

KOLOREKTAL KARSİNOMA VE ÖNCÜ LEZYONLARINDA MİKROSATELLİT İNSTABİLİTESİNİN İMMÜNHİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Seher YÜKSEL¹, Berna SAVAŞ², Elçin KADAN³, Arzu ENSARİ², Nazmiye KURŞUN⁴

¹ Gümüşhane Devlet Hastanesi Patoloji Bölümü

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

³ Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü

⁴ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı

Mikrosatellit instabilitesi:

- Sporadik KRK'lerin **%15' i**
- Mikrosatellit:
 - İnsan genomu boyunca dağınık yerleşimli, 1-5 baz arasında, kısa ve çiftler halinde tekrar eden DNA dizileri
 - DNA replikasyonu sırasında mikrosatellit allellerinin insersiyon veya delesyon ile uzunluğu değişebilmekte
- Hatalar normal koşullarda DNA "mismatch" onarım genleri (MMR) tarafından düzeltilmekte
- **MMR genlerinde oluşan mutasyon → Gende oluşan hata tamir edilememekte → Tekrarlayan nükleotid dizileri (mikrosatellit) oluşmakta → MSI**

Giriş

▶ KRK' da DNA " mismatch" onarım genleri (MMR)

▶ **MSH2-MSH6** → MSH2 major, MSH6 minör

▶ MSH2, MSH6'nin yokluğunda MSH3 ile eşleşmekte

▶ **MLH1-PMS2** → MLH1 major, PMS2 minör

▶ MLH1, PMS2'nin yokluğunda PMS1 ile eşleşmekte

MSI Deęerlendirmesi:

1. Moleküler (Bethesda):

- 2 mononükleotid tekrarı (BAT25, BAT26),
- 3 dinükleotid tekrarı (D5S346, D2S123, D17S250)
- Tümörlü dokudan elde edilen PCR ürünleri ile normal dokudaki mikrosatellit boyutları karşılaştırılır
- Normal doku ile karşılaştırılan tümörlü dokuda bu 5 lokustan 2 veya daha fazlasında farklılık saptanması MSI-H olarak adlandırılmakta

2. İmmünohistokimyasal:

- MMR proteinlerinin ekspresyon kaybının değerlendirilmesi
- Tümörde 1 veya daha fazla markerin nükleer immünreaktivitesinin tam kaybı MSI lehine deęerlendirilmekte

Amaç

- ▶ Farklı moleküler ve morfolojik özelliklerin tanımlanması ⇒
prognoz ve tedaviyi etkilemekte, rutin patoloji
uygulaması için gereklilik
- ▶ **Bu çalışmada;** KRK'nin ana moleküler
yolakları ile ilişkilendirilmiş adenoma-
karsinoma sekansı ve "serrated" polip-
karsinoma sekansını içeren öncü lezyonlar ve
kolorektal kanserlerde immünohistokimyasal
olarak MSI'nin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod-Olgu Seçimi

HİSTOLOJİK TİP	OLGU SAYISI (n)
Adenomatöz polip (TA-VA-TVA)	60 (20-20-20)
Hiperplastik-"serrated" polip (HP-SSA/P-TSA)	58 (31-23-4)
Konvansiyonel Adenokarsinoma (Sağ kolon-Sol kolon)	46 (23-23)
Müsinöz Adenokarsinoma (Sağ kolon-Sol kolon)	46 (23-23)
TOPLAM	210

Materyal ve Metod-İmmünohistokimya

Antikor	Klon	Dilüsyon	Ticari İsim
MLH1	ES05	1/50	Novocastra
MSH2	G219-1129	Kullanıma hazır	Cell marque
MSH6	PU29	1/100	Novocastra
PMS2	MOR4G	1/25	Leica

Materyal ve Metod-İstatistiksel Değerlendirme

- ▶ SPSS Win. Ver. 20.0 paket programı
 - ▶ “Mann-Whitney U” testi,
 - ▶ “Chi Square” test
 - ▶ “Fisher exact” test
- ▶ $p < 0.05$

Bulgular - İmmünohistokimya

► MSI'nin Değerlendirilmesi

- Kolon mukoza kript epiteli, lenfositler, endotel hücreleri



internal pozitif kontrol

- MLH1
- MSH2
- MSH6
- PMS2

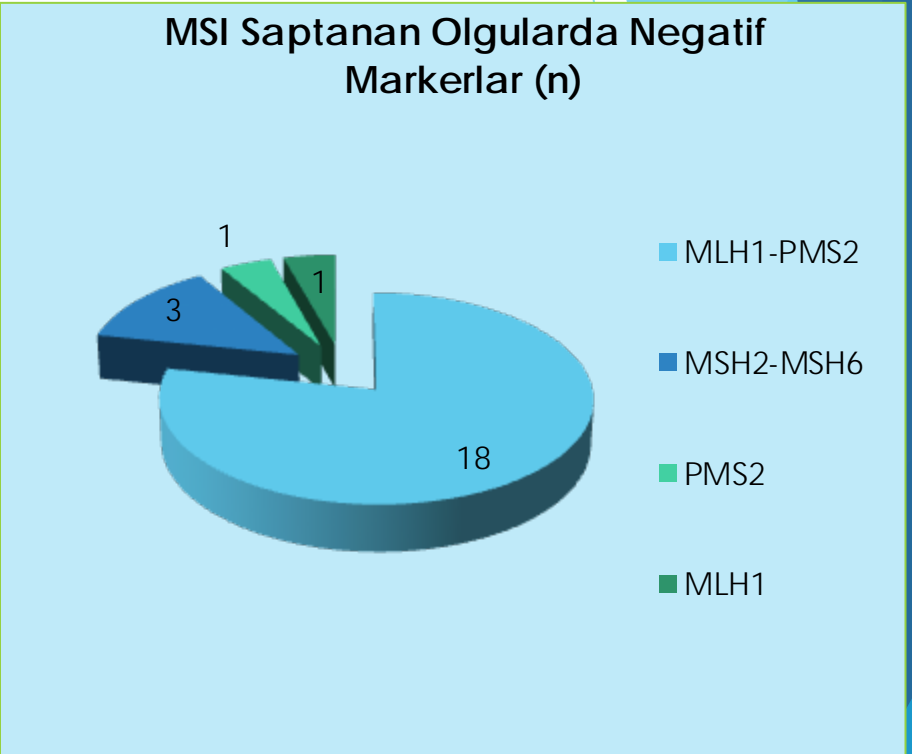
MSI

Herhangi birinde tam kayıp olması (*internal kontrol varlığında*)

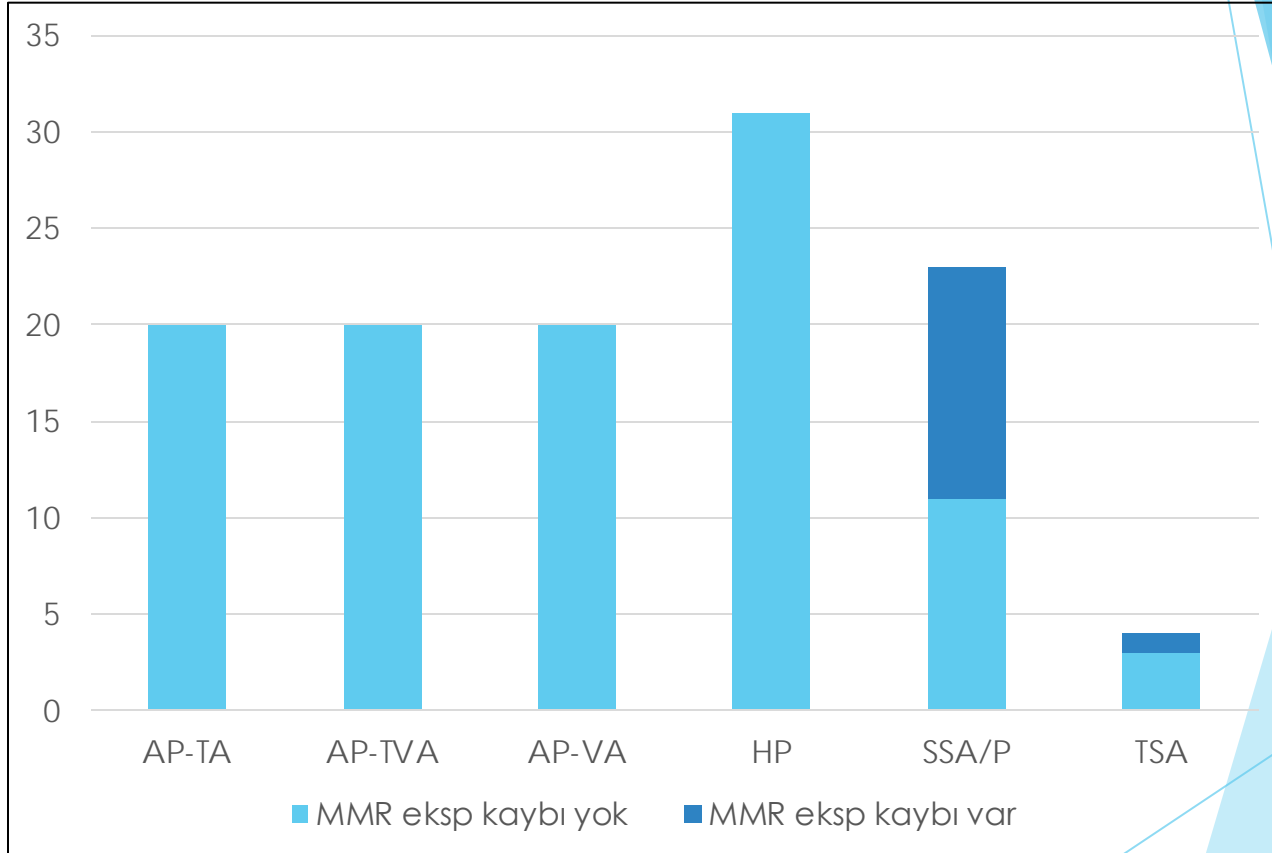
MSS

Tümör hücrelerinde ve polipi oluşturan hücrelerde nükleer boyanmanın olması

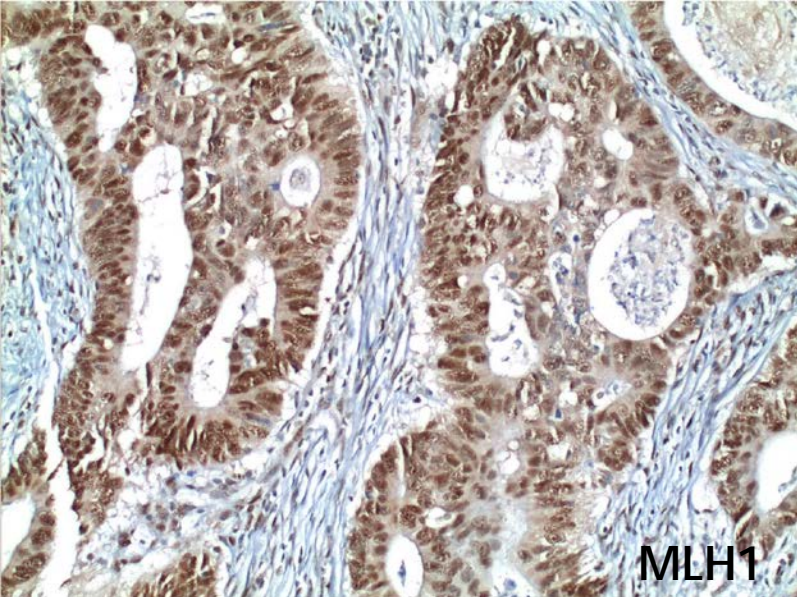
Bulgular – İHK – KRK grubu



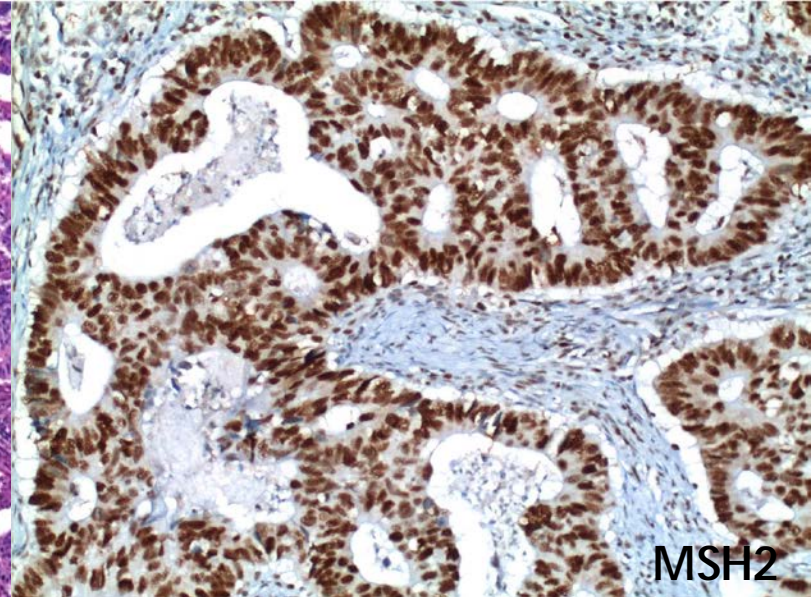
Bulgular – İHK - Polip Grubu



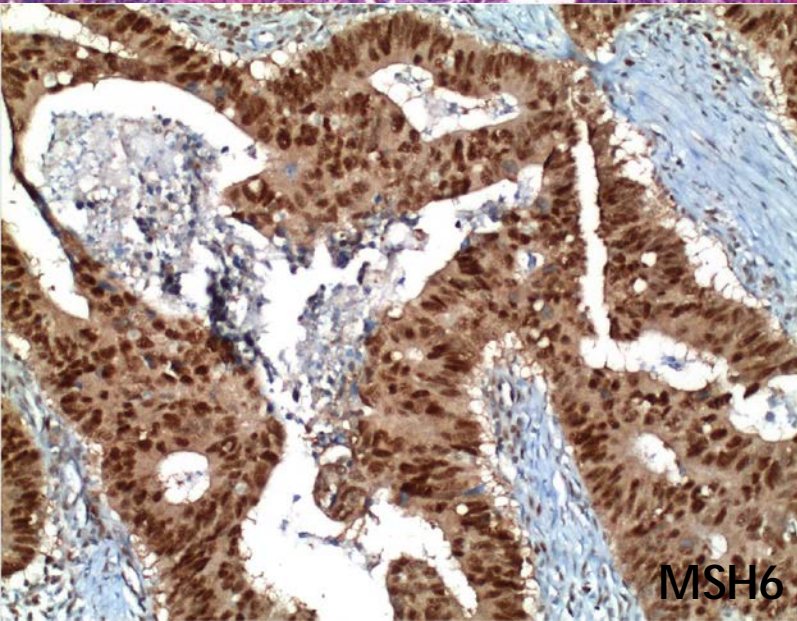
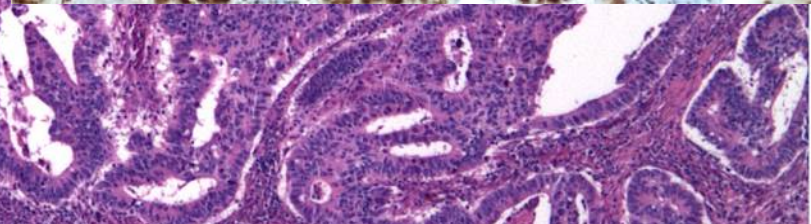
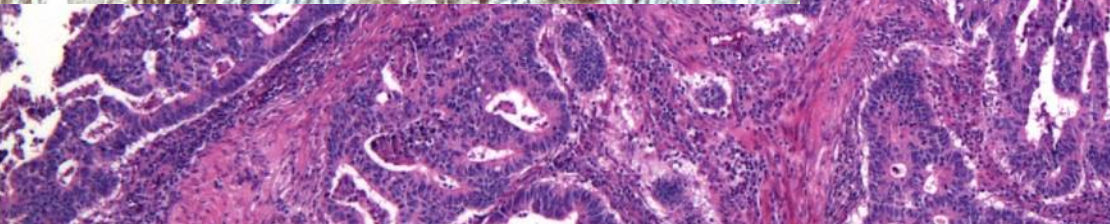
*** MLH1 ile fokal ekspresyon kaybı



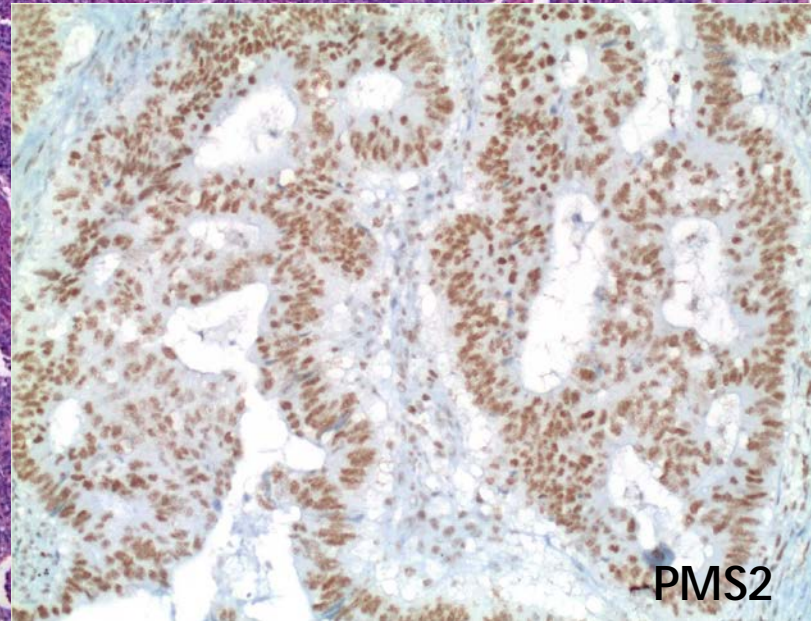
MLH1



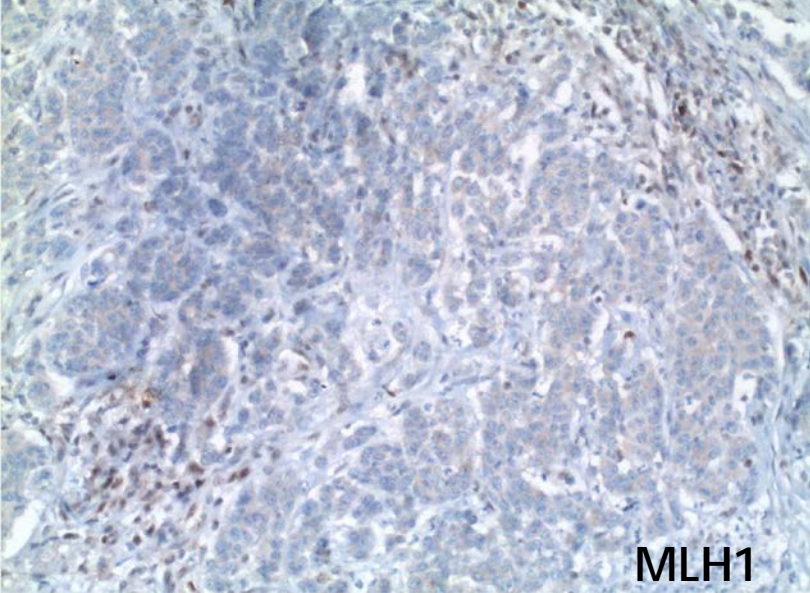
MSH2



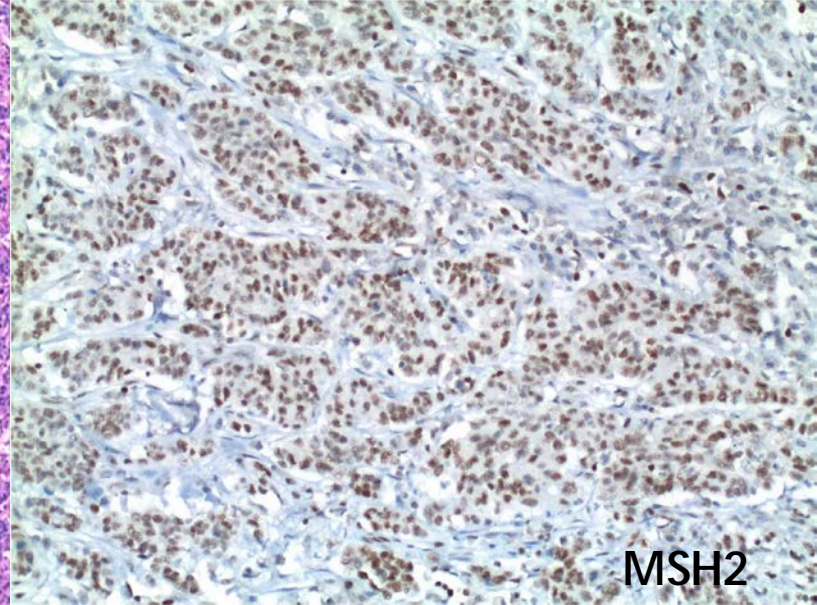
MSH6



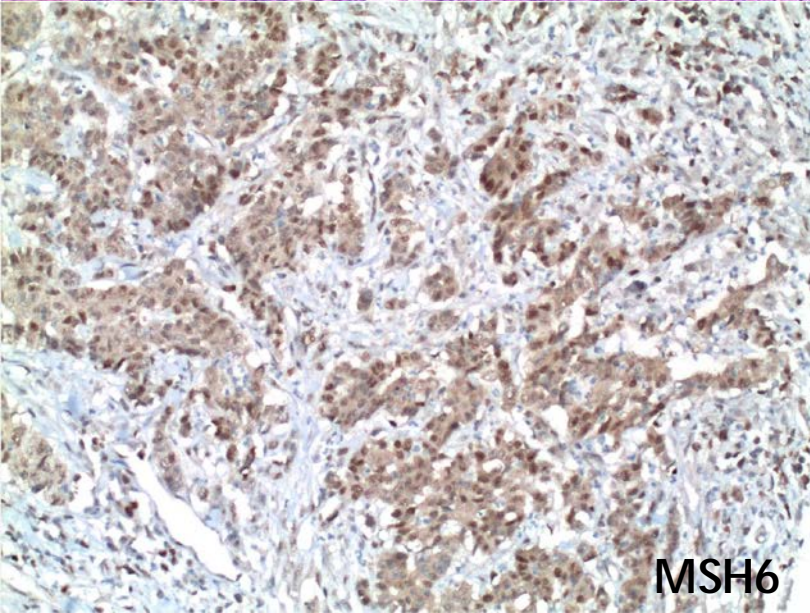
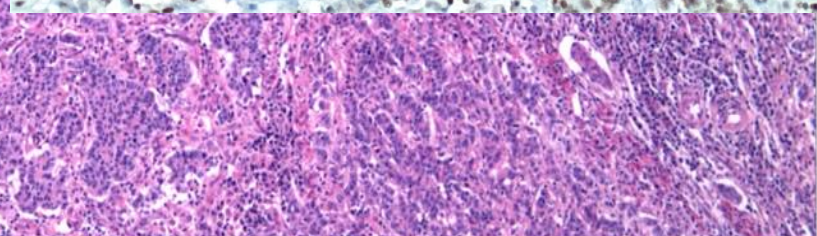
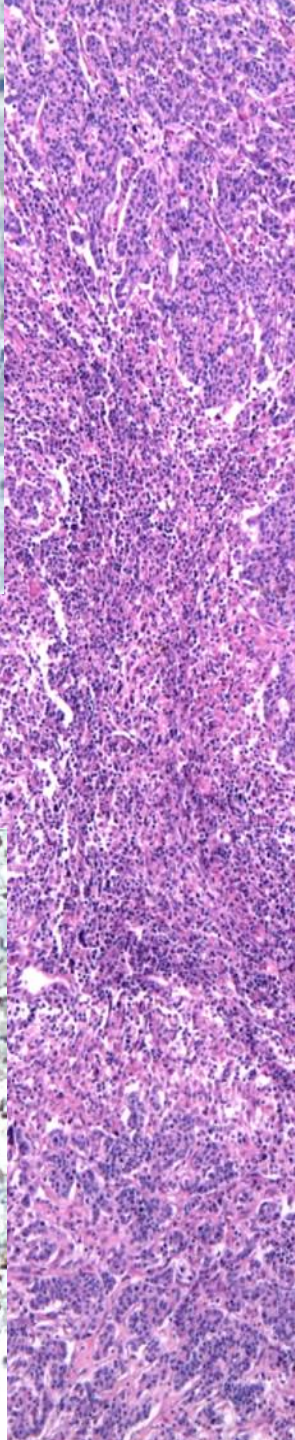
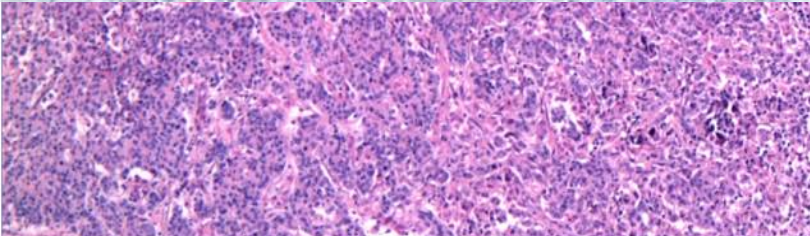
PMS2



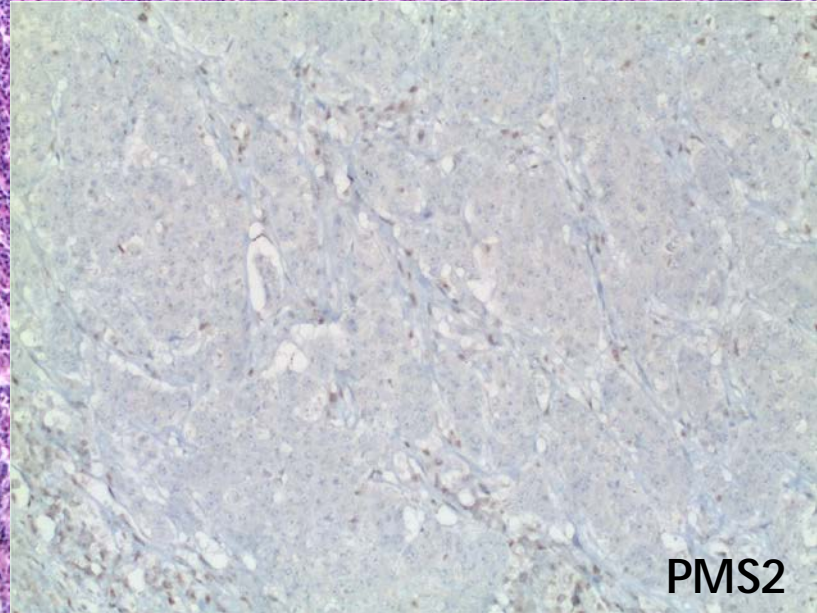
MLH1



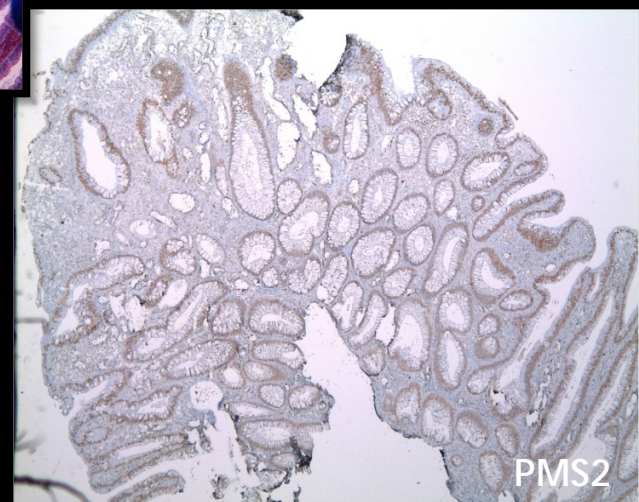
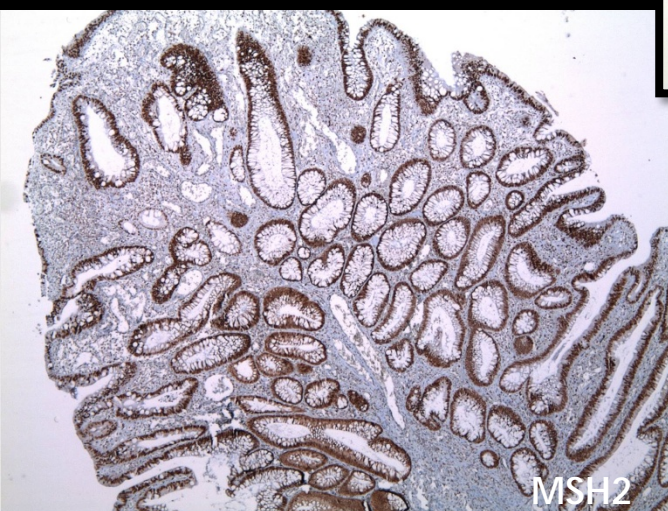
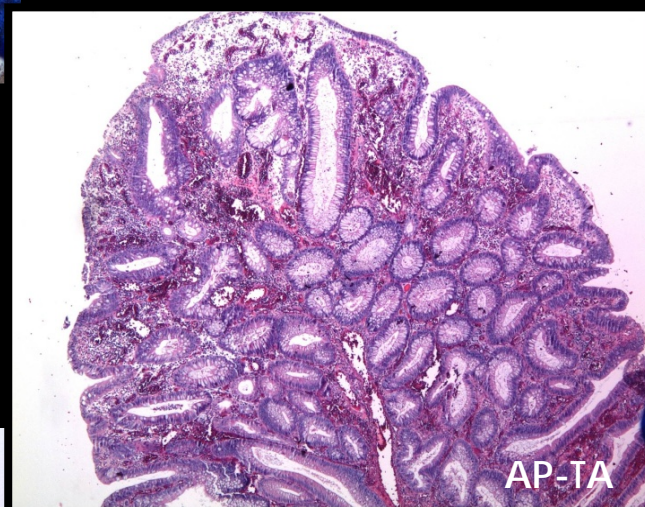
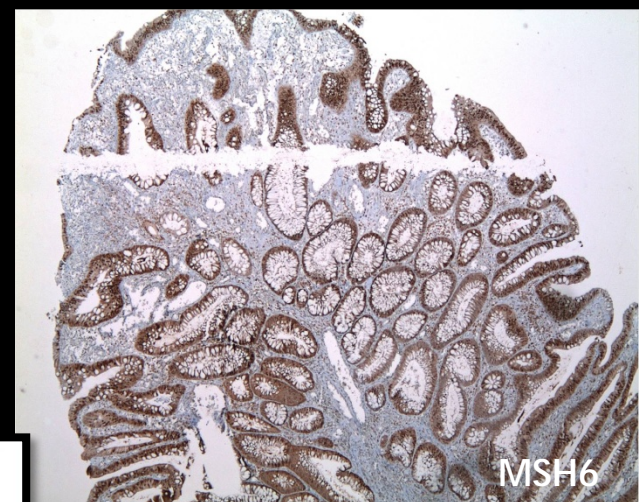
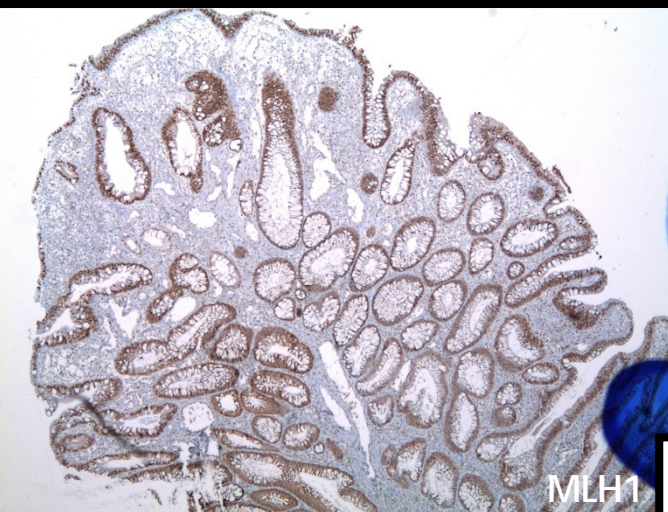
MSH2

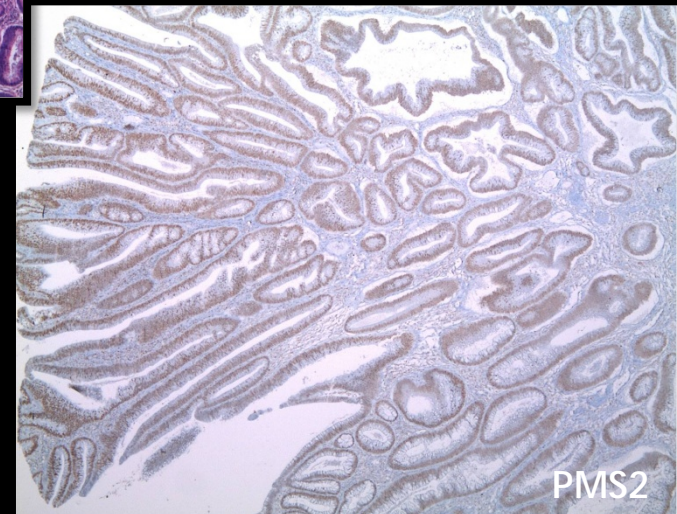
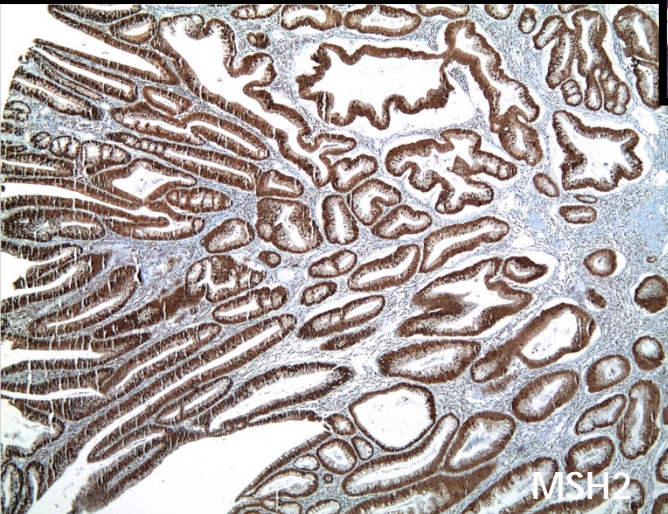
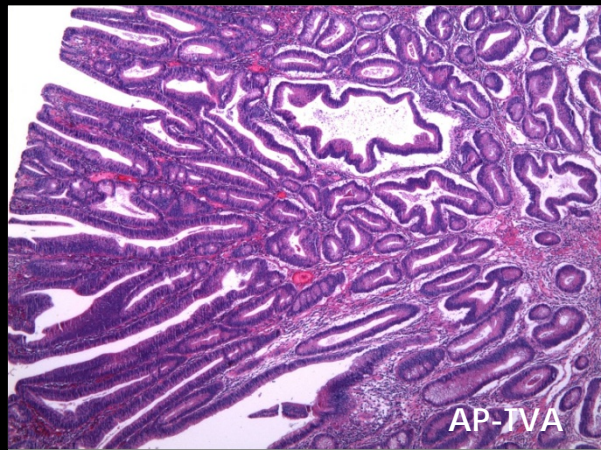
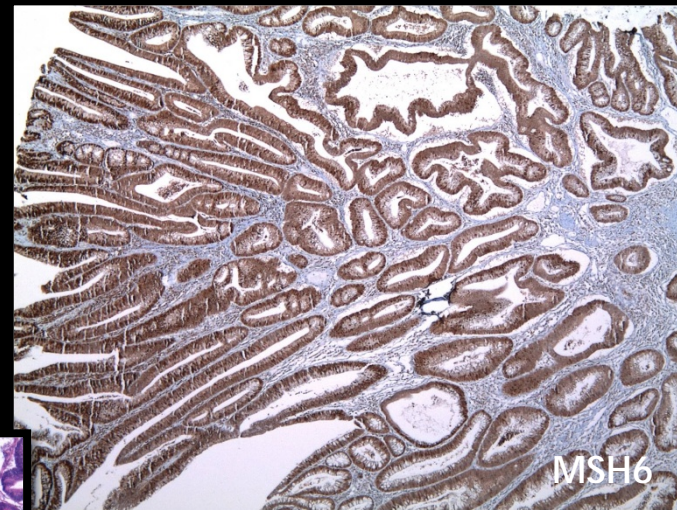
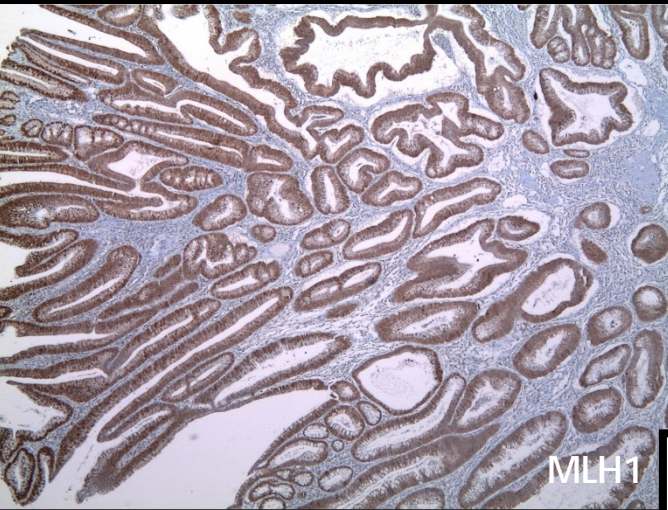


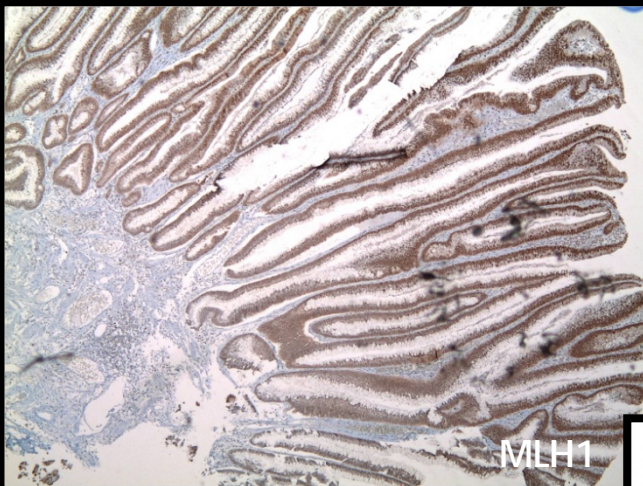
MSH6



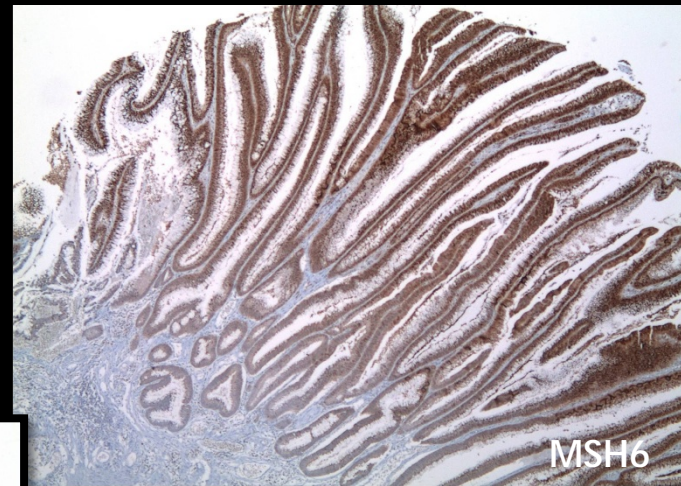
PMS2



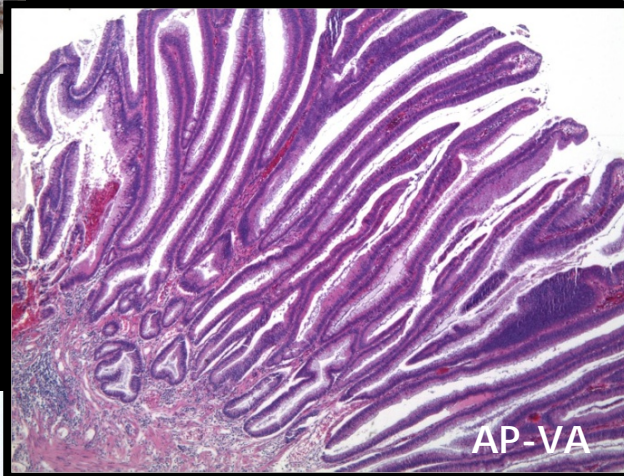




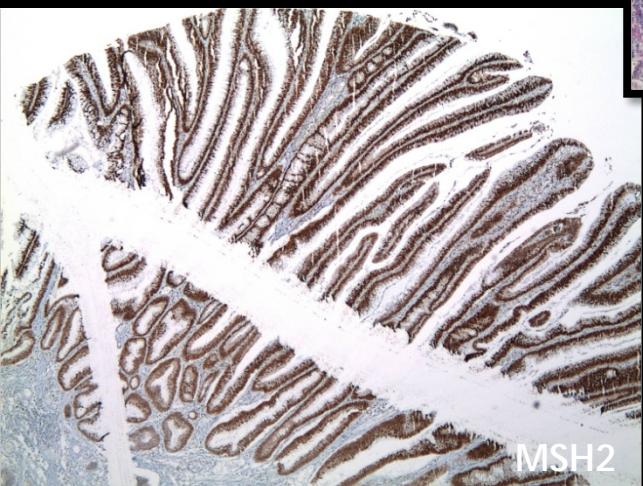
MLH1



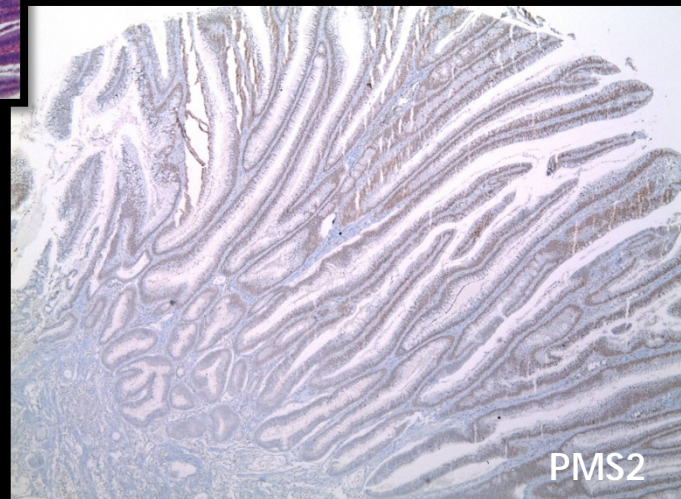
MSH6



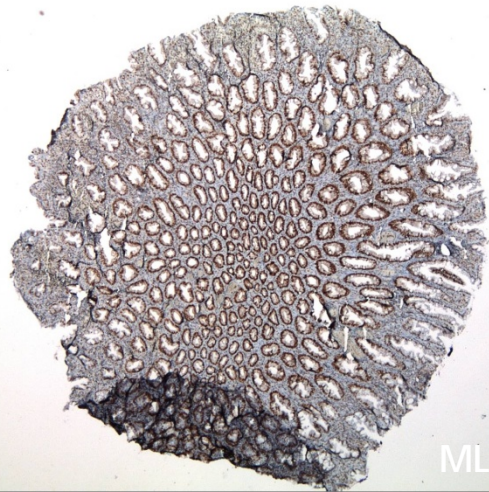
AP-VA



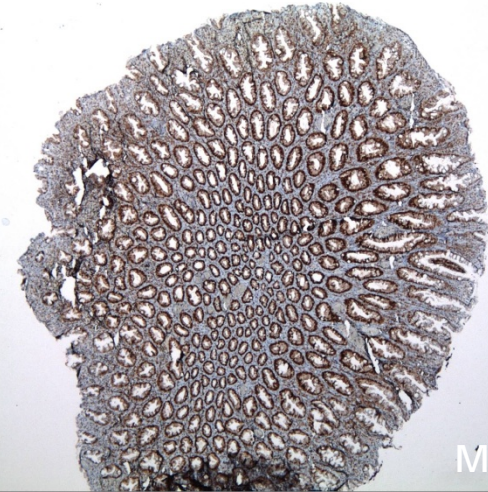
MSH2



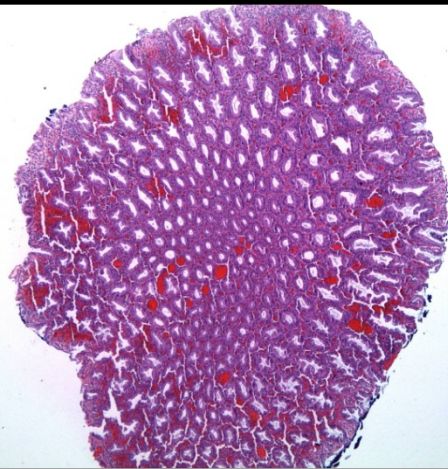
PMS2



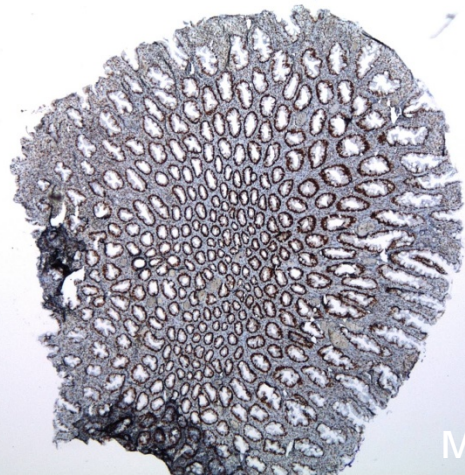
MLH1



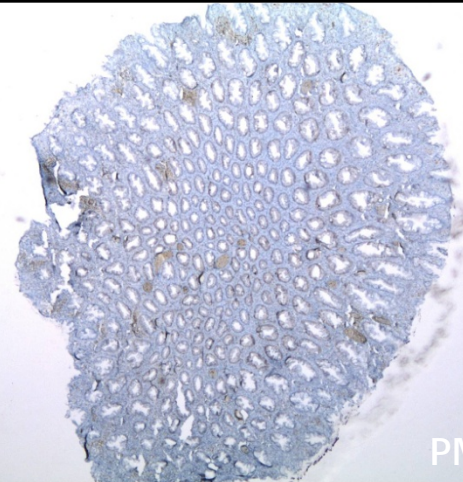
MSH6



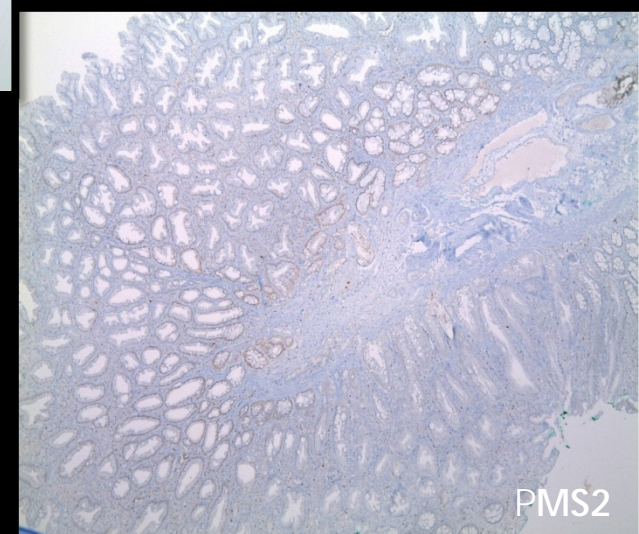
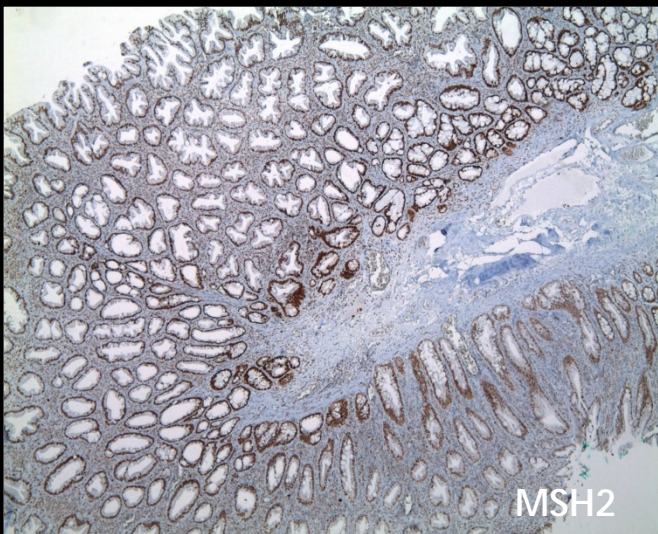
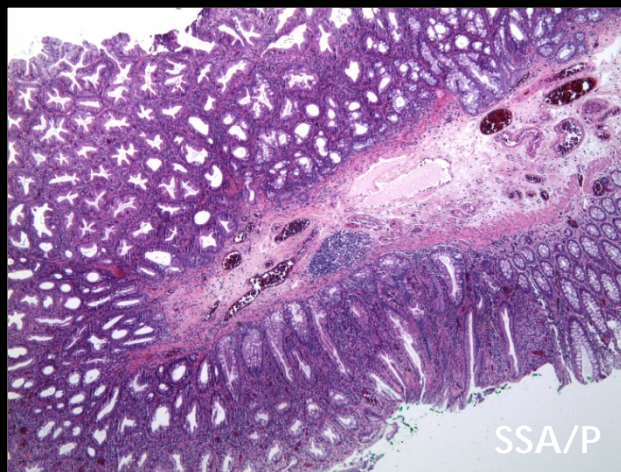
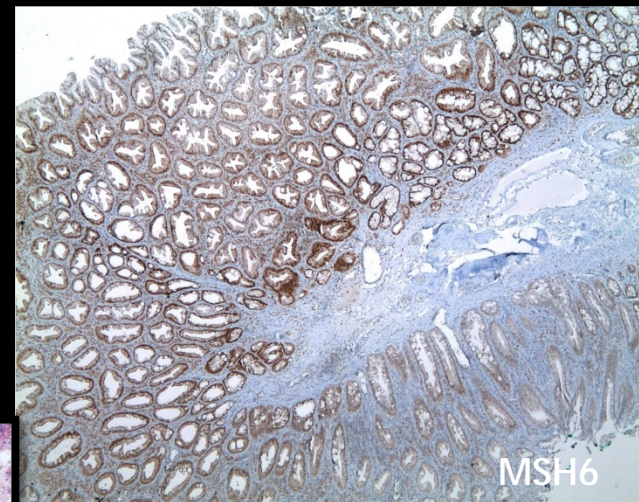
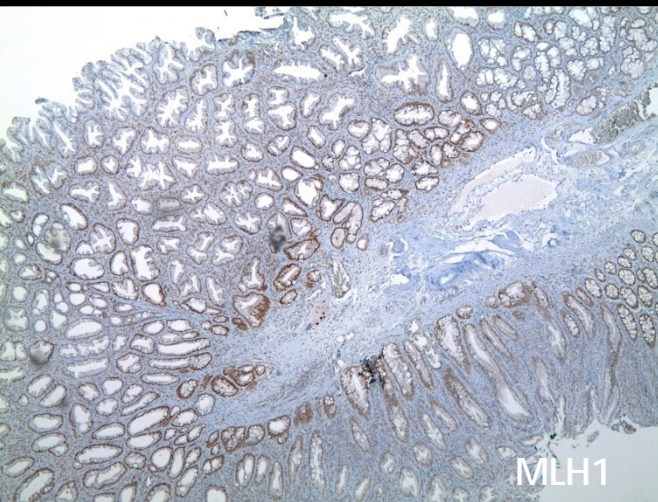
HP

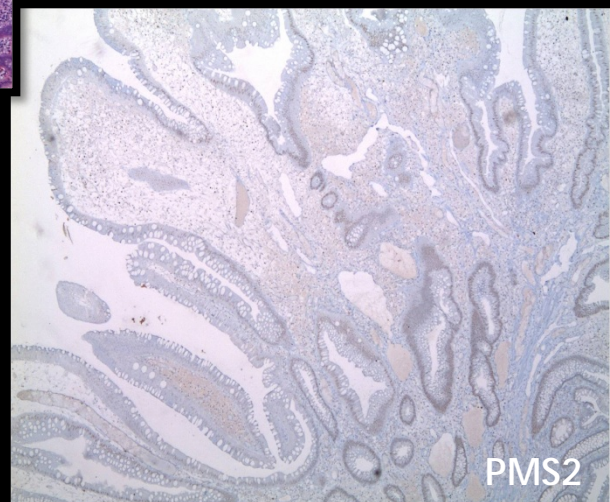
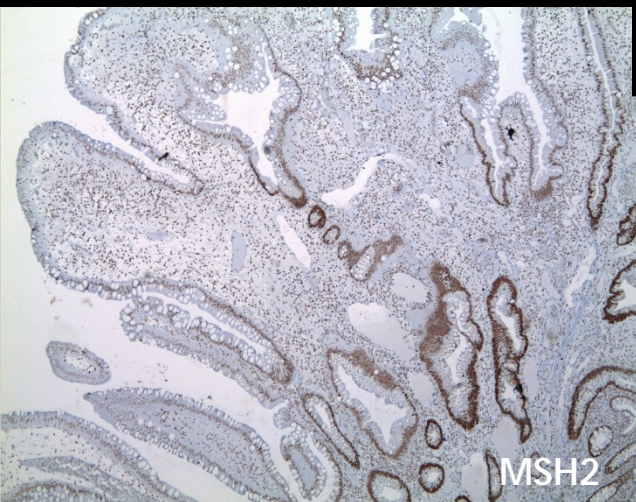
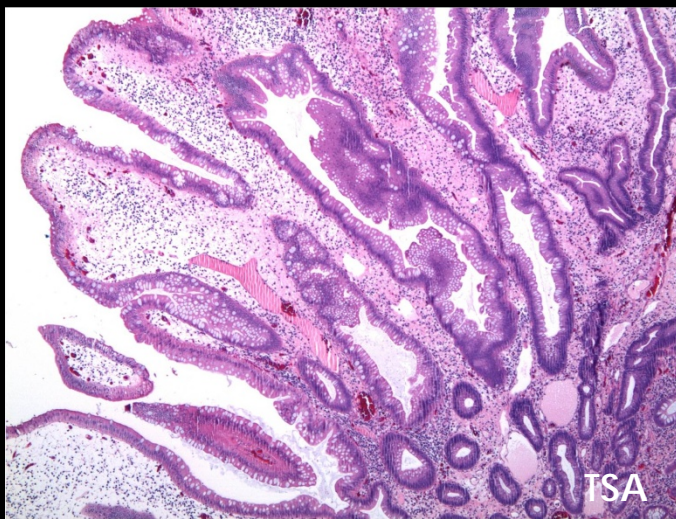
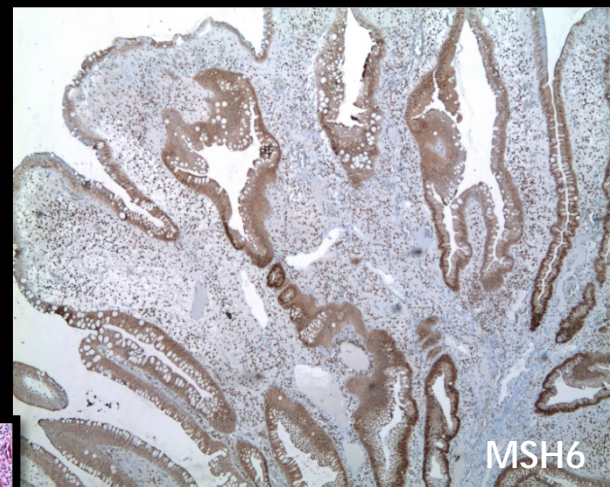
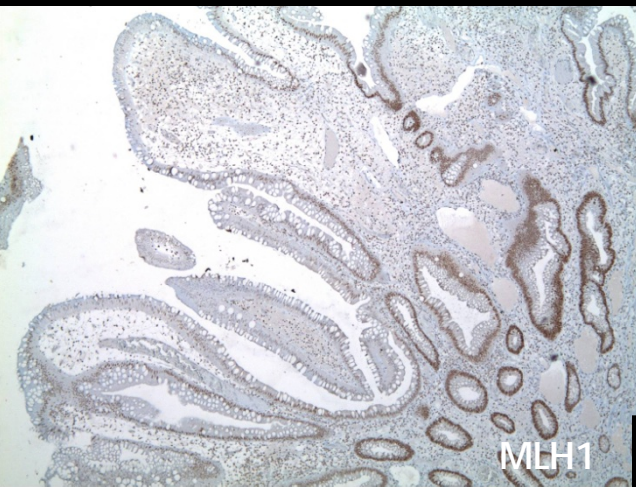


MSH2



PMS2





Tartışma

▶ KRK:

- ▶ Tüm dünyada kanser ilişkili ölümlerin **önemli nedenleri arasında**
 - ▶ Tüm yeni tanı alan kanserler içinde **%9,7** oranına sahip
 - ▶ Ülkemizde doktora başvurma genellikle ileri evrede
 - ▶ Cerrahi tedaviyanında diğer tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmakta
-
- ▶ MSI durumunun belirlenmesi klinik olarak **prognostik öneme sahip**
 - ▶ **MSI gösteren tümörlerin**, MSS tümörlere ve kromozomal instabilite gösteren tümörlere göre daha **iyi prognoza sahip**
 - ▶ MSI gösteren tümörlerin standart tedavide kullanılan kemoterapatik ilaçlara cevabının **az olduğu** ve "**topoisomerase inhibitör irinotecan**" tedavisinden yarar görebileceği bildirilmekte

Tartışma

- ▶ MSI durumu
 - ▶ moleküler ("gold standart) veya
 - ▶ immünohistokimyasal yöntemlerle yapılabilmekte
- ▶ Moleküler yöntemin uygulanması maliyet 
- ▶ İmmünohistokimyasal yöntem ise hem uygulanabilirliği hem de maliyet açısından daha kullanışlı

Tartışma

▶ Moleküler-İHK

- ▶ İmmünohistokimya ile MSI değerlendirmesi sensitivitesi %92 ve spesifitesi %100 bulunmuştur.

Lindor et al. J Clin Oncol 2002; **20**(4): 1043-1048

▶ Doku 'makroarray' bloęu

- ▶ Doku mikroarray bloğundaki 0,6 mm uzun çaplı 4 korun doğruluk oranı %100 olarak bildirilmektedir.

Jourdan et al. Virchows Arch 2003; **443**: 115-121

- ▶ Literatür desteği ile 4 mm uzun çaplı korlar içeren makroarray blokları kullanılmıştır.

Tartışma

KRK	South et al 2009	Pqrk et al 2010	Yoon et al 2011	Kaur et al 2011	Lindor et al 2011	Çalışmamız
MMR ekspresyon kaybı	%21,1	%11,3	%10	%18,6	%28,4	<u>%25</u>

MMR ekspresyon kaybı	MLH1-PMS2 birlikte negatif	MSH2-MSH6 birlikte negatif	PMS2 negatif	MLH1 negatif
Çalışmamız	18/23 (%78,26)	3/23 (%13,04)	1/23 (%4,35)	1/23 (%4,35) <small>*PMS2 teknik boyanma yok</small>

MMR ekspresyon kaybı + tm	Park et al 2010	Yoon et al 2011	Kaur et al 2011	Çalışmamız
Boyut	6,3 ±2,3 cm	≥ 6 cm (%59,4)	-	Ort 6,43 cm (p<0,05)
Lokalizasyon	%52,8 sağ kolon %47,2 sol kolon	%53,1 sağ kolon %47,9 sol kolon	Sağ yerleşimli %45 Sol yerleşimli %11,8	%82,6 sağ kolon %17,4 sol kolon
Grade	%80,6 iyi ve orta dif %19,4 az dif	%68 iyi ve orta dif %32 az dif	%86 orta ve az dif	%26,1 orta dif %73,9 az dif
Tümör tipi	%88,9 konv. %11,1 müsinöz	-	%71 konv.	%60,9 konv %39,1 müsinöz
pT	%61,1 T3 %33,3 T4	%97,1 T3/T4	-	%78,3 T3
Lenf nodu met (N)	%63,9 N0 %27,1 N1	%68,5 N0 %31,5 N1/2	-	%65,2 N0 %34,8 N1/2
Uzak metastaz	%100 M0	%98 M0	-	%100 M0

Tartışma

Sporadik polip	Hawkins et al 2001	Balbinotti et al 2007	Molaei et al 2011	Çalışmamız
Adenomatöz polip	%6 eksp kaybı (Hepsinde MSI gösteren KKK +)	%35,5 eksp kaybı	%10 eksp kaybı	Eksp kaybı yok
Hiperplastik- 'Serrated' polip	%30 eksp kaybı (9/15 HP, 6/15 SSA/P)	Eksp kaybı yok	%40 eksp kaybı	%22 eksp kaybı

- Çalışmamızda fokal ekspresyon kaybı gösteren 13 polipten 8'i "serrated" polipozis olgusuna ait
 - Rezeksiyon materyalinde ayrıca çıkan kolonda yerleşim gösteren adenokarsinom
- MLH1' de fokal ekspresyon kaybı gösteren SSA/P tanısı olan 2 olgunun kolonunda polipektomilerden daha sonra adenokarsinom gelişimi

Tartışma

- ▶ Literatürde “serrated” poliplerde MMR protein ekspresyonu ile ilgili farklı görüşler de bulunmakta
- ▶ “Serrated” poliplerde sıklıkla yüzeyel epitelde ve süperfisyal kriptlerde fokal MLH1 ve/veya MSH2 ekspresyon kaybı bulunduğu ve bunun MSI yansıtmayacağını bildiren yayınlar (+)

American Journal of Surgical Pathology 2003; **27**(1): 65–81
Histopathology 2005; **47**: 32–40

Sonuçlar

- ▶ KRK olgu grubumuzda immünohistokimyasal ekspresyon kaybı %25
 - ✓ *Daha büyük boyutlu,*
 - ✓ *Daha çok sağ kolon yerleşimli,*
 - ✓ *Daha çok grade 3 özellikte,*
 - ✓ *Daha az lenf nodu metastazı gösteren,*
 - ✓ *Uzak metastaz göstermeyen tümörler.*
- ▶ AP' lerde MMR protein ekspresyon kaybı Ø
- ▶ HP' lerde MMR protein ekspresyon kaybı Ø
- ▶ SSA/P ve TSA' da MLH1 ile fokal ekspresyon kaybı gösteren olgular +
 - ▶ *Fokal ekspresyon kaybı gösteren SSA/P olgularının bir kısmında tümör olması nedeniyle böyle olguların klinik olarak kolonun diğer segmentlerinde tümör ve polip varlığı yönünden araştırılması ve uygun aralıklarla takip edilmesi*

TEŐEKKÜRLER...