

**T.C.
Ankara Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı**

71264

**ÖZOFAGUS KANSERİNDE DNA PLOİDİ ve
PROGNOSTİK ETKENLERLE İLİŞKİSİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Ayten Kayı Cangır

Danışman : Prof Dr. İlker Ökten

Ankara - 1998

VSÖZ

Göğüs cerrahisi uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük emekleri olan ve her türlü desteği sağlayan sayın hocalarım, Prof.Dr. Şinasi Yavuzer, Prof.Dr. İlker Ökten, Prof.Dr. İdi Akay, Prof.Dr. Şevket Kavukçu, Doç.Dr.Nezih Özdemir, Doç.Dr. Adem Güngör, Doç.Dr. İrrat Akal ve Y. Doç Dr. Hakan Kutlay'a en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı baştan sona yönlendiren ve değerli katkılarını esirgemeyen hocam Prof.Dr. er Ökten' e teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'ndan sayın ç Dr. Hakan Akbulut'a, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Dr.Aylin Okçu Heper'e, Tıbbi Onkoloji im Dalı Laboratuvarı elemanlarından sayın Nalan Açıkgöz'e ve eşime teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresinde beraber olduğum tüm çalışma arkadaşımı her türlü yardım ve stekleri nedeniyle teşekkür ediyorum.

Dr. Ayten Kayı Cangır

Aralık 1998

İÇİNDEKİLER

Giriş ve Amaç

I - Genel Bilgiler

II a - Özofagusun Embriyolojik Gelişimi

II b - Özofagusun Anatomisi

II c - Özofagusun Fonksiyonu

II d - Özofagus Kanseri

II e - Özofagus Kanserinde Tedavi

II f - Özofagus Kanserinde Prognostik Etkenler

II g - Flow Sitometri ve Solid Tümörlerde DNA Analizi

I - Materyal ve Metod

V - Bulgular

IV a - DNA Ploidi Durumu ve Yaş

IV b - DNA Ploidi Durumu ve Cins

IV c - DNA Ploidi Durumu ve Tümör Lokalizasyonu

IV d - DNA Ploidi Durumu ve Histopatolojik Özellik

IV e - DNA Ploidi Durumu ve Grade

IV f - DNA Ploidi Durumu ve Tümör Derinliği

IV g - DNA Ploidi Durumu ve Lenf Bezi Metastazı

IV h - DNA Ploidi Durumu ve Tümör Evresi

IV i - DNA Ploidi Durumu ve S-fazı fraksiyonu

IV j - DNA Ploidi Durumu ve Proliferasyon İndeksi

IV k - DNA Ploidi Durumu ve Sağkalım

- Tartışma

I - Sonuç

II - Özeti

III - Kaynaklar

I - GİRİŞ ve AMAÇ

Özofagus kanserinde, kötü prognoz ve hızlı klinik progresyon göğüs cerrahisinin büyük sorunlarından birisidir.

Özofagus kanserlerinde, klinik ve patolojik evreleme, özofagus duvarındaki invazyon derinliği, bölgesel ve uzak lenf bezı metastazı, uzak organ metastazı prognозun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Buna karşın benzer klinik, histopatolojik yapı, evre ve cerrahi girişim özelliklerine sahip hastalar arasında önemli sağkalım farklılıklar söz konusudur (1). Bu klinik gözlemler, özofagus kanserli hastaların bireysel özellikleri ile biyolojik malign potansiyelleri arasında farklılıklar olduğunu göstermektedir (1). Bu nedenlerle diğer malignitelerde olduğu gibi özofagus kanserinde de yeni prognoz belirleyici yöntemler üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (2). Bu çalışmalar arasında flow sitometri tekniği ile tümörlerin DNA içeriğinin değerlendirilmesi önemli bir yer tutmaktadır .

Flow sitometrinin klinik uygulamaya girmesi ile birlikte DNA ploidi durumu ve S-fazı fraksiyonunun prognozla ilişkili olabileceği gösterilmeye başlanmıştır (2,3,4). Özellikle arşiv materyali olan parafin bloklardan flow sitometrik çalışmaların yapılabılır olması prognoza yönelik çalışmaları ivmeleştirmiştir (5,6,7,8,9,10).

Bu çalışmada, kliniğimizde özofagus, hipofarinks ve kardia kanseri tanısı alan, radikal cerrahi girişim uygulanan hastaların patoloji arşiv materyali olan parafin bloklarında flow sitometrik DNA analizi ile DNA ploidi, S-fazı fraksiyonu ve diğer klinik parametreler ile korelasyonunu ve prognoz ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

II a - ÖZOFAGUSUN EMBRİYOLOJİK GELİŞİMİ ve HİSTOLOJİK YAPISI

Sindirim sisteminin oluşması, sferoidal blastokistte endodermal tabakanın görülmesiyle başlar. Splanik mezoderm endoderme yaklaştığında birleşerek splankoplörayı oluşturdugunda iki tabakalı primitif barsaklar meydana gelir. Özofagusun iki orijini vardır; üst ya da retrotrakeal bölüm ön barsağın faringeal segmentinde trakeadan uzunlamasına ayrılr, alt ya da infratrakeal segment ise ön barsağın pregastrik segmentinden oluşur (11,12).

Embriyoda özofagus başlangıçta ince, çok sıralı kolumnar epitel ile döşelidir. Bu epitel prolifere olarak lümeni tamamen doldurur. Embriyoda, 6.-7. haftada epitelde vakuolizasyon başlar. Gebeliğin 8. haftasında önce 1/3 orta bölümde silialı epitel ortaya çıkar, yukarıya ve aşağıya uzanarak çok sıralı kolumnar epitelin üzerini örter. Onuncu hafta dolaylarında proksimal ve distal uçlarda tek bir kolumnar hücre tabakası toplanır, sözkonusu bu hücreler 4. ayda lamina propria girerek özofageal kardia tipi bezleri oluşturur. Gebeliğin 5. ayında yine özofagusun 1/3 orta bölümünde çok sıralı yassı epitel gelişmeye başlar ve proksimal ile distal uçlara doğru ilerler. Özofagusun yassı epitelinin ortaya çıkışından sonra submukozal bezler gelişir (11,13).

Özofagusun kas yapıları ise sirküler tabaka 6., longitudinal 9. haftada olmak üzere gelişmeye başlar ve 5. ayda düz kaslar ile çizgili kaslar normal oran ve dağılıma kavuşurlar (11, 13).

Özofagus mukozası, yassı epitel, lamina propria ve kalın bir muskularis mukozadan oluşur. Özofagusun iç yüzü hasarlara dayanıklı çok katlı, non-keratinize yassı epitel ile döşelidir. Yassı epitelin altında lamina propria ve muskularis mukoza uzanır (11, 14).

Özofagusun yassı epitelinin üst sınırı olan hipofarinksten başlayıp kardiaya kadar uzanır. Kardiada çok katlı yassı epitel mide epiteline yani kolumnar epitele dönüşür (11, 14).

Özofagus mukozasında iki tip mukoza bezi vardır. İlk, basit tübüler bezdir (Superfisiyal ya da mukozal bez) ve nötral musin salgıları, diğerı daha kompleks müköz bezdir (derin ya da submukozal bez) ve asidik musin salgıları (11,14).

II b- ÖZOFAGUSUN ANATOMİSİ

Özofagus, farinks ile mideyi birleştiren yoldur. Altıncı servikal vertebra korpusu düzeyinden, m. krikofaringeus başlar ve 10.-11. torakal vertebra düzeyinde mide ile birleşerek son bulur. Özofagus, 25-30 cm uzunluğunda ve üst dış kavisinden mideye kadar olan aralık ise 40-45 cm'dir. Genişliği boş ve dolu olmasına göre değişir ve her düzeyde aynı değildir. Boşken genişliği 1-1,5 cm iken basınç artışı ile 2,5-3 cm genişliğe ulaşabilir. Özofagus 3 yerde darlık gösterir :

- 1- Farinks ile birleşim yeri, en dar yerdir ve 14-15 mm kadar genişleyebilir
- 2- Sol ana bronkusla çaprazlaştiği nokta
- 3- Diafragmayı geçtiği, kardiadan 3 cm yükseklikte olan bölümüdür (11).

Özofagusun en geniş yeri 2. ve 3. darlık arasındaki parcadır. Özofagus vertebra korpusları ile yakın ilişkidedir, bu nedenle vertebra açıklığına uyarak açılığı öne bakan bir eğri çizer. Özofagus hafif yan eğrilikler gösterir, 7. torakal vertebraya kadar orta hatta iken bu düzeyde hafif sola deviye olarak aortanın önüne geçer ve diafragmanın solunda bulunan hiatus özofagustan geçer.

Özofagus, pars servikalis, pars torasika, pars abdominalis olarak üç parçada incelenir.

Özofagusun tunika mukoza, tela mukoza ve tunika muskularisten oluşur. Tunika mukoza, çok katlı yassı epitel, distal 2-3 cm'de kolumnar epitel ile

örtülüdür. Bu mukoza, 8-10 tane kalın mukoza plikası yapar ve kesit yüzeyinde yıldız gibi görünür. Tela submukoza, gevşek bağ dokusudur, vasküler yapılar, sinir ağı ve ganglionlar burada bulunur. Tunika muskularis dışta longitudinal, içte sirküler kas tabakası bulunur. Özofagusun adventisiyası ince gevşek bir bağ dokusundandır. Serozasi ve mesenteri yoktur (11, 15).

Özofagus a.torasika interna, torasik aortadan çıkan dallar, a.gastrika sinistra ve sol a.frenikadan kanlanır. Venöz drenajı ise v. tiroidea inferior, v. azigos ve hemiazigos aracılığı ile v. kava superiora, v. gastrica sinistra aracılığı ile v.kava inferiora'dır (11, 15).

Özofagusun Lenfatik Sistemi :

Özofagusta lenfatik drenaj, lamina propria ve submukozadaki zengin lenfatik damar ağı ile bunların birleştiği musküler ve adventisial lenfatik damarlarla olur. Musküler tabakadaki lenfatikler longitudinal seyrederler. Özofagus mukozasının lamina propria ile muskularis mukoza arasındaki kısımda ve submukozada çok zengin bir lenfatik ağı bulunur. Bu lenfatik damarlar musküler tabakadaki ve adventisyadaki lenfatiklerle anastamozlaşırlar. Musküler tabakadaki lenfatikler longitudinal şekilde uzanırlar. Bu nedenle karsinomların çevrelerindeki alanlara intramukozal ve submukozal yayılımı sıklıkla bulunur (11, 15, 16).

Servikal segment lenfatikleri internal juguler ve üst trakeal lenf bezleri gruplarına, torasik özofagus lenfatikleri üst, orta ve alt mediastinal lenf bezleri gruplarına drene olur. Abdominal segmentin lenfatik drenajı ise superior gastrik, çöliak aks, ana hepatik arter, splenik arter çevresi lenf bezlerinedir. Bütün farklı drenaj bölgelerine karşın tüm lenfatik ağ arasında çok yoğun bir ilişki vardır. Tümörlerin yayılımında bu özelliğin önemi büyüktür (14,16, 17).

Sinirleri :

Boyun bölümü n.rekürrenslerden, torasik ve abdominal bölümü n.vagus ve trunkus sempatikustan oluşan pleksus özofagustan alır (11, 15).

II c - ÖZOFAGUSUN FONKSİYONU

Gastrointestinal sistemin başlıca görevi, vücuda sürekli olarak su, elektrolit ve besin sağlamaktır. Bunun başarılması için besin maddelerinin sindirim ve emilime ugrayabileceği uygun bir hızla gastrointestinal kanalda ilerlemesi gereklidir. Bu bütünün içinde özofagus, besinlerin farinksten mideye iletilmesini sağlamaktadır. Özofagusun bu fonksiyonu ilk bakışta basit gibi görünmekle birlikte kompleks bir fizyolojik olaydır (11, 18).

Yutma; istemli faz, farinks fazı ve özofagus fazı olmak üzere üç bölümden oluşur.

Özofagusta iki tip peristaltik dalga oluşur. Primer peristaltizm, yutmanın farinks fazında farinksten başlayan ve özofagusa yayılan peristaltik dalganın basitçe devamından ibarettir. Bu dalga, farinksten mideye kadar 8-10 sn.'de özofagusa yayılır. Eğer primer peristaltik dalga besini mideye kadar göndermeye yetersiz kalırsa, özofagusa takılan besinin çeperi germesi ile intramural sinir sistemi uyarılarak sekonder peristaltik dalga gelişir ve özofagustan kaynaklanır. Özofagusun peristaltik dalgaları, yutma mekanizmalarının bir parçası olan vagus refleksleri ile başlar. Bu refleksler, özofagustan medulla oblongataya vagusun afferent lifleri ile merkezden geriye, özofagusada vagusun efferentleri ile taşınırlar (11, 18).

Farinks ve özofagusun 1/3 üst bölümünün kas yapısı çizgili kas tipindedir. Bu nedenle bu bölgelerde oluşan peristaltik dalgalar glossofaringeus ve vagus sinirleri içindeki iskelet sinir impulsları ile kontrol edilir. Özofagusun 2/3 alt bölümünde kas

yapısı düz kas tipindedir ve vagusun intramural sinir pleksusları ile kontrol edilir. Özofagusa giden vagus dalları kesildiği zaman özofagusun miyenterik sinir pleksusları bir kaç gün sonra yeteri kadar duyarlılık kazanarak vagus refleksinin desteği olmadan da sekonder peristaltik dalgaları oluşturabilir (11, 18).

Özofagusun diğer bir fonksiyonu mide içeriğinin yukarıya geçişini engellemektir. Bu işlevi, anatomik açıdan diğer bölgelerinden farklı olmayan ancak tonik olarak kasılı olan alt gastroözofageal sfinkter ile gerçekleştirir.

Özofagusun sekresyonu tümüyle mukoid niteliktedir ve yutmanın kolaylaşmasını sağlar. Özofagusun büyük bir bölümü, bir çok basit müköz bezlerle kaplıdır. Bu bezler müsin salgılayarak yeni gelen besinlerin mukozaya zarar vermesini önler (11,14,18).

II d - ÖZOFAGUS KANSERİ

Özofagus kanserleri sık görülen maligniteler arasında yer almamakla birlikte yaşamın temel işlevlerinden biri olan beslenmeyi engelleyerek çok kısa bir zaman dilimde hastanın yaşam kalitesini ileri derecede bozarak kısaltır. Bu nedenle diğer malignitelerden özellikli bir konumu vardır.

Tarihçe :

Mackenzie, 1884 yılında yayınladığı makalesinde kendisinden önce özofagus kanseriyle ilgili yapılan deneyleri kaydetmiştir. Galen, 2. yüzyılda, özofagusu kısmen ya da tamamen tikayan et parçalarından söz eder. Onuncu yüzyılda İbn-i Sina, disfajiye neden olan çeşitli durumları tanımlamış ve tümörlerin disfajide önemli rol oynadıklarını fark etmiştir. Coiter, 1686'da özofagusun alt bölümünü tikayan ağır bir kitlenin bir kadının ölümüne neden olduğunu belirtmiştir. Boerhaave ve van Swieten 1745'de özofagusun malign obstrüksiyon semptomlarını ayrıntılı bir biçimde tanımlamışlardır. Morgagni ve Lieutaud 1767, Ballie 1802'de ve Home 1805'de bu gibi hastalarla ilgili gözlemlerini yayımlamışlardır ve bu tarihlerden sonra özofagus kanseriyle ilgili sayısız yayınlar yapılmıştır (11).

Etiyoloji:

Özofagus kanseri dünya genelinde tüm kanserler arasında 6. Sırada yer almaktadır ve sıklığı 6.4 / 100.000 olarak bildirilmektedir (11,19,20). Tüm kanserlerin % 1.5-2'sini, gastrointestinal sistem kanserlerinin ise % 5-7'sini oluşturmaktadır (21,22,23). Ancak coğrafik dağılımı özellikleidir. Dünya üzerindeki bazı bölgelerde düşük riskli alanlara göre 500 kat daha fazla görülmektedir (19,20,21,24). Görülme sıklığı yüksek olan ülkeler İran, özellikle Hazar Denizi kıyıları, Güney Afrika, Çin'in kuzey bölgeleri, Rodezya, Türkmenistan, İsviçre, Fransa, Hindistan, Portoriko, Singapur, Japonyadır. A.B.D.'lerinde ise zenci populasyonda sıktır (25). Uzak Doğu ülkelerinde, özofagus kanseri gastrointestinal sistem kanserlerinde birinci sıradadır. İran'da 245/100.000, Çin'de 108/100.000 gibi yüksek oranlardadır (11,22,24,26,27,28, 29). Ülkemizde hasta profili değerlendirildiğinde ise büyük bir çoğunluğunun Doğu Anadolu bölgesinde yaşamakta olduğu görülmektedir (30).

Özofagus kanserinin otuzlu yaşlardan önce görülmeye sıklığı düşüktür, en çok 6. ve 7. dekatlarda rastlanır. Erkeklerde, kadınlara göre iki kat daha fazla görülmesine karşın kadın hastalar genellikle daha gençtir (11).

Özofagus kanserinin etiyolojisi kesin olarak hala bilinmemekle birlikte sık olarak görüldüğü bölgelerin ortak özellikleri üzerinde durulmaktadır. Bu ortak noktalar yoksulluk, tütün bağımlılığı ve beslenme alışkanlıklarıdır. Yoksullğun

kaçınılmaz sonucu malnutrisyondur ve buna bağlı olarak diyete yer alan hayvansal, bitkisel proteinlerin, eser elementlerin ve vitaminlerin (A, C, riboflavin, pridoksin, tiyamin) yetersiz alımına neden olmaktadır. Beslenme alışkanlıklarında ise ortak öğe aşırı sıcak yiyecek ve içeceklerin olmasıdır. Ayrıca sözkonusu bu bölgelerde alkol alımının ve tütün alışkanlığının yüksek olmasında anlamlı olarak değerlendirilmektedir (11,21,22,31,32). Yine diyette nitrosamin içeren besinlerin alımında etiyolojide etken olabileceği savunulmuştur(21,33).

Tylosis, otozomal dominant geçişli kalıtsal bir hastalıktır, ayak tabanında ve avuç içinde hiperkeratoz ile karakterizedir. Tylozis tanısı alan hastaların %35'inde özofagus kanseri riski vardır (11,22).

Özofagus kanserinin etiyolojisinde kronik irritasyon, metaplastik striktürler, Plummer-Vinson Sendromu, akalazya, Barrett özofagusunun, özofagus kanseri gelişiminde etkisi yüksektir (11,22,31,32).

Bütün diğer malignitelerde olduğu gibi özofagus kanserinin etiyolojisine yönelik genetik çalışmalar devam etmektedir ve özofagus kanserinin sık görüldüğü ailelerle ilgili çalışmalar vardır. Sözkonusu bu çalışmalarda 3p,5,9,17q ve 17p, kromozomlarda delesyonların sık olduğu bildirilmiştir (34-39).

II e - ÖZOFAGUS KANSERİNDE TEDAVİ

Özofagus kanserinin tedavisi cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ya da her üç yöntemin kombinasyonu ile yapılmaktadır.

1 - Cerrahi Tedavi : Özofagus rezeksiyonu yüksek morbidite ve mortalite oranına karşın kürabilité ve iyi bir palyasyon ile uzun sağkalım süresi sağlayan tek yöntem olması nedeniyle kontrendikasyon olmayan olgularda en iyi yöntemdir (26,40).

Özofagus kanserinin cerrahi tedavisi radikal ya da palyatif cerrahi tedavi olmak üzere ikiye ayrılır. Radikal cerrahi, tümörün total olarak rezeksiyonu ile kürabiliteyi amaçlar. Bu tür girişimlerde kürabilité olmaya bile bölgesel nüks oluşumu çok düşüktür ve hastalar genellikle uzun bir sağkalım süresi ile iyi bir palyasyon elde ederler. Palyatif cerrahi girişimler ise kürabilité şansı olmayan , oral ya da enteral beslenmeyle sağkalım süresini uzatmayı amaçlayan girişimlerdir (26,40).

Özofagus kanserinde cerrahi rezeksiyon, genel durumu iyi olan, tümörün total olarak çıkarılmasının olası olduğu ve uzak organ metastazı olmayan tüm olgularda ilk tercih edilecek tedavi yöntemidir. Tümörün çevre organlara direk invazyonu olan T4 tümörde invazyon perikard ve diafragma gibi rezeksiyonu olası organlarda ise bu olgularda da rezeksiyon önerilmektedir (41).

Cerrahi tedavide, tümörün perforasyonu, trachea invazyonu ve trakeoözofageal fistül, aorta, kalp invazyonu, intraabdominal yayılım (Peritoneal tutulum), uzak organ metastazı direkt inoperabilite kriterleridir. Genel durumun ileri derecede bozuk olması, karaciğer, böbrek ve kardiak fonksiyonların cerrahi girişimi tolere edemeyecek düzeyde olması ise indirekt inoperabilite kriterleridir (26).

Özofagus rezeksiyonu ve rekonstrüksiyonu çok değişik yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Cerrahi yöntemin seçimi tümörün yerleşim yeri, evresi, tümörlü özofagus segmentinin uzunluğu, yaş, eşlik eden hastalıklar, daha önce geçirilmiş gastrointestinal operasyonlara bağlıdır (26,42,43,44).

Cerrahi girişimde amaç, tümörlü özofagusun yeterli genişlikte çıkarılması yani komplet rezeksiyon, lenf bezi diseksiyonu ve hasta için uygun yöntemle rekonstrüksiyonun gerçekleştirilmesidir. Rekonstrüksiyonda, gastrik transpozisyon güvenli vaskülarizasyon, yeterli uzunluğu nedeniyle anastamoz hattında gerginlik yapmaması, tek anastamoz ve ameliyat gerektirmesi, rezidüel tümör kalması olasılığının minimal olması gibi üstünlükleri nedeniyle en çok tercih edilen yöntemdir. Kolon ve jejunum interpozisyonuda rekonstrüksiyonda kullanılabilir (11,22,26).

2 - Radyoterapi : Özofagus kanserinde radyoterapi, inrezektabl olgularda palyasyon ve rezektabl olgularda ise preoperatif olarak rezeksiyonu kolaylaştırmak, postoperatif ise lokal nüks kontrolüyle sağkalımı artırmakla sınırlıdır.

Radyoterapinin sıkılıkla striktür, fistül ve tümör nekrozona bağlı kanama gibi komplikasyonları yanı sıra hastalarda genellikle özofajit ve radyasyon pnömonitisi, perikardite yol açması sonucu endikasyonu sınırlıdır. Bu nedenle özofagus kanserinde radyoterapi sıkılıkla neoadjuvan ya da adjuvan tedavi protokollerinde yer almaktadır. İnoperabl olgularda, cerrahi sonrası nükslerde kemoterapi ile eş zamanlı radyoterapi yapılabilir (26,46).

3 - Kemoterapi : Özofagus kanserinde kemoterapinin tek başına yeri yoktur. Cerrahi tedavi ve radyoterapinin başarısının artırılmasında kemoterapininde içinde yer aldığı multimodal neoadjuvan uygulamaların kullanımı ise araştırma aşamasındadır. Cerrahi sonrası nükslerde radyoterapi ile birlikte değişik ajanlardan oluşan protokoller denenmekle birlikte en çok kullanılan ajanlar 5-florourasil ve sisplatindir (46-49).

Sonuç olarak, özofagus kanserinin tedavisinin temelini cerrahi girişim oluşturmaktadır. Komplet rezeksiyonun olası olmadığı geç evrelerde saptanmış olgularda ya palyatif amaçlı major cerrahi girişim ya da yaşamın sürdürülmesine yönelik minör cerrahi girişimlerle birlikte radyoterapi, kemoterapi gibi yandaş tedaviler kullanılabilir. Neoadjuvan radyoterapi, kemoterapi, multimodal tedavi ile endoskopik özofageal stent uygulamaları, laser, fotodinamik tedavi, brakiterapi ile semptomatik tedavi en azından yaşam kalitesinin yükseltilmesinde ve beslenme ile ilgili komplikasyonları önlemede yararlı yöntemlerdir (25,26,45,50).

II f - ÖZOFAGUS KANSERİNDE PROGNOSTİK ETKENLER

Özofagus kanserinde, prognozda en önemli etken diğer bütün malignitelerde olduğu gibi erken tanı ve tedavidir. Erken evrede tanı konularak tedavi edilen olgular dışında özofagus kanserli hastalarda prognoz kötüdür (22,40). Ne yazık ki hasta profilimiz gözönünde tutulduğunda hastaların büyük bir çoğunluğu ileri evrede başvurmaktadır.

Özofagus kanserinde, anatomik lokalizasyon prognozda etkilidir, üst ve orta 1/3 torasik özofagus kanserlerinin sonuçları diğer anatomik lokalizasyonlara göre daha kötüdür (23).

Tüm malignitelerde olduğu gibi özofagus kanserinde de TNM sınıflaması kullanılarak yapılan evrelemede ileri evreler kötü prognoz habercisidir. Özofagus kanserindeki TNM sınıflamasında T'nin değerlendirilmesinde farklılık vardır. Malignitelerde T primer tümörün yaygınlığına göre değerlendirilmesine karşın özofagus kanserinde tümörün derinliği gözönünde tutularak yapılır, yani tümörün uzunluğunun T'nin değerlendirilmesinde dolayısı ile evreleme ve prognозda etkisi yoktur (23,51,52).

Özofagus kanserinde lenfatik yayılının prognoza etkisi değişkendir. Ancak bölgesel olmayan uzak lenf bezinin metastazı prognozu olumsuz

etkilemektedir. Uzak organ metastazı ise uzak lenf bezı metastazından daha kötü prognoz etkenidir (23,51,52,53).

Histolojik tipin prognoza etkisi T1 tümörler dışında aynıdır. T1 tümörlerde ise adenokarsinomların, yassı hücreli karsinomlara göre daha iyi prognoza sahip olduğu görülmektedir (23). Özofagus kanserinde kadın cinsiyetinin iyi prognoz etkeni olduğunu bildiren yayımlar vardır (54). Hastaya komplet rezeksiyon yapılmış olması da önemli bir prognostik etkendir.

Yukarıda sözü edilen prognostik etkenler göz önünde tutulmasına karşın aynı özellikleri taşıyan özofagus kanserli hastaların prognozlarında farklılıklar vardır. Bu nedenle yeni prognostik etkenler üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Tümör diferansiyasyonu, onkojenler, growth faktörler, proliferasyon belirleyicileri ve tümörün DNA ploidisinin prognoz üzerindeki etkisinin değerlendirilmesine yönelik çalışmalar sürdürmektedir ve veriler arttıkça prognoza olan etkileride netleşecektir (1,6-10,55-58).

II g - FLOW SİTOMETRİ ve SOLİD TÜMÖRLERDE DNA ANALİZİ

Flow sitometri, hücresel özellikleri hızlı ve kantitatif olarak ölçebilen bir yöntemdir. İlk olarak 1965 yılında yöntem tanımlanmış ve 1970'li yıllarda çok parametreli ölçümler yapılmaya başlanmıştır (5).

Günümüzde flow sitometri tekniği ile geniş bir yelpazede hücrenin içerik ve özelliklerinin değerlendirilmesi olasıdır. Hücrenin yapısal özellikleri, DNA, RNA ve çeşitli protein içerikleri ölçülebilirken hücrenin metabolizması hakkında bilgi veren intrasellüler pH, intrasellüler kalsiyum düzeyi değişikliklerini de flow sitometri ile saptamak olasıdır (Tablo I) (3,5,59).

Flow sitometri hızlı ve istatistiksel doğruluğa sahip bir yöntemdir. Birkaç dakikada hatta daha kısa sürede 10.000-100.000 arasında değişen hücreyi ya da nükleusu tarayabilir. Florokrom ile boyanan partiküllerin kantitatif değerinin saptanması, birkaç parametrenin aynı anda değerlendirilmesi gibi üstünlükleri söz konusudur (5,59,60).

Flow sitometri, süspansiyon durumundaki hücrelerin bir sıvı akımı aracılığıyla sitometri cihazından belirli bir hızda geçişi sırasında tek tek hücrelerin belirli özelliklerinin ölçülmesi temeline dayanan bir yöntemdir. Hücre süspansiyonu mekanik ya da enzimatik ayırmıla yapılır (5,59,60).

Tablo I: Flow sitometri ile ölçülebilen hücresel parametreler

Ekstrensek yapısal parametreler	Ekstrensek fonksiyonel parametreler
- Hücre büyüklüğü	- Membran bütünlüğü
- Hücre biçimleri	- Membran geçirgenliği
- Sitoplasmik granüllerite	- Yüzey elektrik yükü
- Pigment içeriği (hemoglobin, lipofüssin, porfirinler)	- Yüzey reseptörleri
- Protein floresansı	- Mikroviskozite
İntrensek yapısal parametreler	- Endositoz
- DNA içeriği	- Hücre içi reseptörler
- Kromatin yapısı	- Enzim aktivitesi
- RNA içeriği	- DNA sentezi
- Gen dizisi	- Membrana bağlı kalsiyum
- Total protein	- Sitoplazmik kalsiyum
- Yüzey抗原leri	- Hücre içi pH
- Hücre içi抗原ler	- Apoptozis (Programlı hücre ölümü)
- Yüzey şekerleri	

Flow sitometrinin temel özelliklerini basittir. Hücre ya da nukleus gibi partiküllerin arasından en sık olarak laser kullanılarak elde edilen akımlar odaklanarak söz konusu partiküllerin arasından geçirilir. Hücresel özellikler, elektriksel ve optik detektörler aracılığıyla ölçülür. Flow sitometride ölçümler floresans ağırlıklı olduğundan hücreler istenilen parametreye özgü bir ya da daha

fazla florokrom işaretleyici ile boyanır. Bu akımı partiküle, istenen dalga boyuna ya da incelenecuk olan hücre bölümünü örneğin DNA'nın florokrom ile boyanmasına göre ayarlanabilir. Aynı zamanda florokrom boyalar ile boyanmış olan hücrenin bir ya da daha fazla bölümünün aynı anda flow sitometri ile ayrı ayrı değerlendirilmesi olasıdır (5,59).

Flow sitometrik inceleme ile elde edilen veriler depolanarak daha sonra bilgisayar programlarının yardımı ile analiz edilerek histogram biçimine dönüştürülür. Histogramda, vertikal eksen sıklığı, yatay eksen ise değişkenin miktarını belirler (60).

Değerlendirmenin sağlıklı olabilmesi için histogramın kalitesinin kontrolü koşuldur. Histogram dağılıminın kalitesi, G0/G1 pikinin varyasyon kat sayısı olan "coefficient variation" (CV) ile tanımlanır. CV'nin yüksek olması hazırlanan süspansiyonun debritlerle kontaminasyonunu anlamına gelir (59). Bu nedenle, taze dokuda CV değeri beşin ve parafin blokta ise sekizin üzerinde olan DNA histogramlarının katilesinin iyi olmadığı söylenebilir. Bu nedenle alet ilk kullanım için açıldığında test partikülleri kullanılarak CV minimuma ayarlanır. Böylece boyanma ve cihaz ayarının standartizasyonu yapılarak ölçümlein karşılaştırılması kolaylaşır. Özet olarak CV sağlıklı cihaz ayarı ve ölçümün göstergesidir (5,59).

Flow sitometrik çalışmaların klinik ile ilgili olan bölümünün büyük bir çoğunluğunu DNA içeriğinin ölçümü ile proliferatif aktivitenin değerlendirilmesini kapsar. Flow sitometri ile elde edilen DNA histogramı ile hücre siklusunun G1, S ve G2+M fazlarını saptamak olasıdır (5).

Normal insan DNA'sı çift sarmallıdır. Somatik hücreleri 46 kromozom içerir ve diploid olarak tanımlanır. Hücre çoğalması sırasında kendi DNA'sının aynı ikinci bir DNA sentezler. Hücrenin bölünme süreci;

1- Başlangıç fazı (G₁) : Mitoza hazırlık, protein ve RNA sentezi yapılır

2- Sentez fazı (S) : DNA sentezi gerçekleşir

3 -DNA sentezi sonrası : Mitoz öncesi dönemde normal hücrenin iki katı

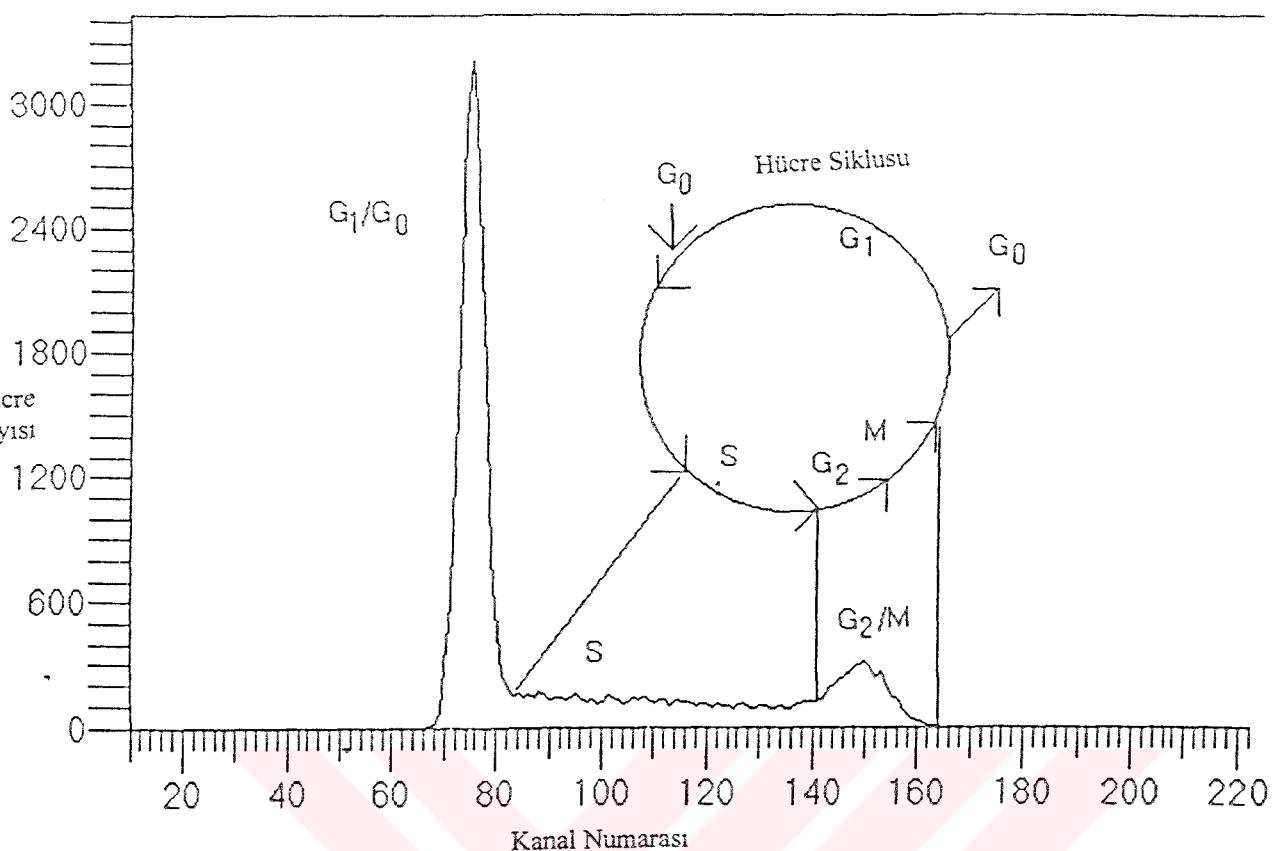
(G₂) DNA vardır yani fazda hücre tetraploidir (4n)

4 - Mitoz fazı (M) : Hücre bölünür ve kendisinin aynı iki hücre oluşur.

Oluşan bu yeni iki hücre ya siklus'a yeniden girer yani G₁ fazına döner ya da dinlenim durumunda yani G₀ fazında kalır.

Flow sitometri tekniği ile hücrenin yukarıda sözü edilen döneminin değerlendirilmesi olasıdır. Bu değerlendirme elde edilen histogramın normal hücrelere ait histogram ile karşılaştırılmasıyla yapılır (Şekil I).

DNA histogramlarında iki temel parametre ölçülebilir. Birincisi, anormal DNA içerikli yani **anöploid DNA'lı** hücrelerin miktarı belirlenebilir. Tümör ploidisi, DNA içeriği gözönünde tutulatar tümör hücrelerindeki G₀-G₁ fazının malign olmayan hücrelerdeki G₀-G₁ ile olan ilişkisi olarak tanımlanabilir.



Şekil 1 : Normal flowsitometrik histogram ve hücre çoğalma siklusu arasındaki ilişki

Diploid olarak tanımlanan tümör hücrelerinin normal hücrelerden DNA içeriği farkının olmadığını yani 46 kromozom içeren hücreler olduğu söylenebilir. DNA indeksi ise; anöploid G0-G1 pikinin kanal numarasının normal hücrelerde G0-G1 pikinin kanal numarasına olan sayısal oranıdır (5,61). Diploid hücrelerin DNA indeksi 1.00'dır. DNA indeksi 1.00'dan büyük ise hiperdiploidi, 1.00'dan küçük ise hipodiploidi, 2.00'den büyük olması durumundaysa tetraploid hücreden sözedilir (62, 63). Eğer DNA histogramında ikinci bir pik var ise bu durumda anöploid hücre populasyonunu sözkonusudur. Anöploid hücre sayısal olarak anormal kromozom içerir. Statik ve flow sitometri kullanılarak yapılan çalışmalarla, DNA'sı anöploid olan tümörlerin prognozu, yalnızca diploid DNA'lı hücrelerden oluşan tümörlerden daha kötü olduğu bildirilmektedir. İkinci önemli parametre, proliferatif aktivite indeksidir. Hücrede, S ve G2+M fazında proliferatif aktivite yüksektir. S-fazındaki hücrelerin yüzdesi (S-faz fraksiyonu, SPF) ya da S ve G2+M fazlarının ortak yüzdesi proliferatif aktivitenin değerlendirilmesinde net bilgiler verir (5,63,64). S-faz fraksiyonu DNA'sı replikasyon halinde bulunan tüm hücre populasyonunu anlatmaktadır. S-faz fraksiyonu histogramda G0/G1 piki ile G2/M piki arasında yer alır. S-faz fraksiyonunun hesaplanması güçtür. Bir histogramda S-faz fraksiyonun hesaplanması için taze dokuda çalışıldı ise CV'nin 5 ve altı, parafin bloktan çalışıldı ise CV'nin 8 ve altı olması koşuldur (2,5,59,65-67). Çünkü hücre süspansiyonundaki debritler arttıkça CV'de artış olmaktadır. Timidin analogu olan bromodeoksiüridin (BUdR) ile boyama yapılarak daha kaliteli DNA histogramları elde edilebilir ve buna bağlı olarak daha kaliteli S-fazı ya da

proliferatif aktivite değerlendirilmesi yapılabilir. S-faz fraksiyonunun, ploidi durumundan daha çok prognozla ilişkili olduğunu bildiren yayınlar vardır (3,62,63,68,69). S-fazının %10 ve altının olduğu tümörlerde prognosun iyi olduğu belirtilmektedir. S-fazının %10'nun üzerinde olduğu tümörlerde ise tümör diploid olsa dahi prognosun kötü olduğu bildirilmekte olan yaynlarda vardır (69). Ancak genel görüş DNA ploidisi ile birlikte değerlendirildiğinde malign hastalıkarda yararlı bir prognostik etken olabileceğidir (2,5,64).

Flow sitometrinin bilinen önemli bir dezavantajı yoktur. Pahalı donanıma gereksinme olması, solid dokularda çalışıldığından tek-hücre ya da tek-nukleus suspansiyonunun hazırlanması sırasında morfolojik yapılarda bozulma olasılığı eleştirilebilir (5,60).

Flow sitometrinin kullanılmaya başladığı 1970'li yıllarda yalnızca taze dokudan hücre süspansiyonu hazırlamak teknik olarak olasıydı. Ancak 1983 yılında Hedley ve arkadaşlarının parafin bloklardan da süspansiyonu hazırlamayı başarmaları ile flow sitometrinin uygulama alanı çok genişleyerek yapılan çalışmaların sayısında da buna paralel olarak artmıştır (5,62,64-66). Çünkü parafin bloklardan alınan kesitler ile uygulama yapılabilmesi; geniş retrospektif serilerde çalışılarak klinik izlem ile karşılaştırma yapılabilmesini, uzun süre sağkalımı olan 10 yıl ve daha üstü olan hastaların ortak özelliklerinin saptanılmasına olanak verir. Ayrıca nadir görülen lezyonların parafin bloklarından yapılacak çalışmalarla sözkonusu lezyonlar hakkında daha çok bilgi sahibi olunmasını sağlar. Bunun yanında pekçok merkezde bu çalışmaların

yapılabilir olması ve sonuçların ana bir merkezde toplanarak daha çok veriyle analiz yapılarak daha net bilgilere ulaşılabilmesini olanaklı hale getirmiştir. Ancak parafin bloklardan elde edilen histogramların taze dokudan hazırlananlara göre kalitesinin iyi olmaması eleştirilebilmekle birlikte hazırlama tekniğine gösterilecek özen ile bu sorunu aşmak olasıdır (5,59,62-66,70).

Solid tümörlerde flow sitometrinin klinik kullanım alanları,

- 1- Morfolojik belirsizliğin olduğu durumlarda malignite tanısında
- 2- Grade ve evreden bağımsız olarak прогнозda
- 3- Sınırda malignitesi olan lezyonların alt sınıflandırılması
- 4- Tedaviye yanıtın değerlendirilmesi
- 5- Senkronoz ve metakronoz tümörlerin ayırimıdır (59,64).

Sonuç olarak flow sitometri malignitelerde tanı ve tedavi yanıtının değerlendirilmesinde kullanılan hızlı, kaliteli ve aynı anda pekçok parametrenin değerlendirilebildiği bir yöntemdir.

III - MATERİYAL ve METOD

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'nda 1993- 1998 yılları arasında özofagus, hipofarinks ve kardia kanseri tanıları ile opere edilen ve izlenen, parafin bloklarına ulaşılabilen 85 hastaya ait patoloji arşiv materyalinde flow sitometri tekniği kullanılarak DNA analizi ve proliferatif aktivite ölçümü yapıldı. Parafin blokların seçiminde flow sitometri ile çalışmasına uygun yani en az %50 tümör ve minimal debride sahip bloklar olmasına özen gösterildi. Değerlendirilebilir histogram elde edilen 52 olgu çalışmaya alındı. Hastaların klinik ve patolojik özellikleri Tablo II'de görülmektedir. Çalışmada yer alan hastaların tamamına küratif cerrahi girişim uygulanmıştır.

Arşiv materyali parafin bloklarda heterojeniteyi önlemek amacıyla DNA analizi için doku kesiti alınmadan önce hematoksilen-eozin ile boyanan kesitler değerlendirildi ve mikroskopik olarakta en az %50 tümör dokusu içeren bloklarda çalışma gerçekleştirildi.

Flow sitometrik DNA analizi A.Ü.T.F. Tıbbi Onkoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi . Analiz, Hedley ve arkadaşlarının yöntemi modifiye edilmesi

Tablo II : 52 hastanın klinik ve patolojik özelliklerı

Parametre	Sayı	%
Yaş (ortalama ve dağılım)	56.8 (31-75)	
Cins (Kadın / Erkek)	21 /31	40.4 / 59.6
Tümör lokalizasyonu		
Hipofarinks Ca	7	13.5
Özofagus Ca -1/3 üst	6	11.5
-1/3 orta	20	38.5
-1/3 alt	12	23.1
Kardia Ca	7	13.5
Histopatolojik özellik - Yassı hücreli karsinom	44	84.6
- Adenokarsinom	8	15.4
Grade -iyi differansiyel	21	40.4
-orta differansiyel	26	50.0
- kötü differansiyel	5	9.6
Tümörün derinliği -T2	16	30.8
-T3	31	59.6
-T4	5	9.6
Lenf Bezi metastazı -N0	19	36.5
-N1	33	63.5
Evre II	20	38.5
Evre III	30	57.7
Evre IV	2	3.8

ile oluşturulmuş yöntem kullanıldı. Parafin bloklardan 50 µm kalınlığında 5-6 kesit alınarak 15 milimetrelük cam tüplere konuldu ve aşağıda tanımlandığı biçimde hücre (çekirdek) süspansiyonu hazırlandı.

Deparafinizasyon ve Rehidrasyon İşlemi :

- 1 - Her tüpe 10ml xylene eklenerek oda ısısında 10 dk bekletildikten sonra xylene aspire edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
- 2 - Tüplere %100 konsantré etanolden 10 ml eklendi ve oda ısısında 10 dk bekletildi. Etanol aspire edildikten sonra % 100, % 95, %70 ve %50'lik solüsyonları ile aynı işlem yinelendi.
- 3 - Etanol aspire edildikten sonra tüplere distile su konularak oda ısısında bir gece bekletildi.

Hücre Süspansiyonunun Hazırlanması :

- 1 - Tüpler santrifüj edilerek doku parçacıkları çöktürüldü ve distile su aspire edildi.
- 2 - Tüplere 10 ml phosphate-buffered saline (PBS) eklenerek 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- 3 - Doku makası ile doku parçacıkları mekanik olarak ayrıldı.
- 4 - Tüplere 1 mg/ml konsantrasyonda proteaz (Sigma tip XXIV) solüsyonundan 1ml eklendi. Karışım 37 C'de 30-60 dk enkübe edildi.

Enkübasyon sırasında tüpler her 5 dk'da bir elde çalkalanarak hücrelerin dokudan ayrılması sağlandı.

5 - Her tüpe 2 ml soğuk PBS eklendi ve 37 µm filtreden süzülderek tek hücre süspansiyonu hazırlandı.

6 - Tüpler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek üstte kalan sıvı bölüm aspire edildi.

7 - Tüplere tekrar 2 ml PBS eklenderek birinci aşamadaki santrifüj ve aspirasyon işlemi yinelendi.

8 - Tüplere 1 ml tripsin tampon solüsyonu eklendi

DNA Boyaması :

1 - Tüpler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek üstte kalan sıvı bölüm aspire edildi.

2 - DNA boyama işleminde Cycles TEST PLUS, Becton Dickinson ticari kiti kullanıldı. Tüplerin dibindeki hücrelerin üzerine 250 µl trypsin buffer (A çözeltisi) eklenderek 10 dk enkübe edildi.

3 - A çözeltisini atmadan üzerine 200 µl trypsin inhibitör + ribonükleaz (B çözeltisi) eklenderek 10 dk enkübe edildi.

4 - B çözeltisini atmadan üzerine 200 µl propidium iyodür + spermin tetrahidroklorür (C çözeltisi) eklendi ve buzdolabında 10 dk karanlıkta bekletildi.

5 - Enkübasyondan sonra karışım 50 μm filtreden süzüldü ve ardından flow sitometrik analiz tüpüne alındı ve analiz hemen yapılamayacaksa yapılmıcaya kadar buzdolabında karanlıkta saklandı.

Flow Sitometrik Analiz :

Hücre DNA içeriği ile orantılı kırmızı nükleer floresans, Becton Dickinson FacScan marka flow sitometride ölçüldü. Örnek analizinden önce floresans referans boncuklar ($2\mu\text{m}$) ile cihaz kalibre edildi. Propidium iyodür floresans 488 nm'de argon laser ile uyarıldı. Her örnektten en az 10-15 bin çekirdek sayıldı.

DNA Histogramlarının Yorumlanması :

Histogramların yorumlanmasında CV değerleri dikkate alındı. CV'si sekizden küçük olan ve tek bir G_{0,1} piki içeren histogramlar "diploid" olarak yorumlandı. CV'si 11'den büyük olan histogramlar ya değerlendirme dışı bırakıldı ya da yeni kesitler alınarak ölçümler yenilendi.

Anöploid histogramda, ikinci pikin toplam sayımının en az %10'unu içermesine, diploid pikten net olarak ayırt edilmesine ve anöploid G_{0,1} pikine karşılık gelen G_{2-M} piki bulunmasına dikkat edildi. Çalışmada yer alan olgulara ait diploid (Şekil 2) ve anöploid (Şekil 3) histogram örnekleri görülmektedir.

Ploidi değerlendirilmesinde DNA indeksi (DI) kullanıldı. DNA indeksi aşağıdaki formülle hesaplandı :

$$DI = \frac{\text{Anöploid } G_{0,1} \text{ pikinin kanal numarası}}{\text{Diploid } G_{0,1} \text{ pikinin kanal numarası}}$$

Diploid $G_{0,1}$ pikinin kanal numarası

$DI = 1.00 \pm \%10$ olduğunda, histogram diploid olarak değerlendirildi.

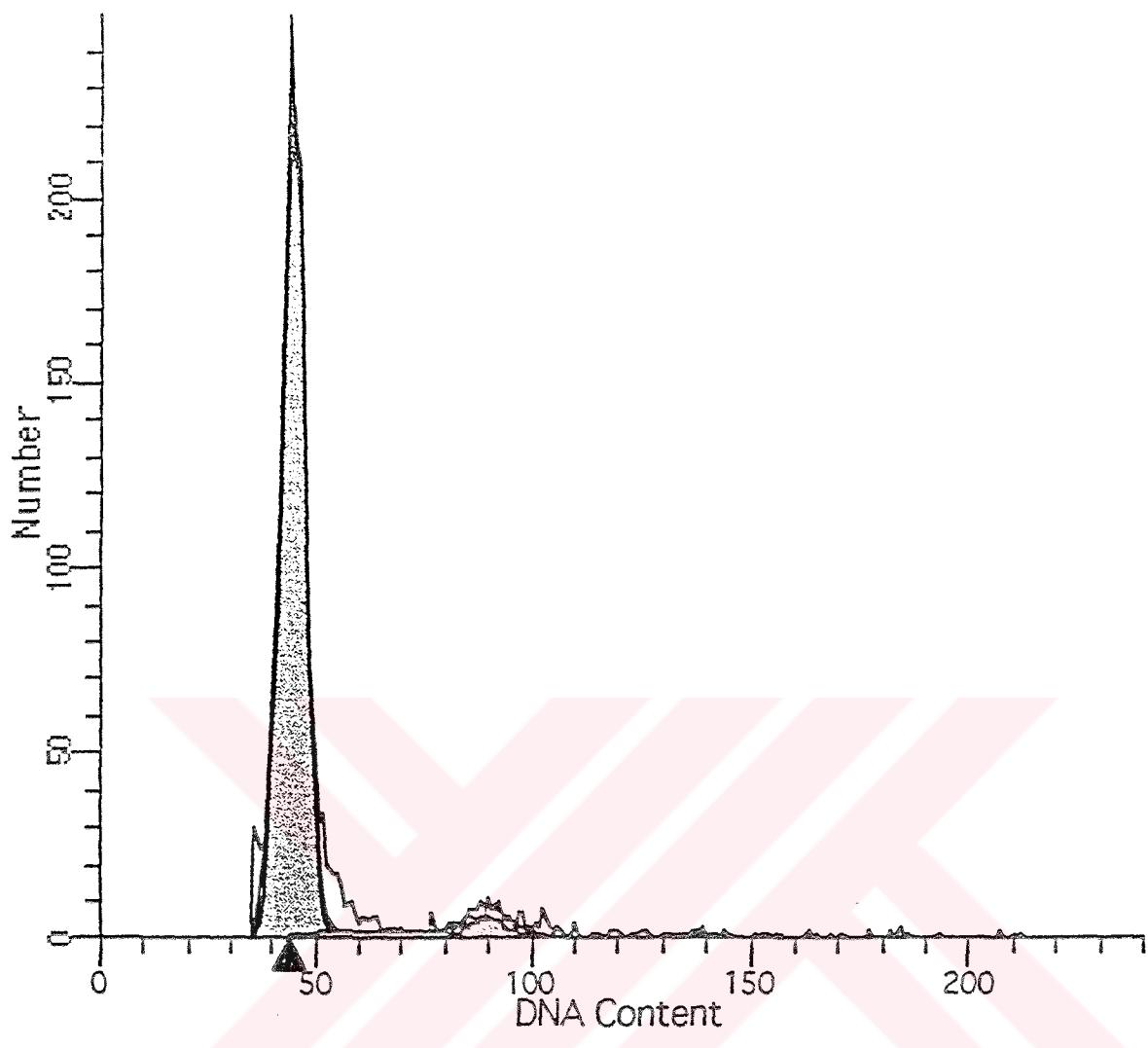
Anöploid histogramlarda birinci pik, diploid pik olarak kabul edildi.

Hücre Siklus İstatistikleri :

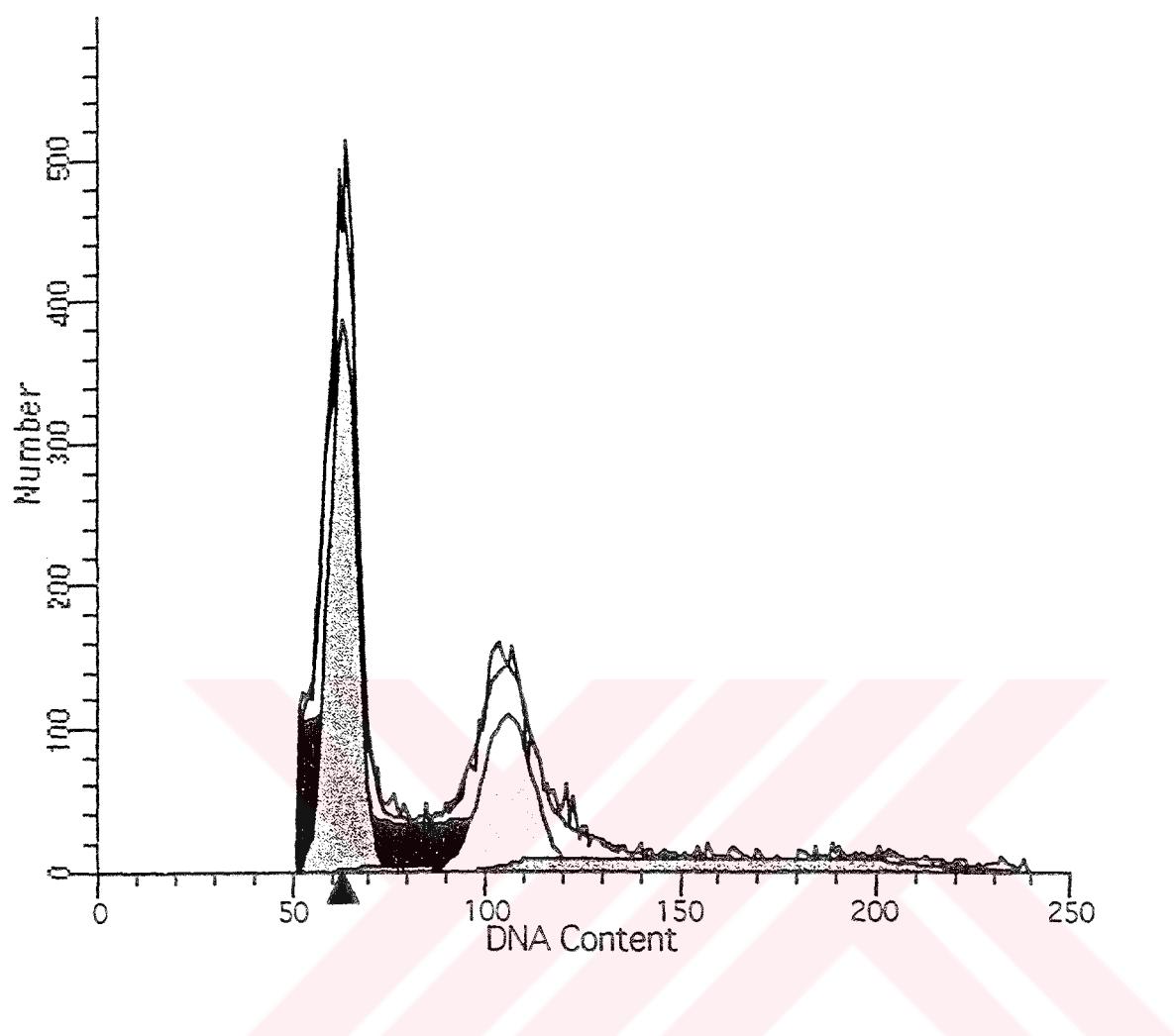
Histogramların hücre siklusuna ilişkin istatistikleri ($G_{0,1}$ pik, S-fazı, G_2-M pikine ait) BD tarafından üretilen CELLFIT yazılım programı kullanılarak hesaplandı. S-faz fraksiyonları diploid piklerde RFIT ve SOBR modelinde, anöploid piklerde ise POLYNOMINAL modelinde ya da anöploid pik gate edilerek diploid halde RFIT modelinde hesaplandı. CV'si sekizin üzerinde olan pikler güvenilir olmayacağı için S-faz fraksiyonları hesaplanmadı.

İstatistik Analiz Yöntemleri :

Gruplar arası farkın önem kontrolünde Ki-kare testi kullanıldı. Sağkalım analizlerinde ise log-rank ve Breslow testleri uygulandı.



Şekil 1 : Hastalarımızdan diploid histogram örneği



Şekil 1 : Hastalarımızdan anöploid histogram örneği

IV - BULGULAR

Hipofarinks, özofagus ve kardia kanserli hastaların operasyon materyallerinden patolojik değerlendirme için hazırlanan ve en az yarısını tümör dokusunun oluşturduğu parafin bloklardan elde edilen kesitlerde flow sitometri (FCM) tekniği ile DNA analizi yapıldı. Bu inceleme sonucunda 17 (%32.7) olguda anöploid histogram örneği elde edilirken 35 hastada diploid histogram örneği izlendi. Her iki grup yaş, cins, tümör lokalizasyonu, histopatolojik özellik, grade, tümör derinliği, lenf bezı metastazı, evre ve sağkalım süreleri gözönünde tutularak karşılaştırılmış olarak değerlendirildi.

a - DNA Ploidi Durumu ve Yaş

	Sayı	Ortalama yaşı
Anöploid	17	56.88
Diploid	35	56.85
Tüm olgular	52	56.87

Çalışmada anöploid histograma sahip olan 17 olgunun yaşıları 31 ile 71 arasında değişmekte ve yaş ortalaması 56.88 ± 12.36 olarak saptandı. Diploid grupta yer alan 35 olgunun ise yaşıları 37 ile 75 arasındaki ve ortalama yaş 56.85 ± 11.09 olarak hesaplandı. Her iki grup hastaların yaşı gözönüne tutularak değerlendirildiğinde istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

b - DNA Ploidi Durumu ve Cins

	Kadın		Erkek	
	Sayı	%	Sayı	%
Anöploid	11	64.7	6	35.3
Diploid	10	28.6	25	71.4
Tüm olgular	21	40.4	31	59.6

Anöploidi grupta 17 hastanın 11 (%64.7)'ini kadın hasta, altısını (%35.3) erkek hasta oluşturmaktaydı. Oysa diploid grupta 10 (%28.6) kadın, 25 (%71.4) erkek hasta vardı. Her iki grubun cins dağılımı gözönünde tutulduğunda istatistik olarak anlamlı ($p<0.05$) bir dağılım sözkonusuydu. Bu sonuçtan yola çıkarak çalışmamızda kadınlarda anöploidi örneği daha sık gözlenmektedir sonucuna varıldı.

c - DNA Ploidi Durumu ve Tümör Lokalizasyonu

	Hipofarinks		Özofagus		Kardia	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Anöploid	0	0	2	11.8	7	41.2
Diploid	7	20	4	11.4	13	37.1
Tüm olgularda	7	13.5	6	11.5	20	38.5
					12	23.1
					7	13.5

Çalışmada yer alan hastaların yedisi (%13.5) hipofarinks, altısı (%11.5) üst 1/3 özofagus, 20 (%38.5)'si orta 1/3 özofagus, 12 (%23.3)'si alt 1/3

özofagus kanseri ve yedi (%13.5) olguda kardia kanseriydi. Anöploidi saptanan hastaların ikisinde (%11.8) üst 1/3 özofagusda lokalize karsinom saptanırken orta ve alt 1/3 özofagusun herbirinde yedi (%41.2) olgu yer aldığıni gözlemledik. Anöploid grupta hiç hipofarinks kanserli hasta yokken yalnızca bir (%5.9) kardia kanseri vardı. Diploid grupta ise serinin tüm hipofarinksli hastaları yani yedi (%20) hasta yanı sıra özofagus kanserli üst, orta ve alt 1/3 sıra ile dört (%11.4), 13 (%37.1), beş (%14.3) olgu ve altı (%17.1) kardia kanserli hasta yer almaktaydı.

Anöploid ve diploid hasta gruplarının tümör lokalizasyonlarına göre dağılımı istatistik olarak değerlendirildiğinde anlamlı ($p>0.05$) olarak saptanmamakla birlikte yedi hipofarinks kanserli hastanın tamamının diploid grupta yer almış olması ve kardia kanserli yedi olgunun altısında yine diploid örnek göstermesi ilgi çekiciydi.

d - DNA Ploidi Durumu ve Histopatolojik Özellik

	Yassı hc Ca		Adeno Ca	
	Sayı	%	Sayı	%
Anöploid	15	88.2	2	11.8
Diploid	29	82.9	6	17.1
Tüm olgular	44	84.6	8	15.4

Çalışmada yer alan yedi hipofarinks kanserli hastaların tamamı, özofagus kanserli 38 hastanın 37'si yassı hücreli karsinom, özofagus kanserli

bir olgu ve kardia kanserli sekiz hastanın tamamı adenokarsinomdu. Tüm olguların 44 (%84.6)'ü yassı hücreli karsinomken sekizi (%15.4) adenokanser tanısı almıştı. Sözkonusu hastalarda histopatolojik özellik ve DNA ploidisi arasındaki ilişki değerlendirildiğinde anöploid grupta 15 (%88.2) yassı hücreli karsinom, iki (%11.8) adenokarsinom yer alırken diploid dağılımı olan hastaların 29 (%82.9) yassı hücreli kanser, altısı (%17.1) adenokarsinomdu. Bu sonuçlar gözönünde tutulduğunda DNA ploidisi ile histopatolojik özellik arasında anlamlı istatistiksel fark yoktu ($p>0.05$).

e - DNA Ploidi Durumu ve Grade

	İyi Dif.		Orta dif.		Kötü dif.	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Anöploid	3	17.6	12	70.6	2	11.8
Diploid	18	51.4	14	40.0	3	8.6
Tüm olgular	21	40.4	26	50.0	5	9.6

Çalışmada yer alan 52 hastanın patolojik değerlendirmesinde 21 (%40.4)'i iyi differansiyeli, 26 (%50.0)'sı orta derecede differansiyeli ve beşi (%9.6) ise kötü derecede differansiyeli olarak rapor edilmişti. Anöploid grupta, üç (%17.6) iyi, 12(%70.6) orta ve iki (%11.8) kötü derecede differansiyasyon gösteren tümör sözkonusu iken diploid grupta 18(%51.4) iyi, 14 (%40.0) orta ve üç (%8.6) kötü derecede differansiyasyon gösteren tümör izlendi. Bu

dağılım istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmemekle birlikte ($p>0.05$) iyi derecede differensiye 21 hastanın 18 (%85.7)'nin diploid grupta yer alması dikkat çekicidir, oysa aynı oranlar diğer iki differansiyasyon için geçerli değildi.

f- DNA Ploidi Durumu ve Tümör Derinliği

	T ₂		T ₃		T ₄	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Anöploid	9	52.9	8	47.1	0	0
Diploid	7	20.0	23	65.7	5	14.3
Tüm olgular	16	30.8	31	59.6	5	9.6

Çalışmada yer alan 52 hasta içerisinde T₁ tümörlü hasta yoktu. Hastaların 16 (%30.8)'sında muskularis propria invazyonu (T₂), 23 (%65.7)'ünde adventisya invazyonu (T₃) ve beşinde çevre organlara infiltrasyon (T₄) sözkonusuuydu.

Anöploid grupta dokuz (%52.9) olguda T₂, sekizinde (%47.1) ise T₃ varken T₄ tümörlü hasta yer almamaktaydı. Diploid grupta ise yedi (%20.0) T₂, 23 (%65.7) T₃ ve beş (%14.3) T₄ tümörlü hasta bulunmaktaydı.

Anöploid grupta yer alan hastaların çoğunuğunun T₂ tümör olması ve hiç T₄ tümörlü hastanın olmaması yanında diploid grubun çoğunuğunun T₃ tümör olması ve tüm T₄ tümörlerin diploid grupta yer alması istatistik açıdan farklıydı ($p<0.05$).

g - DNA Ploidi Durumu ve Lenf Bezi Metastazı

	Lenf bezi metastazı yok		Lenf bezi metastazı var	
	Sayı	%	Sayı	%
Anöploid	7	41.2	10	58.8
Diploid	12	34.3	23	65.7
Tüm olgular	19	36.5	33	63.5

Özofagus kanserli 52 hastanın 19 (%36.5)'unda lenf bezi metastazı olmamasına (No) karşın 33 (%63.5)'ünde lenf bezi metastazı (N₁) saptandı. Anöploid grupta yer alan 17 hastanın yedisi (%41.2) No, kalan 10 (%58.8)'u ise N₁'di. Diploid grupta yer alan hastaların ise 19 (%36.5)'u No, 33 (%63.5)'ü ise N₁'di. İstatistik olarak değerlendirildiğinde lenf bezi tutulumunda anöploid ve diploid grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

h - DNA Ploidi Durumu ve Tümör Evresi

	Evre 2		Evre 3		Evre 4	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Anöploid	10	58.8	6	35.3	1	5.9
Diploid	10	28.6	24	68.6	1	2.9
Tüm olgular	20	38.5	30	57.7	2	3.8

Çalışmamızda hastaların tümör evreleri Japon Kanser Komitesi'nin düzenlediği TNM sistemine göre yapılmıştır. Hastaların 20 (%38.5)'si evre II (T₂N₀M₀ ya da T₃N₀M₀ ve T₁N₁M₀ ya da T₂N₁M₀), 30 (%57.7)'u evre III (T₃N₁M₀ , T₄N₀M₀ , T₄N₁M₀) ve ikisi (% 3.8) evre IV (HerTherNM₁)'tü . Evre IV tümörlü hastaların preoperatif metastaza ait uzak sistem araştırmaları negatifti. Ancak operasyonda akciğerde milimetrik nodüller saptanmış ve frozen çalışlığında malign rapor edilen hastalardır. Sözkonusu bu hastalara en azından pasajı sağlamak amacıyla rezeksiyon gerçekleştirilmiştir.

Anöploid grupta 10 (%58.8) hasta evre II, altısı (%35.3) evre III ve bir (%5.9) hastada evre IV olarak değerlendirildi. Diploid grupta ise 10 (%28.6) evre II, 24 (% 68.8)'ü evre III ve bir (%2.9) hastada evre IV tümör vardı. Her ne kadar sözkonusu iki gruptaki dağılımlar istatistik olarak p>0.05 (p=0.07) olması nedeniyle anlamlı fark kabul edilmemekle birlikte anöploidi tümörlerin %58.8 (n=10)'ini evre II, diploid tümörlerin ise % 68.6 (n=24) evre III olması dikkat çekiciydi.

I - DNA Ploidi Durumu ve S-fazı fraksiyonu

	Olgu Sayısı	S-faz Fraksiyonu
		Ortalama (%)
Anöploid	15	10.5 \pm 6.29
Diploid	32	9.75 \pm 6.82

Çalışmada yer alan 52 hastanın 47'sinde S-fazı (%) değerlendirilebildi. Sözkonusu 47 hastanın 15'i anöploid, 32'si ise diploid gruba ait hastalardı. Anöploid grupta yer alan hastaların S-faz fraksiyonları 1.68 ile 21.5 arasında değişmekte ve ortalama S-fazı fraksiyonu 10.5 ± 6.29 'du. Diploid grupta ise S-fazı 0 ile 24.1 arasında değişmekte ve ortalama S-fazı fraksiyonu 9.75 ± 6.82 olarak bulundu. S-fazı fraksiyonu anöploid grupta daha yüksek olmasına karşın istatistik olarak fark anlamlı değildi ($p>0.05$). Ancak diploid grupta yer alan ve S-fazı değerlendirilebilen 32 hastanın başında (%15.62) S-fazı sıfır olarak saptanmasına karşın anöploid DNA örneği olan hastaların hiçbirinde sıfır olmaması ilginçti.

j - DNA Ploidi Durumu ve Proliferasyon İndeksi

	Olgı Sayısı	Proliferasyon İndeksi ortalama (%)
Anöploid	15	12.50 ± 7.26
Diploid	32	11.29 ± 7.19

Çalışmada yer alan 52 hastanın 47'sinde proliferasyon indeksi ölçülebildi. Hastaların 15'i anöploid gruba, 32'si diploid gruba ait hastalardı. Anöploid grupta yer alan hastaların proliferasyon indeksi 2.03 ile 25.7 arasında değişmekte ve ortalama 12.50 ± 7.26 'ydı. Diploid grupta ise sıfır ile 27.3 arasında değişmekte ve ortalama 11.29 ± 7.19 olarak saptandı. Anöploid grubun

proliferasyon indeksi daha yüksek olmakla birlikte bu fark istatistik olarak ($p>0.05$) anlamlı değildi.

k - DNA Ploidi Durumu ve Sağkalım

Bu çalışmada yer alan hastalar A.Ü.T.F. Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'ndan Ökten'in hipofarinks, özofagus ve kardia kanserli 720 olguluk serisinin Patoloji Anabilim Dalı arşivinden parafin bloklarına ulaşılabilen ve bunlar içersinde FCM teknüğine uygun olanlar seçilerek çalışma gerçekleştirilmiştir.

Bu 720 olguluk seride hastaların 457'sine rezeksiyon uygulanmıştır. Sözkonusu hastaların %3.71 (n: 17)'inde anastomoz yetmezliği ve bunun sonucunda sepsis nedeniyle eksitus olurken % 3.75 (n:27) oranında fistül dışı nedenlerle yani kardiak ve pulmoner yetersizlik, serebral emboli, toksik hepatit, böbrek yetmezliği gibi komplikasyonlar sonucu ölüm olmuştur. Tüm seride yer alan 720 olguda ise mortalite %6.11 (n:44)'dir.

Çalışmada yer alan 52 hastanın, 11 (%20.3)'i operatif dönemde böbrek yetmezliği, sepsis, kardiak ve pulmoner yetersizlik nedeniyle eksitus olmuştu. Sözkonusu hastaların beşi (%29.4) anöploid, altısı (%17) diploid grupta yer alan hastalardır. Anöploid tümörlerde ölüm oranın diploid gruba göre daha yükseldi. Ancak çalışmanın planlanmasında olguların seçiminde hastalara ait parafin bloklarına ulaşılması ve ulaşılabilen bloklarda FCM teknüğine uygunluğu gözönünde tutulmuştur. Bu nedenle çalışmada elde edilen özellikle

operatif mortalite ve sağkalım oranları kliniğimiz özofagus kanserlerinin profilini yansıtmadır. Sözkonusu değerler diploid ve anöploid grup arasındaki farkı vurgulamakla sınırlı olduğu gözönünde tutulmalıdır.

Hastalarda üçünün bir süre sonra kontrollere gelmemesi nedeniyle bu hastalar sağkalım değerlendirilmesinden çıkarılmıştır.

İzlem sırasında anöploid grupta üç hasta, 5., 7. ve 19. aylarda, diploid grupta ise sekiz hasta 5 ve 40. aylar arasında değişen sürelerde nüksler sonucu kaybedilmiştir. Ayrıca anöploid grupta yer alan bir hasta ise anastomoz hattında gelişen striktürün palyasyonu için yerleştirilen stentin torasik mideyi perfore etmesi sonucunda mediastinit nedeniyle kaybedilmiştir.

Anöploid grupta 11 hasta diploid grupta ise 27 hasta olmak üzere toplam 38 hasta 6 ile 57 ay arasında takiptedirler ve bu hastaların son kontrollerinde nüks saptanmamıştır. Hastalarımızın sağkalım süreleri göz önünde tutulduğunda anöploid grupta ortalama süre 27.49 ay (median:19 ay), diploid grupta ise 32.13 ay (median:31.0 ay)'dır. Her iki grup arasındaki fark istatistik olarak anlamlı olmamakla birlikte diploid grupta yer alan hastaların sağkalımının daha uzun olduğu görülmektedir.

V - TARTIŞMA

Kanserli hastanın prognozunu büyük oranda histolojik tanı, tümörün evresi, tümörün malign potansiyeli ve bireyin performansı belirler (3,4). Tümörün biyolojik malign potansiyelini tanımlarken hücre düzeyinde tümör hücresi DNA farklılıklarını, büyümeye kinetiği, hormon reseptör varlığı önemlidir. Kantitatif sitolojik bir yöntem olan flow sitometri (FCM) ile hücrenin farklı aşamalarını ya da normal hücre ile proliferatif olan tümör hücrelerini kantitatif olarak değerlendirmek olasıdır (3,4). FCM tekniği ile herhangi bir hücrenin yapısal, moleküler, biyofizik ve fonksiyonel özelliklerini çok hızlı (100.000 hücre/sn) ve kantitatif olarak öğrenilebilir. Sitogenetik çalışmalarında olduğu gibi sitometrik bir yöntem olan FCM ile tümör davranışları hücresel düzeyde incelenerek, tümörün davranışıyla ilgili önemli ipuçları elde edilebileceği düşüncesinden yola çıkmış ve pek çok kanser tipinde bu çalışmalar gerçekleştirilmiştir ve hücrenin davranışının belirlendiği DNA içeriğinde belirli oranlarda anormallikler saptanmıştır (2,3,4,5,56,64,69,71-80).

Flow ve statik sitometri yöntemleri ile DNA analizi çalışmalarının sayısında özellikle solid tümörlerde son iki dekatta artış gözlenmektedir. Hematolojik malignitelerin tanısında ve tedavisinde de FCM geniş kullanım alanı bulmuştur (3,4,5,59). Solid tümörlerdeki çalışmalar bu alana göre yenidir. Solid tümörlerde FCM morfolojik olarak maligniteden kuşkulanan yapıların tanısında, "grade"ten ve evreden bağımsız olarak prognozun

tahmininde, sınırlı malignitelerin alt sınıflandırılmasında, tedaviye yanıtın izlenmesinde, metakronoz ve senkronoz tümörlerin ayrılmada klinik kullanım alanı bulmuştur (59,64,68,71,78). Ancak söz konusu bu çalışmalar arasında farklı sonuçlar hatta aykırılıklar olduğu da bir gerçektir.

Bunun yanında meme, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, kolon, renal hücreli karsinoma, mesane, prostat, over, endometrium kanserlerinde ve melonomada anöploidi kötü прогноз ile ilişkilendirilmektedir. Yüksek S-faz fraksiyonu ise meme, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, kolon, glial tümörler ve over kanserlerinde прогнозla ilişkili olduğunu bildiren yayınlar vardır (2,3,4,5,64,69,71,72,74-78,81)

Özofagus kanserinde çok olmamakla birlikte FCM çalışmaları vardır. Bu çalışmalarında DNA anöploidi sıklığı %57-80 arasında değişmektedir (6,7,9,10,82-87). Bizim çalışmamızda, 52 hasta yer almaktaydı ve anöploidi sıklığı %32.7 (n=17)'di. Olgularda anöploidi sıklığının daha az oranda saptanmış olması tümör heterojenitesinden kaynaklandığı düşünülebilir, ancak çalışma planlanırken tümör heterojenitesi gözönünde tutuldu ve tümör içeren parafin bloklardan iki ya da daha fazla örnek alındı. Bu etkenin minimale indirgenmesi amaçlandı.

DNA ploidi durumu ile yaş arasındaki ilişki değerlendirildiğinde çalışmada anöploid grupta 56.88 ± 12.36 , diploid grupta ise 56.85 ± 11.09 bulunmuştur. Her iki grup arasında yaş farkı olmaması diğer çalışmaların

sonuçlarına benzerdir (6,7,9,10,82-87). Özofagus kanserinin ileri yaşta görülen bir hastalık olması ile paralellik göstermektedir.

DNA ploidi durumu ile cins arasındaki ilişki ele alındığında, diploid grubu %28.6 oranında kadın hastalar, %71.4 erkek hastalar oluşturuken anöploid grupta %64.7 kadın hasta, %35.3 erkek hasta oluşturmaktaydı ve istatistik olarak anlamlı bir farktı . Roul (10), Jin-ming (83) ve İkebe (86) DNA ploidi durumunun cins ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir. Sugimachi (54) 'nin 1987 yılında yapmış olduğu çalışmada ise özofagus kanserli kadın hastalarda diploidi oranının anöploidiye göre kısmen daha yüksek olduğunu belirtmiş ve kadın hastaların прогнозunun daha iyi olmasına ilişkili olabileceğini bildirmiştir. Bunun yanı sıra kolorektal kanserlerde erkeklerde anöploidinin sikliğinin daha yüksek olduğunu bildiren yaynlarda vardır (67). Bizim bulgularımız özofagus kanserinde anöploidinin kadın hastalarda yüksek olduğunu göstermektedir.

DNA ploidi durumunu ile tümörün lokalizasyonu arasındaki ilişki hipofarinks düzeyinden kardiaya kadar değerlendirdiğimizde anlamlı bir dağılım saptamamamıza karşın çalışmada yer alan tüm hipofarinks kanserlerinin diploid grupta yer olmasının dikkate değer olduğu ve daha çok hasta içeren gruplarda değerlendirilmesi ile konunun daha da netleşebileceği düşünülmektedir. FCM çalışmalar göz önünde tutulduğunda bu biçimde geniş yelpazede değerlendirmeye rastlanmadı.

DNA ploidi durumu ile histopatolojik tanı arasındaki bağlantıyı değerlendirmek için çalışmaya yedi kardia, bir alt 1/3 özofagus kanseri olmak üzere sekiz adenokanserli hasta da alındı. Anöploid grubun %88.2'si yassı hücreli kanser, %11.8'i adenokanserdi, diploid grubun ise %82.9 yassı hücreli kanser, %17.1'i adenokanserdi. İki grup arasında histopatolojik tanı açısından benzer dağılım söz konusu oldu. Histopatolojik gruplar temel alınarak değerlendirildiğimizde, yassı hücreli kanserlerin %34'ü anöploid, %66'sı diploid, adenokanserlerin ise %25'i anöploid, %75'i diploid idi. Bu dağılımda yassı hücreli ve adenokanserler arasında ploidi oranlarında istatistik anlamlı fark olmadığı göstergesidir. Bu sonuctan yola çıkarak diğer malignitelere ait çalışmalarında olduğu gibi özofagus kanserinde de her iki histopatolojik tipi içeren grplarda çalışma yapmak olasıdır.

Klasik differansiyasyon sistemlerinin prognoz ile ilişkisi bilinmektedir. Ancak tek başına özofagus kanserlerinde kesin olarak yeterli değildir yani diferansiyasyon derecelendirmesinin sınırlı bir prognostik değeri vardır (1,11,23). Grade ile DNA ploidi durumu karşılaştırıldığında Böttger (8)'in yayınında bildirmiş olduğu gibi istatistik olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Ancak Roul (10), Porschen (85), İkebe (86) ve Jin-ming (83)'in yayınılarında belirttikleri sonuçlara benzer biçimde iyi differansiyeli tümörlerin %85'ini diploid örnek gösteren hastalar oluşturmaktaydı.

Özofagus kanserinin TNM sınıflandırmasında T tümörün özofagus duvarını invaze ettiği derinliğe göre belirlenir ve uzunluğundan bağımsızdır (11,23,51). Özofagus duvarının invazyon derecesi hem operabilitenin hemde prognozun değerlendirilmesinde önemli bir etkendir (23,51,52). DNA ploidi durumu ve tümör derinliği arasındaki bağlantıyı değerlendiren yaynlarda farklı sonuçlar vardır. Porschen (85), DNA ploidisi ile tümörün invazyon derinliği arasında anlamlı bir korelasyon olduğu çünkü anöploid tümörlerde T₁ oranı %20 iken, T₄ tümörlerde %69 gibi yüksek oranda olduğunu bildirmiştir. Matsuura (57,58), Jin-mign (83), Ohno (84), ve Minu (1) 'nun bu görüşü destekleyen yaynları vardır. Roul (10) ve Doki (7) ise böyle bir ilişkiye saptamadıklarını bildirmektedirler. Çalışmamızda yer alan hastalar içersinde ne yazık ki ne karsinoma in-situ (Tis) ne de lamina propriaya ya da submukozaya kadar yayılım (T₁) olan hasta yoktu. Bir başka deyişle hastalarımızın tamamı geç dönem hastaneye başvuran hastalardı. Bunun sonucu olarak hastaların 16'sı T₂, 31'i T₃ ve beşi T₄ tümörü olan hastalardı. Anöploid grubun %52.9 (n=9)'u T₂, %47.1 (n=8)'i T₃ tümör iken T₄ tümör bu grupta yoktu. Diploid grupta ise %20.0 (n=7) T₂, %65.7 (n=23) T₃ ve %14.3 (n=5) oranında da T₄ tümör vardı. Bu dağılım istatistik olarak değerlendirildiğinde anöploid grupta T₂ tümörün sıklığı ve T₄ tümörlerin tamamının diploid grupta yer alması anlamlı bir fark olarak değerlendirildi. Burada invazyon derinliği ile anöploidi arasında ters bir ilişki söz konusudur. Ancak hastaların çoğunda derin invazyon olduğu anımsanmalıdır. Bununla birlikte tümör kütlesi ve anöploidi arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bazı çalışmalarında örneğin Dinçol (88), infiltratif duktal

karsinomlu meme kanseri olan hastalarında çelişkili sonuçlar bildirirken, Akbulut (67) kolorektal kanserli hastalarda yapmış olduğu çalışmasında bizim çalışmamıza benzer ters bir ilişki saptadığını yayımlamıştır. Bunun yanında anöploidi gösteren özofagus kanserlerinde hiç T4 olmaması bu aşamaya gelen anöploid tümörlerin uzak organ ya da lenf bezi metastazları gibi nedenlerle inoperabil olmasından kaynaklanıyor olma olasılığını akla getirmektedir.

Lenf bezi metastazı diğer tüm malignitelerde olduğu gibi özofagus kanserinde de prognozu olumsuz etkiler. Özofagusun lenfatiklerden zengin yapıda olması çok erken evrelerde dahi bölgesel lenf bezi metastazı hatta uzak lenf bezlerine metastaz yapabilir (9,52,89). DNA ploidisi ve lenf bezi metastazı bağlantısı gözönünde tutulduğunda pekçok yayında anöploid tümörlerde lenf bezi metastazının sık olduğu belirtilmektedir (1,57,58,83). Bunun yanı sıra bağlantının olmadığını bildiren yayınların sayısı az değildir (8,85,86). Çalışmamızda ise yukarıda belirtildiği gibi hastaların geç dönemde hastaneye başvurmuş olmaları ile bağlantılı olabileceğini düşündüren oranlarda lenf bezi metastazı görüldü. Elli iki hastanın 33'ünde yani %63.5'inde lenf bezi metastazı vardı. DNA ploidisi gözönünde tutularak değerlendirildiğinde anöploid grubun %41'inde, diploid grubun %34.3'ünde lenf bezi metastazı yokken, anöploid grubun % 58.8'inde diploid grubun ise %65.7'sinde lenf bezi metastazı gözlendi. Ancak hastaların çoğunda ilerlemiş hastalık olduğundan bu dağılım anlamlı olarak yorumlanmadı.

Özofagus kanserinde tedavinin seçimi, postoperatif takip ve прогноз tahmininde TNM sınıflaması ile yapılan evreleme kullanılmaktadır. Çalışmamızda, Japon Kanser Komitesinin düzenlediği TNM sınıflandırmamasına göre evreleme yapılmıştır. Özofagus kanserinde de evre arttıkça sağkalım oranı azalır. Evre ve DNA ploidisinin arasındaki bağlantının değerlendirilmesinde de farklı görüşler vardır. Porschen (85) diploid kanserlerin evre I ve II (%51) tümörlerde evre III ve IV (%30)'e göre daha yüksek oranda olduğunu bildirirken, Böttger (8) ise böyle bir dağılım saptamadıklarını yayımlamıştır. Çalışmamızda anöploid grubun %58'i evre II, %35.3'i evre III ve %5.9'u evre IV tümör oluştururken diploid grupta %28.6 evre II, %68 evre III ve %2.9 evre IV tümörlü hastadan oluşmaktadır. Böttger (8)'in görüşünü destekler biçimde, bu dağılım istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı olarak bulunmadı.

Proliferatif aktivitenin değerlendirilmesinin DNA ploidi durumuna göre daha önemli olduğunu ve прогнозda daha etken olduğunu belirten görüşler vardır (9,69). FCM'de proliferatif aktivite S-fazı fraksiyonu ve proliferasyon indeksi (S-fazı+G2M) ile değerlendirilmektedir. Ancak flow sitometrik çalışmalarında $CV > 8$ olan histogramlarda S-faz fraksiyonun ve proliferasyon indeksinin güvenilir olmayacağı nedeniyle hesaplanması önerilmemektedir (3,5,59,67). Bu çalışmada 47 hastada S-faz fraksiyonu ve proliferasyon indeksi hesaplanması uygun görüldü. Söz konusu hastaların 15'i anöploid grup, 32'sini diploid gruptan hastalar oluşturmaktaydı. Anöploid grupta S-faz fraksiyonu 1.68 ile 21.5 arasında değişmekte ve ortalaması 10.50 ± 6.29 'du.

Diploid grupta ise 0 ile 24.1 arasında değişmekte ve ortalaması 9.75 ± 6.82 'di.

Proliferasyon indeksi ise anöploid grupta 2.03 ile 25.7 arasında ve ortalama 12.50 ± 7.26 'dı. Diploid grupta ise 0 ile 27.3 arasında değişirken ortalaması 11.29 ± 7.19 olarak saptandı. Anöploid ve diploid gruplar arasında proliferatif aktivitenin değerlendirmesinde farklar çok büyük oranda olmamakla birlikte hem S-fazının hemde proliferasyon indeksinin anöploid grupta yüksek olması, anöploidi gösteren tümörlerin daha fazla proliferatif aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca diploid tümörlerde beş hastada S-fazının sıfır olmasına karşın anöploid tümörlerin hiçbirinde bu durum sözkonusu değildi. Bu anöploid tümörlerin daha yüksek proliferatif aktivitede olduklarını desteklemektedir. Yüksek proliferatif aktivite erken yayılım olasılığını buna paralel olarak artırması da doğaldır.

Özofagus kanserinde ploidi durumunun sağkalım üzerine etkisi konusunda farklı görüşler vardır. Minu ve arkadaşları (1), özofagus kanserinde şu andaki standart prognostik belirleyiciler ile daima önceden tümör davranışını ya da uzun sağkalım süresinin saptanmasının olası olmadığını belirtmektedir. Buradan yola çıkarak özofagus kanserinde mikrospektrofotometrik yöntemle DNA içeriğini değerlendirmiştir. Çalışmalarında erken evre özofagus kanserinde (evre 0) daha çok diploidi gözlerken ileri evre kanserlerde daha çok anöploidi saptadıklarını belirtmekte ve anöploid kanserlerde sağkalımın daha kısa olduğunu saptadıklarını bildirmektedirler. Bu çalışmalarının sonunda Minu ve arkadaşları (1),

anöploid tümörlerde radikal cerrahi, geniş lenf bezı diseksiyonu, sıkı izlem ve ploidi örneklerinin diğer prognostik etkenlerle bir araya getirilmesi ile прогноз tahmin yeteneğimizin artacağı görüşündedirler.

Doki ve arkadaşlarının (7) 103 hastada flow sitometri ile yapmış olduğu çalışmanın sonucu da, Minu ve arkadaşının (1) sonuçlarına paralellik göstermektedir. Doki (7), 5 yıllık sağkalımı diploid tümörlerde %46, anöploid tümörlerde ise %20 olduğunu belirttikten sonra DNA ploidi durumunun, özofagus yassi hücreli kanserinde прогноз belirleyici olarak kullanılabilceğini bildirmiştir.

Matsuara'nın 1985 ve 1991 (57,58) yıllarında mikrospektrofotometrik yöntemle yapmış olduğu çalışmalarında da anöploid örnekli hastalarada sağkalımın daha kısa ve nükslerin daha sık olduğunu прогноз tahmininde tek etken olmamakla birlikte postoperatif izlem için değerli bir rehber olduğu görüşünü bildirmektedir.

Kaketani ve arkadaşlarının (6) FCM kullanarak 31 özofagus kanserli hastada yaptıkları çalışmada anöploidi örneğe sahip tümörlerde mitozu daha sık gördüklerini bildirmiştirlerdir. Aynı çalışmada anöploid grupta, diploid gruba göre anlamlı oranda yüksek erken nüks saptadıklarını bildirmelerine karşın sağkalım ile doğrudan ilişki bulamadıklarını bunun için daha çok çalışma gereklili olduğu görüşüne yer vermektedirler.

Edwars ve arkadaşlarının (90) 100 özofagus kanserli hastada FCM ile DNA ploidisini değerlendirmiştir. DNA ploidisi ve sağkalım ile diğer parametreler arasında anlamlı ilişki saptamadıklarını yayımlamışlardır.

Patil ve arkadaşlarının (9) 74 hastada FCM ile yaptıkları çalışmalarında ise DNA ploidi durumu ile sağkalım arasında bağlantı belirlemediklerini bildirmektedirler.

Yukarıda verilen örneklerde görüldüğü gibi Japon araştırmacılar (1,7,53,57,58,86,87) ile diğer araştırmacıların (8,9,10,85,90) arasında sağkalım ve DNA ploidisi ilişkisinde farklı sonuçlar bildirilmiştir. Bu farklılıklar, Japon araştırmacıların serilerinde yer alan hastaların büyük çoğunluğunun erken evre özofagus kanserli hastalar olmasından ve ileri evre kanserlerde nekrozun daha fazla olması sonucu olarak hazırlanan hücre süspansiyonlarında debrit miktarının daha fazla olmasının da bir etken olabileceğini akla getirmektedir. Ayrıca Japon araştırmacıların bir bölümünün statik sitometri yöntemini kullanmaları farklılıktan sorumlu olabilir.

Çalışmamızda anöploidi gösteren özofagus kanserli hastaların, proliferasyon indeksinin ve S-fazındaki yüksek olduğu saptandı. Anöploid tümörlerde sağkalım ortalama 27.49 ay (median:19ay), diploid grupta 32.13 ay (median:31.0 ay) olmak üzere anöploidi gösteren özofagus kanserli hastalarda

sağkalımın daha kısa olduğunu gözlemledik. Bizim sonuçlarımız Roul (10) ve arkadaşlarının çalışmalarının sonuçlarına benzemektedir yani çok belirgin olmamakla birlikte anöploidi sağkalımı hafifde olsa azaltmaktadır.

Özofagus kanserli hastada hastanın genel durumu, laboratuar bulguları, radyolojik değerlendirilmesi yapıldıktan sonra tedavisi planlanır. Bunun yanında onkolojik cerrahinin temel kurallarından biri olan hastaya uzun sağkalım ve kaliteli yaşam, özofagus kanserinde cerrahi tedavi planlanırken de temeldir. Preoperatif dönemde sağkalım, operatif mortalite ve morbitite hakkında bilgi verecek parametreler çok değerlidir. Bu bilgiler hastaya uygulanacak cerrahi girişimin türü, genişliğinin sınırlarının çizilmesinde yol gösterici olacaktır. Kolon kanserinde olduğu gibi (91) özofagus kanserli hastanın preoperatif dönemde yapılan değerlendirmede özofagoskopide alınan biyopsiden FCM ile tümörün ploidisinin saptanması olasıdır. Robaszkiewicz ve arkadaşları (92), disfajisi olan 26 hastada özofagokopi ile alınan biyopsilerden FCM ile değerlendirme yapmışlardır. Biyopsilerin %93'ünde flow sitometrik çalışma yapılmış ve bunların %73'ünde kaliteli histogramlar elde edebilmiştir. Çalışmalarında yer alan tüm lenf bezi tutulumlu ve karaciğer metastazı olan hastaların anöploid grupta yer aldıklarını gözlemlemeleri oldukça değerli bir bulgudur. Çalışmamızda anöploid hastalarda daha yüksek operatif mortalite ve daha kısa sağkalım görüldü. Matsuara ve arkadaşlarının (57) 1985 yılında yayınladıkları çalışmada, özofagus kanserinin farklı malign potansiyellere sahip olduğu görüşünden yola çıkışlılar ve özofagus kanserinde

preoperatif biyopsiden ve ardından da operasyon materyalinde de DNA ploidi durumunu değerlendirmiştirlerdir. Çalışmalarının sonunda preoperatif dönemde tümörün malign potansiyelinin bilinmesinin cerrahi tedavinin planlanmasında etkili olabileceği görüşünü bildirmiştirlerdir. Böylece cerrahi girişim öncesi hastanın tümörünün ploidi durumunun bilinmesi yani anöploid örnek gösteren bir hastada, diploid tümörlü hastalara göre lenf bezi tutulumu, karaciğer metastazı, operatif mortalite riskinin daha yüksek olduğu ve sağkalım bekłentisinin daha az olduğunu bilmek yapılacak olan cerrahi girişime etki edebilecektir. Matsuara ve arkadaşları (57) sözkonusu çalışmalarında anöploid tümörlü hastalarda hızlı yayılım ve küratif cerrahiye karşın postoperatif kısa sürede ölümlerin daha çok olduğunu belirmiştirlerdir. Bu tip hastalara küratif cerrahi tedavi planlansa da ek bir tedavi planlanabileceği görüşüne yer vermiştir. Özofagus kanserli hastalarda adjuvan tedaviler ile sağkalımın arttığını bildiren yayınlar vardır (93) ve anöploid tümörlü özofagus kanserli hastalarda Jing-Ming (83)'in yayınında da adjuvan tedavi önerilmektedir.

Özofagus kanserinin geç semptom vermesi, serozasının olmaması nedeniyle belirgin lateral sınırlayıcı bariyerinin olmaması sonucu çevre organ yayılımının ve lenf bezi metastazının sıklığı, multisentrik olması cerrahi tedavi uygulanan olgularda dahi nükslerin sık ve sağkalımın kısa olmasına yol açar. Dünyada genel eğilim malignitelerde multimodel tedavi yöntemleriyle nüksleri azaltmak ve sağkalımı uzatmaktadır. Bu eğilime paralel olarak neoadjuvan ve adjuvan tedavi protokolları ile çalışmalar yapılmaktadır. Özofagus kanserinde

de benzer çalışmalar söz konusudur. Ancak bu çalışmalarda neoadjuvan olsun adjuvan olsun tedavilerin yanıtlarının heterojen olduğu dikkati çekmektedir.

Özofagus kanserinde preoperatif kemo ve radyoterapi yanıtı ile DNA ploidi arasındaki ilişkiyi sorgulayan yaynlarda farklı görüşler bildirilmektedir. Segalin ve arkadaşlarının (94) 1993 yılında 30 yassı hücreli özofagus kanserli hastada gerçekleştirdikleri çalışmalarında KT ve KT+RT'ye komplet ya da parsiyel yanıtın, diploid hastalarda anöploid tümörlere göre daha iyi olduğunu bulduklarını ancak bunun istatistik olarak anlamlı bir fark olmadığını bildirmiştir. Porschen ve arkadaşlarının (85) yine 1993 'de daha geniş bir hasta grubunda 126 özofagus kanserli hastada yaptıkları çalışmada ise DNA anöploidisinin, preoperatif KT ya da RT yanıtta belirleyici olabileceğini ancak bunun prospektif çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini bildirmiştir.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'nda 1994-1997 yılları arasında neoadjuvan tedavinin uygulandığı benzer klinik ve patolojik özelliklere sahip 10 hastada kemoterapiye yanıtlarında farklılıklar saptanmıştır. Kemoterapi uygulanan hastaların %60'ında iyi, %40'ında ise kötü yanıt gözlenmiştir (95). Bu heterojen yanıtın açıklanmasında DNA flow sitometri tekniği ile tümörün ploidisinin ve S-faz fraksiyonunun değerlendirilmesinin yararı olabilir. Çünkü kemoterapi morbititesi ve mortalitesi yüksek bir tedavi yöntemidir, özellikle özofagus kanseri gibi hastanın oral beslenmenin sınırlı ya da olası olmaması sonucuda ileri derecede genel durumu kötü hastalarda bu riskler daha belirgin olmaktadır. Oysa

kemoterapi öncesi tedaviye alınacak yanıtın tahmininde belirleyici etkenlerin olması KT'ye yanıtın alınmadığı hastaları KT'nin toksik etkisinden korunmasını sağlayabilecektir. Anöoploldi ve S-faz faksiyonu yüksek tümörü olan hastalarda proliferatif aktivitenin yüksek olduğu bilinmektedir ve bizim çalışmamızda elde edilen bulgular da buna paralellik göstermektedir. Proliferasyonun çok olduğu tümörlerin KT yanıtlarının iyi olduğu ise bilinen bir gerçektir (96). Preoperatif özellikle KT'ye yanıtın heterojenitesinin değerlendirilmesinde DNA ploidisinin ve S-faz fraksiyonunun göz önünde tutulmasının aydınlatıcı olacağı görüşündeyiz.

VI - SONUÇ

Özofagus kanserinde de diğer bütün malignitelerde olduğu gibi prognoz hakkında bilgi veren etkenler çok önemlidir. Prognozun tahmini, tedavinin ve izlemin planlanması belirlemektedir. Bu nedenle prognoz belirleyicileri malignitelerde önemli rol üstlenmektedir. Hematolojik malignitelerde, meme, kolorektal, beyin, mesane, prostat, over ve akciğer kanserinde prognostik belirleyiciler arasında yerini almış olan DNA ploidisi özofagus kanserinde de bir prognostik etkendir.

Sonuç olarak özofagus kanserli, anöploid tümörü olan hastalarda operatif mortalitenin yüksek olması ve daha kısa sağkalım gibi riskler nedeniyle sözkonusu hastalarda preoperatif dönemde biyopsi ile ploidinin bilinmesinin cerrahi tedavinin planlanmasında yararlı olacağı görüşündeyiz. Ayrıca, postoperatif flow sitometrik incelemede anöploidi saptanan hastaların sağkalım sürelerinin diploid tümörlere göre daha kısa ve nüks olasılığının daha yüksek olması nedeniyle bu hastalarda sıkı izlem ve değerlendirme daha uygun görülmektedir. Postoperatif değerlendirme sonrası anöploid tümör saptanan hastalarda küratif cerrahi tedavi sonrası adjuvan tedavinin ya da preoperatif özofagoskopik biyopside anöploidi saptanan hastalarda neoadjuvan tedavi sonrası cerrahi uygulanmasının yararının ise ayrı bir çalışma konusu olabileceği görüşündeyiz.

VII - ÖZET

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'nda 1993- 1998 yılları arasında özofagus, hipofarinks ve kardia kanseri tanıları ile opere edilen ve izlenen 85 hastaya ait patoloji arşiv materyalinde flow sitometri tekniği kullanılarak DNA analizi ve proliferatif aktivite ölçümü yapıldı. Bunlardan değerlendirilebilir histogram elde edilen 52 olgu ile çalışma gerçekleştirildi.

DNA ploidi durumu ile diğer klinik, patolojik etkenler analiz edildi. Anöploidi oranı %32.7 (n:17) olarak bulundu. Diploid ve anöploid grup arasında yaş farkı gözlenmemesine karşın anöploid grupta kadın hastaların %64.7 gibi yüksek bir oranda olduğu saptandı. Histopatolojik tiplerde farklı dağılım gözlenmemesi yanı sıra iyi differansiyel tümörlerin %85'i diploid gruptaydı. Tümörün derinliği ile anöploidi arasında ters bir orantı olmasına karşın lenf bezi metastazında ve evrede iki grup arasında farklılık izlenmedi.

Diploid grupta S-faz fraksiyonu $\%9.7 \pm 6.82$ iken anöploid grupta daha yüksek $\%10.50 \pm 6.29$ olarak saptandı. Benzer biçimde diploid grupta proliferasyon indeksi 11.29 ± 7.19 iken anöploid grupta 12.50 ± 7.26 'dı. Bu değerler anöploidi örneğe sahip tümörlerde daha fazla proliferatif aktivite olduğunu göstergesidir.

Sağkalım anöploid grupta 27.49 ay (median :19 ay), diploid grupta 32.13 ay (median :31.0) olmak üzere anöploid tümörlü hastalarda sağkalım daha kısaydı.

Özofagus kanserli hastaların anöploidörneğe sahip olanlarda operatif mortalite yüksek ve sağkalım daha kısadır. DNA ploidi durumu bir prognostik etkendir. Preoperatif biyopsi materyalinde yapılacak değerlendirme ile tedavinin planlanması, operasyon materyalindeki değerlendirme ile de izlemenin programlanmasına yardımcı bir etken olarak göz önünde tutulabilir.

KAYNAKÇA

- 1 - Minu AR, Endo M, Sunagawa M. Role of DNA ploidy pattern in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1994;74:578 -584
- 2 - Seckinger D, Sugarbaker E, Frankfurt O. DNA content in human cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1989;113:619-626
- 3 - Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drevinko B, Swartzendruber DE et al. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Research* 1983;43:3982-3997
- 4 - Merkel DE, Dressler LG, McGuire WL. Flow cytometry cellular DNA content and prognosis in human malignancy. *J Clinical Oncology* 1987;5 (10):1690-1703
- 5 - Camplejohn RS, Macartney JC. Flow cytometry. In:Assesment of cell proliferation in clinical practice. Eds:Hall PA, Levison DA, Wrigth NA, Springer-verlag, London, printed in Germany, 1992, pp:95-111
- 6 - Kaketani K, Saito T, Kobayashi M. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in esophageal cancer. *Cancer* 1989;64:887-891
- 7 - Doki Y, Shiozaki H, Tahara H, Kobayashi K, Miyata M, Oka H et al. Prognostic value of DNA ploidy in squamous cell carcinoma of esophagus. *Cancer* 1993;72:1813-1818

8 - Böttger T, Störkel S, Stöckle M, Wahl W, Jugenheimer M et al. DNA image cytometry a prognostic tool in squamous cell carcinoma of the esophagus ? Cancer 1991;67:2290-2294

9 - Patil P, Redkar A, Patel SG, Mistry RC, Deshpande RK, Mittra I, Desai PB. Prognostic operable squamous cell carcinomas of the esophagus. Cancer 1993;72:20-24

10 - Roul A, Segalin A, Panozzo M, Stephans JK, Palma PD, Skinner DB et al. Flow cytometric DNA analysis of squamous cell carcinoma of the esophagus . Cancer 1990;65:1185-1188

11 -Postlethwait RW, Anatomy, In:Surgery of the esophagus, second edition, Appleton-Century-Crofts, Connecticut, USA, 1986, chapter:17, pp:563-588

12 - Blevins CE, Embryology of the esophagus, In:General Thoracic Surgery, Ed:Shields TW, fourth edition, Williams and Wilkins, PA, USA,1995, chapter:102,pp:1355-1358

13 -Chifec G. Esophagus. In:Anderson's Pathology. Eds:Danzenov I, Linder J, tenth edition, Mosby, st Louis, USA, 1996, pp:1647

14 - Antonioli DA, Madora JL. Functional anatomy of the gastrointestinal tract. In:Pathology of the Gastrointestinal Tract. Eds:Ming SC, Goldman H, WB Saunders Company, PA, USA, 1992, chapter:2, pp:14

15 - Rothberg M, Johnson S, De Meester TR. Anatomy of the esophagus. In: General Thoracic Surgery. Ed:Shiels TW, Fourth edition, Williams and Wilkins, PA, USA, 1994, chapter:103, pp:1354-1369

- 16 - De Nardi FG, Riddell RH. Esophagus. In:Histology for pathologist, Ed:Stenberg SS, First edition, Raver Press, Hong Kong, 1992, pp:515-533
- 17 - Shields TW. Lymphatic drainage of the esophagus. In:General Thoracic Surgery. Ed:Shiels TW, fourth edition, Williams and Wilkins, PA, USA, 1994, chapter:104, pp:1370-1377
- 18 - Guyton AC. Text Book of Medical Physiology. Seventh edition (Türkçe çevirisi:Tıbbi Fizyoloji), Mert Matbaacılık, İstanbul, 1988, bölüm:63, s:1086-1106
- 19 - Wang LD, Shi ST, Zhou Q, Goldstein S, Hong JY, Shao P et al. Changes in p53 and cell proliferation in different stages of human esophageal and gastric-cardia carcinogenesis. *Int J Cancer* 1994;59:514-519
- 20 - Gates EC, Reed CE, Bromberg JS, Everett ET, Baron PL. Prevalence of p53 mutation in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1994;108:148-151
- 21 - Liu FS, Wang QL. Squamous cell carcinoma of the esophagus, In:Pathology of the Gastrointestinal Tract. Eds:Ming SC, Goldman H, WB Saunders Company, PA, USA, 1992, chapter:18, pp: 439-458
- 22 - Bains MS, Shiels TW. Squamous cell carcinoma of the esophagus. In:General Thoracic Surgery. Ed:Shiels TW, fourth edition, Williams and Wilkins, PA, USA, 1994, chapter:126, pp:1633-1658
- 23 - AJCC Cancer Staging Manueal. Esophagus. Lippincott-Raven, New York, USA, fifth edition, 1997, pp:65-70

- 24 - Wang DY, Xiang YY, Tanaka M, Shen Q et al. High prevalence of p53 protein overexpression in patients with esophageal cancer in Linxian, China and its relationship to progression and prognosis. *Cancer* 1994;75:3089-3096
- 25 -Hennessy TPJ. Cancer of the esophagus. *Postgrad. Med. J* 1996;72:458-463
- 26- Ökten İ. Özofagus kanseri. Klinik Cerrahi Onkoloji, Ed:Ünal A, Özkan Matbaacılık, Ankara, 1997, bölüm:33, s:455-467
- 27 - Dawsey M, Lewin KJ, Path FRC, Wang GQ, Liu FS, Blot WJ et al. Squamous esophageal histology and subsequent risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1994;74:1686-1692
- 28 -Jaskiewicz K, Banach L, Mafungo V, Knobel GJ. Esophageal mucosa in a population at risk of esophageal cancer:postmortem studies. *Int J Cancer* 1992;50:32-35
- 29 - Kuwano H, Morita M, Matsuda H, Mori M, Sugimachi K. Histopathologic finding of minute foci of squamous cell carcinoma in the human esophagus. *Cancer* 1991;68:2627-2620
- 30 - Ökten İ. Özofagus kanseri ve Doğu Anadolu bölgesindeki görülümü. *Atatürk Üniversitesi TF Tıp Bülteni* 1986;18 (3):337-342
- 31- Wyder EL, Bross IJ. A study of etiological factors in cancer of the esophagus. *Cancer* 1961;14:389-413
- 32 - Weir JM, Dunn JE. Smoking and mortality: a prospective study. *Cancer* 1970;25:105-112

33 - Lijinsky W, Taylor HW. Increased carcinogenicity of 2,6-dimethylnitrosomorpholine compared with nitrosomorpholine rats. *Cancer Research* 1975;35:2123-2125

34 - Casson AG, McCarty JA. Molecular alterations in esophageal cancer. In:Chest Surgery Clinics of North America "Basic Biology for the Thoracic Surgery" 1995;5(1):17-37

35 - Ogasawara S, Tamura G, Maesawa C, Suzuki Y, Ishida K, Satoh N et al. Common deleted region on the long arm of chromosome in esophageal carcinoma. *Gastroenterology* 1996;110:52-57

36 - Ogasawara S, Maesawa C, Tamura G, Satodate R. Frequent microsatellite alterations on chromosome 3p esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Research* 1995;55:891-894

37 - Tarmin L, Yin J, Zhou X, Suzuki H, Jiang HY, Rhyu MG et al. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 9 in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer Research* 1994;54:6094-6096

38 - Mori T, Aoki T, Matsubara T, Iida F, XiQun D, Nishihira T et al. Frequent loss of heterozygosity in the region including BRCA1 on chromosome 17q in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer Research* 1994;54:1638-1640

39 - Wagata T, Shibagaki I, Imamura M, Shimida Y, Toguchida J, Yandell DW et al. Loss of 17p mutation of the p53 gene and overexpression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Research*. 1993;53:846-850

- 40 - Li H, Yao SC. Surgical treatment for carcinoma of the esophagus in Chinese language publications. British J Surgery 1997;84:855-857
- 41 - Wang LS, Chi KH, Hu MH, Fahn HJ, Huang MH. Management for patients with advanced T4 epidermoid carcinoma of the esophagus. J Surgical Oncology 1996;62:22-29
- 42 - Yalav E, Ökten İ. Özofagus Rezeksiyon ve rekonstrüksiyonları. Tip Dünyası 1979;52:62-71
- 43 - Yalav E, Ökten İ. Özofagusun alt 1/3 bölüm tümörlerinde cerrahi yaklaşım metodları. Dirim 1979;67:73
- 44 - Ökten İ. Esophageal carcinoma:an analyses of 502 cases. J Ankara Med. School 1995;17:115
- 45 - Giuli R, Gignoux M. Treatment of carcinoma of the esophagus retrospective study of 2400 patients. Ann. Surg. 1980;192 (1):44-53
- 46 - Vogel SB, Mendelhall WM, Sombeck MD, Marsh R, Woodword ER. Downstaging of esophageal cancer after preoperative radiation and chemotherapy. Ann. Surg. 1995;221(6):685-695
- 47 - Law S, Chir B, Fok M, Chau S, Chu KM, Wong J. Preoperative chemotherapy versus surgical therapy alone for squamous cell carcinoma of the esophagus:a prospective randomized trials. J Thorac. Cardiovasc. Surg. 1997;114 (2):210-217
- 48 - Ando K, Iizuka Y, Kakegawa T, Isono K, Watanabe H, Ide H, et al. A randomized trials of surgery with and without chemotherapy for localized

squamous carcinoma of the thoracic esophagus: The Japan Clinical Oncology . J Thorac. Cardiovasc. Surg. 1997;114 :205-209

49 - Carey RW, Hilgenberg AD, Wilkins EW, Choi NC, Mathisen DJ, Grillo HC et al. Long-term follow-up of neoadjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin with surgical resection and possible postoperative radiotherapy and/or chemotherapy in squamous cell carcinoma of the esophagus. Cancer Investigation 1993;11(2):99-105

50 - Skinner DB. Editorial on combined therapy for squamous cell carcinoma of the esophagus. J Thoracic Cardiovasc. 1997;114:203-204

51 - Korst R, Rusch VW, Venkatraman E, Bains M, Burt M, Downey RJ, Ginsberg RJ. Proposed revision of the staging classification for esophageal cancer. J Thorac. Cardiovasc. 1998;115:660-670

52 - Rice TW, Zuccaro G, Adelstein DJ, Rybicki LA, Blackstone EH, Goldblum J. Esophageal carcinoma: depth of tumor invasion is predictive of regional lymph node status. Ann Thorac. Surg. 1998;65:787-792

53 - Sugimachi K, Matsuoka H, Ohno S, Mori M, Kuwano H. Multivariate approach for assessing the prognosis of clinical oesophageal carcinoma. Br J Surg. 1988;75:1115-1118

54 - Sugimachi K, Matsuoka H, Matsufiji H, Maekawa S, Kai H, Okudaira Y. Survival rates of women with carcinoma of the esophagus exceed those of men. Surg. Gyn. Obst. 1987;164:541-545

55 - Mandar AM, Whitehead R, Li L, Hamilton SR, Bogomoletz W. Other tumours of the oesophagus. In: Gastrointestinal and Oesophageal Pathology.

Ed:Whitehead R, Churchill Living Stone, second edition, UK, 1995,
Chapter:38, pp:777-783

56 - Sasaki K, Hashimoto T, Kawachino K, Takahashi M. Intratumoral regional differences in DNA ploidy gastrointestinal carcinomas. *Cancer* 1988;62:2569-2575

57 - Matsuura H , Sugimachi K, Ueo H, Kuwano H, Koga Y, Okamura T. Potentially of squamous cell carcinoma of the esophagus predictable by DNA analysis. *Cancer* 1986;57:1810-1814

58 - Matsuura H , Kuwano H, Morita M, Tsutsui S, Kido Y, Mori M et al. Predicting recurrence time of esophageal carcinoma through assessment of histologic factors and DNA ploidy. *Cancer* 1991;67:1406-1411

59 -Coon JS, Landay AL, Weinstein RS. Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Laboratory Investigation* 1987;57 (5):453-479

60 - Muirhead KA. Establishment of quality control procedures in clinical flow cytometry. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993;677:1-20

61 - Shields TW, Robinson PG, Radosevich JA. Lung cancer: etiology, carcinogenesis, molecular biology and pathology, In:General Thoracic Surgery, Ed:Shiels TW, fourth edition, Williams and Wilkins, PA, USA, 1994, chapter:85, pp:1095-1117

62 - Kallioniemi OP. Comparison of fresh and parafin-embedded tissue as starting material for DNA flow cytometry and evaluation of intratumor heterogeneity. *Cytometry* 1988;9:164-169

63 - Wheeless LL. The clinical utility of DNA cytometry. Annals of the New York Academy of Sciences 1993;677: 82-85

64 - Merkel DE, McGuire WL. Ploidy, proliferative activity and prognosis. Cancer 1990;65:1194-1205

65 - Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Ruggy CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J Histochemistry and Cytochemistry 1983;31:1333-1335

66 - Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW. Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. Cytometry 1985;6:327-333

67 - Akbulut H. Kolorektal Kanserli Olgularda DNA ploidi ve diğer faktorlerin prognozla ilişkisi (Uzmanlık Tezi). Ankara ÜTF İç Hastalıkları ABD, Tibbi Onkoloji Bilim Dalı, Ankara , 1995

68 - Wilson GD, McNally NJ, Dunphy E, Karcher H, Pfrangner R. The labelling index of human and mouse tumours assessed by bromodeoxyuridine staining in vitro and in vivo in flow cytometry. Cytometry 1985;6:641-647

69 - Ohyama S, Yonemura Y, Miyazaki I. Prognostic value of S-phase fraction and DNA ploidy studied with in vivo administration of bromodeoxyuridine on human gastric cancers. Cancer 1990;65:116-121

70 - Coon JS, Deitch AD, Vere White RW, KossLG, Melamed MR, Reeder JE et al. Interinstitutional variability in DNA flow cytometric analysis of tumor,

The National Cancer Institute's flow cytometry network experience. Cancer 1988;61:126-130

71 - Volm M, Drings P, Mattern J, Sonka J, Vogt-Moykopf I, Wayss K. Prognostic significance of DNA patterns and resistance predictive test in non-small cell lung carcinoma. Cancer 1985;56:1396-1403

72 - Volm M, Mattern J, Vogt-Schanden M, Wayss K. Flow cytometric analysis of primary lung carcinomas and their lymph node metastases. Anticancer Research 1987;7:71-76

73 - Volm M, Hahn EW, Mattern J, Müller T, Vogt-Moykopf I, Weber E. Five year follow up study of independent clinical and flow cytometric prognostic factors for the survival of patients with non-small cell lung carcinoma. Cancer Research 1988;48:2923-2928

74 - Tomoda H, Inoue T. Flow cytometric analysis of the DNA content in primary and metastatic lesions of colorectal cancer. Cancer J Surg. Oncol. 1995;59: 101-104

75 - Olsson H, Ranstam J, Baldetorp B, Ewers SB, Fernö M, Killander D, Sigurdsson H. Proliferation and DNA ploidy in malignant breast tumors in relation to early oral contraceptive use and early abortions. Cancer 1991;67:1285-1290

76 - Inokuchi K, Kodama Y, Sasaki O, Kamegawa T, Okamura T. Differentiation of growth patterns of early gastric carcinoma determined by cytophotometric DNA analysis. Cancer 1983;51:1138-1141

77 - Tirindelli-Danesi D, Teodoro L, Mauro F, Modini C, Botti C, Cicconetti F, Stipa S. Prognostic significance of flow cytometric in lung cancer, 5 year study. *Cancer* 1987;60:844-851

78 - Takanishi DM, Hart J, Covarelli P, Chappell R, Michelassi F. Ploidy as a prognostic feature in colonic adenocarcinoma. *Arch. Surg.* 1996;31:587-592

79 - Xiang J, Spanier SS, Benson NA, Braylan RC. Flow cytometric analysis of DNA in bone and soft-tissue tumors using nuclear suspensions. *Cancer* 1987;59:1951-1958

80 - Bağdatoğlu C. Flow cytometry ile glial tümörlerin biyolojik davranışının değerlendirilmesi (Uzmanlık Tezi). Ankara ÜTF Nöroşirurji ABD, Ankara ,1998

81 - Atkin NB, Kay R. Prognostic significance of nodal DNA value and other factors in malignant tumours based on 1465 cases. *Br. J Cancer* 1979;40:210-221

82 - Haraguchi Y, Baba M, Takao S, Yoshinaka H, Hase S, Aikou T. Flow cytometric analysis of DNA heterogeneity in superficial carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1995;75:914-919

83 - Jin-Ming Y, Li-Hua Y, Gou-Qian, Yan-Tiaoc, Xiao L, Wei-Xia Z et al. Flow cytometric analysis DNA content in esophageal carcinoma. *Cancer* 1989;64:80-82

84 - Ohno S, Mori M, Tsutsui S, Matsuura H, Kuwano H, Soejima K, Sugimachi K. Growth patterns and prognosis of submucosal carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1991;68:335-340

- 85 - Porschen R, Bevers G, Remy U, Schauseil S, Borchard F. Influence of preoperative radiotherapy on DNA ploidy in squamous cell carcinoma of the esophagus. *GUT* 1993;34:1086-1090
- 86- Ikebe M, Kitamura K, Baba K, Morita M, Tsutsui S, Sugimachi K. DNA ploidy as a prognostic factor in early esophageal carcinoma. *Hepato-Gastroenterol.* 1993;40:232-235
- 87 - Sasaka K, Murakami T, Murakami T, Nakamura M. Intratumoral heterogeneity in DNA ploidy of esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* 1991;68:2403-2406
- 88 - Dinçol D, Timlick-Aller C, Küçük Ö, Gilman-Sachs A, Erekul S, İçli F. Tumor-cell heterogeneity of DNA ploidy in premenopausal node-positive breast cancer. *J Exp. Clin. Cancer* 1994;13:223-227
- 89 - Orringer MB. Editorial on " Occult cervical nodal metastases in esophageal cancer: preliminary result of three-field lymphadenectomy" *J Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1997;113:538-539
- 90 - Edwards JM, Jones DJ, Wilkes JL, Hillier VF, Hasleton RS. Ploidy as a prognostic indicator in oesophageal squamous carcinoma and its relationship to various histological criteria. *J Pathology* 1989;159:35-41
- 91 - Nishida K, Takona H, Yoneda M, Ohtsuki T, Fujii M, Terasawa Y et al. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in tissues of colon cancer using endoscopic biopsy specimens *J Surg. Oncol.* 1995;59:181-185

92 – Robaszkiewicz M, Reid BJ, Volant A, Cauvin JM, Rabinovitch PS, Gouerou H. Flow-cytometric DNA Content analysis of esophageal squamous cell carcinomas. *Gastroenterology* 1991;101:1588-1593

93 - Abo S, Kitamura M, Hashimoto M, Izumi K, Minamiyo Y, Shikama T et al. Analysis of results of surgery performed over a 20 year period in 500 patients with cancer of the thoracic esophagus. *Surg. Today Jpn. J Surg.* 1996;26:77-82

94 - Segalin A, Roul A, Panozzo M, Bonovina L, Bianchi LC, Peracchia A. Flow cytometric DNA analysis does not predict the radiochemoresponsiveness of esophageal cancer. *J Surg. Oncol.* 1993;54:87-90

95 - Han S. Özofageal yassı hücreli karsinomda neoadjuvan kemoterapinin operabilite ve rezektabiliteye etkisi (Uzmanlık Tezi). Ankara ÜTF Göğüs Cerrahisi ABD, Ankara 1997

96 - Jahnke L, Kies MS. Principles of chemotherapy. In:General Thoracic Surgery. Ed:Shiels TW, fourth edition, Williams and Wilkins, PA, USA, 1994, chapter:93, pp:1218-1228