug/ml, Thermo Fisher, Fremont, CA, USA) klonları ile boyama yapılabilmesi için bloklardan üçer adet 3µ kalınlığında kesitler polilizinli lamlara alındı. Kesitlerin kurumaması için işlemlerin tümü oda sıcaklığında ve nemli bir ortamda (humidified chamber) gerçekleştirildi. Doku arşivinden çıkarılan parafin blokların hepsinden 3 mikron kalınlığında 4 adet kesit 4 ayrı lama alındı. Bunlardan biri hematoksilen-eozin boyandı. Diğer üçü ise immünohistokimyasal boyama için polizini lamlara alındı. Hematoksilen-eozin boyalı lamlar ışık mikroskopu altında incelendi. 3 mikron kalınlığındaki kesitler; COX-2: RB-9072_p, p53 Ab5(Do-7): MS-186-P, B-catenin: RB-9035-P klonları ile boyanmak için polizini lamlara alındı. Kesitlerin kurumaması için işlemlerin tümü oda ısı ve nemli bir ortamda gerçekleştirildi. Deparafinizasyon işlemi için 75° lik etüvde 40 dk bekletilen parafin kesitler 2 kez ksilende 15'er dakika bekletildi. %96 ve 70'lik alkolde 10' ar dakika hidrate edilen preparatlar su ile yıkandıktan

sonra antijen retrieval aşaması gerçekleştirildi. Yıkandıktan sonra sitrat buffer (pH=6) mikrodalga fırında kaynatıldı. Distile suda bekletilen lamlar sitrat buffer solüsyonunda 800 watt'ta şoklandı. İlk kaynama olunca 200 watta düşürülerek 15 dk'da kademeli şoklama yapıldı. Enerji kesilip lamlar 30 dk soğumaya bırakıldı. Kesitler distile suya alındıktan sonra endojen enzim blokajı için %3'lük H₂O₂ ile 10 dk muamele edildi. PBS ile iki kez beşer dakika yıkanan kesitlere 3 dk UV blok uygulandı.

Beta-katenin 1/200, COX-2 1/100, p-53 1/100 oranda dilüe edilmiş. Oda sıcaklığında bir saat bekletilen antikolarla sırasıyla 20 dk sarı link (Takara, Japonya, 1/100 monoklonal çözeltisi), 20 dk pembe link (Biotynilated goat anti-polivalent lavisyon) 3-10 dk DAB kromojen uygulanmıştır. Harris'in hematoksilen'i ile 1 dk zıt boya yapılan kesitler son kez alkol ile yıkanıp (70, 80° ve 96°) den geçirilen hidrate edildi. Etüvde kurutulup, ksilende parlatılan kesitler mounting medium ile kapatıldı.

Preparatlar ışık mikroskopunda (Nikon Eclipse E400) değerlendirildi. Tümör ve komşu mukozanın birlikte değerlendirilebildiği tüm preparatlarda tümör hücrelerinde ve komşu mukozada COX-2, p53 ve β-catenin ile boyanma dereceleri ve kriterleri, Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. İmmünohistokimyasal değerlendirme kriterleri

Parametreler	Yüzdesi				Şiddeti			
COX-2	1-25	26-50	51-75	76-100	Negatif	Hafif	Orta	Şiddetli
β-cathenin	0	1-9	10-89	90-100	-			
p53	1-25	26-50	51-75	76-100	-			

Adenomatöz poliplerde de immünoaktiviteler değerlendirilip, adenokarsinomlarla karşılaştırıldı. Vakalarda yaş, cinsiyet, tümörün lokalizasyonu, diferansiyasyon derecesi, çap, invazyon derinliği, metastatik lenf düğümleri, damar ve sinir invazyonu ile tümör ve adenomların büyüme paternleri, COX-2, p-53, β-catenin immünoaktiviteleri ile olan ilişkileri değerlendirildi. İki değişken arasındaki ilişki incelenirken Fisher'in ki-kare testi kullanıldı. Çalışmada her olguya ait yaş ve cinsiyet bilgileri

patoloji raporlarından elde edildi. Adenokarsinomlar glandüler yapılanmalarına göre 3 gruba ayrıldı. %75'inden fazlasında glandüler yapılanma bulunan tümörler Grade1 (iyi diferansiyasyon), %25-75'inde glandüler yapılanma bulunan tümörler Grade2 (orta derecede diferansiyasyon), %0-25 arasında glandüler yapılanma bulunan tümörler Grade3 (az diferansiyasyon) karsinom olarak belirlendi.

Evrelendirmede TNM sistemi kullanıldı. Tümörler en büyük çapına göre 2 cm'den küçük, 2-5 cm arası ve 5

cm'den büyükler diye üç grupta değerlendirildi.

Adenom histolojik görünümüne göre tubuler, tubulovillöz, villöz adenom olarak üç gruba ayrıldı.

Bulgular

Klinik ve Morfolojik Bulgular

Çalışmaya dahil ettiğimiz 119 hastanın 29 (%24.3)'u kadın, 90 (%75.7)'i erkek olup olgular 38 ila 82 yaşları arasında yer almakta ve yaş ortalaması 60.79'dur (Tablo 2). Kalın barsak adenokarsinomlu hastalar arasında en genci 44 yaşında iken, en yaşlı hasta 82 yaşındaydı. Hastaların 35 (%45.5)'i, 50-69 yaşları arasındaydı. 23 (%29.9) tanesi 50 yaşından küçük, 19 (%24.6)'u 69 yaşından büyüktü (Tablo 2). Erkeklerde iyi diferansiye karsinom daha sık (%80.6) izlenirken kadınlarda kötü diferansiye karsinom daha sık (%43.7) olarak izlendi. Ancak istatistiksel olarak erkeklerde ve kadınlarda tümör diferansiyasyonu açısından ilişki anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 3). Az diferansiye

adenokarsinomlarda lenfovasküler invazyon varlığının daha sık (%93.8) görüldüğü izlendi. Lenfovasküler invazyon yönünden az diferansiye adenokarsinomlarla iyi ve orta diferansiye adenokarsinomlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.001$) (Tablo 4). Az diferansiye adenokarsinomlarda perinöral invazyon varlığının daha sık (%81.3) görüldüğü izlendi. Perinöral invazyon yönünden az diferansiye adenokarsinomlarla iyi ve orta diferansiye adenokarsinomlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (ki-kare: 15.33 $p<0.001$) (Tablo 4). Az diferansiye adenokarsinomlarda nekrozun daha sık (%93.8) görüldüğü izlendi ($p<0.001$). Az diferansiye adenokarsinomlarda lenf nodu tutulumunun daha sık (%75) olduğu gözlenirken, iyi diferansiye adenokarsinomlarda daha az tutulduğu izlendi ($p<0.001$) (Tablo 4). Duke evrelemesine göre vakaların büyük çoğunluğu evre B'de, TNM evrelemesine göre ise 2. Evrede (%57) bulunuyordu.

Tablo 2. Adenom ve adenokarsinomlarda yaş dağılımı

Yaş	Adenom	Adenokarsinom
30-49	10	23
50-69	17	35
70-89	15	19

Kalın barsak adenokarsinomlarının 36 (%46.7)'sı iyi diferansiye, 25 (%32.4)'i orta derecede diferansiye, 16 (%20.9)'sı az diferansiye olarak gruplandı (Tablo 3). Kalın barsak adenomlarının 18 (%42.8)'i tübüler, 15 (%35.8)'i tübulovillöz, 9

(%21.4)'u villöz adenom olarak sınıflandı (Tablo 3). Olguların 8 (%10.5)'i evre1'de (TNM), 44 (%57)'ü evre 2'de, 25 (%32.5)'i evre 3'te yer almaktaydı.

Tablo 3. Her iki cinsiyette kalın barsak kanserlerinin diferansiyasyonlarına göre dağılımı

Diferansiyasyon derecesi	Erkek (%)	Kadın (%)	Toplam (%)
İyi	29 (80.6)	7 (19.4)	36 (%46.7)
Orta	18 (72)	7 (28)	25 (%32.4)
Az	9 (56.3)	7 (43.7)	16 (%20.9)
Toplam	56 (%72)	21 (%28)	77 (%100)

45 (%58.4) adenokarsinom olgusunda lenfovasküler invazyon mevcut olup, 32 (%41.6) olguda görülmedi. Perinöral invazyon 30 (%39) olguda mevcuttur. Lenf nodu tutulumu 25 (%32.5) olguda mevcut olup, nekroz ise 51 (%66.2) olguda saptanmıştır (Tablo 4).

Tablo 4. Kalın barsak kanserlerinin lenf nodu tutulumu ve lenfovasküler ve perinöral invazyon dağılımı

Diferansiyasyon	Az Diferansiye	Orta Diferansiye	İyi Diferansiye	Toplam
Lenf Nodu Tutulumu Dağılımı				
Lenf nodu tutulumu var (%)	12 (75)	9 (36)	4 (11.1)	25 (32.5)
Lenf nodu dağılımı; p<0.001.				
Nekroz dağılımı				
Nekroz var (%)	15 (93.8)	20 (80)	16 (44.4)	51 (66.2)
Nekroz dağılımı için; p<0.001.				
Lenfovasküler ve Perinöral İnvazyon Dağılımı				
Lenfovasküler invazyon yok (%)	1 (6.2)	9 (36)	22 (61.1)	32 (41.6)
Perinöral İnvazyon var (%)	13 (81.3)	7 (28)	10 (27.8)	30 (39)
Perinöral İnvazyon yok (%)	3 (18.7)	18 (72)	26 (72.2)	47 (61)

Lenfovasküler invazyon ; p<0.001.

Perinöral invazyon ; p<0.001.

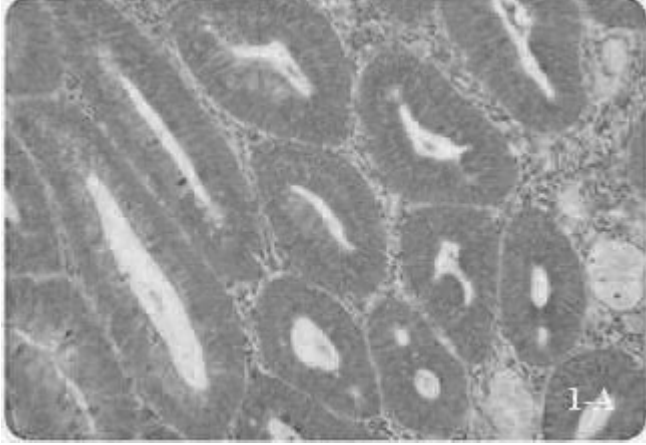
İmmunohistokimyasal Bulgular

Tübüler adenomların zayıf şiddette ve %50'nin altında COX-2 eksprese ettikleri görüldü. Tübülovillöz adenomların daha çok zayıf-orta şiddette (%26-75); villöz adenomların daha çok orta şiddette (%51-75) COX-2 eksprese ettikleri görüldü. Adenomların COX-2 ile boyanma şiddeti veya yüzdesi açısından aralarında anlamlı bir fark izlenmedi (p>0.05). İyi diferansiye adenokarsinomların daha çok orta şiddette (%51-75) orta diferansiye adenokarsinomların ise daha çok orta ve şiddetli (%51-100) COX-2 eksprese ettikleri görüldü. Az diferansiye adenokarsinomların daha çok şiddetli (%76-100) COX-2 eksprese ettikleri görüldü. Ancak adenokarsinomların COX-2 ile boyanma şiddeti veya yüzdesi açısından aralarında anlamlı bir fark bulunamadı (p>0.05). Adenomlar ve adenokarsinomlar arasında COX-2 ile boyanma şiddeti açısından ilişkisi incelendiğinde, adenokarsinomların adenomlara göre daha şiddetli boyanma gösterdikleri tespit edildi. Bu istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.001) (Tablo 5).

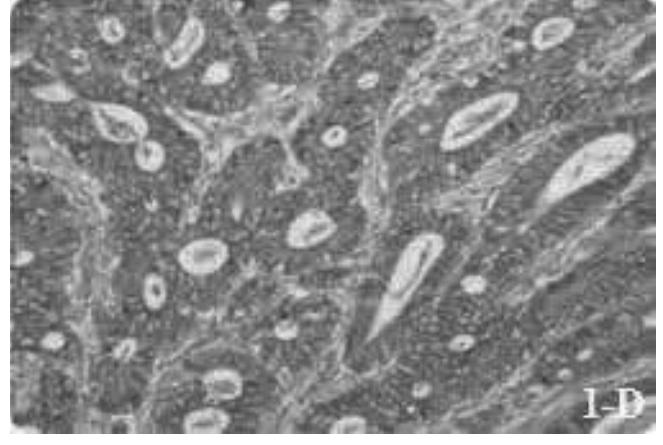
Adenomlar ve adenokarsinomlar arasında COX-2 ile boyanma yüzdesi açısından ilişkisi incelendiğinde, adenokarsinomların adenomlara göre daha fazla yüzde ile boyanma gösterdikleri tespit edildi. Bu istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.001) (Resim 1A-B, Tablo 5). Kalın barsak adenokarsinomları ve adenomlarında beta-katenin immunreaktivitesi tutulum varlığı ve yüzdesine göre incelendi. Sadece iki vakada beta kateninle boyanma göstermedi. Tübüler adenomlarda benzer ekspresyon oranları görüldü. Tübülovillöz ve villöz adenomların %90 ve üzerinde beta-katenin eksprese ettikleri görüldü. Ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark görülmedi (p>0.05). İyi diferansiye adenokarsinomların yarısının %10-89 diğer yarısının ise %90 ve üzerinde beta-katenin eksprese ettikleri görüldü. Orta diferansiye adenokarsinomların ve az diferansiye adenokarsinomların daha çok %90 üzerinde beta-katenin eksprese ettikleri görüldü. Ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark görülmedi (p>0.05). Adenomlar ve adenokarsinomlar arasında beta-katenin ile boyanma yüzdesi arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Resim 1C-D, Tablo 5). p-53 ile yedi vakada %25'in altında immün reaksiyon görüldü. Tübüler adenomların tümünde p53 reaktivitesi %50'nin altındaydı. Tübülovillöz ve villöz adenomlarda %26-100 ve daha çok %50'nin altında, iyi diferansiye adenokarsinomlarda

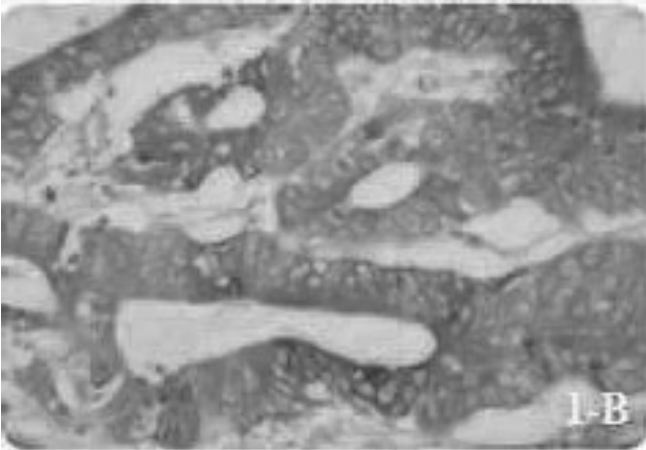
%50'nin üzerinde eşit olarak dağılmıştı. Orta diferansiye adenokarsinomlarda daha çok %50'nin üzerinde; az diferansiye adenokarsinomlarda daha çok %75'in üzerinde izlendi. Adenokarsinomların adenomlara göre daha fazla boyanma gösterdikleri tespit edildi. Bu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$) (Resim 1E-F, Tablo 5).



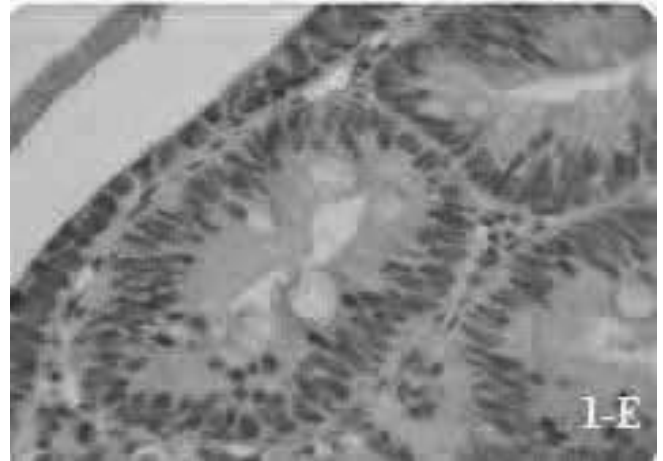
Resim 1A. Tübülovillöz Adenom (COX-2, x10)



Resim 1D. İyi Diferansiye Adenokarsinom (Beta-katenin, x10)



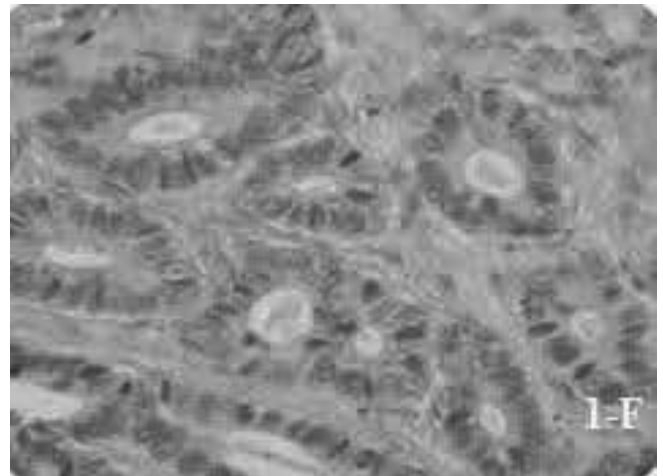
Resim 1B. Orta Diferansiye Adenokarsinom (COX-2, x20)



Resim 1E. Tüberler Adenom (p53, x40)



Resim 1C. Villöz Adenom (Beta-katenin, x20)



Resim 1F. İyi Diferansiye Adenokarsinom (p53, x20)

Tablo 5. Kalın barsak adenomları ve adenokarsinomlarında COX-2, β -katenin ve p53 immünoreaktivite skorları

	TA	TVA	VA	İDA	ODA	ADA	Toplam
COX-2 İmmünoreaktivitesi ¹							
Negatif-0 (%)	4 (22.2)	2 (13.3)	1 (11.1)	2 (5.6)	-	1 (6.3)	10 (8.4)
Zayıf-1 (%)	11 (61.1)	7 (46.7)	2 (22.2)	9 (25)	4 (16)	1 (6.3)	34 (28.6)
Orta-2 (%)	3 (16.7)	5 (33.3)	4 (44.5)	18 (50)	14 (56)	10 (62.4)	54 (45.4)
Şiddetli-3 (%)	-	1 (6.7)	2 (22.2)	7 (19.4)	7 (28)	4 (25)	21 (17.6)
Toplam (%)	18 (100)	15 (100)	9 (100)	36 (100)	25 (100)	16 (100)	119 (100)
COX-2 İmmünoreaktivite Yüzdesi ²							
1 (%1-25)	8 (44.5)	2 (13.3)	-	1 (2.8)	-	1 (6.3)	12 (10.1)
2(%26-50)	10 (55.5)	7 (46.7)	3 (33.3)	8 (22.2)	4 (16)	1 (6.3)	33 (27.7)
3(%51-75)	-	6 (40)	4 (44.5)	18 (50)	7 (28)	2 (12.5)	37 (31.1)
4(%76-100)	-	-	2 (22.2)	9 (25)	14 (56)	12 (75)	37 (31.1)
Toplam (%)	18 (100)	15 (100)	9 (100)	36 (100)	25 (100)	16 (100)	119 (100)
β -katenin immünoreaktivitesi ³							
1- (%)	-	-	1 (11.1)	-	-	1 (6.3)	2 (1.7)
2-%10'dan az	5 (27.8)	-	-	-	-	-	5 (4.2)
3-(%10-89)	7 (38.9)	2 (13.3)	-	18 (50)	8 (32)	5 (31.2)	40 (33.6)
4-(%90↑)	6 (33.3)	13 (86.7)	8 (88.9)	18 (50)	17 (68)	10 (62.5)	72 (60.5)
Toplam	18 (100)	15 (100)	9 (100)	36 (100)	25 (100)	16 (100)	119 (100)
p53 immünoreaktivitesi ⁴							
0(%)	6 (33.4)	-	-	-	-	1 (6.3)	7 (5.9)
1(%)	12 (66.6)	7 (46.7)	4 (44.5)	-	2 (8)	-	25 (21)
2(%)	-	5 (33.3)	2 (22.2)	18 (50)	10 (40)	5 (31.2)	40 (33.6)
3 (%)	-	3 (20)	3 (33.3)	18 (50)	13 (52)	10 (62.5)	47 (39.5)
Toplam (%)	18 (100)	15 (100)	9 (100)	36 (100)	25 (100)	16 (100)	119 (100)

TA: tübülöz adenom; TVA: tübülovillöz adenom; VA: villöz adenom; İDA: İyi diferansiye adenom; ODA: orta diferansiye adenom; ADA: Az diferansiye adenom.

¹COX-2 immünoreaktivite şiddeti skorları için ki-kare testi sonucu: 21.8, p<0.001.

²COX-2 immünoreaktivite yüzdesi için ki-kare testi sonucu: 40.71, p<0.001.

³ β -katenin immünoreaktivitesi için p>0.05.

⁴p53 immünoreaktivitesi için ki-kare testi sonucu: 61.84, p<0.001.

Tartışma

Kolorektal karsinomlar gastrointestinal sistemin en sık rastlanan malign tümürüdür. (25, 26). 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 olabilmektedirler. Kolon kanser hücrelerinde disregülasyona uğramış böylesi proteinler arasında en önemlileri B-catenin, E-cadherin, COX-2 ve p53 proteindir. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik araştırmalar, düzenli olarak NSAİİ (nonsteroidanti-inflamatua rilaj) kullanan kişilerde, başta kolorektal kanserler olmak üzere tüm gastrointestinal kanserlere daha az rastlanıldığını göstermiştir (27-28). Bazı çalışmalarda kolorektal kanser riskini %40-50 düşürdüğü belirtilmektedir (29-30). NSAİİ'lar ve aspirinin iyi bilinen ortak özellikleri COX-1 ve COX-2 enzimlerini bloke ederek araşidonik asidin inflamatuvar mediatörlere dönüşmesini engellemeleridir. COX-2'nin PGE2 üretimine bağımlı mekanizmasında, kolorektal kanserlerde PGE2 düzeyi artar ve buna bağılı olarak hücre proliferasyonunu sağlayarak tümörün gelişimine neden olur. Hücre proliferasyonunu; sekonder olarak PGE2, epidermal growth faktör reseptör transaktivasyonunu sağlayarak, bcl-2 ekspresyonunu artırarak ve apoptozisi inhibe ederek sağlar (31). Ayrıca PGE2, kanser hücrelerinin metastatik potansiyelini ve hareketlerini artırır ve immunsupresiftir, bu tümör gelişimi için önemlidir (32). Sonuç olarak COX-2 ekspresyonu anjiogenezisi indükler. Bu etki de tümör anjiogenezisini sağlar ve bunun sonucunda da tümör büyüyüp metastaz yapar. Bunun yanı sıra COX-2, vasküler endotelial growth faktör (VEGF) ve fibroblast growth faktör (FGF) gibi proanjiogenik faktörlerin salınımına sebep olur. Tümörde COX-2 salınımı, VEGF salınımı ve mikro damar yoğunluğu ile ilişkilidir (33). NSAİİ'lar birçok çalışmada gösterilen COX-2'nin tümör gelişimi sırasında tetiklediği mekanizmaları (hücreler arası adezyonu ve apoptozisi azaltarak, angiogenezi ve proliferasyonu artırır) baskılayarak bu antitümöral etkisini gösterdiği ileri sürülmektedir. Farklı çalışmalara göre kolorektal adenokarsinomlarda %90, kolorektal adenomlarda ise %40-90 oranında COX-2 salınımı görülür (34). Adenomlarda COX-2 salınımının boyut ile ilişkili olup, displazi derecesi ve yapısı ile ilişkili olduğuna dair net bir çalışma

mevcut değildir (35).

Normal kolon mukoza hücrelerinde COX-2 ekspresyonu sadece sitoplazmik apikal ve zayıf olarak izlenirken tümör hücrelerinde yaygın ve kuvvetli sitoplazmik ekspresyonun saptanması bu hücrelerin kuvvetli COX-2 etkisine maruz kaldığını göstermektedir. Karsinomların kendi aralarında diferansiyasyonlarına göre ve adenomların ise tiplerine göre ayrıca adenomlarla adenokarsinomların COX-2 ekspresyonu yönünden farkı araştırıldı. Adenokarsinomlar adenomlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek COX-2 immunoreaktivitesi gösterdi ($p<0.05$). Adenokarsinomların diferansiyasyonlarına, adenomların ise tiplerine göre kendi aralarında COX-2 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

β -catenin hücreler arasında kontakt inhibisyonu sağlayan adezyon moleküllerinden olup plazma membranında adezyon molekülü olan E-kadherini hücre iskeletindeki aktine bağlar (6, 7, 13, 36). Oluşan bileşik, bir invazyon süpressör sistemi gibi fonksiyon gösterir. E-kadherin'de oluşan değişiklikler hücreler arasındaki normal adezyonların bozulmasına sebep olur. Bu proteinin stoplazmik kısmı β -katenine bağlanarak bir kompleks oluşturur. Bu kompleks alfa-katenin ve aktine bağlanarak hücreler arası adezyonun sağlanmasında rol oynar (37). β -catenin-E-kadherin kompleksinde gelişebilecek anomalilerin, karsinojenik sürecin başlamasına neden olduğu düşünülmektedir (6, 8, 9). β -katenin'in APC proteini ile birlikte kolon kanseri oluşumunda etkili olduğu yönünde çalışmalar vardır. Buna göre β -katenin, axin ve glikojen sentetaz enzimlerinin oluşturduğu komplekste APC proteini de yer almaktadır. Glikojen sentaz kinaz β -katenin'i fosforilleyerek kompleksten ayrılmasına ve β -katenin'in DNA bağlayan bir protein olan T hücre faktör (Tcf) veya Lymphoidenhanced faktör (Lef) denilen faktöre bağlanarak transkripsiyon genlerini aktive eder. Bu da kolon kanserinin gelişimini aktive eder (38). Kolorektal poliplerdeki beta-katenin ekspresyon seviyeleri ile ilgili yapılmış birçok çalışmada displastik kolonik lezyonlarda beta-katenin ekspresyonundaki değişikliklerin ve hücresel lokalizasyonunun erken dönemde değişim gösterdiği ve karsinomlardaki beta-katenin ekspresyonu adenomlara nazaran istatistiksel olarak anlamlı derecede olduğu tespit edilmiştir (39, 40). Mevcut çalışmada ise gruplar arasında istatistiksel

olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Şu ana kadar birçok çalışma (21, 22), kolorektal karsinogenezin çeşitli aşamalarında multiple gen değişikliğinin etkili olduğunu göstermiştir. Mutagen p53 geninin kolon karsinogenezinin geç evresinde rol aldığı düşünülmektedir. Genomun bekçisi olarak tanımlanan p53 geni, hücre siklusunun en önemli düzenleyicilerinden biri olup, hücre oluşurken DNA kusurlarını fark etmek ve onarılmayacak bir hasar durumunda genler kaskadını aktifleyerek hücreyi apoptoza götürmekle yükümlüdür. Bu genin her iki allelinin de aktive olması ile adenomdan karsinoma geçiş olur. Kolorektal kanserlerin %50'sinden fazlasında bu genin mutasyonu saptanabilir.

Erken kolorektal neoplazili 157 hasta üzerinde p53'ün rolünün araştırıldığı bir çalışmada (41), p53 ekspresyonu oranları sırasıyla, adenomatöz polip, insitu karsinom intramukozal karsinomda %10.3, %21.7 ve %34.9 olarak bulunmuştur. Masayuki ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 37 adenomun üçünde (%8) ve 38 fokal karsinomun 20'sinde (%54) p53 ile pozitif boyanma saptanmıştır. Shariat ve arkadaşlarının çalışmalarında (42), bağımsız tümör belirteçlerinin kombinasyonunun tümörlerin klinik gidişlerini daha iyi yansıtacağını bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada adenokarsinomların adenomlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek p53 immunoreaktivitesi gösterdiği tespit edildi. Adenokarsinomların diferansiyasyonlarına, adenomların ise tiplerine göre kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Sonuç olarak, kolon adenomları ile karsinomları arasında etyopatogenezde yer alan COX-2, beta-katenin ve p53'ün yerini araştırdığımız çalışmamızda normal dokuya göre COX-2 ve p53 ekspresyonu her iki grupta da artmış olmasına rağmen karsinom grubundaki olgularda adenomlara göre daha yüksek oranda tespit edildi. Bu da p53'ün adenom-karsinom geçişi dahil olmak üzere karsinogenezde önemli yer aldığını göstermektedir. Ayrıca COX-2'nin kolorektal kanserin başlangıcında ilerlemesinde ve gelişiminin devamında rol aldığını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda kolon karsinomlarında lenfatik invazyon %8 ile %73 oranında izlenmekle birlikte tümör stage ve grade arttıkça lenfatik invazyon sıklığı da arttığı saptanmıştır (48). Çalışmamızda, kolon adenokarsinomlu hastalarda lenfovasküler

invazyon, nekroz ve perinöral invazyon ile tümör diferansiyasyonları karşılaştırıldı. Az diferansiye adenokarsinomlarda %93.8 oranında lenfovasküler invazyon izlenirken, orta derece diferansiye kanserlerde %64, iyi diferansiye kanserlerde %38.9 oranında tespit edildi. Çalışmamızda lenfatik ve vasküler invazyonu birlikte değerlendirmiştir. Bulgular, literatür bilgileriyle uyumlu olarak değerlendirildi (43). Yine aynı hasta gurubumuzda nekroz varlığıyla diferansiyasyon dereceleri arasındaki ilişki saptanmış olup az diferansiye adenokarsinomlarda nekrozun daha sık olduğu (%93.8) ve sonucun literatür bilgileriyle uyumlu olduğunu tespit edilmiştir (48). Kolon adenokarsinomlarında perinöral invazyon oranı %14-32 olarak belirtilmektedir ve görülme oranı tümör stage ve grade arttıkça artmaktadır (48) Biz aynı hasta gurubunda perinöral invazyon ile diferansiyasyon dereceleri arasındaki ilişki incelendiğinde az diferansiye adenokarsinomlarda perinöral invazyon varlığının daha sık (%81.3) olduğu tespit edildi.

Kaynaklar

1. Ferlay J. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 <https://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/GLOBOCAN-2012-Estimated-Cancer-Incidence-Mortality-And-Prevalence-Worldwide-In-2012-V1.0-201216.05.2019>.
2. İltter H, Keskinçilic B. 2015 yılı Türkiye Kanser İstatistikleri Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Savaş Daire Başkanlığı, T.C Sağlık Bakanlığı Ankara 2018.
3. Wiese FW, Thompson PA, Kadlubar FF. Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2. *Carcinogenesis*. 2001; 22(1): 5-10.
4. Plastaras JP, Guengerich FP, Nebert DW, Marnett LJ. Xenobiotic-metabolizing cytochromes P450 convert prostaglandin endoperoxide to hydroxyheptadecatrienoic acid and the mutagen, malondialdehyde. *J Biol Chem*. 2000; 275(16): 11784-90.
5. Washington K, Hamilton K. Expression of beta-catenin and alfacatenin and E-cadherin in Barrett's esophageal adenocarcinomas. *Modpathol* 1998; 11(9): 805-13.
6. Huiping C, Jonassan JG, et al. Alterations of E-cadherin and beta-catenin in gastric cancers. *BMC Cancer* 2001; 1:16-30

7. Tsuji H, Takahashi H. Nuclear localization of beta-catenin in the hair matrix cells and differentiated keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2001; 27:170-7.
8. Moustafa AA, Yen L. Regulation of E-cadherin, beta-catenin complex patterns by epidermal growth factor receptor modulation in human lung cancer cells. *Lung Cancer* 2002; 37: 49-56
9. Zhou YN, Xu CP, Han B. Expression of E-cadherin, beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterology* 2002; 8(6): 987-93.
10. Aust DE, Terdiman J, et al. Altered distribution of beta catenin, and its binding proteins E-cadherin and APC, in ulcerative colitis related colorectal cancers. *Modpathol.* 2001; 14:29-39
11. Murata M, Iwao K, Miyoshi Y. Activation of the beta catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 as early event in colorectal tumorigenesis. *Cancer Letters* 2000; 159: 73-8
12. Nilbert M, Ramberch E. beta-catenin activation through mutation is rare in rectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 128: 43-45
13. Muro G, Munoz J, et al. Prognostic value of the expression of E-cadherin, beta-catenin in bladder cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 357-62
14. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Neoplasia, chapter 7, in Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2005: 269-342.
15. Seidman JD, Russel P, Kurman RJ. Surface Epithelial Tumors of the Ovary, chapter 18, Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. Ed Kurman RJ. 5th ed. New York: Springer. 2002: 791-904
16. Vojtesek B, Bartek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein P53. *J Immunol Methods.* 1992; 151(1-2): 237-44
17. Vikhanskaya F, D'Incalci M, Broggini M. p73 competes with p53 and attenuates its response in a human ovarian cancer cell line. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(2): 513-9.
18. Wang S, Guo M, Ouyang H, Li X, Cordon-Cardo C. The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase selectively regulates p53-dependent apoptosis but not cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(4): 1584-8.
19. Vikhanskaya F, Erba E, D'Incalci M, Broggini M. Introduction of wild-type p53 in a human ovarian cancer cell line not expressing endogenous p53. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(6): 1012-7.
20. Azumi N, Czernobilsky B. Immunohistochemistry. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. Ed Kurman RJ. 5th ed. New York: Springer. 2002. p:1267.
21. Crawford JM, Kumar V: Robbins Temel Patoloji. In Çevikbaş U. Ağız Boşluğu ve Gastrointestinal Sistem. 7.ed, istanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2003: 563-90.
22. Pecina-Slaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int* 2003; 3: 17-24.
23. Rosai J. Surgical Pathology, (9th ed.) China. 2004: 776-855.
24. Hamilton Sr, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. In: Hamilton SR, Aaltonen LA. Tumours of Colon and Rectum. 1 st ed, Lyon, France: IARC Press; 2000: 103-43.
25. Harpaz N, Saxena R: Modern Surgical Pathology. In: Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM. Gastrointestinal Tract, Large Intestine. 1st ed. Saunders, 2003: 749-852
26. Harry S. Cooper, Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, (4 th ed.) Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins. 2004: 1543-602.
27. Laakso M, Mutru O, Isomaki H and Koota K. Cancer mortality in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1986; 13: 522- 26.
28. Sheng H, Shao J, Funkhoser EM, Sharp GB. Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma. *Cancer (Phila)* 1995; 76: 1116-9.
29. Laakso M, Mutru O, Isomaki H, Koota A. Cancer mortality in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1986; 13: 522-6
30. Thun MJ. Aspirin, NSAIDs and digestive tract cancers. *Cancer Metastasis Rev* 1994; 13: 269-88
31. Sheng H, Shao J, Dixon DA, Williams CS, Prescott SM, DuBois RN, Beauchamp RD. Transforming growth factor-beta1 enhances Ha-ras-induced expression of cyclooxygenase-2 in intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA. *J Biol Chem* 2000; 275: 6628-35.
32. Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2

33. increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 18075-81
34. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705-16
35. Wendum D, Masliah J, Trugnan G, Flejou JF: Cyclooxygenase-2 and its role in colorectal cancer development. *Virchows Arch.* 2004; 445: 327-33
36. Joo YE, Kim HS, Min SW, Lee WS, Park CH, Park CS, Choi SK, Rew JS, Kim SJ. Expression of cyclooxygenase-2 protein in colorectal carcinomas. *Int J Gastrointest Cancer.* 2002; 31(1-3): 147-54.
37. Brown RS, Wahl RL. Overexpression of Glut-1 Glucose transporter in human breast cancer. *Cancer* 1993; 72: 2979-85.
38. Schohl A, Fagotto F. β -catenin, MAPK and Smad signaling during early *Xenopus* development. *Development* 2001; 129: 37-52.
39. Iwamoto M, Ahnen DJ, Franklin WA, Maltzman TH. Expression of β -catenin and full-length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1935-40.
40. Wong SC, Lo ES, Chan AK, Lee KC, Hsiao WL. Nuclear β catenin as a potential prognostic and diagnostic marker in patients with colorectal cancer from Hong Kong. *Mol Pathol* 2003; 56: 347-52
41. Chang H, Su JM, Huang CC, Liu LC, Tsai CH, Chou MC, Lin P. Using a combination of cytochrome P450 1B1 and β catenin for early diagnosis and prevention of colorectal cancer. *Cancer Detect Prev.* 2005; 29(6): 562-9.
42. Terry MB, Neugut AI, Mansukhani M, Wayne J, Harpaz N, Hibshoosh H. Tobacco, alcohol, and p53 over expression in early colorectal neoplasia. *BMC Cancer* 2003; 3: 29.
43. Shariat SF, Tokunaga H, Zhuo JH. P53, p21, pRb and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(6): 1014-24.
44. Cecilia MP. Lymphoproliferative Disorders of the gastrointestinal tract in *Gastrointestinal Pathology Plus: An atlas and text.* 3. baskı, 2008.

Sorumlu Yazar**Abdullah Fahri ŞAHİN**

Malatya İl Sağlık Müdürlüğü

E-mail: afahrisahin@mynet.com