

Kolorektal Karsinomalarda İmmünohistokimyasal c-erbB-2, p53, bcl-2 Ekspresyonu ile Apoptotik, Proliferatif İndeks ve Diğer Prognostik Faktörler arasındaki İlişki

Dr. Ömer Yerci*, Dr. Gülaydan Filiz*, Dr. Sema Özuysal*, Dr. Selim Gürel**,
Dr. Tuncay Yılmazlar***, Dr. Abdullah Zorluoğlu***

ÖZET

Bu retrospektif çalışmada, kolorektal karsinomalarda c-erbB-2, p53 ve bcl-2 onkoproteinlerinin apoptotik ve proliferatif indeksler ile ilişkilerinin araştırılması amaçlandı. Ayrıca onkoprotein salınımı, apoptotik ve proliferatif indeksler ile tümör grade, stage ve prognozları arasındaki korelasyona bakıldı.

Çalışmada 1992-1995 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda Cerrahi materyalleri incelenen 57 kolorektal karsinoma olgusunun parafin bloklarından elde edilen kesitleri yeniden değerlendirildi. Tümör tipi, grade ve stajeleri ile Hemaitoksilen Eozin (H.E) kesitlerde apoptotik ve mitotik indeksler belirlendi. 57 olgunun tümoral dokularına immünohistokimyasal ki-67, bcl-2, p53 ve c-erb B-2 uygulandı.

Çalışmadaki 57 olgunun 49'u adenokarsinoma, altısı müsinöz, ikisi taşlı yüzük hücreli karsinoma idi. Adenokarsinomalarda üç olgu Grade I, 39 olgu Grade II, yedi olgu Grade III olup 16 olgu Evre I, 10 olgu Evre II, 26 olgu Evre III ve beş olgu Evre IV idi.

Çalışma sonunda onkoproteinlerin apoptotik ve proliferatif indeksler ile diğer prognostik faktörler ve prognoz arasında herhangi bir ilişki saptanmadı.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal Karsinoma, Onkoproteinler, Apoptozis

GİRİŞ

Tümör oluşumunun moleküler temelinde; genetik ya da çeşitli edinsel faktörlerle protoonkogenlerin aktivasyonu, tümör supressör genlerin inaktivasyonu ile apoptozisin (programlı hücre ölümü - PHÖ) engellenmesi sorumlu mekanizmalar olarak bilinmektedir (1-9). Günümüzde pek çok malign tümörde onkogen ve tümör supressör genlerin mutasyonları gösterilebilmekte ve ayrıca bu genlerin ürünü olan onkoproteinlerin immünohistokimyasal boyamalarla tümör hücrelerinde gösterilmesi de mümkün hale gelmiştir. Bir çok çalışmada onkoprotein varlığı ile tümör hücrelerinde gösterilmesi de mümkün hale gelmiştir. Bir çok çalışmada onkoprotein varlığı ile tümör tipi, grade, stage ve hasta prognozlarının ilişkisi araştırılmıştır. Onkoproteinlerden olan p53 ve bcl-2 proteinleri aynı zamanda PHÖ'nü inhibe etmektedir. p53 proteini ise normalde PHÖ'nü uyarmasına rağmen mutasyona uğradığı ya

SUMMARY

The Correlation of the immunohistochemical expressions of c-erbB-2, p53, Bcl-2 with the apoptotic and proliferative indices and the other prognostic factors in colo-rectal carcinoma.

In this retrospective study, we aimed to investigate the correlation of c-erbB-2, p53, bcl-2 oncoproteins with apoptotic and proliferative indices and the tumor grade, stage and prognosis.

The sections made from paraffin blocks of 57 colo-rectal carcinoma cases were reevaluated in the Pathology Department of Uludağ University. The type, grade and stage of the tumors as well as the apoptotic and mitotic indices were determined on hematoxyline - eosin sections. Immunohistochemical stains of Ki-67, bcl-2, p53 and c-erbB-2 were performed on the tumors of the 57 cases. In our study, 49 of 57 cases were adenocarcinoma, six were mucinous, and two were signet ring cell carcinoma. Three adenocarcinomas were Grade I, 39 were Grade II and, seven Grade III; of fiftyseven cases, 16 cases were stage I, 10 were stage II, 26 stage III and five stage IV.

According to our results, no statistically meaningful association was found among these oncoproteins, apoptotic and proliferative indices and the other prognostic factor.

Key Words: Colorectal Carcinoma, Oncoproteins, Apoptosis

da bulunmadığı zaman hücre yaşamını uzatır (8).

Dokulardaki büyümelerde bunun proliferasyon lehine bozulması ya da hücre ölümünün inhibisyonu gerekmektedir. PHÖ'nin karsinogenesiste inisiyator ya da promotor rol oynadığını gösteren birçok çalışma vardır (1,9-14).

Kolorektal karsinomalar batı ülkeleri ve ABD'de en sık görülen malignansilerdendir. Kolorektal karsinogenesiste; karsinomaların adenomalardan ya da normal kolon mukozasından "de novo" gelişimi kabul edilen mekanizmalardır. Çalışmalarda apoptozisin, onkoprotein ve tümör supressör gen ürünleri olan p53 ve bcl-2'nin kolorektal karsinogenesisteki multistep olaylarda inisiyator ya da promotor rolleri belirtilmektedir. (1,2,3,6). Çalışmalarda ayrıca bcl-2 ve p53 ile diğer onkoproteinlerin prognostik faktör olarak ta kullanılabileceği vurgulanmaktadır. Hepsinde olmasa da bazı çalışmalarda p53, bcl-2 ve

* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Bursa

** Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji BD, Bursa

*** Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Bursa

c-erb B-2 proteinlerinin prognozla ilişkileri gösterilmiştir. (12-29).

Çalışmamızda kolorektal karsinogeneziste belirgin şekilde etkili olan bu proteinlerin olgularımızdaki ekspresyon, proliferatif ve apoptotik indekslerle ilişkileri, diğer prognostik faktörler ve hasta prognozları ile ilişkileri araştırıldı.

Çalışmada proliferasyon indeksi için mitoz sayısı ve Ki-67 indekslerine; apoptotik (PHÖ) indeks için ise tümöre ait glandüler yapılarda apoptotik cisimciklere bakıldı.

Çalışmanın amacı; kolorektal karsinomalarda tümör hücrelerinden eksprese edilen onkoproteinler ile apoptozis ve proliferatif aktivitenin hasta prognozu ile olan ilişkisini ve bunların prognostik faktör olarak kullanılıp kullanılmayacaklarını araştırmak olarak belirlendi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Retrospektif çalışmada 1992-1995 yılları arasında U.Ü. Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda Cerrahi materyalleri incelenen ve adenokarsinoma tanısı alan 57 kolorektal karsinoma olgusuna ait doku kesitleri yeniden değerlendirildi. Tümör doku kesitlerinde tümör hücrelerinin glandüler ve solid yapılanmalarına göre grade'lemeleri yapıldı.

TNM esas alınarak AJCC ve UICC'ye göre tümör evreleri saptandı. Tümör dokulardaki müsinöz komponente bakılarak müsinöz ve taşlı yüzük hücreli karsinomalar ayrıldı. Müsinöz ve taşlı yüzük hücreli karsinomalar Grade III olarak kabul edildi.

H.E. kesitlerde 500 tümör hücresindeki atipik mitoz ve apoptotik cisimcikler sayılarak; mitotik ve apoptotik indeks çıkarıldı.

Tümör doku örneklerine immünohistokimyasal olarak Ki-67, c-erbB-2, p53 ve bcl-2 uygulandı. Boyama Streptavidin - Biotin Peroksidaz -DAB tekniği, zıt boyamaları Harris Hematoksilin ile yapılarak ve DAKO'ya ait Rabbit Anti-Human Ki-67 Antigen (Predilüe), Monoklonal mouse antihuman p53 protein (DO-7, predilüe), Mouse Anti-Human bcl-2 oncoprotein (predilüe), Rabbit Anti-Human c-erbB-2 oncoprotein (1/100 TBS dilüsyonu) kullanılarak yapıldı.

Ki-67 uygulanan kesitlerde 500 tümör hücresi sayılarak yüz hücredeki proliferatif aktivite indeksleri saptandı. p53, bcl-2 ve c-erbB-2 uygulanan dokularda %20 üzerindeki nükleer ve stoplazmik boyanmalar (+) olarak değerlendirildi.

İstatistik:

İstatistiksel analizler, SPSS PC + kullanılarak yapıldı. Değerler arasındaki ilişkiler, student t testi ve Mann-Whitney-U rank sum testi, sonuçlar arasındaki değişiklikler ise korelasyon testleri (bivariate) ile araştırıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ 1 SEM olarak verildi. "p" değeri 0.05 den küçük ise, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR ve SONUÇLAR

Çalışmadaki 57 olgunun grade ve stage'leri tablo 1'de gösterildi. Olgulardan 49'u adenokarsinoma, 6'sı Müsinöz karsinoma, 2'si Taşlı Yüzük Hücreli Karsinoma idi. Müsinöz ve Taşlı yüzük hücreli karsinomalar Grade III olarak kabul edildi (Tablo 1).

Tablo 1 : Olguların Tümör Stage ve Gradeleri

	Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
Grade I	1	1	1	-
Grade II	15	9	11	4
Grade III	-	-	14	1

p53, bcl-2 ve c-erbB2 onkoprotein ekspresyonunun tümör gradeleri ile ilişkisi Tablo 2 de gösterildi.

Tablo 2 : Tümör Gradeleri ile Onkoproteinler arasındaki ilişki

Grade	p53 (-)	p53 (+)	c-erbB-2 (-)	c-erbB-2 (+)	bcl-2 (-)	bcl-2 (+)
I	2	1	1	2	3	-
II	17	22	12	27	39	-
III	7	8	5	10	15	-
Toplam	26	31	18	39	57	

P53 31 olgu (%54.3), c-erbB-2 39 olgu da (%68.4) pozitif iken bcl-2 hiçbir olguda pozitif boyanma göstermedi. 16 olguda (%28) ise hem p53 hem de c-erbB-2 pozitifliği mevcuttu. Onkoprotein salınımının tümör evreleri ile ilişkisi Tablo 3'de gösterildi.

Tablo 3 : Tümör evreleri ve onkoproteinler arasındaki ilişki

Evre	p53 (-)	p53 (+)	c-erb B-2 (-)	c-erb B-2 (+)	bcl-2 (-)	bcl-2 (+)
I	9	7	7	9	16	(-)
II	3	7	3	7	10	(-)
III	13	13	8	18	26	(-)
IV	1	4	(-)	5	5	(-)
Toplam	26	31	18	39	57	(-)

Olgularda ki tümörlerin grade ve stage'leri ile Apoptotik ve proliferatif indeksler arasındaki ilişki Tablo 4'de gösterilmiştir.

Ayrıca Ki-67 ile mitotik indeks arasında pozitif yönde (r: 0.5324) iyi derecede bir korelasyon ve yine tümör stage'leri ile gradeleri arasında da orta derecede (r: 0.4042) bir korelasyon saptandı. Diğer indeksler arasında anlamlı bir bağıntı bulunamadı.

TARTIŞMA

Sporadik ve herediter kolorektal karsinomalarda ras, myc, c-erbB-2 gibi onkogenlerin ve apc, dcc ve p53 gibi tümör supressör genlerin mutasyonu ve mutant proteinleri bilinmektedir (2,3,9). Çalışmalardan bazıları onkoprotein ve apoptozun kolorektal karsinogeneziste olduğu kadar prognozda da rol

Tablo 4 : Tümör grade ve stageleri ile Apoptotik ve proliferatif indeksler arasındaki ilişki

	Apoptotik index	Ki-67 indexi	Mitotik index
Grade I	1.6 ± 0.31*	39.4±11.42	2.33±0.74
Grade II	2.02±0.14	40.47±2.42	2.91±0.23
Grade III	2.09±0.28	37.67±4.18	2.36±0.35
Stage I	1.96±0.23	41.19±3.42	3.09±0.45
Stage II	2.24±0.26	42.9±6.92	2.62±0.30
Stage III	1.99±0.2	40.13±2.74	2.79±0.26
Stage IV	1.92±0.41	26±2.53**	1.52±0.42**

* Grade I tümörlerdeki Apoptotik indeks, diğer grade ve stagelerdeki tümörlerin Apoptotik indekslerinden anlamlı olarak farklı bulundu.

** Stage IV'de Ki-67 ve Mitotik indeks diğer grade ve stagelerdeki indekslerden anlamlı olarak farklı idi. Onkoproteinlerin proliferatif ve apoptotik indekslerle ilişkisi Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5 : Onkoproteinleri Proliferatif ve Apoptotik indekslerle ilişkisi

	p53		C-erb B-2		bcl-2	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Apoptotik indeks ort.	1.73±0.12	2.26±0.19	2.21±0.19*	1.93±0.16*	2.02±0.12	-
Ki-67 indeksi ort.	39.49±2.96	39.83±2.84	41.9±2.76	38.65±2.69	39.68±2.03	-
Mitotik indeks ort.	2.4±0.22	3.02±0.29	2.67±0.27	2.76±0.25	2.73±0.19	-

*Aralarındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulundu (p<0.05).

Olguların ortalama Ki-67 değeri: 39.68±2.03 ve ortalama Apoptotik indeksi: 2.02±0.12 idi. Ki-67 ve apoptotik indeksler arasındaki ilişki Tablo 6'da gösterildi.

Tablo 6 : Kolorektal Karsinomlarda Ki-67 İndeksi ile Apoptotik indeks arasındaki ilişki

	PHÖ Oranı		
	<2.02 %	>2.02 %	Toplam %
Ki-67 Oranı < 39.68	19 (61.3)	12 (38.7)	31 (54.3)
Ki-67 Oranı > 39.68	15 (57.7)	11 (42.3)	26 (45.7)
Toplam	34 (57.7)	23 (42.3)	57 (100)

Apoptotik indeksin onkoproteinler ile ilişkisi Tablo 7'de gösterildi.

Tablo 7 : Apoptotik indeks ile onkoproteinlerin yüzde olarak ilişkisi

	PHÖ Oranı		
	<2.02 %	>2.02 %	Toplam %
bcl-2 negatif	34 (59.6)	23 (40.4)	57 (100)
p53 negatif	20 (76.9)	6 (23.1)	26 (100)
p53 pozitif	15 (48.4)	16 (51.6)	31 (100)
c-erb-B2 negatif	11 (61.1)	7 (38.9)	18 (100)
c-erb-B2 pozitif	23 (58.9)	16 (41.1)	39 (100)

Prognozu bilinen 32 hastanın onkoprotein salınımı ile ilişkileri Tablo 8'de gösterildi.

Tablo 8 : Onkoproteinler ve Prognoz ilişkisi

	p53		c-erb-B2		bcl-2	
	-	+	-	+	-	+
Sağ	8	9	7	10	17	-
Eksitus	8	7	7	8	15	-
Toplam	16	16	14	18	32	-

oynadığını, yeni prognostik faktörler olarak kullanılabileceklerini göstermektedir.

Bcl-2 onkoproteini apoptozisin inhibisyonunda rol oynar. Proteinin aşırı ekspresyonu ilk defa lenfoid malignansilerde (foliküler lenfoma) ve kromozomal translokasyona t(14;18) bağlı olarak saptanmıştır. Daha sonra bcl-2 onkoproteininin aşırı salınımı ve apoptozisin bloke edilmesinin endometrium, akciğer, meme, prostat, nazofarengeal ve kolorektal karsinomlar gibi epitelial tümörlerin gelişmesinde de rol oynadığı ve diğer onkoprotein ya da tümör supressör gen proteinleri kadar önemli olduğu anlaşıldı. Bugün için karsinogenezdeki rolleri tüm araştırmalarda belirtilmektedir. Ancak mutant p53 ve c-erb B-2 proteinleri, aşırı bcl-2 proteini, apoptotik ve proliferatif indekslerin, tümör prognozlarıyla ilişkileri, prognostik faktör olarak önemli olup olmadıkları konusunda kesin kriterler ortaya konamamıştır.

Baretton ve arkadaşları ekspresyonunun; kolorektal polip, adenoma ve displazik değişiklikler ile karsinomların erken dönemlerinde bulunduğu, bcl-2 pozitif tümörlerin prognozlarının daha iyi olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca bcl-2 pozitif tümörlerde proliferatif ve apoptotik indeksler düşük olarak vurgulanmaktadır. Aynı çalışmalarda kolorektal karsinomlarda bcl-2 pozitifliği ile mutant p53 proteini negatifliği arasında kuvvetli korelasyonlar bulunmuştur. Sonuç olarak bcl-2 (+), p53 ve c-erbB-2 (-) tümörlerin; bcl-2 (-); p53 ve c-erbB-2 (+) tümörlerden daha iyi prognoza sahip oldukları ve bunların prognostik faktör olabileceği belirtilmektedir (1,2). Ancak çoğu çalışmada onkoproteinlerin tümör grade, stage gibi diğer prognostik faktörlerle ve prognoza ilişkileri gösterilememiştir. Birçok çalışmada; kolorektal karsinomlarda bcl-2 pozitiflik oranları %20-67 arasında değişmekle beraber; tümörlerin erken evrelerinde pozitifliğin arttığı vurgulanmaktadır.

Pozitifliğin yüksek görüldüğü çalışmalarda frozen kesitlere immünohistokimyasal boyamanın uygulandığı görülmektedir (15-17, 19-21). Behatavdekar ve arkadaşlarının bir çalışmasında ise bcl-2 onkoproteininin aşırı ekspresyonunun az diferan- siye tümörlerde % 100 pozitif bulunduğu ifade edilerek, Bretton ve arkadaşlarının tam tersi bir tanımlama yapılarak bcl-2 ekspresyonunun kötü prognozu gösterdiği vurgulanmıştır. Özellikle onkoproteinlerin aynı olguda beraber salınımlarının prognozu kötü etkiledikleri kabul edilmiştir (18).

Bizim çalışmamızda ise bcl-2 hiçbir olguda pozitif saptanmamıştır. Prognozu belli olan 32 olguda sağ kalım ile eksitus oranında bcl-2 (-) olgularda farklılık bulunmamıştır. Bcl-2 ekspresyonu ile apoptotik ve proliferatif indeksler arasındaki ilişki ise; bcl-2 pozitifliğinde bu indekslerin düşük bulunmaları şeklindedir. Çalışmamızda apoptotik, mitotik ve Ki-67 indeksleri arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır.

Proliferatif indekslerden PCNA ile yapılan bir çalışmada Hong JoChoi ve arkadaşları tümör grade ve stage'i arttıkça pro- liferatif indeksin arttığını bulmuş ancak Sun XF ve arkadaşları proliferatif indeks ve tümör grade ve stageleri arasında ilişki bulamamışlardır (26,29). Bizim çalışmamızda da anlamlı ilişki olmamakla birlikte stage IV tümörlerde Ki-67 ve mitotik indeks diğer gruplardan belirgin şekilde düşük çıkmıştır.

Bazı çalışmalarda proliferatif indeks ile apoptotik indeks arasında korelasyonlar bulunmuştur. Baretton ve arkadaşlarının çalışmalarında 93 kolorektal karsinomada Aİ 1.9 ± 1.45 % olarak bulunmuş; 44 (%47) olgu düşük, 49 olgu (%53) yüksek Aİ olarak değerlendirilmiştir. Aynı çalışmada Ki-67 ortalaması 28 ± 14 % olarak tespit edilmiş; 41 olgu (%44) düşük, 53 olgu (% 56) yüksek Ki-67 indeksli olarak değerlendirilmiş ve yüksek Aİ ile yüksek Ki-67 indeksleri arasında korelasyon saptanmıştır.

Çalışmamızda olguların ortalama Ki-67 değeri $39,68 \pm 2.03$ ortalama Apoptotik indeksi 2.02 ± 0.2 idi. Düşük Aİ sahip 34 olgu (%57.7), yüksek Aİ sahip 23 olgu (%42.3); düşük Ki-67 indeksli 31 olgu (%54.3), yüksek Ki-67 26 olgu (%45.7) bulun- du. Apoptotik ve Ki-67 indeksleri arasında korelasyon bulun- madı. Aİ ve Pİ indeksler ile tümör gradeleri arasında korelas- yon saptanmadı. Sadece Grade I tümörlerde Aİ belirgin şekilde diğer gruplardan düşük bulunmuştur. P53 ve c-erb-B2 ekspresyonu kolorektal karsinomalarda %30-70 arasında değişen oranlarda bildirilmekte ve bunların tek ya da birlikte salınımlarının kötü prognozu gösterdiği belirtilmektedir (2, 18, 22-25, 27, 28). Ancak bazı çalışmalarda bunların grade, stage ve prognostik önemi olmadığı vurgulanmıştır. Fante ve arkadaşlarının 150 kolorektal adenokarsinomlu hastada yaptık- ları çalışmada p53 pozitifliği %54.3, c-erb-B2 pozitifliği %68.4 olarak bulunmuş; iki onkoproteinin birlikte salınımı ise %28 oranında saptanmıştır. P53 ve c-erb-B2 salınımlarının tümör grade'i ve stage'i ile korelasyonu gözlenmiştir. Olgularda grade ve stage yükseldikçe onkoprotein salınımı artmıştır. Ancak bun- ların prognozla ilişkileri gözlenmemiştir.

Sonuç olarak onkoproteinlerin p53 ve bcl-2'nin kolorektal karsinogeneziste önemli rol oynadıkları ancak prognostik faktör olarak yerlerinin belirginleşmediği kabul edilmiştir. Apoptotik ve proliferatif indekslerinde diğer prognostik faktörlerle korelas- yonlarının her zaman görülmediği, birçok çalışmada farklı sonuçlar alındığı görülmüştür. Değerlendirilmelerde objektif kriterlerin ortaya konması ile bu farklılıkların azalacağı ve tümördeki onkoprotein ekspresyonları ile apoptotik ve prolife- ratif indekslerin prognostik faktör olarak tümör tanı ve tedavi- sine katkıda bulunacağı kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- Baretton GB, Diebolt J, Christoforis G, Vogt M, et al., Apoptosis and Immunohistochemical bcl-2 Expression in Colorectal Adenomas and Carcinomas. Cancer 1996; 77: 255-264.
- 2- Mosnier JF, Perret AG, Vindimian M, Dumollard JM, et al. An Immunohistochemical Study of the Simultaneous Expression of bcl-2 and p53 Oncoproteins in Epithelial Tumors of the Colon and Rectum. Arch Pathol Lab. Med. 1996; 120: 654-659.
- 3- Wada R, Matsukuma S, Abe H, Kuwabara N, et al. Histopathological Studies of Superficial-Type Early Colorectal Carcinoma. Cancer 1996; 77: 44-50.
- 4- Lauwers GY, Scott GV, Karpeh MS. Immunohistochemical Evalutaion of bcl-2 Protein Expression in Gastric Adenocarcinomas. Cancer 1995; 75: 2209-2213.
- 5- Nakamura T, Tabuchi Y, Nakae S, Ohno M, et al. Serum Carcinoembryonic Antigen Levels and Proliferating Cell Nuclear Antigen Labeling Index for Patients with Colorectal Carcinoma. Cancer 1996; 77: 1741-1746.
- 6- Sameshima S, Kubota Y, Sawada T, Watanabe T, et al. Overexpression of p53 Protein and Histologic Grades of Dysplasia in Colorectal Adenomas. Rectum 1996; 39: 562-567.
- 7- Eguchi S, Kohara N, Komuta K, Kanematsu T. Mutatitons of the p53 Gene in the Stool of Patients with Resectable Colorectal Cancer. Cancer 1996; 77: 1707-1710.
- 8- Kandiloğlu G. Hücre ölüm mekanizmaları içinde apoptozis. Apoptozis (Mekanizmaları-Tanı yöntemleri-Klinik önemi). Açılım Yayıncılık San. Tic. Ltd. Şti. İzmir 1995; 5-21.
- 9- Tsujitani S, Shirai H, Tatebe S, Sugamura K. Et al. Apoptotic Cell Death and Its Relationship to Carcinogenesis in Colorectal Carcinoma. Cancer 1996; 77: 1711-1716.
- 10- Kerr JFR, Winterfod CM, Harmon BV. Apoptosis. Cancer 1994; 73: 2013-2026.
- 11- Goldworthy TL, Conolly RB, Fransson SR. Apoptosis and cancer risk assesment. Chemical Industry Institute of Toxicology, Reearch Triagle Park, NC 27709-2137, USA.
- 12- Manning FC, Patierno SR. Apoptosis: İnhibitor or instigator of carcino- genesis?
- 13- Hockenbery DM. Bcl-2 in cancer, development and apoptosis. J Cell Sci Suppl 1994; 18 51-55.
- 14- McDonnell TJ, Marin MC, Hsu B, Brisbay SM, et al. The bcl-2 onco- gene: apoptosis and neoplasia. Radiat Res Dec 1993; 136: 307-312.
- 15- Watson AJ, Merritt AJ, Jones LS, Askew JN et al. Evidence of reci- procity of bcl-2 and p53 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. Br J Cancer. 1996; 73: 889-895.
- 16- Bosari S, Moneghini L, Graziani D, Lee Ak. Et al. bcl-2 and p53 onco- protein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarci- nomas. Hum Pathol 26: 534-540.

17. Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC. Et al. bcl-2 and p53 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas. *Hum Pathol* 26: 237-241.
18. Bhatavdekar JM, Patel DD, Ghash N, Chikhlikar PR, et al. Coexpression of bcl-2 c-Myc, and p53 Oncoproteins as Prognostic discriminants in Patients with Colorectal Carcinoma. *Rectum* 1997; 40: 785-790.
19. D'Sa-Eipper C, Subramanian T, Chinnadurai G, bfl-1, a bcl-2 homologue, suppresses p53-induced apoptosis and exhibits potent cooperative transforming activity. *Cancer Res.* 1996 56: 3879-3882.
20. Mueller J, Mueller E, Hoepner I, Jutting J, et al. Expression of bcl-2 and p 53 in de novo and ex-adenoma colon carcinoma : a comparative immunohistochemical study. *J. Pathol*, 1996 180: 259-265.
21. Kaklamanis L, Savage A, Mortensen N, Tsiotos P. et al. Early expression of bcl-2 protein in the adenomacarcinoma sequence of colorectal neoplasia. *J Pathol* 1996, 179: 10-14.
22. Kliftinger AM, Robinson BW, Quenville NF, Finley RJ, Davis NL. Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer. *Surg Oncol* 1992, 1: 97-105.
23. Tal M, Wetzler M, Josefberg Z, Deutch A, Et al. Sporadic amplification of the HER2/neu protooncogene in adenocarcinomas of various tissues. *Cancer Res.* 1988. 48: 1517-1520.
24. Yokozaki H, tahara E. Metastasis-related genes. *Gan To Kagaku Ryoho.* 1994 21: 2541-2548.
25. Shirai H, Ueno E, Osaki M, Tatebe S. Et al. Expression of growth factors and their receptors in human early colorectal carcinomas: immunohistochemical study. *Anticancer Res.* 1995 15: 2889-2994.
26. Sun XF, Carstenson JM, Stal O, Zhang H. Et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in relation to ras c-erbB-2, p53 clinicopathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1996. 69: 5-8.
27. Bosari S, Viale F, Bossi P, Maggioni M, et al. Cytoplasmic accumulation of p53 protein: an independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1994 86: 681-687.
28. Smith Dr, Goh HS. P53 and prognosis in colorectal cancer. *Ann Acad Med Singapore* 1996 25: 107-112.
29. Choi H; Jung IK, Kim SS; Hong SH. Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression and Its Relationship to Malignancy Potential in Invasive Colorectal Carcinomas. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 51-59.