ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ PATOLOJİ

KOLOREKTAL ADENOKARSİNOMLARDA LİZİL OKSİDAZ VE MASPİN EKSPRESYONUN, TÜMÖR MİKROÇEVRESİ, MOLEKÜLER PROFİLİ VE PROGNOSTİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ayça Dilşad Çağlayan

ANKARA, EKİM 2021

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ PATOLOJİ

KOLOREKTAL ADENOKARSİNOMLARDA LİZİL OKSİDAZ VE MASPİN EKSPRESYONUN, TÜMÖR MİKROÇEVRESİ, MOLEKÜLER PROFİLİ VE PROGNOSTİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ayça Dilşad Çağlayan

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Hayriye Tatlı Doğan

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Ayşegül Aksoy Altınboğa

ANKARA, EKİM 2021

KABUL VE ONAY SAYFASI

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurullar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

TEŞEKKÜR

Eğitimimde emeği geçen, tez çalışmamın her aşamasında bana destek ve yol gösterici olan sevgili tez danışmanım Doç. Dr. Hayriye Tatlı Doğan'a, tez çalışmamda ve eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan sevgili ikinci danışmanım Doç. Dr. Ayşegül Aksoy Altınboğa'ya,

Asistanlığa başladığım ilk günden bugüne kadar, üzerimde büyük emekleri bulunan, desteğini ve hoşgörüsünü her zaman hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Fazlı Erdoğan'a,

Birlikte çalıştığım süre boyunca bilgi ve tecrübelerini aktaran değerli Prof. Dr. Sezer Kulaçoğlu, Prof. Dr. Nesrin Turhan, Prof. Dr. Murat Alper ve Prof. Dr. Berrak Gümüşkaya Öcal olmak üzere tüm hocalarıma,

Asistanlık süresi boyunca bana yol arkadaşı olan başta sevgili Dr. Elif Doğan ve Dr. Betül Günbey Yılmaz olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

Sevgili Betül Güreş ve Selinay Timoçin başta olmak üzere tüm laboratuvar ekibimize,

Tüm hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini her zaman hissetiğim, bugünlere gelmemde sonsuz emekleri bulunan kıymetli anne ve babama,

Bu süreçte her konuda yanımda olan, desteğini sürekli hissettiğim, hayat arkadaşım sevgili eşim Adem Çağlayan'a sonsuz teşekkür ederim.

TEŞEKKÜR ..... **I**

KISALTMALAR ..... **IV**

TABLOLAR ..... **VI**

ŞEKİLLER ..... **VIII**

RESİMLER ..... **X**

ÖZET ..... **XII**

ABSTRACT ..... **XIV**

GİRİŞ VE AMAÇ **1**

GENEL BİLGİLER **4**

1. Kolonun normal yapısı 4

2. Kolon adenokarsinomları 7

2.1. Moleküler patogenez 8

2.1.1 Kromozomal instabilite 10

2.1.2 Mikrosatellit instabilite 13

3. Kolorektal kanserlerde prognostik parametreler 20

3.1. Histolojik subtipler 20

3.2. Derecelendirme 23

3.3. Evreleme: TNM 24

3.4. Vasküler invazyon 37

3.5. Perinöral invazyon 28

3.6. Cerrahi sınır durumu 29

3.7. Tümör boyutu 29

3.8. Tümör lokalizasyonu 30

3.9. Lenf nodu sayısı ve metastaz durumu 35

3.10. Tedaviye yanıt 37

3.11. Tümör tomurcuklaması ve az diferansiye hücre kümeleri..... 38

3.12. Peritümöral stroma 43

3.13. Tümöre karşı gelişen immün yanıt 47

3.14. Moleküler özellikler 50

3.15. Prediktif biyomarkerlar 54
4. Tedavi 55
5. İmmünhistokimya 57
5.1. Maspin 57
5.2. Lizil oksidaz 61
MATERYAL METOD 64
1. Olguların seçimi ve değerlendirilmesi 64
2. İnfiltrasyon paterni 65
3. Tümör tomurcuklanması 65
4. Az diferansiye kümeleri.....65
5. Desmoplastik reaksiyon paterni 66
6. Tümörü infiltre eden lenfositler ve Crohn benzeri reaksiyonun 68
7. İmmünhistokimyasal yöntem 70
8. İmmünhistokimyasal değerlendirme 70
9. Moleküler analiz 77
10. İstatistiksel analiz 78
BULGULAR 80
1.Demografik ve Klinik Bulgular 80
2. Maspin ekspresyonu ile diğer parametrelerin ilişkisi 84
3. LOX ekspresyonu ile diğer parametrelerin ilişkisi 87
4. Desmoplastik stroma paterni ile diğer parametrelerin ilişkisi 92
5. Tümör tomurcuklanması ile diğer parametrelerin ilişkisi.....94
6. Az diferansiye kümeler ile diğer parametrelerin ilişkisi 96
7. Tümör lokalizasyonu ile diğer parametrelerin ilişkisi 98
TARTIŞMA 100
SONUÇLAR 118
KAYNAKLAR 121
ÖZGEÇMİŞ 128

KISALTMALAR

ADK: Az diferansiye hücre kümeleri

AJCC: American Joint Committee on Cancer

APC: Adenomatous Polyposis Coli

CAF: Cancer associated fibroblast

CIMP: CpG adası metilatör fenotip

CIN: Kromozomal instabilite

CMS: Consensus Molecular Subtype

DCC: Deleted in Colorectal Carcinoma

d-MMR: deficient MMR

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EMT: Epitelyal-mezenkimal transizyon

EMVI: Ekstramural vasküler invazyon

HPNCC: Herediter Non Polipozis Kolorektal Karsinom

İBH: İnflamatuar barsak hastalığı

IDL: Insertion/Deletion Loops

İHK: İmmünohistokimyasal

KRAS: Kirsten Rat Sarcoma-2

KRK: Kolorektal karsinom

LOH: Loss of heterozygosity

LOX: Lizil Oksidaz

MAPK: Mitojenle Aktive Protein Kinaz

Maspin: Mammary Serine Protease İnhibitor

MET: Mezenkimal-epitelyal transizyon

MLH: Mut L homoloğu

MMR: Mismatch repair

MSH: Mut S homoloğu

MSİ: Mikrosatellit İnstabilite

MSS: Mikrosatellit stabil

NOS: Not otherwise specified

PDC: Poorly differentiated clusters

p-MMR: proficient MMR

PMS: Post-meiotic Segregation-1

POLE: DNA polymerase epsilon

SCNA: Somatic Copy Number Alteration

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TİL: Tümörü İnfiltre eden Lenfositler

TMA: Tissue Microarray

TABLOLAR

Tablo 1: Mismatch repair proteinlerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

Tablo 2: AJCC Prognostik evreleme sistemi.

Tablo 3: Preneoplastik lezyonların ve kolorektal kanserlerin lokalizasyona göre moleküler özellikleri

Tablo 4: Onkogen ve Tümör supresör mutasyon oranları

Tablo 5: Kolonun anatomik alt bölgeleri için bölgesel lenf nodlar

Tablo 6: Maspin ekspresyonun değerlendirilmesi ve gruplanması

Tablo 7: Tümördeki LOX ekspresyonun değerlendirilmesi

Tablo 8: Analizin termal aşamaları

Tablo 9: Demografik ve patolojik bulgular

Tablo 10: Maspin ekspresyonu ile patolojik parametrelerin ilişkisi

Tablo 11: Maspin gruplarının karşılaştırılması

Tablo 12: Maspin ekspresyonu ile hastalıksız sağkalım arasındaki ilişki

Tablo 13: Olgularda izlenen maspin ekspresyonu ile hastaların genel sağkalımı arasındaki ilişki

Tablo 14: Tümörün epitelyal komponentindeki LOX ekspresyonu ile diğer paramatreler arasındaki ilişki

Tablo 15: Tümördeki LOX ekspresyonu ile stromal LOX ekspresyonu ve maspin ekspresyonu arasındaki ilişki

Tablo 16: Evre IV hastalarda tümördeki LOX ekspresyonun diğer parametreler ile ilişkisi

Tablo 17: Evre IV hastalarda tümördeki LOX ekspresyonu ile ADK arasındaki korelasyon

Tablo 18: Evre IV hastalarda tümördeki LOX ekspresyon ile progresyonsuz sağkalım arasındaki ilişkisi

Tablo 19: Stromadaki LOX ekspresyonu ile prognostik parametreler ve maspin ekspresyonu arasındaki ilişki

Tablo 20: Stromadaki LOX ekspresyon grupları arasında maspin ekspresyonun karşılaştırılması

Tablo 21: Desmoplastik stroma paterni ile prognostik veriler arasında anlamlı ilişki tespit edilen parametreler

Tablo 22: Stroma paterni ile tomurcuklanma arasındaki korelasyon

Tablo 23: Tümör tomurcuklanması ile prognostik veriler arasındaki ilişki

Tablo 24: Tümör tomurcuklanması ile diferansiyasyon ve stroma paterni arasındaki korelasyon

Tablo 25: Az diferansiye kümeler ile prognostik veriler arasındaki ilişki

Tablo 26: Az diferansiye kümeler ile diferansiyasyon ve evrenin korelasyonu

Tablo 27: Tümör lokalizasyonu ile prognostik parametreler arasındaki ilişki

Tablo 28: Tümör lokalizasyonu ile genel sağkalım arasındaki ilişki

Tablo 29: Kolorektal karsinomlarda, Maspin'in tümör süpresör fonksiyonunu destekler nitelikte sonuçlara ulaşan çalışmalar

Tablo 30: Kolorektal karsinomlarda, Maspin ile kötü prognoz arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmalar

ŞEKİLLER

Şekil 1: Kolon ve rektumun çeşitli seviyelerinde peritoneal ve mezenterik ilişkileri

Şekil 2: Kolon karsinogenezinin mismatch repair yolağındaki morfolojik ve moleküler değişiklikler.

Şekil 3: Adenomatoz polipozis kolinin (APC) β-katenin stabilitesini ve fonksiyonunu düzenlemedeki rolü.

Şekil 4: EGFR yolağı

Şekil 5: Mismatch repair mekanizması

Şekil 6: T evreleme şeması

Şekil 7: Sağ ve sol kolon segmentleri

Şekil 8: Sağ-sol kolon arasındaki anahtar biyolojik farklılıklar

Şekil 9: Tümördeki ve normal dokudaki ekstrasellüler matriks modeli

Şekil 10: Tümör mikroçevresinde, kanser hücreleri ile kanser ilişkili fibroblastlar arasındaki etkileşim

Şekil 11: dMMR/MSİ sonucunda gelişen tümör ilişkili mekanizmalar. (TGF-β geninde ortaya çıkan mutasyon sonucu DNA onarımı yapılamaması nedeniyle meydana gelen *frameshift* mutasyonu örneği ve sonuçları)

Şekil 12: Cancer Genome atlas (2013) ve moleküler konsensus altiplerin karşılaştırması

Şekil 13: Moleküler alt tip konsensus gruplarının temel özellikleri *(consensus molecular subtype-CMS)*

Şekil 14: Hücre içindeki veya dışındaki lokalizasyonuna dayalı olarak maspin için olası işlevleri gösteren bir model.

Şekil 15: LOX'un tümör supresör ve prometastatik etkisinin oluşturduğu denge.

Şekil 16: LOX'un direkt ve dolaylı olarak sinyal yolaklarını etkilemesi.

Şekil 17: Desmoplastik stroma paternini değerlendirme şeması

Şekil 18: Maspin ekspresyon ile hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım arasındaki ilişki

Şekil 19: Evre IV hastalarda tümördeki LOX ekspresyonu ile progresyonsuz sağkalım arasındaki ilişki

Şekil 20: Tümör lokalizasyonu ile sağkalım arasındaki ilişki

RESİMLER

Resim 1: Normal kolonik mukoza

Resim 2: Müsinöz adenokarsinom (x4, H&E)

Resim 3: Taşlı yüzük hücreli karsinom (x10, H&E)

Resim 4: Medüller karsinom (x2, H&E)

Resim 5: Serrated adenokarsinom (x4, H&E)

Resim 6: Mikropapiller adenokarsinom (x10, H&E)

Resim 7: Ekstramural vasküler invazyon (x2, H&E)

Resim 8: Perinöral invazyon (x40, H&E)

Resim 9: A: Tümör Regresyon Skoru 1, B: Tümör Regresyon Skoru 2

Resim 10: Tümör tomurcuklanması

Resim 11: Miksoid stroma (x40, H&E)

Resim 12: Keloid benzeri kollajen içeren stroma (x40, H&E)

Resim 13: Matür stroma (x40, H&E)

Resim 14: Tümörü infiltre eden lenfositler (x40, H&E)

Resim 15: Crohn benzeri reaksiyon

Resim 16: Fokal ve zayıf maspin ekspresyonu (Negatif)

Resim 17: Maspinin sitoplazmik ekspresyonu (x20).

Resim 18: Maspinin nükleer ekspresyonu (x20).

Resim 19: Maspinin mikst ekspresyonu (x20).

Resim 20: Tümördeki hafif şiddette (+1) sitoplazmik LOX ekspresyonu (x20).

Resim 21: Tümördeki orta şiddette (+2) sitoplazmik LOX ekspresyonu (x20).

Resim 22: Tümördeki kuvvetli (+3) sitoplazmik LOX ekspresyonu (x20).

Resim 23: Tümör stromasındaki orta şiddette (+2) LOX ekspresyonu (x20).

Resim 24: Tümör stromasındaki kuvvetli (+3) LOX eskpresyonu ile birlikte tümördeki kuvvetli LOX ekspresyonu (x20).

Resim 25: İmmünhistokimyasal olarak MMR ekspresyon profili (x20). A: MLH1 ekspresyon kaybı, B: PMS2 ekspresyon kaybı, C: MSH2 ekspresyonu, D: MSH6 ekspresyonu.

Resim 26: **:**. Ekspansil büyüme paternine sahip MMR ekspresyon kaybı gösteren tümör (H&E, x4).

Resim 27: Maspinin tümör tomurcuklarında tek hücrelerde nükleer ekspresyonu (x20).

Resim 28: Miksoid stromaya sahip tümörde izlenen peritümöral tomurcuklanma (H&E, x10).

Resim 29: Tümör tomurcuklanması (H&E, x20). A: Düşük dereceli tomurcuklanma, B: Orta dereceli tomurcuklanma, C: Yüksek dereceli tomurcuklanma.

Resim 30: Az diferansiye hücre kümeleri (H&E, x20). A: Düşük dereceli ADK, B: Orta derecede ADK, C: Yüksek dereceli ADK.

ÖZET

Giriş: Kolorektal kanserler, dünyada ve ülkemizde sık görülen mortalite nedenlerindendir. Hastalığın yönetiminde ve prognoz tayininde mevcut prognostik parametreleri destekleyecek yeni belirteçlere ihtiyaç duyulmakta olup bu konu araştırmacıların ilgi odağını oluşturmaktadır. Son zamanlarda tümörün mikroçevresi ve moleküler profili daha yakından incelenmeye başlanmıştır. Bu bağlamda tümör progresyonunu aydınlatmaya yönelik maspin ve lizil oksidaz (LOX) gibi yeni immün belirteçler gündeme gelmektedir. Kolon karsinomları da dahil olmak üzere birçok tümörde maspin ve LOX ekspresyonunun tümör progresyonu ve hasta prognozuyla ilişkili farklı sonuçlara sahip araştırmalar mevcuttur.

Amaç: Bu retrospektif çalışmada amacımız epitelyal mezenkimal transizyon (EMT) ve onkogenezde rolü olduğu bildirilen LOX ve maspin'in kolorektal karsinomlarda ekspresyonunu değerlendirerek tümör tomucuklanması, tümöre karşı gelişen immün ve desmoplastik yanıt gibi histopatolojik verilerle; mismach repair protein (MMR) ekspresyon profili ve moleküler özellikleri ile ilişkisini değerlendirmektir. LOX ve maspin arasındaki ilişkiyi inceleyerek bu antikorların immunohistokimyasal patolojik prognostik bir belirteç olarak önemini ortaya koymak ve sağkalım üzerine etkisini incelemek amaçlanmıştır. Tümör tomucuklanmasının, tümöre karşı gelişen immün yanıtın ve desmoplastik stroma paterninin prognozu yansıtmadaki rolünü değerlendirmek hedeflenmiştir.

Materyal ve metod: Çalışmamıza, Ankara Şehir Hastanesi'nde Şubat 2019 tarihinden itibaren Eylül 2021 tarihine kadar laboratuvarımıza gönderilmiş kolorektal rezeksiyon materyalinde kolorektal adenokarsinom tanısı almış, MMR ekspresyonu ve KRAS, NRAS, BRAF mutasyon analizi yapılmış 101 olgu dahil edilmiştir. Tümör tomurcuklanması, desmoplastik stroma paterni, az diferansiye hücre kümeleri, tümöre karşı gelişen immün yanıt gibi özellikle mikroçevreyi yansıtan histopatolojik özellikler için patoloji arşivinden çıkarılan tümör içeren lamlar yeniden değerlendirilmiştir. Seçilen bloklardan her bir tümör örneğinden iki adet olacak şekilde tümör merkezinden ve invaziv kenarından uygun alanlar işaretlenip 3 mm çapında doku korları parafin bloklardan çıkarılıp doku mikro dizilimi bloğu oluşturulmuştur. İmmünohistokimyasal olarak maspin ve LOX antikorları uygulanıp sonuçlar değerlendirilmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar istatiksel olarak incelenmiştir.

Bulgular: LOX ekspresyonu ile ADK (az diferansiye hücre kümeleri) derecesi arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir. Tümörün epitelyal komponentinde LOX ekspresyonu arttıkça stromadaki LOX ekspresyonun da arttığı gözlenmiştir. Stromadaki LOX ekspresyonu ile tümör tomurcuklanması arasında anlamlı ilişki saptanmış olup yüksek LOX ekspresyonunda yüksek tomurcuklanma dereceleri tespit edilmiştir. LOX'un hem tümör epitelyal hem stromal ekspresyonu ile maspin ekspresyonu arasında anlamlı ilişki izlenmiştir. Stromada kuvvetli LOX ekspresyonu saptanan vakalarda mikst ve nükleer maspin ekspresyonunda artış dikkati çekmiştir. Evre IV hastalarda yüksek LOX ekspresyonu azalmış progresyonsuz sağkalım ile ilişkili bulunmuştur. Maspinin nükleer ekspresyonu ile tümör tomurcuklanması, mikst ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Sitoplazmik maspin ekspresyonun genel sağkalım ve hastalıksız sağkalımda azalma ile ilişkisi olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda yüksek tümör tomurcuklanması ile kötü diferansiyasyon, sık lenfovasküler invazyon ve korunmuş MMR ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Yüksek dereceli tümör tomurcuklanmasında azalmış genel sağkalım izlenmiştir. Desmoplastik stroma paterni değerlendirildiğinde immatür stromada yüksek tümör tomurcuklanması ve sık lenfovasküler invazyon gözlenmiştir.

Tümör lokalizasyonu ile moleküler özellikler, tümör subtipi, MMR ekspresyon durumu ve genel sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Moleküler profil ile tümör subtipi ve genel sağkalım ilişkili bulunmuştur.

Sonuçlar: Bulgular, kolorektal kanserlerde tümör tomurcuklanmasının evreden bağımsız prognozla ilişkili olduğunu ve stroma paterni ile ilişkisi nedeniyle EMT (Epitelyal-mezenkimal transizyon) ile yakından ilişkili olabileceğini göstermektedir. LOX ve maspin arasındaki ilişki tespit edilmiş olup tümör progresyonunda kritik öneme sahip EMT ile yakından ilişkili olduğunu destekleyen sonuçlar elde edilmiştir. Tümörün histolojik özelliklerinin ve yerleşim yerinin moleküler profilini yansıtabileceği gösterilmiş, histolojik ve moleküler özelliklerin prognoza olan etkisi belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: kolorektal karsinom, tümör tomurcuklanması, desmoplastik stroma paterni, Maspin, LOX, moleküler profil

ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancers are the most common causes of mortality in the world and in our country. New markers are required to support current prognostic parameters in the management of the disease and determining the prognosis. Recently, the microenvironment and molecular profile of the tumor has been investigated more closely. The effectts of maspin and LOX on tumor progression have been searched in distinct tumours. In this study, we investigated the relationship between tumor stroma, tumor budding, poorly differentiated clusters, maspin and LOX expression. We evaluated the correlation between biological behavior of the tumor and expression of maspin and LOX and their realtionship with molecular profile.

Material and Method: This study included 101 patients with a diagnosis of colorectal adenocarcinoma in colorectal resection material sent to our laboratory at Ankara City Hospital since February 2019. Mismatch repair protein expression and KRAS, NRAS, BRAF mutation analysis results of these cases were evaluated retrospectively. Tumor slides were reassessed for histopathological features such as tumor budding, desmoplastic stroma pattern, poorly differentiated cell clusters, and immune response to the tumor. Optimal areas were marked at the tumor center and at the invasive border. 3 mm diameter tissue core were removed two for each tumor from the tumor block. A tissue microarray (TMA) blocks were created for Maspin and LOX immunohistochemistry study. Maspin and LOX antibodies were stained immunohistochemically and the results were evaluated. Results were recorded and statistical analysis was performed.

Results : In our study, a significant correlation was found between high scores of tumor budding and poor differentiation, frequent lymphovascular invasion and preserved MMR expression. A decrease in overall survival was observed at high tumor budding. High tumor budding and frequent lymphovascular invasion were observed in the immature stroma, when the desmoplastic stroma pattern was evaluated. High LOX expression was associated with decreased progression-free survival in stage IV patients. A significant relationship was found between LOX expression and the degree of poorly differentiated cell clusters (PDC). It was observed that when the LOX expression in the tumor epithelium increased, the LOX expression in the stroma also increased. A significant relationship was found between LOX expression in the stroma and tumor budding, and high levels of budding were detected in high LOX expression. Between the epithelial and stromal expression of LOX and the expression of maspin

significant correlation was found. Compared to negative cases, intense stromal LOX expression was correlates to increased mixed and nuclear maspin expression. A significant corelation was detected between nuclear maspin expression and tumor budding, and also mixed maspin expression and lymphovascular invasion. Cytoplasmic maspin expression was found to be associated with decreased overall survival and disease-free survival. Mixed and cytoplasmic expression of maspin was dominant in the right colon carcinomas. Nuclear expression was observed more frequently in left colon tumors. Nuclear expression of maspin was observed not only in tumor buds but also in neoplastic cells in tumor-stroma interaction. We observed that tumor localization assosiacted molecular characteristics, tumor subtype, MMR expression status, and overall survival. Molecular profile was corraleted with tumor subtype and overall survival.

Conclusions: This results suggest that tumor budding in colorectal cancers is associated with prognosis on independent of stage and may be closely related to EMT due to its relationship with stroma pattern. The relationship between LOX and maspin was determined, and results were obtained supporting that it is closely related to EMT, which has a critical importance in tumor progression. It has been shown that the histological features of the tumor and its location can reflect the molecular profile, and the effect of histological and molecular features on the prognosis has been determined.

Key words: colorectal carcinoma, tumor budding, desmoplastic stroma pattern, Maspin, LOX, molecular profile

GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal karsinomlar, dünya genelinde kadınlarda ikinci sıklıkta, erkeklerde üçüncü sıklıkta tespit edilen kanser tipidir. Akciğer kanserlerinden sonra ikinci en sık ölüm nedeni olmakla birlikte sigara içmeyen popülasyonda ölüm nedenlerinin başında gelir [1]. Türkiye'de ise 2020 yılında tanı alan kanser sıklığında üçüncü sırada yer alır [2]. Kolorektal karsinomlar, erkeklerde kadınlara göre daha sık görülür ve özellikle 50 yaş üzerinde risk artmaktadır [1].

Kolorektal karsinomlar, genetik ve epigenetik değişiklikleri içerir. Bilindiği üzere ölümcül olmayan genetik hasarlar karsinogenezin temelini oluşturur. Bu genetik hasara sahip tek bir prekürsör hücrenin klonal olarak çoğalması ile tümör oluşmaktadır. Büyümeyi destekleyen protoonkogenler, büyümeyi inhibe eden tümör supresör genler, programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) düzenleyen genler ve DNA onarımından sorumlu genler olmak üzere 4 temel gen grubu bulunmakta olup bu genler, kansere neden olan mutasyonların temel hedefleridir. Karsinogenez, tamamlayıcı mutasyonların zaman içinde aşamalı olarak birikmesinden kaynaklanır. Diğer birçok gendeki mutasyonlar, konakçı immün yanıtlarına müdahale ederek veya stroma ile etkileşimleri değiştirerek tümör oluşumunu destekler [3].

Kolon tümörlerinde genomik instabiliteye yol açan 3 temel mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan ilki kromozomal instabilitedir. Sporadik kolon kanserlerinin yaklaşık %80'inde bulunan kromozomal instabilite yolağında KRAS ve BRAF genleri gibi protoonkogenlerde ve APC, TP53, SMAD2, SMAD4, DCC genleri gibi tümör supresör genlerde mutasyon görülür [3].

Kolon tümörlerinde genomik instabiliteye yol açan ikinci mekanizma ise DNA onarımından sorumlu genlerde oluşan defekt nedeniyle geniş gen gruplarının etkilendiği yüksek mutasyon oranı içeren mikrosatellit instabilite yolağıdır [4].

Son olarak daha az saptanan, POLE (*DNA polymerase epsilon*) mutasyonu ile karakterli ultramutant yolak da diğer bir genomik instabilite nedenidir [4].

En sık izlenen epigenetik mekanizma, promoter bölgelerindeki hipermetilasyon sonucu bir dizi duyarlı genin ekspresyonlarının susturulmasıdır. Sporadik kolon tümörlerinin %15-20'sinde CpG adalarında hipermetilasyon izlenir. Sıklıkla MLH1 (Mut L homoloğu) etkilenmektedir [5].

Maspin (mammary serine protease inhibitor), serin proteaz inhibitör ailesine ait bir proteindir. İlk olarak 1994'te Zou ve arkadaşları tarafından normal meme glandlarında ve meme tümör hücrelerinde tanımlanmıştır. Bu proteinin, kolon tümörleri de dahil olmak üzere meme, prostat, over, tiroid, pankreas ve mide neoplazileri gibi birçok kanser türünde tümör supresör fonksiyonu olduğunu gösteren araştırmalar bulunmaktadır [6].

Kanserlerde meydana gelen bazı mutasyonlar, konakçının immün yanıtını veya stroma ile etkileşimlerini değiştirir. Tümör hücreleri ve çevre stromadaki etkileşimler, kanser progresyonunda ve metastazında kritik öneme sahiptir. Kolorektal adenokarsinomlarda tümörün mikroçevresini oluşturan stromal ve inflamatuar hücrelerin histopatolojik özellikleri, tümörün davranışı ile yakından ilişkilidir. Lizil oksidaz (LOX), kollajenin çapraz bağlanması ve ekstrasellüler matriksin kompakt yapısını oluşmasında görev alan bakır bağımlı bir amin oksidazdır. LOX, metastaz potansiyelinin artmasını sağlayan ve tümör hücrelerinin yaşamını idame ettirecek mikroçevre oluşumunda görev alan önemli bir enzimdir [7].

Tümör çevresindeki aktive fibroblastlar, kanser mikroçevresini değiştirmek, epitelyal mezenkimal transizyonu kolaylaştırmak ve kanser kök hücre fenotipini modüle etmek gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla tümör progresyonunda kritik bir rol oynamaktadır. Epitelyal-mezenkimal transizyon; tümör invazyonu, migrasyonu ve metastatik yayılım ile yakından ilişkili bir mekanizmadır. Bu nedenle tümör çevresindeki stromanın, tümörün biyolojik davranışını ve prognozu belirlemede önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir [8].

Kolorektal kanserde, tümör tomurcuklanması (peritümöral tomurcuklanma) kılavuzlar tarafından belirlenmiş bir prognostik parametredir. Tümör tomurcuklanması, tümörün invaziv kenarında glandüler yapılardan ayrılarak tek veya birkaç hücre kümesi (5 ten az) şeklinde invazyon göstermesi olarak tanımlanmaktadır. Tümör tomurcuklanmasının epitelyal-mezenkimal transizyon ile yakın ilişkisi olduğu düşünülmektedir [9].

Tümörü infiltre eden lenfositler de (TİL), tümör mikroçevresinin bir parçası olup vücudun anti-tümör immün yanıtını yansıtır. TİL yoğunluklarının ve lokalizasyonlarının kolorektal kanserli hastalarda prognostik önemi olduğu gösterilmiştir [10].

Bu çalışmada kolorektal adenokarsinom tanısı almış 101 hastada, tümör hücrelerinde ve stromada LOX ekspresyonunu ve tümördeki Maspin ekspresyonun; tümörün metastaz yapma potansiyeli ile ilişkili olduğu bildirilen tümör tomurcuklanması, az diferansiye kümeler (ADK), tümör mikroçevresindeki lenfositik ve desmoplastik yanıt gibi histopatolojik veriler ile metastaz, mikrosatellit instabilite durumu ve moleküler özellikler ile ilişkisinin ortaya konulması amaçlamaktadır. Bu çalışma, Maspin ve LOX ekspresyonunun, immünhistokimyasal patolojik prognostik bir biyomarker olarak önemini araştırmaktadır.

GENEL BİLGİLER

1.Kolonun normal yapısı

1.1. Embriyoloji

Gastrointestinal trakt, üç germ yaprağından oluşan (endoderm, mezoderm, ektoderm) kompleks, özelleşmiş üç boyutlu bir organ yapısıdır. Barsak gelişiminin erken dönemlerinde dört asimetrik aks paterni izlenir (anterior-posterior, dorsoventral, sağ-sol, radyal). Anterior-posterior (AP) eksen gelişimi ve diferansiyasyonu ile ön, orta ve arka ilkel barsak yapıları oluşmakta olup daha sonra oral kaviteden anüse kadar olan sistem meydana gelir.

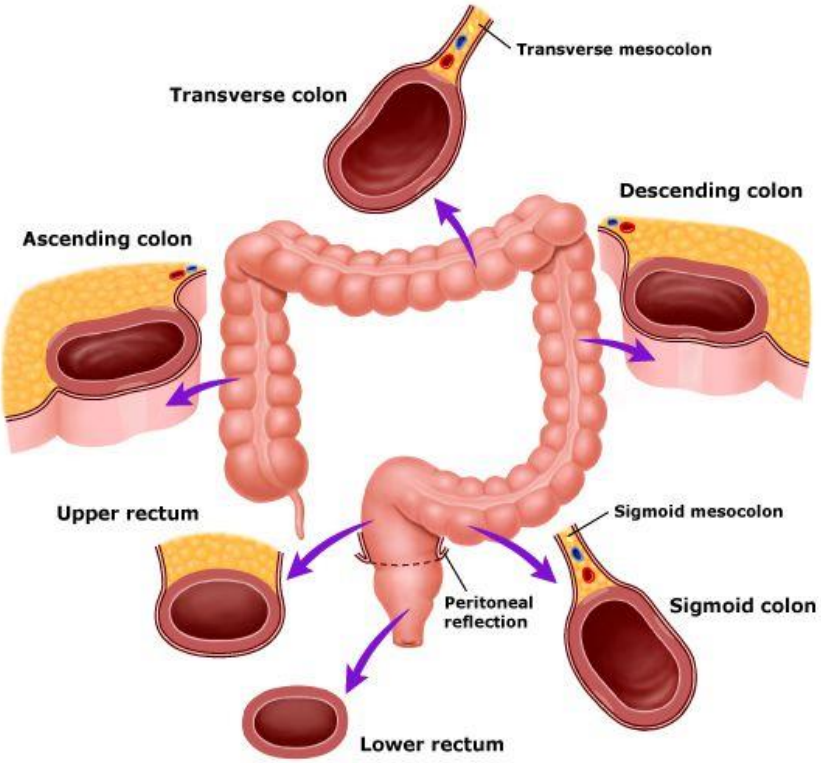
Çekum, apendiks, asendan kolon ve çıkan kolonun proksimali (sağ kolon), orta barsaktan; distal transvers kolon, desenden kolon, sigmoid kolon ve rektum (sol kolon) arka barsaktan köken alır. Genel olarak, ilkel barsak tüpü 4. gelişim haftası civarında ön, orta ve arka barsak yapılarını oluşturur. Orta barsak bu aşamada embriyonun orta hattındadır; ancak, yolk sac açık kalır. Barsak çeşitli rotasyonlar sonunda 10. hafta civarında karın içi pozisyonuna geri döner [11].

1.2. Anatomi

Kolon, gastrointestinal sistemin terminal 1.0-1,5 metrelik bölümünü içeren, periton ile çevrili, rektuma kadar abdominal kavite içerisinde bulunan ve sonrasında pelvise doğru uzanarak anal kanalda sona eren bir organdır. Çekum, tamamen periton ile örtülüdür. Çıkan kolon retroperitoneal yerleşimli olup lateral ve anterior yüzleri periton ile çevrilidir. Transvers kolon ve sigmoid kolon mezentere sahip ve tamamı periton ile çevrili kolon segmentleridir. İnen kolon retroperitoneal yerleşimlidir ve posterior yüzünde periton izlenmez [11].

Rektum, periton ile ilişkisi açısından üç segmente ayrılır. Üst ⅓ segmenti, anterior ve lateral yüzlerinde periton bulundurur. Orta segmenti, sadece anterior yüzde periton ile örtülüdür. Rektumun alt ⅓ segmenti ise tamamen peritonsuzdur [11].

Sağ ve sol kolon segmentinin vasküler yatağı, venöz drenajı ve innervasyon modeli açısından farklılığı, embriyolojik AP (orta bağırsak/arka bağırsak) eksen gelişim modeli ile tutarlıdır [11]



Şekil 1: Kolon ve rektumun çeşitli seviyelerinde peritoneal ve mezenterik ilişkileri [12]

1.3. Fonksiyon

Sağ ve sol kolon, sadece farklı embriyolojik kökenlere sahip olmakla kalmazlar; motilite paternleri, bakteri popülasyonları, metabolik aktiviteleri ve lokal-sistemik immün fonksiyonları açısından farklılık gösterir. Genetik paternlerdeki farklılıklar, lektin ve yüzey belirleyicilerin ekspresyonlarındaki değişiklikler, hastalıkların tutulum paterni, neoplastik transformasyonun görülme sıklığı ve oranlarındaki değişkenlik; bu temel ayrımın bir yansımasıdır [13].

1.4. Histolojik Özellikler

Kolon mukozası, ince barsak mukozasındaki villüs yapılarını içermeyen ve daha düz bir yapıda mukozaya sahiptir. Yüzeyinde girinti oluşturan, yaklaşık 0,5 mm uzunluğundaki derin düz intestinal glandlar (veya kriptler), ince barsaktakinden iki-üç kat daha uzundur. Yüzey, basit kolumnar epitel ile örtülüdür. Goblet hücrelerin enterositlere oranı ince barsaktakine oranla yüksek olup çekumdan rektuma doğru yavaşça artış göstermektedir [13].

Lamina propriada çok sayıda lenfoid nodül bulunmaktadır ve bazen muskularis mukozayı aşarak submukozaya kadar ulaşır. Paneth hücreleri, çekum ve apendikste görülebilr fakat kolonun diğer alanlarında izlenmemektedir. Kriptler, epitel yenilenmesi için kök hücreler ve ayrıca enteroendokrin hücreler içerir; bunlar enterositler ve goblet hücreleri arasında dağılır. Asendan ve desendan kolon segmentleri retroperitoneal yerleşimli olup adventisya tabakası ile örtülü, diğer segmentler seroza ile kaplıdır [13].



Resim 1: Normal kolonik mukoza [11]

2. KOLON ADENOKARSİNOMLARI

Kolorektal adenokarsinomlar kolondan köken alan, glandüler veya müsinöz diferansiasyon gösteren malign epitelyal tümörlerdir. Serrated adenokarsinom; adenom benzeri adenokarsinom; mikropapiller adenokarsinom; müsinöz adenokarsinom; az koheziv karsinom (poorly cohesive carcinoma); taşlı yüzük hücreli karsinom; medüller karsinom; adenoskuamöz karsinom; karsinom, indiferansiye, NOS ve sarkomatoid komponent içeren karsinom olmak üzere birçok subtipi tanımlanmıştır [4].

Lokalizasyon

Kolon tümörleri lokalizasyonlarına göre; proksimal veya sağ kolon (çekum, çıkan kolon ve transvers kolon), sol kolon (splenik fleksura ve sigmoid kolon arasındaki herhangi bir segment) ve rektal karsinomlar olmak üzere temel olarak 3 ana bölgeye ayrılmıştır [14] .

Klinik özellikler

Kolon tümörleri asemptomatik olabileceği gibi, karın ağrısı, hematokezya, konstipasyon, abdominal distansiyon gibi semptomlara da sebep olabilir. Bu gibi semptomlar genellikle sol kolon tümörlerinde görülürken, sağ kolon tümörleri halsizlik, kilo kaybı ve anemi gibi non-spesifik semptomlara neden olmaktadır [5].

2.1. MOLEKÜLER PATOGENEZ

Kolon kanserleri genomik instabiliteye yol açan üç temel mekanizma ile sınıflandırılabilir. Bunlar;

1) Küçük gen gruplarında meydana gelen delesyonlar veya amplifikasyonlar içeren çok sayıda değişime uğramış somatik DNA kopyalarının (DNA somatic copy number alterations/SCNAs) oluşturduğu kromozomal instabilite.

2) DNA mismatch repair mekanizmasının defekti nedeniyle geniş gen gruplarının etkilendiği yüksek mutasyon oranı içeren mikrosatellit instabilite.

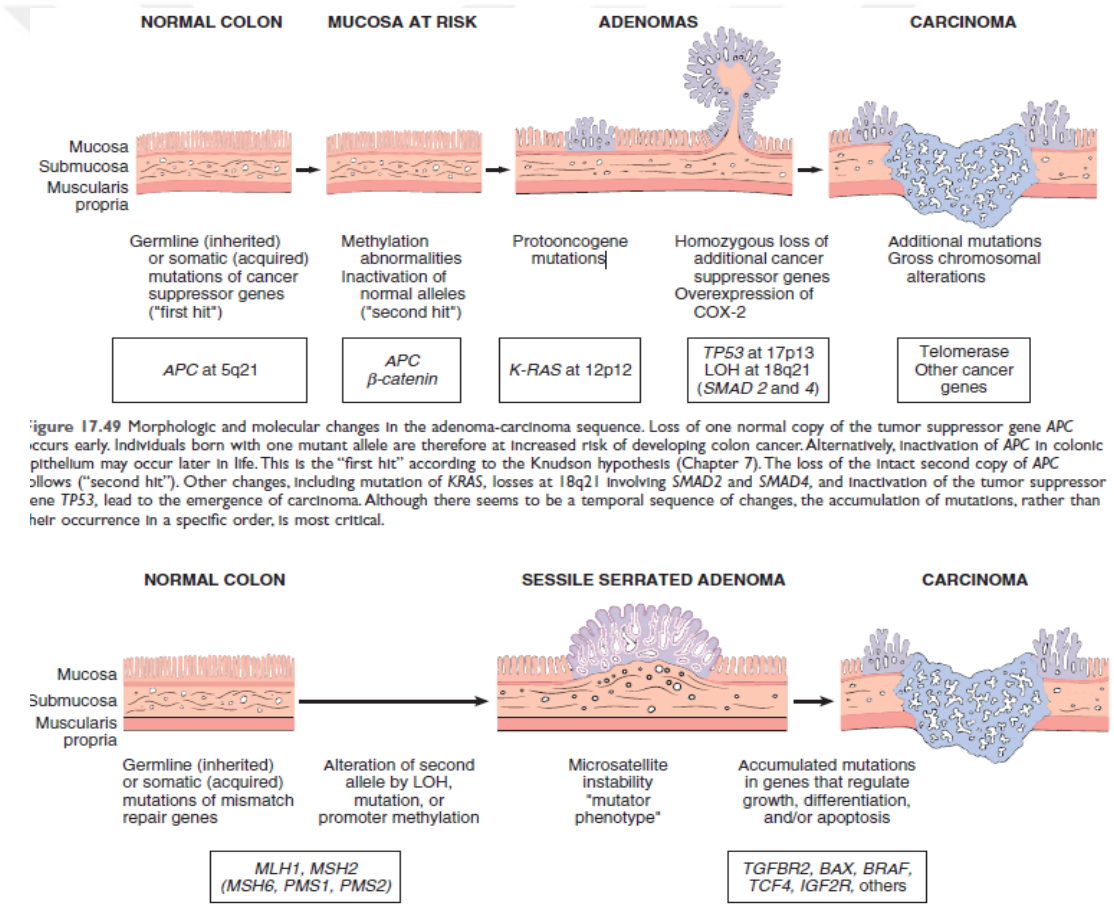
3) Proofreading polimeraz aktivitesindeki defekt nedeniyle çok geniş gen gruplarının [birkaç sürücü (driver) mutasyonları da içeren çoğunlukla yolcu(passenger)mutasyonlar] etkilendiği çok yüksek mutasyona sahip yolak.

APC, KRAS, TP53, SMAD4 veya PIK3CA mutasyonları, kromozomal instabilite yolağında dahil olup tüm mutasyonların yaklaşık %84 ünü oluşturur.

MLH1 ve MS/72 mismatch repair genlerini içeren mutasyonlar, mikrosatellit instabilite yolağında yer alır ve mutasyonların yaklaşık %13 ünü temsil eder.

POLE mutasyonu ise yaklaşık %3 olguda izlenmekte olup ultramutant yolakta yer alır [4].

Serrated ve diğer adenokarsinomlar mismatch repair defekti ile ilişkili olup kolorektal karsinomların yaklaşık %13 ünü oluşturmaktadır. Bu tümörlerde ilerleyen farklı genetik yolaklar mevcuttur. Bu karsinomların prekürsörleri konvansiyonel adenomlardan ziyade hiperplastik polip, sesil serrated lezyon ve traditional serrated adenomlardan oluştuğu bilinmektedir. Serrated polipler genellikle BRAF ve (daha az sıklıkla) KRAS aktive edici mutasyonlarına ve CpG adalarında hipermetilasyon fenotipine sahiptir. CpG adalarında hipermetilasyon, epigenetik promoter bölgelerindeki hipermetilasyon sonucu bir dizi duyarlı genin ekspresyonlarını susturmakta olup sıklıkla MLH1 in etkilenmesine neden olur. Bu durum ise mismatch repair mekanizmasındaki hasar ve mikrosatellit instabiliteyi yol açar [4].



igure 17.49 Morphologic and molecular changes in the adenoma-carcinoma sequence. Loss of one normal copy of the tumor suppressor gene *APC* ccurs early. Individuals born with one mutant allele are therefore at increased risk of developing colon cancer. Alternatively, inactivation of *APC* in colonic pithelium may occur later in life. This is the "first hit" according to the Knudson hypothesis (Chapter 7). The loss of the intact second copy of *APC* ollows ("second hit"). Other changes, including mutation of *KRAS*, losses at 18q21 involving *SMAD2* and *SMAD4*, and inactivation of the tumor suppressor ene *TP53*, lead to the emergence of carcinoma. Although there seems to be a temporal sequence of changes, the accumulation of mutations, rather than heir occurrence in a specific order, is most critical.

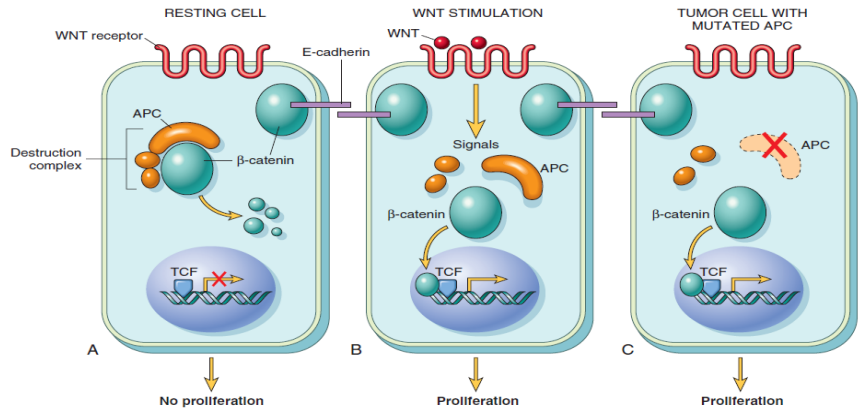
Şekil 2: Kolon karsinogenezinin yolağındaki morfolojik ve moleküler değişiklikler [3].

Kolorektal adenokarsinomların çoğu; konvansiyonel adenom, sesil serrated adenom/polip, veya traditional serrated adenomlardan gelişmektedir. Yaklaşık %10-30 olguda rezidü adenom tespit edilmesi bu bulguyu destekler niteliktedir. Prekürsör lezyon ile tümörün histolojik tipi arasında da belirgin bir ilişki bulunmaktadır. Bu durumda, kolorektal karsinomlarda konvansiyonel adenom ve serrated adenom/polip yolağı olmak üzere temel olarak iki yolak varlığını göstermektedir [5].

2.1.1. Kromozomal İnstabilite (Chromosomal Instability-CIN)

Kromozomal instabilite yolağı, kolorektal kanserlerin yaklaşık %85'inde izlenmektedir. Bu yolak genel olarak, anöploidi (anormal bir kromozom sayısı), subkaryotipik amplifikasyon, kromozomal yeniden düzenleme ve tümör supresör gen lokuslarında heterozigositenin (Loss of heterozygosity -LOH) kaybı ile karakterizedir. Ayrıca bu yolak; APC, TP53, KRAS ve BRAF dahil olmak üzere onkogenlerde ve tümör supresör genlerde mutasyonların birikmesine yol açar [15].

Vogelstein modeline göre, ilk olarak hiperproliferatif epitelde APC'nin inaktivasyonu meydana gelir, bunu KRAS onkojenik mutasyonu takip eder. Sonraki aşamada kromozomal alterasyon ve tümör supresör gen olan TP53'ün inaktivasyonu ile meydana gelir [16]. Tipik olarak, bu değişiklikler klasik adenom-karsinom dizisine yol açar. Klasik adenom-karsinom sekansı, sporadik kolon kanserinin yaklaşık %80'inde görülür. Bu nedenle erken neoplastik lezyonlarda tipik olarak APC mutasyonu saptanmaktadır [3].



Şekil 3: Adenomatoz polipozis kolinin (APC), β-katenin stabilitesini ve fonksiyonunu düzenlemesindeki rolü [3].

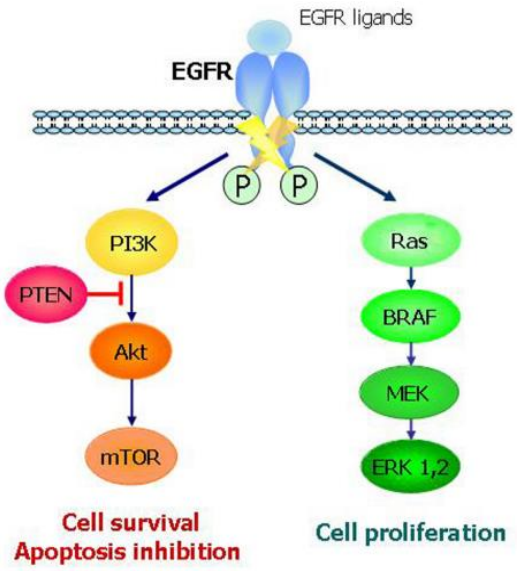
APC, embriyonel gelişimdeki diferansiyasyonda ve hücresel büyümede görev alan WNT ileti yolağının bir komponentidir. WNT molekülleri, hücre yüzeyindeki kıvrımlı reseptör ailesinden olan reseptöre bağlanarak iletiyi başlatır. Bu sinyal, başta APC ve Beta-katenin olmak üzere birçok yolağı aktive eder. APC proteininin başlıca görevi Beta-katenin aktivasyonunu kontrol etmektir. WNT yolağında sinyalin olmadığı durumda; APC, Beta-kateninin proteozomal yıkılımına neden olan destrüksiyon kompleksini oluşturur. Sinyal oluştuğunda bu kompleksin oluşumu engellenir. Daha sonra Beta-katenin stabilize olur ve sitoplazmadan nükleusa geçer. Beta-katenin'in nükleusa geçtikten sonra DNA-bağlanma faktörü olarak bilinen TCF ile birlikte aktivasyon kompleksini oluşturur (Şekil 4). Bu kompleks, MYC, Cyclin-D1 ve diğer genlerin ekspresyonunu arttırarak kolonik epitelin büyümesine sebep olur [3].

Adenom gelişimi için; APC geninin her iki kopyasının da fonksiyonel olarak inaktive olması gereklidir. APC proteinin fonksiyon kaybı, Beta-katenin birikimine ve nükleusa translokasyonuna neden olarak proliferasyona yol açar [5].

EGFR *(epidermal growth factor receptor),* HER *(human epidermal growth factor receptor)* reseptörleri ailesine ait bir transmembran glikoproteindir. Epidermal büyüme faktörü (EGF), transforming growth factor alpha (TGF-α), amphiregulin ve betacellulin EGFR'nin temel ligandlarıdır. Ligandın bağlanması, reseptör dimerizasyonunu ve PI3K/Akt, Stat, Src ve MAPK gibi kritik yolakları otofosforilasyon yolu ile aktive edilmesini tetikler (Şekil 5) [17].

KRAS onkogeni, *transforming gene Kirsten rat sarcoma-2 virus* geninin insan hücresel homoloğunu kodlar. K-ras proteini, intrinsik GTP-az aktivitesi sahip olduğu için kendi kendini etkisiz hale getiren bir sinyal dönüştürücü görevi bulunmaktadır. Ancak, KRAS aktive edici mutasyonlar, intrinsik GTPaz aktivitesini ortadan kaldırır ve sinyal yollarını aktive ederek kontrolsüz proliferasyona neden olur [18].

Vogelstein modeline göre, APC'nin inaktivasyonunu KRAS geninin onkojenik mutasyonu takip eder. KRAS mutasyonu, 1 cm'den küçük adenomların %10'undan azında bulunur. Fakat 1 cm den büyük adenomların %50'sinde ve invaziv karsinomların %50'sinde geç dönem neoplastik progresyona neden olmaktadır [3].



Şekil 4: EGFR yolağı [17]

BRAF; RAS'ın intrinsik GTPaz fonksiyonu ile aktive edilen ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) aracılı mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağında görev alan önemli bir serin/treonin protein kinazdır (Şekil 5). BRAF, hücresel göç, apoptoz ve hayatta kalma gibi birçok kritik hücresel süreçler ile yakından ilişkilidir. BRAF'ın farklı birkaç bölgede mutasyona uğradığı saptanmıştır. Tüm BRAF mutasyonlarının %80'ini temsil eden ve en sık saptanan mutasyon V600E mutasyonudur. Bu mutasyon ile oluşan amino asit değişikliği, yapısal kinaz aktivitesi ile sonuçlanır [19].

Karsinogenezde, SMAD2 ve SMAD4 genlerini kodlayan tümör supresörlerdeki mutasyonlar da yer alır. SMAD2 ve SMAD4 genlerinin, TGF-Beta iletiminde effektör rolü bulunmaktadır. TGF-Beta sinyali hücre siklüsünu inhibe eder. Bu genlerin kaybı kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olur [3].

Kolon kanserlerinin %70 ile %80 kadarında tümör supresör gen olan TP53 mutasyonu bulunmaktadır. Ancak bu genin adenomlarda etkilenmediği göze alındığında bu mutasyonun tümör progresyonunun ileri evresinde oluştuğu düşünülmektedir [3].

2.1.2. Mikrosatellit İnstabilite Yolağı

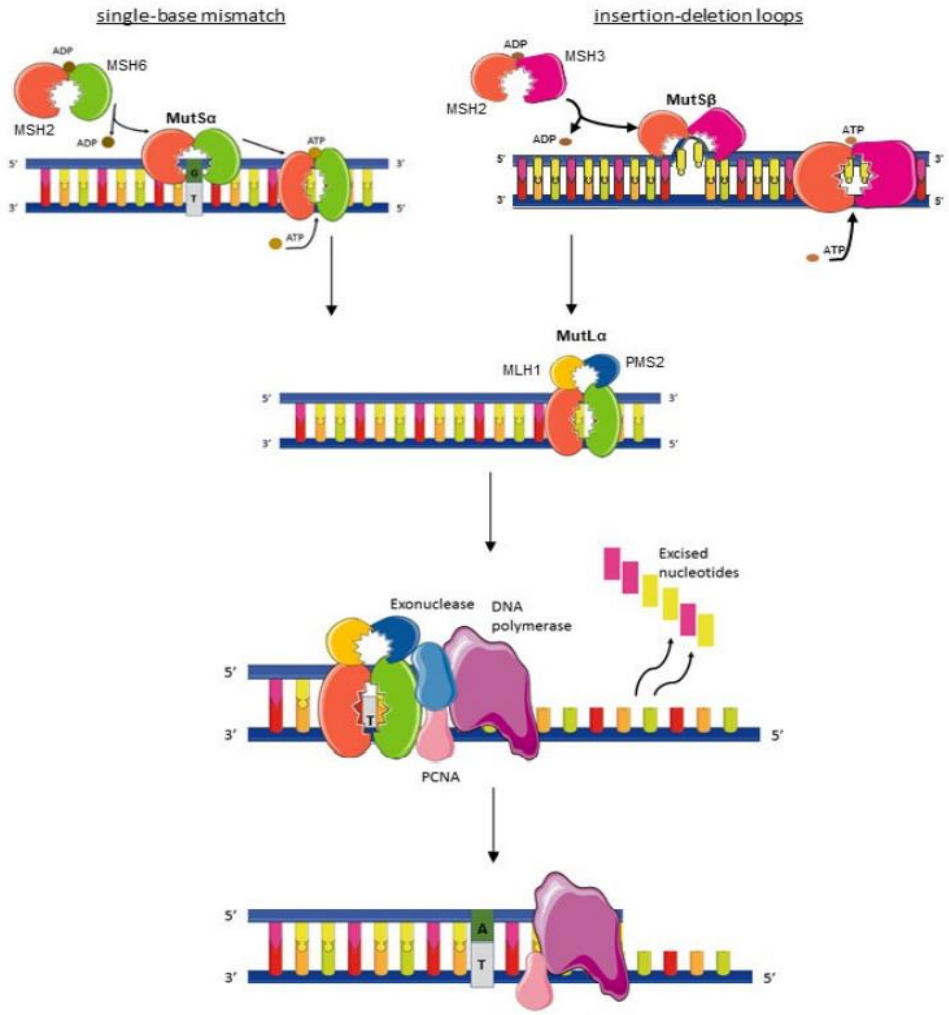
DNA mismatch repair proteinleri, DNA replikasyonu sırasında yazım denetimini sağlarlar. Örneğin, adenozin ile timin bağlantısı yerine guanin ile timin bağlantısı gibi hatalı bir eşleşme olduğu durumlarda, mismatch repair proteinleri hatayı düzeltir. "Düzeltme" işlevi kaybedildiğinde, hatalar genom boyunca birikir. Bu hatalardan bazıları tesadüfen sürücü mutasyonları yaratarak zamanla kanser oluşumuna neden olabilir. Mismatch repair defektinin belirleyicilerinden biri mikrosatellit instabilitedir. Mikrosatellitler, genom boyunca bulunan 1 ile 6 nükleotidin ardışık tekrarlarıdır. Normal insanlarda mikrosatellitlerin uzunluğu sabit kalır. Ancak, mismatch repair defekti bulunuyorsa mikrosatellitler kararsızdır ve uzunlukları artar veya azalır. Bu durumda mutasyona uğramış aleller meydana gelir [3].

DNA sentezi sırasında, mikrosatellit primer ve şablon iplikler bazen ayrışabilir ve yanlış şekilde yeniden düzenlenebilir. Bu durum, şablondaki ve yeni sentezlenen iplikteki mikrosatellit tekrar birimlerinin sayısının birbirinden farklı olduğu heterodupleks DNA moleküllerinin ortaya çıkmasına yol açar. Partner olmayan nükleotidler kısmen ekstrahelikal yapıda olur. Meydana gelen heterojenlikler, delesyon/insersiyon spiralleri (insertion/deletion loops-IDL'ler) olarak bilinir [20].

IDL'ler ve DNA polimerazın düzeltme işlevinden kaçan hatalarının neden olduğu baz yanlış eşleşmeleri MMR sistemi tarafından hedef alınır. MMR sistem, yeni sentezlenen ipliğin hata içeren bölümünü bozar ve DNA dizisinin hatasız bir kopyasını oluşturmak için başka bir şans oluşturur. MMR kaybında IDL'ler ve baz-baz uyumsuzlukları düzeltilmeden kalır, bu da mikrosatellit instabilitenin eşlik ettiği bir mutasyon fenotipine ve sonucunda kansere neden olmaktadır [20].

Mismatch repair proteinleri, kompleks bir sistem oluşturur. Bakteriyel mutS ve mutL genlerinin homologları klonlanıp Mut S homoloğu (MSH) ve Mut L homoloğu(MLH) olarak isimlendirilmiştir. Ayrıca mayalarda postmiyotik ayrışma/*post-meiotic segregation-1* (PMS-1) olarak başka bir Mut L homoğu tanımlanmıştır. Mut S ve Mut L homodimer olarak fonksiyon gösteremez. MSH2 ve MSH6 heterodimerleri Mut Sα oluştururken, MSH2 ve MSH3 heterodimerleri Mut Sβ komponentini meydana getirmektedir (Şekil 6). Bu heterodimerler, DNA yanlış eşleşmedeki farklı bölgeleri tanıma ve tamir etmek kapasitelerine sahiptir. Örneğin, Mut Sα, tek baz yanlış eşleşmelerini tespit eder. MSH6 başlangıçta GT bağlayıcı protein olarak tanımlanmıştır. Daha sonra MSH3 geninin, daha büyük IDL'lere bağlanma yeteneğini arttıran bir kompleks oluşturmak için MSH2 ile dimerize olan başka bir MutS homoloğunu kodladığı keşfedilmiştir [21].

Memelilerde prokaryotik Mut L geninin 4 homoloğu bulunmaktadır; MLH1, MLH3, PMS1 ve PMS2. MutL homologlarının ürünlerinin işlevi MutS homologlarınınki kadar açık değildir, ancak kodlanmış proteinler heterodimerler olarak işlev görür. MLH1 ve PMS2, MutS proteinleri ile birlikte replikasyon sonrası yanlış eşleşme onarımında uzun yama eksizyonunda yer alan enzimler arasındaki etkileşime aracılık eden MutLα'yı oluşturur. Bununla birlikte, MLH1 (insanlardaki ana MutL homoloğu), PMS1 ile dimerize olarak Mut Lβ'yi; MLH3 ile dimerize olarak Mut Lγ oluşturmakta olup bu komplekslerin insanlardaki fonksiyonu net olarak açıklanamamıştır. MLH1 kaybı, total MMR aktivitesi kaybıyla sonuçlanır, ancak PMS2 kaybı, MLH3 ile kısmen telafi edilebilir. PMS1'in bu modele nasıl uyduğu bilinmemektedir, ancak MLH1-PMS1 heterodimer, bilinen insan MMR sisteminin bir parçası değildir [21].



Şekil 5: Mismatch repair mekanizması [21]

MMR eksikliği, bir MMR proteininin kaybından veya epigenetik susturma veya germline mutasyonu nedeniyle kesilmiş(trunkasyon), işlevsel olmayan bir MMR proteininin üretiminden kaynaklanır. MMR eksikliği gösteren tümörler dMMR veya MSI-H olarak anılırken, sağlam MMR proteinlerine sahip olanlar, korunmuş MMR (pMMR) olarak sınıflandırılabilir ve mikrosatellit stabil (MSS) veya MSI-low/düşük (MSI-L) olması beklenir [22].

Sporadik kolorektal kanserlerde sadece MLH1 protein ekspresyonunun kaybı tarif edilmiştir. MLH1 ve PMS2 proteinleri ile MSH2 ve MSH6 proteinleri sıklıkla birlikte kaybolur. PMS2 proteininin izole kaybı çoğunlukla altta yatan bir germline PMS2 mutasyonunu temsil eder. MSH2 veya MSH6 proteinlerinin izole kaybı, bu genlerin bir germline mutasyonu için yüksek özgüllüğe sahiptir ve Lynch sendromunu telkin etmektedir. Ayrıca MSH2 proteininin kaybı, MSH2 geninden ziyade EPCAM genindeki germline mutasyonundan kaynaklanabilir [22].

Lynch sendromlu hastalarda, DNA mutasyonlarını ve hasarlarını tanıyan ve onaran MMR proteinlerinden sorumlu germline mutasyonları bulunmaktadır. Lynch sendromu, 1 mutant MMR geni ile 1 normal genden oluşan bir çift otozomal kromozomun, otozomal dominant olarak kalıtılması ile ortaya çıkmaktadır. Somatik bir hücrede MMR geninin normal kopyasına "ikinci vuruş (second hit)" sonucu çift somatik mutasyon veya heterozigositenin kaybı sonucu MMR proteininin total kaybı 10 yıllar alır. Ancak bu gerçekleştiğinde bozulmuş MMR sistemi nedeniyle kısa bir süre içinde çok sayıda gen mutasyonu birikecektir [22].

Bazı mikrosatellit sekansları, hücre çoğalmasının regülasyonun görev alan; tip II TGF-Beta reseptörlerini ve pro-apoptotik olan BAX proteininin kodlandığı bölgelerde veya bu genlerin promotor bölgelerinde yer almaktadır. Burda oluşan mutasyonlar, TGFBR2 aracılığı ile kontrolsüz prolifersyona; BAX proteinin fonksiyon kaybı nedeniyle genetik olarak anormal klonların çoğalmasına neden olmaktadır [3].

DNA mismatch repair enzim eksikliği olmayan mikrosatellit instabil kolon tümörlerinin bazılarında, CpG adalarında hipermetilasyon varlığı gösterilmiştir (CIMP). Bu tümörlerde sıklıkla MLH1 in promotor bölgesinde hipermetilasyon izlenir. Bu durum MLH1 ekspresyonunda ve tamir fonksiyonunda azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca bu tümörlerde sıklıkla BRAF onkogeninde aktive edici mutasyon saptanırken KRAS ve TP53 genlerinde mutasyon görülmemektedir. Mikrosatellit instabilite, BRAF mutasyonu ve MLH1 gibi spesifik bölgelerde görülen metilasyon, bu karsinogenez yolağının tipik bulgusudur [3].

Küçük bir grup kolon kanserinde ise mikrosatellit instabilite olmaksızın CpG adalarında hipermetilasyon bulunur. Bu tümörlerin çoğunda KRAS mutasyonu bulunur fakat TP53 ve BRAF mutasyonu sık değildir. TP53 mutasyonu, CpG adalarında hipermetilasyon bulunmayan kanserlerde sık izlenir [3].

Morfoloji, karsinogeneze yol açan altta yatan moleküler olayları güvenilir bir şekilde yansıtmasa da, bazı bulgular DNA mismatch repair enzim eksikliği ve mikrosatellit instabilite ile ilişkilendirilmiştir. Bu moleküler değişiklikler, sesil serrated lezyonlarda ve bunlardan kaynaklanan kanserlerde yaygındır. Ayrıca MSI tespit edilen invaziv karsinomlarda belirgin müsinöz diferansiasyon ve peritümöral lenfosit infiltrasyonu izlenir. Bu tümörler ve CpG adalarında hipermetilasyon barındıran tümörler genellikle sağ kolonda bulunurlar. Mikrosatellit instabilite, mismatch repair proteinlerinin immünohistokimyasal yöntemler ile yokluğu ile veya mikrosatellit sekanslarının genetik analizi ile tespit edilir. Kolonda veya başka organlarda başka bir malignite geliştirebilme riskinin yüksek olması, bazı durumlarda prognoz ve tedavideki farklılıklar ve genetik danışmanlık açısından Herediter Non Polipozis Kolorektal Karsinom (HPNCC) vakalarını tespit etmek oldukça önemlidir [3].

İmmünohistokimyasal yöntemler

MMR gen ürünü olan proteinlerin (MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2) kaybının immünohistokimyasal (İHK) yöntemler ile tanımlanması, Lynch sendromunu teşhis etmek amacıyla germline mutasyon tespiti için DNA dizilimini yönlendirebilir. MMR proteinlerinin immünhistokimyasal değerlendirilmesi ile PCR tabanlı testlerin sonucunun %90 dan fazla uyumlu olduğu bildirilmiştir.

İmmünohistokimyasal yöntemlerin bazı MSI-H vakalarını tespit etmede yetersiz olduğu söylenebilir. Bu durumun nedenlerinden biri MMR ilişkili genlerdeki missense mutasyonu sonucu oluşan non-fonksiyonel MMR proteinidir. Bu durumda MMR proteinin ekspresyonu tam olarak kaybolmazken fonksiyonu olmayan MMR proteini nedeniyle mikrosatellit instabilite durumu oluşmaktadır. MMR kaybı, başlangıçta Lynch sendromu için tasarlanmış İHK panelinde yer almayan MSH3 gibi bir MMR proteini sonucunda oluyorsa immünohistokimyasal yöntem bu durumu tespit edemeyebilir [22].

İmmünohistokimyasal yöntem ile MMR taraması için çoğunlukla 4 ana protein ile yapılmaktadır. MLH1 ve PMS2 proteinleri ile MSH2 ve MSH6 proteinleri sıklıkla birlikte kaybolur. MSH2 veya MSH6 proteinlerinin izole kaybı, Lynch sendromunun telkin etmektedir. MMR taraması için dört antikor yerine, MSH6 ve PMS2 ile taranabileceği düşünülse de MSH2 kaybının olduğu kolorektal kanser vakalarında fokal MSH6 ekspresyonu nedeniyle bu yaklaşımın MSH2 ile ilişkili Lynch sendromunun bir alt kümesini kaçırabileceğini gösterilmiştir [23].

Neoadjuvan terapiye sekonder izlenen MSH6 kaybının altında da genellikle mikrosatellit instabilite durumuna rastlanmamaktadır [23]. Bu nedenle rektum kanserlerine, İHK yöntem için ameliyat spesmenlerinden ziyade endoskopik materyalin temel alınması önerilmektedir. Bu nedenle endoskopik yöntem ile çok sayıda büyük biyopsi alınmalıdır. Onkologlar tarafından neoadjuvan tedavi öncesinde İHK ile MMR durumunun değerlendirildiğini doğrulaması gerekmektedir [24].

Kolorektal karsinomlarda rutin olarak dört MMR proteini (MLH1, PMS2, MSH2 ve MSH6) immünhistokimyasal çalışma ile değerlendirilir. Endometrial karsinomlarda da bu uygulama giderek artmaktadır. Sporadik kolorektal karsinomlarda izole MLH1 protein ekspresyonu kaybı tanımlanmıştır. MLH1 protein ekspresyonu kaybı olan kolorektal karsinomlarda, sporadik bir vakayı doğrulamak ve Lynch sendromunu dışlamak için BRAF mutasyonu bakılmaktadır. BRAF mutasyonu saptanmayan hastalarda Lynch sendromu tanısı için gen sekanslama yöntemi kullanılarak bu olguların sporadik kolorektal karsinomlardan ayrılması sağlanmalıdır [22].

Mismatch repair proteinlerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirmesi;

MMR proteinlerinin nükleer ekspresyonu kaybı yok: MSI-H olasılığı düşüktür.

MLH1 ve PMS2 de nükleer ekspresyon kaybı: Sporadik veya Lynch sendromu ilişkili olabilir.

- MLH1 promoter metilasyonu için test ve/veya BRAF mutasyonu bakılmalıdır. MLH1 metilasyonunun ve BRAF V600E mutasyonunun olmaması, Lynch sendromu olasılığını düşündürür ve germline MLH1 analiz endikasyonu olabilir.

MSH2 ve MSH6 da nükleer ekspresyon kaybı: Lynch sendromu olasılığı yüksektir**.**

- Germline MSH2 analizi uygulanır ve negatif ise germline MSH6 analiz edilebilir.

İzole MSH6'nın nükleer ekspresyonunun kaybı: Lynch sendromu olasılığı yüksektir.

- Germline MSH6 analizi yapılabilir.

İzole PMS2 nükleer ekspresyon kaybı: Lynch sendromu olasılığı yüksektir.

- Germline MSH2 analizi yapılabilir. [25]

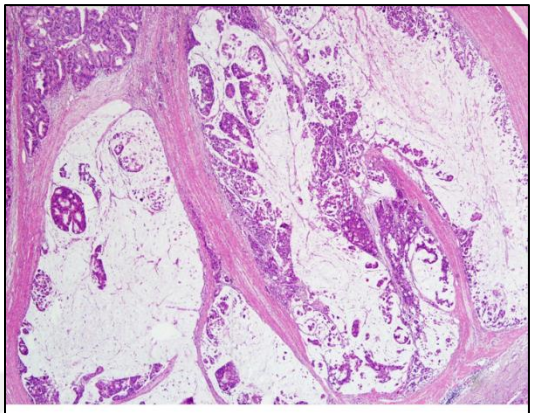
İHK sonucu	MMR ve MSI durumu	MMR gen defekti	Lynch Sendromu	Sporadik
MLH1+PMS2 kaybı	MMR eksik/ MSI-H	MLH1	Germline MLH-1 (çok düşük olasılık)	BRAF-mutasyonu MLH-1 metilasyonu
MSH2+MSH6 kaybı	MMR eksik/ MSI-H	MSH2	Germline MSH-2 - EPCAM mutasyonu	DÜŞÜK OLASILIK
İzole PMS2 kaybı	MMR eksik/ MSI-H	PMS2	Germline PMS-2 - Nadiren MLH1 gen defekti	DÜŞÜK OLASILIK
İzole MSH6 kaybı	MMR eksik/ MSI-H	MSH6	Germline MSH-6	DÜŞÜK OLASILIK

Tablo 1: Mismatch repair proteinlerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi [25]

3. KOLOREKTAL KANSERLERDE PROGNOSTİK PARAMETRELER

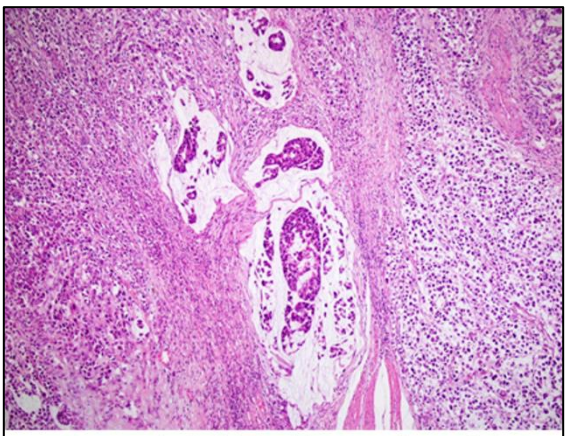
3.1. Histolojik Subtipler

Müsinöz Adenokarsinom


Resim 2: Müsinöz adenokarsinom (x4, H&E)

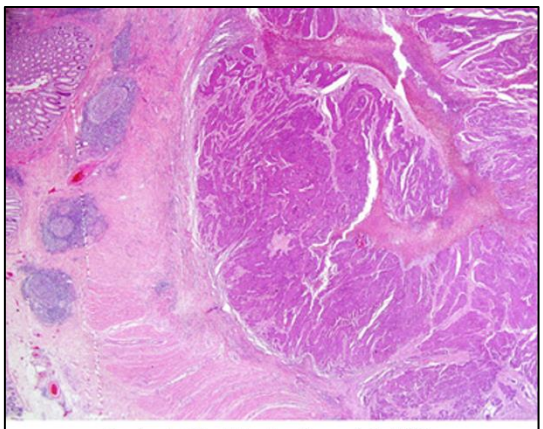
Tümörün % 50'sinden fazla kümeler, tabakalar taşlı yüzük hücreleri de dahil tek hücreler içeren ekstrasellüler müsin havuzlarından oluşuyorsa müsinöz adenokarsinom olarak adlandırılır (Resim 2). En sık görülen subtip olup görülme sıklığı %5-%20 arasında değişkenlik gösterir. Metastatik süreçlerde sistemik tedaviye göreceli olarak daha az yanıt verir. Mikrosatellit instabilite olguları adenokarsinom, NOS subtipine göre daha sıktır. MSI durumu bağımsız bir risk faktörü olarak değerlendirilmemelidir. Derecelendirme glandüler yapılanma ve epitel maturasyonuna göre yapılır [4].

Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom


Resim 3: Taşlı yüzük hücreli karsinom (x10, H&E)

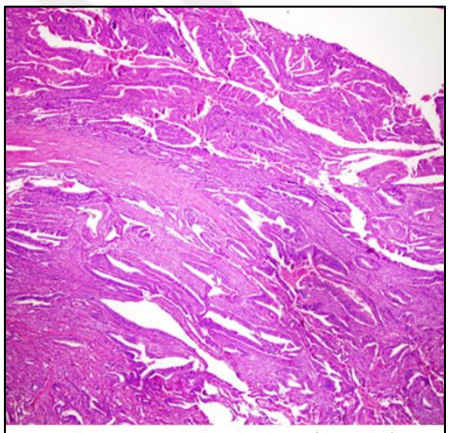
İntrasitoplazmik müsin içeren, tipik olarak nükleusu kenara itilmiş görünümlü hücreler tümörün %50'sinden fazlasını oluşturduğunda tümör, taşlı yüzük hücreli karsinom olarak tanımlanır (Resim 3). Bu subtip, yaklaşık %1 gibi düşük bir prevalans oranına sahiptir ve sıklıkla sağ kolonda izlenir. Tümörler sıklıkla ileri evrelerde tanı alır. Ancak evreye göre düzeltilmiş sonuçları, adenokarsinom NOS ve müsinöz karsinom ile karşılaştırıldığında daha kötüdür. Metastazlar hızlı ve çoklu lokalizasyonlarda görülür. Bu durum kolorektal karsinomlar için tipik değildir. MSI, sık rastlanır. Lynch sendromu ile sıkı ilişkisi bulunur [4].

Medüller Karsinom


Resim 4: Medüller karsinom (x2, H&E)

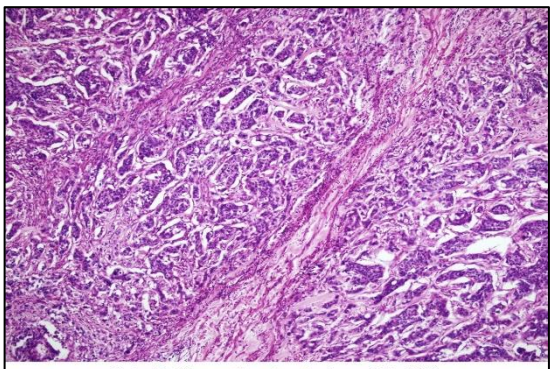
Veziküler nükleuslu, belirgin nükleollü, geniş eozinofilik sitoplazmalı hücrelerin tabakalar halinde izlendiği, belirgin lenfosit ve nötrofil lökosit infiltrasyonu ile karakterize bir karsinom subtipidir. Bu alt tipin az raporlandığı düşünülmektedir. Sıklıkla mikrosatellit instabilite içerir, en sık BRAF mutasyonları ile kombinasyon halindedir ve iyi bir prognoz ile ilişkilidir. Bu alt tip, CDX2 ve CK20 ekspresyon kaybı göstermekte olup aberan bir immünhistokimyasal profile sahiptir (Resim 4) [4].

Serrated Adenokarsinom


Resim 5: Serrated adenokarsinom (x10, H&E)

Bu alt tip, serrated poliplere benzerlikler ile tanımlanır. Tümör hücrelerinde nükleositoplazmik oran düşük olarak izlenir. Tüm kolorektal kanserlerin yaklaşık %10-15'i serrated adenokarsinom olarak sınıflandırılabilir. BRAF mutasyonu ve MLH1 metilasyonu ile yakın ilişkilidir [4]. (Resim 5)

Mikropapiller Adenokarsinom


Resim 6: Mikropapiller adenokarsinom (x10, H&E)

Bu tümör alt tipi, vasküler yapılara benzer stromal boşluklar içerisinde küçük tümör kümelerinin izlendiği yapılar ile karakterize olup tanı için bu komponentin %5'ten fazla olması gereklidir. Bu subtip, yüksek lenf nodu metastaz riski ile lenfatik invazyon, ekstramural vasküler invazyon ve perinöral invazyon gibi kötü prognostik faktörler ile ilişkilidir [4]. (Resim 6)

Adenom Benzeri Adenokarsinom

Bu subtip, daha önceleri villöz adenokarsinom ve invaziv papiller adenokarsinom olarak tanımlanmıştır. İnvaziv alanların %50'sinden fazlası düşük dereceli bir görünüme sahiptir, adenom benzeri villöz yapılar görülmektedir. Çok az desmoplastik reaksiyon görülür ve itici tarzda büyüme paterni sergilemektedir. Bu alt tipin küçük biyopsilerde tanınması zordur. Yüksek KRAS mutasyon oranı ve iyi prognozla ilişkilidir.

Adenoskuamöz Karsinom

Bu nadir görülen subtipin insidansı %0,1 den az olup adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom morfolojisi birlikte görülmektedir [4].

Sarkomatoid Komponent İçeren Karsinom

Küçük bir kolorektal karsinom alt grubu, kısmen indiferansiye morfolojide olup iğsi hücreli komponent veya rabdoid özellikler gibi sarkomatoid özellikler içerebilir. Tümörler tipik olarak büyük olup bol miktarda intrasitoplazmik, eozinofilik rabdoid cisimleri olan karakteristik rabdoid hücreler içermektedir. Tümör hücreleri genellikle diskoheziv ve miksoid matrikse gömülüdür. Pleomorfik dev iğsi hücreler ve glandüler farklılaşma alanları da görülebilir. SWI/SNF kromatin yeniden modelleme kompleksinin bir çekirdek alt birimi olan SMARCB1 (INI1) için nükleer immün ekspresyon kaybı karakteristiktir. Bu tümörler, SMARCA4, SMARCA2 ve/veya SMARCB1 dahil olmak üzere SWI/SNF protein ailesinin birçok üyesinin kaybına/koaktivasyonuna sahip gibi görünmektedir. Bazılarında ARID1A anormallikleri bulunur [4].

İndiferansiye Karsinoma

Bu karsinomlar, epitelyal farklılaşmadan sonraki aşamaların görülmediği, morfolojik, immünohistokimyasal ve moleküler kanıtlarından yoksun tümörlerdir. İnfiltratif sınırlarının olması, sinsityal büyüme paternleri ve belirgin lenfoplazmositik infiltrasyonun izlenmemesi ile medüller karsinomlardan farklıdırlar. Nadiren MSI gösterirler [4].

3.2. Derecelendirme

WHO 5.edisyona göre kolorektal karsinomlarda derecelendirme gland formasyonu temel alınarak yapılır. Daha önceleri iyi-orta derecede diferansiye tümörler olarak bilinen grup düşük dereceli, kötü diferasiye tümörler yüksek dereceli olarak sınıflandırılması önerilir. Derecelendirme, en az farklılaşmış bileşene göre yapılır. Epitelyal mezenkimal transizyonun bir işareti olarak tümör tomurcuklanması ve kötü farklılaşmış kümelerin oluşumunun meydana geldiği invaziv kenar, tümörü derecelendirirken dikkate alınmamalı, ancak ayrı olarak bildirilmelidir [4].

Kolorektal karsinomlarda birden çok derecelendirme sistemi bulunmaktadır fakat geniş çaplı kullanılan ve genel geçer bir derecelendirme sistemi konusunda eksiklik bulunmaktadır. Çoğu derecelendirme sistemi tümörleri 3 veya 4 kademeli olarak gruplandırır.

Derece 1: İyi diferansiye (%95 ten fazla gland formasyonu)

Derece 2: Orta diferansiye (%50-95 arası gland formasyonu)

Derece 3: Kötü diferansiye (%50 den az gland formasyonu)

Derece 4: İndiferansiye (gland yapısı veya müsin içermemesi, skuamöz diferansiyasyon ve nöroendokrin diferansiyasyon izlenmemesi)

AJCC (American Joint Committee on Cancer), TNM kılavuzunun 8. baskısı için kolorektal kanser için dört kademeli bir derecelendirme sisteminin kullanımını belirlemiştir [28]. WHO'ya göre, yapılan derecelendirmede, medüller karsinomlar, kötü diferansiye olarak kategorize edilse bile düşük dereceli tümörler gibi davrandığı bilinmektedir [26].

4.3. Evreleme: TNM

Kolorektal karsinomlarda evrelemede daha önceleri Dukes, sonra Astler-Coller evreleme sistemleri kullanılmış olup mevcut raporlama sistemlerinde AJCC ve UICC (Union for International Cancer Control) tarafından geliştirilen TNM evreleme sistemi tercih edilir [27].

TNM Tanımlayıcıları

m (çoklu primer tümörler), r (tekrarlayan), y (tedavi sonrası)

Primer tümör (T)

T değerlendirilemedi: Mevcut patolojik bilgilere dayanarak belirlenemez

T0: Primer tümör yok

Tis: Karsinoma in situ, intramukozal karsinom (lamina propria invazyonu, muskularis mukozaya uzanım yok)

T1: Tümör submukozaya invaze

T2: Tümör muskularis propriaya invaze

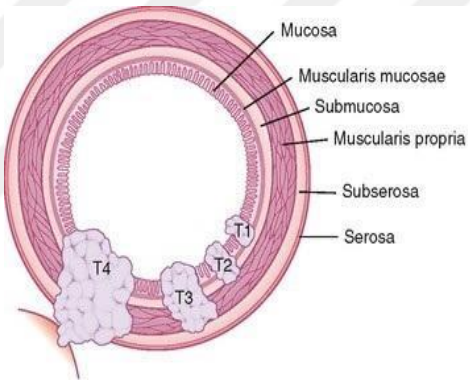
T3: Tümör subserozaya veya nonperitonealize perikolik yağ dokuya veya perirektal dokulara invaze

T4: Tümör diğer organ veya yapılara direkt invaze ve adheze, ve/veya visseral peritonu perfore etmiş

T4a: Tümör visseral peritonu perfore etmiş (tümör nedeniyle makroskopik perforasyon ve visseral peritonun yüzeyindeki inflamasyon alanlarına tümör invazyonu)

T4b: Tümör, diğer organ veya yapılara direkt invaze veya yapışık

- Diğer organlara veya yapılara büyük ölçüde yapışık olan tümör cT4b olarak sınıflandırılır. Ancak adezyonda tümör yoksa mikroskopik olarak duvar invazyonunun anatomik derinliğine göre sınıflandırma yapılmalıdır.



Şekil 6: T evresi şeması [28]

Bölgesel lenf nodları (N)

NX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: Bir-üç adet bölgesel lenf nodu metastazı mevcut (lenf nodundaki tümörün boyutu 0,2 mm'den büyük ve eşit), tüm lenf nodları negatif iken herhangi bir sayıda tümör depozit varlığı

N1a: 1 adet bölgesel lenf nodu metastazı mevcut

N1b: 2-3 adet bölgesel lenf nodu metastazı mevcut

N1c: Bölgesel lenf nodu metastazı olmadan subserozada, mezenter veya nonperitonealize perikolik veya perirektal dokuda tümör depoziti/depozitleri mevcut

N2: Dört veya daha fazla bölgesel lenf nodu metastazı mevcut

N2a: Dört-altı adet bölgesel lenf nodu metastazı mevcut

N2b: Yedi veya daha fazla bölgesel lenf nodu metastazı mevcut

Uzak metastaz (M)

M0: Uzak metastaz yok

M1: Bir veya daha fazla uzak bölgeye veya organa metastaz veya peritoneal metastaz

M1a: Periton metastazı olmaksızın bir organda metastaz mevcut

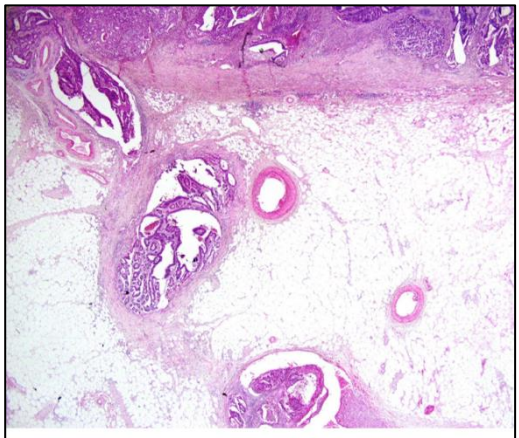
M1b: Birden fazla organda metastaz mevcut

M1c: Diğer organ tutulumuna bakılmaksızın peritonda metastaz mevcut

T	N	M	EVRE
Tis	N0	M0	0
T1, T2	N0	M0	I
T3	N0	M0	IIA
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
T1-T2	N1/N1c	M0	IIIA
T1	N2a	M0	IIIA
T3-T4a	N2b	M0	IIIB
T2-T3	N2a	M0	IIIB
T1-T2	N2b	M0	IIIB
T4a	N2a	M0	IIIC
T3-T4A	N2b	M0	IIIC
T4b	N1-N2	M0	IIIC
Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a	IVA
Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1b	IVB
Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1c	IVC

Tablo 2: AJCC Prognostik evreleme sistemi [27]

3.4. Vasküler invazyon


Resim 7: Ekstramural vasküler invazyon (x2, H&E)

Lenfatik invazyon, tek veya gruplar halinde tümör hücresinin endotel ile döşeli boşluklar içerisinde görülmesi şeklinde tanımlanır. pT1 kolorektal karsinomlarda lenf nodu metastazı için morfolojik bir risk faktörüdür.

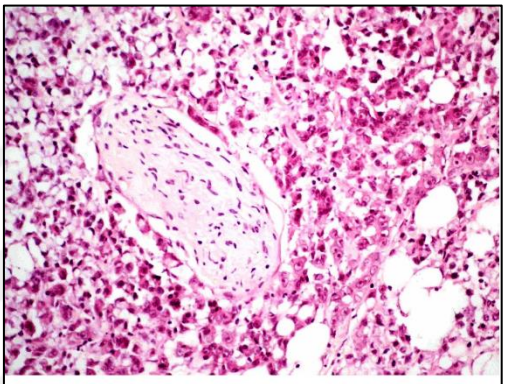
İnvazyon izlenen vasküler yapıların lokalizasyonuna göre intramural ve ekstramural vasküler invazyon tanımlanır ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Ekstramural vasküler invazyon (EMVI), intramuralden daha sık görülmekte olup daha az raporlanmaktadır. Ekstramural vasküler invazyon; endotel ile döşeli boşluğun çevresinde kas veya elastin tabakası ile çevrili olması veya elastin ile çevrili artere komşu iyi sınırlı tümör nodülün izlenmesi olarak tanımlanır. Perikolik yağ dokusundaki artere komşu alana uzanım gösteren, protrüde dil benzeri, düzgün sınırlı tümöral alanın varlığı ve devam eden bir vasküler yapısı olmaksızın artere bitişik yuvarlak bir tümör nodülü olarak tanımlanan bağımsız arteriol bulgusu *(orphan arteriole),* vasküler invazyon açısından potansiyel ipuçlarıdır ve daha yakın inceleme gerektirir (Resim 7). Çevredeki bağ dokusunda zaman zaman görülen düzensiz elastin lifleri ve peritoneal elastik laminanın elastin lifleri vasküler bir yapının kanıtı olarak kabul edilmemelidir. Vasküler invazyon için şüpheli olan ancak bu kriterleri karşılamayan vakalar şüpheli olarak tanımlanabilir [29].

Evre II kolorektal adenokarsinomlarda EMVI adjuvan kemoterapinin endikasyonlarından biridir. Özellikle karaciğer metastazlarının gelişimi ile güçlü ilişkisi bu kararı haklı çıkarmaktadır. *The Royal College of Pathologists*, EMVI için %25'lik bir standart tespit oranı belirlemiştir ve varlığının optimal tespiti için numune başına en az dört tümör bloğunun incelenmesi tavsiye edilir. Bazı çalışmalar EMVI ile uzak metastaz gelişimi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir; bu da venöz invazyon varlığının, barsak duvarındaki konumundan daha önemli olabileceğini düşündürmektedir [30].

Yakın zamanlarda, manyetik rezonans görüntülemenin neoadjuvan tedaviden önce ve sonra EMVI'yı doğru bir şekilde saptadığı ve rutin patolojik değerlendirmede gözden kaçan vakaları belirlediği gösterilmiştir. EMVI'nin prognostik etkileri olduğu biliniyor ancak geleneksel histopatolojik yöntemlerle yetersiz saptanıyorsa, hastalığın tekrarlama riskini önlemek için MRI gibi alternatifler düşünülebilir [31].

3.5. Perinöral invazyon

Tümör hücreleri tanım gereği sinir çevresinin en az üçte birini çevrelemelidir (Resim 8). Sinirlerin üç katmanından herhangi birinde bulunabilir. Rektumda, daha yüksek tümör evrelerinde ve diğer risk faktörlerinin varlığında daha sık rastlanır. İnsidansı yaklaşık %20 olarak bildirilmiştir. Perinöral invazyon, lokal nüks, uzak nüks ve azalmış sağkalım ile ilişkilidir [4].



Resim 8: Perinöral invazyon (x40, H&E)

3.6. Cerrahi sınır durumu ve rezeksiyon örneğinin kalitesi

Birçok cerrahi sınır mevcuttur. Proksimal ve distal sınırlar ayırt edilmesi en kolay olanlardır. Bu sınırlar nadiren pozitiftir, ancak tümör bu uzunlamasına sınırlara yakın yerleştiğinde, özellikle ameliyattan önce radyoterapi uygulanmadığında rektum kanserinde lokal nüks riski artar. Sirkumferansiyel cerrahi sınır daha önemlidir. Tümör ile rezeksiyon kenarı arasındaki mesafe <1 mm ise pozitif kabul edilir. Bu cerrahi sınır pozitifliği lokal nüks ve genel sağkalım ile yakından ilişkilidir. Çekum yerleşimli karsinomlarda sirkumferansiyel veya mezokolik cerrahi sınırlar da önemlidir. Lokal eksizyon materyalleri için en önemli cerrahi sınır, bazal cerrahi sınırdır. Lateral rezeksiyon cerrahi sınır pozitifliği lokal nüks oranlarını etkilemez [4].

3.7. Tümör boyutu

Kolorektal kanser hastalarının prognozunun değerlendirilmesi, izlem ve adjuvan tedavi seçimi açısından oldukça önemlidir. Yüksek riskli hastaları belirlemede en önemli parametre, tümörün invazyon derinliğine dayanan T sınıflandırmasıdır. Ancak, yatay tümör yayılımının prognostik etkisine ilişkin veriler sınırlı ve çelişkilidir [32]. Mide karsinomlarında tümör boyutunun, özellikle maksimum yatay tümör çapı önemli bir prognostik faktör olup sınır değerinin 3,5 cm olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [33]. Optimal eşik değerleri kolonun farklı bölümleri arasında değişkenlik göstermektedir. Sağ kolondan rektuma doğru azalır [32].

T evresinin artmasıyla kolon kanseri ölüm ve tekrarlama riskine tümör boyutunun etkisi belirgin olarak azalmaktadır. Bu araştırmalarda; tümör boyutunun, T1 evresindeki hastalarda diğer tüm klinik faktörlerden daha iyi olduğu düşünülmüştür [34].

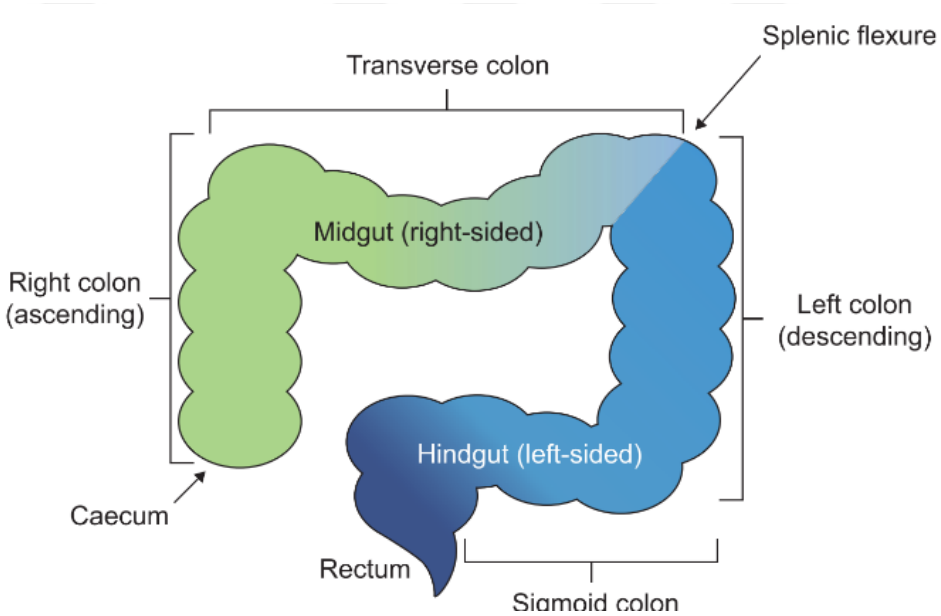
Kolon kanserinde eşik tümör boyutuna (tümör boyutu 7-8 cm) ulaşana kadar lenf nodu pozitifliğinin ölüm riskini arttırdığı gösterilmiştir Rektum kanserinde de tümör boyutunun değeri ihmal edilmemelidir. Artan tümör boyutu ile lenf nodu tutulumu prevalansı arasında doğrusal olmayan bir korelasyon gözlenirken, tümör boyutu ile uzak metastazlar arasında pozitife yakın bir korelasyon saptanmıştır. 5 yıllık ve 10 yıllık rektum kanserine özgü ölüm oranları tümör büyüdükçe artmaktadır [35].

3.8. Tümör lokalizasyonu

Proksimal ve distal kolorektal kanserlerde epidemiyolojik ve histolojik farklılıklar gözlemlenmiştir. Sağ taraflı KRK olan hastaların sol taraflı olanlara kıyasla kadın cinsiyet dominansı, ileri yaşta görülme ve müsinöz, farklılaşmamış veya taşlı yüzük hücre histolojisine sahip olma olasılığı daha yüksektir. Ayrıca farklı organlara metastaz sıklıkları da vardır; sağ taraflı kolon tümörlerinin peritona metastaz yapma olasılığı ve sol taraflı olanların toraksa veya daha az sıklıkla kemiğe metastaz yapma olasılığı daha yüksektir. Farklı karsinogenetik mekanizmalar ve değişen moleküler özellikleri nedeniyle; sağ ve sol kolon tümörleri farklı biyolojik özelliklere sahiptir [36].

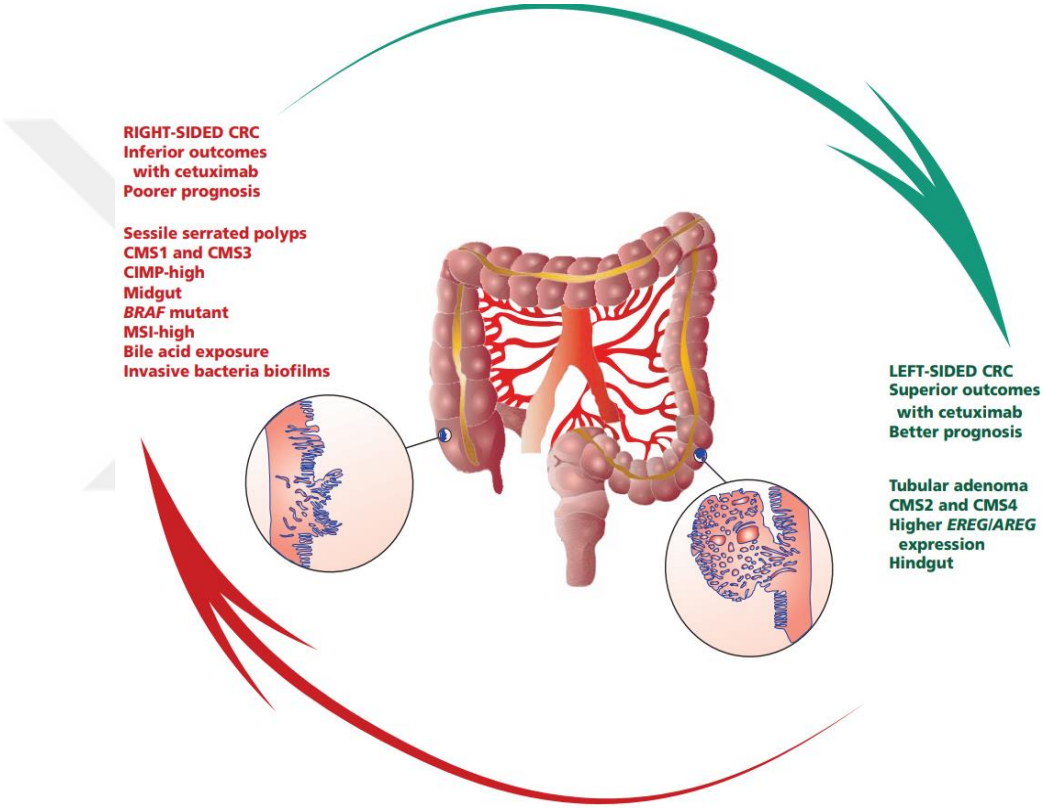
Gen ekspresyonunu ve metilasyonlarını geniş çapta araştırabilen Kanser Genom Atlası (The Cancer Genome Atlas) gibi genomik platformlar sayesinde, proksimal ve distal kolorektal karsinomlar arasındaki farklı genomik özellikler tanımlanabilir hale gelmiştir [37].

Lokalizasyon tarifindeki en yaygın ayrım, splenik fleksuranın proksimalindeki kanserleri sağ taraflı ve distalindeki kanserleri sol taraflı olarak tanımlar. Bu kesim noktasının temelini transvers kolonun embriyolojik gelişimi oluşturur. Transvers kolonun çoğu (proksimal üçte ikisi) orta barsaktan, distal üçte biri arka barsaktan köken alır [38]. Bazı çalışmalar, transvers kolonun proksimal ve distal olarak net ayrılamaması nedeniyle araştırmalara dahil etmemektedir. Özellikle lokal evre II-III rektum kanserleri de, kolon kanserlerinden farklı bir tedavi paradigmasına sahip olması nedeniyle sıklıkla dışlanır. Fakat, metastatik rektum ve kolon kanserleri için sistemik tedaviler aynı olduğundan son zamanlarda yapılan birkaç çalışmaya dahil edilmiştir [36].



Şekil 7: Sağ ve sol kolon segmentleri [39]

Normal embriyolojik gelişim sırasında hücre göçü ve diferansiyasyon süreçlerinin farklı olması, orta ve arka barsaktaki farklı gen ekspresyon kalıpları ile açıklanabilir. Özellikle, bazı homeobox (HOX) ve kraniokaudal polarizasyon oluşturan diğer genler, orta ve arka barsakta farklı oranlarda bulunur. Ayrıca, enterik nöron prekürsörleri tarafından gerçekleştirilen rostrokaudal kolonizasyon, ilgili topografi ve biyolojik tepkiler ile ilişkili spesifik protein ekspresyonundan etkilenir. Sağ ve sol kolonun farklı embriyolojik kökenleri, muhtemelen altta yatan biyolojideki farklılıklara katkıda bulunduğu düşünülmektedir [36].



Şekil 8: Sağ-sol kolon arasındaki anahtar biyolojik farklılıklar [36]

Kolon, bakterilerden zengin bir flora barındırır. Fusobacterium nucleatum, enterotoksijenik bacteroides fragilis ve enterococcus faecalis dahil olmak üzere çeşitli bakteri suşlarının varlığı, KRK gelişimi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Normal kolonik mukozadaki florada çok ufak farklar olsa da sağ ve sol taraflı kolorektal karsinom gelişen hastalar arasında bakteriyel biyofilmlerin varlığı da dahil olmak üzere, mukozal florada belirgin bir fark vardır [36]. Bakteriyel biyofilmler, bir yüzeye ve/veya birbirine bağlı ve kendi ürettiği bir matrikse gömülü bakteri kümeleridir [40]. Sağ taraflı KRK'lerin %89'unda (hepatik fleksura proksimalinde) invaziv bakteriyel biyofilmler bulunurken, sol taraflı tümörlerde sadece %12'sinde (hepatik fleksuranın distalinde) tespit edilmiştir. Bu biyofilmler, epitelyal e-cadherin kaybı, artan interlökin-6 ve aktive edilmiş Stat3 ile birlikte artan proliferasyon ile ilişkilendirilmiştir [41].

Epidemiyolojik çalışmalar, artan fekal safra asidi konsantrasyonu ile artan KRK insidansı arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Özellikle, sağ kolonda sola kıyasla 10 kat daha fazla primer safra asidi-konjuge kolik asit konsantrasyonu bulunmaktadır. Bu konsantrasyonun karsinogenezin farklı mekanizmalarına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir [36].

Normal sağ ve sol kolon epitelleri arasında farklı gen ekspresyon profilleri de vardır. Sağ kolon epitelinde sitokrom P450 ailesi genlerinin ekspresyonu sol kolona göre daha yüksektir. Sağ ve sol kolon arasındaki gen metilasyon modelleri önemli farklılıklar gösterir. Özellikle, mismatch repair genlerindeki hMLH1 promotör metilasyonunu ve O-6-metilguanin-DNA metiltransferaz-MGMT'nin prevalansı, özellikle yaşlı hastalarda normal sağ kolon mukozasında daha yüksektir. Bu epigenetik farklılıkların, sağ kolon karsinomlarının biyolojisinde altta yatan moleküler özellikleri açıklayabileceği düşünülmektedir [36].

Sesil serrated adenomlar sağ kolonda daha yaygındır. Konvansiyonel tübüler ve tubulovillöz adenomlar, sağ kolonda daha küçük boyutta iken yüksek dereceli displazi veya adenokarsinom oluşumu ile ilişkilidir. Bu adenomların farklı moleküler özellikleri bulunmakta olup farklı KRK tiplerinin öncüleri olduğu düşünülmektedir (Tablo 3) [36].

	CIMP-H	MSI-H	MLH-1 metilasyonu	BRAF mutasyonu	CIN
	Preneoplastik lezyonlar				
Sesil serrated adenoma (sağ taraf)	+	+/-	+/-	+	-
Konvansiyonel adenom (sağ ve sol)	-	-	-	-	+
	Kolorektal karsinomlar				
Sağ taraflı KRK	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
Sol taraflı KRK	Düşük	Düşük	Düşük	Düşük	Yüksek

Tablo 3: Preneoplastik lezyonlar ve KRK lokalizasyonlarına göre moleküler özellikleri

Kısaltmalar: CIMP-H; CpG Island Metilasyon Fenotipi, yüksek, MSI: Mikrosatellit instabilite, yüksek, CIN: Kromozomal instabilite.

Sağ ve sol taraf yerleşimli kolon kanserlerinin makroskopik özelliklerinde de farklılıklar bulunmaktadır. Sağ kolon tümörleri, tipik olarak lümene doğru uzanan ve anemiye neden olan büyük boyutlu, ekzofitik, polipoid lezyonlar şeklinde prezente olur. Sol kolon karsinomları ise genellikle lümeni çevreleyen daraltan ve sıklıkla obstrüksiyona yol açar infiltratif tümörlerdir [38].

Sağ ve sol kolon kanserleri ile ilişkili olan alternatif KRK karsinogenezi yolları tanımlanmıştır. Epigenetik gen susturulmasına neden olan geniş genom sekanslarında hipermetilasyona sahip KRK'lar ile; belirgin anöploidi içeren kromozomal instabilite gösteren tümörler birbirinden farklı olma eğilimindedir. CIMP-yüksek KRK'lar özellikle mikrosatellit instabiliteye sahip tümörlerdir ve sıklıkla proksimal yerleşimlidir. Kromozomal instabilitesi olan tümörler sıklıkla sol taraf yerleşimlidir (Tablo 3) [37].

CIMP-yüksek kolorektal karsinomların %50-60'ı MSS olup bu fenotipe sahip kanserler, kötü sağkalım ile ilişkilidir. MSI'nin prognostik etkisi evreye bağlıdır. Evre II ve III kanserlerde, MSI iyi prognoz ile ilişkili iken evre IV tümörlerin sadece %4'ü MSI olsa da, bu grup tümörler düşük sağkalım ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, anti–programmed death-1 (PD-1) gibi bağışıklık kontrol noktası antikorlarının MSI-H tümörlerin tedavisindeki etkinliği nedeniyle evre IV hastalıkta MSI ile ilişkili prognozun büyük ölçüde değişebileceği öngörülmektedir [36].

Sağ ve sol kolon kanserlerinde temel onkogenlerde ve tümör supresör genlerde mutasyon oranları farklılık göstermektedir. Evre IV kolon kanserlerindeki kötü prognoz ile ilişkili bulunan BRAF V600E mutasyonu sağ kolon karsinomlarında daha sık izlenir. Buna karşılık APC ve TP53 mutasyonu daha çok sol kolon tümörlerinde tespit edilmektedir [42]. Nokta mutasyonlarının yanı sıra, ERBB2 ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi reseptör tirozin kinazların amplifikasyonları da sol kolon yerleşimli karsinomlarda daha yaygındır (Tablo 4) [38].

Tablo 4: Onkogen ve Tümör Süpresör mutasyon oranları (Cancer Genome Atlas)

	Total (n=276)	Sağ (n=92)	Sol (n=161)
APC	75.0%	63.6%	81.9%
TP53	54.0%	34.8%	64.6%
KRAS	42.0%	45.5%	40.3%
PIK3CA	20.1%	27.3%	14.6%
FBXW7	16.5%	22.7%	12.5%
SMAD4	11.6%	15.2%	9.7%
TGFBR2	10.3%	27.3%	1.4%
BRAF	9.4%	24.2%	2.1%
NRAS	8.9%	7.6%	9.0%

Birçok çalışmada kolorektal karsinomların moleküler özelliklerini esas alan birkaç farklı gruplama sistemi yer almaktadır. Bu sistemlerde tanımlanan alt tipler arasında tam bir tutarlılık izlenmemiştir. Bu nedenle farklı alt tipleme şemalarını birleştirmek için, uluslararası bir *Kolorektal Alt Tipleme Konsorsiyumu*, farklı sınıflandırma şemaları arasındaki ilişki belirleyerek 4 moleküler alt tipi (consensus molecular subtypes -CMS) ortaya koymuştur [36]. Moleküller özellikler kısmında detaylı olarak bahsedilecektir.

3.9. Lenf nodu sayısı metastaz durumu

Lenf nodu evrelemesi, prognoz tahmin etmek ve postoperatif tedavi sınıflandırması yapmak için çok önemlidir. Küratif olgularda halen en güçlü prognostik parametredir. Lenf nodu pozitif kolon kanserinde genellikle adjuvan kemoterapi önerilir. Bunun aksine, evre II kanserlerde yarar minimaldir ve adjuvan tedavi kararı ek risk faktörlerine bağlıdır. Yetersiz lenf nodu disseksiyonu bu faktörlerden biridir. Ancak yeterli lenf nodu evrelemesi için gereken lenf nodu sayısı için farklı öneriler bulunmaktadır [43].

Ulusal Kalite Forumu’nda, Amerika Birleşik Devletleri'nde kolon kanseri bakımı için anahtar kalite ölçütleri arasında bir cerrahi rezeksiyonda en az 12 lenf nodu varlığı önerilmektedir. İncelenen lenf nodu sayısı arttıkça metastaz tespit etme olasılığı artar; bu nedenle 12 lenf nodu minimum hedef olarak kabul edilmelidir, ancak olası tüm lenf nodları incelenmelidir. Obez veya yaşlı hastalardan alınan örneklerde veya neoadjuvan tedavi sonrası lenf nodlarının tespiti daha zor olabilir. Kolorektal kanserde nodal metastazların sıklıkla küçük lenf nodlarında (çapı <5 mm) bulunduğu gösterilmiştir. Bu nedenle rezeksiyon örneklerinde titiz bir araştırma yapılması gerekir. 12'den az lenf nodu bulunursa, spesmeni tekrar incelemek gereklidir [26].

Tümör ile tamamı infiltre olmuş ve rezidü lenf nodu dokusunun izlenmediği tümöral alanlar, tümör nodülü veya satelit nodül olarak adlandırılır. Bu nodüller, pozitif bir lenf nodu olarak kabul edilmez. Lenf nodu metastazlarının yokluğunda, tümör nodülleri N1c olarak sınıflandırılır [27].

İzole tümör hücreleri, tek tümör hücreleri veya küçük kümeler olarak tanımlanır. 0,2 mm'den küçük tümör hücreleri, genellikle immünohistokimyasal teknikler ile tespit edilir. ve N0 olarak sınıflandırılır. 0,2 mm- 2,0 mm arasındaki metastatik odaklar, mikrometastaz olarak adlandırılmıştır [26].

AJCC sistemine göre evrelemede metastatik lenf nodu sayısı belirtilir. Bu lenf nodlarının bölgesel olmasına dikkat edilmelidir. Bölgesel olmayan lenf nodu metastazları uzak metastaz olarak kabul edilmektedir. Bölgeye göre lokal lenf nodları tablo 5’te özetlenmiştir. Örneğin rektal kanserler için, eksternal iliak veya common iliak lenf nodlarında metastaz, uzak metastaz olarak sınıflandırılır [29]. İyi diferansiye müsinöz adenokarsinomlar genellikle lenf nodu metastazı olmadan peritoneal yayılım gösterirler. Bunun aksine, az diferansiye müsinöz ve non-müsinöz apendiks adenokarsinomlarında sıklıkla lenf nodu metastazları saptanır [27].

BÖLGE	LENF NODU
Çekum	Perikolik, ileokolik, sağ kolik
Çıkan kolon	Perikolik, ileokolik, sağ kolik, orta kolik sağ dalı
Hepatik fleksura	Perikolik, ileokolik, orta kolik, sağ kolik
Transvers kolon	Perikolik
Splenik fleksura	Perikolik, orta kolik, sol kolik
İnen kolon	Perikolik, sol kolik, alt mezenterik, sigmoid
Sigmoid	Perikolik, sigmoid, alt mezenterik, üst rektal
Rektosigmoid	Perikolik, sigmoid, üst rektal
Rektum	Mezorektal, üst rektal, alt mezenterik, iç iliak, alt rektal

Tablo 5: Kolonun anatomik alt bölgeleri için bölgesel lenf nodlar [26]

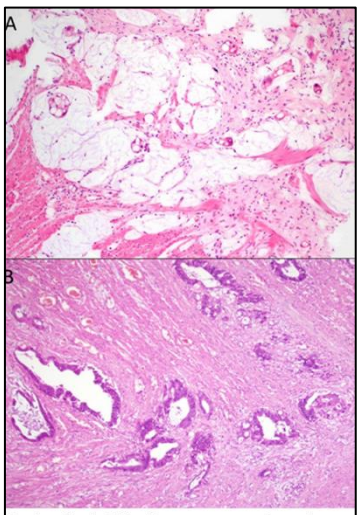
3.10. Tedaviye yanıtı

Genellikle rektal karsinomlarda uygulanan neoadjuvan radyoterapi veya kemoradyoterapi veya kolorektal karsinomlarda tercih edilen sistemik tedavi; histopatolojik özellikleri etkilemektedir. Tedavi yanıtının saptanması, tümör regresyon derecesinin değerlendirilmesi ile gerçekleştirilir. Bu değerlendirme için çeşitli sınıflandırma sistemleri önerilmiştir [4].

Neoadjuvan tedavi sonrası görülen tümör yanıtı, özellikle rektal karsinomlar için kritik öneme sahiptir. Tedavi sonrasında rezidüel tümör izlenemeyeceği gibi, tedavi yanıtının görülmediği durumlar da bulunabilmektedir. Minimal rezidüel hastalık varlığının daha iyi bir prognoza sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle özellikle makroskopik olarak tümörün görülmediği rezeksiyon materyallerinin dikkatli bir şekilde incelenmesi gerekmektedir. CAP protokolünde tümör yanıtının puanlanması için Modifiye Ryan şeması önerilmiştir [26, 44].

Modifiye Ryan Şeması:

- Hiç canlı tümör hücresinin olmaması (tam yanıt): 0
- Tek hücre veya küçük gruplar halinde tümör olması (tama yakın yanıt) (Resim 9): 1
- Tümör regresyon kanıtı ile birlikte rezidüel kanser olması, tek hücre veya küçük tümör gruplarından daha fazla (parsiyel yanıt) (Resim 9): 2
- Tümör regresyon kanıtı bulunmadan rezidüel kanser varlığı (zayıf yanıt veya yanıt yok): 3



Resim 9: A: Tümör regresyon skoru 1, B: Tümör regresyon skoru 2.

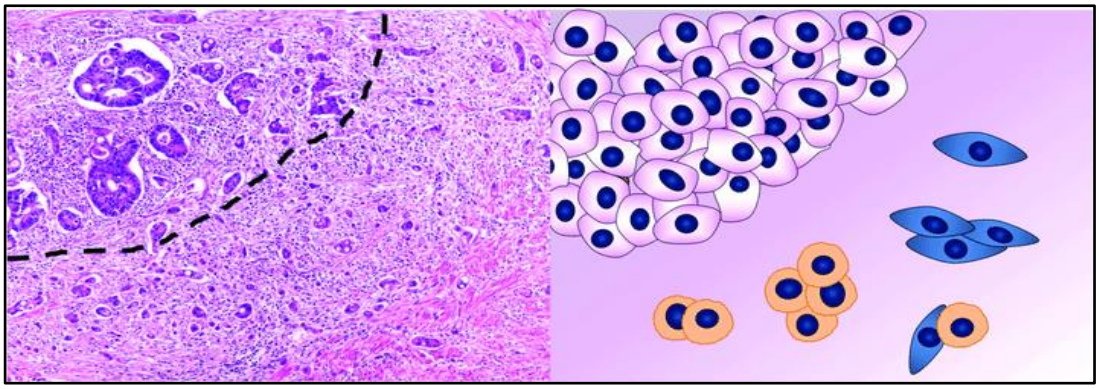
Tümör regresyonu, primer tümörde değerlendirilmeli, lenf nodu metastazları değerlendirilmeye dahil edilmemelidir. Neoadjuvan terapi sonrası izlenen asellüler müsin, tam yanıtı temsil etmektedir [26, 44].

3.11. Tümör tomurcuklanması ve az diferansiye hücre kümeleri

Erken evre kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %25'inin uzak metastaz geliştirdiği bilinmektedir. Aynı patolojik evredeki hastaların, erken nüks veya mortalite gibi onkolojik sonuçlar açısından farklı özellikleri olabilmektedir. Bu nedenle son zamanlarda tomurcuklanma ve ADK gibi birçok potansiyel prognostik biyobelirteç tanımlanmıştır [45].

Tümör tomurcuklanması, tümörün invaziv kenarında izlenen tek hücre veya 4 hücreden daha az hücreden oluşan tümör hücre grubu olarak tanımlanır. Bu parametre, hematoksilen eozin kesitte en yoğun alanda değerlendirilir ve hafif, orta ve yüksek olarak gruplandırılır. Az diferansiye kümeler ise 5 tümör hücresinden fazla ve gland oluşturmayan hücre kümeleri olarak tanımlanmakta olup kötü prognostik faktör olduğu düşünülmektedir [4].

Kolorektal kanserde tümör tomurcuklanması, bağımsız bir olumsuz prognostik faktör olup daha yüksek TNM evresi, yüksek tümör derecesi, lenfovasküler invazyon varlığı ve sonuç olarak lenf nodu ve uzak metastazlarla ilişkilidir [46].



Resim 10: Tümör tomurcuklanması [47]

Uluslararası Tümör Tomurcuklanması Konsensüs Konferansı, uluslararası kolorektal kanser kılavuzlarında ve rutin uygulamada kullanılmak üzere tümör tomurcuklanması için kanıta dayalı, standart bir puanlama sistemi önermektedir [48].

1. H&E kesitlerinde tümör tomurcuklanma sayımı yapılmalıdır. İnflamasyon gibi engelleyici faktörlerin olduğu durumlarda değerlendirmek için immünohistokimyasal yöntem kullanılabilir. Ancak puanlama H&E kesitler ile yapılmalıdır.

2. Tümör tomurcuklanması, invaziv tümör içeren tüm kesitlerin incelenmesinin ardından seçilen bir "hot-point" alan değerlendirilerek bildirilmelidir. Toplam tomurcuk sayısı, bazı mikroskoplarda 20x alana karşılık gelen 0.785 mm2'lik bir alanda rapor edilmelidir. Diğer mikroskoplar için uygun dönüştürme yapılmalıdır.

3. Hem toplam tomurcuk sayısı hem de üç kademeli derecelendirme bildirilmelidir. Üç kademeli değerlendirme: düşük (0-4 tomurcuk), orta (5-9 tomurcuk) ve yüksek (10 veya daha fazla tomurcuk) olarak belirlenmiştir.

Tümör tomurcuklanması, raporlamada zorunlu bir parametre olmamakla birlikte poliplerde ortaya çıkan kanserlerde ve evre I-II vakalarda bildirilmesi önerilir [48]. Tümör tomurcuklanmasının varlığı, APC mutasyonu ve artan nükleer β-katenin ekspresyonu ve membranöz E-cadherin kaybı, tipik olarak MMR korunması veya mikrosatellit stabilitesi ile ilişkili özellikler ile önemli ölçüde ilişkilidir. Kolorektal rezeksiyonlarının yakından incelenmesi, tümör tomurcuklanmasının sadece invaziv tümör kenarında(peritümöral tomurcuklanma) meydana gelmeyebileceğini, aynı zamanda ana tümör merkezinde (intratümöral tomurcuklanma) meydana gelebileceğini ortaya koymaktadır [49].

Tomurcuklanma, yüksek nüks riski ("yüksek riskli evre II KRK") olan ve bu nedenle adjuvan kemoterapiden fayda görebilecek bir hasta alt grubunu belirlemesi nedeniyle evre II KRK'de özel bir öneme sahip olabileceği düşünülmektedir. Evre II KRK tanısı olan hastalarda adjuvan kemoterapinin sağkalımı iyileştirdiği gösterilmiş olsa da yarar oldukça azdır. Bu nedenle adjuvan tedavi kararı kritik bir öneme sahiptir. Adjuvan kemoterapi, evre II kolorektal karsinom olgularının küçük bir kısmında kullanılmaktadır. Bu grubu belirleyen bazı parametreler; tam kat invazyon (pT4), lenfovasküler invazyon ve yüksek histolojik derecedir. Tomurcuklanma, evre II hastalarda yüksek risk ile ilişkili bir parametre olarak giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Özellikle yüksek dereceli tomurcuklanma izlenen olgularda, kemoterapinin etkinliğini koruduğu gösteriliyorsa; tomurcuklanmanın, adjuvan tedavi kararları üzerinde etkisi olabilir [50].

Epitelyal mezenkimal transizyon, epitel hücreleri tarafından malign fenotip için kritik bir mekanizma olarak düşünülmektedir. Kolorektal kanserde tümör tomurcuklanması, EMT mekanizmasının histolojik yansıması olarak değerlendirilebilir. Tomurcuklanan hücreler sıklıkla "psödo" sitoplazmik çıkıntılar ile birlikte görülebilir (Resim 10). Bu özelliğin hücre motilitesi ve invazyon kapasitesinin artışı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Histolojik olarak, yüksek dereceli tümör tomurcuklanması infiltratif sınıra sahip tümörlerde görülürken, iyi sınırlı tümörlerde daha az rastlanır [51].

EMT, embriyolojik gelişim sırasında izlenen olağan bir süreçtir ve daha sonra fizyolojik olarak susturulur. EMT, yara iyileşmesi, fibrozis ve kanser gibi çeşitli durumlarda yeniden etkinleşir. EMT sırasında epitel hücreleri iğsi hücrelere dönüşür [51]. Epitel hücreleri, E-cadherin ve sitokeratin gibi adezyon molekülleri ile oluşan sağlam hücre-hücre etkileşimleri ile karakterizedir. Apikal-bazal polarite de önemli bir epitelyal özelliktir. EMT'yi indükleyen ekstrasellüler sinyallere yanıt olarak epitel hücreleri; EMT'yi indükleyen transkripsiyon faktörlerini upregüle ederek morfolojik, hücresel ve moleküler değişiklikleri düzenler [52]. Bu mekanizma ile primer tümör hücreleri migrasyon yeteneği kazanarak metastatik potansiyeli oluşturur. Uzak bir bölgeye yayıldıktan sonra kanser hücrelerinin, mezenkimal-epitelyal transizyon (MET) olarak adlandırılan ters bir süreçte epitel özelliklerini yeniden kazandıkları düşünülmektedir. Komplet EMT, intermediate filament ekspresyonunda, intersellüler bağlantı kompozisyonunda ve hücre morfolojisinde eş zamanlı değişiklik süreçlerini içerir. Kanserlerde, komplet EMT'nin nadiren meydana geldiği düşünülmekte olup kanserlerin çoğunda parsiyel EMT izlenmektedir. Fenotipik heterojenite nedeniyle parsiyel EMT geçiren hücreleri tanımak zor olabilir [53].

Kolorektal kanserlerde tümör dokusundaki az diferansiye neoplastik hücre kümelerinin (poorly differentiated clusters-PDC) sayımına dayanan yeni bir derecelendirme sisteminin prognostik değerini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Ueno ve arkadaşları tarafından 2012'de tanımlanan tarife göre ADK, glandüler yapılar yapmaksızın en az beş neoplastik hücreden oluşan kümelerdir. ADK, sadece tümörün invaziv cephesinde değil, aynı zamanda tümör stromasında da bulunabilir. Küçük büyütmede (4x objektif lens) tespit edildikten sonra, en yüksek ADK yoğunluğuna sahip bir 20x büyük büyütme alanında sayılır. Tomurcuklanma derecelendirmesine benzer olarak 5 ten az grup derece 1, 5-9 arası grup derece 2 ve 9'dan fazla grup derece 3 olarak sınıflandırılır [54].

Konvansiyonel derecelendirme sistemi, kolorektal adenokarsinom, NOS *(not otherwise specified)* için geçerlidir. PDC derecelendirme sistemi, müsinöz ve mikropapiller subtip için de kullanılabilir fakat, taşlı yüzük hücreli tümörler genellikle izole hücrelerden veya solid tabakalardan oluşmakta olup nadiren kümeler halinde izlendiğinden PDC derecelendirmesinin mümkün olamayacağını düşünen yayınlanmamış çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar nedeniyle, taşlı yüzük hücreleri kümelerinin az diferansiye neoplastik kümeleri temsil etmediği düşünülmüştür. PDC derecelendirme sistemi rezeksiyon materyallerinde uygulanmakta olup endoskopik biyopsilerde de uygulanabilmektedir. Endoskopik biyopsilerde izlenen alanın küçük olması ve temsil ettiği PDC'nin daha az görülebilmesi sebebiyle sınıflandırmada farklı kriterler kullanılması gerekir. Bir 20x büyük büyütme alanında hiç grup izlenmediğinde derece 1; 1-2 grup varlığında derece 2; 3 ve daha fazla grup varlığında derece 3 olarak kategorize edilmesi önerilmiştir [55].

Az diferansiye neoplastik hücre kümelerinin değerlendirilmesinde farklı yaklaşımlar vardır. Histolojik derecelendirme ile birlikte değerlendiren bir araştırmada az diferansiye komponenti sınıflandırmak için 6 grup saptanmıştır. Az diferansiye alan tümörün %50 sinden fazlasını oluşturduğunda az diferansiye komponent *(poorly differentiated component-POR)* predominant olarak kategorize edilmiştir. Daha sonra POR alanın kapladığı objektiflere göre POR (x10), POR (x20) ve POR (x40) olarak gruplandırılmıştır. POR alanın x40 büyük büyütme alanını doldurmadığı durumlarda 5 ten fazla ve gland formasyonu oluşturmayan kümelerin (PDC) sayısına göre sınıflandırılmış 10 ve daha fazla; 10'dan daha az olarak ikiye ayrılmıştır [56].

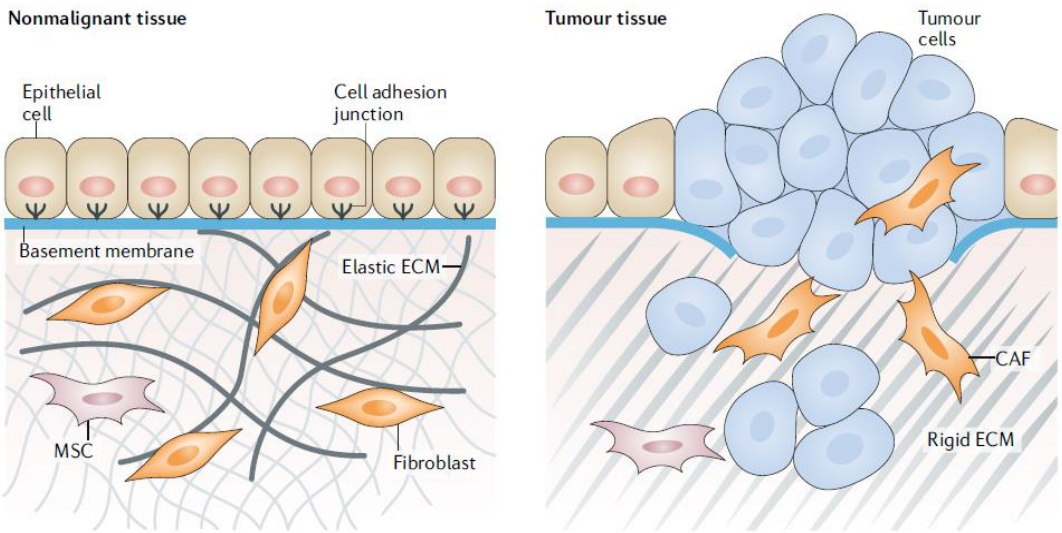
Tümör tomurcuklanması ve az diferansiye kümelerin prognostik önemi olduğu gösterilse de kolorektal kanser mikroçevresindeki anti-tümör immünitesi ve tümörün moleküler özellikleri ile bu parametreler arasındaki ilişki yeterince açıklanmamıştır [57].

PDC derecelendirmesinin, kansere spesifik sağkalım *(cancer specific survival-CSS)* için önemli bir prognostik faktör olduğu ve pTNM evresinden bağımsız olarak KRK'de rekürrenssiz sağkalım *(recurrence free survival-RFS)* için önemli bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir. PDC oluşumu, tümör hücrelerinin invaziv ve metastaz potansiyeli ile ilişkili olduğu düşünüldüğünden bu derecelendirme sistemi TNM evrelemesi ile karşılaştırıldığında, tümörün agresifliğini daha fazla yansıtır [55].

3.12. Peritümöral stroma

Kolorektal karsinomlarda, özellikle yüksek riskli evre II hastalarda adjuvan kemoterapinin faydası net olarak aydınlatılamamıştır. Konvansiyonel prognostik faktörler, hastanın prognozunu tam olarak yansıtmadığı düşünülmektedir [58]. Son zamanlarda prognozu tayin etmek için tümör mikroçevresinin ve peritümoral stromanın incelendiği birçok araştırma bulunmaktadır [8, 58-62].

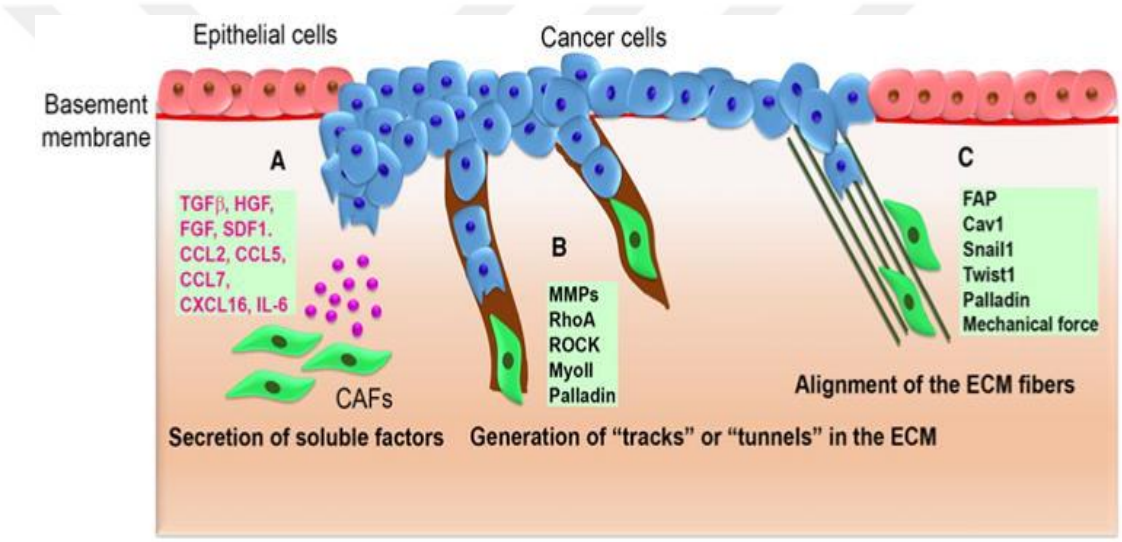
Tümör tarafından indüklenen fibrotik stroma yanıtı desmoplastik reaksiyon olarak adlandırılır. Kolorektal karsinomlarda da dahil olmak üzere birçok tümörde görülmektedir [8]. Kanser araştırmalarının amaçlarından biri, anormal ekstrasellüler matriksin etkin bir tedavi hedefi olup olmayacağını belirlemektir. Bu amacı araştırmak için ekstrasellüler matriksin normal kompozisyonunu ve organizasyonunu nasıl koruduğunu; bu organizasyonun kanserde nasıl bozulduğunu anlamak gerekmektedir [63].



Şekil 9: Tümördeki ve normal dokudaki ekstrasellüler matriks modeli [64]

Normal dokuların yapısal organizasyonu ve işlevi, hücreler ve ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşimler tarafından belirlenir. Dokular, bazal membran ve interstisyel bağ dokudan oluşan ekstrasellüler matriks ile birbirinden ayrılırlar. Metastaz için, epitelyal adezyonunu kaybetmiş hücrelerin alttaki bazal membranın bütünlüğünü bozarak interstisyel bağ dokuya geçmesi gereklidir [3].

Epitelyal adezyonun kaybı, ekstrasellüler matriks yapısının değişimi, yeni matriks bileşenlerine bağlanma ve tümör hücrelerinin migrasyonu olmak üzere invazyon ve metastaz temel olarak dört aşamada gerçekleşir. Epitelyal adezyonun kaybı E-cadherin'in inaktivesi ile gerçekleşmektedir. Tümör hücreleri ve stromal hücreler tarafından salgılanan proteolitik enzimler ile bazal membran ve interstisyel matrikste bozulma gerçekleşir. Proteolitik enzimler, ekstrasellüler matrikste bulunan büyüme faktörlerini serbest bırakır. SNAIL ve TWIST gibi transkripsiyon faktörleri, epitelyal mezenkimal transizyon ile ilişkilidir. Bu transkripsiyon faktörleri; epitelyal belirteçlerin azalması ve mezenkimal belirteçlerin ekspresyonu ile metastaz için gerekli EMT yi destekler (Şekil 8) [4, 65].



Şekil 10: Tümör mikroçevresinde, kanser hücreleri ile kanser ilişkili fibroblastlar arasındaki etkileşim [65]

Tümör ve tümörü çevreleyen stroma arasındaki parakrin bir iletişim mevcuttur. Bu iletişim, kanser progresyonunu belirlemektedir. Fibroblastlar, stroma içindeki ana hücre komponentini oluşturur ve tümör stromasında yer alan hücreler, kanserle ilişkili fibroblastlar *(cancer-associated fibroblasts-CAFs)* olarak adlandırılır [66]. Aktive fibroblastların, kanser mikroçevresini değiştirmek, epitelyal mezenkimal transisyonunu kolaylaştırmak, kanser kök hücre fenotipini modüle etmek gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla tümör progresyonunu arttıracak etkilere sahip olduğu gösterilmiştir [8].

Desmoplastik reaksiyon, tümör stromasında izlenen değişikliklerin genel adı olarak kullanılmaktadır. Bu değişiklikler farklı kompozisyonlar içerebilir. Bu stroma; fibroblastlar, vasküler yapılar ve hematopoetik hücrelerin oluşturduğu hücresel komponentten zengin ve az miktarda ekstrasellüler matriks içerebileceği gibi; kollajenden zengin yoğun ECM komponentine de sahip olabilir [67].

Tümör stromasının histolojik olarak kategorizasyonu, ilk olarak Ueno H ve arkadaşları tarafından yapılmış ve rektum kanseri hastalarında postoperatif sağkalımı başarılı bir şekilde temsil ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, fibrotik stromal yanıt üçe ayrılmıştır. Stroma, tümörün invaziv marjininde değerlendirilmiştir. İnce ve olgun kollajen liflerinin oluşturduğu çok katmanlı, kompakt ve matür stroma, Tip A kategorisi olarak tanımlanmıştır. Parlak eozinofilik hyalinize geniş kollajen bantlarını ('keloid benzeri' kollajen) içeren stroma Tip B ve miksoid stroma içeren Tip C olarak sınıflandırılmıştır [65]. Daha sonra yapılan araştırmalarda bu kategorizasyon sırasıyla; matür, intermediate ve immatür olarak tarif edilmiştir [8, 58, 60, 61].

Tip B stroma barındıran tümörlerin Tip A ya göre daha agresif kanser özellikleri ile karakterize olduğu düşünülmüştür. Bu sonuçların mekanizması net olarak açıklanamasa da 'keloid benzeri' kollajenin metabolik modülatör olarak işlev görmek üzere anormal şekilde aktive olduğu öne sürülmektedir. Miksoid değişiklikler; kollajen fibrillerinin ve proteoglikanların çözünebilir öncüleri olan glikoproteinlerin zeminde aşırı birikmesi sonucu meydana gelmektedir. Miksoid stroma içeren Tip C grubu, kötü prognostik sonuçlar ile ilişkili bulunmuştur. Bu sonucun, kanser gelişimi ve progresyonu için gerekli olduğu düşünülen, tenascin ve fibronektin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin birikmesi ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir [68].

Kötü prognoza sahip desmoplastik reaksiyon içeren tümörlerdeki kanser ilişkili fibroblastlar (*cancer-associated fibroblasts-CAFs)*, tümör gelişimi için uygun mikroçevre oluşturabilirler. Agresif tümörlerde izlenen, keloid benzeri kolajen içeren stroma ve miksoid stroma; tümör stromasında bulunan CAFs ın bir göstergesi olarak düşünülmektedir. İmmatür stroma içeren tümörlerde, epitelyal mezenkimal transisyon ile ilişkili olduğu düşünülen yüksek derecede tomurcuklanma tespit edilmiştir. Miksoid stroma içinde bulunan CAFs ın EMT indükleyen molekülleri aktive etmesi, muhtemel patogenez olarak değerlendirilmiştir. İmmatür stromaya sahip tümörlerde daha az anjiyogenez saptanmış ve bunun immün sistem için bir bariyer fonksiyonu olabileceği öngörülmüştür [58].

Tümör çevresi stroma, tümör progresyonuna katkısına ek olarak tedavi etkinliğinde de oldukça önemli bir yere sahiptir. Kanserli bir hastanın tedaviye yanıt verme derecesi, büyük ölçüde stromanın ne kadar aktive olduğuna bağlıdır. Tümör stroması birçok mekanizma ile tedavi direncini oluşturur. İlacın hedef dokuya erişimini engelleme, sitotoksik tedaviye, radyoterapiye, hedefe yönelik tedaviye, hormon antagonistlerine ve immünoterapiye direnç geliştirme, bu mekanizmaların başında gelir [64].

Tümör stroması, terapötik ajanların hedef dokuya erişimini; fibrozis, yüksek interstisyel basınç ve ilaçların stromal enzimler tarafından bozunması yoluyla üç şekilde sınırlayabilir. Sitotoksik terapiler, çoğunlukla yüksek proliferatif evredeki hücreleri hedef alır. Tümör stromasında, tedavi görmemiş stromal hücreler veya tedaviden etkilenmeyen nonproliferatif stromal hücreler kanser hücresinin hayatta kalmasını ve çoğalmasını destekleyebilir. Bu intrinsik direnç, stromal yanıtın ölümcül olmayan yanıta dönüşmesini destekler. Ayrıca tedaviye sekonder gelişen DNA hasarları sonucu stromal hücrelerde strese karşı oluşan yanıt, kanser progresyonunda kritik öneme sahip basamakların oluşmasına katkı sağlayan birçok faktörün salınımına sebep olur. Hedefe yönelik tedavilerde, kanser heterojenitesi ile bir proteini veya yolu inhibisyonu sonucu alternatif yolakların aktive olması, bu tedavi modalitesine gelişen direncin iki temel sebebidir. Stroma, bu adaptasyonda kanser hücrelerine yardımcı olur. Tüm bu mekanizmalardan ötürü, anti-kanser tedaviye ek olarak anti-stromal tedaviler de günümüzde oldukça önem kazanmaktadır [64].

Desmoplastik reaksiyonun kategorizasyonu, stromanın progresyon sürecinde tümörlerin biyolojik davranışlarını belirlemede kritik bir öneme sahip olduğunu göstermiş olup stromanın pasif bir bileşen olmadığını saptamıştır. Ayrıca, tümör stromasının tedavi hedefi için alternatif olabilme potansiyeli mevcuttur [64]. Bu nedenle peritümöral stroma değerlendirmesinin giderek önem kazanacağı düşünülmektedir [8].

3.13. Tümöre karşı gelişen immün yanıt

Tümör-konak etkileşimleri, birçok neoplazide önemli bir role sahiptir [69]. Kolorektal kanserlere karşı gelişen çok farklı tiplerde inflamatuar ve immün cevap gözlenmektedir. Bunlardan biri, nötrofilik inflamasyondur. Bu reaksiyonun barsaktaki bakteri kolonizasyonunda bozulma ile ilişkili olduğu ve IL-23'e sekonder geliştiği düşünülmektedir. IL-23, tümör ilişkili myeloid hücrelerden salgılanmakta olup tümör büyümesinde promotor rolü bulunur. Lenfoid immün reaksiyon, tümör infiltre lenfositleri, peritümöral lenfositleri, germinal merkez içeren veya içermeyen peritümöral lenfoid agregatları ve reaktif bölgesel lenf nodlarını kapsamaktadır. Genellikle herhangi bir tipte yoğun inflamatuar yanıt, daha iyi prognoz ile ilişkilidir [5].

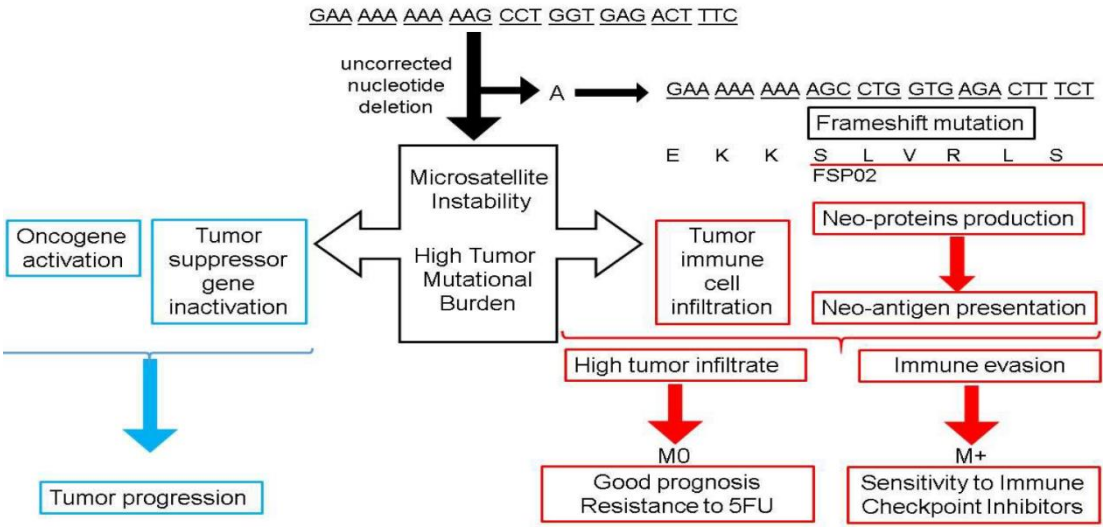
Genetik mutasyonlar, kanser hücrelerinde farklılaşmış protein ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Bu proteinler, immün cevabı tetikleyen "yabancı" bir ürün olarak işlev görür ve bir neoantijen gibi algılanır. Ayrıca, inflamatuar, hipoksik ve sıklıkla izlenen tümörün nekrotik mikroçevresi, konakçı immün sistemini uyaran tehlike sinyalleri gönderir [70].

Ortamı infiltre eden immün sisteme ait hücreler, tümörün büyümesini ve progresyonunu kontrol etmekte olup aynı zamanda tümörün gelişmesi için immünsupresif bir ortam yaratmaya yardımcı olur. CD8+ sitotoksik T lenfositler, interferon-gama üreten T-helper 1 (Th1) hücreleri, natural killer hücreler ile birlikte M1 fenotipine sahip makrofajlar ve DC1 fenotipi gösteren dendritik hücreler antitümöral immün cevap ile ilişkilidir. İmmünsüpresif etkilerden; Th2 hücreleri, M2 makrofajları, DC2 dendritik hücreler, miyeloid kökenli süpresif ve interlökin-10 ve TGF-Beta *(Transforming Growth Factor-Beta)* üreten FOXP3+ regulatuar T (Treg) hücreleri sorumludur. B lenfositler ve plazma hücreleri ise pozitif veya negatif antitümör etkiler oluşturabilir. İmmün infiltrasyonu oluşturan hücre komponenti, tümörün içinde ve arasında değişik miktarda bulunabilir ve antitümör etkinliği gösterdiği bilinmektedir [70].

Tümörü infiltre eden lenfositler, tümör antijenlerini tanır, tümör lizisini indükler veya spesifik kemotaktik ve proinflamatuar sitokinleri salgılayarak immün cevabı oluşturur. Elektron mikroskobu kullanılarak, bu lenfositler ile doğrudan temas halinde olan neoplastik hücrelerin membranlarının ve sitoplazmalarının destrükte olduğu gözlenmiştir. Bazı durumlar ise tümör hücresine penetrasyonu ve sonrasında hücre çekirdeğinin destrüksiyon ile sonuçlandığı tespit edilmiştir [71].

Graham ve Appelman tarafından, peritümöral lenfoid reaksiyonu değerlendirmek için Crohn benzeri lenfoid reaksiyon olarak isimlendirilen kriterler tanımlanmıştır. Derecelendirme 3 kategoriye ayrılmıştır. Bazıları germinal merkez içeren, belirgin lenfoid agregatlar ile birlikte belirgin peritümöral lenfosit bandı olan olgulara 3; az sayıda agregat ve dağınık lenfositlerin varlığı ile tanımlanan olgulara 2; hiç izlenmeyen olgulara 1 olacak şekilde kategorize edilmiştir [72]. Bu şekilde tanımlanan Crohn benzeri lenfoid reaksiyonun, birkaç çalışmada bağımsız prognostik öneme sahip olduğu bulunmuştur [5]. Crohn benzeri lenfoid reaksiyonun sınıflandırılması ile ilgili literatürde çok farklı limit değerleri bulunmaktadır [72-74].

Tümör infiltre lenfositler ile MMR kaybı gösteren tümörler arasındaki ilişkinin araştırıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur. MMR kaybı gösteren tümörlerde sıklıkla izlenen immün yanıtın mekanizmasında birçok faktör olduğu düşünülmektedir. dMMR/MSİ durumunda meydana gelen *frameshift* mutasyonları sonucunda sadece non fonksiyone proteinler değil neo-antijen yapıdaki proteinlerde oluşmaktadır[75]. Yapılan bir araştırmada dMMR tümörlerde pMMR tümörlere göre 300 kat daha fazla frameshift mutasyonu olduğu tespit edilmiştir. Bu mutasyon sonrasında oluşan neo-antijenlerin geniş spektrumdaki *major histocompatibility complex classI*(MHC-I) bağlanarak immün cevabın artırılmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir [75]. Regülatuar CD3+ CD4+ T lenfositler, Foxp3'ü eksprese eder ve TİL'lerin küçük bir kısmını oluşturur. Ayrıca, TGF-β ekspresyonu yüksek olan KRK'de, Foxp3 negatif TİL'ler daha iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir. dMMR/MSİ kanserlerde ise Foxp3 negatif TİL, daha az invaziv karakter ile ilişkili bulunmuştur. Bu lenfositlerin büyük kısmının CD3+ CD8+ sitotoksik T lenfositler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu lenfositlerin, MSİ nedeniyle oluşan *frameshift* mutasyonları sonucunda üretilen peptitleri spesifik olarak tanıdığı gösterilmiştir [76-78]. Başka bir çalışmada dMMR/MSİ olan tümörlerden alınan taze dokulardaki TİL'in MSS kanserleri öldürmede başarısız olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada kanseri bulunmayan Lynch Sendromlu hastalardan toplanan dolaşımdaki T lenfositlerin *frameshift* mutasyonları sonucunda üretilen peptitleri hedef alabildiği izlenmiştir [21, 79].



Şekil 11: dMMR/MSİ sonucunda gelişen tümör ilişkili mekanizmalar. (TGF-β geninde ortaya çıkan mutasyon sonucu DNA onarımı yapılamaması nedeniyle meydana gelen *frameshift* mutasyonu örneği ve sonuçları) [21]

Tümörü infiltre eden lenfositlerin değerlendirilmesinde birçok derecelendirme sistemi ve izlenen lenfositlerin sayısı ile ilgili farklı limitler bildirilmiştir [5]. Bir büyük büyütme alanında (x40) 5 intraepitelyal lenfosit ve fazlasının intraepitelyal lenfosit reaksiyonu olarak kabul edilerek yapılan bir araştırmada, MSI-H olgularının tanımlanması için %72'lik bir duyarlılığa ve %82'lik bir özgüllüğe sahip olduğu belirtilmiştir [73].

3.14. Moleküler özellikler

Kolorektal karsinomları moleküler patolojik sınıflandırmasına yönelik iki farklı yaklaşım mevcuttur. *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* ağı tarafından gerçekleştirilen entegre moleküler analizle desteklenen genomik (DNA tabanlı) sınıflandırma ve kolorektal karsinomları karakterize eden transkriptomik (RNA tabanlı) profilleme RNA sekanslama veya dizi tabanlı teknolojiler bu sınıflandırmanın temelini oluşturur [4].

Genomik sınıflandırma

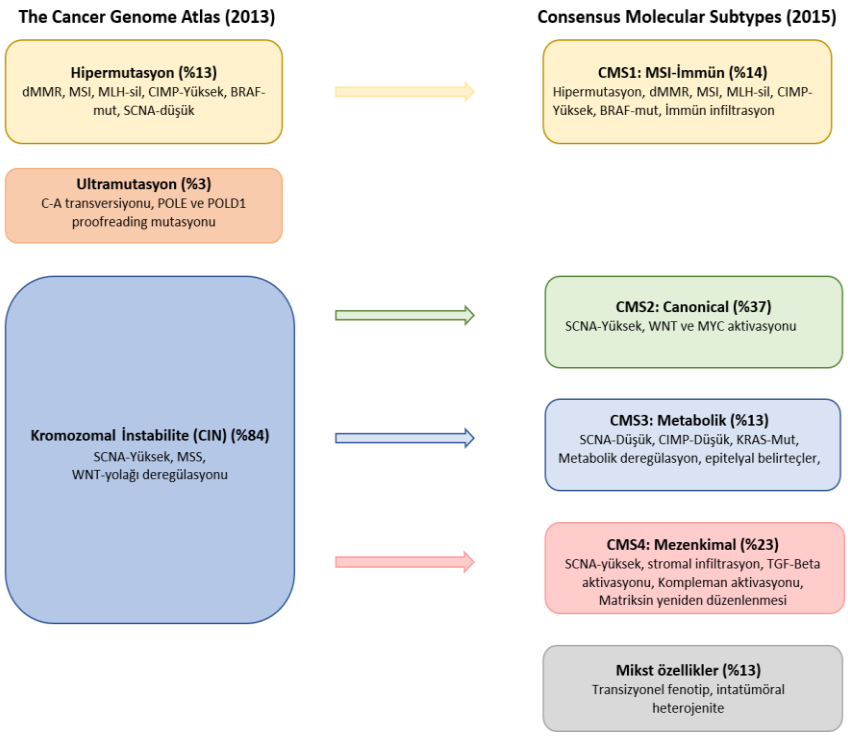
Bu yaklaşım kolorektal karsinomları içerdiği mutasyon oranına göre hipermutant ve non-hipermutant kanserler olarak iki ana gruba ayırmaktadır. Bu sınıflandırmanın, MSI ve kromozomal instabilite yollarıyla uyumlu ve önceki DNA tabanlı sınıflandırma sistemleriyle tutarlı olduğu bilinmektedir [4].

Hipermutant vakalarda (KRK'ın %15'i) yüksek mutasyon sıklığı izlenir. Bu olgularda *DNA mismatch repair* sistemindeki defekt nedeniyle sıklıkla mikrosatellit instabilite saptanır. DNA mismatch repair sistemindeki defekt, MLH1 promotor hipermetilasyonu sonucu MLH1 ekspresyon kaybı ile olabileceği gibi *DNA mismatch repair* sistemin inaktivasyonu sonucu da gerçekleşebilir. Bu tümörlerin neredeyse tamamı CpG adalarında metilasyon fenotipi barındırmaktadır. Bu durum, promotor hipermetilasyonu sonucu diğer birçok gende susturulmaya neden olur. Olguların az bir kısmında, *mismatch repair* genlerinde hem herediter hem de somatik mutasyon izlenmektedir. Bu grubun yaklaşık olarak %2-3'ü ultramutasyona uğramış kanserlerdir.

Ultramutant vakalarda karakteristik olarak nükleotid baz değişim spektrumu içeren son derece yüksek mutasyon oranları izlenir. Bu kanserler, hücrenin DNA replikasyon enzimi POLE (*DNA polymerase epsilon*) veya nadiren POLD1 (*DNA polymerase delta1*) in ekzonükleaz alanını etkileyen ve *proofreading* fonksiyonunu inaktive eden bir mutasyonun varlığından kaynaklanır. Bu mutasyon, DNA replikasyonu veya onarımı sırasında, nükleotitlerin yanlış birleştirilmesinin düzeltilmesi aşamasının başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olur [4].

Non-hipermutant vakalar (KRK'ın %85'i) düşük mutasyon sıklığına sahiptir ve mikrosatellit stabildir (MSS). Ancak genellikle kromozomal segment kazançlarının ve kayıplarının göstergesi olan yüksek DNA SCNA (somatic copy number alteration) frekansına sahiptirler. Non-hipermutant MSS KRK'de tekrarlayan mutasyona uğrayan genler arasında APC (%80), TP53 (%60) ve KRAS (%45) genleri yer alır [4].

Mutasyonlar sonucu sinyal yolaklarında en sık görülen değişiklikler; WNT, MAPK ve PI3K büyüme sinyal yolaklarında aktivasyon ve TGF-beta, p53 gibi inhibitör yolaklarının inaktivasyondur. WNT sinyal yolu, non-hipermutant kanserlerin %93'ünde ve hipermutant kanserlerin %97'sinde aktivedir [4].



Şekil 12: Cancer Genome atlas (2013) ve Consensus Molecular Subtypes karşılaştırması [4]

Transkriptomik profilleme

Kolorektal Kanser Alt Tiplendirme Konsorsiyumu *(The Colorectal Cancer Subtyping Consortium- CRCSC)*, çalışmalardan elde edilen RNA ekspresyon profili verilerini derleyerek dört ana moleküler alt tip *(consensus molecular subtype-CMS)* grubunu tanımlamıştır [4].

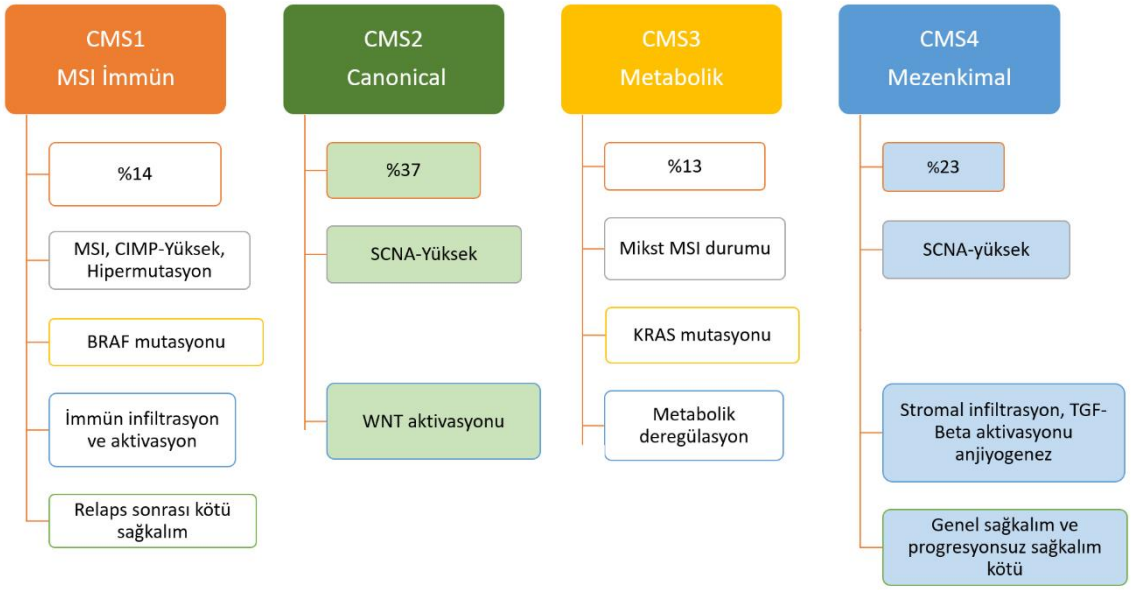
CMS1, hipermutasyon grubunda yer almakta olup düşük SCNA *(somatic copy number alterations)* içermektedir. **CMS1,** MSI olan tümörlerin büyük bir kısmını kapsar. TCGA'daki metilasyon profillerinin analizi ile CMS2–CMS4 grubunun, SCNA sayılarıyla ölçüldüğü üzere daha yüksek kromozomal instabilite (CIN) sergilediği tespit edilmiştir. **CMS2** subgrubunda diğer alt tiplere göre, onkogenlerdeki artışın ve tümör supresör genlerdeki kayıpların daha sık olduğu izlenmiştir. Özellikle, **CMS3** grubunun, diğer CIN tümörlerine kıyasla ayırt edici bir genomik ve epigenomik profile sahip olduğu dikkati çekmiştir. Tümör saflığı ile açıklanamayacak düzeyde belirgin olarak düşük sayıda SCNA saptanması bu özelliklerden biridir. CMS3 örneklerinin yaklaşık %30'unda hipermutasyon tespit edilmiş olup MSI durumuyla örtüştüğü gözlenmektedir. Ayrıca bu grupta CpG adası metilasyon fenotipi -düşük *(CIMP-low)* olan grubun yüksek prevelansta görüldüğü izlenmiş olup orta seviyede gen hipermetilasyonu saptanmıştır [80].

CMS grupları içerisinde saptanan mutasyonların yoğunluğu incelendiğinde CMS1 grubunda MSI durumu ile uyumlu olarak BRAF mutasyonunun; CMS3 grubunda ise KRAS mutasyonun belirgin olduğu izlenmektedir. CMS gruplarının biyolojik davranış modelleri de araştırılmıştır. CMS1 subgrubunun, temel olarak MSI kolorektal karsinomlarda izlenen immün sistemden kaçınma fenotipine sahip olduğu saptanmıştır. Bu grubun, TH1 ve sitotoksik T lenfositlerden oluşan infiltrasyon ile ilişkili genlerin ekspresyonlarında artış izlenmiştir [80].

CMS2 grubunda, klasik kolorektal tümörlerin karsinogenezinde rol oynayan WNT ve MYC yolaklarında belirgin upregülasyon saptanmış ve epitelyal diferansiyasyon varlığı tespit edilmiştir [80].

CMS3 grubunda, multipl metabolik süreçler ile ilgili işaretlerin belirgin olarak arttığı gözlenmiştir. Bu bulgunun, metabolik adaptasyonu indüklediği bilinen KRAS genini aktive eden mutasyonlar ile paralel olduğu düşünülmüştür. CMS4 tümörlerde, epitelyal-mezenkimal transisyon (EMT) ile ilişkili genlerde belirgin upregülasyon saptanmıştır. Bu grup tümörlerde, TGF-Beta *(Transforming Growth Factor-Beta)* sinyallerinin aktivasyonuna bağlı olarak anjiyogenezde, matriksin yeniden şekillenmesinde ve komplementer aracılı inflamatuar sistemin aktivasyonunda artış izlenmiştir. Ayrıca CMS4 grubunun; stromal infiltrasyon, ekstrasellüler matriks proteinlerinin aşırı ekspresyonu ve kanserli olmayan hücrelerle birlikteliğinin daha yüksek oluşu ile uyumlu bir gen ekspresyon profili sergilediği izlemiştir [80].

Özet olarak, hemen hemen tüm hipermutant MSI kanserleri CMS1 olarak sınıflandırılmıştır (MSI-immün, %14). MSS kanser grubunu oluşturanlar CMS2 (*canonical*, %37), CMS3 (metabolik, %13) ve CMS4 (mezenkimal, %23) olarak 3 gruba ayrılmıştır. Geriye kalan sınıflandırılmamış grup (karma özellikler, %13), bir geçiş fenotipini ya da tümör içi heterojeniteyi temsil eder [80].



Şekil 13: Moleküler alt tip gruplarının temel özellikleri (consensus molecular subtype-CMS) [80]

3.15. Prediktif biyomarkerlar

RAS mutasyonu

RAS kodlu proteinler, hücre sinyal iletiminde yer alan küçük GTPaz ile ilgili proteinlerin bir ailesidir. RAS onkogenlerindeki mutasyonlar, insan kanserlerinde en yaygın görülen mutasyonlardandır. Üç adet RAS geni mevcuttur. KRAS ve NRAS genlerinin tedavi açısından önemi bulunmaktadır. Uluslararası kılavuzlar KRAS ve NRAS genlerindeki 12, 13, 59, 61,117 ve 146 kodonlarının analizini önermektedir. Bu kodonlar genellikle EGFR'nin (HER1) ekstrasellüler parçasını hedef alan monoklonal antikorlara karşı gelişen direnç ile ilişkili kodonlardır. Kolorektal karsinomların neredeyse %50'si RAS mutasyonu nedeni ile anti-EGFR tedavisinden fayda görememektedir [4].

BRAF mutasyonu

BRAF, RAF treonin kinaz ailesinden bir onkogendir. BRAF; melanom, Hairy Cell lösemi, akciğer adenokarsinomu ve tiroid kanseri gibi birçok tümörün tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır [4].

BRAFV600E mutasyonu, metastatik kolorektal karsinomlarının yaklaşık %8'inde, mikrosatellit instabilite gösteren vakalarının %30-40'ında ve MLH1'in promotor hipermetilasyonu olan sporadik mikrosatellit instabilite vakalarının %60'ında mevcuttur [21]. BRAF mutasyonları, mismatch repair proteinlerinin ekspresyonda kayıp tespit edilen olgularda Lynch sendromunun dışlanması için kullanılır. RAS ve BRAF mutasyonları genellikle birbirini dışlar niteliktedir. BRAF p.V600E mutasyonları olan hastalar anti-EGFR tedavisinden fayda görmediğini belirten çalışmalar bulunmakta olup onkologlar tedavi yönetiminde bu bilgiden yararlanabilmektedir [4].

Mikrosatellit instabilite

MSI, mismatch repair sistemindeki eksiklik sonucu ortaya çıkar ve mutasyonlara yatkınlığa neden olur. MSI, kolorektal karsinomlardaki korsinogenez mekanizmasının anahtar mekanizmalarından birini temsil etmektedir. Lynch sendromu taramasında ve tanısında kullanılır [4]. Mikrosatellit instabilite durumu tedavi modalitesi seçimi açısından kritik öneme sahiptir. MSI; BRAF mutasyonu saptanmayan vakalarda iyi prognoz ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [21] BRAF durumundan bağımsız olarak, MSI vakalarının florourasil bazlı kemoterapilerden fayda görmediği bildirilmiştir [81]. Ayrıca MSI varlığı immünoterapi seçeneği açısından da oldukça önemlidir. Konvansiyonel tedaviden fayda görmeyen MSI gösteren olgularının PDL1 inhibitörlerine iyi yanıt verdiği bildirilmiştir [4].

4. TEDAVİ

Kolorektal kanseri olan hastalar, genellikle tümörün evresine bağlı olarak primer tümörün cerrahi rezeksiyonu ile tedavi edilir. Cerrahi rezeksiyona kemoterapi rejimi eklenebilir. Tümörün lokal olarak rezeke edilemediği veya ameliyat için kontrendikasyon olmadığı tüm hastalarda cerrahi rezeksiyon yapılır. Non-obstrüktif hastalarda, segmental kolektomi ve bölgesel lenf nodu disseksiyonu uygulanmaktadır. Rektum kanserlerinde, muskularis propriyayı aşmış T3 tümörlerde rezeksiyondan önce sıklıkla neoadjuvan kemoradyoterapi tercih edilmektedir [5].

Primer tümörü rezeke edilmiş veya edilecek olan hastalarda, metastatik alanın tam rezeksiyonu mümkün olduğu durumlarda ve geride kalan organ fonksiyonu korunabildiği düşünüldüğünde; karaciğer ve akciğer metastazların metastazektomi prosedörü uygulanabilmektedir. Önceden non-rezektabl hastalığın rezektabl hastalığa dönüşüm açısından yeniden değerlendirme, kemoterapinin başlamasından sonra tipik olarak her 2 ayda bir yapılır [5].

Kolorektal kanserlerin kemoterapisinde temel ajanlar olarak 5-florourasil+lökovorin folinik asit [5-FU] veya oral kapesitabin kullanılmakta olup son 5 yıldır yeni sitotoksik ajanlar da gündeme gelmiştir. Bu sitotoksik ajanlar, adjuvan ve ileri hastalık durumlarında 5-FU ile kombinasyon halinde kullanılır (FOLFOX protokolü FOLinik asit + 5-Florourasil + OXaliplatin) [5].

Dirençli metastatik hastalığı olan hastalarda hedefe yönelik yeni ajanlar mevcuttur. Cetuximab ve panitumumab, anti-EGFR antikorları olup KRAS mutasyonlarını içermeyen ileri evre kolorektal karsinomların tedavisinde oldukça etkilidir [5].

Bevacizumab, tümörlerde antianjiyojenik etki ile sonuçlanan vascular *endothelial growth factor (VEGF)* antikorudur. Hedefe yönelik terapötik ajanların kanıtlanmış yararları metastatik hastalığı olan hastalarda sınırlıdır. Genellikle bu ajanlar, tek başına veya diğer kemoterapötik ajanlar ile kombine edilerek kullanılır [5].

Kolon kanserlerinde ve rektal kanserlerde tedavi yönetiminde farklılıklar mevcuttur. Kolon kanserlerinde, evre I hastalarda tek başına cerrahi rezeksiyon yeterli görülüp genellikle adjuvan kemoterapi önerilmez. Az diferansiye tümörlerde ve lenfatik/venöz invazyon (özellikle EMVI) saptanan olgularda bölgesel lenf nodu metastaz riskinin yüksek olduğu düşünülerek segmental rezeksiyon tercih edilmektedir. Az diferansiye tümörlerde, lenfatik/vasküler ve perinöral invazyon varlığında, tümör obstrüksiyonunda, 12'den az lenf nodu incelendiğinde, lokal tümör perforasyon varlığında, yakın veya pozitif cerrahi sınır durumunda veya herhangi T4 varlığında adjuvan tedavi tercih edilir. Bunun yanısıra, düşük riskli evre II hastalara kemoterapi önerilmemektedir. Ancak özellikle MMR kaybı olmayan hastalarda kemoterapi rejimi düşünülebilir. Evre III hastalarda yaygın olarak adjuvan kemoterapi kullanılmaktadır [5].

İlerlemiş hastalık evresinde (evre IV, Dukes evre D, uzak metastazlar), kemoterapinin yararı kanıtlanmıştır. Bu hastaların tedavi modalitelerinde standart kemoterapi ajanları yanı sıra hedefe yönelik ajanların kombinasyonu kullanılmaktadır [5]. Rektal kanserler de ise, evre II/III hastalarda kemoradyasyon, total mezorektal eksizyon ve postoperatif kemoterapi kombinasyonu ile yönetilmektedir [5].

5. İMMÜNHİSTOKİMYA

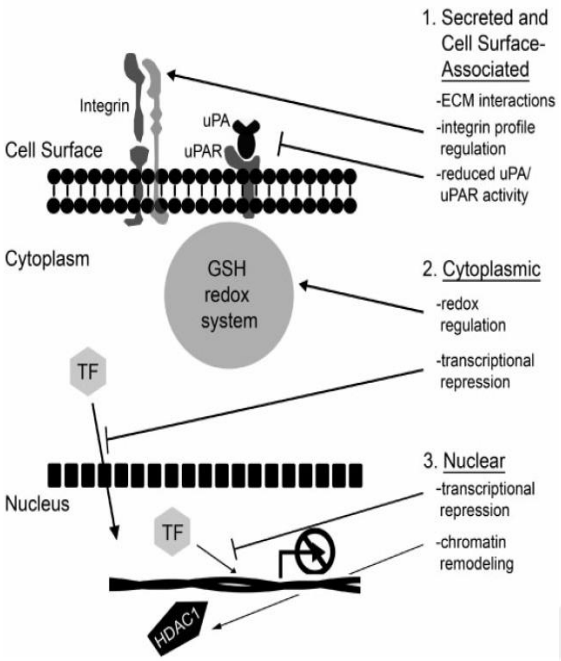
Maspin *(mammary serine protease inhibitor-MASPIN)*

Maspin, ilk olarak 1994 yılında tanımlanmış bir serin proteaz *(mammary serine protease inhibitor-MASPIN)* inhibitörüdür. Bu serin proteaz inhibitörü, *human* serpin B ailesi üye 5 (SERPINB5) geni tarafından kodlanan bir tümör supresör olarak bildirilmiştir [82]. Serin proteaz inhibitörleri, proteazların katalitik aktivitesini inhibe ederek proteinlerin parçalanmasını düzenlemektir [83]. Maspin, bazı yapısal özelliklerindeki alterasyonlar sebebiyle serpin B üyelerinden farklı özelliklere sahiptir [84]. Bu özellik Maspin'i, serpin süper ailesinin inhibitör olmayan kategorisine yerleştirir ve Maspin'in biyolojik işlevlerini açıklamak için proteaz aktivitesini hedef göstermekten uzaklaştırır [85].

Maspin geni, 18q21.3-q23 kromozomundaki bir serpin lokus kümesinin parçasıdır. Bu bölgenin promotor alanında Ets, Ap1, HRE ve p53 gibi birkaç önemli transkripsiyon faktörü bağlama bölgesi mevcuttur [86, 87].

Kanser hücrelerinde Maspin'in nükleer lokalizasyonunun, tümör supresör aktivitesi için gerekli olduğunu ve metastazı önlemek için nükleusta lokalize Maspin'in kromatine bağlanması gerektiğini göstermektedir. Maspin'in nükleustaki gen veya kromatin regülasyonu sonucu hücre-matriks etkileşimini veya diferansiyasyon durumunu indirekt olarak etkilediği ve bu durumun yalnızca hücre hasarı veya nekrozu sonucunda gerçekleşebileceği diğer bir olası mekanizma olarak düşünülmüştür. Ayrıca, Maspin'in dokuya spesifik bir şekilde epigenetik olarak düzenlendiği de tespit edilmiştir [85].

Maspin’in tümör supresör özelliği bilinmesi nedeniyle supresör mekanizması ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin, tümör hücrelerinde maspin aşırı ekspresyonunun, sitokrom artışı ile veya bir pro-apoptotik protein olan Bax'ın up-regülasyonu yoluyla apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca, maspin proteini doğrudan histon deasetilaz C1'e (HDAC1) bağlanabilir ve birkaç genin transkripsiyonunu suprese etmek için histon deasetilasyonunu düzenleyen aktivitesini inhibe edebilir [88]. Maspin’in, invazyonu engellediğini, apoptozu indüklediğini, anjiyogenezi inhibe ettiğini ve bu nedenle tümör supresör görevi olduğunu destekler nitelikte çalışmalar mevcuttur [89]. İnsan Protein Atlas veritabanına göre, normal kolon mukozası da dahil olmak üzere neredeyse tüm insan dokuları bir miktar maspin eksprese eder [90]. Hücre tipine bağlı olarak maspin farklı lokalizasyon paternleri göstermektedir. Meme epitel hücrelerinde, esas olarak sitoplazmada lokalize olur. Fakat myoepitelyal hücrelerde olduğu gibi nükleusta da bulunabilir. Hücre içerisinde sekretuar veziküllerde ve hücre yüzeyine de lokalize olabilir. Maspin’in lokalizasyonu neoplastik bir lezyonun göstergesi olabileceğinden yerleşim yeri ve işlevi önemli görünmektedir. Ovaryan karsinomda da Maspin’in sitoplazmik lokalizasyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Fakat, bu kanserlerde nükleer maspin lokalizasyonunun tümör supresör rolünü destekler nitelikte benign lezyonun bir göstergesi olduğu da öne sürülmektedir. Bu paradoksal yerleşim, küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında ve pankreas kanserlerinde de izlenmiştir. Bu tümörlerde de nükleer maspin lokalizasyonunun iyi davranış ile ilişkili olduğu bulunmuştur [91].



Şekil 14: Hücre içindeki veya dışındaki lokalizasyonuna dayalı olarak maspin için olası işlevleri gösteren bir model.

(Kısaltmalar: TF, transkripsiyon faktörü; uPA, ürokinaz plazminojen aktivatörü; uPAR, uPA reseptörü; HDAC1, histon deasetilaz-1; ECM, ekstrasellüler matriks; GSH, glutatyon.) [91]

Kolorektal kanserlerde maspin ekspresyonu ile ilgili çok farklı sonuçlar ve yaklaşımlar bulunmaktadır [92]. Maspin, uzun yıllardan bu yana tümör supresör fonksiyonuna sahip protein olduğu bilinirken son yıllarda tümörün histolojisi, maspinin lokalizasyonu veya hücredeki yerleşim yerine göre onkojenik aktivite de gösterebileceği düşünülmeye başlanmıştır [82].

Maspin aracılı tümör progresyonunun altında yatan moleküler mekanizmalar henüz net aydınlatılamamıştır. Meme kanser hücre dizileri ile yapılan bir araştırmada maspin pozitif hücrelerde MAPK yolağının pozitif regülasyonunu arttığı izlenmiştir. MAPK yolağı birçok tümör gelişiminde kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir. iDEG'ler olarak tanımlanan dört gen arasında, KISS1R'ye (GPR54 olarak da adlandırılır) bağlanan bir endojen ligandı kodlayan KISS1'in yakın zamanda meme kanser hücre dizilerinde TGFβ aracılı invazyona katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca maspin pozitif meme kanser hücrelerinde SRGN ekspresyon seviyesinin kontrol hücrelerindekinden daha yüksek olduğunu tespit edilmiştir [88]. SRGN (Serglycin), hücre dışı matriks elemanları, proteolitik enzimler, kemokinler, sitokinler ve hücre yüzeyi reseptörleri dahil olmak üzere çeşitli biyolojik moleküllerle etkileşime giren hematopoietik hücrelerden salgılanan düşük moleküler ağırlıklı bir proteoglikan olarak karakterize edilmiştir. SRGN'nin CD44/NF-κB/CLDN1 yolağı, HIF-1α/SRGN yolağı ve SRGN/TGFβ2 yolağı dahil olmak üzere çeşitli sinyal yolları aracılığıyla kanser hücrelerindeki agresif davranışa ve metastazını desteklediğini bildiren araştırmalar da mevcuttur [93]. Meme kanserlerin yapılan bu araştırmada maspin pozitif hücre dizinde Snail, Slug, Zeb1 ve Zeb2 gibi EMT ilişkili transkripsiyon faktörlerinin, SRGN, TGFβ2, fosforile edilmiş Smad3 te yüksek ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. Bunun sonucunda sitoplazmik maspin ekspresyonunun artan seviyesinin, SRGN/TGFβ2 iletim aksı boyunca EMT'yi kolaylaştırarak hücre invazyonunu desteklediği düşünülmüştür [88].

Kolorektal kanserlerde yapılan çalışmada SRGN nin artmış ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmektedir [94].

Lizil Oksidaz (LOX-*Lysyl oxidase)*

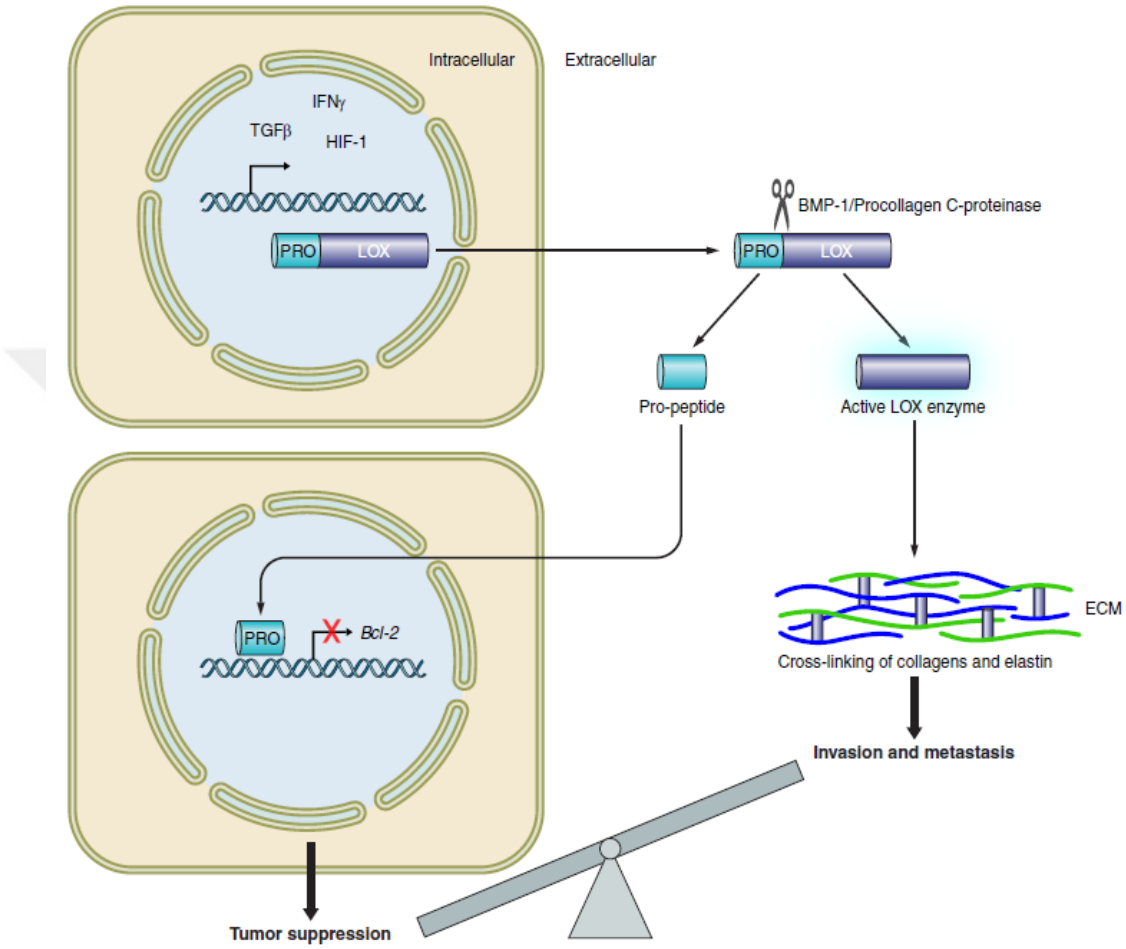
Lizil oksidazlar, oksidasyon yoluyla kollajen ve elastinin çapraz bağlanmasını katalize eden, böylece ekstrasellüler matriksin sağlamlığını ve yapısal stabilitesini koruyan bir ekstraselüler enzim grubudur. Keratinositler, fibroblastlar, adipositler, osteoblastlar, düz kas hücreleri ve endotel hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilen, salgılanan bakır bağımlı bir amin oksidazdır. En iyi bilinen fonksiyonu, kollajen ve elastinde çapraz bağlanmayı başlatmasıdır [95].

LOX ayrıca proliferasyonu, invazyonu, metastazı ve anjiyogenezi artırarak kanserde de rol oynamaktadır. Bununla birlikte, LOX'un ayrıca tümör supresör fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir. Tümör supresör fonksiyonunu, inaktif formu olan LOX-PP (lysl oxidase propeptid) ile gösterdiği bildirilmektedir (Şekil) [96].

LOX, birçok farklı tümörde eksprese olabilir. Oral skuamöz hücreli karsinomda ve kolorektal karsinomda, LOX'un ekspresyonundaki artış hücresel proliferasyonda ve tümör anjiogenezinde rol oynamaktadır. Ayrıca LOX ekspresyonunda artma, epitelyal mezenkimal transizyonda önemli rolü bulunan E-cadherin azaltıp, Vimentin'i arttırarak metastatik yayılıma katkıda bulunduğu bildirilmektedir [95].

LOX, kollajenin çapraz bağlanmasını sağlayarak ekstrasellüler matriksin sıkılığına yol açar. Bu durum, integrin sinyal yolaklarında değişikliklere sebep olur. Bu değişiklikler, adezyonu ve metastazı yöneten tümör hücresi ile ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşime katkıda bulunur [97].

LOX ekspresyonunun düzenlenmesinde sitokinler ve büyüme faktörlerinin de yer aldığı bulunmuştur. TGF-β, Smad3, PI-3 kinaz (PI3K) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) aktivasyon yoluyla LOX mRNA ekspresyonunu destekler (Şekil 16, Şekil 17) [95].

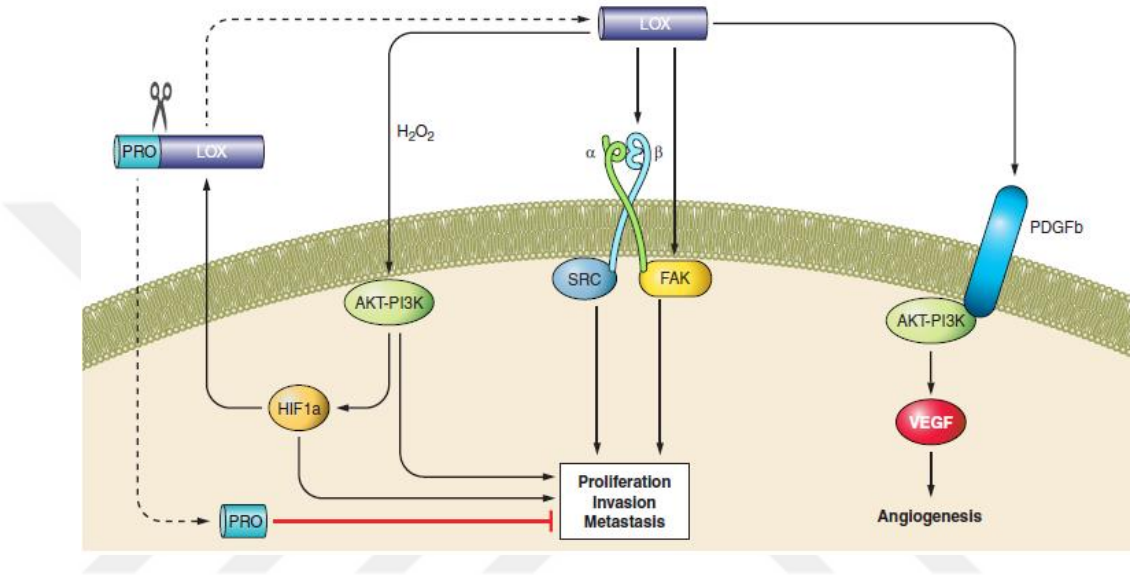


Şekil 15: LOX un tümör supresör ve prometastatik etkisinin oluşturduğu denge. (ECM, ekstraselüler matriks. BMP-1, kemik morfojenik protein-1; PRO, propeptid.) [7]

Hücre-matriks adezyonunda görev alan FAK (fokal adezyon kinaz) ve Src molekülleri, tümör migrasyonunda kritik bir öneme sahiptir. Bu proteinlerden herhangi birinin inaktivasyonu, tümör hücresinde mobilite kaybına yol açabilir [98].

Az diferansiye meme kanser hücre dizilerinde, matür LOX'un eksojen ekspresyonu sonucunda Src ve FAK aktivasyonunu kolaylaştığı tespit edilmiştir. Src aktivasyonunda LOX ilişkili hidrojen peroksitin yer aldığı düşünülmüştür. LOX inhibitörü olarak bilinen beta aminopropionitrile (bAPN) kullanıldığında fosforile Src düzeylerinin belirgin olarak azaldığı izlenmiştir (Şekil 13) [99].

Kolon kanserlerinde yapılan araştırmada ise CAF ların FAK fosforilasyonunu ve EMT gelişimini desteklediği, FAK sinyal yolunu aktive ettiği ve uzak metastaz gelişimine ortam sağladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada bir bakır şelatörü olarak kullanılan tetrathiomolybdate FAK aktivasyonunu ve EMT'yi inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu sonuç, bakır bağımlı lizil oksidazın bu yolakta aktif rol aldığını destekler niteliktedir [100].



Şekil 16: LOX'un direkt ve dolaylı olarak sinyal yolaklarını etkilemesi. (FAK, fokal adezyon kinazı; AKT-PI3K, protein kinaz B-fosfatidilinositol-3-kinaz; HIF1a, hipoksi ile indüklenebilir faktör-1.)[7].

Özet olarak, LOX'un tümör supresör özelliklerini propeptid formuyla ve nükleer lokalizasyonun aracılığıyla gösterdiği düşünülmektedir. Matür formunun metastatik etkiye sahip olduğu ve LOX-PP'nin bu durumu dengede tuttuğu varsayılmaktadır. Kanser progresyonunda bu dengenin bozulması metastazı tetikliyor olabilir. Ayrıca LOX, kolorektal kanserde, Src-FAK ve AKT-PI3K gibi sinyal yolaklarını etkileyerek; hücre proliferasyonu, invazyon ve metastaz gibi birçok tümör progresyon basamağında görev alır (Şekil 12 ve Şekil 13) [7].

MATERYAL METOD

1.Olguların seçilmesi

Araştırmamız için, T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Şehir Hastanesi 1 Nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 11/11/2020 tarih ve E1-20-1287 sayılı kurul onayı alınmıştır. Bu araştırma; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi Tarafından 2164 nolu proje ile desteklenmiştir. Çalışmamıza, Ankara Şehir Hastanesi'nde Şubat 2019 tarihinden itibaren Eylül 2021 tarihine kadar laboratuvarımıza gönderilmiş 839 kolorektal rezeksiyon materyalinde kolorektal adenokarsinom tanısı almış, tanı anında immünohistokimyasal olarak mismatch repair protein ekspresyonu değerlendirilmiş ve moleküler patoloji laboratuvarınca KRAS, NRAS, BRAF somatik mutasyon analizi yapılmış 101 olgu dahil edilmiş ve retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Patoloji arşivinde lamlarına ve bloklarına ulaşılamayan hastalar çalışmaya alınmamıştır.

Hastalara ait yaş, cinsiyet, operasyon tarihi, tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, histolojik derece, tümör invazyon derinliği, lenf nodu sayısı ve tutulumu, tanı anındaki evre, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, immünohistokimyasal MMR profili, KRAS, NRAS, BRAF mutasyon profili, progresyon tarihi, ölüm tarihi, tanı anında ve takibindeki CEA ve CA 19.9 değerlerine patoloji raporları ve hastane veritabanından ulaşılmıştır. Olgularda patolojik evre, güncel AJCC,2018 sistemine göre belirlenmiştir.

Genel sağkalım, ilk tanı tarihi ile ölüme ve son kontrol tarihine kadar geçen süre olarak hesaplanmıştır. Evre I-III olan hastalarda tanı tarihinden nüks/metastaz tarihine kadar geçen süre hastalıksız sağkalım; evre IV hastalarda tanı tarihinden ilk progresyonun tespit edildiği tarihe ya da son kontrol tarihine kadar geçen süre "progresyonsuz sağkalım" olarak hesaplanmıştır.

Olgulara ait, %10 nötral tamponlu formalin solüsyonu ile fikse edilerek parafin bloklara gömülü dokulardan 4 μm kalınlığında hazırlanmış hematoksilen ve eosin (H&E) boyalı tümör içeren tüm preparatlar yeniden değerlendirilmiştir. Histolojik alt tip, tümörün infiltrasyon paterni, tümör tomurcuklanması, az diferansiye kümeler, desmoplastik reaksiyon paterni, tümörü infiltre eden lenfosit ve Crohn benzeri reaksiyon varlığı açısından lamlar yeniden değerlendirilmiştir. Değerlendirilen alanlarda her tümör için tümörü ve tümörün infiltratif sınırını en iyi temsil eden 3er mm çapında ikişe ralan tespit edilmiştir. Bu alanlar Quick-Ray® Manual Tissue Microarrayer cihazı ile bloktan çıkarılarak yeni bir doku mikro dizilimi (tissue microarray-TMA) bloğu oluşturulmuştur. Her bir TMA bloğuna her tümörden iki örnek olacak şekilde sırasıyla 14 kor/ 7 vaka yerleştirilmiştir. 101 olguya ait 15 TMA bloğu oluşturulmuştur.

2. İnfiltrasyon paterni

Muskularis propriayı disseke ederek ilerleyen, invazyon sınırında irregüler patern oluşturan tümörler infiltratif olarak gruplandırılmıştır İnvazyon kenarında tümör ile stroma arasında düzgün sınır izlenen tümörlerdeki infiltrasyon paterni ekspansil olarak kategorize edilmiştir.

3. Tümör tomurcuklanması

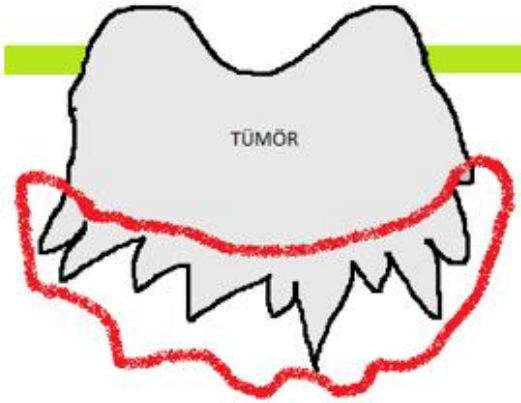
Tümör tomurcuklanması, Uluslararası Tümör Tomurcuklanması Konsensüs Konferansı tarafından önerilen kanıta dayalı, standart bir puanlama sistemine göre yapılmıştır [48].

4. Az diferansiye kümeler/ ADK

Az diferansiye kümeler en az 5 tümör hücresinden oluşan ve gland oluşturmayan hücre kümeleri olarak tanımlanmaktadır. ADK değerlendirilmesi Ueno ve arkadaşları tarafından 2012'de tanımlanan skorlama sistemine göre yapılmıştır [54]

5. Desmoplastik reaksiyon paterni:

Peritümöral stromanın değerlendirilmesi Ueno ve arkadaşları tarafından tanımlanan desmoplastik reaksiyon paternlerine göre yapılmıştır [58]. Tümörden alınan longitudinal kesitte, infiltrasyon sınırında izlenen stroma komponentine göre matür, intermediate ve immatür olarak 3 kategoride gruplandırılmıştır. Stroma içerisinde amfofilik, hafif bazofilik ekstrasellüler matriks komponenti izlendiğinde immatür stroma olarak sınıflandırılmıştır (Resim 11). Parlak eozinofilik, hyalinize, kalın hiposellüler kollajen demetleri, keloid benzeri kollajen içeren stroma intermediate olarak kategorize edilmiştir (Resim 12). İnce ve matür kollajen liflerin oluşturduğu çok katmanlı, kompakt stroma ise matür stroma olarak kabul edilmiştir (Resim 13). Değerlendirmede apse odakları çevresindeki stroma dikkate alınmamıştır. Sınıflandırmada birden çok stroma paterni izlendiği durumda en immatür komponent dikkate alınmıştır. Bu gibi durumda izlenen en immatür alanın x40 objektifteki alanı doldurması gerekmektedir. Stroma kategorizasyonunda kullanılan algoritma şekildeki gibidir (Şekil 18) [58].



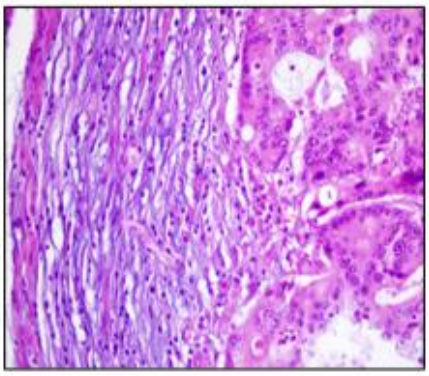
Reaktif fibröz alan

Miksoid stroma içeriyor mu?

Hayır

Evet

İmmatür



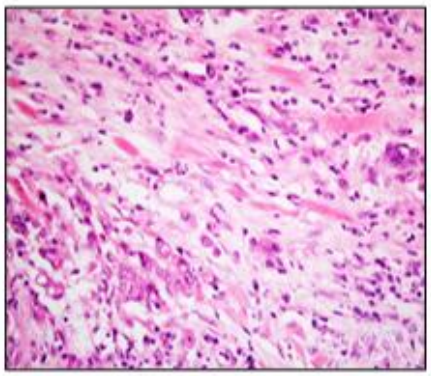
Resim 11: Miksoid stroma (x40, H&E)

Keloid benzeri kollajen içeriyor mu?

Hayır

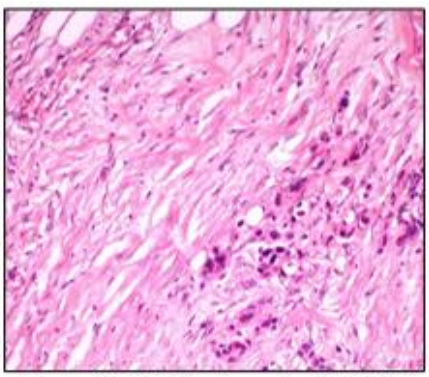
Evet

İntermediate



Resim 12: Keloid benzeri kollajen içeren stroma (x40, H&E)

Matür

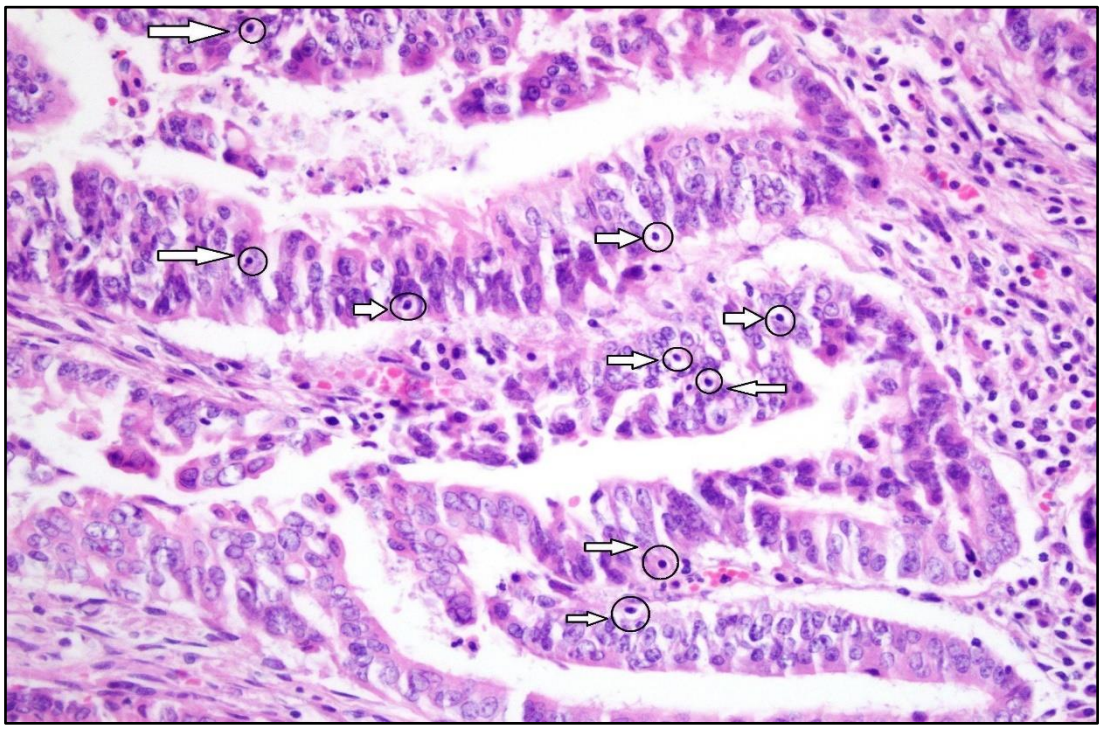


Resim 13: Matür stroma (x40, H&E)

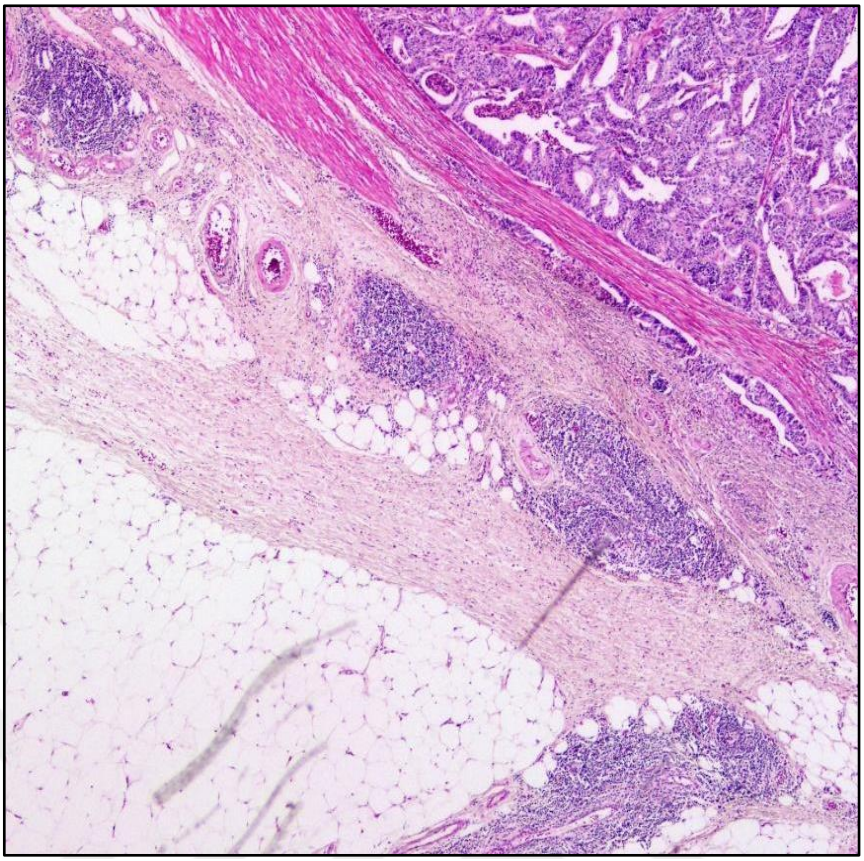
Şekil 17: Desmoplastik stroma paternini değerlendrime şeması

6. Tümörü infiltre eden lenfositler ve Crohn benzeri reaksiyonu

Bu çalışmada immün yanıtı değerlendirmek için tümörü infiltre eden intraepitelyal lenfosit ile Crohn benzeri reaksiyon varlığı değerlendirilmiştir. Tümörü infiltre eden intraepitelyal lenfositler, tipik olarak çevresinde kısmen şeffaf halo bulunduran küçük mavi yuvarlak nükleusa sahip hücreler olarak tanınmaktadır. Sadece tümör epitelini infiltre eden lenfositler sayılmıştır. Apoptotik hücrelerin dahil edilmemesine dikkat edilmiştir. En yoğun lenfosit infiltrasyon alanı küçük büyütmede tespit edildikten sonra x40 objektif ile birbirinin devamı 5 alan sayılıp ortalaması alınmıştır (Resim 14). Tümörler, <2 TIL/BBA ve ≥ 2 TIL/BBA olacak şekilde iki grupta incelenmiştir [74]. Crohn benzeri reaksiyon ise tümörün infiltrasyon sınırına komşu alanda en az üç lenfoid agregat varlığı olarak kabul edilmiştir (Resim 15) [74].



Resim 14: Tümörü infiltre eden lenfositler (x40, H&E)



Resim 15: Crohn benzeri reaksiyon (x2, H&E)

7. İmmünohistokimyasal yöntem

Maspin için [PA5-110847] rabbit-poliklonal antikoru, LOX için [EPR4025] rabbit-monoklonal antikoru kullanılmıştır. Maspin ve Lizil Oksidaz'ın immünhistokimyasal analizde tümörden hazırlanan TMA bloklarından poly-L-lizin kaplı lamlara 3- 4 µ kalınlığında kesitler hazırlanmıştır. Kesitler, deparafinizasyon için 72°C'lik etüvde (DAIHAN Scientific) 1 saat bekletildikten sonra deparafinizasyon ve boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Boyama, işleme Roche Ventana Ultra cihazında gerçekleştirilmiştir. Preparatlar ilk olarak EZ Prep (10x konsantrasyonunda dilüe) ile ardından reaksiyon buffer (10x konsantrasyonunda dilüe, pH: 7,4-7,8) ile yıkanmıştır. Tüm antikorlar için hazırlanan kesitlere CC1 (EDTA, ethilen-diamine-tetraacetic acid) tampon (Ph:8) kullanılmıştır. 95°C sıcaklıkta her iki antikor için 36 dakika, antijen retrieval işlemi uygulanıp reaksiyon buffer ile yıkanmıştır. Maspin için 37°C de 1 saat, LOX için 37°C de 20 dakika olacak şekilde antikor ile inkübasyon sağlanmıştır. Kesitler reaksiyon buffer ile yıkandıktan sonra zemin boyaması için 8 dakika hematoksilen ve 4 dakika blueing reagent kullanılmıştır. Tüm boyama işlemleri otomatik olarak Roche Ventana Ultra cihazda gerçekleştirilmiştir. Distile sudan geçirildikten sonra %96'lık alkolden 2 kere, %99'luk alkolden bir kere ve ksilenden üç kere geçirilmiştir. Lamlar alkole daldırılıp kurutulduktan sonra balzamla kapatılarak incelemeye alınmıştır.

Daha önceden uygulanmış mismatch repair proteinler ekspresyonu değerlendirmek için immünohistokimyasal yöntemde ise yukarıda tariflenen işlemlere benzer aşamalar kullanılmıştır. MLH-1, MSH-2 ve MSH-6 için 95°C de 36 dakika, PMS-2 için 95°C 76 dakika antijen retrieval işlemi uygulanmıştır. Antikor inkübasyonları, 37°C de MLH-1 için 40 dakika, MSH-2 için 36 dakika, MSH-6 için 1 saat ve PMS-2 için 1 saat 36 dakika olarak gerçekleştirilmiştir.

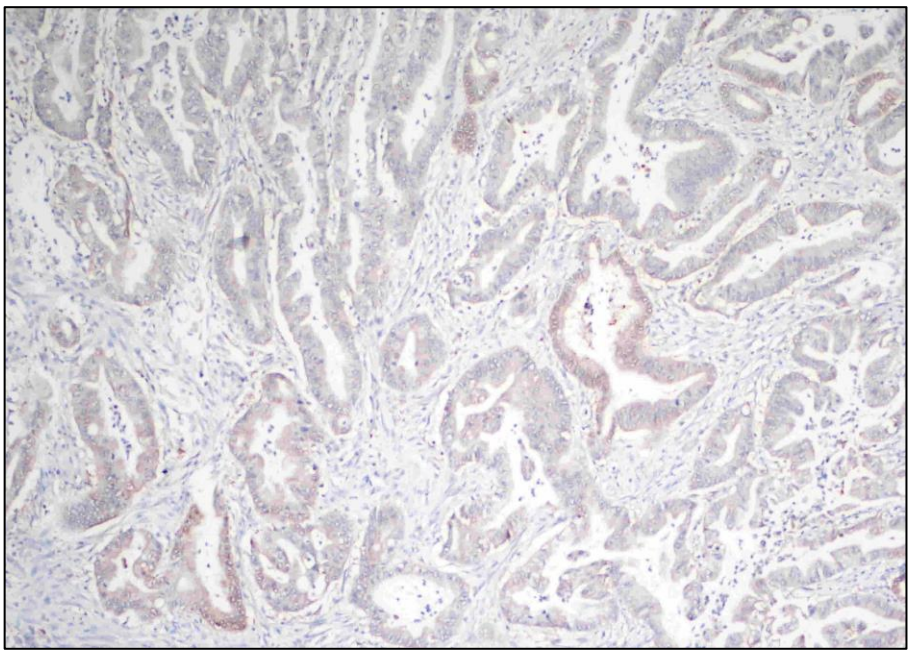
8. İmmünohistokimyasal değerlendirme

İmmünohistokimyasal değerlendirme ve skorlama, iki gözlemci tarafından klinik ve patolojik veriler açısından kör olarak yapılmıştır.

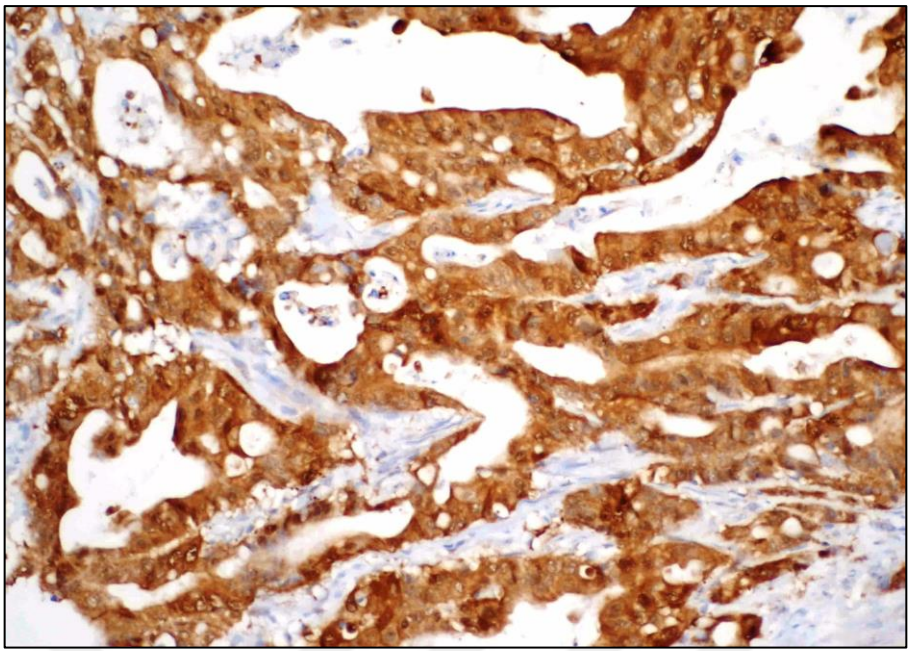
Maspin ekspresyonu, reaksiyonun izlendiği hücresel komponente göre sitoplazmik ve nükleer olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir (Resim 16-19). Ekspresyon yüzdesinde %10 ve %25 limitleri kullanılmıştır [92]. Sonuç olarak, ekspresyon yüzdesi ve şiddettine göre gruplandırma yapılmıştır (Tablo 6).

Tablo 6: Maspin ekspresyonun değerlendirilmesi ve gruplanması [92]

Sitoplazma	Nükleus	Değerlendirme sonucu
<%10	<%10	Negatif
Yoğun ekspresyon, ≥%10- <%25	<%10	Sitoplazmik predominans
Negatif veya hafif ekspresyon, <%10	≥%10- <%25	Nükleer predominans
Yoğun ekspresyon, ≥%25	Yoğun ekspresyon, ≥%25	Mikst ekspresyon

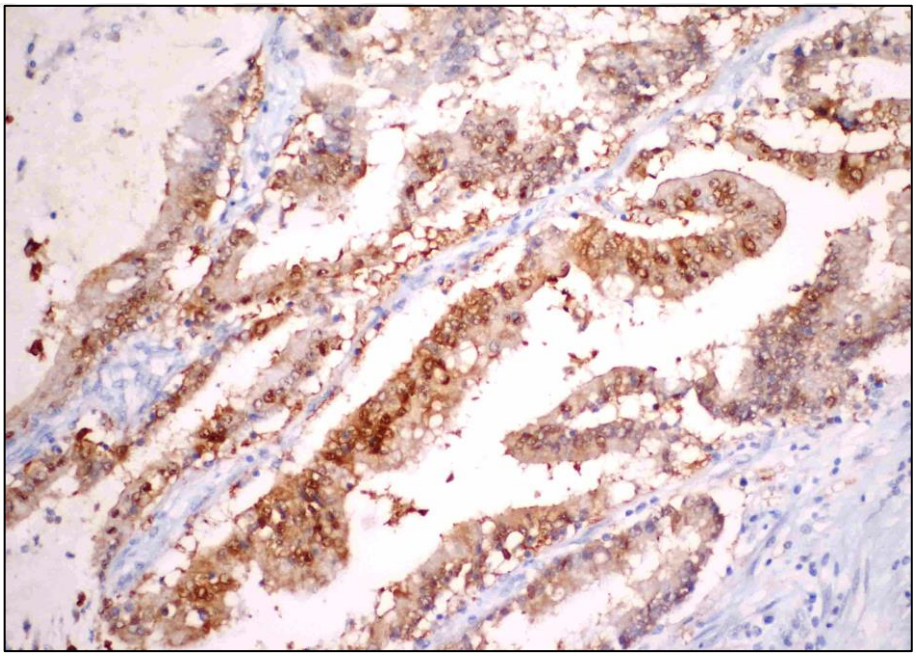


Resim 16: Fokal ve zayıf maspin ekspresyonu (Negatif)

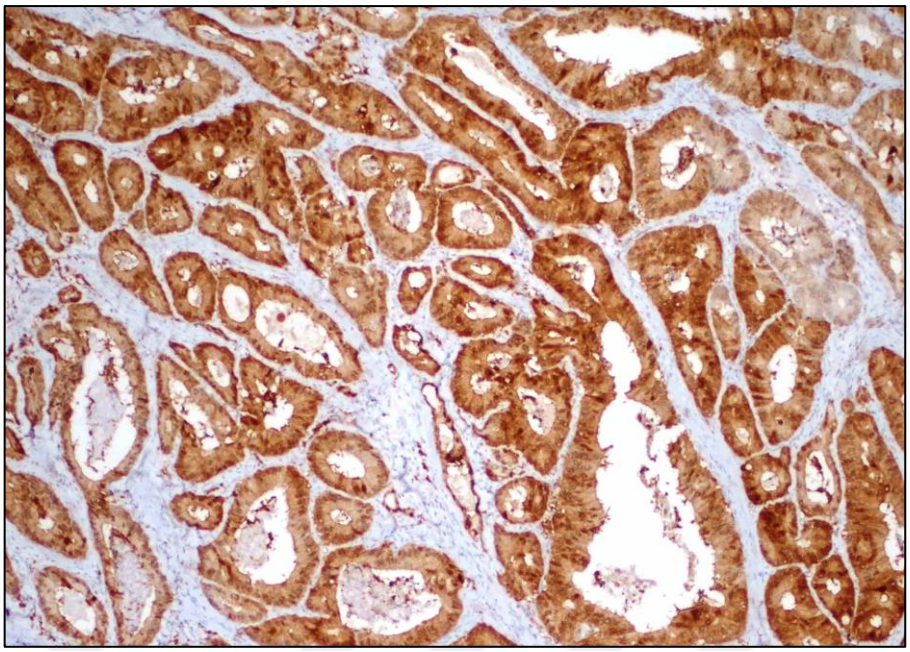


Resim 17: Maspinin sitoplazmik ekspresyonu (x20).

.



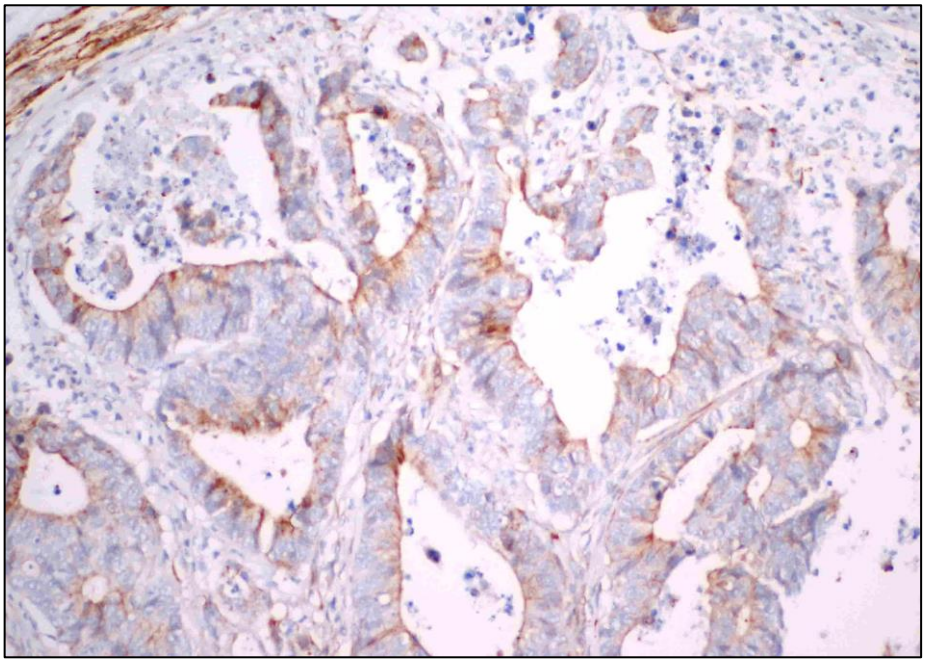
Resim 18: Maspinin nükleer ekspresyonu (x20).



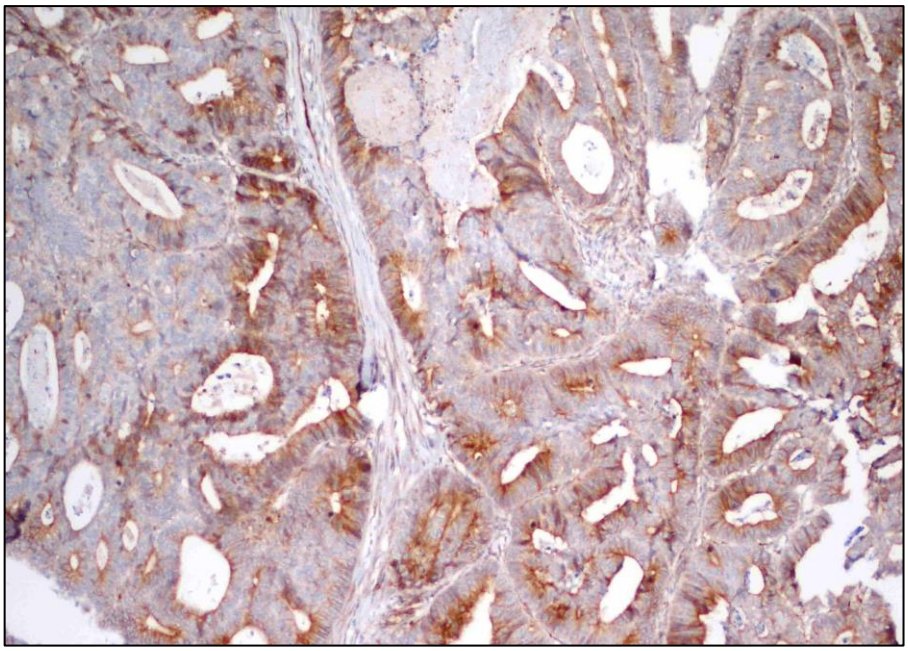
Resim 19: Maspinin mikst ekspresyonu (x20).

Tümörün epitelyal komponentinde sitoplazmik LOX ekspresyonun şiddeti; negatif, 1+, 2+ ve 3+ olarak gruplanmış ve ekspresyon yüzdeleri değerlendirilmiştir (Resim 17, 18 ve 19). Ekspresyon yüzdeleri 0 (%0), 1 (%0-%25), 2 (%25-%50), 3 (%50-%75) ve 4 (%75-%100) olarak puanlanmıştır. Ekspresyon yüzdeleri ile yoğunluk skorları çarpılarak final skor hesaplanmıştır. Final skoru ≤4 olan grup LOX ekspresyonu düşük, >4 olan grup LOX ekspresyonu yüksek olarak değerlendirilmiştir (Tablo 7) (Resim 20, 21, ve 22)[101].

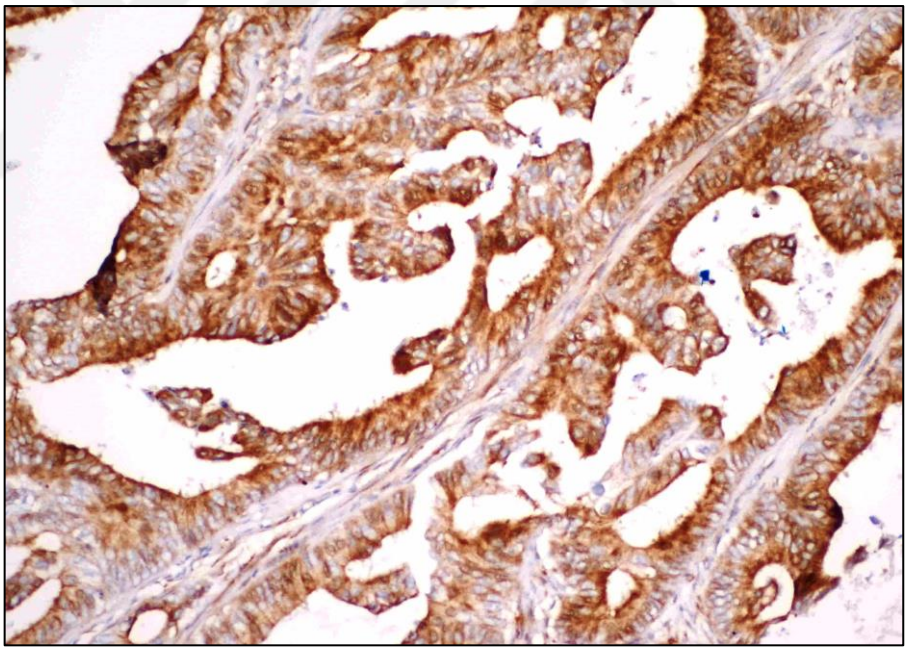
Tablo 7: Tümördeki LOX ekspresyonun değerlendirilmesi	
Tümörün ekspresyon yüzdesi	**Tümörün ekspresyon yüzdesi puanı**
%0	0
%0-%25 (≤%25)	1
%25-%50 (≤%50)	2
%51-%75 (≤%75)	3
>%75	4
Tümörün ekspresyon yoğunluğu	**Tümörün ekspresyon yoğunluğu puanı**
Negatif	0
Zayıf pozitif	1
Orta şiddette pozitif	2
Güçlü pozitif	3
Tümör ekspresyon skoru (Yüzde puanı x Yoğunluk puanı)	
≤4	Düşük Ekspresyon
>4	Yüksek Ekspresyon



Resim 20: Tümördeki hafif şiddette (+1) sitoplazmik LOX ekspresyonu (x20).

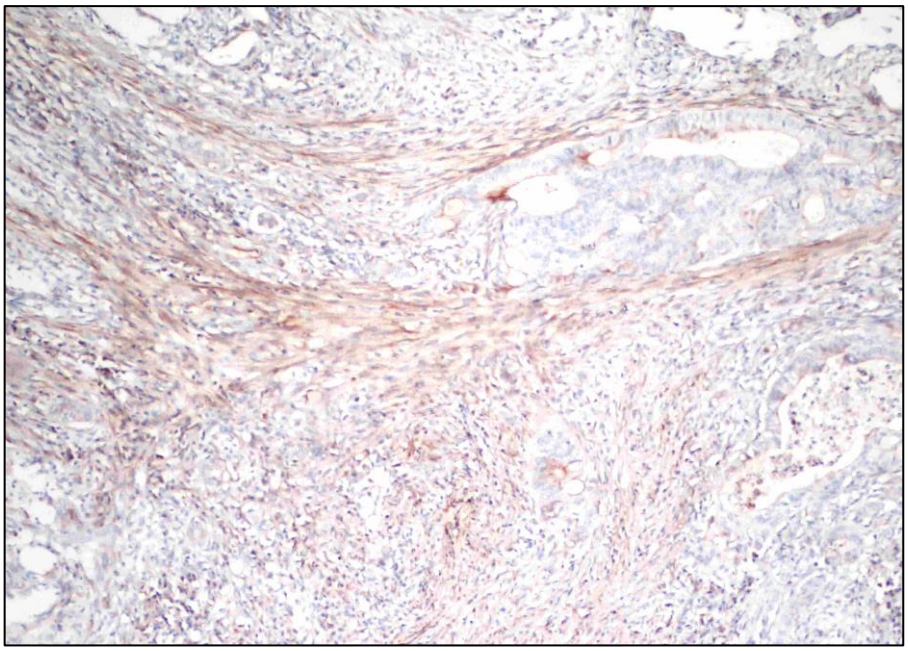


Resim 21: Tümördeki orta şiddette (+2) sitoplazmik LOX ekspresyonu (x20).

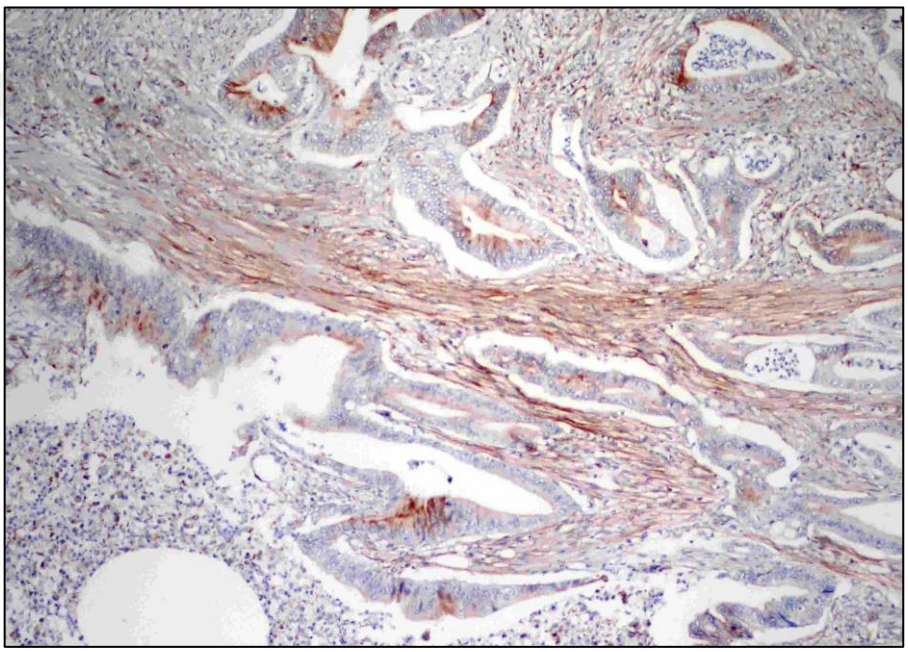


Resim 22: Tümördeki kuvvetli (+3) sitoplazmik LOX ekspresyonu (x20).

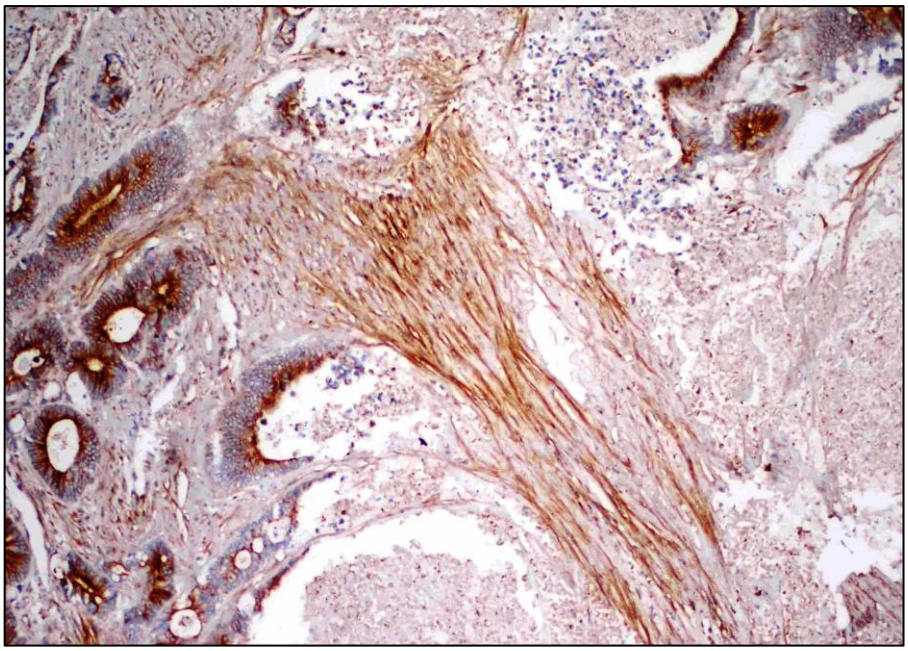
LOX ekspresyonu tümöre komşu stromada da değerlendirilmiştir. Hafif/zayıf ekspresyon 1+, orta şiddette ekspresyon 2+, yoğun ekspresyon 3+ olarak sınıflandırılmış olup ekspresyon izlenmeyen durumlar negatif kabul edilmiştir (Resim 22, 23 ve 24).



Resim 22: Tümör stromasındaki hafif şiddette (+1) LOX ekspresyonu (x20).



Resim 23: Tümör stromasındaki orta şiddette (+2) LOX ekspresyonu (x20).



Resim 24: Tümör stromasındaki kuvvetli (+3) LOX eskpresyonu ile birlikte tümördeki kuvvetli LOX ekspresyonu (x20).

9. Moleküler analiz

DNA ekstraksiyonu: Moleküler çalışma için uygun nitelikte tümör bloğu tespit edilir ve çalışılacak alan lam üzerinde işaretlenir. Parafine gömülü dokulardan 5 µm kalınlığında kesit hazırlanarak 1,5 ml hacimli epandorfa alınır. 100µ deparafinizasyon solüsyonunu ve 100µ tampon solüsyonunu sırayla tüpe eklenip hafifçe karıştırılır. Daha sonra 10 µl proteinaz K eklenerek overnight 56 derecede kuru blokta bekletilir. 350 rpm de çalkalanır. Ardından 90°C'de 1 saat kuru blokta inkübe edilir. Buffer ve etanol eklenerek filtreli tüplere aktarılır. Santrifüj sonrası tüpün altındaki çökelti, süpernatan ile karıştırılmadan yeni bir tüpe aktarılır. Yıkama basamaklarından sonra yüksek rpmde 3 dk çevrilerek 50 mikrolitre dilüsyon solusyonu eklenir. 5 dk oda ısında bekletilerek tekrar santrifüj edilir.

DNA ölçümü: Mikro hacimli spektrofotometrik ölçümler için MaestroNano cihazı kullanılmıştır. DNA konsantrasyonunu ölçmek için sadece 1,5 µl örnek hacmi gerekmektedir. Örnek konsantrasyonu 2 ng/µL – 2.000 ng/µL dsDNA arasında sonuç alınabilmektedir. Öncelikle izolasyon sonrasında elüsyon yapılan solüsyon ile kalibrasyon yapılması gerekmektedir.

Amplifikasyon: Uygulamalarda, Real time PCR platformunda EasyPGX™ KRAS, NRAS ve BRAF mutasyon saptama kitleri kullanılmış olup firmanın önerdiği protokoller uygulanmıştır.

Her numune KRAS ve NRAS analizi için EasyPGX şeridinde bulunan 8, BRAF analizi için 4 farklı mutasyon kiti kullanılmıştır. Negatif kontrol için su, pozitif kontrol için EasyPGX pozitif kontrolü kullanılmıştır. Bu uygulamada Tablo 8'de belirtilen termal koşullar kullanılmıştır.

Basamaklar	Sıcaklık/Süre
Hızlı başlangıç/Ön denatürasyon (1 siklus)	95°C- 5 dakika
Amplifikasyon (40 siklüs)	95°C- 15 saniye
	56°C-15 saniye
	60°C- 45 saniye (sonuç toplama)

Tablo 8: Analizin termal aşamaları

Mutasyon analizi: KRAS, NRAS, BRAF mutasyon analizleri için DNA izolasyonu ve ölçümü sonrasında hedef mutasyonlar EasyPGX® analysis software version 1.1.0 sistemi ile gerçek zamanlı PCR reaksiyonu uygulanarak tespit edilmiştir.

10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 23.0 programı yardımıyla gerçekleştirildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu histogram grafikleri ve Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Tanımlayıcı analizler sunulurken ortalama, standart sapma, ortanca değerler kullanıldı. Kategorik değişkenler Pearson Ki Kare Testi ile karşılaştırıldı. Normal dağılım göstermeyen (nonparametrik) değişkenler iki grup arasında değerlendirilirken Mann Whitney U Testi, ikiden fazla grup arasında değerlendirilirken Kruskal Wallis Testi kullanıldı. Ölçümsel verilerin birbirleri ile analizinde Spearman Korelasyon Testi'nden kategorik değişkenlerin ilişkisinde ise (sıralı niteliksel) Gamma korelasyon katsayısından faydalanıldı. Spearman Korelasyon Testi'nde korelasyon katsayısı(r) -1 ile +1 aralığında değişmekte olup, sayının 1'e yakınlığı kuvvetini, pozitif ya da negatif olması korelasyonun yönünü gösterir. Tedaviden sonra hastaların beklenen yaşam sürelerinin tahmin edilmesi

amacıyla da sağkalım analizi (Kaplan Meier) yapıldı. P-değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

BULGULAR

1. Demografik ve Klinikopatolojik Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 101 hastanın yaş ortalaması 61,84±11,39 olup yaş aralığı 32 ile 85 arasında değişmektedir. Olguların 16'sı (%16) 50 yaşından küçük, 41'i (%40,5) 50-65 yaş aralığında, 44'ü (%43,5) 65 ve üzeri yaştadır. Olguların 65'i (%64,4) erkek, 36'sı (%35,6) kadındır. Hastalardan 28'i (%27,7) yaşamını yitirmiştir.

Çekum, çıkan kolon ve transvers kolon lokalizasyonları "sağ kolon", inen kolon, sigmoid kolon ve rektum lokalizasyonları "sol kolon" şeklinde belirlenmiştir. Olguların 26'sı (%25,74) sağ kolon, 75'i (%74,25) sol kolon yerleşimli olarak saptandı. Ortalama tümör boyutu 5,25±3,36 cm'dir.

Tümör derecelendirmesinde dört basamaklı sınıflandırma kullanılmıştır. Bu sisteme göre; 46'sı (%45,5) iyi diferansiye, 40'ı (%39,6) orta diferansiye, 11'i (%10,8) kötü diferansiye ve 4'ü (%3,9) indiferansiye olarak kategorize edilmiştir (Tablo 9).

TNM evresine göre; vakaların 7'si (%6,9) T2, 61'i (%60,4) T3, 33'ü (%32,7) T4 olup çalışmaya dahil edilmiş T1 tümör saptanmamıştır. Materyallerden disseke edilen lenf nodu ortalaması 21,6 olup 12'nin altında lenf nodu diseke edilen olgu sayısı 22 (%21,7) olarak tespit edilmiştir. Lenf nodu metastazı olguların 62'sinde (%61,4) izlenmiş, 39'unda (%38,6) izlenmemiştir. pN açısından değerlendirildiğinde, 38'i (%37,6) N0, 24'ü (%23,7) N1, 39'u (%38,7) N2'dir. Metastatik lenf nodu sayısı 1 ila 53 arasında dağılım göstermektedir.

Olguların 67'sinde (%66,3) lenfovasküler invazyon, 38'inde (%37,6) perinöral invazyon mevcuttur. Ekstramural vasküler invazyon 18 (%17,8) olguda saptanmıştır.

Tanı anındaki evrelemeye göre; hastaların 3'ü (%2,97) evre I, 16'sı (%15,84) evre II, 25'i (%24,75) evre III, 57'si (%56,44) evre IV'tür.

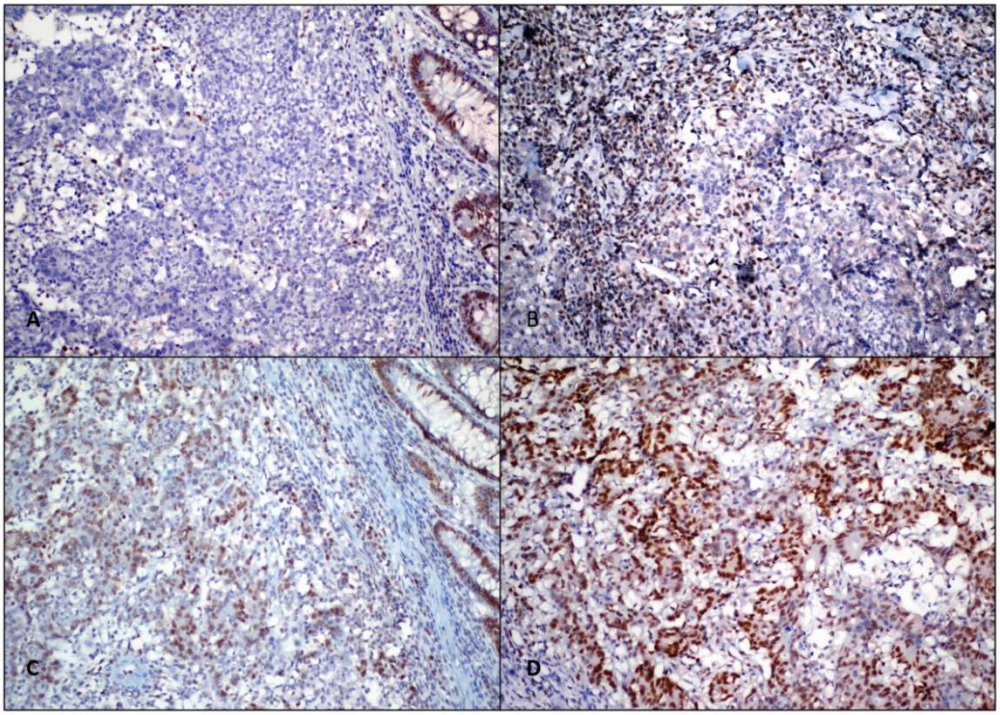
Olguların 87'sinde (%86,1) MMR protein ekspresyonu korunmuş olup 14'ünde (%13,9) MMR protein ekspresyon kaybı saptanmıştır. MMR durumu ile klinikopatolojik veriler karşılaştırıldığında MMR ekspresyon kaybı ile tümör lokalizasyonu (p=0,007), tümör infiltrasyon paterni (p=0,003), pTNM evresi (p <0,001), tümör tomurcuklanması (p=0,005), TİL varlığı (p=0,019), ve Crohn benzeri reaksiyon varlığı (p=0,014) ile arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde MMR kaybı gösteren tümörlerin daha çok sağ kolonda (%57,14) yerleşim gösterdiği saptanmıştır. MMR protein ekspresyon kaybı bulunan tümörler daha erken evrede saptanırken (evre II; dMMR %54,14), MMR ekspresyonu korunan tümörler ileri evrede (evre IV; pMMR %61,63) tespit edilmiştir. Ayrıca MMR ekpsresyon kaybı ile ekspansil büyüme paterni arasında ilişki olduğu izlenmiştir (Resim 25 ve 26).

TİL varlığı ile prognostik parametreler karşılaştırıldığında Crohn benzeri reaksiyon varlığı (p=0,023), MMR durumu (p=0,019), progresyonsuz sağkalım (p=0,032) ve pTNM evresi (p=0,007) arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. TİL saptanan olgular genellikle erken evre kanserler olup TİL varlığında progresyonsuz sağkalımda artış izlenmiştir. Ayrıca TİL 2'den fazla tespit edilen olgularda TİL 2'den az olan olgulara göre eşlik eden Crohn benzeri reaksiyon varlığı daha sık olduğu izlenmiştir.

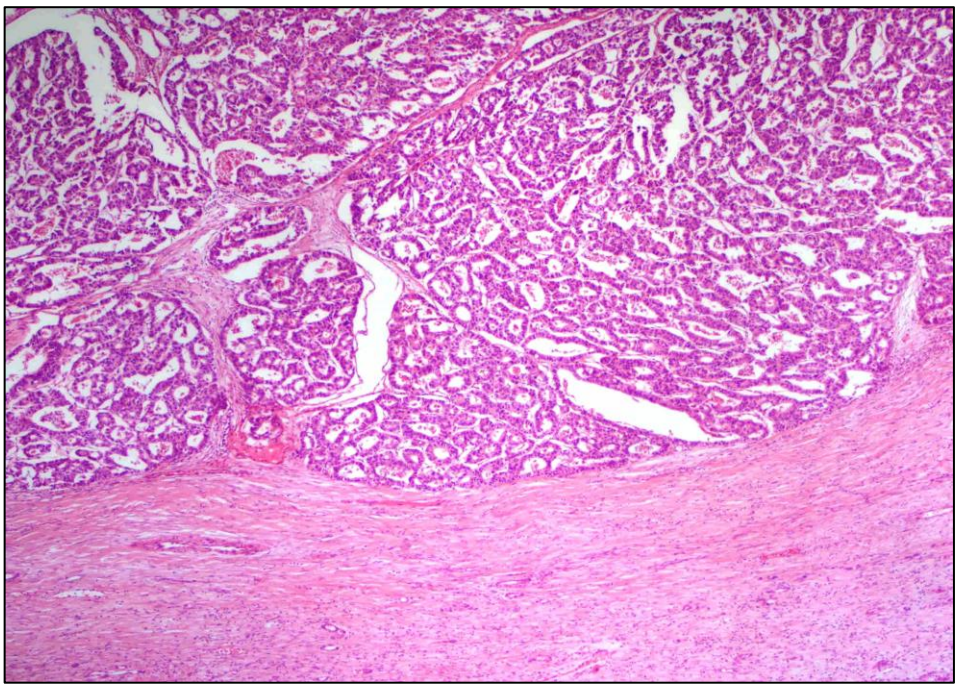
Olgular moleküler özellikler açısından değerlendirildiğinde vakaların 32'sinde (%31,68) KRAS, 11'inde (%10,89) BRAF, 4'ünde (%3,96) NRAS mutasyonu saptanmış olup 54 (%53,47) vakada mutasyon tespit edilememiştir. Moleküler profil ile klinikopatolojik veriler karşılaştırıldığında tümör subtipi ile moleküler profil arasında anlamlı ilişki izlenmiştir (p=0,002). Serrated adenokarsinomların %60'ında BRAF mutasyonu saptanmıştır. Ayrıca moleküler özellikler ile genel sağkalım arasındaki anlamlı ilişki (p=0,016) mevcut olup en kötü sağkalım BRAF mutasyonu saptanan grupta gözlenmiştir (BRAF mutasyonu olgularda ölüm oranı: %63,64).

Özellikler		n	%
Cinsiyet	Kadın	36	64,36
	Erkek	65	35,64
Lokalizasyon	Sağ kolon	26	24,75
	Sol kolon	75	75,25
Tümör derecesi	İyi diferansiye	46	45,54
	Orta diferansiye	40	39,60
	Az diferansiye	11	10,89
	İndiferanisye	4	3,96
Lenfovasküler invazyon	YOK	32	31,68
	VAR	69	68,32
Perinöral invazyon	YOK	63	62,38
	VAR	38	37,62
Evre	I	3	2,97
	II	16	15,84
	III	25	24,75
	IV	57	56,44
Tümör Tipi	Konvansiyonel	75	74,26
	Müsinöz	12	11,88
	Serrated	5	4,95
	Taşlı yüzük	4	3,96
	Mikropapiller	3	2,97
	Medüller	2	1,98
MMR durumu	pMMR	87	86,14
	dMMR	14	13,86
Moleküler profil	BRAF+	11	10,89
	KRAS+	32	31,68
	NRAS+	4	3,96
	NEGATİF	54	53,47

Tablo 9: Demografik ve patolojik bulgular



Resim 25: İmmünhistokimyasal olarak MMR ekspresyon profili (x20). A: MLH1 ekspresyon kaybı, B: PMS2 ekspresyon kaybı, C: MSH2 ekspresyonu, D: MSH6 ekspresyonu.

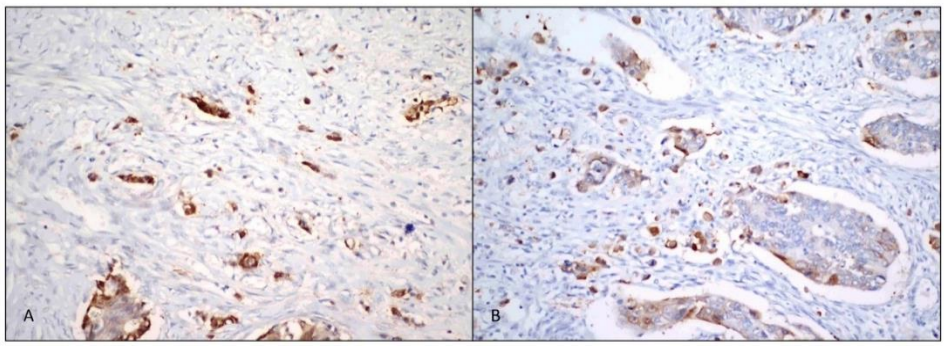


Resim 26:. Ekspansil büyüme paternine sahip MMR ekspresyon kaybı gösteren tümör (H&E, x4).

2. Maspin ekspresyonu ile klinikopatolojik özelliklerin karşılaştırılması

Maspin ekspresyonun değerlendirildiği dört kategoriye göre olguların 11'inde (%11,11) sitoplazmik, 19'unda (%19,19) nükleer, 12'sinde (%12,12) mikst ekspresyon izlenmiş olup 57 (%57,58) olguda ekspresyon saptanmamıştır. Maspin ekspresyonu, 2 olguda teknik nedenlerden ötürü değerlendirilememiştir.

Maspin ekspresyonu ile prognostik parametreler, klinik veriler ve LOX ekspresyonu arasındaki ilişki incelenmiştir. Maspin ekspresyonu ile LOX ekspresyonu (p=0,012), tomurcuklanma derecesi (p=0,038), tümör lokalizasyonu (p=0,022), lenfovasküler invazyon varlığı (p=0,047), hastalıksız sağkalım (p=0,015) ve genel sağkalım (p=0,048) arasında ilişki saptanmıştır (Tablo 11- 13; Şekil 19). Buna göre; en yüksek epitelyal LOX ekspresyonu nükleer maspin ekspresyonu olan grupta izlenmiştir. Gruplar kendi arasında değerlendirildiğinde nükleer ve mikst maspin ekspresyonu olan olgularda ekspresyon izlenmeyen tümörlere göre yüksek derecelerde tümör tomurcuklanması gözlenmiştir (Tablo 11). Negatif olgularda ise düşük tomurcuklanma derecesi saptanmıştır. Sitoplazmik maspin ekspresyonun hem hastalıksız sağkalımda hem de genel sağkalımda azalma ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Maspinin mikst ve sitoplazmik ekspresyonu sağ kolonda baskın iken nükleer ekspresyonu sol kolon tümörlerinde daha sık izlenmiştir. Desmoplastik stroma paterni ile maspin ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Maspini ekspresyonu değerlendirilirken tümör tomurcuklanma alanındaki stroma etkileşimi içinde olan hücrelerde nükleer ekspresyon gözlenmiştir (Resim 27). Diğer parametreler arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.



Resim 27: Maspinin tümör tomurcuklarında tek hücrelerde nükleer ekspresyonu (x20).

		Maspin								p
		Mikst		Negatif		Sitoplazmik		Nükleer		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Desmoplastik Stroma	Matür	4	(33,33)	32	(56,14)	7	(63,64)	10	(52,63)	0,309
	Miksoid	7	(58,33)	20	(35,09)	2	(18,18)	9	(47,37)	
	İntermedier	1	(8,33)	5	(8,77)	2	(18,18)	0	(,00)	
Tümör tomurcuklanması	Düşük	6	(50,00)	35	(61,40)	7	(63,64)	5	(26,32)	0,038
	Orta	1	(8,33)	15	(26,32)	3	(27,27)	8	(42,11)	
	Yüksek	5	(41,67)	7	(12,28)	1	(9,09)	6	(31,58)	
ADK	Düşük	7	(58,34)	39	(68,42)	8	(72,72)	8	(42,10)	0,137
	Orta	1	(8,33)	7	(12,28)	3	(27,27)	6	(31,58)	
	Yüksek	4	(33,33)	11	(19,30)	0	(,00)	5	(26,32)	
Lokalizasyon	Sağ kolon	7	(58,33)	10	(17,54)	4	(36,36)	4	(21,05)	0,022
	Sol kolon	5	(41,66)	47	(82,46)	7	(63,64)	15	(78,95)	
Moleküler profil	Negatif	4	(33,33)	34	(59,65)	4	(36,36)	11	(57,89)	0,364
	BRAF+	3	(25,00)	5	(8,77)	2	(18,18)	1	(5,26)	
	KRAS+	5	(41,67)	16	(28,07)	5	(45,45)	5	(26,32)	
	NRAS+	0	(,00)	2	(3,51)	0	(,00)	2	(10,53)	
İnfiltrasyon Paterni	İnfiltratif	10	(83,33)	50	(87,72)	8	(72,73)	19	(100,00)	0,156
	Ekspansil	2	(16,67)	7	(12,28)	3	(27,27)	0	(,00)	
Diferansiyasyon	G1	2	(16,67)	28	(49,12)	6	(54,55)	8	(42,11)	0,551
	G2	8	(66,67)	19	(33,33)	4	(36,36)	9	(47,37)	
	G3	1	(8,33)	7	(12,28)	1	(9,09)	2	(10,53)	
	G4	1	(8,33)	3	(5,26)	0	(,00)	0	(,00)	
Evre	I	0	(,00)	3	(5,26)	0	(,00)	0	(,00)	0,431
	II	1	(8,33)	7	(12,28)	3	(27,27)	5	(26,32)	
	III	3	(25,00)	11	(19,30)	4	(36,36)	6	(31,58)	
	IV	8	(66,67)	36	(63,16)	4	(36,36)	8	(42,11)	
Lenfovasküler invazyon	Yok	0	(,00)	23	(40,35)	3	(27,27)	5	(26,32)	0,047
	Var	12	(100,00)	34	(59,65)	8	(72,73)	14	(73,68)	
MMR durumu	pMMR	11	(91,67)	50	(89,29)	7	(63,64)	16	(84,21)	0,148
	dMMR	1	(8,33)	6	(10,71)	4	(36,36)	3	(15,79)	

Ki-Kare Testi

Tablo 10: Maspin ekspresyonu ile patolojik parametrelerin ilişkisi

		Maspin											
		M	Neg	M	S	M	Nük	Neg	S	Neg	Nük	S	Nük
Tümör Tomurcuklanması	Düşük	**0,038**		0,157		0,119		0,956		**0,022**		0,113	
	Orta												
	Yüksek												
LVİ	Yok	**0,007**		0,052		0,052		0,414		0,272		0,954	
	Var												

Ki-Kare Testi

Tablo 11: Maspin gruplarının karşılaştırılması

Maspin ekspresyonu	**Estimate**	**Std. Error**	**95% Confidence Interval**		p
			Lower Bound	**Upper Bound**	
Mikst	381,651	98,697	188,206	575,097	
Negatif	908,693	154,804	605,278	1212,108	
Sitoplazmik	269,136	43,038	184,782	353,491	**0,015**
Nükleer	505,522	63,429	381,201	629,843	
Overall	673,123	103,925	469,430	876,815	

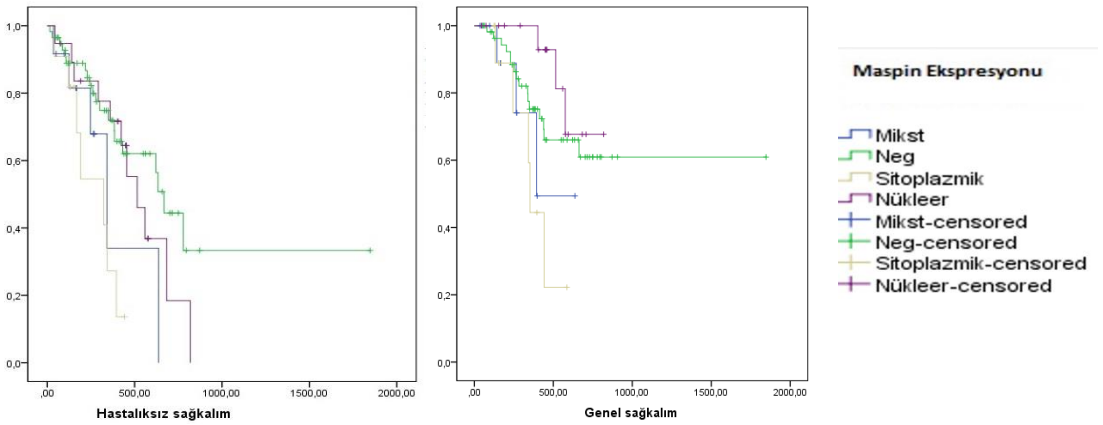
Sağkalım Analizi

Tablo 12: Maspin ekspresyonu ile hastalıksız sağkalım arasındaki ilişki

Maspin Ekspresyonu	**Estimate**	**Std. Error**	**95% Confidence Interval**		p
			Lower Bound	**Upper Bound**	
Mikst	467,000	73,531	322,879	611,121	
Negatif	1259,416	121,607	1021,066	1497,766	
Sitoplamik	382,333	53,508	277,457	487,210	**0,048**
Nükleer	721,022	47,750	627,432	814,612	
Overall	1211,802	99,624	1016,539	1407,064	

Sağkalım Analizi

Tablo 13: Olgularda izlenen maspin ekspresyonu ile hastaların genel sağkalımı arasındaki ilişki



Şekil 18: Maspin ekspresyon ile hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım arasındaki ilişki

3. LOX ekspresyonu ile klinikopatolojik özelliklerin karşılaştırılması

LOX ekspresyonu tümörde ve tümöre komşu stromada değerlendirilmiştir. Tümörün epitelyal komponentindeki LOX ekspresyonun değerlendirilmesinde olguların 54'ünde (%54,55) düşük ekspresyon, 45'inde yüksek ekspresyon saptanmıştır. 2 olgu teknik nedenlerden dolayı değerlendirilememiştir.

Tümördeki LOX ekspresyonu ile klinik-patolojik parametreler ve maspin ekspresyonu karşılaştırılmıştır. Epitelyal komponentteki LOX ekspresyonu ile stromadaki LOX ekspresyonu (p=0,001) ve maspin ekspresyonu arasında anlamlı ilişki izlenmiş olup (p=0,027) diğer parametreler ile anlamlı ilişki tespit edilememiştir (Tablo 15). Tümöre komşu stromadaki LOX ekspresyonu ile tümör epitelindeki LOX ekspresyonu arasında orta düzeyde pozitif yönde korelasyon (r=0,578) izlenmiştir (Tablo 15).

		LOX Tümör				p
		Düşük		Yüksek		
		n	%	n	%	
Desmoplastik Stroma	Matür	29	(53,70)	23	(51,11)	0,599
	Miksoid	22	(40,74)	17	(37,78)	
	İntermedier	3	(5,56)	5	(11,11)	
Tümör Tomurcuklanması	Düşük	29	(53,70)	23	(51,11)	0,604
	Orta	16	(29,63)	11	(24,44)	
	Yüksek	9	(16,67)	11	(24,44)	
ADK	Düşük	31	(57,41)	30	(66,67)	0,132
	Orta	28	(24,07)	4	(8,89)	
	Yüksek	10	(18,52)	11	(24,44)	
Lokalizasyon	Sağ kolon	14	(25,93)	11	(24,44)	0,840
	Sol kolon	27	(50,00)	25	(55,56)	
	Rektum	13	(24,07)	9	(20,00)	
Moleküler profil	Negatif	27	(50,00)	26	(57,78)	0,775
	BRAF+	6	(11,11)	5	(11,11)	
	KRAS+	18	(33,33)	13	(28,89)	
	NRAS+	3	(5,56)	1	(2,22)	
İnfiltrasyon Paterni	İnfiltratif	47	(87,04)	40	(88,89)	0,779
	Ekspansil	7	(12,96)	5	(11,11)	
Tümör tipi	Konvansiyonel	36	(66,67)	37	(82,22)	0,536
	Müsinöz	8	(14,81)	4	(8,89)	
	Serrated	3	(5,56)	2	(4,44)	
	Taşlı yüzük	3	(5,56)	1	(2,22)	
	Mikropapiller	2	(3,70)	1	(2,22)	
	Medüller	2	(3,70)	0	(,00)	
Diferansiyasyon	G1	28	(51,85)	16	(35,56)	0,057
	G2	17	(31,48)	23	(51,11)	
	G3	5	(9,26)	6	(13,33)	
	G4	4	(7,41)	0	(,00)	
Evre	I	1	(1,85)	2	(4,44)	0,502
	II	7	(12,96)	9	(20,00)	
	III	12	(22,22)	12	(26,67)	
	IV	34	(62,96)	22	(48,89)	
Lenfovasküler invazyon	Yok	17	(31,48)	13	(28,89)	0,780
	Var	37	(68,52)	32	(71,11)	
Perinöral invazyon	Yok	35	(64,81)	26	(57,78)	0,473
	Var	19	(35,19)	19	(42,22)	
MMR durumu	pMMR	47	(87,04)	37	(84,09)	0,678
	dMMR	7	(12,96)	7	(15,91)	
EMVI/IMVI	Yok	44	(81,48)	37	(82,22)	0,924
	Var	10	(18,52)	8	(17,78)	

Ki-Kare Testi

Tablo 14: Tümörün epitelyal komponentindeki LOX ekspresyonu ile diğer paramatreler arasındaki ilişki

		LOX Tümör				p	r
		Düşük		Yüksek			
		n	%	n	%		
LOX stroma	Negatif	27	(50,94)	8	(17,78)	**0,001**	**0,578**
	1+	17	(32,08)	18	(40,00)		
	2+	9	(16,98)	12	(26,67)		
	3+	0	(,00)	7	(15,56)		
Maspin	Mikst	4	(7,55)	8	(17,78)	**0,027**	-
	Negatif	37	(69,81)	19	(42,22)		
	Sitoplazmik	6	(11,32)	5	(11,11)		
	Nükleer	6	(11,32)	13	(28,89)		

Ki-Kare Testi **Tablo 15**: Tümördeki LOX ekspresyonu ile stromal LOX ekspresyonu ve maspin ekspresyonu arasındaki ilişki

Evrelere göre değerlendirildiğinde sadece evre IV hastalarda LOX ekspresyonu ile progresyonsuz sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (p=0,004) (Şekil 20). Yüksek LOX ekspresyonun progresyonsuz sağkalımda azalma ile ilişkili olduğu izlenmiştir (Tablo 16, Şekil 20). Tümör epitelinde LOX ekspresyonu ile ADK derecesi arasında orta düzeyde pozitif yönlü (r=0,436) anlamlı ilişki bulunmuştur (p=0,043) (Tablo 17). Diğer parametreler ile tümördeki LOX ekspresyonu arasında ilişki mevcut değildir (Tablo 16).

Evre IV		LOX Tümör				p
		Düşük		Yüksek		
		n	%	n	%	
Desmoplastik Stroma Paterni	Matür	17	(50,00)	10	(45,45)	0,880
	Miksoid	15	(44,12)	10	(45,45)	
	İntermedier	2	(5,88)	2	(9,09)	
Tümör Tomurcuklanması	Düşük	20	(58,82)	9	(40,91)	0,265
	Orta	9	(26,47)	6	(27,27)	
	Yüksek	5	(14,71)	7	(31,82)	
ADK	Düşük	20	(58,82)	13	(59,09)	**0,043**
	Orta	9	(26,47)	1	(4,55)	
	Yüksek	5	(14,71)	8	(36,36)	
Lokalizasyon	Sağ kolon	8	(23,53)	5	(22,73)	0,161
	Sol kolon	26	(76,47)	17	(77,27)	
Moleküler profil	Negatif	16	(47,06)	11	(50,00)	0,589
	BRAF+	3	(8,82)	4	(18,18)	
	KRAS+	14	(41,18)	7	(31,82)	
	NRAS+	1	(2,94)	0	(,00)	
İnfiltrasyon Paterni	İnfiltratif	30	(88,24)	22	(100,00)	0,095
	Ekspansil	4	(11,76)	0	(,00)	
Diferansiyasyon	G1	19	(55,88)	7	(31,82)	0,084
	G2	10	(29,41)	12	(54,55)	
	G3	2	(5,88)	3	(13,64)	
	G4	3	(8,82)	0	(,00)	
MMR durumu	pMMR	31	(91,18)	21	(95,45)	0,544
	dMMR	3	(8,82)	1	(4,55)	
Genel sağ kalım	Sağ	21	(61,76)	18	(81,82)	0,111
	Ex	13	(38,24)	4	(18,18)	

Ki-Kare Testi **Tablo 16:** Evre IV hastalarda tümördeki LOX ekspresyonun diğer parametreler ile ilişkisi

	LOX Tümör	
	r	p
Az diferansiye kümeler	0,436	**0,043**

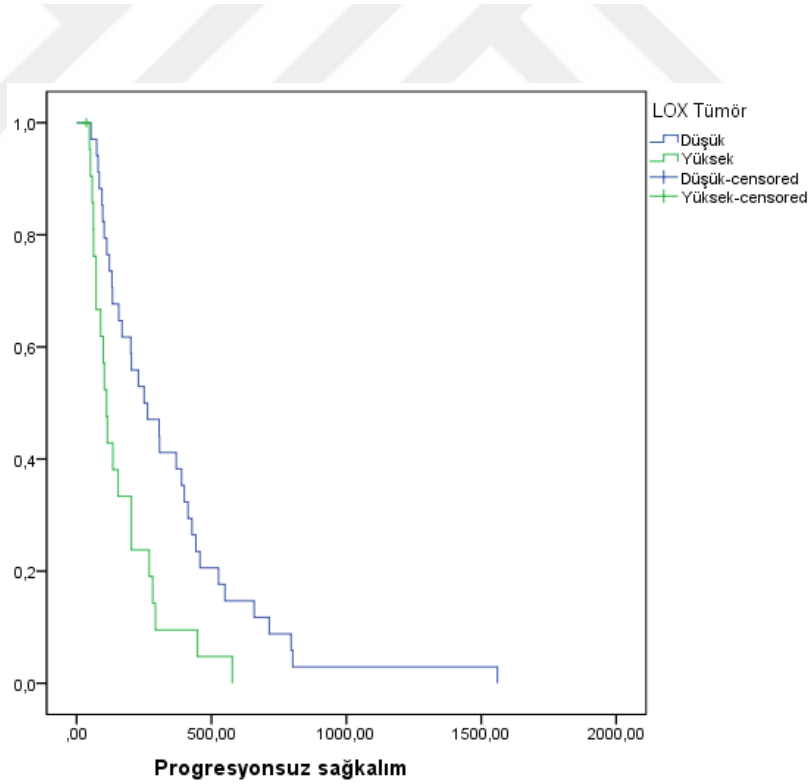
Phi Katsayısı

Tablo 17: Evre IV hastalarda tümördeki LOX ekspresyonu ile ADK arasındaki korelasyon

LOX Tümör	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		p
			Lower Bound	Upper Bound	
Düşük	343,088	52,140	240,893	445,283	**0,004**
Yüksek	166,857	30,484	107,108	226,606	
Overall	275,800	35,975	205,289	346,311	

Sağkalım Analizi

Tablo 18: Evre IV hastalarda tümördeki LOX ekspresyonu ile progresyonsuz sağkalım arasındaki ilişkisi



Şekil 19: Evre IV hastalarda tümördeki LOX ekspresyonu ile progresyonsuz sağkalım arasındaki ilişki

Stromadaki LOX ekspresyonu değerlendirildiğinde olguların 35'inde (%35,35) hafif ekspresyon (1+), 21'inde (%21,21) orta şiddette ekspresyon (2+), 7'sinde (%7,07) kuvvetli ekspresyon izlenmiştir. Olguların 36'inde (%36,36) ekspresyon saptanmamıştır. Stromadaki LOX ekspresyonu ile diğer klinikopatolojik veriler ve maspin ekspresyonu arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu çalışmada tümör stromasında LOX ekspresyonu ile tümör tomurcuklanması arasında orta düzeyde pozitif yönlü (r=0,402) anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p=0,007). Stromada LOX ekspresyonu yüksek olan tümörlerde yüksek tomurcuklanma dereceleri izlenmiştir (Tablo 19).

		LOX stroma								p
		Negatif		Hafif		Orta		Yoğun		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Desmoplastik Stroma Paterni	Matür	19	(52,78)	20	(57,14)	11	(52,38)	2	(28,57)	0,875
	Miksoid	15	(41,67)	12	(34,29)	8	(38,10)	4	(57,14)	
	İntermedier	2	(5,56)	3	(8,57)	2	(9,52)	1	(14,29)	
Tümör Tomurcuklanma	Düşük	24	(66,67)	22	(62,86)	4	(19,05)	2	(28,57)	**0,007**
	Orta	8	(22,22)	5	(14,29)	11	(52,38)	3	(42,86)	
	Yüksek	4	(11,11)	8	(22,86)	6	(28,57)	2	(28,57)	
ADK	Düşük	22	(61,11)	25	(71,43)	11	(52,38)	3	(42,86)	0,226
	Orta	6	(16,67)	3	(8,57)	7	(33,33)	1	(14,29)	
	Yüksek	8	(22,22)	7	(20,00)	3	(14,29)	3	(42,86)	
Maspin	Mikst	3	(8,33	5	(14,71)	2	(9,52)	2	(28,57)	**0,005**
	Neg	28	(77,78)	17	(50,00)	10	(47,62)	1	(14,29)	
	Sitoplazmik	1	(2,78)	8	(23,53)	1	(4,76)	1	(14,29)	
	Nükleer	4	(11,11)	4	(11,76)	8	(38,10)	3	(42,86)	
Moleküler profil	Negatif	22	(61,11)	18	(51,43)	10	(47,62)	3	(42,86)	0,487
	BRAF+	2	(5,56)	4	(11,43)	3	(14,29)	2	(28,57)	
	KRAS+	10	(27,78)	13	(37,14)	7	(33,33)	1	(14,29)	
	NRAS+	2	(5,56)	0	(,00)	1	(4,76)	1	(14,29)	
İnfiltrasyon Paterni	İnfiltratif	31	(86,11)	29	(82,86)	21	(100,00)	6	(85,71)	0,277
	Ekspansil	5	(13,89)	6	(17,14)	0	(,00)	1	(14,29)	
Diferansiyasyon	G1	18	(50,00)	18	(51,43)	7	(33,33)	1	(14,29)	0,480
	G2	13	(36,11)	11	(31,43)	11	(52,38)	5	(71,43)	
	G3	3	(8,33)	4	(11,43)	3	(14,29)	1	(14,29)	
	G4	2	(5,56)	2	(5,71)	0	(,00)	0	(,00)	
Evre	I	1	(2,78)	1	(2,86)	1	(4,76)	0	(,00)	0,584
	II	4	(11,11)	7	(20,00)	4	(19,05)	1	(14,29)	
	III	6	(16,67)	9	(25,71)	5	(23,81)	4	(57,14)	
	IV	25	(69,44)	18	(51,43)	11	(52,38)	2	(28,57)	
Lenfovasküler invazyon	Yok	12	(33,33)	13	(37,14)	5	(23,81)	0	(,00)	0,222
	Var	24	(66,67)	22	(62,86)	16	(76,19)	7	(100,00)	

Ki-Kare Testi

Tablo 19: Stromadaki LOX ekspresyonu ile prognostik parametreler ve maspin ekspresyonu arasındaki ilişki

Stromadaki LOX ekspresyonu ile maspin eksresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p=0,005). Gruplar arasında yapılan değerlendirmede negatif ile hafif ve negatif ile yoğun ekspresyon arasında anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir (p<0,05) (Tablo 19). Bu fark en çok mikst ve sitoplazmik maspin ekspresyonunda izlenmektedir (Tablo 20). Stromal LOX ekspresyonun yoğun izlendiği vakalarda çoğunlukla mikst ve sitoplazmik maspin ekspresyonu gözlenmektedir. Stromal LOX ekspresyonu ile stroma paterni arasında ilişki saptanmamış olmakla beraber matür stromaya sahip tümörlerin çok az bir kısmında yoğun stromal LOX ekspresyonu gözlenmektedir.

		LOX stroma											
		Negatif	Hafif	Negatif	Orta	Negatif	Yoğun	Hafif	Orta	Hafif	Yoğun	Orta	Yoğun
Maspin	Mikst Neg Sitoplazmik Nükleer	**0,042**		0,101		**0,015**		0,066		0,119		0,319	

Ki-Kare Testi

Tablo 20: Stromadaki LOX ekspresyon grupları arasında maspin ekspresyonun karşılaştırılması

4. Desmoplastik stroma paterni ile klinikopatolojik özelliklerin karşılaştırılması

Tümörün infiltratif sınırında izlenen stroma paternine göre; 54'ü (%53,47) matür, 8'i (%7,92) intermediate ve 39'u (%38,61) miksoid stroma olarak değerlendirilmiştir. Tümör stroma paterni ile tümör tomurcuklanması, az diferansiye kümeler gibi prognostik parametreler ve tümör lokalizasyonu, sağkalım gibi klinik veriler ile arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu çalışmada stroma grupları ile tümör tomurcuklanması derecesi arasında orta düzeyde pozitif yönlü (r=0,639) ilişki saptanmıştır (p <0,001) (Tablo 21 ve Tablo 22). Bu sonuca göre tomurcuklanma derecesi yüksek olan tümörlerin daha immatür stromaya sahip olduğu izlenmiştir (Resim 28). Ayrıca stroma paterni ile lenfovasküler invazyon arasında ilişki bulunmuş olup (p=0,037) miksoid stromaya sahip tümörlerde matür stromaya göre daha sık lenfovasküler invazyon varlığı mevcuttur. Diğer parametreler ile stroma arasında ilişki saptanmamıştır (Tablo 21). Stroma paterni ile LOX ve maspin ekspresyonu arasında ilişki saptanmamıştır.

		Stroma paterni						p
		Matür		Miksoid		İntermedier		
		n	%	n	%	n	%	
Tümör Tomurcuklanması	Düşük	39	(72,22)	13	(33,33)	2	(25,00)	**<0,001**
	Orta	12	(22,22)	13	(33,33)	2	(25,00)	
	Yüksek	3	(5,56)	13	(33,33)	4	(50,00)	
ADK	Düşük	40	(74,07)	20	(51,28)	3	(37,50)	0,228
	Orta	7	(12,96)	8	(20,51)	2	(25,00)	
	Yüksek	7	(12,96)	11	(28,21)	3	(37,50)	
İnfiltrasyon Paterni	İnfiltratif	46	(85,19)	36	(92,31)	7	(87,50)	0,577
	Ekspansil	8	(14,81)	3	(7,69)	1	(12,50)	
Diferansiyasyon	G1	30	(55,56)	13	(33,33)	3	(37,50)	0,222
	G2	16	(29,63)	21	(53,85)	3	(37,50)	
	G3	6	(11,11)	3	(7,69)	2	(25,00)	
	G4	2	(3,70)	2	(5,13)	0	(,00)	
Evre	I	3	(5,56)	0	(,00)	0	(,00)	0,484
	II	11	(20,37)	4	(10,26)	1	(12,50)	
	III	12	(22,22)	10	(25,64)	3	(37,50)	
	IV	28	(51,85)	25	(64,10)	4	(50,00)	
Lenfovasküler invazyon	Yok	23	(42,59)	8	(20,51)	1	(12,50)	**0,037**
	Var	31	(57,41)	31	(79,49)	7	(87,50)	
Perinöral invazyon	Yok	37	(68,52)	23	(58,97)	3	(37,50)	0,205
	Var	17	(31,48)	16	(41,03)	5	(62,50)	
MMR durumu	pMMR	43	(81,13)	36	(92,31)	7	(87,50)	0,309
	dMMR	10	(18,87)	3	(7,69)	1	(12,50)	

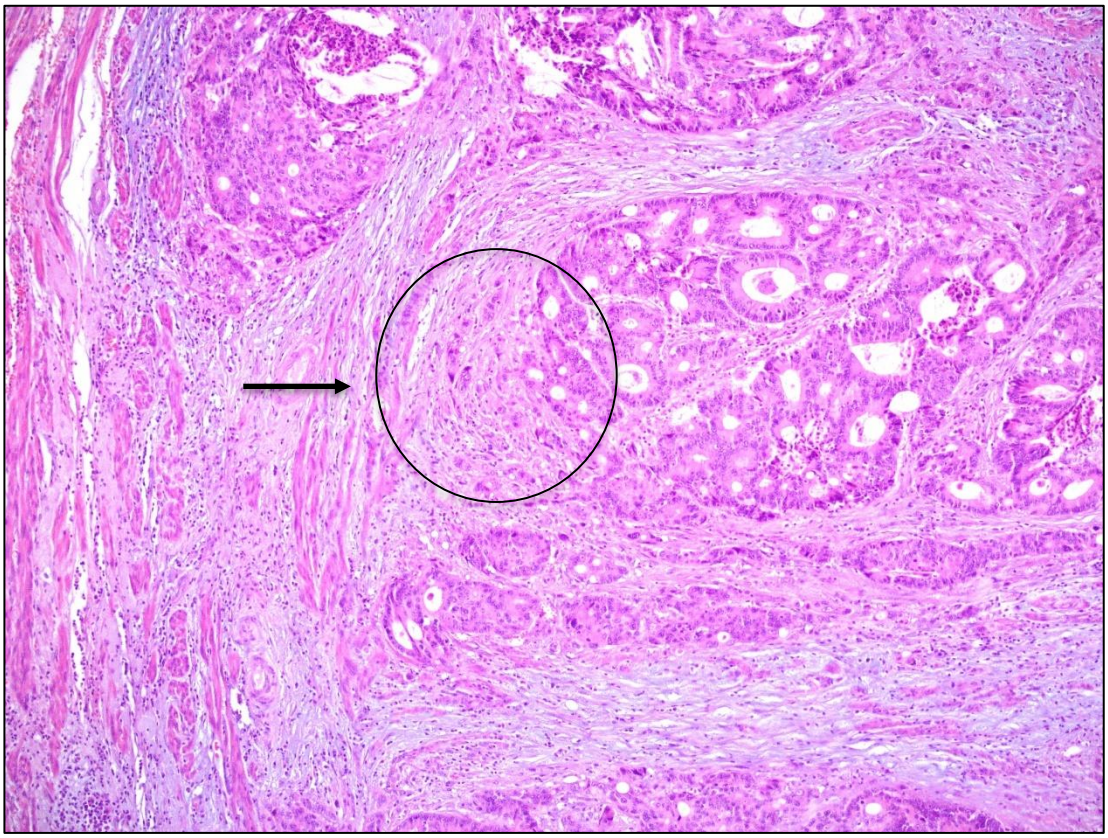
Ki-Kare Testi

Tablo 21: Desmoplastik stroma paterni ile prognostik veriler arasında anlamlı ilişki tespit edilen parametreler

		Stroma paterni					
		Matür	İntermedier	Matür	Miksoid	İntermedier	Miksoid
Lenfovasküler invazyon	Yok	0,103		**0,026**		0,600	
	Var						

Ki-Kare Testi

Tablo 22: Stroma paterni ile tomurcuklanma arasındaki korelasyon



Resim 28: Miksoid stromaya sahip tümörde izlenen peritümöral tomurcuklanma (H&E, x10).

5. Tümör tomurcuklanması ile klinikopatolojik özelliklerin karşılaştırılması

Tümör tomurcuklanması değerlendirildiğinde olguların 54'ünde (%53,47) düşük, 27'sinde (%26,73) orta ve 20'sinde (%19,8) yüksek tomurcuklanma saptanmıştır (Resim 29). Tümör tomurcuklanma derecesi ile tümör diferansiyasyonu, az diferansiye kümeler gibi prognostik parametreler ve tümör lokalizasyonu, sağkalım gibi klinik veriler ile arasındaki ilişki incelenmiştir.

Tümör tomurcuklanması ile tümör diferansiyasyonu arasında anlamlı bir ilişki (p=0,006) mevcut olup kötü diferansiye tümörlerde yüksek tomurcuklanma derecesi saptanmıştır (r=0,431) (Tablo 24). Ayrıca tümör tomurcuklanma derecesi ile stroma paterni (p<0,001), lenfovasküler invazyon (p=0,008), MMR durumu (p=0,005) ve genel sağkalım (p=0,040) analizlerinde de anlamlı ilişki izlenmiştir (Tablo 23 ve Tablo 24). Bu sonuca göre, yüksek tomurcuklanmaya sahip tümörlerde daha sık lenfovasküler invazyon varlığı mevcuttur. MMR kaybı göstermeyen tümörlerde de yüksek tomurcuklanma derecesi olduğu gözlenmiştir. Yüksek tümör tomurcuklanması kötü genel sağkalımla ilişkilidir. Diğer parametreler ile arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır (Tablo 23).

		Tomurcuklanma						p
		Düşük		Orta		Yüksek		
		n	%	n	%	n	%	
Lokalizasyon	Sağ kolon	15	(27,78)	4	(14,81)	7	(35,00)	0,259
	Sol kolon	39	(72,22)	23	(85,19)	13	(65,00)	
İnfiltrasyon Paterni	İnfiltratif	44	(81,48)	26	(96,30)	19	(95,00)	0,086
	Ekspansil	10	(18,52)	1	(3,70)	1	(5,00)	
Tümör tipi	Konvansiyonel	38	(70,37)	25	(92,59)	12	(60,00)	**0,003**
	Müsinöz	10	(18,52)	1	(3,70)	1	(5,00)	
	Serrated	1	(1,85)	1	(3,70)	3	(15,00)	
	Taşlı yüzük	3	(5,56)	0	(,00)	1	(5,00)	
	Mikropapiller	0	(,00)	0	(,00)	3	(15,00)	
	Medüller	2	(3,70)	0	(,00)	0	(,00)	
Diferansiyasyon	G1	33	(61,11)	10	(37,04)	3	(15,00)	**0,006**
	G2	13	(24,07)	15	(55,56)	12	(60,00)	
	G3	5	(9,26)	2	(7,41)	4	(20,00)	
	G4	3	(5,56)	0	(,00)	1	(5,00)	
Evre	I	3	(5,56)	0	(,00)	0	(,00)	0,446
	II	10	(18,52)	5	(18,52)	1	(5,00)	
	III	11	(20,37)	7	(25,93)	7	(35,00)	
	IV	30	(55,56)	15	(55,56)	12	(60,00)	
Lenfovasküler invazyon	Yok	23	(42,59)	8	(29,63)	1	(5,00)	**0,008**
	Var	31	(57,41)	19	(70,37)	19	(95,00)	
Perinöral invazyon	Yok	35	(64,81)	19	(70,37)	9	(45,00)	0,179
	Var	19	(35,19)	8	(29,63)	11	(55,00)	
MMR durumu	pMMR	40	(75,47)	27	(100,00)	19	(95,00)	**0,005**
	dMMR	13	(24,53)	0	(,00)	1	(5,00)	
Genel sağkalım	Sağ	43	(79,63)	20	(74,07)	10	(50,00)	**0,040**
	Ex	11	(20,37)	7	(25,93)	10	(50,00)	

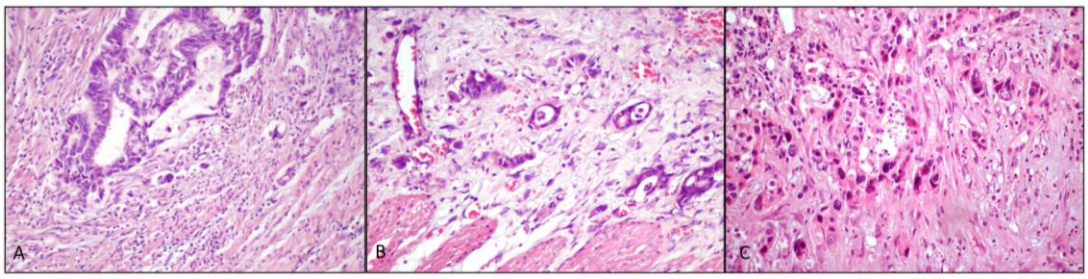
Ki-Kare Testi

Tablo 23: Tümör tomurcuklanması ile prognostik veriler arasındaki ilişki

	Tomurcuklanma	
	r	p
Diferansiyasyon	0,431	**0,006**
Stroma paterni	0,639	**<0,001**

Gamma Korelasyonu

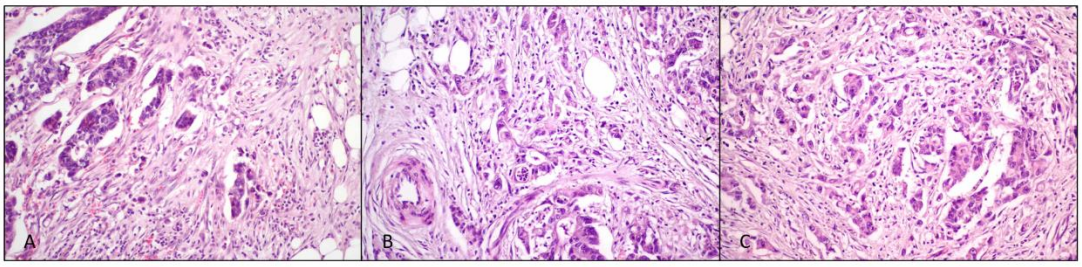
Tablo 24: Tomurcuklanma ile diferansiyasyon ve stroma paterni arasındaki korelasyon



Resim 29: Tümör tomurcuklanması (H&E, x20). A: Düşük dereceli tomurcuklanma, B: Orta dereceli tomurcuklanma, C: Yüksek dereceli tomurcuklanma.

6. Az diferansiye kümeler (ADK) ile klinikopatolojik özelliklerin karşılaştırılması

Az diferansiye kümeler incelendiğinde, düşük derecede ADK içeren 63 (%62,38), orta derecede ADK içeren 17 (%16,83), yüksek derecede ADK içeren 21 (%20,79) vaka saptanmıştır (Resim 30). ADK derecesi ile tümör tomurcuklanması ($p < 0,001$), tümör diferansiyasyonu ($p < 0,001$), tümör tipi ($p = 0,004$) ve genel sağkalım ($p = 0,043$) ile arasında anlamlı ilişki mevcuttur (Tablo 25). ADK derecesi arttıkça diferansiyonun azaldığı ($r = 0,635$) ve tomurcuklana derecesinin yükseldiği ($r = 0,664$) tespit edilmiştir (Tablo 26). Yüksek dereceli ADK en sık konvansiyonel adenokarsinomda saptanmıştır. Yüksek ve orta derecede ADK izlenen hastalarda düşük dereceye göre daha kötü genel sağkalım gözlenmiştir.



Resim 30: Az diferansiye hücre kümeleri (H&E, x20). A: Düşük dereceli ADK, B: Orta derecede ADK, C: Yüksek dereceli ADK.

		Az diferansiye kümeler/ADK						p
		Düşük		Orta		Yüksek		
		n	%	n	%	n	%	
Tümör Tomurcuklanması	Düşük	46	(73,02)	2	(11,76)	6	(28,57)	**<0,001**
	Orta	12	(19,05)	9	(52,94)	6	(28,57)	
	Yüksek	5	(7,94)	6	(35,29)	9	(42,86)	
Lokalizasyon	Sağ kolon	16	(25,40)	4	(23,53)	6	(28,57)	0,964
	Sol kolon	47	(74,60)	13	(76,47)	15	(71,43)	
Moleküler profil	Negatif	33	(52,38)	8	(47,06)	13	(61,90)	0,170
	BRAF+	5	(7,94)	2	(11,76)	4	(19,05)	
	KRAS+	24	(38,10)	6	(35,29)	2	(9,52)	
	NRAS+	1	(1,59)	1	(5,88)	2	(9,52)	
İnfiltrasyon Paterni	İnfiltratif	55	(87,30)	16	(94,12)	18	(85,71)	0,691
	Ekspansil	8	(12,70)	1	(5,88)	3	(14,29)	
Tümör tipi	Konvansiyonel	50	(79,37)	13	(76,47)	12	(57,14)	**0,004**
	Müsinöz	9	(14,29)	0	(,00)	3	(14,29)	
	Serrated	2	(3,17)	3	(17,65)	0	(,00)	
	Taşlı yüzük	2	(3,17)	0	(,00)	2	(9,52)	
	Mikropapiller	0	(,00)	1	(5,88)	2	(9,52)	
	Medüller	0	(,00)	0	(,00)	2	(9,52)	
Diferansiyasyon	G1	38	(60,32)	6	(35,29)	2	(9,52)	**<0,001**
	G2	22	(34,92)	9	(52,94)	9	(42,86)	
	G3	3	(4,76)	2	(11,76)	6	(28,57)	
	G4	0	(,00)	0	(,00)	4	(19,05)	
Evre	I	3	(4,76)	0	(,00)	0	(,00)	0,202
	II	14	(22,22)	1	(5,88)	1	(4,76)	
	III	12	(19,05)	6	(35,29)	7	(33,33)	
	IV	34	(53,97)	10	(58,82)	13	(61,90)	
Lenfovasküler invazyon	Yok	24	(38,10)	4	(23,53)	4	(19,05)	0,195
	Var	39	(61,90)	13	(76,47)	17	(80,95)	
Perinöral invazyon	Yok	41	(65,08)	12	(70,59)	10	(47,62)	0,607
	Var	22	(34,92)	5	(29,41)	11	(52,38)	
MMR durumu	pMMR	53	(84,13)	15	(88,24)	19	(90,48)	0,738
	dMMR	10	(15,87)	2	(11,76)	2	(9,52)	
Genel sağkalım	Sağ	51	(80,95)	10	(58,82)	12	(57,14)	**0,043**
	Ex	12	(19,05)	7	(41,18)	9	(42,86)	

Ki-Kare Testi

Tablo 25: Az diferansiye kümeler ile prognostik veriler arasındaki ilişki

	Az diferansiye kümeler	
	r	p
Diferansiyasyon	0,635	**<0,001**
Tümör Tomurcuklanması	0,664	**<0,001**

Gamma Korelasyonu

Tablo 26: Az diferansiye kümeler ile diferansiyasyon ve tomurcuklanma ile korelasyonu

7. Tümör lokalizasyonu ile klinikopatolojik özelliklerin karşılaştırılması

Çalışmamıza dahil edilen olguların 26'sı (%24,75) sağ kolon, 75'i (%74,25'i) sol kolon yerleşimlidir. Tümör lokalizasyonu ile maspin ekspresyonu (p=0,022), moleküler özellikler (p=0,024), tümör subtipi (p=0,005), MMR profili (p=0,004) ve genel sağkalım (p=0,006) arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (Tablo 27). Sağ kolonda serrated adenokarsinom ve BRAF mutasyonu sıklığının sol kolona göre belirgin yüksek olduğu tespit edilmiştir. dMMR tümörlerin sıklıkla sağ kolon yerleşimli olduğu saptanmıştır. Sol kolon tümörlerinde genel sağkalımın sağ kolona göre daha düşük olduğu izlenmiştir (Şekil 21).

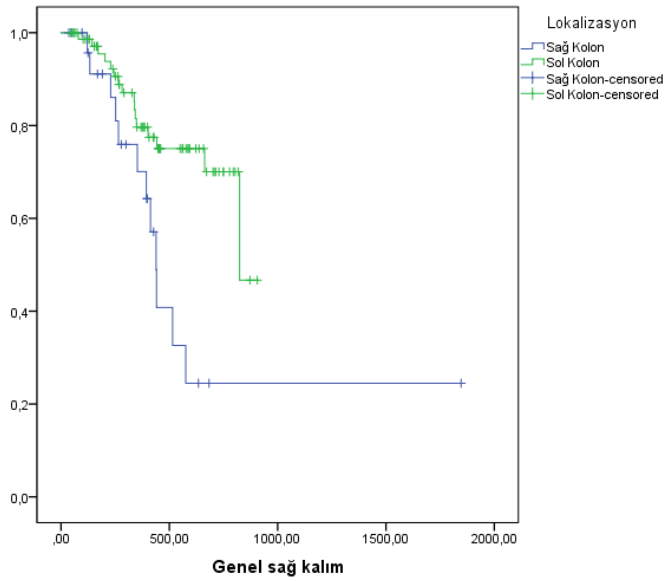
		Lokalizasyon				p
		Sağ Kolon		Sol Kolon		
		n	%	n	%	
Maspin	Mikst	7	(28,00)	5	(6,76)	**0,022**
	Neg	10	(40,00)	47	(63,51)	
	Sitoplazmik	4	(16,00)	7	(9,46)	
	Nükleer	4	(16,00)	15	(20,27)	
LOX Tümör	Düşük	14	(56,00)	40	(54,05)	0,866
	Yüksek	11	(44,00)	34	(45,95)	
LOX Stroma	Negatif	7	(28,00)	28	(38,36)	0,480
	1+	8	(32,00)	27	(36,99)	
	2+	7	(28,00)	14	(19,18)	
	3+	3	(12,00)	4	(5,48)	
Desmoplastik Stroma Paterni	Matür	14	(53,85)	40	(53,33)	0,998
	Miksoid	10	(38,46)	29	(38,67)	
	İntermedier	2	(7,69)	6	(8,00)	
Tümör Tomurcuklanması	Düşük	15	(57,69)	39	(52,00)	0,259
	Orta	4	(15,38)	23	(30,67)	
	Yüksek	7	(26,92)	13	(17,33)	
Moleküler profil	Negatif	8	(30,77)	46	(61,33)	**0,024**
	BRAF+	6	(23,08)	5	(6,67)	
	KRAS+	11	(42,31)	21	(28,00)	
	NRAS+	1	(3,85)	3	(4,00)	
Tümör tipi	Konvansiyonel	13	(50,00)	62	(82,67)	**0,005**
	Müsinöz	4	(15,38)	8	(10,67)	
	Serrated	4	(15,38)	1	(1,33)	
	Taşlı yüzük	3	(11,54)	1	(1,33)	
	Mikropapiller	1	(3,85)	2	(2,67)	
	Medüller	1	(3,85)	1	(1,33)	
Diferansiyasyon	G1	9	(34,62)	37	(49,33)	0,108
	G2	11	(42,31)	29	(38,67)	
	G3	3	(11,54)	8	(10,67)	
	G4	3	(11,54)	1	(1,33)	
Evre	I	1	(3,85)	2	(2,67)	0,367
	II	6	(23,08)	10	(13,33)	
	III	5	(19,23)	20	(26,67)	
	IV	14	(53,85)	43	(57,33)	
Lenfovasküler invazyon	Yok	7	(26,92)	25	(33,33)	0,545
	Var	19	(73,08)	50	(66,67)	
Perinöral invazyon	Yok	14	(53,85)	49	(65,33)	0,297
	Var	12	(46,15)	26	(34,67)	
MMR durumu	pMMR	18	(69,23)	68	(91,89)	**0,004**
	dMMR	8	(30,77)	6	(8,11)	

Ki-Kare Testi

Tablo 27: Tümör lokalizasyonu ile prognostik parametreler arasındaki ilişki

Lokalizasyon	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		p
			Lower Bound	Upper Bound	
Sağ Kolon	720,007	172,056	397,627	1072,087	**0,006**
Sol Kolon	734,857	38,718	644,120	795,894	
Overall	1079,402	152,149	781,190	1377,614	

Tablo 28: Tümör lokalizasyonu ile genel sağkalım arasındaki ilişki



Şekil 20: Tümör lokalizasyonu ile genel sağkalım arasındaki ilişki

TARTIŞMA

Birçok solid tümörde olduğu gibi kolon karsinomlarında da metastatik hastalık, mortalite ve morbiditenin önemli bir nedenidir [102]. Aynı evrede olan vakaların farklı seyretmesi, tedavi direnci ve hastalığın yönetimi açısından metastazları veya prognozu öngörebilen yeni prognostik parametreler, oldukça kritik bir öneme sahiptir.

Tümör progresyonu kompleks bir süreç olup hem neoplastik hücreler hem de tümör çevresindeki stroma bu süreçte aktif rol oynamaktadır. Tümörün metastatik potansiyel kazanmasında epitelyal mezenkimal transizyon oldukça önemli bir basamaktır. Tümör tomurcuklanması, son yıllarda önem kazanan bir prognostik parametre olup bunun epitelyal mezenkimal transizyonun histolojik bulgusu olduğu düşünülmektedir [51].

Yüksek tomurcuklanma derecesi ile düşük sağkalım arasında ilişki olduğunu ortaya koyan az sayıda çalışma bulunmaktadır [50, 57]. Bizim çalışmamızda, genel sağkalım ile tümör tomurcuklanması arasında anlamlı bir ilişki izlenmiş olup yüksek tomurcuklanma izlenen olgularda sağkalımın azaldığı saptanmıştır. Kötü diferansiye tümörlerde yüksek tümör tomurcuklanma derecesinin varlığını ortaya koyan çalışmalara benzer olarak [46, 49] bizim çalışmamızda da tümör tomurcuklanması ile tümör diferansiyasyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Yüksek derecede tomurcuklanma gösteren tümörlerde sık lenfovasküler invazyon varlığını gösteren çalışmalara benzer olarak [46] bizim çalışmamızda da tümör tomurcuklanması ile lenfovasküler invazyon varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Bu bulgular, tümör tomurcuklanmasının tümörün agresifliğini göstermede başarılı olduğunu desteklemekte olup mevcut prognostik parametreler ile uyumludur.

2016 yılında Uluslararası Tümör Tomurcuklanması Konsensüs Konferansı (ITBCC) kararlarında, bazı tümör tiplerinde peritümöral tomurcuklanmayı değerlendirirken tümör histolojisine özgü bulgular ile tomurcuklanmanın ayrımı konusuna dikkat edilmesi gerektiği önemle vurgulanmaktadır. Örneğin müsinöz ve taşlı yüzük hücreli karsinomlarda müsin gölcükleri içerisindeki alanların değerlendirmeye alınmaması önerilmektedir. ITBCC, medüller karsinomlarda, inflamasyona bağlı olarak tümör hücrelerinin ayrışması gerçek tümör tomurcuklarından ayırt edilemeyebileceğine ve mikropapiller karsinomda, kötü diferansiye kümelerin tümör tomurcuğu sayımına dahil edilmemesi gerektiğine dikkat çekmektedir [48]. Tümör tomurcuklanması ile tümör subtipi arasındaki ilişkiyi değerlendiren az sayıda araştırmada, medüller subtip ile tümör tomurcuklanması arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır [103]. Tüm bu öneriler eşliğinde yapılan değerlendirmeler sonucunda bizim çalışmamızda tümör tomurcuklanması ile tümör subtipi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Bu bulguya göre yüksek dereceli tümör tomurcuklanması içeren tümörlerin büyük kısmının konvansiyonel tip adenokarsinom olduğu izlenmiştir. Ayrıca mikropapiller subtipteki karsinomların tamamında yüksek dereceli tümör tomurcuklanması gözlenirken medüller karsinomların tamamında düşük dereceli tümör tomurcuklanması izlenmiştir. Bu sonuçlar mikropapiller subtipin agresif gidişini ve medüller subtipin ekspansil büyüme paternini destekler niteliktedir.

Tümör gelişiminde rol oynayan karsinogenez basamaklarındaki değişiklikler tümör davranışını farklılaştırılabilir. Örneğin sporadik kanserlerin gelişiminde sıklıkla rol alan APC mutasyonu ile ilişkili Wnt yolağının aktivasyonu izlenmektedir. Bu aktivasyonun, pMMR tümörlerdeki tümör tomurcuklanma mekanizmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Lugli ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada MMR korunmuş tümörlerde daha fazla tümör tomurcuklanması olduğu saptanmıştır [49]. Bizim çalışmamızda da MMR durumu ile tomurcuklanma derecesi arasında anlamlı bir ilişki saptanmış olup MMR ekspresyonu korunmuş olgularda daha yüksek tomurcuklanma izlenmiştir.

Mikrosatellit instabil veya MMR kaybı olan tümörler, sıklıkla sağ kolon tümörleri olup [36, 73] müsinöz histoloji, kötü diferansiyasyon, Crohn benzeri reaksiyon varlığı[73], tümörü infiltre eden lenfositler [69, 70, 73, 74, 104, 105], ekspansil büyüme paterni [106, 107] gibi belirgin histolojik özelliklere sahiptir. Bizim çalışmamızda da MMR ekspresyon kaybı gösteren tümörler de sıklıkla sağ kolon yerleşimli olup çoğunlukla ekspansil büyüme paterni göstermektedir. Ayrıca TİL ve Crohn benzeri reaksiyon dMMR tümörlerde daha sık tespit edilmiştir. Bu bulgular literatür ile uyumlu niteliktedir.

MSİ durumu aynı zamanda evre ve dolayısıyla prognoz ile de ilişkilidir. Evre II hastalarda MSI-H olguların daha sık olduğu bildirilen çalışmaya benzer olarak [107] bizim çalışmamızda da MMR durumu ile pTNM evresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. MMR ekspresyon profilinin evre ile korelasyonu nedeniyle prognozu ile ilişkisi, önceki araştırmaları desteklemektedir.

TİL varlığı MMR durumunun yanı sıra sağkalım ve evre ile de ilişkilidir [69, 71]. Rozek ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada 2 veya daha fazla lenfosit içeren tümörler, kolorektal karsinoma özgü sağkalım ve genel sağkalımda artış ile ilişkilendirilmiş ve her bir TİL varlığının ölüm riskini %3-4 azalttığı belirtilmiştir [74]. González ve arkadaşları tarafından çalışmada TİL varlığı; düşük tomurcuklanma derecesi, non-miksoid stroma, perinöral invazyon yokluğu ve MMR proteinlerin kaybı ile ilişkilendirilmiştir [108]. Bizim çalışmamızda TİL varlığı ile progresyonsuz sağkalım, pTNM evresi ve Crohn benzeri reaksiyon varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. TİL saptanan olgular genellikle erken evre kanserler olup TİL varlığında progresyonsuz sağkalımda artış izlenmiştir. TİL ile stroma paterni, tümör tomurcuklanması ve perinöral invazyon varlığı arasında ilişki saptanmamıştır. pMMR tümörlerde yüksek tomurcuklanma izlenmesi ve bu tümörlerde TİL varlığının daha az olması nedeniyle TİL yokluğunun yüksek tomurcuklanma derecesi ile ilişkili olduğu düşünülebilir. Bu bulgular literatür ile uyumlu olarak TİL varlığının MMR durumu yanı sıra sağkalım için prognostik bir belirteç olduğunu destekler niteliktedir.

Kolorektal karsinomlarda, tümör tomurcuklanması bağımsız bir prognostik faktör olarak kabul edilmiştir. Tümör tomurcuklanması çoğunlukla hematoksilen eozin kesitlerde değerlendirilse de bazen CKAE1/AE3, CK20 veya CK8-18 gibi immünohistokimyasal yöntemlerde kullanılabilmektedir. Nöroendokrin farklılaşma gösteren, EMT içeren veya BRAF mutasyonuna sahip mikrosatellit instabilite saptanan kolorektal karsinomlarda az diferansiye hücrelerde CK20 ekspresyonu azalabilir hatta kaybolabilir [92]. Bu nedenle EMT nin histolojik bir yansıması olduğu bilinen tümör tomurcuklanmasını gösteren sitokeratin dışından başka belirteçlere ihtiyaç vardır. Banias ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, tümör tomurcuklanmasının değerlendirilmesinde maspin proteininin immünhistokimyasal bir belirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür [109]. Märkl ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada ise maspinin izole hücreleri ve tümör hücre kümelerini ortaya çıkarırken apoptotik hücreleri işaretlemediği, maspin ile sitokeratin kokteyli arasında iyi konkordans olduğu ortaya konmuştur [6].

Tümör tomurcuklanması ve tümörün biyolojik davranışına yönelik immünohistokimyasal olarak maspin ekspresyonunu değerlendirdiğimiz çalışmamızda, maspin ekspresyonu ile tomurcuklanma derecesi, lenfovasküler invazyon varlığı, hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Nükleer maspin ekspresyonu olan olgularda negatif olgulara göre yüksek derecelerde tümör tomurcuklanması gözlenmiştir.

Kolorektal karsinomlarda epitelyal mezenkimal transizyon, temel olarak WNT/Beta-catenin yolağında izlenir. Bu yolak ile mena (memeli Ena homoloğu), arilsülfataz B (ARS-B) veya maspin proteinleri etkileşime girebilmektedir. Öte yandan, ARS-B geni, kondroitin 4-sülfat yoluyla geleneksel Wnt sinyal yolu dışında EMT fenomenini inhibe edebilir. Kovacs ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, ARS-B gen seviyesi düşük bulunan tümör hücrelerinde, ARS-B/maspin pozitifliği ve yüksek dereceli tümör tomurcuklanması saptanmış ve bu durum EMT'nin muhtemel bir göstergesi kabul edilmiştir [110].

Maspin, tümör supresör bir protein olduğu gibi tümörün histolojisi, lokalizasyonu veya hücredeki yerleşim yerine göre onkojenik aktivite de gösterebilir [111]. Maspin'in hücredeki lokalizasyonlarına göre farklı fonksiyonları bulunur [89]. Örneğin, hücre dışına sekrete edildiğinde ve hücre yüzeyindeyken maspinin ürokinaz plasminojen aktivatörünü (uPA) inhibe ettiği bilinmektedir [91]. Tümör tomurcuklarında tipik olarak ürokinaz plazminojen aktivatörü ve matriks metalloproteinaz gibi hücre dışı matriksin parçalanmasında görev alan enzimleri aktif durumdadır [112]. Maspinin nükleusa translokasyonu sonucunda, hücre yüzeyindeki uPA inhibisyonu fonksiyonunun azalmasına bağlı olarak EMT'ye ve dolayısıyla tümör tomurcuklanmasına katkı sağlıyor olabilir.

Sakabe ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada sitoplazmik maspin ekspresyonunun artan seviyesinin, SRGN/TGFβ2 iletim aksı boyunca EMT'yi kolaylaştırarak hücre invazyonunu desteklediği düşünülmüştür [88]. SRGN ile yapılan kolon tümörleri çalışmasında ise SRGN'nin hipoksi ile ilişkili bir molekül olduğu belirtilmiş olup kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur [94]

Tomurcuklanma ve maspin ekspresyonunu inceleyen Banias ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada, tümörler moleküler olarak sınıflandırılmış ve mezenkimal subtipin en kötü prognoza sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu grupta, yüksek tümör tomurcuklanmasının ve maspinin tümör tomurcuklarında sitoplazmadan nükleusa translokasyonun daha belirgin olduğu ve nükleer Maspin ekspresyonunun yüksek dereceli tomurcuklanma ile ilişkili olduğu saptanmıştır [109, 113]. Maspin ile tümör tomurcuklanmasını inceleyen birçok çalışmada maspinin yüksek tomurcuklanma derecesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [6, 114-117].

Gurzu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yüksek dereceli displastik poliplerde ve agresif KRK'da nükleer paternin baskın olduğu, nükleer paternin malign transformasyon sırasında kaybolabileceği, ancak invaziv sınırda ve tümör tomurcuklanma alanlarında yeniden eksprese edilebileceği savunulmaktadır [114]. Maspinin sadece tümör tomurcukları olarak adlandırılan diskohezif hücreleri değil, aynı zamanda tomurcuklanma noktasında tümör-stroma etkileşimi içerisinde bulunan tümör hücrelerinin nükleusunda da eksprese olduğunu belirten kişisel gözleme dayanan sonuçlar da bulunmaktadır [92].

Bizim çalışmamızda da maspinin sadece tomurcuklanma alanındaki hücrelerde değil bu alandaki tümör-stroma etkileşimi içerisinde bulunan tümör hücrelerinin nükleusunda da eksprese olduğu gözlenmiş olup sözkonusu bulgular ile uyumlu niteliktedir.

Tümörün biyolojik davranışını yansıtan histopatolojik parametreler ile maspin ekspresyonunu değerlendirdiğimiz çalışmamızda maspin ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon durumu ve tümör lokalizasyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Mikst ekpsresyon izlenen olguların tamamında lenfovasküler invazyon izlenmiştir. Mikst ve sitoplazmik ekspresyon sağ kolonda baskın iken nükleer ekspresyon sol kolon tümörlerinde daha sık izlenmiştir. Diğer histopatolojik parametreler arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Kim ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada nükleer maspin ekspresyonu ile tümörün sağ kolon yerleşimli olması, ileri evre olması, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, tümör tomurcuklanması ve peritümöral lenfoid reaksiyonun olmaması arasında ilişki bulunduğu bildirilmiştir [116]. Kolorektal kanserlerde maspin ekspresyonunu değerlendiren çalışmaların çoğunda maspin ekspresyonunun sıklıkla sağ kolonda izlendiği bildirilmiştir [87, 118].

Kolorektal karsinomlarda en sık izlenen moleküler yolak kromozomal instabilite yolağı olup bu tümörler genellikle anöploidi, büyük delesyonlar ve amplifikasyon içeren geniş genomik değişikliklerle karakterizedir. Bu tümörlerin mikrosatellit instabilite içermesi beklenmez. MSS/MSI-L kolorektal karsinomlarda en yaygın delesyona uğrayan kromozomal bölgelerden biri, DCC ve DPC4/SMAD gibi genleri içeren 18q21'dir [119]. Maspin geni de 18q21 üzerinde yer almakta olup ve bu bölgenin delesyonu, MSS/MSI-L tümörlerinde maspin ekspresyonunun azalmasına neden olabilir. MSS/MSI-L tümörlerde maspin geninin heterozigositesinin kaybı veya epigenetik promotör hipermetilasyonu, maspin ekspresyonunun azalmasının olası nedenleri arasında yer alabilir [120].

Maspin ekspresyonu ile mikrosatellit instabilite durumunu karşılaştıran çalışmalarda MSI-H tümörlerde maspin ekspresyonunun arttığı saptanmıştır [83, 120]. Gurzu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada distal kolonda yerleşimli MSS vakalarında maspinin sitoplazmik ekspresyonu; proksimal yerleşimli, kötü diferansiye veya müsinöz tip MSI vakalarında daha sıklıkla maspinin mikst ekspresyonu saptanmıştır [114]. Kim ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada ise maspin ekspresyonunun mikrosatellit instabilite durumundan ziyade CpG adası metilasyon fenotipi ile ilişkili olduğu bulunmuştur [116].

MMR durumu ile maspin ekspresyonu arasındaki ilişkiyi değerlendirdiğimiz çalışmamızda bu iki parametre arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ayrıca maspin ekspresyonu ile moleküler profil arasında da korelasyon bulunamamıştır. Bu sonuç, çalışmaya dahil edilen ve MMR ekspresyon kaybı izlenen vaka sayısının az olması ile açıklanabilir ve bu durum çalışmanın kısıtlığının bir parçası olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamızda ayrıca sitoplazmik maspin ekspresyonunun hem hastalıksız sağkalımda hem de genel sağkalımda azalma ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Kolorektal karsinomlarda yapılan çalışmalarda, Maspin ile prognoz arasındaki ilişkisi açısından farklı sonuçlara ulaşılmıştır (Tablo 29 ve Tablo 30) [92]. Maspin'in yüksek sitoplazmik ekspresyonu ile kötü prognoz arasında ilişki saptanmış ve güçlü maspin ekspresyonu, hastalıksız ve genel sağkalım sürelerinde azalma ile ilişkilendirilmiştir [111, 116, 121]. Karaciğer metastazı olan hastalarda rezeksiyon sonrası erken nüks ile maspin ekspresyonu arasında ilişki olduğunu belirten çalışmada maspinin kolorektal karsinoma spesifik sağkalım için bağımsız bir prediktif faktör olduğu bildirilmiştir [117].

Tam tersine Maspin ekspresyonu ile prognoz arasındaki ilişkiyi değerlendiren ve iyi prognoz ile ilişkili olduğunu belirten az sayıda araştırma mevcuttur. Tanaka ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Maspin ekspresyonundaki artışın, erken evre MSI kolorektal kanser için daha uzun genel ve hastalıksız sağkalım ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu araştırmada, maspinin risk değerlendirmesinin sadece erken evre ve mikrosatellit instabilitesi olan vakalarda kullanılabileceği savunulmaktadır [83]. Gurzu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, maspin ekspresyonunun lokalizasyona göre prognoza olan etkisinin farklı olduğu ve maspinin sitoplazmik ekspresyonunun iyi prognozla, maspinin nükleer ekspresyonunun kötü sağkalımla ilişkili olduğu vurgulanmıştır [114]. Maspin ekspresyonunda azalma veya total kayıp ile tümör nüksü gelişim riskinde artış, nükssüz sağkalım ve genel sağkalımda azalma ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [87].

Kolorektal karsinomlarda, sitoplazmik maspin pozitifliği çoğunlukla p53 negatifliği ile ilişkilidir; maspin negatif vakaların tamamında p53 ekspresyonu izlenmiştir. Bu sonuç, Maspin'in p53'ün düzenleyici yolağındaki hedeflerden biri olabileceğini düşündürmektedir [122]. Maspin/p53 nükleer pozitifliğini, MSI-H karsinomlar içerisinde 5-FU tedavisinden fayda görebileceği grubu seçmek için kullanılabileceği de öne sürülmektedir [123]. Maspin pozitifliğinin 5-FU tedavisinden fayda potansiyeli temsil ettiğini düşünen çalışmalar yanısıra [123, 124] tedavi direnci ile ilişkili olduğunu öne süren araştırmalar da mevcuttur [84, 111].

Dirençli metastatik hastalığı olan hastalarda hedefe yönelik olarak anti-EGFR antikorları kullanılmakta olup KRAS mutasyonlarını içermeyen ileri evre kolorektal karsinomların tedavisinde oldukça etkili olduğu düşünülmektedir. EGFR sinyal yolağı aktivasyonunun, maspin fosforilasyonunu arttırarak daha fazla nükleer translokasyona sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, nükleer maspin ekspresyonunun, anti-EGFR tedavisine direncin bir göstergesi olabileceği sonucuna varılabileceği savunulmaktadır. Bu hipotez, küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında yapılan deneysel bir çalışmaya dayalı olarak varsayılmıştır ve henüz kolorektal karsinomlarda çalışılmamıştır [92].

Yazar ve yıl	Çalışmaya dahil edilen vakalar	Sitoplazmik ekspresyon	Nükleer ekspresyon	Prognostik ve prediktif faktör
TÜMÖR SUPRESÖR FONKSİYONU				
Boltze ve ark, 2005[87]	Evre I- IV, 280 kolon kanseri TMA	*%69 vakada sit veya nükleer ekspresyon *Ekspresyon kaybı; sol kolon, yüksek derece, metastatik tümör	Belirtilmemiş	*Sit ekspresyon, supresif özellik ve iyi prognoz *Ekspresyon kaybı kısa genel sağkalım
Bettstetter ve ark, 2005[120]	159 MSS ve 41 MSI, Kolon ve rektum TMA	* %72 MSS/MSI-L ve %78 MSI-H, *İyi diferansiye karsinomlarda	* %50 MSS/MSI-L ve %73 MSI-H *Yüksek dereceli karsinomlarda, özellikle invaziv sınırda	*Sit ekspresyon, tümör supresif özellik *Nükleer ekspresyon, tümör progresyonu
Markl ve ark[6], 2010	156 kolon ve rektum Evre I-II TMA	*%72 *Yüksek tümör derecesi ile korele	*%42 *Yüksek tümör tomurcuklanması ile korele	*Sit ekspresyon, tümör supresif özellik *pT3/Evre II izole nükleer eks kötü genel sağkalım *Maspin negatif vakalarda kötü genel sağkalım
Gurzu ve ark, 2013[114]	121 kolon ve rektum 43 Evre I-II 78 Evre III-IV Tam kesit	*%44 *Sit predominans düşük tomurcuklanma (5>) derecesi ve p53 negatifliği ile korele * Distal kolon ağırlıklı	*%24 nükleer predominans, %23 ü sit pozitif ile ilişkili mikst ekspresyon(MSI vakalarının %40 ı) * Nükleer predominans, p53 pozitif yüksek anjiyojenik tümör	*Sit veya mikst ekspresyon iyi prognoz *Nükleer predominans veya total kayıp, düşük genel sağkalım *Mikst ekspresyon olan MSI iyi prognoz
Banias ve ark, 2020[109]	112 kolon-rektum Evre I-III 12 MSI, 100 MSS Tam kesit	*Tümör korunda %52,7, tomurcuklarda %19,6 *LNR <0.15 olan düşük dereceli tomurcuklanan metastatik olmayan epitel tipi karsinomlarda daha sık	*Tümör korunda %27,7, tomurcuklarda %60,8 *Yüksek tomurcuklanma *Lenf nodu metastazı *Mezenkimal tip karsinomlarda	*Sit ekspresyon iyi prognoz fakat bağımsız prognostik değeri yok
Tanaka ve ark, 2020 [83]	743 kolon 628 Evre I-II 115 Evre III-IV TMA	* İleri evre ve MSI durumu ile korele - %16,4 vs %57,4 erken vs ileri evre; - %22,3 vs. %13,9 MSI vs. MSS	*MSI durumu ile korele -%22,1 vs. %22,6 Erken vs ileri evre; - %36,9 vs. %19,3% MSI vs. MSS	*Erken evre MSI olan kolorektal karsinomlarda iyi prognoz ile ilişkili

Tablo 29: Kolorektal karsinomlarda, Maspin'in tümör süpresör fonksiyonunu destekler nitelikte sonuçlara ulaşan çalışmalar [92].

Yazar ve yıl	Çalışmaya dahil edilen vakalar	Sitoplazmik ekspresyon	Nükleer ekspresyon	Prognostik ve prediktif faktör
KÖTÜ PROGNOZ İLE İŞİKİLİ				
Dietmaier ve ark, 2006[124]	172 kolon kanseri, Evre III, 5-FU tedavisi öncesi ve sonrası	*%71,5 * Korelasyon bulunamamış	*%52,3 *MSS olgularında ve yüksek dereceli karsinomlarda artmış	*Nükleer ekspresyon MSS olgularında artmış *Genel sağkalım için bağımsız kötü prognostik faktör *5-FU tedavisi için prediktif faktör
Umekita ve ark, 2006[115]	104 kolon ve rektum Evre I-III Tam kesit	*%66 *Yüksek tümör evresi ve yüksek tomurcuklanma(9<) ile korele	Belirtilmemiş	*Sitoplazmik ekspresyon agresif özellikler ile ilişkili *Genel sağkalım için prediktif değil
Fung ve ark, 2010	450 kolon Evre III TMA	*%80 *Sağ kolon ve yüksek dereceli tümörler ile korele	*%79 *En az 4 metastatik lenf nodu olan sağ kolon ve yüksek dereceli tümörler ile korele	Bağımsız prognostik faktör değil
Hestetun ve ark, 2010[84]	380 kolon ve rektum Evre II-III KT öncesi ve sonrası	*%23	*%99 * Kolon kanserlerinde KT sonrasında artış	*Kolon kanserleri için KT sonrası nükleer ekspresyonda artış ve KT rezistans *Düşük hastalıksız sağkalım *Rektal karsinomlar için bağımsız prognostik faktör değil
Pasz-Walczak ve ark, 2010[121]	102 kolon ve rektum Evre I-IV Tam kesit	*%88 *Yüksek tümör derecesi * İleri evre *Metastaz varlığı ile korele	*%58,82 *Korelasyon bulunamamış	*Sit ekspresyon kötü prognoz ile ilişkili
Baek ve ark, 2014 [111]	377 kolon 147 EvreI- II 230 Evre III-IV	*Yüksek tümör derecesi * İleri evre *Lenf nodu metastazı *Yüksek tomurcuklanma ile korele -özellikle nükleer pozitiflik ile ilişkili ise-	*Sitoplazmik ekspresyon ile korele ve sağ kolonda daha fazla	* Ekspresyonda artış hastalıksız sağkalımda ve genel sağkalımda azalma * CEA düzeyleri ile ilişki
Snoeren ve ark., 2013 [117]	419 kolon-rektum 243 Evre II 166 Evre III KT öncesi ve sonrası TMA	*Sağ kolon *Yüksek derece *Müsinöz diferansiyasyon *MSI durumu -özellikle nükleer pozitiflik ile ilişkili ise-	%0,95	*Mikst ekspresyon, Evre II-IV hastalarda; rekürrens, lenfatik yayılım ve hastalıksız sağkalım için bağımsız prediktif faktör *Evre II de değil
Kim ve ark, 2015 [116]	216 MSI-H karsinom 139 Evre I-II 77 Evre II-IV TMA	Belirtilmemiş	*%51 * CIMP-H durumu, MLH-1 metilasyonu, ileri evre, metastaz durumu, yüksek tomurcuklanma ile ilişkili	*Nükleer ekspresyon kötü hastalıksız sağkalım ile ilişkili fakat bağımsız prognostik değeri yok

Tablo 30: Kolorektal karsinomlarda, Maspin ile kötü prognoz arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmalar [92].

Tümör tomurcuklanması, tümörün invaziv kenarında izlenen tek hücre veya 4 hücre grubundan az tümör hücreleri olarak tanımlanırken az diferansiye kümeler 5 tümör hücresinden fazla ve gland oluşturmayan hücre kümeleri olarak tanımlanmakta olup kötü prognostik faktör olduğu düşünülmektedir [4]. Kolorektal kanserlerde tümör dokusundaki az diferansiye neoplastik hücre kümelerinin (poorly differentiated clusters-PDC) sayımına dayanan yeni bir derecelendirme sisteminin prognostik değeri ortaya koyan çalışmalarda ADK derecesi ile tümör invazyon derinliği (pT evresi) , pozitif lenf nodu sayısı (pN evresi) , AJCC evresi, kötü diferansiyasyon ve BRAF mutasyonu ile ilişkili bulunmuştur [54-57] Ueno ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada az diferansiye tümör komponenti değerlendirerek yeni bir derecelendirme sistemi önerilmiş ve bu sisteme göre az diferansiye komponentin sağkalımda azalmaya sebep olduğu belirtilmiştir [56]. Bizim çalışmamızda az diferansiye kümelerin derecesi ile tümör diferansiyasyonu, tümör tomurcuklanması ve genel sağkalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Yüksek derecede ADK içeren tümörlerde yüksek tümör tomurcuklanması izlendiği tespit edilmiştir. ADK derecesi arttıkça diferansiyasyonun azaldığı saptanmıştır. Yüksek ve orta derecede ADK saptanan hastalarda genel sağkalımda azalma izlenmiştir. Bulgular tümör progresyonunu yansıtmada tümör tomurcuklanması gibi ADK derecesinin de değerlendirilmesinin faydalı olabileceğini destekler niteliktedir.

Son zamanlarda prognozu tayin etmek için tümör mikroçevresinin ve peritümoral stromanın incelendiği birçok araştırma bulunmaktadır [8, 58-62]. Tümör stromasının histolojik olarak kategorizasyonu, ilk olarak Ueno ve arkadaşları tarafından yapılmış ve rektum kanseri hastalarında postoperatif sağkalımı başarılı bir şekilde temsil ettiği gösterilmiştir [61]. Yapılan araştırmalarda stroma kategorizasyonu sırasıyla matür, intermediate ve immatür olarak tarif edilmiş olup matür stromanın iyi prognozla; miksoid ve intermediate stromanın kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir [8, 58, 60, 61]. Tümör çevresi stroma, tümör progresyonuna katkısına ek olarak tedavi etkinliğinde de oldukça önemli bir yere sahiptir. Tümör stroması birçok mekanizma ile tedavi direncini oluşturur [64]. Tümör stroma paternini inceleyen araştırmalarda daha immatür stromaya sahip tümörlerde daha yüksek tomurcuklanma ve daha sık lenfovasküler invazyon saptanmıştır. Ayrıca tümör diferansiyasyonu ile stroma arasında ilişki mevcut olup kötü diferansiye tümörlerde daha immatür stroma varlığı gözlenmiştir [8, 58, 60]. Çalışmamızda stromanın matürasyon derecesi ile prognostik faktörleri karşılaştırdığımızda, tümör tomurcuklanması ve lenfovasküler invazyon varlığı ile stroma özellikleri arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Yüksek tomurcuklanma saptanan olgularda daha immatür stroma olduğu izlenmiştir. Ayrıca daha immatür stromaya sahip tümörlerde daha sık lenfovasküler invazyon varlığı mevcuttur. Bu bulgu, tomurcuklanma ile ilişkisi nedeniyle epitelyal mezenkimal transizyonda stromanın aktif rolünü destekler niteliktedir. Bu nedenle stroma paterninin prognostik bir parametre olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Ayrıca stromayı hedefleyen medikal ajanların tümör ilerleyişinde aktif rol alan stroma komponentini etkileyerek progresyonu azaltabileceği öngörülmektedir

Tümör stromasında LOX ekspresyonu ile histopatolojik ve prognostik parametreleri karşılaştırdığımız çalışmamızda tümör stromasındaki LOX ekspresyonu ile tümör tomurcuklanması arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Stromadaki LOX ekspresyonu yüksek olan tümörlerde yüksek tomurcuklanma derecesi izlenmiştir. Bu bulgu, LOX ekspresyonu ile EMT arasındaki ilişkiyi destekler niteliktedir. Literatürde, kolon kanserlerinde tümör stromasındaki LOX ekspresyonu ile tomurcuklanma arasındaki ilişkiyi değerlendiren çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Tümör progresyonu oldukça kompleks bir süreç olup hem neoplastik hücreler hem de tümör çevresindeki stroma bu süreçte aktif rol oynamaktadır. Tümör çevresindeki fibroblastlar da bu süreçte görev alır ve CAF (kanser ilişkili fibroblast) olarak adlandırılır. Bu fibroblastlar kollajen üretimi yanı sıra lizil oksidaz da salgılayarak tümör progresyonunda görev almaktadır [125]. Gastrik kanserlerin karaciğer metastazında yapılan bir araştırmada karaciğer metastaz ortamında CAF'lardan eksprese edilen LOX'un, tümör için uygun ortamın oluşumunu ve aşırı büyümeyi teşvik ettiği saptanmış ve LOX ekspresyonunun kötü prognozu ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Metastatik tümör hücrelerinin TGF-β1 ile CAF'ları aktive ederek LOX ekspresyonunu arttırdığı belirtilmiştir [126]. Kolon tümörlerinde ekstrasellüler matriksin incelendiği bir araştırmada CAF'ların lizil oksidaz yoluyla FAK fosforilasyonunu ve EMT gelişimini desteklediği ayrıca uzak metastaz gelişimine ortam sağladığı gösterilmiştir [100].

Tümör epitelindeki LOX ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak değerlendirdiğimiz çalışmamızda evre IV hastalarda LOX ekspresyonu ile progresyonsuz sağkalım arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Tümördeki LOX ekspresyonu artışı ile yüksek ADK skoru arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. LOX ekspresyonu yüksek olan tümörlerde progresyonsuz sağkalımda azalma izlenmiştir. Tümördeki LOX ekspresyon ile lenfovasküler invazyon arasındaki ilişkiyi destekler nitelikte belirgin bir bulgu saptanmamış olsa da uzak organ metastazı bulunmayan (M0), lenf nodu metastazı tespit edilmeyen (N0), lenfovasküler invazyon izlenen vakaların büyük çoğunluğunda yüksek LOX ekspresyonu izlenmiştir (5/6 , %83).

Yakın zamanda LOX ekspresyonunda artışın epitelyal mezenkimal transizyon gibi tümör progresyonunda rol oynayan birçok yolağı destekleyerek metastatik yayılıma katkıda bulunduğunu gösteren çok sayıda araştırma ortaya konmuştur [95, 100, 127, 128]. LOX ekspresyonunun prognoza ve histopatolojik parametrelere etkisi değerlendirildiğinde, az diferansiye tümörlerde, lenf nodu metastazı olan olgularda, ileri evre hastalarda artmış LOX ekspresyonu izlenmektedir [127]. Akciğer ve karaciğer metastazı olan kolorektal kanserlerde yapılan bir çalışmada, kolorektal karsinomlarda normal mukozaya göre LOX mRNA ekspresyonunda artış saptanmış ve LOX'un nükleer ekspresyonunun; akciğer/karaciğer metastazı, yüksek CEA seviyesi, müsinöz tümör tipi ve kötü sağkalım ile ilişkili olduğu bulunmuştur [128]. Reynaud ve arkadaşları tarafından kolorektal kanserlerde yapılan çalışmada kemik iliğine metastaz yapan tümör hücrelerinde, LOX ekspresyonu tespit edilmiştir [129]. Baker ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kolorektal kanserlerde tümörde normal mukozaya göre, metastatik tümörde primer tümöre göre, evre II olgularda evre I'e göre LOX ekspresyonunda artmış saptanmıştır [130]

Liu ve arkadaşları tarafından kolon tümörlerinde yapılan çalışmada bir bakır şelatörü olarak kullanılarak bakır bağımlı lizil oksidazın inhibisyonu sonucunda FAK aktivasyonu ve EMT inhibisyonu saptanmıştır [100]. LOX ekspresyonunun tümör progresyonunda oynadığı rolü aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalarda LOX'un SRC aktivasyonu yoluyla tümör hücre mobilitesini etkileyebileceği ve LOX inhibisyonunun kanser progresyonunu azaltabileceği ön görülmüştür [130]. Kolon kanserlerinde Ras aktivasyonunun; PI3K-Akt-HIF-1a yolağının aktivasyonu ile LOX ekspresyonunu artırdığı tespit edilen bir araştırmada Ras inhibitörü kullanımının LOX ekspresyonunu azaltarak hücre migrasyonunu ve akciğer metastazını azalttığı gösterilmiştir [131]. Yakın zamanda kolon kanserlerinde yapılan bir çalışmada kanser ilişkili LOX etkileşimleri incelenmiş ve bu etkileşimin, ECM organizasyonuna, bozunma ve çapraz bağlanmaya, integrin ve non-integrin reseptörlerinin aracılık ettiği hücre-ECM etkileşimlerine, protein katlanmasına, şaperon aktivitesine, organ-kan damarı gelişimine, strese karşı hücresel yanıta ve sinyal iletimine katıldığı tespit edilmiştir. Bu iletişim ağının, kolorektal karsinomda yeniden düzenlendiğini ve ECM organizasyonundan protein katlanması ve şaperon aktivitesine geçişe yol açtığı gösterilmiştir [132].

İmmünohistokimyasal olarak tümördeki ve stromada LOX ekspresyonu ile Maspin ekspresyonunu değerlendirdiğimiz çalışmamızda hem tümördeki hem stromadaki LOX ekspresyonu ile maspin ekspresyonu arasında korelasyon saptanmıştır.

Tümör boyutu arttıkça merkezdeki tümör hücreleri hipoksik bir ortama maruz kalır. Bu hipoksik ortam, *hypoxia-inducible factor* (HIF) aktivasyonunu tetikler. HIF, hypoxia-response element (HRE)'e bağlanarak EGF (epidermal growth factor) ve VEGF (vascular endothelial growth factor) yoluyla hücresel proliferasyona ve anjinogeneze neden olur. HIF ile aktive olan HRE, bir transkripsiyon faktörü olarak LOX promoter bölgesine bağlanır ve LOX ekspresyonunu tetikler [97, 133]. Az diferansiye meme kanser hücre dizilerinde, matür LOX'un eksojen ekspresyonu sonucunda tümör motilitesinde ve EMT'de kritik role sahip Src ve FAK aktivasyonunu kolaylaştığı tespit edilmiştir [99]. Kolon kanserlerinde yapılan araştırmada ise CAF ların FAK fosforilasyonunu ve EMT gelişimini desteklediği, FAK sinyal yolunu aktive ettiği ve uzak metastaz gelişimine ortam sağladığı gösterilmiştir [100]. Maspin ise uzun yıllardan bu yana tümör supresör fonksiyonu olduğu bilinen bir serin proteaz olmasına karşın yakın zamanda yapılan birçok araştırma, tümör progresyonunda rol aldığını destekler niteliktedir [6, 83, 87, 113, 114, 120, 123]. Maspinin tümör supresör fonksiyon mekanizması ile ilgili yapılan çok sayıda araştırma olsa da onkojenik mekanizmasını aydınlatmaya yönelik oldukça az sayıda çalışma mevcuttur [88]. Meme kanserlerinde yapılan araştırmada SRGN/TGFβ2 yolağı ile sitoplazmik maspin ekspresyonunun agresif davranış ile ilişkisini destekler nitelikte sonuçlar bulunmuştur [88]. SRGN ile yapılan kolon tümörleri çalışmasında ise hipoksi ile ilişki bir molekül olduğu belirtilmiş olup kötü prognoz ilişkili bulunmuştur [94]. Bu veriler birlikte değerlendirildiğinde LOX ve Maspin ekspresyonun hipoksi ile ilişkili olarak epitelyal mezenkimal transizyonda görev aldığı, tümör progresyonu ve kötü sağkalım sonuçları ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Farklı karsinogenetik mekanizmalar ve değişen moleküler özellikleri nedeniyle; sağ ve sol kolon tümörleri farklı biyolojik özelliklere sahiptir [36]. CIMP-yüksek KRK'lar özellikle mikrosatellit instabiliteye sahip tümörlerdir ve sıklıkla proksimal yerleşimlidir. Kromozomal instabilitesi olan tümörler sıklıkla sol taraf yerleşimlidir [37]. Sağ ve sol kolon kanserlerinde temel onkogenlerde ve tümör supresör genlerde mutasyon oranları farklılık göstermektedir. Evre IV kolon kanserlerindeki kötü prognoz ile ilişkili bulunan BRAF V600E mutasyonu sağ kolon karsinomlarında daha sık izlenir. Buna karşılık APC ve TP53 mutasyonu daha çok sol kolon tümörlerinde tespit edilmektedir [42]. Nokta mutasyonlarının yanı sıra, ERBB2 ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi reseptör tirozin kinazların amplifikasyonları da sol kolon yerleşimli karsinomlarda daha yaygındır [38]. Bizim çalışmamızda tümör lokalizasyonu ile yapılan değerlendirmede lokalizasyonun; maspin ekspresyonu, moleküler profil, tümör tipi, MMR ekspresyon durumu ve genel sağkalım ile anlamlı ilişkisi olduğu izlenmiştir. Serrated adenokarsinom ve BRAF mutasyonunun sağ kolonda daha sık olduğu tespit edilmiştir. dMMR tümörlerin sağ kolonda daha sık olduğu gözlenmiştir. Sol kolon tümörlerinde genel sağkalım sağ kolona göre düşük olduğu izlenmiştir. Sağ kolon tümörlerinde mikst ve sitoplazmik ekspresyon baskın izlenirken sol kolon karsinomlarında nükleer ekspresyon daha sık izlenmiştir. Moleküler olarak KRAS mutasyonu başta olmak üzere moleküler özellikler ile maspin ve LOX ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

Morfoloji, karsinogeneze yol açan altta yatan moleküler olayları güvenilir bir şekilde yansıtmasa da, bazı bulgular ile moleküler özellikler ilişkili bulunmuştur. Özellikle serrated yolağından gelişen poliplerde ve kanserlerde BRAF mutasyonu daha sık görülmektedir. Moleküler özellikler aynı zamanda prognoz açısından da oldukça önemli bir yere sahiptir. Moleküler özelliklerin prognoza etkisini araştıran çalışmalarda BRAF mutasyonunun özellikle Evre IV kanserlerde düşük sağkalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [134, 135] Kolorektal Kanser Alt Tiplendirme Konsorsiyumu tarafından 2016 yılında tanımlanan moleküler altiplere göre CMS1 subgrubunda (*consensus molecular subtype-CMS)* BRAF mutasyonu daha sık izlenmiş olup bu grupta relaps sonrası kötü sağkalım izlenmiştir [80]. Kolon tümörlerindeki moleküler özellikler sıklıkla tedavi modalitesi seçimini etkilemektedir. Örneğin anti-EGFR gibi hedefe yönelik tedavide, KRAS ve NRAS mutasyonları tedaviye direnç oluşturabilir. BRAF mutasyon analizi ise genellikle MMR kaybı gösteren tümörlerde Lynch sendromunu dışlamak için kullanılsa da bazı araştırmalarda BRAF mutasyonu saptanan grubun anti-EGFR tedavisinden de fayda görmediği de bildirilmiştir [4]. Bu çalışmada moleküler özellikler ile tümör subtipi ve genel sağkalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. BRAF mutasyonu gösteren olgularda sağkalımın daha düşük olduğu gözlenmiştir Ayrıca serrated adenokarsinom morfolojisine sahip tümörlerde BRAF mutasyonunun daha sık izlendiği tespit edilmiştir.

Kolorektal kanserlerde hastalığın biyolojik davranışını belirlemede ve tedaviyi yönlendirmede mevcut prognostik belirleyicilerin yanı sıra pek çok yeni parametre gündeme gelmektedir. Tümörün parankimal özellikleri yanı sıra stroma komponentini de histopatolojik olarak yakından inceleyen ve EMT ile ilişki tümör tomurcuklanması gibi histopatolojik parametrelerin prognoza etkisini değerlendiren çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca son zamanlarda bu histopatolojik parametreler ile tümörün lokalizasyonu ve tümörün moleküler profili ile ilişkileri de önem kazanmaktadır. Bu bağlamda hem EMT'de rolü olan hem de onkojenik aktivasyon ile ilişkili olduğu belirtilen maspin ve LOX ekspresyonunu değerlendirdiğimiz çalışmamızda stromal LOX ekspresyonunun ve maspin ekspresyonunun tümör tomurcuklanması ile ilişkisi saptanmıştır. Tümör epitelindeki LOX ekspresyonunun progresyonsuz sağkalım ile, maspin ekspresyonunun genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım ile ilişkili olduğu izlenmiştir. Stroma matürasyonu ile tümör tomurcuklanması arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir. Dolayısıyla çalışmamızda bu iki immünhistokimyasal belirtecin ve stroma paterninin mevcut histopatolojik bulguları destekleyerek ek prognostik faktör olarak kullanılabileceği gösterilmeye çalışılmıştır. Moleküler özellikler açısından MMR ekspresyonu ile tümör tomurcuklanması arasında ilişki izlenmiş olup karsinogenez yolakları ile ilgili moleküler özellikler yönünde açık bir ilişki tespit edilememiştir. Bu sonucun dMMR vaka sayısının az olmasından kaynaklı olduğu düşünülmüş olup bu durum çalışmamızın kısıtlayıcı özelliği olarak değerlendirilmiştir.

SONUÇLAR

- Çalışmamızda 101 kolorektal karsinom vakasında histopatolojik olarak stroma paterni, tümör tomurcuklanması, az diferansiye hücre kümeleri değerlendirilmiş, immünhistokimyasal olarak maspin ve LOX ekspresyonları incelenmiştir ve sonuçlar histopatolojik veriler, moleküler ve prognostik özellikler ile karşılaştırılmıştır.
- Maspin ekspresyonu değerlendirildiğinde nükleer ekspresyonun tümör tomurcuklanması ile, mikst ekspresyonun lenfovasküler invazyon ile ilişkisi saptanmıştır. Sitoplazmik maspin ekspresyonunun genel sağkalım ve hastalıksız sağkalımda azalma ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Maspin ekspresyonu ile tümör lokalizasyonu arasında anlamlı ilişki bulunmuş olup mikst ve sitoplazmik ekspresyon sağ kolonda baskın iken nükleer ekspresyon sol kolon tümörlerinde daha sık izlenmiştir.
- Maspinin nükleer ekspresyonu ile tümör tomurcuklanma derecesi arasında anlamlı ilişki saptanmış olup immünohistokimyasal değerlendirme sırasında tümör-stroma etkileşiminde aktif olan tümör hücrelerinde de nükleer maspin ekspresyonu dikkati çekmiştir.
- Tümör epitelindeki LOX ekspresyonu değerlendirildiğinde, evre IV hastalarda yüksek LOX ekspresyonunun progresyonsuz sağkalımda azalma ile ilişkisi olduğu saptanmıştır. LOX ekspresyonu yüksek olduğunda ADK derecesinin arttığı izlenmiştir.
- Uzak organ metastazı bulunmayan (M0) ve lenf nodu metastazı tespit edilmeyen (N0) vaka grubunda lenfovasküler invazyon izlenen vakaların büyük çoğunluğunda yüksek LOX ekspresyonu (5/6 , %83) izlenmiştir.
- Tümör stromasındaki LOX ekspresyonu değerlendirildiğinde, tümör tomurcuklanması ile arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Yüksek LOX ekspresyonunun daha yüksek tomurcuklanma ile ilişkili olduğu bulunmuştur.
- Tümördeki ve stromadaki LOX ekspresyonu ile maspin ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Yüksek LOX ekspresyonu izlenen olguların büyük çoğunluğunun maspin ekspresyonu gösterdiği izlenmiştir.

- Stroma matürasyonu ile tümör tomurcuklanması arasında ilişki saptanmış olup daha immatür stromaya sahip tümörlerde daha yüksek tomurcuklanma dereceleri izlenmiştir. Ayrıca daha immatür stromaya sahip tümörlerde lenfovasküler invazyon saptanma oranı daha yüksek bulunmuştur.
- Yüksek tümör tomurcuklanması ile kötü diferansiyasyon, sık lenfovasküler invazyon, korunmuş MMR ekspresyonu ve azalmış genel sağkalım arasında ilişki saptanmıştır.
- ADK derecesi ile tümör diferansiyasyonu, tümör tomurcuklanması ve genel sağkalım arasında anlamlı ilişki mevcuttur. ADK derecesi arttıkça diferansiyonun azaldığı ve tomurcuklanma derecesinin yükseldiği tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek derecede ADK içeren tümörlerde genel sağkalımda azalma saptanmıştır.
- MMR ekspresyon kaybı ile sağ kolon lokalizasyonu, TİL ve Crohn benzeri reaksiyon varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır.
- TİL saptanan olgular genellikle erken evre kanserler olup TİL varlığında progresyonsuz sağkalımda artış izlenmiştir. Ayrıca TİL tespit edilen olgularda eşlik eden Crohn benzeri reaksiyon varlığı daha sık olduğu izlenmiştir.
- Moleküler profil ile genel sağkalım arasında anlamlı ilişki izlenmiş olup BRAF mutasyonu olan olgularda düşük sağkalım gözlenmiştir.
- Tümör lokalizasyonu ile yapılan değerlendirmede lokalizasyonun; maspin ekspresyonu, moleküler profil, tümör tipi, MMR ekspresyon durumu ve genel sağkalım ile anlamlı ilişkisi olduğu izlenmiştir. Sağ kolonda serrated adenokarsinom ve BRAF mutasyonu sıklığı sol kolona göre belirgin yüksek olduğu tespit edilmiştir. dMMR tümörlerin sıklıkla sağ kolon yerleşimli olduğu saptanmıştır. Sol kolon tümörlerinde genel sağkalım sağ kolona göre daha düşük olduğu izlenmiştir. Sağ kolon tümörlerinde mikst ve sitoplazmik maspin ekspresyonu baskın iken sol kolon tümörlerinde nükleer maspin ekspresyonu daha sık izlenmiştir.

- Sonuç olarak, çalışmamızda maspin ve LOX ekspresyonun tümör tomurcuklanması ve sağkalım ile ilişkisi tespit edilmesi nedeniyle hem tümörün biyolojik özelliklerini hem de prognozu yansıtmada mevcut parametrelere ek katkı sağlayabileceği düşünülmüştür. Tümör tomurcuklanması ile stroma reaksiyon paterni arasındaki korelasyon, stromanın tümör progresyonun aktif rolü olduğunu destekler nitelikte olup yeni bir prognostik parametre olarak önem kazanmaktadır. Tümör tomurcuklanması ile MMR profili arasındaki ilişki ve tümör subtipi ile moleküler özellikleri arasındaki ilişkinin ortaya konması, histolojik özelliklerin altta yatan muhtemel karsinogenez yolağına ışık tutabileceğini destekler niteliktedir. Kolorektal karsinomlarda tümör davranışını belirleyebilecek ve tedavi yöntemine yön verebilecek, tümör tomurcuklanması ve stroma paterni gibi histopatolojik özellikler ile maspin ve LOX ekspresyonunu gibi immünhistokimyasal yöntemleri prognostik parametre olarak inceleyen daha geniş kapsamlı çok sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. *Cancer Facts & Figures 2021*. 2021, Atlanta: American Cancer Society; 2021.
2. S, E., *Cancer survival in Izmir, Turkey,.* Global Cancer Observatory, 1995−1997. **Chapter 29**.
3. Kumar, V., et al., *Robbins & Cotran pathologic basis of disease.* 2021.
4. *WHO Classification of Tumors, Digestive System Tumours. 5th edition.* , ed. W.C.o.T.E. Board. IARC; 2019.
5. Odze, R.D. and J.R. Goldblum, *Odze and Goldblum surgical pathology of the GI tract, liver, biliary tract, and pancreas.* 2015.
6. Märkl, B., et al., *Shift from cytoplasmic to nuclear maspin expression correlates with shorter overall survival in node-negative colorectal cancer.* Hum Pathol, 2010. **41**(7): p. 1024-33.
7. Cox, T.R. and J.T. Erler, *Lysyl oxidase in colorectal cancer.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013. **305**(10): p. G659-66.
8. Ueno, H., et al., *Desmoplastic pattern at the tumor front defines poor-prognosis subtypes of colorectal cancer.* 2017. **41**(11): p. 1506-1512.
9. Karlberg, M., et al., *Tumor budding versus mismatch repair status in colorectal cancer–an exploratory analysis.* 2018. **38**(8): p. 4713-4721.
10. Lee, H., et al., *Analysis of tumor microenvironmental features to refine prognosis by T, N risk group in patients with stage III colon cancer (NCCTG N0147)(Alliance).* 2020. **31**(4): p. 487-494.
11. Mills, S.E., *Histology for pathologists*. 2020, Philadelphia: Wolters Kluwer.
12. *Idealized represantation of the peritoneal and mesenteric relationships*, in *Peritoneum colon rectum*. 2011: UpToDate.
13. Ovalle, W.K., P.C. Nahirney, and F.H. Netter, *Netter's essential histology with correlated histopathology*. 2021.
14. Stang, A. and A. Kluttig, *Etiologic insights from surface adjustment of colorectal carcinoma incidences: an analysis of the U.S. SEER data 2000-2004.* Am J Gastroenterol, 2008. **103**(11): p. 2853-61.
15. Harada, S. and D. Morlote, *Molecular Pathology of Colorectal Cancer.* Adv Anat Pathol, 2020. **27**(1): p. 20-26.
16. Krasinskas, A.M., *EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma.* Pathology research international, 2011. **2011**: p. 932932-932932.
17. de Castro-Carpeño, J., et al., *EGFR and colon cancer: a clinical view.* Clin Transl Oncol, 2008. **10**(1): p. 6-13.
18. Siddiqui, A.D. and B. Piperdi, *KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy.* Ann Surg Oncol, 2010. **17**(4): p. 1168-76.
19. Barras, D., *BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update.* Biomarkers in cancer, 2015. **7**(Suppl 1): p. 9-12.
20. Jiricny, J.J.N.r.M.c.b., *The multifaceted mismatch-repair system.* 2006. **7**(5): p. 335-346.
21. Randrian, V., C. Evrard, and D.J.C. Tougeron, *Microsatellite Instability in Colorectal Cancers: Carcinogenesis, Neo-Antigens, Immuno-Resistance and Emerging Therapies.* 2021. **13**(12): p. 3063.
22. Sun, B.L., *Current Microsatellite Instability Testing in Management of Colorectal Cancer.* Clin Colorectal Cancer, 2021. **20**(1): p. e12-e20.
23. Pearlman, R., et al., *Two-stain immunohistochemical screening for Lynch syndrome in colorectal cancer may fail to detect mismatch repair deficiency.* 2018. **31**(12): p. 1891-1900.
24. Vilkin, A., et al., *How reliable is immunohistochemical staining for DNA mismatch repair proteins performed after neoadjuvant chemoradiation?* 2014. **45**(10): p. 2029-2036.

25. Lawrence J. Burgart, William V. Chopp, and Dhanpat Jain, *Template for Reporting Results of Biomarker Testing or Specimens From Patients With Carcinoma of the Colon and Rectum*. June 2021, 2021 College of American Pathologists.
26. Lawrence J. Burgart, William V. Chopp, and Dhanpat Jain, *Protocol for the Examination of Resection Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum*. June 2021, 2021 College of American Pathologists (CAP).
27. Amin MB, et al., *AJCC Cancer Staging Manual. 8th edition.* 2018, [Place of publication not identified]: New York: Springer.
28. John R. Leyendecker and M. Oliphan, *A Brief Guide to Cancer Imaging*. Mar 6, 2016: Radiology Key. p. https://radiologykey.com/a-brief-guide-to-cancer-imaging/.
29. Kirsch, R., et al., *Venous invasion in colorectal cancer: impact of an elastin stain on detection and interobserver agreement among gastrointestinal and nongastrointestinal pathologists.* Am J Surg Pathol, 2013. **37**(2): p. 200-10.
30. Knijn, N., et al., *The value of intramural vascular invasion in colorectal cancer - a systematic review and meta-analysis.* Histopathology, 2018. **72**(5): p. 721-728.
31. Chand, M., et al., *Systematic review of prognostic importance of extramural venous invasion in rectal cancer.* World journal of gastroenterology, 2016. **22**(4): p. 1721-1726.
32. Kornprat, P., et al., *Value of tumor size as a prognostic variable in colorectal cancer: a critical reappraisal.* 2011. **34**(1): p. 43-49.
33. Jun, K.H., et al., *Does tumor size have an impact on gastric cancer? A single institute experience.* Langenbecks Arch Surg, 2009. **394**(4): p. 631-5.
34. Dai, W., et al., *The critical role of tumor size in predicting prognosis for T1 colon cancer.* 2020. **25**(3): p. 244.
35. Luo, D., et al., *The correlation between tumor size, lymph node status, distant metastases and mortality in rectal cancer patients without neoadjuvant therapy.* 2021. **12**(6): p. 1616.
36. Lee, M.S., D.G. Menter, and S.J.J.o.t.N.C.C.N. Kopetz, *Right versus left colon cancer biology: integrating the consensus molecular subtypes.* 2017. **15**(3): p. 411-419.
37. Muzny, D.M., et al., *Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer.* Nature, 2012. **487**(7407): p. 330-337.
38. Benedix, F., et al., *Comparison of 17,641 patients with right-and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival.* 2010. **53**(1): p. 57-64.
39. Stintzing, S., et al., *Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes.* Eur J Cancer, 2017. **84**: p. 69-80.
40. Vestby, L.K., et al., *Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease.* Antibiotics (Basel), 2020. **9**(2).
41. Dejea, C.M., et al., *Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(51): p. 18321-6.
42. Glebov, O.K., et al., *Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression.* 2003. **12**(8): p. 755-762.
43. Märkl, B., et al., *The clinical significance of lymph node size in colon cancer.* Modern Pathology, 2012. **25**(10): p. 1413-1422.
44. Ryan, R., et al., *Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer.* Histopathology, 2005. **47**(2): p. 141-6.
45. Demir, A., O. Alan, and E.J.W.j.o.s.o. Oruc, *Tumor budding for predicting prognosis of resected rectum cancer after neoadjuvant treatment.* 2019. **17**(1): p. 1-8.

46. Marx, A.H., et al., *High-grade intratumoral tumor budding is a predictor for lymphovascular invasion and adverse outcome in stage II colorectal cancer.* 2020. **35**(2): p. 259-268.
47. Maffeis, V., L. Nicolè, and R. Cappellesso, *RAS, Cellular Plasticity, and Tumor Budding in Colorectal Cancer.* Front Oncol, 2019. **9**: p. 1255.
48. Lugli, A., et al., *Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016.* Mod Pathol, 2017. **30**(9): p. 1299-1311.
49. Lugli, A., et al., *Intratumoral budding as a potential parameter of tumor progression in mismatch repair–proficient and mismatch repair–deficient colorectal cancer patients.* 2011. **42**(12): p. 1833-1840.
50. Mitrovic, B., et al., *Prognostic and Predictive Value of Tumor Budding in Colorectal Cancer.* 2021.
51. Zlobec, I. and A.J.O. Lugli, *Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget.* 2010. **1**(7): p. 651.
52. Mittal, V., *Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis.* Annu Rev Pathol, 2018. **13**: p. 395-412.
53. Cao, H., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review.* Pathol Res Pract, 2015. **211**(8): p. 557-69.
54. Ueno, H., et al., *New criteria for histologic grading of colorectal cancer.* 2012. **36**(2): p. 193-201.
55. Barresi, V., et al., *Poorly differentiated clusters: clinical impact in colorectal cancer.* 2017. **16**(1): p. 9-15.
56. Ueno, H., et al., *Histological grading of colorectal cancer: a simple and objective method.* 2008. **247**(5): p. 811-818.
57. Fujiyoshi, K., et al., *Tumour budding, poorly differentiated clusters, and T-cell response in colorectal cancer.* 2020. **57**: p. 102860.
58. Ueno, H., et al., *A multicenter study of the prognostic value of desmoplastic reaction categorization in stage II colorectal cancer.* 2019. **43**(8): p. 1015-1022.
59. Theodoro, T.R., et al., *Extracellular matrix changes in colorectal carcinoma and correlation with lymph node metastasis.* 2021.
60. Ueno, H., et al., *Histologic categorization of desmoplastic reaction: its relevance to the colorectal cancer microenvironment and prognosis.* 2015. **22**(5): p. 1504-1512.
61. Ueno, H., et al., *Histologic categorization of fibrotic cancer stroma in the primary tumor is an independent prognostic index in resectable colorectal liver metastasis.* 2014. **38**(10): p. 1380-1386.
62. Ueno, H., et al., *Histopathological atlas of desmoplastic reaction characterization in colorectal cancer.* 2021. **51**(6): p. 1004-1012.
63. Nebuloni, M., et al., *Insight On Colorectal Carcinoma Infiltration by Studying Perilesional Extracellular Matrix.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 22522.
64. Valkenburg, K.C., A.E. de Groot, and K.J. Pienta, *Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy.* Nature Reviews Clinical Oncology, 2018. **15**(6): p. 366-381.
65. Erdogan, B. and D.J.J.B.S.T. Webb, *Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis.* 2017. **45**(1): p. 229-236.
66. Herrera, M., et al., *Cancer-associated fibroblast-derived gene signatures determine prognosis in colon cancer patients.* 2021. **20**(1): p. 1-6.
67. DeClerck, Y.A., *Desmoplasia: a response or a niche?* Cancer Discov, 2012. **2**(9): p. 772-4.
68. Ueno, H., et al., *Clinicopathological significance of thekeloid-like'collagen and myxoid stroma in advanced rectal cancer.* 2002. **40**(4): p. 327-334.

69. Ropponen, K.M., et al., *Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer.* 1997. **182**(3): p. 318-324.
70. Hendry, S., et al., *Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: A practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the host immune response, TILs in invasive breast carcinoma and ductal carcinoma in situ, metastatic tumor deposits and areas for further research.* 2017. **24**(5): p. 235.
71. Jakubowska, K., et al., *Stromal and intraepithelial tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinoma.* 2017. **14**(6): p. 6421-6432.
72. Graham, D.M. and H.D. Appelman, *Crohn's-like lymphoid reaction and colorectal carcinoma: a potential histologic prognosticator.* Mod Pathol, 1990. **3**(3): p. 332-5.
73. Jenkins, M.A., et al., *Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study.* 2007. **133**(1): p. 48-56.
74. Rozek, L.S., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes, Crohn's-like lymphoid reaction, and survival from colorectal cancer.* 2016. **108**(8).
75. Roudko, V., et al., *Shared Immunogenic Poly-Epitope Frameshift Mutations in Microsatellite Unstable Tumors.* Cell, 2020. **183**(6): p. 1634-1649.e17.
76. Tougeron, D., et al., *Regulatory T lymphocytes are associated with less aggressive histologic features in microsatellite-unstable colorectal cancers.* PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61001.
77. Maby, P., et al., *Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy.* Cancer Res, 2015. **75**(17): p. 3446-55.
78. Phillips, S.M., et al., *Tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic.* British Journal of Surgery, 2004. **91**(4): p. 469-475.
79. Tesmer, L.A., et al., *Th17 cells in human disease.* Immunol Rev, 2008. **223**: p. 87-113.
80. Guinney, J., et al., *The consensus molecular subtypes of colorectal cancer.* Nat Med, 2015. **21**(11): p. 1350-6.
81. Ribic, C.M., et al., *Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer.* 2003. **349**(3): p. 247-257.
82. Zou, Z., et al., *Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells.* 1994. **263**(5146): p. 526-529.
83. Tanaka, A., et al., *Maspin as a prognostic marker for early stage colorectal cancer with microsatellite instability.* 2020. **10**: p. 945.
84. Hestetun, K.E., et al., *Nuclear maspin expression as a predictive marker for fluorouracil treatment response in colon cancer.* 2015. **54**(4): p. 470-479.
85. Berardi, R., et al., *Role of maspin in cancer.* 2013. **2**(1): p. 1-19.
86. Zhang, M., et al., *Transactivation through Ets and Ap1 transcription sites determines the expression of the tumor-suppressing gene maspin.* Cell Growth Differ, 1997. **8**(2): p. 179-86.
87. Boltze, C.J.P.-R. and Practice, *Loss of maspin is a helpful prognosticator in colorectal cancer: a tissue microarray analysis.* 2005. **200**(11-12): p. 783-790.
88. Sakabe, T., et al., *Role of cytoplasmic localization of maspin in promoting cell invasion in breast cancer with aggressive phenotype.* 2021. **11**(1): p. 1-12.
89. Jiang, N., et al., *Maspin sensitizes breast carcinoma cells to induced apoptosis.* Oncogene, 2002. **21**(26): p. 4089-98.

90. Yang, Q., M.H. Roehrl, and J.Y. Wang, *Proteomic profiling of antibody-inducing immunogens in tumor tissue identifies PSMA1, LAP3, ANXA3, and maspin as colon cancer markers.* Oncotarget, 2018. **9**(3): p. 3996-4019.
91. Bailey, C.M., et al., *Biological functions of maspin.* 2006. **209**(3): p. 617-624.
92. Gurzu, S. and I.J.C. Jung, *Subcellular Expression of Maspin in Colorectal Cancer: Friend or Foe.* 2021. **13**(3): p. 366.
93. Guo, J.Y., et al., *Serglycin in tumor microenvironment promotes non-small cell lung cancer aggressiveness in a CD44-dependent manner.* Oncogene, 2017. **36**(17): p. 2457-2471.
94. Xu, Y., et al., *SRGN Promotes Colorectal Cancer Metastasis as a Critical Downstream Target of HIF-1α.* Cell Physiol Biochem, 2018. **48**(6): p. 2429-2440.
95. Wang, T.H., S.M. Hsia, and T.M. Shieh, *Lysyl Oxidase and the Tumor Microenvironment.* Int J Mol Sci, 2016. **18**(1).
96. Bais, M.V., et al., *Effects of tumor-suppressor lysyl oxidase propeptide on prostate cancer xenograft growth and its direct interactions with DNA repair pathways.* Oncogene, 2015. **34**(15): p. 1928-37.
97. Farhat, A., et al., *Lysyl Oxidase Mechanisms to Mediate Gastrointestinal Cancer Progression.* 2021. **8**(1): p. 33-40.
98. Roy-Luzarraga, M. and K. Hodivala-Dilke, *Molecular Pathways: Endothelial Cell FAK-A Target for Cancer Treatment.* Clin Cancer Res, 2016. **22**(15): p. 3718-24.
99. Payne, S.L., M.J. Hendrix, and D.A.J.J.o.c.b. Kirschmann, *Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer—a prospect.* 2007. **101**(6): p. 1338-1354.
100. Xuefeng, X., et al., *Epithelial-mesenchymal transition and metastasis of colon cancer cells induced by the FAK pathway in cancer-associated fibroblasts.* J Int Med Res, 2020. **48**(6): p. 300060520931242.
101. Tang, W., et al., *MicroRNA-29a promotes colorectal cancer metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 and E-cadherin via KLF4.* 2014. **110**(2): p. 450-458.
102. Cox, T.R., A. Gartland, and J.T.J.C.r. Erler, *Lysyl oxidase, a targetable secreted molecule involved in cancer metastasis.* 2016. **76**(2): p. 188-192.
103. Shinto, E., et al., *A novel classification of tumour budding in colorectal cancer based on the presence of cytoplasmic pseudo-fragments around budding foci.* Histopathology, 2005. **47**(1): p. 25-31.
104. Salgado, R., et al., *The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014.* 2015. **26**(2): p. 259-271.
105. Ohtani, H.J.C.I.A., *Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer.* 2007. **7**(1).
106. Klarskov, L., et al., *Hereditary colorectal cancer diagnostics: morphological features of familial colorectal cancer type X versus Lynch syndrome.* J Clin Pathol, 2012. **65**(4): p. 352-6.
107. Shin, U.S., et al., *Is microsatellite instability really a good prognostic factor of colorectal cancer?* Ann Coloproctol, 2014. **30**(1): p. 28-34.
108. González, I., et al., *Intraepithelial tumour infiltrating lymphocytes are associated with absence of tumour budding and immature/myxoid desmoplastic reaction, and with better recurrence-free survival in stages I–III colorectal cancer.* 2021. **78**(2): p. 252-264.
109. Banias, L., et al., *Immunohistochemical-based molecular subtyping of colorectal carcinoma using maspin and markers of epithelial-mesenchymal transition.* 2020. **19**(2): p. 1487-1495.
110. Kovacs, Z., et al., *Interaction of arylsulfatases A and B with maspin: A possible explanation for dysregulation of tumor cell metabolism and invasive potential of colorectal cancer.* 2019. **7**(23): p. 3990.

111. Baek, J.Y., et al., *Serpin B5 is a CEA-interacting biomarker for colorectal cancer.* Int J Cancer, 2014. **134**(7): p. 1595-604.
112. Lugli, A., et al., *Tumour budding in solid cancers.* Nat Rev Clin Oncol, 2021. **18**(2): p. 101-115.
113. Banias, L., et al., *Nuclear maspin expression: A biomarker for budding assessment in colorectal cancer specimens.* 2017. **213**(9): p. 1227-1230.
114. Gurzu, S., et al., *Practical value of the new system for Maspin assessment, in colorectal cancer.* 2013. **60**(4): p. 373-383.
115. Umekita, Y., M. Souda, and H. Yoshida, *Expression of maspin in colorectal cancer.* In Vivo, 2006. **20**(6b): p. 797-800.
116. Kim, J.H., et al., *Nuclear maspin expression correlates with the CpG island methylator phenotype and tumor aggressiveness in colorectal cancer.* 2015. **8**(2): p. 1920.
117. Snoeren, N., et al., *Maspin is a marker for early recurrence in primary stage III and IV colorectal cancer.* 2013. **109**(6): p. 1636-1647.
118. Fung, C.L., et al., *Clinicopathological correlates and prognostic significance of maspin expression in 450 patients after potentially curative resection of node-positive colonic cancer.* Histopathology, 2010. **56**(3): p. 319-30.
119. Barberá, V.M., et al., *The 18q21 region in colorectal and pancreatic cancer: independent loss of DCC and DPC4 expression.* Biochim Biophys Acta, 2000. **1502**(2): p. 283-96.
120. Bettstetter, M., et al., *Elevated nuclear maspin expression is associated with microsatellite instability and high tumour grade in colorectal cancer.* 2005. **205**(5): p. 606-614.
121. Pasz-Walczak, G., et al., *Maspin and Nm23-H1 expression in colorectal cancer.* Neoplasma, 2010. **57**(2): p. 95-101.
122. Song, S.Y., et al., *Expression of maspin in colon cancers: its relationship with p53 expression and microvessel density.* 2002. **47**(8): p. 1831-1835.
123. Gurzu, S., et al., *Possible predictive value of maspin expression in colorectal cancer.* 2013. **8**(2): p. 183-190.
124. Dietmaier, W., et al., *Nuclear Maspin expression is associated with response to adjuvant 5-fluorouracil based chemotherapy in patients with stage III colon cancer.* Int J Cancer, 2006. **118**(9): p. 2247-54.
125. Sakuma, Y., *Epithelial-to-mesenchymal transition and its role in EGFR-mutant lung adenocarcinoma and idiopathic pulmonary fibrosis.* Pathol Int, 2017. **67**(8): p. 379-388.
126. Li, Q., et al., *Lysyl oxidase promotes liver metastasis of gastric cancer via facilitating the reciprocal interactions between tumor cells and cancer associated fibroblasts.* 2019. **49**: p. 157-171.
127. Wei, B., et al., *Human colorectal cancer progression correlates with LOX-induced ECM stiffening.* Int J Biol Sci, 2017. **13**(11): p. 1450-1457.
128. Liu, Y., et al., *Lysyl oxidase: A colorectal cancer biomarker of lung and hepatic metastasis.* 2018. **9**(7): p. 785-793.
129. Reynaud, C., et al., *Lysyl Oxidase Is a Strong Determinant of Tumor Cell Colonization in Bone.* Cancer Res, 2017. **77**(2): p. 268-278.
130. Baker, A.-M., et al., *The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer.* 2011. **103**(5): p. 407-424.
131. Yoshikawa, Y., et al., *Ras inhibitors display an anti-metastatic effect by downregulation of lysyl oxidase through inhibition of the Ras-PI3K-Akt-HIF-1α pathway.* 2017. **410**: p. 82-91.
132. Vallet, S., et al., *The Interactome of Cancer-Related Lysyl Oxidase and Lysyl Oxidase-Like Proteins. Cancers 2021, 13, 71*. 2020, s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in ….
133. Erler, J.T. and A.J. Giaccia, *Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis.* Cancer Res, 2006. **66**(21): p. 10238-41.

134. Tran, B., et al., *Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer.* Cancer, 2011. **117**(20): p. 4623-32.
135. Lochhead, P., et al., *Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication.* J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(15): p. 1151-6.