

69895

TC
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
İNCİRALTI/İZMİR

KOLOREKTAL ADENOMLARDAKİ MÜSİN DEĞİŞİKLİKLERİNİN
KOLOREKTAL KARSİNOM GELİŞİMİNDEKİ YERİ VE
DOKUKİMYASAL VE İMMÜN DOKUKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI
(54 OLGU)

Uzmanlık Tezi
DR. BANU KURTOĞLU LEBE

İZMİR-1998

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	1
GİRİŞ.....	2-14
GEREÇ-YÖNTEM	15-18
BULGULAR	19-31
TARTIŞMA.....	32-42
SONUÇLAR.....	43
ÖZET.....	44
KAYNAKLAR.....	45-51

ÖNSÖZ

Kolorektal adenomlar, sık görülen ve adenom-karsinom silsilesinde öncü lezyonlar olarak kabul edilen neoplazmlardır. Kolorektal adenomlardaki bazı değişiklikler, adenomların atipi derecesini belirlemede önemlidir. Bunlardan en çarpıcı olanı da adenomatöz kriptlerdeki müsin değişiklikleridir. Müsinlerdeki bu değişiklikler dokukimyasal olarak HİD-AB ve PAS-AB yöntemi ile ortaya konulmaktadır. Dokukimyasal yöntemlerin yanısıra, müsinine yönelik antikolar kullanılarak uygulanan immün dokukimyasal yöntemler de vardır. HGM (Human Gastric Mucin) normal erişkin mide mukozası ve fetal intestinal traktüste eksprese edilen onkofetal bir proteindir. MUC2 de normal intestinal epitelde bulunan dominant müsin genidir. Prekanseroz ve kanseroz kolon lezyonlarındaki HGM ve MUC2 müsin gen ekspresyonlarındaki değişiklikler dikkat çekicidir ve adenom-karsinom silsilesinde önemli yer tutacaktır.

Bu çalışmada değişik atipi derecelerinde olan kolorektal adenom olgularındaki müsin değişiklikleri, HİD-AB ile PAS-AB dokukimyasal yöntemleri ve HGM ile MUC2 antikoları kullanılarak uygulanan immün dokukimyasal yöntemleri kullanılarak semikantitatif olarak değerlendirilmiş ve bu değişikliklerin atipi dereceleri ile ilişkileri araştırılmıştır. Bu müsin değişikliklerinin kolorektal karsinom gelişimindeki yerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim sırasında değerli katkılarını gördüğüm tüm hocalarıma ve meslektaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamdaki katkılarından ve önerilerinden, patoloji eğitimim sırasındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Ali Küpelioğlu'na teşekkür ederim. Patoloji eğitimim sırasında yetişmemde emeği geçen değerli öğretim üyelerine; Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Emek Özen, Prof. Dr. Tülay Canda, Prof. Dr. M. Şerefettin Canda, Prof. Dr. Uğur Pabuçcuoğlu, Prof. Dr. Aydanur Kargı, Doç. Dr. Kutsal Yörükoğlu, Doç. Dr. Meral Koyuncuoğlu, Doç. Dr. Sülen Sarıoğlu, Yrd. Doç. Dr. Erdener Özer' e de teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca uzmanlık eğitimim sırasındaki katkılarından dolayı Uzm. Dr. Oya Göre, Uzm. Dr. Özgül Sağol, Uzm. Dr. Alp Kılıçalp ile değerli araştırma görevlisi arkadaşlarıma da teşekkür ederim. Tezimin dokukimyasal boyaları aşamasında her türlü yardımını ve desteğini gördüğüm Uzm. Metin Çabuk' a da teşekkür ederim. Tezimin istatistiksel değerlendirmesindeki büyük yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Erdener Özer' e teşekkür ederim. Anabilim Dalı' nın sekreter, teknisyen, laborant ve personeline de teşekkürlerimi sunarım. Tezimin her aşamasında yardımını ve desteğini gördüğüm değerli eşim Dr. Erdal Lebe' ye de teşekkür ederim.

GİRİŞ

Kolorektal adenomlar, kolorektal mukozal epitelden kaynaklanan, tek ya da çok sayıda olabilen benign neoplazmlardır. Birçok ülkede kolorektal karsinomların en azından üçte birinin bu adenomlardan geliştiğine inanılmaktadır. Adenomların kolorektal karsinom oluşumunu hızlandıran öncül lezyon olduğu bilinmektedir ve bu bilgi geleneksel olarak “adenom-karsinom silsilesi” olarak tanımlanır. Bu özellik de displazik epitelin varlığı ile birliktedir. Displazi neoplastik epiteliyal proliferasyondur (1, 2). Adenomlar histopatolojik olarak tübüler, tübülovillöz ve villöz olarak üç gruba ayrılmaktadır. Bu ayırmda adenomatöz epiteldeki karakteristik büyüme paterni temel olarak alınmaktadır (3). Bu ayırım klinisyen, cerrah ve patologlar için oldukça anlamlıdır (4).

GENEL BİLGİLER

Etiyoloji:

Adenomların etiyojileri konusundaki hipotezler iki temel faktör üzerine kurulmuştur: Genetik ve çevresel faktörler; Hill ve arkadaşları (ark.) adenom gelişimi için potansiyel olan resesif bir gen olduğunu ileri sürmüşlerdir (p geni). Kişinin iki p geni (pp) taşıması halinde adenom gelişimine yatkın olacağını söylemişlerdir. Bununla birlikte diğer çevresel faktörler de adenom gelişimi ve adenomların karsinoma dönüşümünde rol oynamaktadırlar. Örneğin Japonlarda ve siyah ırkta, batı toplumlarına göre adenom açısından daha düşük bir insidans vardır (3, 5).

Adenom-karsinom silsilesi ve kolorektal karsinogeneizde rolü olduğu bilinen ilişkili genler 2 kategoride toplanmaktadır: Onkogenler ve tümör supressör genler. Onkogenler genleri, dominant olarak DNA sekansındaki değişimler ya da aktive edici mutasyonlar ile etkilerler. Selüler onkogenler hücre büyüme faktörlerine ait reseptörleri kodlarlar. Tümör supressör genler ya da antionkogenler ise, hücre büyümesinde negatif regülatör olarak bilinirler. Günümüzde adenom-karsinom silsilesi ve kolorektal karsinogeneziste tanımlanmış genler ras onkogeni ve APC (Adenomatosis Poliposis Koli geni), p53 ve DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma geni) tümör süpressör genleridir. Ras onkogeni ve APC gen mutasyonlarının tümör genezisinin başlangıcındaki erken olaylar olduğuna inanılmakta iken, p53 ve DCC gen mutasyonlarının tümör progresyonunda geç olaylar olduğuna inanılmaktadır. Mutasyonların kümülatif etkisi adenom-karsinom silsilesi, malignite gelişimi ve progresyonunda önemli olarak görülmektedir (6- 12).

Adenom-karsinom silsilesi terimini ilk defa 1951' de Mayo ve Jackman adlı araştışıcılar kullanmışlardır. Araştışıcılar rezidüel benign adenomatöz dokularda küçük karsinomların bulunabileceğini, malign odakların sıklıkla daha geniş poliplerde görüldüğünü ve kolonik adenom ve karsinom dağılımının aynı olduğunu göstermişlerdir (13). Kolonik adenokarsinomun prekürsörünün polipoid adenomlar olduğuna günümüzde geniş ölçüde inanılmaktadır. Adenom-karsinom silsilesi olarak bilinen bu bilgi, erken dönemde benign olan küçük adenomlarda belirli zaman sonra kolorektal karsinom gelişimi olarak tanımlanabilir. Yıllar içinde bu benign küçük adenomların boyutları artarak malignite özellikleri geliştirirler. Burada önemli olan malign transformasyon için gerekli olan süredir. Genellikle bu süre insan denekler üzerinde böyle bir deney yapılamayacağından, kesin olarak belirlenmemektedir (13- 15).

Stryker ve ark. ı tedavi edilmeyen kolonik poliplerin doğal seyrini araştırmışlardır. Bu çalışmadaki ortalama izlem süresi en az 12 ay, en fazla 229 ay olmak üzere ortalama 68 aydır. Bu izlem periyodu içinde poliplerin %37' sinin boyutu artmıştır. Ortalama 108 aylık bir izlem periodundan sonra poliplerin %9.3' ünde invaziv karsinom bulunmuştur. İzlem grupları içinde karsinom gelişen olgulardaki karsinom gelişim yerleri anatomik olarak adenomlarla büyük farklılık göstermemektedir. Eksize edilen poliplerdeki malignite insidansı açıkca polibin çapına bağlı olmaktadır. Özellikle 10 mm. in üzerindeki poliplerde bu risk artmaktadır (5, 13).

Neugut ve ark. ı adenomlu hastalarda, adenomun eksizyonundan sonra yeni, metakron ya da rekürren bir adenom gelişme riskini, adenom eksizyonundan 3-4 yıl sonra %15- 60 olarak belirtmişlerdir (16). Ulusal polip çalışmasında ise bu oran 3 yılda %32 olarak belirtilmektedir (14). Bu rekürrens hızı oldukça yüksektir ve adenom-karsinom silsilesinde önemli olabilecektir. Multipl adenomu olan hastalarda bu rekürrensler daha çabuk olmaktadır (16).

Wilcox ve ark.ı kolonik poliplerdeki erken invaziv karsinomu araştırmışlardır. Kolonoskopik polipektomi uygulamaya başlanmadan önce bu tür lezyonların metastaz oranı ortalama %10.4 bulunmuştur. Polipektomi materyellerindeki histopatolojik incelemede atipik epitelin muskularis mukoza içinde olması ve eğer polip saplı ise sap kısmında bu lezyonun devam etmesi halinde daha değişik tedavi protokolleri uygulanması gerektiği vurgulanmaktadır. Polipektomiden sonra invaziv karsinom gelişimi için risk taşıyan hastalar bulunmaktadır. Bu risk faktörleri araştışıcılar tarafından şöyle özetlenmiştir: 1)Kanser rezeksiyon sınırında varsa, 2) Lenfatik ya da venlerin içinde kanser varsa, 3) Tümör az diferansiye ise, 4) Sesil polip ise, 5) Rezeksiyon sınırında ya da sınırın yakınında kanser içeren kısa saplı polipler, 6)Tümör,

rezeksiyon sınırında varsa ya da inkomplet eksize edilmişse, hasta rezidüel hastalık için risk taşımaktadır (17, 18).

Kolorektal adenomlar dünyanın bazı bölgelerinde diğerlerine göre daha sıklıkla görülmektedir. Bu farklılıkta popülasyonun diyet alışkanlığı önemli bir noktadır. Diyetin liften fakir ve yağdan zengin olması, lifli gıdalardan zengin diyete göre daha yüksek oranda adenom gelişimine yol açmaktadır. Yüksek lif ve düşük yağ içeren diyetlerin barsak içeriğinin transit zamanını hızlandırmakta ve böylece potansiyel karsinojenlerin barsak mukozası ile temasını azaltmaktadır. Diyetteki yağ miktarı, safra asitlerinin fekal konsantrasyonu ile belirlenmektedir (2). Fazla miktarda yağ alınmasının karaciğerde kolesterol ve safra asitleri sentezini arttırdığı, bunların ise kalın barsaktaki bakteriyel flora tarafından potansiyel karsinojenlere çevrildiği ileri sürülmektedir. Mikroorganizmalardan özellikle Bakteriodes türünden kuşkululanılmaktadır. Kolonda çoğalmaları, diyetle yüksek miktarda rafine şeker alınmasıyla desteklenmektedir. Diyetle lif içeriği düşük olan zengin batı toplumlarındaki kolorektal karsinom ve adenom insidansının, daha yüksek lif içerikli, daha basit doğal gıdalarla beslenen Asya, Afrika ve diğer bölgelerde yaşayan daha düşük sosyoekonomik düzeye sahip popülasyonlardan yüksek olmasında, diyetle lif miktarının koruyucu bir etki sağladığı düşünülmektedir (6). Ayrıca kalıtsal predispozan faktörler üzerinde de durulmaktadır. Kolorektal neoplazi gelişim yatkınlığı gösterilen akraba örnekleri bulunmaktadır ve bir çalışmada bu genin geçiş sıklığının %19 olduğu söylenmektedir (1). Bunlardan başka sigara ve bira tüketimi de adenom gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olabilmektedir (1).

Yaş, sıklık ve lokalizasyon:

Adenomların her yaş grubunda görülmelerine karşın, insidansları, herediter adenomatöz poliposis sendromları dışında ortalama 40 yaşlarıdır. Olgularda yaşamın ilk 1., 2. ve 3. dekatlarında, kişi poliposis sendromlarından biri ya da juvenil polip olmadığı sürece, son derece seyrek olarak görülür. Tüm adenomların yaklaşık %5'i 4. dekatla, %15'i 5. dekatla ve yaklaşık %30'u 6. ile 7. dekatlar arasında izlenmektedir. 60- 70'li yaşlar arasında pik yapmaktadır. Genel popülasyondaki insidansları bölgeden bölgeye değişmek üzere ortalama %69' dur (1, 2). Adenom insidansının batı ülkelerindeki otopsi çalışmalarında %60, az gelişmiş ya da gelişmekte olan toplumlarda ise %5.5 olduğu bildirilmektedir (3, 4). O'Brien ve ark. nın yaptıkları ulusal polip çalışmasında, adenom prevalansının açık olarak bilinmemesine rağmen, otopsi serilerinde Amerika Birleşik Devletleri ve Kuzeybatı Avrupa ülkelerinde bu oranın %30 ya da daha fazla olduğu ve bunların sıklıkla 40 yaş üzerinde görüldüğü bildirilmektedir (14). Rickert ve ark. nın otopsi serisinde, Weiss ve ark. nın 614

adenomu içeren çalışmalarında, kalın barsaktaki adenomatöz lezyonlarda yaş ile birlikte adenom sıklığının arttığını göstermişlerdir. Bu oranlar 40 yaşın altına %25, 41-50 yaşları arasında %27, 51-60 yaşları arasında %32, 61-70 yaşları arasında %45 ve 71 yaş üzerinde de %48 olarak bildirilmiştir (19, 20). Ayrıca 65 yaşın altındaki erkeklerde ve 55 yaşın altındaki kadınlarda daha sık adenom görüldüğünü belirtmişlerdir (19).

Kolorektal adenomlarda hafif bir erkek predominansı bulunmaktadır ve multipl adenomlar 2 kat daha fazla oranda erkeklerde görülmektedir (2, 3, 21, 22).

Kolorektal adenomların lokalizasyonları otopsi çalışmaları ve endoskopik yöntemlerin uygulanmasıyla daha iyi ortaya konulmaktadır. O'Brien ve ark. nin yaptığı 3371 adet adenomu içeren ulusal polip çalışmasında, adenomların %7.6'sının çekumda, %8.6'sının çıkan kolon, %4.6'sının hepatic fleksura, %10.1'inin transvers kolon, %4.1'inin splenik fleksura, %13.9'unun inen kolon, %43'ünün sigmoid kolon ve % 8.1'inin de rektumda yerleştiğini bulmuşlardır, bu oranlar Rickert ve ark.nın sonuçları ile yakınlık göstermektedir (14, 19). Genel olarak serilerde adenomların önemli bir bölümünün rektosigmoid bölgede olduğu gözlenmektedir. Daha yaşlı hastalarda sağ kolon yerleşimli adenomlara rastlanmaktadır ve çapı daha büyük adenomlar da yine sağ kolon yerleşimli olmaktadır. 1978-1982 yılları arasında yapılan geniş bir çalışmada adenomların % 29.1' inin rektum, %31.5' inin sigmoid kolon yerleşimli olduğu ve diğerlerinin kalın barsağın değişik lokalizasyonlarında olduğu bildirilmektedir (1- 4).

Klinik Özellikler:

Kolorektal adenomlar sıklıkla asemptomatiktir ve rastlantısal olarak cerrahi, otopsi ve radyolojik girişimler sırasında ortaya çıkmaktadır. Bazı olgularda rektal kanama bazen tek klinik semptom olabilmektedir. Rektal kanama özellikle distal kolon yerleşimli adenomlarda belirgindir. Bundan başka karın ağrısı, inkontinens, obstrüksiyon, prolapsus, anemi, konstipasyon ya da diyare, dışkılama alışkanlığında değişiklikler gözlenir. Daha az sıklıkla izlenen bir bulgu da, özellikle villöz adenomlardan sekrete edilen büyük miktarlarda sıvı ve elektrolitten zengin olan mukusa bağlı olarak hastalarda ciddi derecelerde sıvı ve elektrolit kaybıdır (1-4, 23). Kolorektal villöz ve tübülovillöz adenomlarda sıklık sırasına göre şu semptomlar izlenmektedir: %43 rektal kanama, %32 mukuslu diare, %25 karın ağrısı, %14 konstipasyon, %8 tenezm, %5 prolapsus, %3 halsizlik . Mukuslu diareye bağlı dehidratasyon, letarji, prerenal azotemi, asidoz, hipotansiyon ve kollapsla sonuçlanan ciddi metabolik bozukluklar da bildirilmiştir (24). Gaitadaki gizli kan bakışı özellikle kolon adenomlarında erken tanı için önemlidir. Adenomlardaki bükülme ve dönmeler, sap kısmının zedelenmesi ya da vasküler obstrüksiyonu ile pasif konjesyon ve stromal kanama meydana gelmektedir.

Adenomlardaki bu gizli kanama özellikle sol kolon yerleşimli olanlarda daha sıktır. Ciddi kanamalar adenomun çapına, saplı olup olmamasına ve villöz büyüme paternine bağlıdır (1, 23).

Makroskopik ve Endoskopik özellikler:

Kolorektal adenomların temelde 2 büyük büyüme paterni vardır: Saplı (pedinküle) ve sapsız (sesil- flat). Bu ayırım genellikle endoskopik görünümlere bağlı olmaktadır. Adenomların çoğunluğu saplıdır. Sap birkaç milimetreden birkaç santimetreye kadar değişkenlik göstermektedir. Sap kısmı muskularis mukozayı da içeren normal mukozadan ve submukozal dokulardan oluşmaktadır ve kolon duvarıyla devamlılık göstermektedir. Sapsız olan düz (flat) adenomların boyutu küçük olabilir, kabarıklık şeklinde daha geniş olanları da vardır. Nadir olarak bu sapsız adenomlar yaygın plak tarzında olabilmekte ve daha fazla sıklıkla malign potansiyele sahip olmaktadır. Genel olarak tübüler adenomlar saplı ve villöz adenomlar ise sapsız olma eğilimindedir (1-4, 19, 25, 26). Kanamaru ve ark. nin Japonya' da yaptıkları 1503 adenomu içeren çalışmalarında, olguların %53'ü saplı, %47'si sapsız bulunmuş ve sapsız olan adenomların genellikle 6- 10 mm arasında boyut gösterdikleri saptanmıştır (27).

Tübüler adenomların boyutları genellikle 1 cm. nin altındadır. Villöz komponent içeriği arttıkça adenom boyutunda artış dikkati çekmektedir. Genelleme yapacak olursak, adenomların boyutları makroskopik büyüme paternlerine bağlı olarak değişmektedir. Otopsi materyellerinde tespit edilen adenomların %88'i 1.0 cm. den küçüktür. Kolonoskopi materyellerinde ise 1.0 cm. den küçük olan adenomların oranı %48 olarak bildirilmektedir. %35'i 1-2 cm arasında ve %17'si de 2 cm.nin üzerindedir. 1.0cm. nin altında olan adenomların %91'i tübüler adenomlardır (1-3). Ayrıca adenomlardaki malignite potansiyelinin 1 cm. nin altındaki adenomlarda oldukça düşük olduğu belirtilmektedir. St. Mark's hastanesinin verilerine göre adenomatöz poliplerdeki karsinom riski, boyut 1 cm. nin altında ise sadece %1'dir. 1-2 cm. arasında olanlarda oran%10 ve 2 cm.den daha büyük olanlarda ise bu oran %50 olarak belirtilmektedir. Belirtilen serideki tüm adenomların %60'ı 1 cm. nin altında, %20-25'i 1-2 cm. arasında ve %15-20'si ise 2 cm. nin üzerindedir (5).

Rickert ve ark. nin 518 adenom olgusunu içeren serilerinde, adenomların ortalama boyutu 5.8 mm, villöz komponent içerenlerde ise ortalama boyut 19.0 mm dir. Tübüler adenomların %86.7'si, tübülovillöz adenomların %6.3'ü ve villöz adenomların da %5.3'ü 10 mm. nin altındadır. Adenomların boyutları da yaşla birlikte artmaktadır. 60 yaş altında ortalama 6.2 mm, 60-74 arasında 6.0 mm, 75 yaş ve üzerinde ise 6.3 mm olarak bildirilmiştir (19). Fenoglio ve ark.nin yaptıkları bir çalışmada, 1.5cm. nin üzerindeki saplı adenomlarda invaziv

karsinom insidensinin %10, 5 cm. nin üzerindeki sapsız adenomlarda ise bu oranın %30 olduğu belirtilmektedir (5, 25).

O'Brien ve ark. nin yaptıkları ulusal polip çalışmasında, 3371 adet adenomun %37.6' sının küçük (0.5 cm. nin altında), %36.5' inin orta (0.6-1 cm arasında) ve %25.5' inin de büyük boyutta (1 cm. nin üzerinde) olduğu söylenmektedir (14).

Thompson ve ark.nın 187 kolonik lezyon üzerinde yaptıkları makroskopik çalışma oldukça anlamlıdır. Bu çalışma adenomların endoskopik-makroskopik görünümlerinden histopatolojik türlerini ayırt etmeye yöneliktir. Çalışmada makroskopik ve mikroskopik tanımlar korele edilmiştir. Beş makroskopik kriter çalışılmıştır. Bunlar sırasıyla:

1. Mukozal yüzeydeki "serebriform" görünüm. Bu kriter adenomatöz ve non-adenomatöz poliplerin ayırımında kullanılmıştır.%97 sensitivitesi ve %90 spesifitesi olan bir belirleyicidir.
2. Serebriform polibin baş kısmındaki yarıklanma ve lobulasyonun derecesi. Bu kriter tübüler, tübülovillöz ve villöz adenomların ayırımı için kullanılmıştır. Villöz özellikteki lezyonlarda lobulasyonun derecesi artmaktadır.
3. Serebriform polibin baş kısmındaki fokal asimetrik jiral (çevreleyen) distorsiyonun varlığı ya da yokluğu. Bu kriter adenomlardaki displazi derecelerini ayırt etmede kullanılmıştır. %100 sensitivitesi ve %93 spesifitesi olan bir belirleyicidir.
4. Fokal jiral distorsiyon içeren lobüldeki çöküntüler ya da fokal konkavitenin varlığı. Bu kriter karsinoma in situ ayırımında kullanılmıştır. %67 sensitivitesi ve % 100 spesifitesi olan bir belirleyicidir.
5. Lobül ya da serebriform polipteki konkavitenin üzerinde bulunan ülserasyonun varlığı. Bu kriter adenomatöz polipteki invaziv karsinom ile mikroinvazyon ayırımı için kullanılmıştır. %93 sensitivitesi ve % 100 spesifitesi olan bir belirleyicidir. Lobüler çöküntü içeren adenomlardaki fokal ülserasyon invaziv karsinomun varlığını gösteren bir belirleyicidir.

Adenomların endoskopik- makroskopik görünümlerinden histopatolojik türleri ile, karsinoma in situ lezyonların ve mikroinvazyonların varlığını belirlemek oldukça önemli olmaktadır (26). Aynı türde bir çalışma da Minamoto ve ark.ı tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar adenomları makroskopik-endoskopik görünümüne göre, süperfisiyel ya da non-polipoid, "flat" yani düz ve deprese tür olarak ayırmışlar, bu türde görülen adenomları aynı türdeki karsinomlarla ve bu sonuçları histopatolojik özellikler ile karşılaştırmışlardır (28- 31).

Mikroskopik Özellikler:

Adenomlar, adenomatöz epiteldeki karakteristik büyüme paternine göre üç histopatolojik türe ayrılmaktadır:

1. Tübüler adenomlar (adenomatöz polipler, polipoid adenom)

2. Tübülovillöz adenomlar (intermediate adenomlar)

3. Villöz adenomlar (villöz papillomlar).

Bu sınıflama, temelde adenomların histolojik ve sitolojik özelliklerine dayanmaktadır (1-5, 14, 19, 24, 26, 32-34).

Tübüler Adenomlar (TA): Adenomatöz epiteliyal hücrelerin döşediği düzenli olarak dallanmış bez yapılarından oluşmaktadır. Fokal olarak bezlerde kistik genişlemeler olabilmektedir. Bu bez yapıları uzamış, hiperkromatik nükleuslu, genişlemiş ve kalabalıklaşmış hücreler ve sıklıkla azalmış sayıda goblet hücreleri ile döşelidir. Bu dallanmış bez yapıları rölatif olarak normal görünümlü, ancak inflame ve kanamalı olabilen bir lamina propria içine gömülmüşlerdir. Normal kolonik epitel adenomatöz epitele yer değiştirmiştir. O'Brien ve ark. nın ulusal polip çalışmasında, TA'ların oranı %70.4 olarak bildirilmektedir (14). Otopsi serilerinde TA oranı %95 iken, bu oran endoskopik çalışmalarda %65-85 arasında değişmektedir (3). Weiss ve ark. nın yaptıkları çalışmada ise TA oranı %89'dur (20). Muto ve ark. nın çalışmasında TA oranı %75 olarak belirtilmektedir (5). TA. ların genel olarak çoğunluğu büyük ve saplıdır. Ortalama olarak 1 cm. in altındadır (2, 3, 5, 14, 19). TA. lar proksimal kolonda, distale göre daha sıklıkla yerleşmektedir. %66.5'i sırasıyla, çekum, çıkan kolon ve transvers kolondadır. Buna karşılık %33.5'i sırasıyla, inen kolon, sigmoid kolon ve rektumdadır (19).

Tübülovillöz Adenomlar (TVA): Tübüler ve villöz yapıların karışımından oluşmaktadır. Villöz yapılar uzun ya da kısa olabilmektedir. Bu tür adenomlar da sık olarak görülmektedir. Muto ve ark. ı TVA insidansını %15 olarak belirtmişlerdir (5). Otopsi serilerinde %2-4, endoskopik serilerde ise bu oran %16-27'dir (3). Ulusal polip çalışmasında ise %8.2'dir (14). Weiss ve ark. nın çalışmasında TVA oranı %6.3'tür (20). TVA. ların %7'si 1 cm. nin altında, %38'i 2 cm. nin üzerindedir (3). TVA. ların %62.5'i proksimal kolonda, %37.5'i de distal kolon yerleşimlidir (19).

Villöz Adenomlar (VA): Yüzeyden lümeneye doğru çıkan parmaklı mukozal uzantılardan oluşmaktadır. Bu parmaklı uzantılar adenomun derininde muskularis mukozaya doğru da inmektedir. Muto ve ark. nın serisinde VA oranı %10'dur (5). Bu oran otopsi serilerinde %1-3, endoskopik serilerde ise %3-9 arasındadır (3). Ulusal polip çalışmasında oran %4.7'dir (14). Weiss ve ark. nın serisinde ise oran %4.5'tur (20). VA. ların %2'si 1 cm. nin altında,

%12' si 2 cm. nin üzerindedir (3). Rektum ve rektosigmoid bölgede daha sıktır, genellikle sapsızdır (1-4, 6.)

Histopatolojik olarak bu 3 türe ayrılan adenomların hepsi neoplastiktir ve anormaldir. Adenom epitelindeki atipi ya da displazinin derecesi sitolojik kriterlere göre 3 kategoriye ayrılmaktadır:

1. Hafif derecede atipi (HA)
2. Orta derecede atipi (OA)
3. Şiddetli derecede atipi (ŞA) (1-5, 12, 14, 35, 36).

Ulusal polip çalışmasında O'Brien ve ark.ı adenomlardaki atipinin derecesini "karsinoma in situ" yu da ekleyerek 4 derecede incelemiştir (14).

Hafif derecede atipi'de (HA) epiteliyal hücrelerin nükleusları bazalde yerleşmiş, genişlemiş, hiperkromatik, bazı alanlarda stratifiedir. Minimal bir polarite kaybı izlenmektedir. Nükleer membranlar düzenlidir, kromatin düzgün dağılımlıdır ve nükleol belirginliği yoktur. Hücrelerde az sayıda mitoz vardır. Hücreler normalden daha az miktarda müsin salgırlar. Tübüller ve villöz yapılar düzenli görünümündedir. Stroma normale oranla azalmıştır (1, 5, 14). HA'de dominant olan hücre tipi normal gastrik foveolar hücrelere benzeyen mukus üreten epiteliyal hücrelerdir. Normal kolon mukozasındaki absorbtif ve goblet hücrelerinden ve Lieberkühn kript epitelindeki endokrin ve Paneth hücrelerinden farklı olarak apikal müsin damlacıkları içermektedirler. HA'li VA'da Paneth hücrelerinin varlığı dikkat çekicidir (1, 4, 25, 37).

Şiddetli derecede atipi'de (ŞA) glandüler tomurcuklanma, bezler arası köprüleşme ve sırt sırta vermiş görünümlü tübül ya da villuslarda belirgin düzensizlik dikkat çekicidir. Musin sekresyonu çok azdır ya da hiç yoktur. Nükleuslar geniş, pleomorfik, hiperkromatiktir. Belirgin stratifikasyon ve polarite kaybı içermektedir. Nükleer membranlar oldukça düzensizdir. Nükleer kromatin berraklaşması izlenir. Geniş ve düzensiz nükleol dikkat çekicidir. Mitoz oldukça sıktır ve atipik mitozlar da görülebilir. Bezler arası stroma belirgin derecede azalmıştır (1, 4, 5, 14). Histolojik olarak immatür hücreler dominant hale geçerler. Bu tür hücrelerde müsin yoktur, normal kolon mukozasından farklı olarak değişik miktarlarda glikojen içerdiklerinden dolayı, eozinofilik sitoplazmalıdır (1). ŞA gösteren ve genellikle 10 mm. nin üzerindeki adenomlar daha çok sol kolon ve rektumda yerleşmektedir ve adenomlardaki ŞA kolorektal karsinom riskinin artmasında selektif bir histopatolojik bir belirleyici olarak görünmektedir (38).

Orta derecede atipi'de (OA) bezlerdeki hücrelerin nükleuslarının bazaldeki polarizasyonu kaybolmuştur. HA ile ŞA arasındaki patolojik formlardır. Nükleer membranlar ve nükleer kromatin paterni HA' den daha düzensizdir. Nükleol belirginliği HA'den daha sık belirgindir (1, 5, 14).

Adenomlardaki Müsin Değişiklikleri:

Adenomlardaki müsin değişikliklerini anlamak için öncelikle normal kolon mukozası ve kriptlerinin histolojik özelliklerini bilmek gerekmektedir. Kolonun yüzey epiteli basit kolumnar ve ya da küboidal epitelden oluşmaktadır. Bu hücreler "Absorbif" ve "Goblet hücreleri" olmak üzere iki tipdir.

Absorbif hücreler kolonun iyon ve su transportunu sağlamaktadırlar. Sitoplazmaları eozinofiliktir ve mukus içermezler. Nükleuslar oval şekilli ve bazalde yerleşmiştir, sıklıkla nükleol içerirler.

Goblet hücreleri mukus granüllerini sentezlerler, depolarlar ve sekrete ederler. Lümenle ilişkili apikal villusları vardır. Bu mukus granülleri rutin H+E boyalı preparatlarda izlenemez ancak müsin boyaları ile gösterilebilir. Goblet hücrelerindeki müsin glikoprotein yapıları kolonun bölgelerine göre değişkenlik göstermektedir.

Kolonik kriptleri ya da Lieberkühn kriptlerini basit kolumnar epitel döşemektedir. Ancak kript epiteli yüzey epitelinden daha farklı hücre kompozisyonundan oluşmaktadır. Matür absorbif ve Goblet hücrelerine ek olarak endokrin ve Paneth hücreleri şeklinde özelleşmiş immatür ve andiferansiye prekürsör hücreleri içermektedir. Kriptlerdeki bu andiferansiye hücreler çok az mukus içerirler ya da mukus içermezler (37).

Lorenzsonn ve Trier'in tanımladığı şekilde Lieberkühn kriptleri temel olarak şu hücreleri içermektedir:

1. Andiferansiye hücreler
2. Enterokromafin hücreler
3. Matür goblet hücreleri
4. İmmatür goblet hücreleri, immatür absorbif hücreler ve intermediate hücrelerden oluşan parsiyel diferansiye hücreler (1, 39-41).

Mughal ve ark. nın yaptıkları karşılaştırmalı ultrastrüktürel çalışmada adenomlardaki atipi derecesi ile kript epitelindeki temel hücre değişikliklerinin ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. Bu değişiklikler özellikle bu hücrelerdeki mukus değişikliklerine dayandırılmaktadır (40).

Dokukimyasal Özellikler:

Müsinler primer olarak goblet hücreleri tarafından, az miktarda da absorbtif hücreler tarafından salgılanan sekretuar glikoproteinlerdir. Yapısal olarak şekerle ilişkili, sonlanabilen ya da devam edebilen santral yerleşimli polipeptid bir santral kısımdan oluşmaktadır. Şekerler santral kısımla ilişkilidir. Sıklıkla bir şeker kombinasyonu ile sonlanmaktadır. Dokukimyasal olarak Alcian blue (AB) ya da periodic acid-Schiff (PAS) boyalarıyla ya da bu reaksiyonların kimyasal varyantları ile boyanarak gösterilebilirler ya da immün dokukimyasal olarak karbonhidrat bağlayan proteinlere yüksek afinite gösteren lektinlerin kullanılmasıyla gösterilebilirler (1, 42).

Mukusun major spesifik komponentleri, genital traktüs, gastrointestinal traktüs ve trakeabronşial ağaç gibi mukoza epitellerinin korunması ve lubrifikasyonunda rol oynayan müsinlerdir. Bu kompleks O-glikoproteinler total ağırlığının %80'inden fazlasını oluşturan çok sayıdaki glikan halkalarının varlığına bağlı olarak büyük bir moleküler kitleye sahiptir. Glikan halkalarındaki asit konsantrasyona bağlı olarak 3 temel sınıfa ayrılırlar: Nötral müsinler, asidik müsinler ve çok asidik müsinler. Bu yapıları ayırt etmede değişik pH'lardaki AB ve PAS dokukimyasal boya ile lektinler kullanılmaktadır (43-48).

Dokukimyasal olarak müsinler primer olarak AB ve PAS reaksiyonları ile gösterilirler. Asidik müsinler asidik pH'da AB gibi bazik boyalar ile gösterilebilen sialik asit ve sülfatları içerirler. Sialik asit ve sülfatlar kendi aralarında ya değişik pH'larda ya da pH 2.5'te uygulanan high iron diamine (HID) boyası kullanılarak ayırt edilirler. Sülfatlar diamine ile reaksiyona girerek kahverengi-siyah, sialik asit ise mavi boyanır. Nötral müsinler daha basit yapıdadır ve bu yolla gösterilemezler. PAS yönteminin kullanılması ile gösterilebilirler (1, 42).

Normal kolonik mukoza nötral müsinler, asidik sialomüsinler ve sülfomüsinlerin karışımından oluşmaktadır. Sol kolonda sülfomüsin kriptlerin alt yarısında dominanttır, yüzey epiteli ve kriptlerin üst yarısında ise değişik derecelerde sülfomüsin ve sialomüsin karışık olarak bulunurlar. Sağ kolonda sialomüsinler kriptlerin alt üçte birinde, sülfomüsinler ise, üst üçte ikisinde dominanttır. Hem sol, hem de sağ kolonda dominant olarak sekrete edilen müsin "sülfomüsin"dir. Sülfomüsin ve sialomüsini ayırt etmede kullanılan en popüler metod pH 2.5'te uygulanan HID-AB boyasıdır. Burada sülfomüsinler kahverengi-siyah, sialomüsinler ise mavi boyanırlar (42, 49-51).

Filipe ve ark. 1 kolon mukozasındaki müsin değişikliklerinin belki de karsinom histogenezisinin erken basamağını temsil ettiğini ve bu yüzden oldukça önemli olduğunu vurgulamışlardır (52).

Gastrointestinal traktüsteki müsün sekresyon dağılımındaki değişikliklerin malignite ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Kolondaki bu değişiklikler normalde dominant olan sülfomüsünün, sialomüsüne doğru kayması şeklindedir. Adenomatöz poliplerdeki malignite potansiyelinin atipinin derecesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir, ancak atipinin derecelendirilmesi oldukça sübjektiftir. Bu değişikliklerin müsün komponentlerindeki değişikliklerle birlikte değerlendirilmesi daha yararlı olacaktır (35, 53- 55).

İmmün Dokukimyasal Belirleyiciler

Human Gastric Mucin (HGM):

Prekanseroz kolon lezyonlarında mukus değişikliklerinin gösterilmesi İDK' sal olarak A ve B kan grup antijenlerinin varlığı ile yapılmıştır. Bu değişikliklerin bazıları onkofetal değişikliklerdir. HGM ya da M1 antijen ilk defa Fenoglio ve ark. nın sınıflamasına dayanılarak pür endoservikal tür ovarian müsünöz kist sıvısından izole edilen bir fukomüsündür. M1 antijen ya da HGM fetal kolonik mukozada bulunmasına karşın, normal erişkin kolon mukozasında bulunmamaktadır. Bu da HGM'nin onkofetal özelliğini göstermektedir. HGM aynı zamanda kolon adenokarsinomlarının %29' unda ve bunlara komşu mukozaların da %57' sinde gösterilmiştir. Bara ve ark. ı ratların distal kolon mukozasına kimyasal karsinojen olan 1.2-dimethylhydrazine (DMH) 'ın ilk enjeksiyonundan 2 hafta sonra mukozadaki HGM varlığını göstermişlerdir. Bu bulgu HGM' nin, prekanseroz kolon mukozasında erken bir belirleyici olduğunu göstermektedir. HGM fetal, pre-kanseroz ve kanseroz kolon mukozasında eksprese edilmekte, ancak normal kolon mukozasında eksprese edilmemektedir. Ayrıca kolorektal adenomlarda anöploidide ile HGM ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon bulunmaktadır (3, 56- 58).

HGM gastrointestinal traktüsü proteazlar, patojenik mikroorganizmalar ve mekanik travmalardan korumada major rol oynayan bir glikoproteindir. HGM ekspresyonu mide ve safra kesesinde en yüksek derecededir. Terminal ileum ve sağ kolonda ise oldukça zayıf ekspresyon göstermektedir (59). Kitamura ve ark. nın yaptıkları bir çalışmada, kolon kanser hücrelerinde eksprese edilen müsünün, kolonik tip müsünden gastrik tip, özellikle gastrik süperfisiyel tip müsüne doğru bir kayma gösterdiği bulunmuştur (60).

Bara ve ark. nın çalışmasında kolorektal adenomların %94' ünde HGM ekspresyonu gösterilmiştir (57).

MUC2:

Glandüler epiteliyal hücreler tarafından sentezlenen müsinler, yüksek oranda Ser, Thr, Pro, Ala ve Gly ile düşük oranda aromatik ve değişmiş aminoasitleri içeren yüksek moleküler ağırlıklı glikoproteinlerdir. Kan grubu belirleyicilerini içeren karbonhidrat zincirleri, molekül ağırlığının %60-80' ini oluşturan "O-linked" serin ya da tirozindir. Glandüler epitelden kaynaklanan tümörlerdeki müsin sentezi ve sekresyonu sıklıkla değişmiştir. Tümör müsinleri NeuAc α 2,6 GalNAc α -O-Ser/Thr (Sialy-Tn) gibi normal müsinlerde bulunmayan tuhaf karbonhidrat epitoplarını taşırlar. Tümör hücrelerinin glikosilasyonu, kriptlerdeki normal müsinlerin peptid epitoplarının çoğalmasına neden olabilirler. Geçmiş yıllarda insan müsinlerini kodlayan birkaç tane gen izole edilmiş ve özellikleri bulunmuştur. Bu genlerin genel özelliği hidroksi aminoasitlerden zengin olmaları ve yaklaşık 60 baz çiftinin ardışık tekrarlarının değişik sayılarda bulunmasıdır. MUC1 ilk defa MCF-7 meme kanser hücrelerinden izole edilmiştir. Daha sonraları aynı gen HPAF pankreas kanser hücrelerinin tamamlanmış DNA yani cDNA ailesinden izole edilmiştir. MUC2 ve MUC3 ise ilk defa ince barsaktan izole edilmiştir. MUC2 ve MUC3 genleri nötral ve asidik intestinal apomüsin genlerini temsil etmektedirler. MUC2' nin homoloğu olan cDNA lar ve MUC4 trakeabronşial dokudan derive olan cDNA türlerinden izole edilmiştir (45, 48). Dört ayrı müsin kor peptidini kodlayan cDNA klonları (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4), insan meme, pankreas, ince barsak ve trakeabronşial dokularından izole edilmiştir. Bu genlerin ekspresyonu adı geçen dokuların neoplastik durumlarında değişkenlikler göstermektedir (44, 61- 65).

MUC1 normal meme ve pankreasta ekspresse edilen major apomüsindir. MUC2 dominant olarak gastrointestinal traktüste, MUC5B ve MUC5C genleri de yüksek düzeylerde normal solunum yolları ve midede eksprese edilmektedir (48). MUC6 gastrik mukozanın cDNA türünden izole edilen ve 11q15 kromozomunda bulunan bir gendir. MUC7 submandibüler bezden izole edilmiştir ve 4. kromozomda bulunur, MUC2 11q15 kromozomunda bulunmaktadır (43).

Çok sayıda karbonhidrat zincirinde bulunan apomüsinlerden oluşan müsin tip moleküller glikozidik bağlarla serin ve tionin aminoasitlerine bağlanmaktadırlar. "O-linked" karbonhidrat yapıları molekülün %80' ini oluşturmaktadır ve glüsidik taraf zincirlerinin uzunluğu 1' den 20' ye kadar değişmektedir. Geçmişte zorluklarla sekiz müsin geni izole edilmiştir, bunların temel özelliği santralde yerleşmiş çok sayıda ardışık tekrarlardan oluşan bölgelerinin bulunmasıdır. MUC2 geni insan ince ve kalın barsak dokularında dominant olan tipik sekretuar jel yapısındaki müsinini kodlamaktadır (66- 68). MUC2 ve MUC3 genlerinin her ikisi

de kolonik tümörlerde eksprese edilmektedirler, bununla birlikte, ekspresyon düzeyleri açıkça farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar tümörün farklı histopatolojik alt türüne bağlı olabilmektedir (68- 71).

Ewing ve ark. ı immün dokukimyasal olarak MUC1, MUC2 ve MUC3' ün ardışık tekrarlayan proteinlerini normal kolon mukozası, hiperplastik polip, adenomatöz polip ve invaziv kanserlerde araştırmışlar ve MUC2 skorlarını adenomlarda villöz histoloji ve adenom çapı arttıkça anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (72).

Bu çalışmanın amacı kolorektal adenomlardaki dokukimyasal ve immün dokukimyasal yöntemlerle belirlenebilen ve adenom-karsinom silsilesinde oldukça önemli olan müsin değişikliklerinin, adenomlardaki epitelial atipi ile ilişkisini araştırmaktır.



GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 1996-1997 yılları arasında kolorektal adenom nedeniyle endoskopik polipektomi uygulanmış ve Patoloji Anabilim Dalı'nda değerlendirilmiş toplam 54 olgu alınmıştır. Retrospektif özellikteki bu çalışmada olgular rastgele seçilmiştir.

Olgulara ait hematoksilen-eosin boyalı preparatlar Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na ait preparat arşivinden çıkartılarak yeniden gözden geçirilmiş ve kolorektal adenom tanıları doğrulanmıştır. Olguların histopatolojik türleri (tübüler, tübülovillöz, villöz), atipilerinin derecesi (hafif, orta, şiddetli) yeniden değerlendirilmiştir.

Olgulara ait lezyonların anatomik lokalizasyonları, boyutları, olguların yaşları, cinsiyetleri patoloji rapor kayıtlarından elde edilmiştir.

Her olgu için lezyonu örnekleyen dokuyu içeren %10' luk formalinde fikse, parafine gömülü blok seçilmiştir. Seçilen bloklardan hazırlanan 4 mikron kalınlıkta kesitler poli-1-lizin ile kaplı lamlara alınarak dokukimya ve immün dokukimya boyamaları için oda ısısında bekletilmiştir.

Dokukimyasal boyama:

Kombine Alcian blue-PAS tekniği (Mowry, 1956) :Asit mün ve nötral münlerin belirlenmesi için uygulanmıştır.

Boya; a. Alcian blue :1 gr.

b. %3'lük asetik asit : 100 cm³

c. Schiff's reaktifini içermektedir.

Boyanın uygulanmasında şu aşamalar izlenmiştir:

1. Poli-1-lizinli kesitler ksilolde 20 dk. bekletilerek deparafinize edilmiştir.
2. %96'lık alkolden başlayarak %70'lik alkole dek dizilerden geçirilerek rehidrate edilmiştir.
3. Alcian blue solüsyonunda 5 dk. bekletilmiştir.
4. Kesitler bu süre sonunda önce çeşme suyunda, daha sonra distile suda yıkanmıştır.
5. %1'lik sıvı periodik asitte 5 dk. bekletilmiştir.
6. Distile suda kesitler yıkanmıştır.
7. Schiff's reaktifinde kesitler 15 dk. bekletilmiştir.
8. 5-10 dk. suda yıkanmıştır.
9. Nükleusların boyanması için hematoksilende bekletilmiştir.
10. Kesitler suda yıkanmıştır.

11. Absolü alkolde yıkanmış kesitler, ksilolde saydamlaştırılmış ve balsam ile kapatılmıştır.

Boyanın Değerlendirilmesi: Asit mûsinler “mavi”, nötral mûsinler “kırmızı-morumsu”, nükleuslar “soluk mavi” renk almışlardır (42). Kesitlerdeki mûsin ile boyalı hücreler semikantitatif olarak şu şekilde değerlendirilmiştir (35):

0: Reaktivite yok

1: Bazı reaktif hücreler (%10'un altında)

2: Orta sayıda reaktif hücreler

3: Çok sayıda reaktif hücre

4: Tüme yakın reaktif hücreler

High iron diamine tekniği (Spicer, 1965): Sülfomûsin ile sialomûsin ayrımı için kullanılmıştır.

Boyanın hazırlanması: N, N-Dimetil-meta-fenilendiamin-dihidroklorid : 120 mg

N, N-Dimetil-para-fenilendiamin-dihidroklorid : 20 mg

Distile su : 50 cm³

Ferrik klorid (%60'lık BDH solüsyonu) : 1.4 cm³

İki diamin tuzu aynı anda distile suda eritildikten sonra ferrik klorid solüsyonu eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Boyanın uygulanmasında şu aşamalar izlenmiştir:

1. Poli-1-lizinli kesitler ksilolde 20 dk. bekletilerek deparafinize edilmiştir.

2. %96'lık alkolden başlayarak %70'lik alkole dek dizilerden geçirilerek rehidrate edilmiştir.

3. Kesitler 24 saat diamin solüsyonunda bekletilmiştir.

4. Suda yıkanmıştır.

5. Zıt boya için %3'lük asetik asitteki %1'lik Alcian blue boyasında kesitler 5 dk. bekletilmiştir. Kesitler yıkandıktan sonra 2-3 dk. %0.5'lik sıvı nötral kırmızıda bekletilmiş ve sonra suda yıkanmıştır.

6. Kesitler absolü alkolde yıkandıktan sonra, ksilolde saydamlaştırılmış ve balsam ile kapatılmıştır.

Boyanın değerlendirilmesi: Sülfomûsinler “siyah-kahverengi”, sialomûsinler “mavi”, nükleuslar “kırmızı” renk almıştır (42). Kesitlerdeki mûsin boyalı hücreler semikantitatif olarak Kombine Alcian blue-PAS tekniğinde olduğu gibi değerlendirilmiştir (35).

İmmün dokukimyasal boyama:

İmmün boyama, peroksidaz ile işaretlenmiş streptavidin-biotin (Large volume DAKO LSAB 2 Kit, peroxidase, DAKO Corp. Carpinteria, USA) yöntemi ile HGM ve MUC2 primer antikoları kullanılarak yapılmıştır. Uygulamada şu aşamalar izlenmiştir:

1. Poli-1-lizinli kesitler ksilolde 20 dk. bekletilerek deparafinize edilmiştir.
2. Daha sonra %96'lık alkolden başlayarak %70'lik alkole dek dizilerden geçirilerek rehidrate edilmiştir.
3. Kesitlerin çevresi sınırlayıcı kalem ile çerçeve içine alınmış ve kesitler önceden hazırlanan pH'ı 7.2 olan phosphate-buffered saline (PBS) solüsyonunda 5 dk. yıkanmıştır.
4. Kesitler nemli kamara içerisine dizilerek %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatılarak 5 dk. bekletilmiştir. Bu uygulama ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edilmiştir.
5. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra primer antikolar ile Tablo 1' de verilen uygun dilüsyonlarda oda sıcaklığında 1 saat süre ile inkübe edilmiştir.
6. PBS' te 5 dk. yıkanarak bağlanmamış antikoların uzaklaşması sağlanmıştır.
7. Kesitlere bağlayıcı biotinize sekonder antikordan damlatılmış, 10 dk. beklenmiştir.
8. Kesitler PBS' te 5 dk. yıkanmıştır.
9. Kesitlere Streptavidin peroksidaz solüsyonu damlatılarak, 10 dk. bekletilmiştir.
10. Kesitler 5 dk. PBS' te yıkanmıştır.
11. Antijen-antikor bağlanmasını göstermek için kesitlere önceden tarafımızdan hazırlanan 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorür (DAB) / H₂O₂ damlatılarak, kahverengi renklenme gözlenene dek beklenmiş ve daha sonra çeşme suyunda yıkanmıştır.
12. Kesitlere Mayer's hematoksilen boyası ile zıt boyama yapılmıştır.
13. Çeşme suyunda yıkanan kesitler %70'lik etil alkolden %96'lık alkole kadar dizilerden geçirilerek, saydamlaşma sağlamak amacıyla ksilolde 10 dk. bekletilmiş ve balsam ile kapatılmıştır.

İmmünreaktivitenin değerlendirilmesi:

HGM ve MUC2 primer antikoları ile reaktif hücrelerdeki intrastoplazmik ve intralüminal mün boyanması pozitif olarak kabul edildi. Hiç boyanma göstermeyen lezyonlar ise negatif olarak kabul edildi.

HGM için pozitif kontrol olarak mide ve endoserviks kesitleri, MUC2 için ise normal kolon mukozası seçilmiştir.

HGM ve MUC2 ile pozitif boyanan hücrelerin yüzdesinin semikantitatif olarak ölçümünde Bara ve ark.nın (57) kullandıkları skorlama yöntemi tercih edildi:

- 0: Hiç boyanma yok.
1: %10' un altındaki sayıda hücresele pozitiflik
2: %10-50 arası
3: %50-75 arası
4: %75' in üzeri.

Tablo 1. Primer antikorların özellikleri.

PRİMER ANTİKOR	FİRMA ADI	DİLÜSYON	SÜRE	ÖZELLİK
Human Gastric Mucin (HGM)	Novocastra	1/50	1 saat	Peptide core of human gastric mucin
Monoclonal Antibody to Mucin2 (MUC2)	BioGenex	Hazır dilüe	1 saat	Synthetic human MUC2 (MI-29) peptide

İstatistiksel analiz:

İstatistiksel işlemler SPSS (Scientific Package for Social Sciences) programı ile IBM uyumlu bilgisayarda yapıldı. Tüm verilerin tanımlayıcısı ve dağılımsal değerleri alındı. Değişkenlerin türüne ve dağılımına göre parametrik-nonparametrik istatistik testleri kullanıldı.

İstatistiksel analizde olgulara ait lezyonların boyutu, histopatolojik grade'i, paterni, dokukimyasal ve immün dokukimyasal boyanma özellikleri değerlendirildi. Kolorektal adenomların boyutları ile atipi dereceleri ve paternleri karşılaştırıldı. Adenomların atipi dereceleri ile dokukimyasal (PAS-AB ve HID-AB) boyanma skorları, immün dokukimyasal (HGM ve MUC2) boyanma skorları arasındaki ilişki araştırıldı. Ayrıca adenomların HGM ekspresyonu ile MUC2 ekspresyonu arasındaki ve HID boyanması ile AB boyanması arasındaki ilişki de değerlendirildi.

Sonuçlar Ki-Kare, Kruskal Wallis 1-Way Anova ve Kendall's Tau-B korelasyon testi kullanılarak elde edildi. Olasılık katsayısı (p) 0.05' e eşit ya da 0.05' ten küçük ise, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ($p < 0.05$ ya da $p = 0.05$).

BULGULAR

Hastaların Özellikleri:

Bu çalışmada araştırılan 54 olgudan 42' si erkek (%77.8), 12' si (%22.2) kadındır. Olguların yaşları 40- 83 arasında değişmektedir, ortalama yaş 58.7' dir.

54 olgudan 32' si (%59.2) TA' dur (Resim 1). Bu gruptaki olguların 7' si (%21.8) kadın, 25' i (%78.2) erkektir. Olguların yaşları 40- 74 arasında değişmektedir, ortalama yaş 58.2' dir.

54 olgudan 12' si (%22.2) TVA' dur (Resim 2). Bu gruptaki olguların 4' ü (%33.3) kadın, 8' i (%66.7) erkektir. Olguların yaşları 44-83 arasında değişmektedir, ortalama yaş 64.1' dir.

54 olgudan 10' u (% 18.5) VA' dur (Resim 3). Bu gruptaki olguların 1' i (% 10) kadın, 9' u (%90) erkektir. Olguların yaşları 51- 77 arasında değişmektedir, ortalama yaş 63.6' dir.

Histopatolojik Bulgular:

32 TA olgusundan 18' i (% 56.25) hafif derecede atipili, 9' u (% 28.2) orta derecede atipili ve 5'i (% 15.55) şiddetli derecede atipilidir (Resim 4).

12 TVA olgusundan 2' si (%16.7) hafif derecede atipili, 6' sı (% 50) orta derecede atipili, 4' ü (%33.3) şiddetli derecede atipilidir .

10 VA olgusundan 2' si (% 20) hafif derecede atipili, 3' ü (% 30) orta derecede atipili ve 5' ü (%50) şiddetli derecede atipilidir (Tablo 2).

Olgularda en sık hafif derecede atipi izlenmiştir (%40.7). Şiddetli derecede atipi en sık villöz adenomlardadır.

Tablo 2. Olguların atipi dereceleri ile histopatolojik türleri arasındaki ilişki

	N	HA	OA	ŞA
TA	32 (%59.2)	18 (%56.25)	9 (%28.2)	5 (%15.55)
TVA	12 (%22.2)	2 (%16.7)	6 (%50)	4 (%33.3)
VA	10 (%18.5)	2 (%20)	3 (%30)	5 (%50)
TOPLAM	54 (%100)	22 (%40.7)	18 (%33.3)	14 (%26)

Atipinin derecesi ile adenom paterni arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Ki kare testi p=0.09).

Lokalizasyon:

Tüm adenomların %46.3' ü sigmoiditte, % 37' si rektumda, % 5.5' i inen kolon, % 5.5' i transvers kolon, % 3.7' si çıkan kolon ve % 2' si çekumda yerleşmiştir.

Her üç gruptaki olguların lokalizasyonlara göre dağılımı Tablo 3' te gösterilmiştir.

Tablo 3. Tübüler, tübülovillöz ve villöz adenomların lokalizasyonlara göre dağılımı.

	N	ÇEKUM	ÇIKAN	TRANS.	İNEN	SİGMOİD	REKTUM
TA	32	0	2	3	2	17	8
TVA	12	1	0	0	0	6	5
VA	10	0	0	0	1	2	7
Toplam	54	1	2	3	3	25	20

Boyut:

Olguların boyutları 2-40 mm arasında değişmektedir, ortalama boyut 11.8 mm. dir. TA' ların boyutları 2-40 mm arasındadır, ortalama boyut 9.75 mm. dir. TVA' ların boyutları 2-30 mm arasındadır, ortalama boyut 9.4 mm' dir. VA' ların boyutları 5-25 mm arasındadır, ortalama boyut 8.7 mm' dir. Adenom boyutları 0-5 mm arasındakiler küçük (K), 6-10 mm arasındakiler orta (O) ve 10 mm den büyük olanlar da büyük (B) olarak sınıflandırılmıştır (14) (Tablo 4).

Tablo 4. Serideki olguların boyutları ve dağılımları.

	N	K	O	B
TA	32	11(%34.4)	14(%43.9)	17(%21.85)
TVA	12	5(%41.7)	3(%25)	4(%33.3)
VA	10	1(%10)	4(%40)	5(%50)
Toplam	54	17	21	16

Tüm adenomların 17' si (%31.5) küçük, 21' i (%38.9) orta, 16' sı (%29.6) büyük boyuttadır. Epiteliyal atipinin derecesi ile adenom boyutu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (p=0.002, Kruskall Wallis 1-Way Anova Testi).

Adenom boyutu ile adenom paterni arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (p=0.15, Kruskall Wallis 1-Way Anova Testi).

Olguların klinik, histopatolojik, dokukimyasal ve immün dokukimyasal özellikleri Tablo 9' da gösterilmiştir. Olgulardan 4' ünde (%7.4) aynı lokalizasyonda iki ayrı adenom bulunmaktadır.

Dokukimyasal bulgular:

HID-AB boyasında HID ile boyanan sülfomüsün dominant goblet hücreleri özellikle hafif derecede atipi gösteren adenomlarda diffüz olarak kahverengi-siyah olarak boyanmıştır (Resim 5). Orta derecede atipi gösteren adenomlarda HID ve AB ile boyanan goblet hücreleri yani sülfomüsün ve sialomüsün içeriği hemen hemen eşit yoğunlukta ve yaygınlıkta boyanmıştır. Şiddetli derecede atipi gösteren adenomlarda ise diffüz olarak AB ile mavi

boyanmış sialomüsin içeren goblet hücrelerinin baskınlığı dikkati çekmektedir (Resim 6). PAS-AB boyası özellikle nötral müsinleri boyamak için uygulanmıştır. Adenomların bazılarında kriptelerde dağılmış PAS pozitif boyalı nötral müsin içeren goblet hücreleri izlenmiştir (Resim 7).

Atipi derecesi ile AB boyanma skorları arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Ki-kare testi, $p=0.001$). Atipi derecesi ile AB boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.01$) ve doğru orantılı ($r=0.41$) bir korelasyon saptanmıştır (Kendall's Tau B korelasyon Testi). Adenomlardaki atipinin derecesi arttıkça, AB ile boyanan hücre sayısı yani sialomüsin içeren hücre sayısı artmıştır. Sülfomüsinler sialomüsin yönüne kaymıştır (Tablo 5).

Atipi derecesi ile HİD boyanma skorları arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Ki-kare testi, $p=0.01$). Atipi derecesi ile HİD boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.04$) ve ters orantılı ($r=-0.36$) bir korelasyon saptanmıştır (Kendall's Tau B korelasyon testi). Yani atipinin derecesi arttıkça, HİD ile boyanan sülfomüsinler azalmaktadır.

HİD boyanma skorları ile AB boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<<0.005$) ve ters orantılı ($r=-0.85$) bir korelasyon saptanmıştır (Kendall's Tau B korelasyon testi) (Tablo 6).

Atipi derecesi ile PAS boyanma skorları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Ki-kare testi, $p=0.69$).

Tablo 5. Olguların epitelial atipileri ile HİD boyanma skorları.

HİD	TA(N:32)			TVA(N:12)			VA (N:10)		
	H	O	Ş	H	O	Ş	H	O	Ş
0	0	0	1	0	2	1	0	0	0
1	4	6	3	0	2	2	0	2	3
2	14	3	1	2	1	1	2	1	2
3	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toplam	18	9	5	2	6	4	2	3	5

Ki kare $p=0.01$

Kendall's Tau B testi $p=0.04$, $r = -0.36$

Tablo 6. Olguların epitelial atipileri ile AB boyanma skorları.

AB	TA(N: 32)			TVA(N: 12)			VA(N: 10)		
	H	O	Ş	H	O	Ş	H	O	Ş
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	2	0	0	0	0
2	12	2	1	2	1	0	2	1	1
3	6	7	3	0	3	4	0	2	4
4	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Toplam	18	9	5	2	6	4	2	3	5

Ki Kare testi $p=0.001$

Kendall's Tau B korelasyon testi $p = 0.01, r = 0.41$

İmmün dokukimyasal bulgular:

HGM ile hafif derecede atipili adenomlarda ya hiç boyanma olmamış ya da çok hafif oranda birkaç reaktif hücre boyanmıştır (%10' un altında) (Resim 10). Orta derecede ve şiddetli derecede epitelial atipi gösteren adenomlarda ise, şiddetli atipili adenomlarda daha yoğun ve yaygın olmak üzere boyanma izlenmiştir (Resim 8, 9).

Atipinin derecesi ile HGM boyanma skorları arasında oldukça anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Ki-kare testi, $p < 0.05$). Atipinin derecesi ile HGM boyanması arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) ve doğru orantılı ($r=0.64$) bir korelasyon saptanmıştır (Kendall's Tau-B korelasyon testi) (Tablo 7).

Adenom paterni ile HGM boyanma yoğunluğu arasında da anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0.02$, Ki kare). Villöz ve tübülovillöz adenomlarda HGM boyanması daha yoğun ve yaygın olmaktadır.

MUC2 özellikle hafif derecede atipi gösteren adenomlarda kuvvetli ve yaygın olarak boyanmıştır (Resim 11). Atipinin derecesi arttıkça MUC2 boyanması belirgin olarak azalmaktadır. Şiddetli derecede atipi gösteren adenomlarda çok az, fokal boyanma saptanmıştır (Resim 12).

Değişik atipi derecelerinde MUC2 boyanma paterni anlamlı farklılık göstermiştir ($p=0.002$, Ki kare testi). Atipinin derecesi ile MUC2 boyanması arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) ve ters orantılı ($r=-0.55$) bir korelasyon saptanmıştır (Kendall's Tau-B korelasyon testi) (Tablo 8).

Adenom paterni ile MUC2 boyanması arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p=0.65$, Ki kare testi).

HGM boyanma skorları ve MUC2 boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) ve ters orantılı ($r = -0.40$) bir korelasyon saptanmıştır (Kendall's Tau-B korelasyon testi). Yani HGM boyanması arttıkça, MUC2 boyanması azalmaktadır.

Tablo 7. Olguların epitelial atipileri ile HGM boyanma skorları.

HGM	TA (N:32)			TVA (N:12)			VA (N:10)		
	H	O	Ş	H	O	Ş	H	O	Ş
0	2	1	0	0	0	0	1	0	0
1	15	0	1	2	0	0	1	0	0
2	1	6	3	0	3	1	0	1	1
3	0	2	1	0	3	1	0	1	4
4	0	0	0	0	0	2	0	1	0
Toplam	18	9	5	2	6	4	2	3	5

Ki kare testi $p < 0.05$

Kendall's Tau B testi $p < 0.05$, $r = 0.64$

Tablo 8. Olguların epitelial atipileri ile MUC2 boyanma skorları

MUC2	TA (N:32)			TVA (N:12)			VA (N:10)		
	H	O	Ş	H	O	Ş	H	O	Ş
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	4	0	2	1	0	2	1
2	3	5	0	0	1	2	0	0	4
3	7	3	1	1	2	1	1	1	0
4	8	1	0	1	1	0	1	0	0
Toplam	18	9	5	2	6	4	2	3	5

Ki kare testi $p = 0.002$

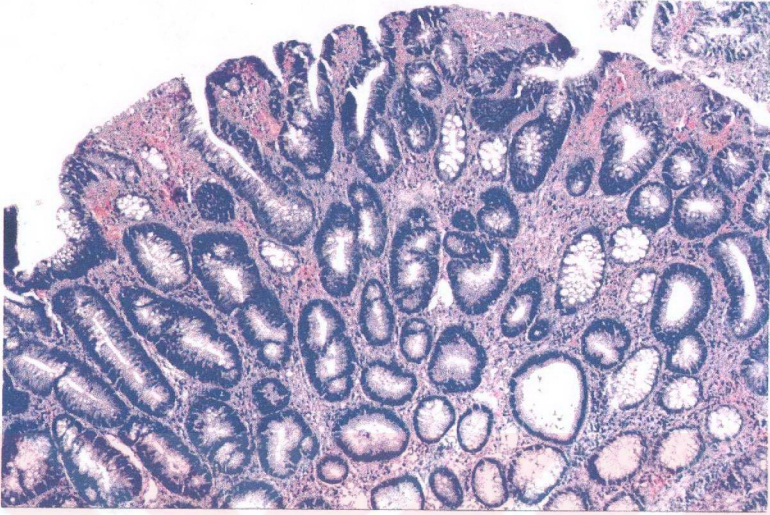
Kendall's Tau B testi $p < 0.05$, $r = -0.55$

Tablo 9. Tübüler, tübülovillöz ve villöz adenomların klinik, histopatolojik, dokukimyasal ve immün dokukimyasal özellikleri.

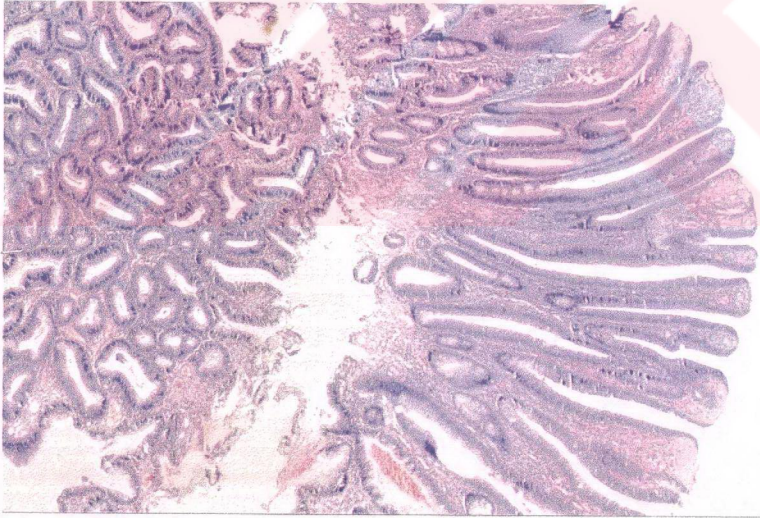
NO	PAT.	YAŞ	CİNS	LOK.	BOY.	TANI *	ATİPİ +	PAS•	HİD•	AB•	HGM #	MUC2 #
1	13503-96	50	K	Trans.	7mm	1	1	1	2	2	1	4
2	13679-96	68	E	Sigm.	6mm	1	2	1	1	3	2	2
3	14298-96	61	E	Sigm.	7mm	1	1	0	1	3	2	4
4	15715-96	60	E	Sigm.	12mm	1	3	0	1	3	1	3
5	15739-96	60	K	Rekt.	5mm	1	1	0	2	2	1	4
6	16169-96	59	E	Sigm.	10mm	1	1	1	2	2	1	4
7	289-97	70	K	Rekt.	13mm	2	2	1	2	2	3	4
8	1270-97	57	E	Rekt.	40mm	1	1	1	2	3	1	3
9**	1505-97	69	E	Rekt.	6mm	1	3	1	2	2	3	1
10	1605-97	40	K	Trans.	10mm	1	2	1	1	3	2	4
11	3831-97	51	E	Sigm.	4mm	1	1	2	1	3	0	3
12	4211-97	67	E	Sigm.	4mm	1	1	1	2	3	1	3
13	4447-97	50	E	Rekt.	7mm	1	1	0	2	2	1	3
14	4778-97	72	E	Rekt.	4mm	1	2	1	2	3	3	2
15	4882-97	55	K	Sigm.	5mm	1	1	1	2	2	1	2
16	5219-97	60	E	Çıkan.	4mm	1	2	0	2	2	2	2
17	5942-97	61	E	İnen.	35mm	1	2	1	1	3	2	3
18	7722-97	74	E	Sigm.	4mm	1	2	0	1	3	2	2
19	8007-97	70	E	Sigm.	6mm	1	1	0	2	2	0	2
20	8326-97	64	E	Rekt.	5mm	2	3	1	2	3	2	2
21	8646-97	64	E	Sigm.	4mm	1	1	1	2	2	1	2
22	8979-97	70	E	İnen.	5mm	1	1	1	1	3	1	3
23	9287-97	50	K	Rekt.	6mm	1	1	2	1	3	1	3
24	9400-97	66	E	Çıkan.	2mm	1	1	1	2	2	1	4
25	9473-96	70	K	Sigm.	10mm	2	3	0	1	3	4	2
26**	12217-96	50	E	Sigm.	20mm	1	2	0	1	3	3	2
27**	12217-96	50	E	Sigm.	20mm	2	1	1	2	2	1	3

28	13812-96	73	E	Sigt.	4mm	2	2	2	3	1	2	1
29	13919-96	67	E	Sigt.	5mm	2	1	1	2	2	1	4
30	4114-97	75	E	Çeku.	30mm	2	3	0	0	3	4	3
31	8678-97	83	K	Rekt.	7mm	2	2	1	1	3	2	3
32	9434-97	44	K	Sigt.	2mm	2	2	0	0	3	3	2
33	10131-97	70	E	Rekt.	5mm	2	2	0	1	3	3	3
34	10489-97	54	E	Rekt.	10mm	2	2	0	3	1	2	1
35	11273-97	50	E	Sigt.	30mm	2	3	0	1	3	3	1
36	14969-96	59	E	Rekt.	10mm	3	3	0	1	3	2	2
37**	1982-97	51	E	Rekt.	25mm	3	3	1	1	3	3	2
38**	1982-97	51	E	Rekt.	25mm	3	1	1	2	2	1	3
39	2620-97	77	E	Sigt.	6mm	3	2	0	1	3	3	3
40	3411-97	72	E	Rekt.	6mm	3	2	1	1	3	2	1
41	5924-97	61	K	Rekt.	7mm	3	2	2	2	2	4	1
42	8615-97	72	E	İnen.	5mm	3	1	1	2	2	0	4
43	8828-97	62	E	Rekt.	25mm	3	3	1	2	3	3	2
44	145-97	68	E	Sigt.	10mm	1	3	2	1	3	2	1
45**	1505-97	69	E	Rekt.	8mm	1	1	0	2	2	1	3
46	1826-97	64	E	Sigt.	15mm	3	3	1	1	3	3	2
47	4337-97	41	E	Rekt.	7mm	1	3	0	0	4	2	1
48	12644-97	67	E	Rekt.	30mm	3	3	0	2	2	3	1
49**	5553-97	67	E	Sigt.	30mm	1	2	1	2	2	2	3
50**	5553-97	67	E	Sigt.	30mm	1	3	1	1	3	2	1
51	5594-97	70	E	Sigt.	10mm	1	2	0	1	3	0	3
52	6551-97	56	E	Trans.	3mm	1	1	0	2	2	1	4
53	8210-97	50	K	Sigt.	10mm	1	1	0	2	2	1	4
54	8367-97	60	K	Sigt.	20mm	1	1	1	2	2	1	4

(*: 1:tübüler adenom, 2:tübülovillöz adenom, 3: villöz adenom. +:1:Hafif atipi, 2:orta derecede atipi, 3: şiddetli atipi. •:0:Boyanma yok, 1:Bazı reaktif hücre(%10 un altı), 2:orta sayıda reaktif hücre, 3: çok sayıda reaktif hücre, 4: Tüme yakın reaktif hücre. #: 0: Boyanma yok, 1:%10' un altında, 2: %10-50 arası boyanma, 3: %50-75 arası boyanma, 4: %75' in üzerinde boyanma, **: Aynı orguda iki adet adenom varlığı)



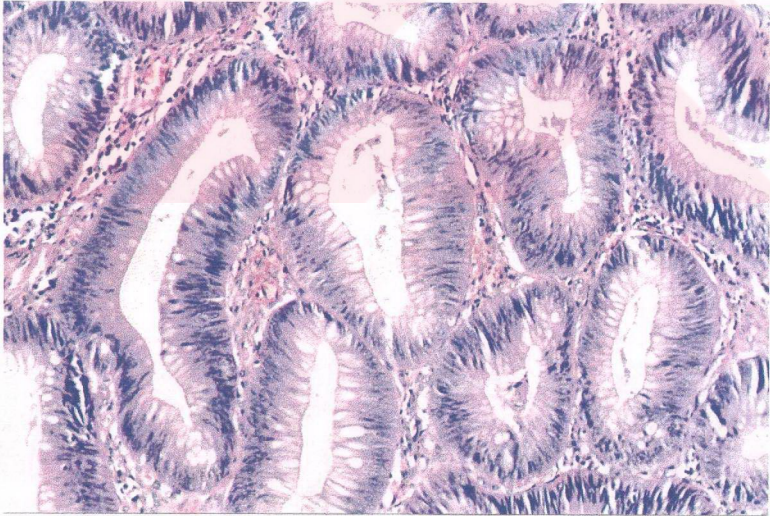
Resim 1. Hafif derecede atipi gösteren (skor 1) tübüler adenom (13503/96, X40, H+E).



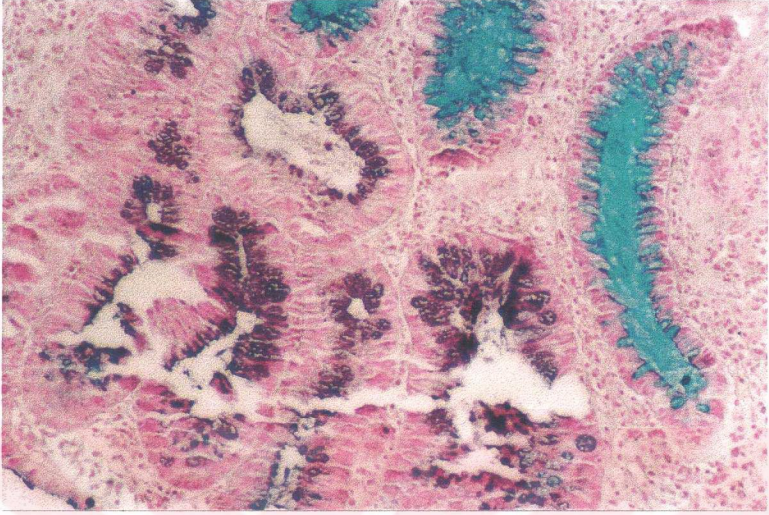
Resim 2. Şiddetli derecede atipi gösteren (skor 3) tübülovillöz adenom (9473/96, X20, H+E).



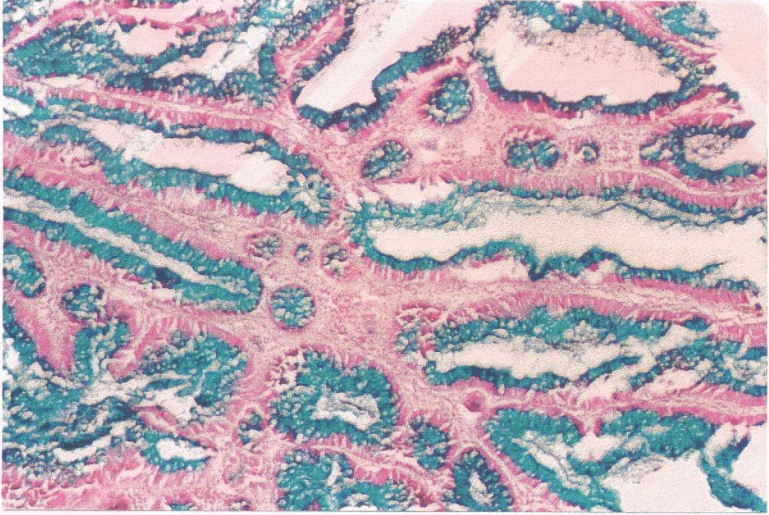
Resim 3. Orta derecede atipi gösteren (skor 2) villöz adenom (5924/97, X20, H+E).



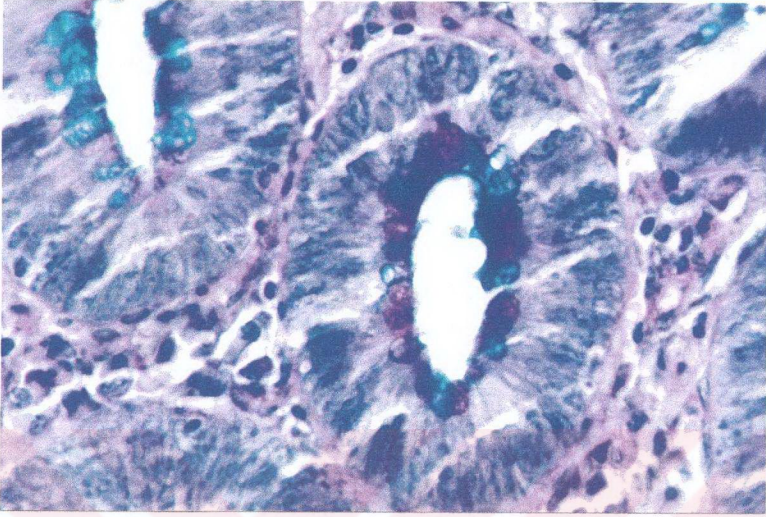
Resim 4. Şiddetli derecede atipi (skor 3), tübülovillöz adenom (9473/96, X100, H+E).



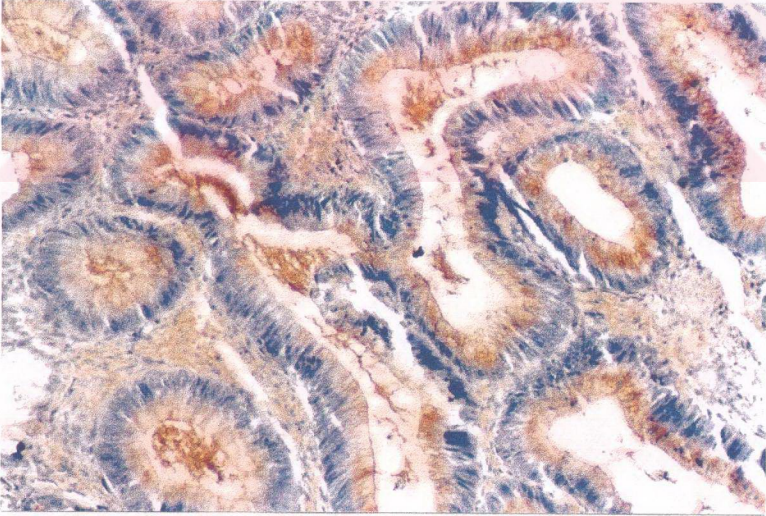
Resim 5. Hafif derecede atipi gösteren (skor 1) tübülovillöz adenomda HİD ile boyanan sülfomüsin baskınlığı (13919/96, X100, HİD+AB).



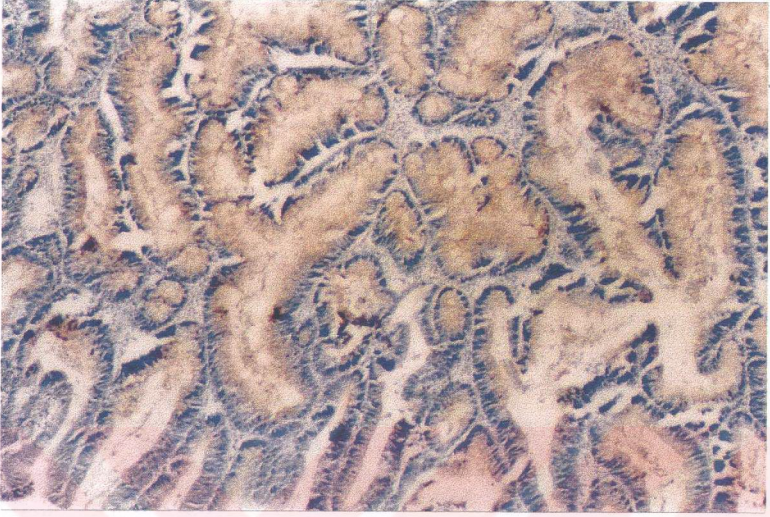
Resim 6. Şiddetli derecede atipi gösteren (skor 3) tübülovillöz adenomda AB ile boyanan sialomsin baskınlığı (4114/97, X40, HİD+AB).



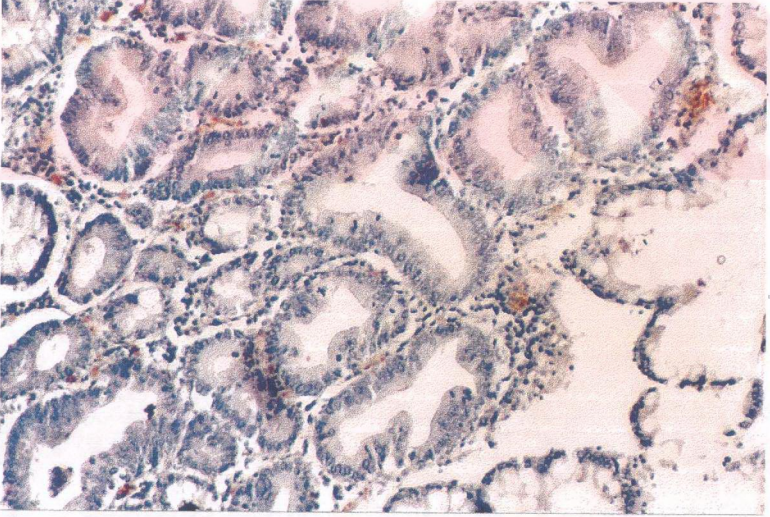
Resim 7. Hafif derecede atipi gösteren (skor 1) tübüler adenomda, PAS ile boyanan nötral mürsinler (13503/96, X400, PAS+AB).



Resim 8. Şiddetli derecede atipi gösteren (skor 3) tübülovillöz adenomda, diffüz (skor 4) HGM pozitifliği (9473/96, X100, HGM).



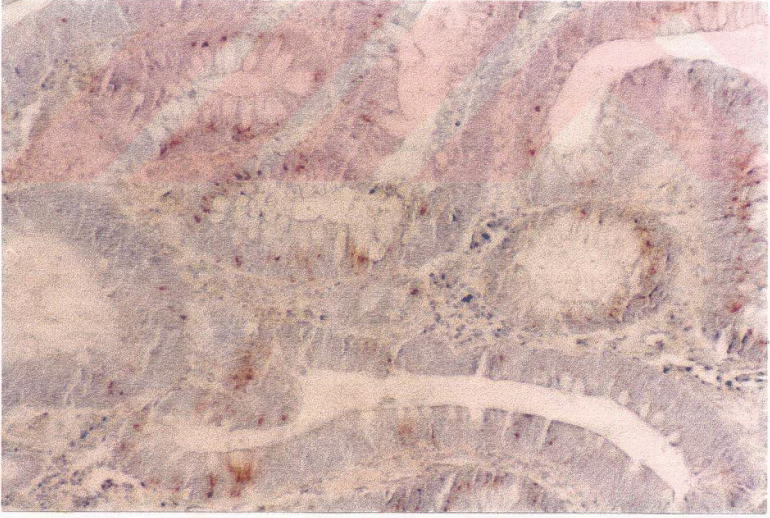
Resim 9. Şiddetli derecede atipi gösteren (skor 3) tübülovillöz adenomda, diffüz (skor 4) HGM pozitifliği (4114/97, X40, HGM).



Resim 10. Hafif derecede atipi gösteren (skor 1) tübüler adenomda HGM negatifliği (6551/97, X100, HGM).



Resim 11. Hafif derecede atipi gösteren (skor 1) tübüler adenomda, diffüz (skor 4) MUC2 pozitifliği (15739/96, X100, MUC2).



Resim 12. Şiddetli derecede atipi gösteren (skor 3) tübülovillöz adenomda fokal (skor 2) MUC2 pozitifliği (9473/96, X100, MUC2).

TARTIŞMA

Kolorektal karsinom patogenezinde geniş ölçüde inanılan ve kabul edilen görüş karsinomların sıklıkla önceden var olan adenomlardan geliştiğidir. Adenomların prevalansı çok açık bilinmemekle birlikte, özellikle 40 yaşın üzerinde %30' dan fazladır. Benign adenomların malign tümörlere dönüşmesinde rol oynayan birçok faktör vardır. Bu faktörler aynı zamanda şiddetli derecede epiteliyal atipi ile de ilişkilidir. Şiddetli derecede atipi, invaziv karsinom içeren adenom ile benign adenomlar arasındaki patolojik bir köprüdür. Bu faktörlerden önemli olanları adenomun histopatolojik türü (tübüler, tübülovillöz, villöz), adenom boyutu, anatomik lokalizasyonudur. Şiddetli derecede atipi anormal histolojik değişikliklerin spektrumunun son noktasında bulunan ve invaziv karsinomla sonuçlanan bir olaydır. Şiddetli atipinin doğal seyri kolonda prospektif olarak izlemek mümkün olmamaktadır. Bu lezyonlar ya gerilemekte ya da invaziv karsinoma ilerlemektedir (14).

Tedavi edilmeyen kolorektal adenomların doğal seyri çok az olguda izlenebilmiştir. Muto ve ark. nın çalışmasında, bu durumda olan dört olgu bildirilmektedir. Bu dört olgudan birincisinde adenom tanısından 5 yıl 3 ay sonra adenom ile aynı lokalizasyonda iyi diferansiye adenokarsinom tespit edilmiştir. İkinci olguda biopsi tanısından 6 yıl, üçüncü olguda tanıdan 13 yıl, dördüncü olguda ise tanıdan 11 yıl sonra adenokarsinom gelişimi olmuştur. Adenom-karsinom silsilesinin süresi bu olgularda birbirinden çok farklıdır. Çünkü benign adenomların tanıdan önceki bulunma süreleri ve karsinomun ne zaman başladığı kesin olarak bilinmemektedir. Sonuçta adenom-karsinom silsilesinin doğal seyrinin zamanı 5 yıldan az, 10 yıldan fazla olabilmektedir. Bu period 5-30 yıl arasında değişmektedir.

Adenom-karsinom silsilesinde önemli olan adenomlarda değişen bazı yapısal özelliklerin ortaya çıkarılmasıdır. Çünkü bu değişiklikler ile benignite özellikleri yavaşça malignite yönüne doğru kaymaktadır. M. Kalus adlı araştırmacının çalışmasında 280 adenomatöz polipin %16' sında karsinoma in situ izlenmiştir. Bu oran Wychulis ve ark. nın %7' lik, Helvig ve ark. nın %7.2' lik adenomda karsinom bulunma oranlarından daha fazladır. Kalus organ doku kültürlerinde de adenomatöz poliplerin histolojik ve biolojik olarak malignleşme potansiyeli olduğunu göstermiştir (73).

Adenom-karsinom silsilesinde ve kolorektal karsinogeneziste tanımlanmış tümör süpresör genler p53 ve DCC genleridir. Hasegawa ve ark. ı p53 gen mutasyonlarını erken kolorektal adenomlarda ve ilerlemiş kolorektal karsinomlarda PCR-SSCP analizi ile araştırmışlar ve adenomatöz lezyonlardan kaynaklanan karsinomlarda %36.7 oranında p53 gen mutasyonları bulmuşlardır (8). Bundan başka ras ve c-myc onkogen ekspresyonu, "Transforming Growth Factor-β type (TGF-β) reseptör gen mutasyonları da adenomlarda gösterilmiştir (10-12).

Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresyon genlerinin inaktivasyonu sıklıkla izlenmektedir (9).

Kolorektal adenomlar herhangi bir yaş grubunda görülebilir. Ancak insidansları yaşamın 1., 2. ve 3. dekatlarında herediter adenomatöz polipozis sendromları ya da juvenil polipler dışında oldukça düşüktür. 6. ve 7. dekatlarda pik yapmaktadır. Ortalama 40-80 yaşları arasındadır. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlardan biraz daha fazladır (1-4, 14). Adenom prevalansı da yaşla birlikte artış göstermektedir (19). Multipl adenomlar iki kat daha fazla oranda erkeklerde görülmektedir (2, 3, 20- 22, 74).

Çalışmamızda yer alan 54 olgudan %77.8' i erkek, %22.2' si kadındır. Erkek-kadın oranı 3.5' tur. Erkeklerde 3.5 kat daha fazla oranda görülmüştür. Ayrıca adenom görülme yaşı serimizde 40-83 arasında değişmekte ve ortalama yaş 58.7 yani 6. dekat içinde yer almaktadır. 40 yaşından daha genç olgular bulunmamaktadır.

Kolorektal adenomların lokalizasyonları otopsi çalışmaları ve endoskopik yöntemlerle belirlenmektedir. Genel olarak rektosigmoid bölgede ya da sol kolonda, sağ kolona oranla daha sıklıkla görülmektedir (1-4, 14, 19). Çalışmamızdaki adenomların toplam %88.8' i (%46.3 sigmoid, %37 rektum ve % 5.5 inen kolon) sol kolonda yerleşmiştir.

Histopatolojik TA, TVA ve VA olarak üç türü bulunan adenomlardan TA lar tüm serilerde daha sıklıkla bulunmaktadır (3, 5, 14, 20). İkinci sıklıkta TVA lar ve üçüncü sıklıkta VA lar yer almaktadır. Çalışmamızda olguların %59.2' si TA' dur. İkinci sıklıkta TVA ve üçüncü sıklıkta da VA' lar yer almıştır.

Adenomlar her boyutta olabilmelerine karşın genellikle 1 cm in altındadır. Villöz komponent içeriği arttıkça, boyutta da bir artış olmaktadır. O'Brien ve ark. nin yaptığı ulusal polip çalışmasında, olguların %37.6' sı küçük boyutta (0-5 mm), %36.5' i orta boyutta (6-10 mm) ve %25.5' i büyük boyuttadır (10 mm üzeri) (14). Dizimizdeki tüm adenomların %38.9' u orta boyuttadır (Tablo 4). Ayrıca adenomun boyutu ile adenomun paterni (TA, TVA, VA) arasında dizimizdeki olgularda anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Kruskal Wallis 1-Way Anova testi, p=0.15).

Boyut ile birlikte malignite potansiyelinin artması iyi tanımlanan bir bulgudur. Muto ve ark. nin çalışmasında St. Mark's hastanesinde saptanan adenomların boyutları arttıkça, karsinom bulunma oranı ya da şiddetli derecede epiteliyal atipi bulunma oranı da artmaktadır. 1 cm. nin altındaki boyuttaki adenomlarda karsinom bulunma olasılığı %1' dir. 1-2 cm. arasındaki olgularda %10, 2 cm. den fazla olan olgularda ise %50 oranında karsinom riski bulunmaktadır. Aynı çalışmada 1 cm. nin altındaki küçük poliplerin sıklıkla hafif derecede atipi gösterdiği ve malignite potansiyelinin belirgin olmadığı söylenmektedir. Şiddetli

derecede atipi küçük adenomlar çok seyrek, fakat malignite riski %27' dir. 1-2 cm arası olan adenomlarda hafif derecede atipi varsa, malignite potansiyeli anlamlı değildir, fakat bu çaptaki tümörler orta ya da şiddetli derecede atipi gösteriyorsa karsinom riski artmaktadır. Adenom boyutu arttıkça, atipi derecesi de artmakta ve aynı zamanda malignite potansiyeli de artmaktadır (5, 13, 14, 19). Genellikle TA lar hafif derecede atipi göstermektedir ve bunların malignite potansiyeli düşüktür. Orta derecede atipide de düşük malignite potansiyeli bulunmaktadır. Adenomlardaki villöz komponent arttıkça atipi derecesi de artmaktadır (5, 14, 19, 38).

Çalışmamızdaki adenomlarda epiteliyal atipinin derecesi ile adenom boyutu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Kruskal Wallis 1-Way Anova testi, $p=0.002$). Adenom boyutu arttıkça epiteliyal atipinin derecesi de artmaktadır. Bununla birlikte epiteliyal atipinin derecesi ile adenom tipi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Ki kare testi, $p=0.09$). Ayrıca adenom boyutu ile adenom tipi (TA, TVA, VA) arasında da anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Kruskal Wallis 1-Way Anova testi, $p=0.15$). Dizimizdeki TA lar genellikle küçük boyutta adenomlar olmalarına karşın, orta ve büyük boyutta (1 cm' in üzerinde) olanlar ve villöz adenomlar genellikle büyük çaplı olmalarına karşın, küçük çaplı (0-5 mm arası) olanlar da bulunmaktadır.

Adenomların malignite potansiyellerini belirlemede boyut, atipinin derecesi ve büyümenin baskın paterni (tübüler ya da villöz) sıklıkla kullanılan kriterlerdir. Adenom-karsinom silsilesi ile ilişkili olarak, adenomlarda birçok selüler değişiklik bulunmaktadır. Bunlar müsin glikoproteinlerinin sekresyonu, transportu ve sentezi gibi hücrel fonksiyonlardaki değişiklikleri içermektedir. Bu değişiklikler dokukimyasal boyama teknikleri ile tanısıl olabilmektedir. Gastrointestinal traktüsteki müsin sekresyonlarının dağılımındaki değişiklikler malignite ile ilişkilidir. Kolondaki değişiklikler normalde dominant olan sülfomüsinin, sialomüsin yönüne doğru kaymasıdır. Adenomatöz poliplerdeki malignite potansiyelinin en iyi göstergesi epiteliyal atipi olmakla birlikte, atipinin değerlendirilmesi oldukça subjektiftir. Müsin değişiklikleri ise daha selektif bir belirleyicidir. Adenomlardaki epiteliyal atipinin derecesi arttıkça, HİD pozitif boyanan sülfomüsin içeren goblet hücreleri azalmakta (54), AB ile pozitif boyanan sialomüsin içeren goblet hücreleri artmaktadır (35). Aynı özellikler kolorektal karsinom komşuluğundaki "transizyonel" geçiş mukozasında Filipe ve ark. 1 tarafından gösterilmiştir. Histolojik olarak normal görünen karsinom komşuluğundaki mukozada anormal dokukimyasal boyanma özellikleri bulunmaktadır. Bu değişiklikler normalde kolon mukozasında dominant olan sülfomüsinlerin azalması ya da tamamen yok olması ve sialomüsinlerin artmasıdır (50, 52).

Filipe ve ark. 1 ile Griffioen ve ark. nın yaptıkları çalışmalarda, dokukimyasal boyama tekniği olarak HID-AB ile PAS-AB uygulamışlardır. Sülfomüsinler için HID, sialomüsinler için AB ve nötral müsinler için ise PAS uygulanmıştır (35, 42, 50, 52).

Kolorektal mukozadaki goblet hücrelerinde iki temel müsin bulunmaktadır: Sülfomüsin ve sialomüsin. Sülfomüsinler AB ile pH 2.5' te bazofiliktir ve HID-AB uygulandığında kahverengi-siyah boyanmaktadır. Non sülfatlı asit komponentler yani sialomüsinler pH 2.5' ta AB' ya afinite gösterirler ve mavi boyanırlar. Normal kolorektal mukozada goblet hücrelerinin mukus içeriğinin karbonhidrat komponentinin ana yapısını sülfomüsinler oluşturmaktadır (50).

Listinsky ve ark. nın çalışmasında kolon mukozasındaki sülfomüsin ve sialomüsin sekresyonu değişikliklerinin başlangıçta spesifik preneoplastik değişiklikler olarak düşünüldüğünü, ancak bu değişikliklerin primer kolon neoplazmlarından başka, benign mezenşimal tümörler, kolon dışı bölgelerden olan metastatik lezyonlar ve endometriozis gibi sekonder olaylarda da izlendiğini bildirmişlerdir. Bu yüzden kolorektal mukozadaki müsin değişikliklerinin primer preneoplastik bir değişiklikten çok, sekonder reaktif bir fenomen olduğunu ileri sürmüşlerdir (49). Benzer bir çalışma da Allen ve ark. 1 tarafından yapılmış ve aynı sonuçlar alınmıştır (55).

Voro ve ark. 1 adenomatöz poliplerdeki sülfomüsin ve sialomüsin oranını %50-%50 olarak bulmuşlardır. Transizyonel mukoza ve kolorektal karsinom alanlarında ise sialomüsin dominantlığını göstermişlerdir. Kolondaki bu sialomüsin değişikliklerinin kolon karsinomu ve adenomlarındaki malignite potansiyelini gösterdiğini belirtmektedirler (51).

Çalışmamızda adenomlardaki müsin değişikliklerini incelemek için HID-AB ile PAS-AB yöntemleri kullanılmıştır. HID sülfomüsinler için, AB sialomüsinler için, PAS ise nötral müsinler için spesifiktir. Değişik atipi derecelerinde HID boyanma paterni anlamlı farklılık göstermiştir (Ki kare testi, $p=0.01$). Atipi derecesi ile HID boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.04$) ve ters orantılı ($r = -0.36$) bir korelasyon saptanmıştır (Kendall's Tau B korelasyon testi). Adenomlarda özellikle hafif derecede atipi olanlarda kuvvetli HID ile boyanan sülfomüsin içeren çok sayıda goblet hücresi bulunurken, şiddetli derecede atipili olgularda ise, HID boyanma skorları oldukça düşük ya da boyanma yoktur. Goblet hücrelerinin sülfomüsin içerikleri belirgin derecede azalmaktadır. AB ile aynı adenomlar boyandığında değişik atipi derecelerinde AB boyanma paterni anlamlı farklılık göstermiştir (Ki kare testi, $p=0.001$). Epitelial atipinin derecesi ile AB boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.01$) ve doğru orantılı ($r = 0.41$) korelasyon saptanmıştır (Kendall's Tau B korelasyon testi). Hafif derecede atipi gösteren adenomlar,

normal kolon mukozasından çok az selüler sapmalar gösterdiği için, aynı normal kolon mukozasına özgü değişiklikler göstermekte, ya da hafif derecede sialomüsin yönüne kayma eğiliminde olmaktadır. Atipinin derecesi arttıkça AB boyanma skorları da artmaktadır. HİD boyanma skorları ile AB boyanma skorları arasında da istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.005$) ve ters orantılı ($r = -0.85$) korelasyon saptanmıştır. Yani sülfomüsin içeriği, atipi derecesi arttıkça sialomüsin yönüne kaymaktadır. Atipinin derecesi ile PAS boyanma skorları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Ki kare testi, $p=0.69$). Nötral müsinler açısından çalışmamızdaki olgularda belirgin ve anlamlı bir mukozal değişiklik olmamıştır.

Müsin değişikliklerinin adenomlarda ve karsinomlarda gösterilmesinin diğer yolu olan müesine yönelik antikolarla yapılan immün dokukiyasal yöntemler, dokukimyasal yöntemlerden daha spesifik olmaktadır. HGM (Human Gastric Mucin) bunlardan birisidir. HGM gastrointestinal traktüsü asitler, proteazlar, patojenik mikroorganizmalar ve mekanik travmalardan korumada major rol oynayan bir glikoproteindir. HGM proteini 507 bazlık tekrarlayan ardışık ünitlerden oluşmaktadır. Protein, threonin, serin ve prolin aminoasitleri ile histidin aminoasitlerini içermektedir. RNA analiz yöntemleri ile müsin özelliği olan polidispers patern daha iyi seçilebilmektedir. HGM ekspresyonu mide ve safra kesesinde oldukça kuvvetli iken, terminal ileum ve sağ kolonda ise zayıftır. Flöresan in situ hibridizasyon yöntemleri ile bu genin kromozom 11q15.4-11q15.5 lokalizasyonunda bulunduğu gösterilmiştir (59).

İnsan transizyonel mukozasında ve DMH (1, 2-dimethylhydrazine) karsinojeni uygulanan rat kolon mukozasındaki müsin değişiklikleri dokukimyasal yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. Bu değişiklikler transizyonel mukoza ve adenomlarda elektron mikroskopisi yoluyla da gösterilmiştir (39, 40). Diğer yandan A ya da B kan grup antijenlerinin varlığı ve PNA (peanut aglütinin) varlığı gibi immün dokukimyasal yöntemlerin kullanılması diğer mukus değişikliklerini göstermektedir. Bu değişikliklerin bazıları da onkofetaldir. HGM gastrik fukomüsindir. Pür endoservikal tür ovarian müsinöz kist sıvısından izole edilmiştir. HGM' nin fetal kolon mukozasında bulunup, normal erişkin kolon mukozasında bulunmaması, antijenin onkofetal özelliğini göstermektedir. Kolon adenokarsinomlarının %29' unda ve karsinoma komşu alanların %57' sinde bulunmuştur (57, 58).

Bara ve ark. ı HGM' nin varlığını ilk DMH injeksiyonundan iki hafta sonra ratların distal kolon mukozasında göstermişlerdir. HGM antijeni prekanseröz kolonik mukozanın erken bir belirleyicisidir. Ancak epiteldeki displazi belirgin, gözle görünür hale geçtikten sonra HGM ekspresyonu ortaya çıkmaktadır. Bara ve ark. nin çalışmasında, olası prekanseröz lezyon olan adenomlarda %66 oranında ekprese edilmektedir. HGM antijeni TA dan çok villöz diferansiasyon gösteren adenomların %87' sinde daha sıklıkla bulunmaktadır. Bir alanında

karsinom bulunan adenomların %94' ünde HGM pozitifdir. Bütün bu bulgular HGM' nin erken prekanseröz bir belirleyici olduğunu göstermektedir (57).

Van Den Ingh ve ark. nın çalışmasında, kolorektal adenomlardaki müsin monoklonal antikoları ile anöploidi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0.001$). Anöploidi birçok kanserle güçlü ilişkili olan, kolorektal adenomların %70' inde bulunan bir özelliktir. Sitoplazmik HGM boyalı adenomlarda ploidi anormallikleri anlamlı olarak sık görülmektedir. Bu tümör hücrelerindeki fenotipik özelliklere sekonder olan sitoplazmik değişikliklerdir (58). Kitamura ve ark. ı metatreksat uygulanmış HT29 kolon kanser hücre topluluğunda normalde dominant olan kolonik tip müsinlerin, özellikle yüzey epiteliyal tip gastrik müsin yönüne kaydığını göstermişlerdir (60).

Çalışmamızdaki adenomlarda değişik atipi derecelerindeki HGM boyanma paterni anlamlı farklılık göstermiştir (Ki kare testi, $p<<0.05$). Atipi derecesi ile HGM boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<<0.05$) ve doğru orantılı ($r = 0.64$) bir korelasyon saptanmıştır. Hafif derecede atipili olgulardaki HGM boyanma skoru, bu tür olgular normal kolorektal mukozaya büyük oranda benzediklerinden dolayı düşük olmaktadır. Atipinin derecesi arttıkça HGM boyanma yüzdesi de artmaktadır.

Müsinler insan vücudunda lümenlerin ve duktusların korunması ve kayganlaşmasını sağlayan sekretuar epiteliyal hücrelerin ürettiği önemli moleküllerdir. Müsinlerin sekretuar epiteliyal hücrelerin malign ve benign hastalıklarının patogeneziinde önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Değişik hastalıkların patogenezi sırasında meydana gelen müsinlerdeki moleküler değişiklikler tam olarak anlaşılammıştır. Prüfiye edilen müsinler aminoasit ve karbonhidratlardan oluşmaktadır. Aminoasitler yüksek oranda serin, threonin, prolin, alanin, glisinden oluşmaktadır. Karbonhidrat kısmı ise total ağırlığın % 80' inden fazlasını oluşturan O-linked oligosakkaritten oluşmaktadır (43, 44, 46, 61, 69, 75).

Günümüzde insan intestinal, trakeabronşial, gastrik mukozal dokulardan ve submandibüler bezlerden hazırlanan müsinlerini kodlayan DNA' lar ya da cDNA lar klonlanmıştır. Sekiz ayrı müsin geni bulunmuştur. MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6 ve MUC7. MUC1 müsin benzeri bir glikoproteindir ve kromozom 1q21-24' te lokalizedir. MUC2 ise 11p15 kromozomunda lokalizedir (43). Özellikleri anlaşılan ilk müsin geni MUC1' dir. Yüksek molekül ağırlıklı bir glikoprotein olan MUC1 ilk defa insan sütünde bulunmuştur. Meme ve diğer adenokarsinomlarda da yüksek derecede eksprese edilmektedir (46).

MUC1 normal meme ve pankreasta eksprese edilen mior apomüsindir. MUC2 ise dominant olarak gastrointestinal traktüste eksprese edilmektedir (45, 48).

Epiteliyal hücrelerin neoplastik transformasyonu sıklıkla müsinlerin sentezi ve yapısındaki değişikliklerle ilişkilidir. Özellikle oligosakkarit zincirlerindeki değişiklikler önemlidir ve birçok çalışmada gösterilmiştir. Glikosilasyon sonucu kanser hücrelerindeki değişen apomüsün epitoplari birikmektedir. MUC2 dominant olarak intestinal ve servikal mukus üreten hücreler tarafından düz ER' nun olduğu yerlerde yani perinükleer boyanma paterni gösterecek şekilde eksprese edilmektedir. Carrato ve ark. nın normal ve neoplastik insan gastrointestinal dokularında yaptıkları çalışmada aynı apomüsünlerin farklı doku ekspresyon paterni gösterdikleri, çok sayıda apomüsünün tek bir dokuda ya da tek bir hücre seviyesinde bulduklarını ve patolojik kolon dokularında değişmiş apomüsün ekspresyonlarının bulunduğunu göstermişlerdir (48).

Gambus ve ark. ı MUC apomüsün ekspresyonu kaybının kolorektal adenomlarda ve sınırlı sayıda kolorektal kanserde olduğunu vurgulamışlardır. Buna karşılık MUC2 apomüsün ekspresyonu ekzokrin pankreastan köken alan tümörlerde, normal dokudan çok güçlü olduğunu göstermişlerdir. MUC2 yüksek düzeylerde gastrointestinal goblet hücrelerinde eksprese edilmektedir. Aynı zamanda epiteliyal kanserlerin büyük bölümünde de eksprese edilmektedir. Bu da çeşitli neoplazilerde apomüsün gen ekspresyonlarının değiştirdiğini göstermektedir (45, 76)

Ho ve ark. ı müsün genlerinde artmış, aberan ve azalmış ekspresyon gibi değişikliklerin olduğunu göstermişlerdir. Artmış MUC1 ekspresyonu over, prostat, pankreas, mide, akciğer ve memenin adenokarsinomlarında sıklıkla izlenmektedir. Prostat karsinomu dışında bu tümörlerde MUC2 ve MUC3' ün fokal aberan ekspresyonu vardır. MUC1, MUC2 ve MUC3 epitoplari kolon adenokarsinomunun tüm histolojik türlerinde artmıştır. Orta ve iyi diferansiye kolon karsinomunda MUC1, MUC2 ve MUC3 mRNA düzeyleri azalmıştır. Müsin genlerinin organ ve spesifik hücre tipinden bağımsız regülasyonu bulunmaktadır. Bu regülasyonun bozulması ile de neoplastik transformasyon olmaktadır (46).

Ogata ve ark. ının çalışmasında MUC1 mRNA' nın tüm kolon dokularında eksprese edildiği ve normal dokular ile karsinomlu dokularda birçok olguda aynı düzeyde olduğu söylenmektedir. MUC2 ve MUC3 mRNA ları ise hem normal, hem de kanserli dokularda eksprese edilmektedir, ancak düzeylerinin kanserli dokularda sıklıkla azaldığı vurgulanmıştır. Araştırmacılar MUC2 mRNA düzeylerinin kanser örneklerinde normal dokuya göre daha düşük olduğunu bulmuşlardır. MUC2 ekspresyonu gibi, MUC3 ekspresyonu da normal kolon mukozası ile karşılaştırıldığında, karsinomlarda belirgin azalmaktadır. Kolonik dokuların

müsin gen ekspresyonlarındaki en dramatik değişiklikler MUC2 ve MUC3' te olmaktadır. Her iki gen normal kolon dokusunda bol miktarda eksprese edilmelerine karşın, genellikle karsinomlu dokularda daha zayıf eksprese edilmektedir. Bu sonuçlar kolon karsinomlarındaki MUC genlerinin ekspresyonunun glikosilasyon gibi bazı olaylardan etkilendiğini ve ekspresyonlarında kaybolma, zayıflama ve artma gibi değişikliklerin oluştuğunu göstermektedir (61).

Çalışmamızdaki adenomların MUC2 boyanma skorları ile epiteliyal atipilerinin dereceleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ve ters orantılı bir ilişki bulunmuştur. Adenomdaki atipinin derecesi arttıkça MUC2 boyanma skorları azalmaktadır. Şiddetli epiteliyal atipi gösteren ve malignite potansiyeli daha fazla olan adenomlarda MUC2 boyanması azalmaktadır. Bu belki de MUC2 müsin gen ekspresyonundaki bir değişiklikten kaynaklanmaktadır.

Yang ve ark. 1 da benzer bir deneysel çalışmada, HTC116 kolon kanser hücrelerinde MUC2 ekspresyon kaybını göstermişlerdir (67).

Bu neoplastik değişikliklerin çoğu protein ve lipidlerin değişmiş glikosilasyonu ile sıklıkla ilişkilidir. Kolon kanser hücrelerinde normalde golgi aparatusta yerleşen moleküller kanser hücrelerinde anormal lokalizasyonda bulunmaktadır. Bu tekrar lokalizasyon düzenlenmesi proteinlerde anormal glikosilasyona ve sonuçta neoplastik transformasyona yol açmaktadır (77).

Buisine ve ark. 1 rektosigmoid villöz adenomlarda MUC5AC' nin aberan ekspresyonunu in situ hibridizasyonla göstermişlerdir. 22 adet rektosigmoid villöz adenomda MUC2' nin overekspresyonu ve MUC5AC' nin aberan ekspresyonu bulunmuştur. Bu MUC5AC ekspresyonu düşük dereceli atipili villöz adenomlarda, yüksek derecede atipili olgulardan daha yoğun bulunmuştur (43).

Kolonik adenomlarda oluşan değişmiş müsin glikosilasyonu malign transformasyon için risk taşımaktadır. Ho ve ark. 1 normal kolon mukozasının kriptlerindeki MUC2 immünreaktivitesinin goblet hücrelerinde sınırlı olduğunu ve MUC boyanmasının da kriptlerin sadece üst kısımlarında zayıf oranda olduğunu göstermişlerdir. Normal ve hiperplastik örnekler karşılaştırıldığında MUC1 ve MUC2 immünreaktivitesinin adenomlardaki villöz komponent, boyut ve atipi derecesi arttıkça, anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir. MUC2 skorları adenomlarda boyut ve villöz büyüme paterni arttıkça, anlamlı olarak artmaktadır (72).

Weiss ve ark. 1 RNA proplarıyla in situ hibridizasyon tekniği kullanarak MUC2 ve MUC3 RNA' nın normal, malign ve inflamatuvar insan intestinal dokularındaki selüler dağılımını

araştırmışlardır. Normal kolon ve ince barsaklarda MUC2 mRNA mukozanın tüm alanlarında goblet hücrelerinde aşırı eksprese edilmiştir. MUC3 mRNA goblet hücreleri ve kolumnar hücreler tarafından , fakat kolon yüzey epitelinde ve ince barsak villöz komponentinde sınırlı olarak eksprese edilmiştir. MUC2 ve MUC3 mRNA ekspresyonları az diferansiye, orta derecede diferansiye ve iyi diferansiye kolon karsinomlarında azalmıştır. Fakat müsinöz kolon karsinomunda ise korunmuştur. Ülseratif kolit ve Crohn' lu olgularda ise MUC2 ve MUC3 mRNA ekspresyonları mukozanın inflame olduğu alanlardan çok normal paternin korunduğu alanlarında gösterilmiştir. Bu bulgu MUC2' nin goblet hücrelerine spesifik olduğunu vurgulamaktadır. MUC3 ise intestinal epitelial hücrelerin maturasyonlarına bağlı olarak spesiflik göstermektedir. Kolon karsinomunda MUC2 ve MUC3' ün genetik regülasyonu tümörün histolojik tipine göre değişiklik göstermektedir (71, 78).

Müsin gen ekspresyonları kolorektal karsinomlardan başka çeşitli organların tümörlerinde de çalışılmıştır. Sakamoto ve ark. 1 genç ve yaşlı erişkinlerdeki gastrik karsinomlarda müsin gen ekspresyonlarını araştırmışlardır. MUC2 ya da MRP antijenlerinin normal gastrik mukozada eksprese edilmediğini, gastrik adenokarsinomlarda ise, az diferansiye olanlarda en az seviyede olmak üzere eksprese edildiğini göstermişlerdir (79).

Yonezawa ve ark. 1 intraduktal papiller tümör gibi pankreasın, ve safra duktus kistadenokarsinomu gibi karaciğerin non-invaziv tümörlerinde MUC2 apomüsünün yüksek oranda eksprese edildiğini göstermişlerdir. Bu sonuçlara karşılık pankreasın invaziv duktal karsinomu ve karaciğerin invaziv kolanjiokarsinomu gibi invaziv karsinomlarında nadir olarak MUC2 ekspresyonu bulunmuştur (80).

Çalışmamızda genel olarak hafif derecede atipi gösteren adenom olgularında daha şiddetli MUC2 boyanma paterni izlenmiştir. Epitelial atipinin derecesi ile MUC2 boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.002$) ve ters orantılı ($r = -0.55$) bir korelasyon saptanmıştır (Kendall' s Tau B korelasyon testi). Atipinin derecesi arttıkça MUC2 ekspresyonu azalmaktadır.

MUC2 normalde intestinal epitelde bulunan bir apomüsindir ve goblet hücrelerine spesifiktir (71). Çalışmamızda MUC2 ekspresyonu hafif dereceli adenomlarda yüksek oranda bulunmuştur. Çünkü bu adenomlar normal kolon mukozasından hafif düzeyde farklılıklar içermektedirler. Ancak atipinin derecesi arttıkça, glikosilasyon gibi olaylarla müsin gen değişiklikleri olmakta ve bu değişiklikler genlerin anormal ekspresyonuna yol açmaktadır.

Kaye ve ark. nin yaptıkları normal, hiperplastik ve adenomatöz kolon epitelinin karşılaştırmalı elektron mikroskopik çalışmasında normal mukozada kriptlerin alt kısmında andiferansiye hücreler, intermediate hücreler, diferansiye goblet hücreleri ve enterokromaffin hücreler

bulunmaktadır. Adenomatöz kriptlerde ise sadece andiferansiye hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler çok az granüler endoplazmik retikulum içermektedirler. Goblet hücreleri normal mukozal kriptlerde bulunan dominant hücre tipidir. Fakat adenomatöz poliplerde elektron mikroskopik olarak matür goblet hücreleri bulunmamaktadır (39).

Benzer bir çalışma da Mughal ve ark. 1 tarafından elektron mikroskopik olarak yapılmıştır. Çalışmada adenomlarda yüzey epitelinde ve kriptlerde artmış sayıda andiferansiye ve immatür hücreler bulunmuştur. Adenomlarda atipi derecesi arttıkça goblet hücreleri sayıca azalmıştır ve atipik mukus damlacıkları içeren atipik sekretuar hücreler halini almıştır (40).

Çalışmamızdaki olgularda epiteliyal atipinin derecesi arttıkça, MUC2 boyanma skorlarının azalması, ultrastrüktürel yapıdaki olası değişiklikler nedeni ile olmaktadır şeklinde bir yorum yapılabilir. Çünkü MUC2 normal intestinal apomüsindir ve goblet hücrelerine spesifiktir. Atipi derecesi arttıkça adenomatöz kriptlerdeki normal goblet hücrelerinin sayısı azalmakta ve andiferansiye ve immatür hücreler ile atipik sekretuar hücreler dominant hale gelmektedir. Bu hücreler normal apomüsünleri eksprese etmemektedir. Glikosilasyon gibi bir takım moleküler değişiklikler ile MUC2 boyanma skorları azalmaktadır. Ayrıca atipi derecesi arttıkça MUC2 antikoru ile reaktivite verecek normal goblet hücreleri de adenomatöz kriptlerde bulunmamaktadır.

Sonuç olarak bu araştırmada kolorektal adenomlardaki malignite potansiyelini belirlemede önemli olan epiteliyal atipinin şiddeti ile selektif epiteliyal hücresel değişiklikler arasındaki ilişkiler ortaya konulmuştur. Bu hücresel değişikliklerden biri mûsinlerdeki değişikliklerdir. Dokukimyasal mûsin belirleyicilerden HİD-AB ve PAS-AB boyama yöntemi sülfomûsinler, sialomûsinler ve nötral mûsinleri ayırmada kullanılmıştır. Adenomlardaki atipinin derecesi arttıkça adenomatöz kriptlerdeki hücrelerin mûsin içerikleri anlamlı olarak sialomûsin yönüne kaymıştır. Şiddetli atipi gösteren adenomlardaki dominant olan mûsin sialomûsindir. Hafif derecede atipi gösteren adenomlarda ise dominant olan mûsin tipi sülfomûsindir. Bu bulgular istatistiksel olarak anlamlıdır. İmmün dokukimyasal yöntemler dokukimyasal yöntemlerden daha zahmetli ve pahalı yöntemler olmasına karşın daha spesifiktir. Adenom-karsinom silsilesinde önemli olan adenomların, malignite potansiyelini belirlemede oldukça yararlıdır. Normalde kolon mukozasında bulunmayan onkofetal gastrik mûsin olan HGM prekanseröz ve kanseröz kolon lezyonlarında bulunmaktadır. Epiteliyal atipinin derecesi arttıkça HGM ekspresyonu artmıştır. Bu da HGM' nin karsinogenezis sırasında erken prekanseröz bir belirleyici olduğunu göstermiştir. Buna karşılık HGM' nin tersine, normal kolon mukozasında bulunan intestinal major apomûsin olan MUC2' nin ekspresyonu, adenomlardaki epiteliyal atipinin derecesi arttıkça, azalmıştır.

Adenom-karsinom silsilesinde önemli rol oynayan adenomlardaki malignite potansiyelini belirlemede, klasik histopatolojik bulgular (boyut, tür, atipinin derecesi) ve klasik dokukimyasal bulgular yanısıra, HGM ve MUC2 müsin gen ekspresyonlarının araştırılması, tümör gelişiminin değerlendirilmesine ışık tutacaktır.



SONUÇLAR

Bu çalışmada farklı epitelyal atipi derecelerindeki 54 kolorektal adenom olgusunda, adenomatöz kriplerdeki sülfomüsin- sialomüsin dağılımı ile, HGM ve MUC2' nin immün dokukimyasal ekspresyonu araştırılmıştır. Bu parametrelerin epitelyal atipi derecesi, yaş, adenom türü, lokalizasyon ve boyut ile istatistiksel ilişkisi incelenmiştir.

1. Dizideki 54 olgunun 42' si erkek, 12' si kadındır.
2. Olguların yaş ortalaması 58.7' dir.
3. Dizideki adenomların çoğu, % 38.9' u orta büyüklüktedir (6-10 mm). Adenom boyutu ile adenom derecesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Ancak adenom boyutu ile adenom paterni arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.
4. Dizideki olguların % 83.3' ü rektosigmoid bölge yerleşimlidir.
5. Olguların % 59.2' si tübüler adenom, % 22.2' si tübülovillöz adenom ve % 18.5' i villöz adenomdur.
6. Tübüler adenomların % 56.25' i hafif derecede atipili, % 28.2' si orta derecede atipili, % 15.55' i şiddetli derecede atipilidir.
7. Tübülovillöz adenomların % 16.7' si hafif derecede atipili, % 50' si orta derecede atipili, % 33.3' ü şiddetli derecede atipilidir.
8. Villöz adenomların % 20' si hafif derecede atipili, % 30' u orta derecede atipili, % 50' si şiddetli derecede atipilidir.
9. Hafif derecede atipili olgularda HİD ile boyanan sülfomüsinler dominant, şiddetli derecede atipili adenomlarda ise, AB ile boyanan sialomüsinler dominanttır. Epitelyal atipinin derecesi ile HİD-AB boyanma özellikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır.
10. HGM dizideki şiddetli ve orta derecede atipili adenomlarda yüksek derecelerde eksprese edilmiştir. Atipi derecesi ile HGM ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve doğru orantılı ilişki bulunmuştur.
11. MUC2 dizideki hafif derecede atipili adenomlarda yüksek derecelerde eksprese edilmiştir. Atipi derecesi ile MUC2 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve ters orantılı ilişki bulunmuştur.
12. Kolorektal adenomlardaki müsin değişikliklerinin dokukimyasal yöntemlerle saptanması, MUC2 ve HGM gibi müsin gen proteinlerinin ekspresyonunun epitelyal atipi derecesi ile ilişkisinin araştırılması, kolorektal karsinom gelişiminde bir basamak olan adenom-karsinom silsilesini belirlemede önemli olacaktır.

ÖZET

Kolorektal adenomlar, adenom-karsinom silsilesinde öncü lezyonlar olarak kabul edilen neoplazmlardır. Adenomlardaki bazı değişiklikler atipi derecelerini belirlemede önemlidir. Bunlardan biri adenomatöz kriptlerdeki müsin değişiklikleridir. Adenomlarda atipinin derecesi arttıkça, normal kolorektal mukozanın kriptlerinde dominant olan sülfomüsin, sialomüsin yönüne kaymaktadır. Müsinlerdeki bu değişiklikler dokukimyasal olarak HİD-AB yöntemi ile ortaya konulmaktadır. Dokukimyasal yöntemlerin yanısıra, adenomlardaki müsin değişikliklerini belirlemede son yıllarda kullanılan ağırlıklı yöntem müesine yönelik antikolar kullanılarak uygulanan immün dokukimyasal yöntemdir. HGM ilk defa endoservikal tür over müsinöz kist sıvısı içeriğinden izole edilen gastrik fukomüsindir. Normalde mide mukozası ile fetal intestinal mukozada eksprese edilirken, erişkin intestinal mukozada eksprese edilmemektedir. Aynı zamanda HGM prekanseröz ve kanseröz kolon lezyonlarında eksprese edilirken, normal kolon mukozasında eksprese edilmemektedir. Bu özellik de HGM' nin onkofetal bir protein olduğunu göstermektedir. MUC2 normal intestinal epitelde bulunan dominant müsin genidir. MUC2, glikosilasyon gibi moleküler değişikliklerin etkisiyle kolon lezyonlarında farklı ekspresyonlar göstermektedir. Bu değişiklikler, artmış, azalmış ya da aberan ekspresyon şeklindedir. Prekanseröz ve kanseröz intestinal lezyonlardaki MUC2 müsin gen ekspresyonlarındaki değişiklikler dikkat çekicidir. Bu çalışmada değişik atipi derecelerinde 54 kolorektal adenom olgusundaki müsin değişiklikleri, HİD-AB ve PAS-AB dokukimyasal yöntemleri ve MUC2 ile HGM antikoları kullanılarak yapılan immün dokukimyasal yöntemleri kullanılarak semikantitatif olarak değerlendirilmiş ve bu değişikliklerin atipi dereceleri ile ilişkileri araştırılmıştır. Adenomlardaki epitelyal atipi dereceleri ile adenomun boyutu, histopatolojik türü, hastanın yaşı ile olan istatistiksel ilişkisi de araştırılmıştır. Hafif derecede atipili adenomlardaki HGM ekspresyonu, şiddetli derecede atipili olanlardan belirgin olarak düşüktür. MUC2 hafif derecede atipili adenomlarda diffüz olarak izlenirken, şiddetli derecede atipili adenomlarda çok az eksprese edilmekte ya da hiç eksprese edilmemektedir. Atipi derecesi, HGM ve MUC2 ekspresyonları ile ilişkili bulunmuştur. Atipi derecesi arttıkça, HGM ekspresyonu artmakta, MUC2 ekspresyonu azalmaktadır. Atipi derecesi arttıkça HİD ile boyanan sülfomüsinler, AB ile boyanan sialomüsinler yönüne kaymıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kolorektal adenomlardaki müsin değişikliklerinin HİD-AB gibi histokimyasal yöntemleri ile saptanması, MUC2 ve HGM gibi müsin gen proteinleri ekspresyonlarının adenomlardaki epitelyal atipi derecesi ile ilişkisinin araştırılması, kolorektal karsinom gelişiminde bir basamak olan adenom-karsinom silsilesini belirlemede önemli yer tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Lewin KJ, Riddel RH, Weinstein WM. Large Bowel Polyps and Tumors. In: Lewin KJ, Ed. *Gastrointestinal Pathology and Its Clinical Implications*. New York: Igaku Shoin 1992; 1222-56.
2. Fenoglio-Preiser CM, Lantz PE, Listrom MB, Davis M, Rilke FO. The Neoplastic Large Intestine. In: Fenoglio-Preiser CM, Lantz PE, Listrom MB, Davis M, Rilke FO, Eds. *Gastrointestinal Pathology An Atlas and Text*. New York: Raven Press 1989; 727-45.
3. Cooper HS. Small Intestine, Colon and Rectum. In: Ming SC, Goldman H, Eds. *Pathology of the Gastrointestinal Tract*. Philadelphia: WB Saunders Company 1992; 796-807.
4. Pascal RR, Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE. Neoplastic Diseases of the Small and Large Intestine. In: Silverberg SG, Ed. *Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology*. New York: Churchill Livingstone Inc. 1997; 1818-22.
5. Muto T, Bussey HJR, Morson BC. The Evaluation of Cancer of the Colon and Rectum. *Cancer* 1975; 36: 2251-70.
6. Crawford JM. The Gastrointestinal Tract. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Eds. *Pathologic Basis of Diseases*. Philadelphia: WB Saunders Company 1994; 811-17.
7. Yüceyar H, Çavuşoğlu H, Yüceyar S. Kolon Karsinomu ve Karsinogenesis Konusundaki Gelişmeler. *Kolon Rektum Hast Derg* 1994; 4: 123-8.
8. Hasegawa H, Ueda M, Furukawa K, Watanabe M, Teramoto T, Mukai M, Kitajima M. p53 Gene Mutations in Early Colorectal Carcinoma. De Novo vs. Adenoma-Carcinoma Sequence. *Int J Cancer* 1995; 64: 47-51 .
9. Mulder JWR, Offerhaus GJA, Feyter EP, Floyd JJ, Kern SE, Vogelstein B, Hamilton SR. The Relationship of Quantitative Nuclear Morphology to Molecular Genetic Alterations in the Adenoma-Carcinoma Sequence of the Large Bowel. *Am J Pathol* 1992; 141(4): 797-804.
10. Akiyama Y, Iwanago R, Saitoh K, Shiba K, Ushio K, Ikeda E, Iwama T, Nomizu T, Yuasa Y. Transforming Growth Factor- β Type II Receptor Gene Mutations in Adenomas From Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997; 112: 33-9.
11. Imaseki H, Hayashi H, Taira M, Ito Y, Tabata Y, Onoda S, Isono K, Tatibana M. Expression of c-myc Onkogene in Colorectal Polyps as a Biological Marker for Monitoring Malignant Potential. *Cancer* 1989; 64: 704-9.
12. Pascal RR. Dysplasia and Early Carcinoma in Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Adenomas. *Hum Pathol* 1994; 25: 1160-71.

13. Stryker SJ, Wolf BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarthy RL. Natural History of Unthreatened Colonic Polyps. *Gastroenterology* 1987; 93: 1009-13.
14. O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, Gottlieb LS, Sternberg SS, Diaz B, Dickersin GR, Ewing S, Geller S, Kasimian D, Komorowski R, Szporn A. The National Polyp Study. *Gastroenterology* 1990; 98: 371-79.
15. Colton CG, Siva MV. Flat Adenomas and Cancers. *Gastroenterology* 1995; 42(2); 182-4.
16. Neugut AI, Jacobson JS, Ahsan H, Santos J, Garbowski GC, Forde KA, Treat MR, Waye J. Incidence and Recurrence Rates of Colorectal Adenomas: A Prospective Study. *Gastroenterology* 1995; 108: 402-8.
17. Wilcox GM, Anderson PB, Colacchio TA. Early Invasive Carcinoma in Colonic Polyps. *Cancer* 1986; 57:160-71.
18. Riddell RH. Hands off "Cancerous" Large Bowel Polyps. *Gastroenterology* 1985; 89: 432-41.
19. Rickert RR, Auerbach O, Garfinkel L, Hammond EC, Frasca JM. Adenomatous Lesions of the Large Bowel. *Cancer* 1979; 43: 1847-57.
20. Ming RH, Weiss B, Deflice J, Blessing L, Gilliland F, Chao A. First Degree Relatives of Patient with Colon Cancer Have a High Incidence of Colorectal Adenomas. *Gastroenterology* 1997; 112(4): A616.
21. Iwabuchi M, Yokota T, Sugihara K, Hosokawa K, Ono H, Shirao K, Kondo H, Saito D, Yamaguchi H, Yoshida S. Are There Any Differences in Colorectal Cancer Risk Between Polypoid and Flat Adenomas? *Gastroenterology* 1997; 112(4): A626.
22. Netzer P, FASTER C, Biral R, Halter F, Mauer C, Schmassmann A. Significance of Histological Criteria for Malignant Colorectal Polyps. *Gastroenterology* 1997; 112(4): A627.
23. Sobin LH. The Histopathology of Bleeding from Polyps and Carcinomas of the Large Intestine. *Cancer* 1985; 55: 577-81.
24. Durgun V, Perek S, Altınlı E, Toksöz T. Kolorektal Villöz ve Tubulovillöz Adenomlar. *Kolon Rektum Hast Derg* 1994; 4: 86-89.
25. Fenoglio CM, Lane N. The Anatomical Precursor of Colorectal Carcinoma. *Cancer* 1974; 34: 819-23.
26. Thompson JJ, Enterline HT. The Macroscopic Appearance of Colorectal Polyps. *Cancer* 1981; 48: 151-60.

27. Kanamaru C, Mine T, Ueda N, Takeda M, Suzuki J, Kataoka A, Tsuchida T, Fujita T. Histological Study of Colon Polyps Resected by Endoscopic Surgery. *Gastroenterology* 1997; 112(4): A588.
28. Minamoto T, Sawaguchi K, Ohta T, Itah T, Mai M. Superficial Type Adenomas and Adenocarcinomas of the Colon and Rectum: A Comparative Morphological Study. *Gastroenterology* 1994; 106: 1436-43.
29. Lipper S, Kahn LB, Ackerman LV. The Significance of Microscopic Invasive Cancer in Endoscopically Removed Polyps of the Large Bowel. *Cancer* 1983; 52: 1691-99.
30. Haggitt RC, Glotzbach RE, Soffer EE, Wruble LD. Prognostic Factors in Colorectal Carcinomas Arising in Adenomas: Implications for Lesions Removed by Endoscopic Polypectomy. *Gastroenterology* 1985; 89: 328-36.
31. Wilcox GM, Beck JR. Early Invasive Cancer in Adenomatous Colonic Polyps ("Malignant Polyps"). *Gastroenterology* 1987; 92: 1159-68.
32. Cooper HS. Intestinal Neoplasms. In: Sternberg SS, Ed. *Diagnostic Surgical Pathology*. New York: Raven Press 1994; 1381-87.
33. Rosai J. Gastrointestinal Tract. In: Eighth Ed. *Ackerman's Surgical Pathology*. St Louis: Mosby 1996; 754-62.
34. Morson BC, Sobin LH. Histological Typing of Intestinal Tumors. *International Histological Classification of Tumors*. No: 15 Geneva: WHO 1976; 56-57.
35. Griffioen S, Bosman FT, Verspaget HW, Bruin PAF, Biemond I, Lamers CBHW. Mucin Profiles and Potential for Malignancy of Human Colorectal Adenomatous Polyps. *Cancer* 1989; 63: 1587-91.
36. Brown LJR, Smeeton NC, Dixon MF. Assessment of Dysplasia in Colorectal Adenomas: An Observer Variation and Morphometric Study. *J Clin Pathol* 1985; 38: 174-79.
37. Levine DS, Haggitt RC. Colon. In: Sternberg SS, Ed. *Histology for Pathologists*. New York: Raven Press 1992; 574-77.
38. Konishi F, Morson BC. Pathology of Colorectal Adenomas: A Colonoscopic Survey. *J Clin Pathol* 1982; 35(8): 830-41.
39. Kaye GI, Fenoglio CM, Pascal RR, Lane N. Comparative Electron Microscopic Features of Normal, Hyperplastic and Adenomatous Human Colonic Epithelium. *Gastroenterology* 1973; 64: 926-45.
40. Mughal S, Filipe MI, Jass JR. A Comparative Ultrastructural Study of Hyperplastic and Adenomatous Polyps, Incidental and in Association with Colorectal Cancer. *Cancer* 1981; 48: 2746-55.

41. Velcich A, Palumbo L, Jarry A, Laboisie C, Racevskis J, Augenlicht L. Patterns of Expression of Lineage-Specific Markers During the In-Vitro-Induced Differentiation of HT29 Colon Cancer Cells. *Cell Growth Differ* 1995; 6(6): 749-57.
42. Cook HC. Carbohydrates. In: Bancroft JD, Stevens A, Eds. *Theory and Practice of Histological Techniques*. New York: Churchill Livingstone 1990; 195-203.
43. Buisine MP, Janin A, Maunoury V, Audie JP, Delescaut MP, Copin MC, Colombel JF, Degand P, Aubert JP, Porchet N. Aberrant Expression of a Human Mucin Gene (MUC5AC) in Rectosigmoid Villous Adenoma. *Gastroenterology* 1996; 110: 84-91.
44. Hollingsworth MA, Strawhecker JM, Coffrey TC, Mack DR. Expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC4 Mucin mRNAs in Human Pankreatic and Intestinal Tumor Cell Lines. *Int J Cancer* 1994; 57: 198-203.
45. Gambus G, Bolos C, Andreu D, Franci C, Egea G, Real FX. Detection of the MUC2 Apomucin Tandem Repeat with a Mouse Monoclonal Antibody. *Gastroenterology* 1993; 104: 93-102.
46. Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS. Heterogeneity of Mucin Gene Expression in Normal and Neoplastic Tissues. *Cancer Res* 1993; 53: 641-51.
47. Niv Y, Bryd JC, HO SB, Dayiha R, Kim YS. Mucin Synthesis and Secretion in Relation to Spontaneous Differentiation of Colon Cancer Cells In Vitro. *Int J Cancer* 1992; 50: 147-152.
48. Carrato C, Balague C, Bolos C, Gonzales E, Gambus G, Planas J, Perini JM, Andreu D. Differential Apomucin Expression in Normal and Neoplastic Human Gastrointestinal Tissues. *Gastroenterology* 1994; 107: 160-172.
49. Listinsky CM, Riddell RH. Patterns of Mucin Secretion in Neoplastic and Non-Neoplastic Diseases of the Colon. *Hum Pathol* 1981; 12(10): 923-29.
50. Filipe MI. The Value of a Study of the Mucosubstances in Rectal Biopsies from Patients with Carcinoma of the Rectum and Lower Sigmoid in the Diagnosis of Premalignant Mucosa. *J Clin Pathol* 1972; 25: 123-8.
51. Vora IM, Chitale AA, Amaraqurkar AD, Joshi A. Mucin Histochemistry of Gastric and Colonic Carcinomas. *Hastroenterology* 1997; 112(4): A674.
52. Filipe MI, Branfoot AC. Abnormal Patterns of Mucus Secretion in Apparently Normal Mucosa of Large Intestine with Carcinoma. *Cancer* 1974; 34: 282-90.
53. Sadahiro S, Ohmura T, Saito T, Akatsuka S. An Assessmnet of the Mucus Component in Carcinoma of the Colon and Rectum. *Cancer* 1989; 64: 1113-6.

54. Terho I, Laitio M. Hexosamine-Containing Macromolecules in Human Colon Carcinomas. *Scand J Gastroenterol* 1977; 12(1): 7-15
55. Allen DC, Connolly NS, Biggart JD. High Iron Diamine-Alcian Blue Mucin Profiles in Benign, Premalignant and Malignant Colorectal Disease. *Histopathology* 1988; 13(4): 399-411,
56. Decaens C, Bara J, Rosa B, Daher N, Burtin P. Early Oncofetal Antigenic Modifications During Rat Colonic Carcinogenesis. *Cancer Res* 1983; 43: 355-62.
57. Bara J, Languille O, Gendron MC, Daher N, Martin E, Burtin P. Immunohistological Study of Precancerous Mucus Modifications in Human Distal Colonic Polyps. *Cancer Res* 1983; 43: 3885-91.
58. Ingh HF, Bara j, Cornelisse CJ, Nap M. Aneuploidy and Expression of Gastric-Associated Mucus Antigens MI and CEA in Colorectal Adenomas. *Am J Clin Pathol* 1987; 87: 174-9.
59. Toribara NW, Robertson AM, Ho SB, Kuo WL, Gum E, Hicks JW, Gum JR, Bryd JC, Siddiki B, Kim YS. Human Gastric Mucin. Identification of a Unique Species by Expression Cloning. *J Biol Chem* 1993; 268(8): 5879-85.
60. Kitamura H, Cho M, Lee BH, Gum JR, Siddiki BB, Ho SB, Toribara NW, Lesuffleur T, Zweibaum A, Kiyamura Y, Yonezawa S, Kim YS. Alteration in Mucin Gene Expression and Biological Properties of HT29 Colon Cancer Cell Subpopulations. *Eur J Cancer* 1996; 32A(10): 1788-9.
61. Ogata S, Uehara H, Chen A, Itzkowitz SH. Mucin Gene Expression in Colonic Tissues and Cell Lines. *Cancer Res* 1992; 52: 5971-78.
62. Jass JR, Allison LJ, Edgar SG. Distribution of Sialosyl In and In Antigens Within Normal and Malignant Colorectal Epithelium. *J Pathol* 1995; 176(2): 143-9.
63. Mc Guckin MA, Devine PL, Ward BG. Early Steps in the Biosynthesis of MUC2 Epithelial Mucin in Colon Cancer Cells. *Biochem Cell Biol* 1996; 74(1): 87-93.
64. Ynozawa S, Bryd JC, Dahiya R, Ho JJ, Gum JR, Griffiths B, Swallow DM, Kim YS. Differential Mucin Gene Expression in Human Pancreatic and Colon Cancer Cells. *Biochem J* 1991; 276(3): 599-605.
65. Hanski C, Hanski ML, Zimmer T, Ogorek D, Devine P, Riecken EO. Characterisation of the Major Sialyl-Lex-Positive Mucins Present in Colon, Colon Carcinoma and Sera of Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 928-33.

66. Seregni E, Botti C, Massaron S, Lombardo C, Capobianco A, Bogni A, Bombardieri E. Structure, Function and Gene Expression of Epithelial Mucins. *Tumori* 1997; 83(3): 625-32.
67. Yang OH, Chauhan DF, Boland CR. Tandem Repeat Domains of the Human MUC2 Gene Encode Glycosylation Sites in Human Colonic Mucin. *Gastroenterology* 1997; 112(4): A685.
68. Ohara S, Bryd JC, Gum JR, Kim YS. Biosynthesis of Two Distinct Types of Mucin in HM3 Human Colon Cancer Cells. *Biochem J* 1994; 297(3): 509-16.
69. Kim YS, Gum JR, Bryd JC, Toribara NW. The Structure of Human Intestinal Apomucins. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144(2): 510-4.
70. Velcich A, Palumbo L, Selleri L, Evans G, Augenlicht L. Organization and Regulatory Aspects of the Human Intestinal Mucin Gene (MUC²) Locus. *J Biol Chem* 1997; 272(12): 7968-76.
71. Weiss AA, Babyatsky MW, Ogata S, Chen A, Itzkowitz SH. Expression of MUC2 and MUC3 mRNA in Human Normal, malignant and Inflammatory Intestinal Tissues. *J Histochem Cytochem* 1996; 44(10): 1161-6.
72. Ho SB, Ewing SL, Montgomery CK, Kim YS. Altered Mucin Core Peptide Immunoreactivity in the Colon Polyp-Carcinoma Sequence. *Oncol Res* 1996;8(2): 53-61.
73. Kalus M. Carcinoma and Adenomatous Polyps of the Colon and Rectum in Biopsy and Organ Tissue Culture. *Cancer* 1972; 30: 972-81.
74. Xi C, Xu L. The Relationship Between Colorectal Adenoma and Cancer. *Gastroenterology* 1997; 112(4): A684.
75. Devine PL, McGuckin MA, Birrel GW, Whitehead RH, Sachdev GP, Shield P, Ward BG. Monoclonal Antibodies Reacting with the MUC2 Mucin Core Protein. *Br J Cancer* 1993; 67(6): 1182-8.
76. Bresalier RS, Ho SB, Schoegger HL, Kim YS, Sleisenger MH, Broat P, Bryd JC. Enhanced Sialylation of Mucin-Associated Carbohydrate Structures in Human Colon Cancer Metastasis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1354-67.
77. Egea G, Franci C, Gambu G, Lesuffleur I, Zweibaum A, Real FX. Cis-Golgi Resident Proteins and O-glycans Are Abnormally Compartmentalized in the RER of Colon Cancer Cells. *J Cell Sci* 1993; 105(3): 819-30.
78. Han SY, Lee MS, Baek SH, Erickson RH, Sleisenger MH, Kim YS. Alteration in Mucin Gene Expression and Biological Properties of Colon Cancer Cells by Protein Kinase-C Activation. *Gastroenterology* 1997; 112 (4): A575.

79. Sakamoto H, Yonezawa S, Utsunomiya T, Tanaka S, Kim YS, Sato E. Mucin Antigens Expression in Gastric Carcinomas of Young and Old Adults. *Hum Pathol* 1997; 28: 1056-65.
80. Yonezawa S, Sueyoshi K, Nomoto M, Kitamura H, Nagata K, Arimura Y, Tanaka S, Hollinsworth MA, Siddiki B, Kim YS, Sato E. MUC2 Gene Expression is Found Noninvasive Tumors but in Invasive Tumors of the Pancreas and Liver. *Hum Pathol* 1997; 28: 344-5

