

**T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Prof. Dr. Mine HEKİMGİL**

**KOLOREKTAL ADENOKARSİNOMLARDA “DNA MISMATCH  
REPAIR (MMR)” PROTEİN EKSPRESYON KAYBININ  
İMMUNHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Başak DOĞANAŞARGİL YAKUT**

**Dr. Fatma YILDIRIM  
İzmir 2014**

## TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince her zaman her türlü konuda desteğini gördüğüm Anabilim Dalı başkanımız *Prof. Dr. Mine HEKİMGİL*'e;

Çalışmamın bu noktaya gelmesinde büyük emeği bulunan danışmanım *Doç. Dr. Başak DOĞANAVŞARGİL YAKUT*'a;

Patoloji alanında yetişmemde büyük katkıları bulunan değerli hocalarım *Prof. Dr. Müge TUNÇYÜREK*'e, *Prof. Dr. Gülşen KANDİLOĞLU*'na, *Prof. Dr. Necmettin ÖZDEMİR*'e, *Prof. Dr. Funda YILMAZ*'a, *Prof. Dr. Taner AKALIN*'a, *Prof. Dr. Ali VERAL*'e, *Prof. Dr. Sait ŞEN*'e, *Prof. Dr. Osman ZEKİOĞLU*'na, *Prof. Dr. Deniz NART*'a, *Doç. Dr. Yeşim ERTAN*'a, *Doç. Dr. Murat SEZAK*'a, *Doç. Dr. Banu SARSIK*'a, *Doç. Dr. Nazan ÖZSAN*'a ve *Uzm. Dr. Banu YAMAN*'a;

İstatistiksel analizlerin hazırlanmasında yardımcı olan *Yrd. Doç. Dr. Timur KÖSE*'ye;

Preparatların ve blokların arşivden çıkarılmasında *Pervin BAKOĞLU* ile *Celal YILMAZ*'a, multiblokların hazırlanmasında *Murat İPEK*'e, kesitlerin hazırlanmasında *Süleyman TOSUN*'a, immunhistokimyasal çalışmaların yapılmasında *Hayriye KÖKTAŞ*'a ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen asistan arkadaşlarım ile bölümümüzün tüm laboratuvar, arşiv ve idari bölüm personeline;

Çalışmalarımı evde de sürdürebilmem için her tür olanağı sağlayan eşim *Dr. İbrahim YILDIRIM*'a;

Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Komisyonuna ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonuna projemize verdikleri destek nedeniyle çok teşekkür ederim.

Dr. Fatma YILDIRIM



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No.</b>
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b>	III
<b>GRAFİK DİZİNİ</b>	III
<b>TABLO DİZİNİ</b>	IV
<b>RESİM DİZİNİ</b>	V
<b>KISALTMALAR</b>	VI
<b>ÖZET</b>	VII
<b>ABSTRACT</b>	VIII
<b>GİRİŞ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	4
<b>GEREÇ-YÖNTEM</b>	37
<b>BULGULAR</b>	44
<b>TARTIŞMA</b>	66
<b>SONUÇ</b>	81
<b>KAYNAKLAR</b>	84

## ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa No:
<b>Şekil 1:</b> Kolonun embriyolojik gelişimi	4
<b>Şekil 2:</b> Adenom-karsinom sekansı ve MSI yolağı	10
<b>Şekil 3:</b> Adenom karsinom sekansının histolojik yansıması	11
<b>Şekil 4:</b> WNT- APC- $\beta$ -katenin sinyal yolağı	11
<b>Şekil 5:</b> CIMP yolağı ve MSI ile ilişkisi	14
<b>Şekil 6:</b> “Serrated” yolağı üzerinden karsinom gelişimi	15
<b>Şekil 7:</b> MSI yolağı ve karsinom gelişim basamakları	16
<b>Şekil 8:</b> E. Coli ve insanda DNA MMR sistemi çalışma mekanizması	17
<b>Şekil 9:</b> Lynch Sendromu tanı algoritması	25

## GRAFİK DİZİNİ

<b>Grafik 1:</b> Olguların MMR protein ekspresyon kaybına göre dağılımı	48
<b>Grafik 2:</b> Boyanma heterojenitesi gösteren olguların dağılımı	48
<b>Grafik 3:</b> TIL pozitif olgulardaki 5 yıllık sağkalım eğrisi	62
<b>Grafik 4:</b> Crohn benzeri lenfositik reaksiyon olan olgulardaki 5 yıllık sağkalım eğrisi	63
<b>Grafik 5:</b> Tümör “budding” olan olgulardaki sağkalım eğrisi	63

## TABLO DİZİNİ

<b>Tablo 1:</b> Kalın bağırsak bölümleri ve periton ilişkisi	5
<b>Tablo 2:</b> KRK'lerde moleküler alt tipler	15
<b>Tablo 3:</b> MMR ilişkili genler, genomdaki lokalizasyonları ve işlevleri	19
<b>Tablo 4:</b> Revize Bethesda kriterleri	22
<b>Tablo 5:</b> MMR protein immunhistokimyası ve olası defektif gen ilişkisi	23
<b>Tablo 6:</b> Histolojik prognostik faktörler	30
<b>Tablo 7:</b> Kolon ve rektum tümörlerinde TNM-7 evrelendirmesi	31
<b>Tablo 8:</b> İmmunhitokimyasal incelemede kullanılan antikorlar	41
<b>Tablo 9:</b> MMR protein ekspresyon kaybı olan ve olmayan olguların klinikopatolojik veriler açısından karşılaştırılması	57
<b>Tablo 10:</b> MMR protein Ekspresyon Kaybı olan ve olmayan olguların histolojik veriler açısından karşılaştırılması	58
<b>Tablo 11:</b> MMR protein Ekspresyon Kaybı olan ve olmayan olguların MSI-H ilişkili histolojik bulgular açısından karşılaştırılması	59
<b>Tablo 12:</b> MMR protein Ekspresyon Kaybı olan ve olmayan olguların yaş, tümör çapı, metastatik lenf nodülü sayısı ve TIL sayısı açısından karşılaştırılması	60
<b>Tablo 13:</b> Klinikopatolojik veriler ve MMR ekspresyon kaybı verilerinin 5 yıllık sağkalımla ilişkisi	64-65

## RESİM DİZİNİ

<b>Resim 1:</b> Kolonun histolojik görünümü	4
<b>Resim 2:</b> Makroarray ve multiblokların hazırlanması	42
<b>Resim 3:</b> Multibloklardan hazırlanan kesitler ve immunhistokimyasal uygulama	42
<b>Resim 4:</b> Tümörü infiltre eden lenfositler	49
<b>Resim 5:</b> Crohn benzeri lenfositik yanıt	49
<b>Resim 6:</b> Taşlı yüzük hücreli ve medüller tümör	50
<b>Resim 7:</b> Tümör tomurcuklanması “budding”	50
<b>Resim 8:</b> MLH1-PMS2 kaybı	51
<b>Resim 9:</b> MSH2-MSH6 kaybı	51
<b>Resim 10:</b> İzole PMS2 kaybı	52
<b>Resim 11:</b> İzole MSH6 kaybı	52

## KISALTMALAR

<b>AJCC</b>	American Joint Committee on Cancer
<b>APC</b>	Adenomatous polyposis coli
<b>BBA</b>	Büyük Büyütme Alanı
<b>BRAF</b>	v-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
<b>CIMP</b>	"CpG Island" Metilatör Fenotipi
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>FAP</b>	Familyal Adenomatöz Polipozis
<b>5-FU</b>	5-Fluorouracil
<b>GİS</b>	Gastrointestinal Sistem
<b>HNPCC</b>	Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanserler
<b>İHK</b>	İmmunhistokimya
<b>KRAS</b>	Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog
<b>KRK</b>	Kolorektal Kanserler
<b>KT</b>	Kemoterapi
<b>KİDEM</b>	Kanser İzlem ve Denetim Merkezi
<b>MSI</b>	Mikrosatellit İnstabilite
<b>MSI-H</b>	Mikrosatellit İnstabilite-High
<b>MSI-L</b>	Mikrosatellit İnstabilite-Low
<b>MSS</b>	Mikrosatellit Stable
<b>MMR</b>	Mismatch Repair
<b>MGMT</b>	O-6-Methylguanine DNA Methyltransferase
<b>MLH1</b>	Mut L, homolog 1, kolon karsinomu, nonpolipozis tip 2 (E. Coli)
<b>MSH2</b>	Mut S homolog 2, kolon karsinomu, nonpolipozis tip 1 (E. coli)
<b>PMS2</b>	Postmeiotic Segregation Increased 2 (S. cerevisiae)
<b>MSH6</b>	Mut S homolog 6, kolon karsinomu, nonpolipozis tip 1 (E. coli)
<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>TIL</b>	Tümörü İnfiltrate Eden Lenfositler
<b>TNM</b>	Tümör-Lenf Nodu-Metastaz
<b>UICC</b>	"International Union Against Cancer"



## ÖZET

**Amaç:** “Mismatch repair gen (MMR)”lerdeki kayıp sonucu gelişen ve mikrosatellit instabilite yolağı (MSI) olarak anılan karsinogenetik yolak, sporadik kolorektal kanserlerin %10-15’inden ve “Lynch sendromu ilişkili” tümörlerden sorumludur. Bu tümörlerin tanısında altın standart olarak MSI-test yapılması önerilse de son yıllarda yapılan çalışmalar immunhistokimyasal incelemenin duyarlılığının benzer olduğunu ortaya koymaktadır.

**Gereç ve Yöntemler:** 2002-2011 yılları arasında tanı almış 1002 olgunun tümörlerindeki MMR proteinlerinin (MLH1, PMS2, MSH2 ve MSH6) ekspresyon kaybı immunhistokimyasal yöntemle araştırılmış, klinikopatolojik bulgular ve MSI-H ilişkili histolojik verilerle karşılaştırılmıştır.

**Bulgular:** Olguların %39,8’i kadın olup, %18’i 50 yaşın altındadır. Tümörlerin %22,3’ü sağ kolon yerleşimlidir. Yüzde 10,5’inde müsinöz, %5’inde medüller diferansiyasyon, %10,4’ünde tümörü infiltre eden lenfositler, %38,4’ünde Crohn-benzeri lenfositik yanıt izlenmiştir. Olguların %17,5’unda MMR kaybı izlenmiş olup, en sık MLH1-PMS2 (%30,2), izole PMS2 (%23) ve MSH2-MSH6 (%13,7) kaybı gözlenmiştir. MMR ekspresyon kaybının; 50 yaş altında ( $p<0,0001$ ), sağ kolonda ( $p<0,0001$ ), kötü diferansiye tümörlerde daha fazla ( $p<0,0001$ ) görüldüğü; tümörü infiltre eden lenfositlerin ( $p<0,0001$ ), müsinöz ( $p=0,043$ ) ve medüller komponentin ( $p<0,0001$ ) daha sık olup, tümör tomurcuklanması ( $p=0,008$ ) ve kirli nekrozun ise daha az ( $p<0,0001$ ) olduğu gözlenmiştir. Beş yıllık sağkalım oranı %56,7’dir. MMR kaybı ile genel sağkalım arasında bir ilişki saptanmamıştır.

**Sonuç:** Serimizdeki tümörlerin %17,5’unda MMR protein ekspresyonu kaybı izlenmiş olup, bu tümörlerin klinikopatolojik özelliklerinin farklılık gösterdiği görülmüştür. Bulgular literatürden derlenen bulgular ile uyumludur. İmmunhistokimyasal incelemenin germline mutasyon analizi yapılacak olguların seçiminde yararlı bir ilk basamak olabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Kolon kanseri, mikrosatellit instabilite, MMR kaybı, immunhistokimya

## ABSTRACT

**Background:** Microsatellit instability (MSI) pathway caused by loss/defects in “Mismatch repair genes (MMR)” is responsible of Lynch Syndrome related tumors and 10-15% of sporadical colorectal cancers. Although MSI-test is regarded as the golden standart for detection of “Lynch Syndrome-related tumors”, there are increasing evidence on similar analitic sensitivity of immunohistochemical evaluation.

**Materials and Methods:** We retrospectively evaluated 1002 colorectal tumors diagnosed between 2002-2011 years for loss of MMR protein (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) expression immunohistochemically. The results were correlated with clinicopathological features and MSI-H related histological parameters.

**Results:** Forty percent of the cases were female, 18% were under 50 years-old, 22.3% were localised in right colon. MMR protein expression loss was observed in 17.5% of the cases as well as mucinous (10.5%), medullary differentiation (5%), tumor invading lymphocytes (10.4%), Crohn-like lymphocytic reaction (38.4%). MLH1-PMS2 loss (%30,2) was the most common loss followed by isolated PMS2 (23%) and MSH2-MSH6 (13.7%) losses. MMR loss was more frequent under 50 years-old ( $p<0,0001$ ), in right colon tumors ( $p<0,0001$ ), poorly differentiated tumors ( $p<0,0001$ ) and tumors with tumor infiltrating lymphocytes ( $p<0,0001$ ), mucinous ( $p=0,043$ ) and medullary components ( $p<0,0001$ ) and less frequent in tumors with tumor budding ( $p=0,008$ ) and dirty necrosis ( $p<0,0001$ ). The 5 years-survival rate was 56.7%. No correlation was found with MMR loss and survival.

**Conclusion:** MMR protein loss was observed in 17.5% of the cases with distinct clinicopathological features. The results were consistant with previous studies. Immunohistochemical evaluation appears to valuable as a first screening method for selection of cases for germline mutation test.

**Key words:** Colon cancer, microsatellit instability, MMR loss, immunohistochemistry

## 1.GİRİŞ

Kolorektal kanserler (KRK), gastrointestinal sistemin (GİS) en çok görülen kanserleri olup dünyada kansere bağlı ölümlerde üçüncü sırada yer almaktadır (1).

KRK'ler, Familyal Adenomatöz Polipozis (FAP), Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanserler (HNPCC, "Lynch Sendromu") ve MUTHY-ilişkili kanserlerde olduğu gibi ailesel ya da herediter olabilmekte birlikte büyük oranda sporadik olarak meydana gelmektedirler (2,3).

KRK'e yol açan olaylar dizisi heterojendir. Günümüzde kolon kanseri gelişiminde başlıca kromozomal instabilite ve mikrosatellit instabilite (MSI) yolakları olmak üzere patogenetik olarak en az iki farklı yolak olduğu bilinmektedir (2,4). Bunlardan daha çok bilineni, sporadik kolorektal kanserlerin %80'inde görülen, klasik adenom-karsinom sekansı ve "FAP ile ilişkili olan; "kromozomal instabilite yolağı" ya da daha iyi bilinen adıyla "APC/ $\beta$ -katenin yolağı"dır. MSI yolağı ise sporadik kolorektal kanserlerin %10-15'inden ve HNPCC (Lynch sendromu) ile ilişkili tümörlerden sorumludur (5-7). MSI yolağı ile ilişkili tümörlerin DNA kopyalanması sırasında yanlış eşleşen (mismatch) baz çiftlerini bularak onaran genlerdeki (Mismatch repair gen-MMR) bozukluk-kayıp sonucu geliştiğı düşünülmektedir (8). DNA MMR kaybının en iyi göstergesi, insan genomundaki "tekrarlayan sekanslar" olarak tanımlanan "mikrosatellit"lerdeki değışikliklerdir (2,9). Bu durum "Mikrosatellit instabilite (MSI)" olarak adlandırılmakta ve DNA MMR gen kaybının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (2,9,10).

MSI'ye yol açan süreç, MMR gen ailesi üyelerinden (MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2) bir ve/veya daha fazlasının inaktivasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır (2,5-7) ve %90'ı MSH2 ve MLH1 genlerindeki mutasyona bağlıdır (5).

MSI yolağı üzerinden gelişen ve ikiden fazla mikrosatellit gen instabilitesi ile karakterli tümörler "Mikrosatellit instabilitesi yüksek-Mikrosatellit-high (MSI-H)" tümörler olarak tanımlanırlar, ayrıca bazı ayırt edici morfolojik özelliklere sahiptirler. Bu tümörler daha çok proksimal kolonda yerleşim gösterirken; kadınlarda ve erken yaşta daha sık görülürler (5-9,11). Histolojik olarak müsinöz, medüller ya da kötü diferansiye karsinom morfolojisi ve tümörü infiltre eden lenfositlerin olması ayırt edici özelliklerdendir. Genel olarak kromozomal instabilite yolağı üzerinde gelişen aynı evredeki tümörlere göre daha iyi prognoza sahiptirler (2,12,13).

Tümörlerin MSI durumunun tespiti başlıca 3 nedenden dolayı önemlidir. Bunlar; sağkalımla yakından ilişkili olması, MSI-H tümörlerin 5-Fluorouracil (FU) bazlı kemoterapiye kötü yanıt verebilmesi nedeniyle adjuvan kemoterapi (KT) seçimindeki prediktif önemi ve Lynch Sendromu/HNPCC sendromu ile ilişkili olmasıdır (2,5-14). Kemoterapi yanıtına ilişkin önemi halen tartışmalıdır.

Lynch Sendromu tanısal sürecinde algoritmik bir yaklaşım uygulanmaktadır. Bugün için algoritmanın ilk basamağı MSI-H fenotipe sahip olgularda immunhistokimyasal (İHK) olarak MMR protein ekspresyonu kaybının gösterilmesidir. Lynch Sendromu açısından genetik inceleme yapılacak hasta seçimi için birçok yönergede altın standart olarak Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile MSI-test yapılması önerilmekle birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar İHK'sal incelemenin analitik duyarlılığının PCR-tabanlı MSI-testle benzer olduğunu ortaya koymaktadır (16). İHK'nın doğrudan MMR protein ekspresyonunu veya kaybını göstermesi ve mutasyon analizini direkt olarak protein kaybı bulunan gene yönlendirebilmesi ek bir avantaj olarak gösterilmektedir(5,17). Ayrıca sporadik kolorektal kanserlerde de MMR protein kaybının görülebilmesi ve bunun tedavi yanıtı ya da prognozu

öngörmedeki halen araştırılan olası rolü nedeniyle tüm kolorektal kanserlerde refleks İHK'sal çalışma yapılmasını öneren yayınlar da mevcuttur (7,18).

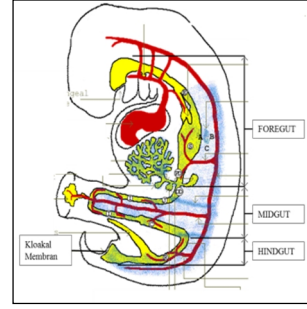
Son yıllarda ayrıca MSI durumunun prognostik belirleyiciliğinin kolon ve rektum tümörleri arasında farklılık gösterebildiği de vurgulanmaktadır (19,20). Ancak farklı lokalizasyonlarda, farklı yaş gruplarında ve farklı diferansiyasyon derecesi ve histolojiye sahip tümörlerde İHK'sal olarak protein ekspresyon kaybındaki farklar üzerine sağlıklı veriler yoktur.

Bu çalışmada 2002-2011 yılları arasında; kolorektal rezeksiyon materyali, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Patoloji Anabilim Dalı'nda "kolorektal adenokarsinom" tanısı almış olguların tümörlerindeki MMR proteinlerinin ekspresyon kaybı immunhistokimyasal yöntemle araştırılmıştır. Protein ekspresyonu kaybı tespit edilen olgularda, saptanan histolojik bulgular; yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, patolojik evre ve "MSI-H ilişkili histoloji" ile korelasyonu açısından değerlendirilmiş, olası gen defekti açısından yorumlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.Embriyoloji

Embriyoda primitif bağırsak, 5'inci haftada gelişir ve ön bağırsak (foregut), orta bağırsak ve son bağırsak (hindgut) olarak üç bölümden oluşur (21,22). Orta barsağın sefalik kısmından duodenumun distal parçası, jejunum ve ileum gelişirken; kaudal kısmından ileumun distal parçası,



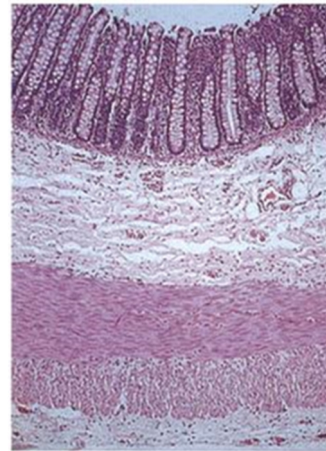
**Şekil 1: Kolonun Embriyolojik Gelişimi**

çekum, apendiks, çıkan kolon ve transvers kolonun 2/3 proksimal kısmı gelişir. Son bağırsaktan transvers kolonun distal 1/3'ü, inen kolon, sigmoid, rektum ve anal kanalın üst kısımları gelişir (21,22). Embriyolojik olarak sağ ve sol kolon farklı taslaklardan gelişmektedir. (Şekil 1)

### 2.2.Histoloji

Gastrointestinal kanal, ortasında değişen çaplarda lümen yapısı bulunan ve bu lümeni çevreleyen dört ana tabakadan oluşan bir sistemdir(23). Bu tabakalar içten dışa sırası ile mukoza, submukoza, muskularis propriya ve serozadır. (Resim 1)

**Mukoza;** epitel, lamina propriya ve muskularis mukozadan oluşmuştur. Kolon epiteli, düzensiz mikrovillus yapısına sahip silindirik hücrelerden oluşur. Çok sayıda goblet hücresi ile az



**Resim 1 Kolonun Histolojik Görünümü**

sayıda enteroendokrin hücre içerir. Lamina propriya, kan ve lenf damarları ile düz kas hücrelerinden zengin gevşek bir bağ dokusudur. Kolonun bakteriyel popülasyonunun fazla olması nedeniyle çok sayıda lenfoid topluluklar içerir. Muskularis mukoza, içte ince sirküler dışta longitudinal düz kas hücrelerinin oluşturduğu tabakadır. **Submukoza**, çok sayıda kan ve lenf damarları yanı sıra submukozal sinir pleksusunu (Meissner Pleksusu) içerir (23). **Muskularis propriya**, içte sirküler, dışta longitudinal seyreden kas liflerinden oluşan bir tabakadır. Bu iki kas tabakası arasında myenterik (Auerbach ) sinir pleksusu bulunur (23). **Seroza**; kan ve lenf damarlarından zengin tek katlı yassı epitel (mezotel) ile döşeli ince gevşek bir bağ dokusudur (23).

### 2.3. Anatomi

İleumun bitiminden itibaren anüse kadar uzanan ve ortalama 150 cm uzunluğunda olan kalın bağırsak, sindirim kanalının 1/5'ini oluşturur. Periton içinde ve retroperitoneal alanda karaciğer, dalak, mide, duodenum, ince bağırsak, böbrekler, üreterler ve mesane gibi organlarla komşuluk gösterir(24).

Kalın bağırsağın bölümleri ve periton ile ilişkisi (24,25) Tablo-1'de verilmiştir.

<b>Tablo 1:</b>	<b>Kalın Bağırsak Bölümleri ve Periton İlişkisi</b>
<b>Anatomik bölümler</b>	<b>Periton İlişkisi</b>
<b>Çekum</b>	Tamamı periton ile örtülü
<b>Çıkan kolon</b>	Retroperitoneal (Lateral ve anterior yüzeyi viseral periton ile örtülü)
<b>Transvers kolon</b>	İntraperitoneal
<b>İnen kolon</b>	Retroperitoneal (Lateral ve anterior yüzeyi viseral periton ile örtülü )
<b>Sigmoid kolon</b>	İntraperitoneal
<b>Rektum</b>	Üst 1/3: Lateral ve anterior yüzeyi viseral periton ile örtülü Orta 1/3: Sadece anterior yüzeyi periton ile örtülü Alt 1/3: Peritoneal yüzey bulunmaz

Kolonun arteriyel dolaşımı superior mezenterik arter (çekumdan splenik fleksuraya kadar) ve inferior mezenterik arter (distalden splenik fleksuraya kadar) ile olur. Sağ ve sol superior rektal arter dalları üst ve orta rektumu kanlandırırken; orta ve inferior rektal arter dalları rektumun 1/3 alt kısmını kanlandırır (26).

Kolonun venöz dolaşımında ise inferior mezenterik ven inen kolon, sigmoid kolon ve proksimal rektumu; superior mezenterik ven çekum, çıkan kolon ve transvers kolonu drene eder. Rektumun üst ve orta bölümleri inferior mezenterik vene katılan superior rektal ven ile drene edilirken; inferior rektal ven ise alt anal kanalı drene eder (26). Lenfatik drenaj kolonda submukoza ve muskularis mukozadaki lenfatik kanallarla olur. Mukozada lenfatik yoktur(25).

Kolonun innervasyonu sempatik ve parasempatik otonom sinirlerle sağlanır. Sağ kolonun parasempatikleri vagustan gelirken; sol kolon ve rektumun parasempatik sinirleri sakral sinirlerden köken alır (26).

Görüldüğü üzere embriyolojik olarak farklı taslaklardan gelişen sağ ve sol kolon anatomik olarak da farklı iki organ profiline sahiptir.

## **2.4.Kolarektal Kanserler**

### **2.4.1.Epidemiyoloji**

KRK'ler bütün dünyada görülmekle birlikte batılı toplumlarda daha sık görülmektedirler. Erkeklerde prostat ve akciğer; kadınlarda meme ve akciğer kanserinden sonra üçüncü sırada gelir (1). Batılı ülkelerde yüksek ölüm oranlarına sahipken gelişmekte olan ülkelerde insidans 10 kata varan düzeyde azalma izlenmektedir. Bu insidans farkına coğrafi farklılıkların, çevresel faktörlerin, özellikle de diyet alışkanlıklarının yol açtığı düşünülmektedir (27). Amerika'da her yıl 141.210 yeni KRK vakası tanımlanmakta ve her yıl yaklaşık olarak 49.380 ölüm görülmektedir. Bu rakamlar tüm kanser olgularının yaklaşık %9'una ve kansere bağlı ölümlerin %8'ine karşılık gelmektedir(1,2).



Ülkemizde ise İzmir Halk Sağlığı Müdürlüğü Kanser Şubesi Kanser Kayıt Merkezi (KİDEM)'nin 2008 yılı verilerine göre KRK'lerde yaşa özel insidans hızı erkeklerde %21,3; kadınlarda 14,5'dir. Bu oranlara göre tüm kanserler arasında erkeklerde 4.; kadınlarda 3. sırada yer almaktadır.

KRK'lar için pik insidans yaşı 60-79 yaşları arasındadır (1). Yaşın ilerlemesi ile kolon karsinom gelişme riski arasında doğru orantı vardır. Genel popülasyonda 40 yaşından itibaren risk artmaya başlar ve her dekatta katlanarak devam eder. Olguların yaklaşık %20'si ise 50 yaş altında ortaya çıkar. Genç yaşta ortaya çıkan KRK'lar için önceden var olan bir inflamatuvar bağırsak hastalığı ya da familyal sendromlardan birinin varlığı araştırılmalıdır (3). Rektum proksimalinde yerleşen tümörler için kadın-erkek dağılımında anlamlı bir fark saptanmamışken; rektum yerleşimli tümörlerde erkek/kadın oranı 1.5/1'dir (2).

#### ***2.4.2.Etiyoloji***

##### **2.4.2.a.Genetik Faktörler**

##### ***Ailesel sendromlar;***

KRK'ler bazı sendromların parçası olarak da görülebilirler.

*Familyal adenomatöz polipozis koli (FAP) sendromu:* Otozomal dominant geçiş gösteren ve APC geninde bir mutant allel ile karakterize bir sendromdur (28). Kolonda 100'ün üzerinde adenomatöz polip varlığı, ailesel öykü ve germline APC mutasyonu ile tanı alırlar (29). Kolon karsinom gelişme riski %100 ulaşan rakamlardadır (4).

*Gardner Sendromu:* Mutiple osteomlar, fibromatozis, epidermal kistler ve tümörler gibi ekstraintestinal bulgularla karakterli FAP sendromu varyantıdır (30).

*MUTYH- ilişkili Polipozis:* 2002 yılında tanımlanmış; otozomal resesif geçiş gösteren, kolonda farklı histolojik özelliklerde (genellikle düşük dereceli

adenomatöz polipler; nadiren eşlik eden hiperplastik polipler), 10'dan fazla polip ve kanser insidansında artış ile karakterli bir sendromdur (31).

*Peutz-Jeghers sendromu:* Mukokütanöz melanin pigmentasyonu ve hamartamatöz GİS polipleri (özellikle ince bağırsak yerleşimli) ile karakterli kalıtsal kanser sendromlarındandır (32).

*Turcot Sendromu:* Kolonda adenomatöz polipler yanı sıra santral sinir sisteminde tümörler ile karakterli nadir görülen bir sendromdur. Olguların üçte ikisinde APC gen mutasyonu, üçte birinde mikrosatellit instabilite saptanmıştır (33).

*Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanser sendromu (HNPCC)/Lynch Sendromu:* DNA MMR genlerinde mutasyonla karakterize otozomal dominant geçiş gösteren bir sendromdur (34-35). Kolon kanseri yanı sıra endometrium, pelvis renalis, ince bağırsak ve üreter tümör insidansında artma görülür. Kolon karsinomu gelişme riski %80'dir (4).

***Ailesel sendromlar dışında,*** Daha önce geçirilmiş kolon karsinomu öyküsü, ailede 1. derecede akrabalarda KRK olması da yüksek risk faktörleri arasındadır (4).

#### **2.4.2.b. Çevresel Faktörler**

***Diyet ve yaşam şekli:*** Yüksek kalorili diyet, ve sedanter yaşam yanı sıra kırmızı et tüketimi, rafine karbonhidratlardan zengin diyet, sigara ve alkol kullanımıyla karakterli batılı diyet tipi ile KRK arasında yüksek ilişki saptanmıştır (37). Bununla birlikte lif içeriği yüksek diyet, uzun süreli nonstroid antiinflamatuvar ilaç kullanımı, fiziksel aktivite ve östrojen replasman tedavisinin KRK'ya karşı koruyucu olduğu öne sürülmektedir (38,39).

***Kronik inflamasyon:*** Kronik inflamatuvar bağırsak hastalıklarında, özellikle hastalığı erken yaşta başlayan ve geniş tutulumu sahip (pankolitli), 8-10 yıllık öyküsü olan hastalarda risk artmaktadır (2). Ülseratif kolitte, hastalığın süresi ve yayılımı risk faktörüdür. Kolonun yarısını tutan

hastalıklarda karsinom gelişme riski %15 iken; sadece sol kolon yerleşimli hastalıkta karsinom gelişme riski %5 olarak bildirilmiştir (40). Crohn hastalığı; hem ince hem de kalın bağırsak karsinom riskinde artışa yol açar. Uzun süreli ve erken başlangıçlı hastalık, riski normal populasyona göre 3 kat artırmaktadır (40).

**Radyasyon:** Pelvik radyasyona maruz kalma rektal kanser oluşumunda kanıtlanmış bir risk faktörüdür(2). Özellikle prostat, serviks ve vagina kanserleri nedeniyle pelvik radyoterapi uygulanmış hastalarda rektum kanseri gelişme riski artmaktadır. Radyoterapi sonrası oluşan kolon kanserlerinin karakteristik bir özelliği yüksek miktarda müsin üreten tümörler olmalarıdır (41).

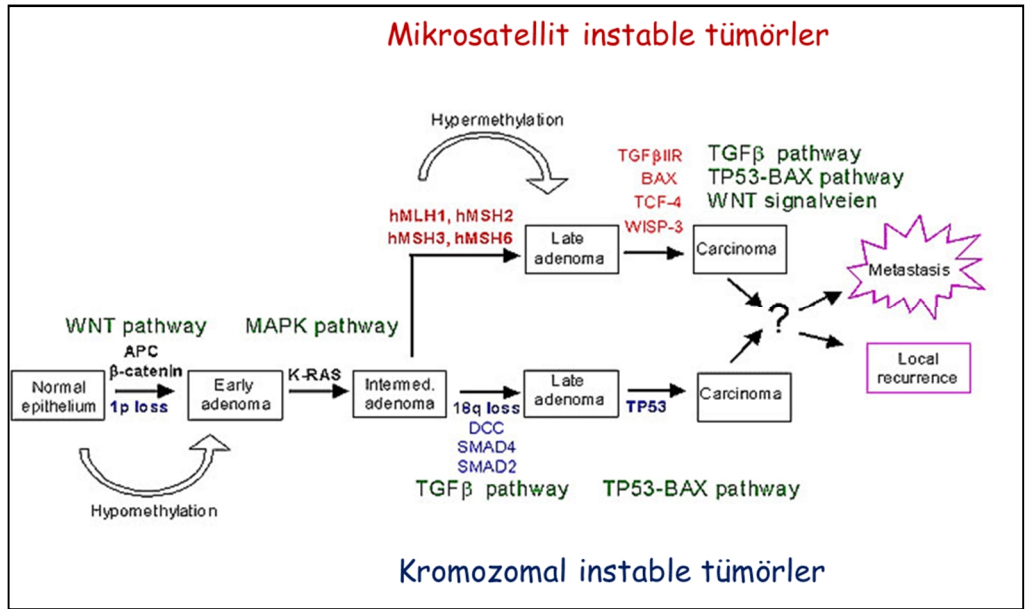
#### **2.4.3.Klinik Özellikler**

Kolorektal karsinomlar uzun yıllar bulgu vermeden kalabilirler. Semptomlar genelde tanı konmadan aylar önce başlar. Çekum ve sağ kolon kanserleri sıklıkla halsizlikle kendini gösteren demir eksikliği anemisi nedenleri araştırılırken saptanırlar. Sol kolon tümörleri ise gizli kanama, bağırsak alışkanlıklarında değişiklikler veya sol alt kadranda kramp tarzında ağrı ve tenezm gibi bulgular verirler. Teorik olarak belirgin bağırsak fonksiyon değişiklikleri, kabızlık, diyare, melena gibi bulgular verdikleri için sol kolon tümörlerinin erken dönemde yakalanma şansı daha yüksektir. Ancak özellikle rektum ve sigmoid kolon yerleşimli tümörler, proksimalde yerleşenlere göre daha infiltratif olma eğiliminde olduklarından daha kötü prognoza sahiptirler (2,4).

#### **2.4.4. Kolorektal Karsinogenezis**

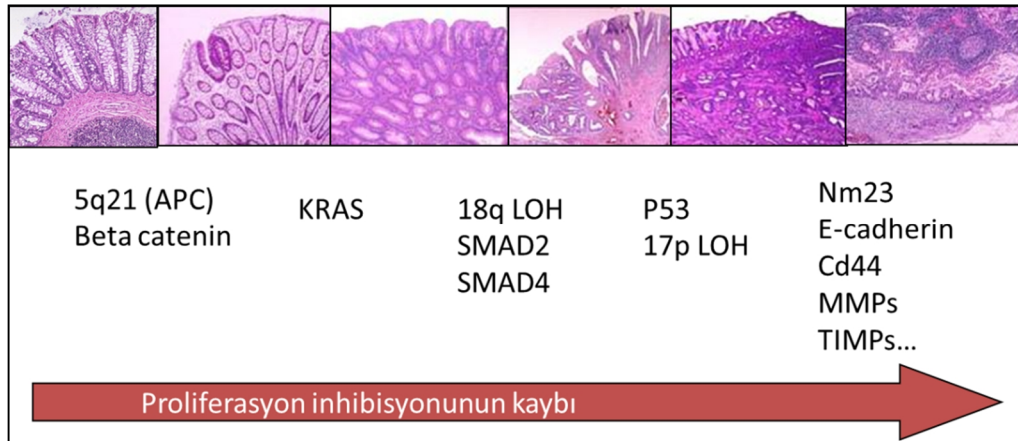
KRK'lerin büyük bir bölümü sporadik olarak meydana gelir. Başlatıcı (inisiyatör) faktörlerden bağımsız olarak tümörlere öncülük eden iyi tanımlanmış genetik değişiklikler dizisi vardır (42). 1990'lı yıllardan itibaren

KRK gelişiminde önemli rol alan iki farklı patogenetik yolak olduğu bilinmektedir (42-44). Her iki yolak da birbirini takip eden basamaklar halinde çok sayıda mutasyonun birikimi ile karakterlidir. APC/ $\beta$ -katenin yolağı ve Mikrosatellit İstabilite Yolağı olarak tanımlanan bu iki yolak Şekil 2’de özetlenmiştir. Günümüzde ayrıca inflamatuvar bağırsak hastalığı zeminindeki karsinom gelişimini tanımlayan “kolit-ilişkili karsinogenez” ve daha önce non-neoplastik olarak kabul edilen hiperplastik polipler ve varyantlarında karsinom gelişimin ortaya konması ile birlikte tanımlanan “serrated yolağı” gibi yeni karsinogenezis yolakları da ortaya atılmıştır (44,45).



Şekil 2 Adenom-karsinom sekansı ve MSI yolağı (42)

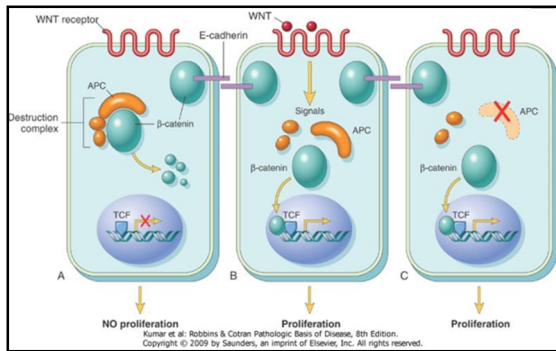
**a-APC/β-katenin yolu:** Bir seri onkogen ve tümör supresör gendeki mutasyonların birikimi ile sonlanan kromozomal instabilite ile karakterize bir yoldur(36). Bu yolak boyunca kolon kanserinin moleküler gelişimi morfolojik olarak da ayırt edilebilen bir seri aşama üzerinden olur. Başlangıçta kolonda lokal epitel proliferasyonu vardır. Bu proliferasyonu; “küçük” adenom oluşması, bu adenomun büyümesi ve displastik bir hal alıp invaziv kanser gelişmesi takip eder (Şekil 3). Buna adenom-karsinom sekansı denir(4).



Şekil 3: Adenom-karsinom sekansının histolojik yansıması (42)

**APC gen kaybı:** APC (Adenomatous polyposis coli) geni 5q21’de haritalanmıştır(46). Bu genin “mutasyonunun” FAP sendromunun genetik temelini oluşturduğu; “kaybının” ise

adenom oluşumunun en erken olayı olduğuna inanılmaktadır (28,36). APC tümör supresör geni mikrotübül demetlerini bağlayan, hücre göçü ve adezyonunu kontrol eden APC proteinini kodlamaktadır (47). APC proteini, aynı zamanda β-katenin “down regülasyonunu” da kontrol eder (48) (Şekil 4). β-katenin hücre duvarında Kaderin kompleksine ait hücre adezyon proteinlerinin bir üyesi olmakla birlikte nükleusa geçerse transkripsiyon faktörü olarak görev almaktadır(46-



Şekil 4: WNT- APC- β-katenin sinyal yolu (2)

48). Mutant APC proteini, hücre sitoplazmasında ve nükleusunda  $\beta$ -katenin proteinin artmasına ve WNT-APC-  $\beta$ -katenin sinyal yolağının bozulmasına neden olur (49). Nükleusta biriken  $\beta$ -katenin ise hücre proliferasyonunu ve apoptozisi düzenleyen genler olan c-myc ve siklin D1 üzerinden hücre bölünmesini başlatır (50). Bu sinyal yolağı normal bağırsak epitelinin gelişimde kritik bir yol oynar. KRK'lerin %80'den fazlasında APC geni inaktivasyonu, %25'sinden fazlasında  $\beta$ -katenin mutasyonu bulunmaktadır (48). APC fonksiyonunun olmayışı ayrıca hücre adezyonunu azaltmakta ve hücre proliferasyonu artırmaktadır (47-50).

***K-RAS mutasyonu:*** K-RAS hücre içi sinyal iletiminde rol alan bir proteindir. KRK'lerde ve adenomlarında en sık görülen aktive olmuş onkogendir. KRK'lerin yaklaşık %40-45'inde K-RAS mutasyonu görülmektedir (36). Saptanabilen K-RAS mutasyonlarının büyük bir kısmı 12,13 ve 61. kodonda bulunur (51). Mutasyon sonucu hücre içinde RAS proteini bağımlı GTPaz aktivitesi azalmakta ve hücre içi sürekli bölünme sinyali taşınmasına neden olmaktadır (52).

***SMAD'ların kaybı:*** Kolon kanserlerinde diğer bir ortak özellik 18q21'de allel kaybıdır. Bu allelde SMAD2 ve SMAD4 tümör supresör genleri bulunur ve TGF- $\beta$  büyüme sinyali inhibisyonunda görev alırlar (36,53). KRK'lerin %60'ında SMAD4'ün "kayıbı" gözlenmektedir (36).

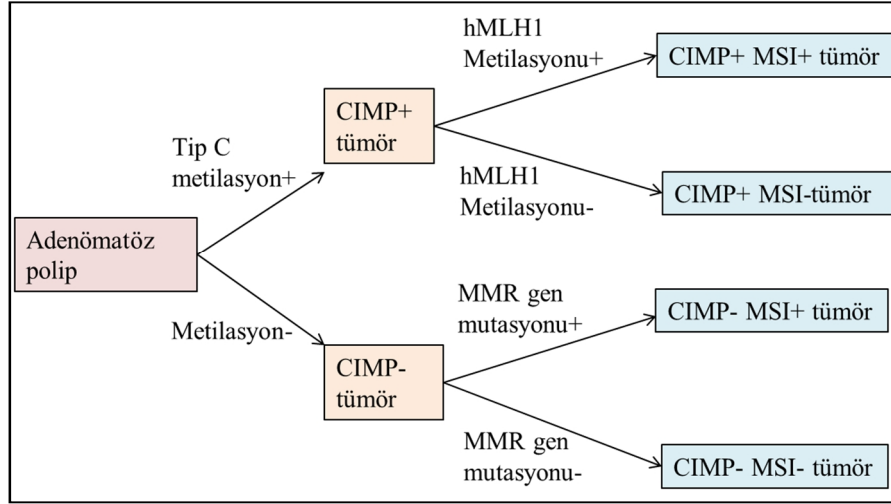
***p53 kaybı:*** TP53 hücre siklusunun düzenlenmesinden sorumlu tümör supresör genlerden olup 17. kromozomun kısa kolunda yerleşir ve p53 proteinini kodlar (36,54). Kolon kanserlerinde %70-80 oranında TP53 gen kaybı bulunmuştur. Adenomlarda nadir olması kolon karsinogenezinde p53 gen kaybının son basamaklarda olduğunu destekleyen bir bulgudur (36).

***Telomeraz aktivasyonu:*** Telomerler kromozomların stabilize edilmesinde rol oynarlar. Her hücre bölünmesi sırasında kısalırlar. Telomeraz aktivitesi bütün kanser hücreleri için ön şart olan hücre ölümsüzlüğünü sağlamak için gereklidir (55).

**b-Mikrosatellit İnstabilite (MSI) Yolağı:** MSI yolağı ile ilişkili tümörlerin DNA replikasyonu sırasında hatalı eşleşen (mismatch) baz çiftlerini bularak onaran genlerdeki (Mismatch repair gen) bozukluk-kayıp sonucu geliştiğı düşünölmektedir (9). Ancak adenom-karsinom sekansı gibi açıkca bilinen bir morfolojik yansıması yoktur (4,56). (Bu yolak bir sonraki bölümde ayrıntılı olarak tartışılacaktır.)

**c-“CpG Island” Metilatör Fenotipi (CIMP):**

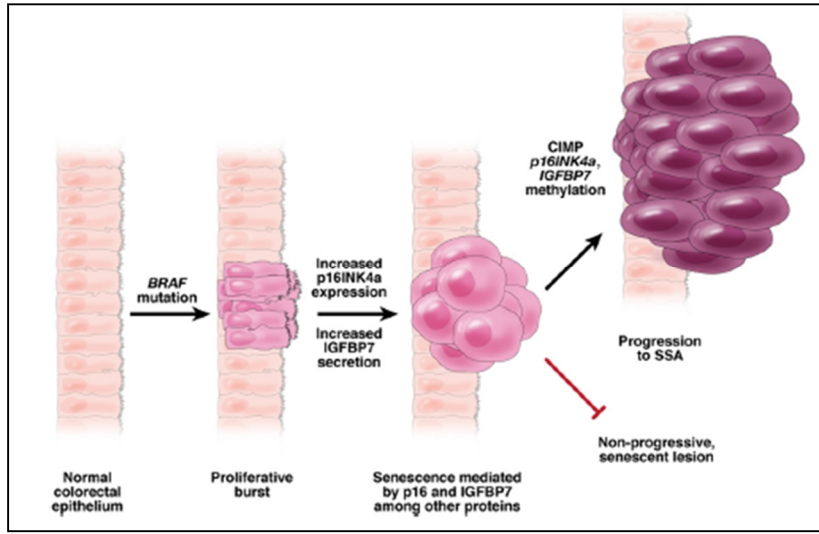
Birçok gende sitozin ve guanin nükleotidlerinden zengin ve “Sitozin-guanin (CpG) adaları” olarak tanımlanan alanlar bulunmaktadır. Kanserli dokulardan elde edilen DNA örneklerinde bu alanları kapsayan, geniş metilasyon alanları gözlenmiş ve bu özellik “CpG Island Methylator Phenotype (CIMP)” olarak tanımlanmıştır (57). Bir takım tümör supresör genlerin promotor bölgeleri de CpG adalarınca zengindir. Bu bölgelerin metilasyonu kromozomal yapıyı değıştirerek, mutasyon olmaksızın epigenetik fonksiyon kaybına neden olmaktadır (2). Bu nedenle bu süreci “epigenetik instabilite” olarak adlandıran yazarlar da mevcuttur (58). Promotor bölgelerdeki metilasyon, yaşa bağılı (Tip A metilasyon) görölebildiğı gibi; kanser ilişkili spesifik, yaygın CpG bölgesi metilasyonu (Tip C metilasyon) şeklinde de görölebilir (2). Tip C metilasyon, hMLH1, MGMT, p16, E-cadherin, gibi genlerde de görölmektedir (36,44). hMLH1CIMP pozitif KRK’ların %10-20’sinde BRAF mutasyonu da saptanmıştır (36) Bu nedenle bir tümörü MMR kaybı ilişkili MSI tümör olarak değıerlendirmeden önce bu olasılıkların da göz önünde bulundurulması önemlidir (Şekil 5).



**Şekil 5:** CIMP yolağı ve MSI ile ilişkisi (44)

**d-“Serrated Yolağı”:** Moleküler patolojinin gelişmesi ve polipozis sendromlarının daha iyi tanınması ile birlikte daha önce non-neoplastik polipler olarak tanımlanan Hiperplastik polipler, sesil serrated adenomlar ve geleneksel (traditional) serrated adenomlar “serrated polipler” başlığı altında toplanmış ve “serrated yolağı” üzerinden KRK gelişiminde rol oynadıkları kabul edilmiştir (35,59). Daha sonra bu poliplerde MGMT (0-6-Methylguanine DNA Methyltransferase) veya MLH1 genlerinde hipermetilasyon sonucu ekspresyon kaybı saptanmış ve sporadik MSI tümörler ile yakından ilişkili oldukları bulunmuştur (44,60). Serrated poliplerde saptanan hedef mutasyonlar ve MSI-H özellik, adenom-karsinom sekansı için yeni bir yolak olarak tanımlanmıştır. Ayrıca BRAF ve K-RAS mutasyonları sonucu Mitojen-aktive protein (MAP) kinaz sinyal yolağı üzerinden gerçekleşen apoptoz inhibisyonu da yaygın saptanan bir bulgudur (59). Daha sonra yapılan çalışmalarda serrated yolağı üzerinden geliştiği bilinen KRK’lerin %20’sinde CpG adalarının hipermetilasyonu saptanmış ve serrated yolağının son basamaklarında meydana geldiği anlaşılmıştır (61). Aynı şekilde BRAF mutasyonlarının ise serrated yolağı üzerinden gelişen karsinogenezde ilk basamaklarda ortaya çıktığı savunulmaktadır (Şekil 6).





Şekil 6: “Serrated” yolağı üzerinden karsinom gelişimi (10)

#### 2.4.4.a. Kolorektal Karsinomların Moleküler Klasifikasyonu

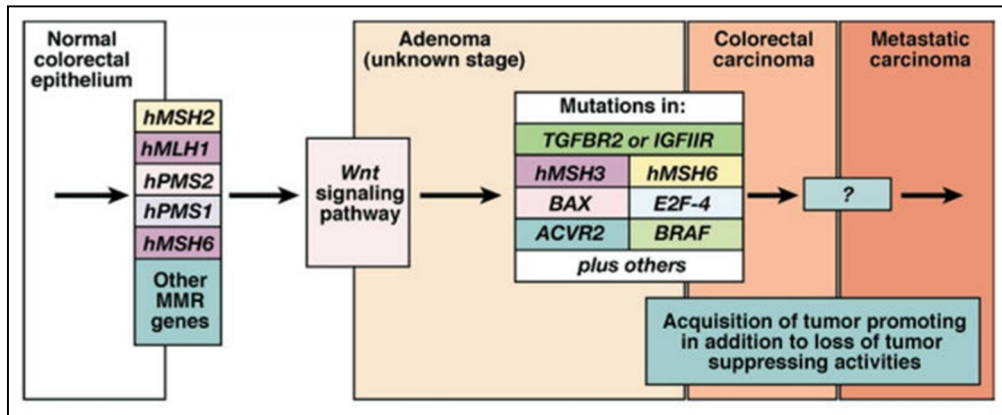
Görüldüğü gibi kolorektal karsinogenezisde (Vogelstein tarafından 1990 yılında ilk kez tanımlanmasından itibaren) birçok moleküler gelişim basamağı ortaya konmuş olup, bu durum yeni ve moleküler bir klasifikasyon ihtiyacını ortaya çıkarmıştır(42). 2007 yılında Jass tarafından klinik, morfolojik ve moleküler korelasyona dayandırılarak hazırlanan sınıflama Tablo-2’ de verilmiştir (62).

**Tablo 2: Kolorektal Karsinomlarda moleküler alt tipler**

Tip	Moleküler Özellikler	Morfolojik Özellikler
Tip 1	CIMP-H/ MSI-H/ BRAF mut	Serrated poliplerden gelişen sporadik MSI-H tümör (%12)
Tip 2	CIMP-H/MSI-L veya MSS/BRAF mut	Serrated polip gelişimi (%8)
Tip 3	CIMP-L/MSI-L veya MSS/KRAS mut	Adenom ya da serrated polip gelişimi(%20)
Tip 4	CIMP negatif/ MSS	FAP ya da MUTYH ilişkili polipozis sendromları (%57)
Tip 5	CIMP negatif/MSI-H/BRAF mut. negatif	Lynch Sendromu (%3)

## 2.5.Mikrosatellit İnstabilite

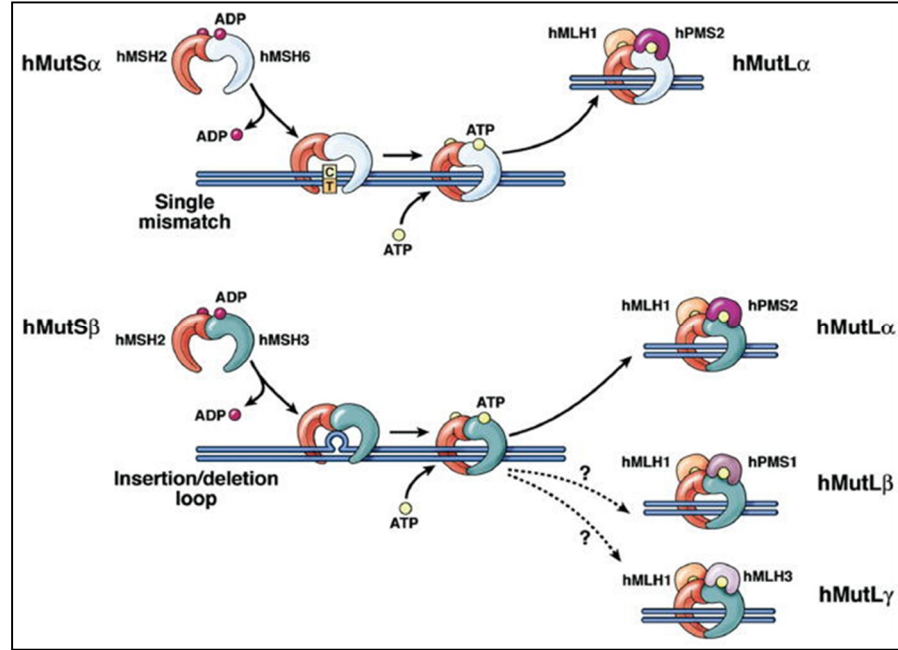
**İnsan DNA'sında Mikrosatellitler:** İnsan genomu; sayısı yüzbinleri bulan, en çok altı baz dizisi kadar uzunluğa sahip tekrarlayan sekanslar içermektedir (63). Bu sekanslar “mikrosatellit”ler olarak adlandırılmaktadırlar ve genellikle DNA'nın protein kodlamayan “promotor” bölgelerinde bulunmaktadır. Bu yüzden DNA replikasyonu sırasında nötral mutasyonların yığılma alanlarına karşılık gelmekte ve insandan insana oldukça değişen “polimorfizm” gösterebilmektedir (9). Bu mutasyonlar, jel elektroforez ya da DNA sekanslama yöntemleri ile ortaya koyulabilmektedir. Bunun yanı sıra; hücre siklusu kontrolü ve kanser gelişiminde rol alan TGFβRII, IGF2R ve BAX gibi birtakım gen ürünleri de mikrosatellit sekanslar tarafından kodlanmakta ve farklı aşamalar üzerinden karsinogenezise neden olabilmektedirler (44).



Şekil 7: MSI yolağı ve karsinom gelişim basamakları (56)

**DNA Mismatch Repair (MMR- Hatalı Eşleşme Onarımı) Sistemi:** DNA MMR sistemi ilk olarak Escherichia Coli'de tanımlanmıştır (64). Başlıca, DNA replikasyonu sırasında meydana gelen ve baz dizileri arasındaki hatalı eşleşme şeklindeki insersiyon/delesyonlarla karakterli mutasyonları düzeltmekten sorumludur (44). E. Coli'de tanımlanan sistem, mutS, mutL, mutH gibi proteinlerinden oluşmaktadır (65). DNA MMR sistemi tarafından onarıldığı kanıtlanmış ilk hatalı eşleşme; GATC sekansında adenin metilasyonunun kaybıdır. Prokaryotlarda DNA replikasyonu sırasında kalıp

zincir metillenmiş durumdayken; yeni sentezlenen zincir birkaç dakikalık gecikme ile metillenmektedir. Bu zaman sürecinde yeni zincirdeki hatalı eşleşen bazlar mutS tarafından tespit edilerek sırasıyla mutL ile mutH ile kompleks oluşturur ve DNA boyunca çift yönlü olarak metillenmemiş bir GATC dizisi buluncaya kadar hareket ederek DNA onarımını gerçekleştirirler (65) (Şekil 8). GATC bölgesi ile hatalı eşleşme arasındaki uzaklık en çok 1000 baz çifti kadar olabilmektedir (66).



Şekil 8: E. Coli ve insanda DNA MMR sistemi çalışma mekanizması (56)

Prokaryotlarda tanımlanan bu sistem daha sonra insan genomunda da tanımlanmış ve E.coli'deki mut proteinleri ile homolog proteinlere sahip oldukları görülmüştür (67,68). İsimlendirme aşamasında kullanılan “mut” takısı, bakterilerde bu proteinin kaybı sonrası, genomun mutasyonlara açık hale gelmesine, “hipermutabiliteye” karşılık olarak kullanılmıştır ve insan genomunda isimlendirilirken; örneğin “mutS homolog 2” proteini gösterecek şekilde MSH2 olarak kısaltılmıştır (69).

E. coli-insan DNA MMR proteinleri homologları,

**Mut S** için → MSH1, **MSH2**, MSH3, MSH4, MSH5, **MSH6**;

**Mut L** için → **MLH1**, **PMS2**, PMS1 ve MLH3'dür.

Tanımlanan MMR proteinleri heterodimerler şeklinde fonksiyon göstermektedirler. İnsersiyon/delesyon noktalarında yanlış eşleşen baz çiftlerini MSH2-MSH6 kompleksi saptamaktadır (69,70) . Fakat DNA MMR sisteminin hatayı düzeltebilmesi için MLH1-PMS2 kompleksinin de işlev görmesi gerekmektedir. MMR heterodimerleri arasında dominant görevde olan proteinler MSH2 ve MLH1'dir. Dominant proteinlerin inaktif halde olması durumunda heterodimer oluşturdıkları MSH6 ve PMS2 proteinleri de instabil halde bulunurlar (71).

Hem ökaryotlarda, hem de prokaryotlarda DNA MMR sistemi herhangi bir mutasyon tarafından inaktive edilirse; genom içerisindeki birçok mikrosatellite mutasyon meydana geldiği ortaya konmuştur (34).

MMR ilişkili genler, genomdaki lokalizasyonları ve işlevleri Tablo 3'de verilmiştir.

**Tablo 3: MMR ilişkili genler, genomdaki lokalizasyonları ve işlevleri**

<b>MLH1</b>	Lokalizasyon	Chr 3q22(72)
	E.Coli Homologu	Mut L
	İşlevi	-PMS2 ile heterodimer oluşturur -MSH2/MSH6 heterodimeri ile bağlanarak DNA onarımına katılır(73)
	İlişkili Sendromlar	HNPCC(73), Turcot, Muir-Torre(74) sendromları Lynch ilişkili-endometrium karsinomları(75)
<b>MSH2</b>	Lokalizasyon	Chr 2p21(76)
	E.Coli Homologu	Mut S
	İşlevi	-MSH6 ve MSH3 ile heterodimer oluşturur(73) -Heterodimer şeklinde DNA'da hatalı bölgeleri tespit eder(77)
	İlişkili Sendromlar	HNPCC, Muir-Torre sendromu ve nadir olarak endometrium karsinomu(74,75)
<b>MSH6</b>	Lokalizasyon	Chr 2p16(78)
	E.Coli Homologu	Mut S
	İşlevi	-MSH2 ile heterodimer oluşturur -ATPaz aktivitesi ile hatalı bazı DNA zincirinden kesip çıkartabilir(77)
<b>PMS2</b>	Lokalizasyon	Chr 7p22(79)
	E.Coli Homologu	Mut L
	İşlevi	-MLH1 ile heterodimer oluşturur(73)

### ***2.5.1. Mikrosatellit İnstabilite Ve Kolorektal Karsinomlar***

KRK'lerde, yapılan DNA analizlerinde, genomun tekrarlayan sekanslarında (mikrosatellitlerde) çok sayıda insersiyon ve delesyonlar ile karakterize mutasyonlar fark edilmiştir (34). Bu durum "Mikrosatellit instabilite (MSI)" olarak adlandırılmakta ve DNA MMR gen kaybının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (6-10). KRK için, referans olarak kullanılacak beş adet mikrosatellit genden (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250) oluşan bir panel tanımlanmıştır (80-81). Tümörler, eğer iki veya daha fazla mikrosatellite mutasyon saptanırsa "mikrosatellit instabilite-high (MSI-H)"; sadece bir mikrosatellite mutasyon saptanırsa "mikrosatellit instabilite-low" (MSI-L) olarak sınıflandırılırlar. Eğer instabilite saptanmazsa "mikrosatellit stable" (MSS) tümörler olarak tanımlanırlar (2). MSI-H tümörlere özgü iyi tanımlanmış histolojik özellikler mevcutken, MSI-L ve MSS tümörlerin klinikopatolojik yansıması arasında belirgin bir fark vurgulanmamaktadır.

Günümüz için MSI, HNPCC-Lynch Sendromu için altın standart kabul edilmekle birlikte sporadik kolon kanserlerinin %15'inde de MSI saptanmaktadır (5). Lynch Sendromuna ve tanı kriterlerine ileride daha detaylı değinilecektir.

Tümörlerin MSI durumunun tespiti başlıca 3 nedenden dolayı önemlidir.

1-MSI-H tümörler, kromozomal instabilite yolağı üzerinde gelişen aynı evredeki tümörlere göre daha iyi prognoza sahiptir yani sağkalımla yakından ilişkilidir.

2-MSI-H tümörler, kolon kanserinin klasik tedavisinde kullanılan 5-FU bazlı kemoterapiye genellikle kötü yanıt verirler, yani tedavi seçiminde olası prediktif önem taşımaktadır.

3-MSI-H tümörler, HNPCC-Lynch Sendromu ile ilişkili olabilmektedir (2,14).

### 2.5.2. Lynch Sendromu

İlk olarak 1913 yılında tanımlanmış, DNA MMR genlerinde germline mutasyonla karakterize otozomal dominant geçiş gösteren bir sendromdur(5). İlk yıllarda Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanseri Sendromu (HNPCC) olarak isimlendirilmekle birlikte ekstraintestinal malignite (endometrium, over, pelvis renalis, ince bağırsak ve üreter tümörü) insidansında artışa neden olduğundan günümüzde sendrom olarak tanımlanmakta ve tanımlanmasında büyük katkı sağlayan Henry. T. Lynch'e ithafen "Lynch Sendromu" olarak anılmaktadır (34). Lynch Sendromu ilişkili tümörler, tüm KRK'in %2-5'ini oluşturmaktadır ve erken yaşta sağ kolon yerleşimli, iyi prognoza sahip tümörler ile karakterizedir (82).

Lynch Sendromlu ailelerin genetik temelinde; kromozomun tek allelinde kalıtsal olarak gelen, çoğunlukla iki majör DNA MMR genindeki (MLH1 ve MSH2) germline mutasyonlar yatmaktadır(83). DNA MMR proteinlerinde defekt ortaya çıkması için diğer alleldeki genin inaktive olması gerekmektedir. Bu ikinci vuruş olarak değerlendirilebilecek inaktivasyon; delesyon, metilasyon ya da nokta mutasyonları şeklinde gelişebilmekte ve genellikle APC ve/veya  $\beta$ -catenin mutasyonları sonucunda oluşmaktadır (5).

***Lynch Sendromu tanısına yaklaşım:*** Klinik olarak Lynch Sendromu tanısı "Amsterdam kriterleri (1990) ve "Modifiye Amsterdam kriterleri (1998)" olarak adlandırılan kriterler uyarınca ailedeki en az 2 jenerasyonun kanser öyküsünün ve kanser görülme yaşlarının değerlendirilmesi ve familial adenomatöz polipozisin elenmesiyle konulmaktadır (84). MSI testi için seçilecek olguların belirlenmesinde ise "Bethesda kriterleri (1996) ve Revize Bethesda kriterleri (2004) uygulanmaktadır (80-81). (Tablo 4).

#### **Tablo 4: Revize Bethesda Kriterleri**

---

- 1-Kolorektal kanser tanısını 50 yaşın altında almak**
- 2-Yaştan bağımsız olarak Lynch sendromu ilişkili çoklu, senkron veya metakron tümöre sahip olmak**
- 3-60 yaşın altındaki olgularda tümörün MSI-H ilişkili tümör fenotipi özelliklerine sahip olması**
- 4-Bir veya birden fazla birinci derece akrabada, biri 50 yaşın altında gelişmiş Lynch Sendromu ilişkili tümörün bulunması**
- 5-Yaştan bağımsız olarak 2 ve ya daha fazla birinci veya ikinci derece akrabada Lynch Sendromu ilişkili tümörün bulunması**

Lynch Sendromu olasılığı olan olguların ayırt edilebilmesi, hem bu olguların hem de risk altındaki diğer aile bireylerinin kolorektal ve ekstraintestinal kanserler açısından yakın takibini sağlayabilmektedir. Bu yüzden bu bireyleri saptamaya yönelik birçok çalışma yapılmış ve çeşitli algoritmalar geliştirilmiştir.

Tümörlerin MSI durumunun tespiti ve Lynch Sendromu kuşkusu olanların belirlenebilmesi için başlıca 3 yöntem mevcuttur.

1-MSI-test: Doku örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile DNA'daki seçilmiş 5 mikrosatellit bölgesindeki (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250) değişikliklerin değerlendirilmesidir. Günümüzde MSI tespiti için altın standart olarak kabul edilmektedir.

2-Protein İHK: Doku örneklerinde İHK'sal olarak MMR proteinlerinin (MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2) ekspresyon kaybının belirlenmesidir.

3-Genetik test: Klinik olarak Lynch Sendromuna sahip olduğu kuşkusu duyulan/bilinen kişilerin aile bireylerini tarama amacıyla kan örneklerinde MMR genlerine yönelik mutasyon araştırılmasıdır.

Bu testlerin her birinin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları mevcuttur. PCR tabanlı bir test olan MSI-test için elde edilen DNA'nın sadece tümör DNA'sı olması gerekmekte ve bunun sağlanabilmesi için de mikrodiseksiyon uygulanması gerekebilmektedir. Aksi takdirde komşu normal mukozaya ait DNA fragmanlarının kontaminasyonu yanlış değerlendirmelere



yol açabilmektedir. Ayrıca bütün mikrosatellit bölgelerinin sekanslanması test maliyetini artırmaktadır (5).

İHK'sal olarak DNA MMR protein kaybının gösterilmesi ise direkt olarak ilgili gene yönelik bilgi verebilmektedir (Tablo 5), böylelikle gereğinde sadece ilgili gene yönelik mutasyon analizi yapılabilmektedir (5).

**Tablo 5: MMR protein immunhistokimyası ve olası defektif gen ilişkisi**

İHK Sonuçları	Defektif Gen
MLH1 PMS2 kaybı	MLH1
MSH2 MSH6 kaybı	MSH2
İzole PMS2 kaybı	PMS2
İzole MSH6 kaybı	MSH6

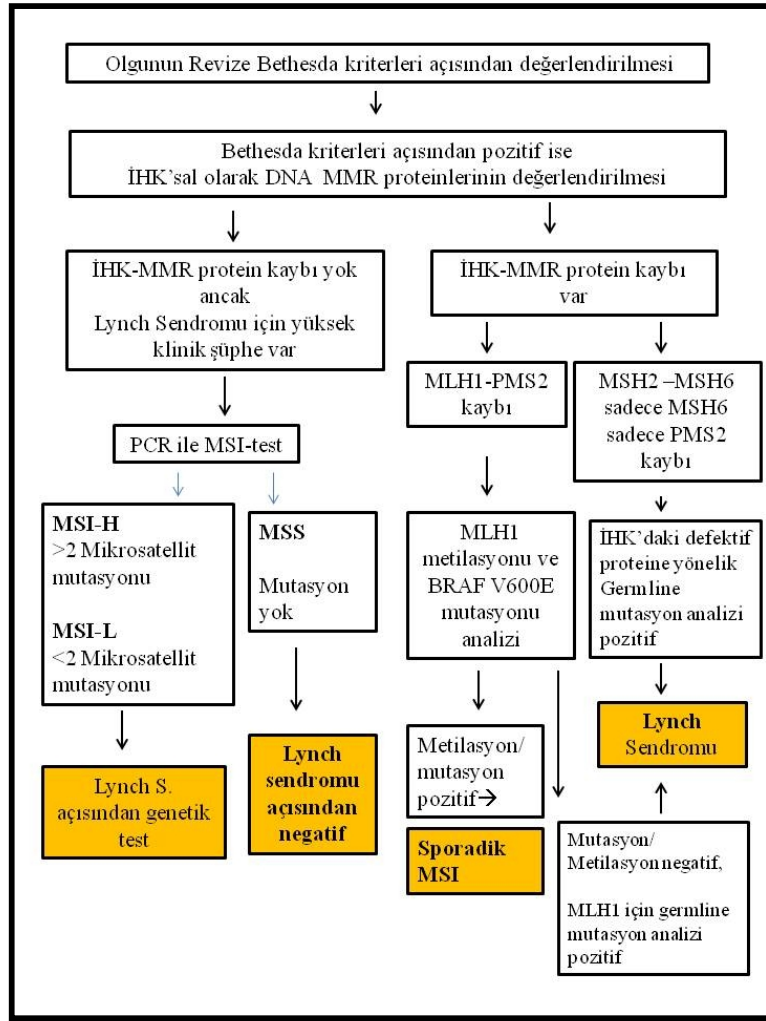
İHK'sal inceleme sonuçları değerlendirilirken “yalancı negatiflik” ve “yalancı pozitiflik” olasılığı da göz önünde tutulmalıdır. DNA MMR genlerindeki “missense” mutasyonlar sonucunda; ilgili proteinde fonksiyon kaybı olmasına rağmen antijenik özelliğini kaybetmemiş olabilir. Bu durum İHK'sal olarak bu proteinde pozitif boyanma elde edilmesine neden olacağından “yanlış pozitiflik” saptanacaktır (85). Yanlış pozitiflik genellikle MLH1 proteininde saptanmaktadır (85). İHK'sal inceleme sonuçları değerlendirilirken bir diğer akılda tutulması gereken nokta da; boyanmanın topografik heterojenite gösterebilmesi ve bu yüzden “yalancı negatif” sonuçlara neden olabilmesidir (86). Fakat DNA MMR proteinlerinin heterodimer şeklinde çalışması ve birinin inaktivasyonu durumunda; diğerinin de inaktif hale geçmesi nedeniyle 4 proteinin (MLH1/PMS2, MSH2/MSH6) birlikte kullanılması “yalancı negatiflik” sorununu çözebilmektedir(5,85). Ayrıca İHK'sal inceleme için seçilen örnek içerisinde pozitif kontrol alanlarının olmasına özen gösterilmelidir.

Lynch Sendromu tanısal sürecinde algoritmik bir yaklaşım uygulanmaktadır (Şekil 9).

Algoritmanın ilk basamağı klinik olarak Amsterdam ve Revize Bethesda kriterlerini karşılayan veya MSI-H fenotipe sahip olgularda İHK'sal olarak DNA MMR protein ekspresyonu kaybının gösterilmesidir (5,7). Genetik inceleme yapılacak hasta seçimi için birçok yönergede altın standart olarak MSI-test yapılması önerilmekle birlikte İHK'sal inceleme; doğrudan DNA MMR protein ekspresyonunu veya kaybını göstermesi ve mutasyon analizini direkt olarak protein kaybı bulunan gene yönlendirebilmesi nedeniyle algoritmanın ilk basamağına alınmıştır (17). Son yıllarda yapılan çalışmalar dört antijeni içeren (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) İHK'sal incelemenin analitik duyarlılığının PCR-tabanlı MSI testle benzer olduğunu ortaya koymaktadır (16,87,88). Bugün için MSI-test sadece İHK'sal olarak DNA MMR protein ekspresyonu normal, klinik olarak MSI-H fenotipe sahip tümörlerde önerilmektedir (89).

İHK'sal olarak DNA MMR proteinlerinden MSH2-MSH6 heterodimerinde ya da sadece MSH6 veya sadece PMS2 de kayıp saptanması durumunda; ilgili proteinlerin hedef genlerine yönelik PCR ile germline mutasyon analizi yapılmakta, mutasyon saptanması durumunda hasta Lynch Sendromu olarak değerlendirilmektedir.

İHK'sal olarak MLH1 ve PMS2 proteinlerinde eş zamanlı kayıp saptanması durumunda "sporadik MSI" olasılığı açısından öncelikle BRAF V600E mutasyonu ve MLH1 metilasyon analizi önerilmektedir. Eğer BRAF V600E mutasyonu ve MLH1 metilasyonu saptanmaz ise; MLH1 genine yönelik germline mutasyon analizi yapılmaktadır. MSI durumunun belirlenmesi karşılayan; fakat İHK'sal olarak DNA MMR proteinlerinde kayıp saptanmayan vakalarda yapılmaktadır. Bu durumda KRK için belirlenen 5 adet mikrosatellit panelin PCR ile sekanslanması yapılmakta ve MSI durumu belirlenmektedir. MSI-H ya da MSI-L tümörler saptanırsa Lynch Sendromuna yönelik germline mutasyon araştırılması yapılmaktadır (5).



Şekil 9: Lynch Sendromu tanı algoritması.

Ayrıca DNA MMR protein kaybının sporadik kolorektal kanserlerde de görülebilmesi ve bunun tedavi yanıtı ya da prognozu öngörmedeki halen araştırılan olası rolü nedeniyle, tüm kolorektal kanserlerde refleks İHK'sal çalışma yapılmasını öneren yayınlar da mevcuttur (7,18). 2010 yılında toplanan Lynch Sendromu Çalışma grubu 70 yaş altı tüm kolorektal kanser vakalarında İHK'sal inceleme önermektedir (83).

### 2.5.3.Sporadik MSI Tümörler

Sporadik KRK'lerin %10-15'i MSI tümörlerdir (5,7,16,35). Sporadik MSI tümörler, %90 oranında MLH1'in promotor bölgesinin hipermetilasyonu

ile karakterlidir. MLH1 ekspresyonu kaybı, MLH1'in her iki allelindeki promotor bölgesindeki CpG adalarının hipermetilasyonu sonucu oluşmaktadır. Bu nedenle İHK'sal olarak MLH1 proteininde ekspresyon kaybı olan vakalarda mutasyon analizi öncesi MLH1 metilasyon testi önerilmektedir. Lynch Sendromunda öncelikle germline mutasyonlar görülmekle birlikte nadir de olsa MLH1 geninde hipermetilasyon da tanımlanmıştır (90). Bu durum somatik-germline MLH1 mutasyonu ayırımını sağlayacak başka analiz arayışlarına neden olmuştur. Bu süreç içerisinde birçok kanserin gelişiminde BRAF mutasyonlarının rolü ortaya konmaya başlanmıştır.

BRAF mutasyonunun hücre içi Ras/Raf/Map Kinaz sinyal yolağında aktivasyona yol açarak özellikle melanom, KKK ve overyan kanserlere neden olduğu bulunmuştur. Saptanabilen BRAF mutasyonları genellikle nokta mutasyonları şeklinde olup; sıklıkla kodon 600 (V600E)'deki glutamik asit yerine valin aminoasidinin geçmesi sonucu meydana gelmektedir(91). Sporadik MSI olgularının %40-50'sinde BRAF-V600E mutasyonu saptanmıştır. Sendrom ilişkili tümörlerde görülmemesi nedeniyle sporadik MSI ve Lynch Sendromu ilişkili tümörlerin ayırımı için kullanılmaktadır (92) .

#### ***2.5.4.Adjuvan Kemoterapi Seçimi ve Mikrosatellit İnstabilite:***

İn vitro yürütülen çalışmalarda MMR genleri hasarlanmış hücre kültürlerinde; DNA hasarı yaparak etkinliğini gösteren 5-FU gibi kemoterapötik ilaçlara resistans geliştiği gösterilmiştir (34). Ayrıca klinik randomize faz III çalışmalar sonucunda da DNA MMR gen defekti gösteren olguların standart KKK adjuvan KT seçeneği olan 5-FU bazlı tedavi protokollerinden yarar görmediği anlaşılmıştır (93). Bu nedenle KKK olgularının MSI durumunun bilinmesi adjuvan KT öncesi tedavi protokolünün belirlenmesinde prediktif önem taşımaktadır.

## **2.6.Kolorektal Karsinomların Histolojik Özellikleri**

### **2.6.1.Makroskopik Özellikler**

KRK'lar değişik morfolojik paternler gösterebilirler. Proksimal kolondaki tümörler polipoid, ekzofitik kitleler şeklinde gelişme eğilimindedir ancak çapın daha geniş olması nedeniyle obstrüksiyon nadiren görülmektedir. Distal kolon karsinomları ise anüler, barsağı halka biçiminde saran lezyonlar şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Lezyonun kenarları kabarık ve sert, ortası ise ülser olabilmektedir. Çoğu kolorektal karsinomların kesit yüzü homojen görüntüye sahiptir ve genellikle nekroz alanları içermektedir. Müsinöz adenokarsinomlarda makroskopik müsin de görülebilir (2,94).

### **2.6.2.Tümörün Yayılımı**

Tümörler, transmural yayılım ile muskularis propriyayı aşarak perikolik ya da perirektal yağ dokuya ulaşır ve komşu yapıları invaze edebilirler veya direkt olarak serozal yüzeye yayılabilirler. Tümör perforasyonu sonucu peritoneal yayılım ve implantlar (peritoneal karsinomatozis), lenfatik ve kan damarları yolu ile uzak metastazlar görülebilir. En sık metastaz yaptıkları organlar sırası ile karaciğer, akciğer, kemikler, peritoneal boşluğun serozal membranları ve beyindir (2,4,94).

### **2.6.3.Sınıflama-Histolojik Tipler-Derecelendirme**

KRK'lerin %90'ından fazlasını adenokarsinomlar oluşturmaktadır. Adenokarsinomlar birçoğu değişik yapı ve büyüklüklere sahip gland formasyonu gösterirler ve gland formasyonu oranına göre derecelendirilirler. 2010 DSÖ derecelendirme sistemine göre (2);

Derece 1-İyi differansiye adenokarsinomlar: Basit veya kompleks gland yapıları, polaritesini nispeten korunmuş uniform nukleuslara sahip hücreleri içerirler. Glandüler yapıların oranı  $\geq$ %95'tir.

Derece 2-Orta diferansiye: Hafif düzensiz glandüler formasyona sahip nükleer polaritesini kaybetmiş hücrelerden oluşurlar. Glandüler yapıların oranı yaklaşık %50-95'tir.

Derece 3-Kötü diferansiye: Hafif düzensiz glandüler formasyona sahip nükleer polaritesini kaybetmiş hücrelerden oluşurlar. Glandüler yapıların oranı %0-49'dur.

**Müsinöz adenokarsinom:** Ekstrasellüler müsin gölcükleri ile karakterize asiner yapılar oluşturmuş malign epitel hücrelerinden oluşan bir varyanttır. Tanı için müsin içeren komponentin tümörün %50'sinden fazlasını oluşturması gerekmektedir. MSI-H ile yakından ilişkilidirler (2,94).

**Taşlı yüzük hücreli karsinom:** Tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasının intrastoplazmik müsin içermesi ile karakterlidir. Tipik taşlı yüzük hücreleri, sitoplazmasında büyük bir müsin vakuolu içeren ve nukleusu kenara itilmiş hücrelerdir (2,94).

**Kribriform-Komodo tip adenokarsinom:** Nadir görülen bir varyanttır. Santral nekroz ile karakterli sırt sırta vermiş kribriform glandüllerle karakterli ve MSS tümörlerdir. Genellikle CpG adalarının hipermetilasyonu ile ilişkilidir (2).

**Mikropapiller adenokarsinoma:** Meme ve mesanenin mikropapiller adenokarsinomlarına benzer morfolojide, son derece nadir görülen bir varyanttır. Lenfovasküler invazyonu taklit edencesine çevresinde bir boşluk yapısı ile karakterli, belirgin kor yapısı içermeyen, küçük tümör gruplarından oluşmaktadır. Pür mikropapiller adenokarsinom histolojisinden daha çok konvansiyonel kolon adenokarsinomlarının bir komponenti olarak izlenmektedir (2).

**Medüller karsinom:** Geniş pembe sitoplazmalı, veziküler nükleuslu ve nükleol belirginliği olan sinsityal kümeler yapmış malign hücrelerle karakterize nadir görülen bir varyanttır. Tümör içerisinde intraepitelyal lenfositler

görülebirlirler. MSI-H ile ilişkili tümörlerdendir. Diğer kötü diferansiye ve andiferansiye tümörler ile karşılaştırıldığında daha iyi prognoza sahiptirler (2).

**Adenoskuamöz karsinom:** Skuamöz karsinom ve adenokarsinom özelliklerini bir arada gösteren nadir görülen bir varyanttır. Kolonun pür skuamöz karsinomları son derece nadirdir (2).

**Andiferansiye karsinom:** Morfolojik olarak köken aldığı dokunun özelliklerini taşımayan, glandüler formasyonun görülmediği tümörlerdir. Histolojik olarak iyi sınırlı kitleler ile karakterize uniform yuvarlak hücrelerden oluşurlar. İntrastoplazmik müsinin olmaması kötü diferansiye adenokarsinomlardan ayırmak için kullanılabilir. Nadir görülürler ve genellikle MSI-H ile ilişkilidirler (2,94).

**Karsinosarkom:** İğsi hücreli mezenkimal komponenti ve karsinomatöz komponenti bir arada içerirler (2). Sarkomatoid karsinom veya iğsi hücreli karsinom olarak adlandırılırlar.

## **2.7.Prognostik Faktörler**

### **2.7.1.Klinik Prognostik Faktörler**

KRK'lerde küratif rezeksiyon sonrası 5 yıllık sağkalım oranları genellikle %40-60 oranındadır(95). Rekürrenslerin %70'i ilk 2 yılda meydana gelirken; bu oran 5 yılda %90'lara çıkmaktadır. Bu oranları önceden öngörmemizi sağlayan ve sağkalımı etkileyen birçok klinikopatolojik prognostik faktör bulunmaktadır.

**Yaş:** Genç yaşta ortaya çıkan KRK daha kötü prognoza sahiptir(96). Bunda yaşlılara göre daha ileri evrede tanı koyuluyor olması bir etkidir fakat aynı evredeki hastalarda dahi prognoz gençlerde yaşlılardan daha kötü seyretmektedir.

**Cinsiyet:** Birçok çalışmada prognozun cinsiyetle de ilişkili olabileceği vurgulanmış ve kadınların erkeklere oranlarla daha iyi prognoza sahip olduğu bildirilmiştir (97).

Çalışma kapsamında, tümörün prognozu belirlememizde yardımcı olan morfolojik özellikleri ele alınmış olup evreden bağımsız olarak tanımlanan örneğin 5 ng/dl'nin üzerindeki serum karsinoembriyjenik antijen (CEA) düzeyleri gibi değişkenler (98) değerlendirmeye alınmamıştır.

### ***2.7.2.Histolojik Prognostik Faktörler***

Morfolojik faktörleri ortaya koymak, hastalığın lokal yayılımını tespit etmek, patolojik veriler doğrultusunda hastaya cerrahi sonrası KT verilip verilmeyeceği belirlemek ve hasta açısından diğer önemli prognostik verileri elde edilebilmek ancak rezeksiyon materyallerinin değerlendirilmesi ile mümkün olmaktadır (14,99). Önemli morfolojik prognostik faktörler Tablo 6'de listelenmiştir (14).

**Tablo 6: Histolojik Prognostik Faktörler**

Patolojik Evre (TNM)
Tümör Tipi ve Özel Alt Tipleri
Cerrahi Sınırların Durumu
Evre Bağımsız Morfolojik Faktörler: Lenfovasküler invazyon Perinöral invazyon Tümör sınırlarının konfigürasyonu Tümör 'tomurcuklanması' (budding) Tümör çevresi lenfositik yanıt
Mikrosatellit İnstabilite Açısından Morfolojik İşaretler



### 2.7.1.a. Patolojik Evreleme

**TNM Tanımlayıcıları:** Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-WHO)'nün önerdiği ve “American Joint Committee on Cancer (AJCC)”-“The International Union Against Cancer” (UICC)” kolorektal kanser "Tümör, Nod, Metastaz" (TNM) evrelendirmesi Tablo 7’de gösterilmektedir(2,14). Klinik verilere dayandırılarak yapılan evreleme için “c”, patolojik verilere dayandırılarak yapılan evreleme için “p” sembolü ön ek olarak kullanılmaktadır. Ayrıca multiple primer tümörü olanlar için “m”; multimodel tedavi şeması (neoadjuvan kemoterapi, radyoterapi veya kemoradyoterapi) uygulanan vakalarda “y”; rekürren (nüks eden) tümörlerde “r” sembolü kullanılır ve sırasıyla pT(m)NM, ypTNM, rpTNM olarak raporlanır (100).

**Tablo 7: Kolon ve rektum tümörlerinde TNM-7 evrelendirmesi**

pTNM	Tümörün Histolojik Özellikleri
pTX	Primer tümör değerlendirilemiyor
pT0	Primer tümör bulgusu yok
pTis	Karsinoma in situ, intraepitelyal (yüksek dereceli displazi)
	Karsinoma in situ, lamina propria/muskularis mukozaya invazyonu (intramukozal karsinom)
pT1	Submukozaya invaze invaze tümör
pT2	Muskularis propriyaya invaze tümör
pT3	Muskularis propriyayı aşmış subserozayı invaze eden tümör
pT4a	Viseral peritonu penetre eden tümör
pT4b	Diğer organları direkt invaze eden veya diğer organ ve yapılara yapışıklık gösteren tümör
pNX	Lenf nodu metastazı değerlendirilemiyor
pN0	Lenf nodu metastazı yok
pN1a	1 lenf nodunda metastaz
pN1b	2-3 lenf nodunda metastaz
pN1c	Bölgesel lenf nodülü metastazı olmaksızın, subseroza veya non-peritonealize perikolik/perirektal dokularda tümör depozitleri (satellit)
pN2a	4-6 lenf nodunda metastaz
pN2b	7'den daha fazla lenf nodunda metastaz
M0	Uzak metastaz yok
M1a	Uzak metastaz bir organla sınırlı
M1b	Birden fazla organ veya periton metastazı

### **2.7.1.b. Tumor (T) Kategorisi**

Tümörün bağırsak duvarına invaze olduğu en son noktadır (14). pTis (in situ karsinom) ise hem tümör hücrelerinin bazal membranla sınırlı olduğu “yüksek dereceli displazi”yi hem de tümör hücrelerinin lamina propriayı invaze ettiği fakat muskularis mukozayı geçmediği “intramukozal karsinoma”yı kapsar (14). Kolon ve rektum dışındaki diğer –neredeysse tüm-epitelyal tümörlerde stromal invazyon, lenfatik ve kan damarlarına ulaşım dolayısıyla metastaz riski getirmesi nedeniyle çok önemlidir. Ancak kolorektal mukozanın, GİS’in (hatta tüm vücudun) diğer mukozalarının aksine lenfatiklerinin olmaması nedeniyle lamina propria invazyonu; bölgesel LNM riskini taşımaz. Bu nedenle bu tümörleri “İntraepitelyal karsinom” ya da intramukozal karsinom” olarak tanımlamak daha uygundur.

TNM’nin 7. basımında pT4a (serozal tutulum), pT4b (komşu organlara direk invazyon) olarak alt gruplara ayrılmış ve perforasyon gösteren tümörler de pT4b alt grubuna dahil edilmişlerdir(100,101). Başka organlara ve yapılarla makroskopik olarak yapışık tümörler “T4” olarak sınıflanırken yapışıklık bölgesinde mikroskopik olarak tümör yoksa T3 olarak sınıflanmalıdır (99).

### **2.1.7.c. Nodal (N) Kategorisi**

Son yıllarda KRK' bölgesel lenf nodu metastazının sınıflandırılmasında birçok tartışmalı konu ortaya çıkmıştır. Bunlardan en önemlileri; rezeksiyon materyalinden diseke edilmesi gereken lenf nodunun sayısı ve ekstramural tümör nodüllerinin (satellit nodüllerin) lenf nodu metastazından nasıl ayırt edileceğidir (14).

**Lenf nodu sayısı:** Birçok KRK metastazı 5 mm'den daha küçük lenf nodlarında bulunmaktadır. Bu yüzden lenf nodlarının çok iyi bir şekilde diseke edilmiş olduğundan emin olmak gerekir. Rezeksiyon materyallerindeki lenf nodu sayısını etkileyen faktörler arasında cerrahi teknik, diseke sırasında gösterilen özen, neoadjuvan KT uygulanması, obezite ve hasta anatomisinden kaynaklanan farklar sıralanabilir (14).

AJCC- TNM 7. baskısında 7-14 lenf nodunun incelenmesi (101), 12 lenf nodundan daha az lenf nodu elde edildiğinde tekrar diseksiyon yapılması önerilmekte ve bunun evreye etkisi üzerinde durulmaktadır (102-104).

**Ekstramural (satellit) nodül:** Perikolik ya da perirektal yağ dokusu içerisinde tümörden ayrı düzensiz konturlara sahip ve herhangi bir bölgesinde rezidüel lenf nodu dokusu içermeyen tümöral yapılardır. Bu nodüller, lenfovasküler yayılım ya da nadiren perinöral yayılım ile ilişkili olabilirler. Sağkalımla ilişkili oldukları için patoloji raporunda sayıları mutlaka bulunmalıdır (14,100). pT1 ve pT2 tümörlerde satellit nodüllerin bulunması tümörün T kategorisini değiştirmez. Fakat lenf nodu metastazı yok ise N1c olarak rapor edilirler (100).

**Bölgesel olmayan lenf nodları:** Lenf nodları diseke edilirken; tümörün yerleşim yerine göre değerlendirilen bölgesel lenf nodları içerisinde olup olmadıklarına dikkat edilmesi gerekir. Bölgesel olmayan lenf nodu metastazı “M1” kategorisinde değerlendirilir ve evre IV tümör kategorisine girer (100). Abdominal organlara peritoneal ekilme ve batın sıvısında tümör hücrelerinin görülmesi de metastatik hastalık olarak değerlendirilir (105).

**Mikrometastazlar ve izole tümör hücreleri:** Mikrometastaz; 0.2 mm ile 2 mm arasındaki boyuta sahip metastazlardır. Mikrometastazlar lenf nodunda veya uzak bölgelerde olmasına göre N1(mic) veya M1(mic) olarak sınıflandırılırlar (99,100,105).

İzole tümör hücreleri tek tek veya kümeler yapmış, 0.2 mm veya daha küçük tümör hücrelerinden oluşurlar. Bu odakların bulunması için zaman alıcı ve pahalı olan İHK ek incelemelerin yapılıp yapılmamasına yönelik kesin bir uzlaşısı yoktur. Prognostik önemi olmadığı için N0 olarak sınıflandırılırlar (100).

### **2.7.1.d.Cerrahi Sınırların Değerlendirilmesi**

Rezeksiyon materyallerinde proksimal, distal, mezenterik ve yerleşim yerine göre radial (sirkumferansiyal) cerrahi sınır değerlendirilmesi gerekir (99).

Rektum dışındaki kolon segmentlerinde cerrahi teknik olarak proksimal ve distal cerrahi sınırların tümöre uzaklığı konusunda sorun yaşanmazken; ‘low anterior rezeksiyon’ tekniği uygulanan rektum tümörlerinde distal cerrahi sınır uzaklığı yeterince sağlanamayabilmektedir. Genel olarak 2 cm’den fazla uzaklık tümörsüz cerrahi sınır olarak kabul edilir (100).

Radial (sirkumferansiyal) cerrahi sınır periton ile çevrili olmayan kolon segmentlerinde (inen kolon, çıkan kolon ve rektum) adventisyal yumuşak doku ile örtülü cerrahi sınırdır. Teknik olarak ya kesilerek ya da kör cerrahi yöntemlerle çıkarılır. Tümörün rezeksiyon sınırına en yakın olduğu uzaklık değerlendirilmeli ve raporda bildirilmelidir. Bir mm uzaklık pozitif cerrahi sınır olarak değerlendirilmelidir (14,99,100). Tamamı periton ile kaplı kolon segmentleri (transvers kolon, sigmoid kolon) için mezenterik cerrahi sınırdan bahsedilir (105).

Cerrahi sınırlarda tümör rezidüsünün olmaması “R0”; mikroskopik rezidü odak olması “R1”; makroskopik rezidü tümör olması “R2” olarak değerlendirilir (99).

### **2.7.1.e.Evre Bağımsız Prognostik Faktörler**

**Lenfovasküler İnvazyon (LVI):** Multivaryasyon analizlerinde önemli bir prognostik belirteç olduğu ortaya konmuştur. Ancak bazı analizler venöz invazyonun, diğerleri lenfatik invazyonlardan daha önemli olduğunu göstermektedir (14,100).

**Perinöral invazyon (PNI):** LVI'dan daha az rastlanır. Tüm kolon karsinomlarının yaklaşık %10'unda rastlanan bir bulgudur. Genellikle yüksek dereceli ve evreli tümörler ile ilişkilidir ve kötü prognozla karakterlidir (2,14).

**Tümör sınırlarının yapısı:** Tümör sınırlarının çevre dokuyu iterek (ekspansif) veya invaze ederek (infiltratif) gelişim göstermesi sağkalım açısından önemlidir. Ekspansif tümörler, infiltratif büyüme gösteren tümörlere göre daha iyi prognoza sahiptirler (100,106)

İnfiltratif sınır yapısı; Çıplak gözle değerlendirildiğinde tümörün invaziv sınırının ayırtedilemesi ya da host-reaksiyondan ayrılamaması; mikroskopik incelemede ise tümörün muskularis propriayı tümör yanıtına yol açmadan boydan boya kat etmesi ve/veya mezenterik yağ dokuda küçük glandlar, kordonlar, düzensiz tümör kümelerin bulunması ve/veya perinöral invazyonun bulunmasıdır (14).

**Tümör tomurcuklanması ("budding"):** Tümörün invaziv sınırında başlayan desmoplastik stroma içerisinde küçük kümeler halinde veya tek tek dizilim gösteren dediferansiye hücrelerin bulunmasıdır. Genellikle infiltratif-invaziv tümör sınırıyla karakterizedir. Vasküler invazyon, lenf nodu ve uzak metastaz ile ilişkilidir(14,100).

**Tümör çevresi lenfositik yanıt:** Peritümöral lenfoid agregatlar ("Crohn-benzeri lenfositik yanıt") veya tümörün CD3/CD8 lenfositler tarafından infiltre edilmesi ("Tümör infiltre eden lenfositler-TIL") şeklinde karşımıza çıkabilir(100). Bu morfolojik özellikler çoğu çalışma da iyi prognostik faktörler arasında sayılmıştır. Crohn-benzeri lenfositik yanıt LNM'ını azaltıcı faktörlerden kabul edilirken; tümörün lenfositlerce infiltre edilmesi MSI ile ilişkili bulunmuştur (107,108).

**Tümör boyutu:** Tümör boyutu kolorektal karsinomlar için tümörü tanımlayıcı faktörlerdendir. Ancak prognoz açısından bir önemi saptanamamıştır (100).

**Histolojik tip:** Çoğu histolojik tip, evreden bağımsız prognostik öneme sahiptir. Nadir görülen tiplerden taşlı yüzük hücreli ve küçük hücreli karsinomlar kötü prognoz ile karakterize iken, medüller karsinom iyi prognoza sahiptir (2,94). Müsinöz karsinomlar birçok çalışmada evreden bağımsız kötü prognostik faktör olarak tanımlanmaktadır. Fakat MSI'si ortaya konmuş müsinöz karsinomlar iyi prognoza sahiptirler (100,109).

**Tümörün derecelendirilmesi:** Yaygın kullanılan, gland formasyonuna dayalı derecelendirme sistemi pratikte çok subjektiftir ve intratümöral varyasyon gösteren tümörlerde sorun yaratmakta ve patologlar arası tanı uyumsuzluğuna neden olmaktadır. Bu yüzden yeni çalışmalarda tümörleri; “Düşük dereceli (iyi ve orta diferansiye)”, ve “Yüksek dereceli (kötü diferansiye ve andiferansiye) olarak gruplayan ikili derecelendirme sistemi de önerilmekte ve prognoz ile arasında daha iyi bir uyum olduğu savunulmaktadır (14,99,100).

#### **2.7.1.f.MSI-H ilişkili tümörler**

MSI-H yolağı üzerinden gelişen tümörler, genel olarak aynı evredeki kromozomal instabilite yolağı üzerinde gelişen tümörlere göre daha iyi prognoza sahiptirler (18). Kendine özgü birtakım morfolojik özellikleri vardır.

-Genellikle genç yaşta ve kadınlarda sık görülürler ve daha çok proksimal kolonda yerleşirler (110).

-Sıklıkla kolon duvarının derinine infiltre olma eğiliminde olmakla birlikte; genel tümör evresi olarak erken evreye sahiptirler. Lenf nodu ve uzak metastaz oranı diğer tümörlere göre düşüktür (111).

-Histolojik olarak müsinöz karsinom, medüller karsinom ya da kötü diferansiye karsinom morfolojisindedirler (109,112)

-Genellikle ekspansif büyüme paterni gösterirler.

-Tümör çevresi lenfositik yanıt (Crohn-benzeri lenfositik yanıt ve TİL) gösterirler (108); kirli nekroz göstermezler (110).

### **3.GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1.Çalışma grubu**

2002-2011 yılları arasında kolon ve rektum adenokarsinomu nedeniyle opere edilen ve rezeksiyon materyali Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda incelenen 1128 olgu geriye dönük olarak gözden geçirildi.

Çalışmanın planlandığı yıllar içerisinde bölümümüze konsültasyon amacıyla gönderilen 21 olgudan; çok sayıda blok ile konsültasyona gönderilen ve klinikopatolojik verilerine ulaşılan 3 olgu çalışmaya dahil edildi. Nüks nedeni ile ikinci kez kolon rezeksiyonu yapılan olgulara ait materyallerden sadece ilk incelenen rezeksiyon materyalleri çalışma kapsamında incelendi ve 16 nüks rezeksiyon materyali çalışma dışı bırakıldı. Tümörün yerleşim yerine ait bilgiye ulaşılamayan 20 olgu ve rezeksiyon materyalinde kalıntı tümör dokusu izlenmeyen 3 olgu, neoadjuvan tedavi aldığı öğrenilen 56 olgu ve değerlendirme aşamasında iç kontrollerinde boyanma saptanmayan 13 olgu da dışlanarak toplam 1002 olgu çalışmaya alındı.

Çalışmamıza Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar etik kurulundan onay alınmıştır. (Karar No: 12-5.1/4; Karar Tarihi: 03.07.2012)

#### **3.2.Klinikopatolojik verilerin derlenmesi ve değerlendirilmesi**

Olgulara ve tümöre ait tanımlayıcı bilgiler (yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, rezeksiyon seviyesi gibi) ile makroskopik veriler (tümör çapı, diseke edilen lenf nodlarının sayısı, cerrahi sınırların durumu, çoklu tümör varlığı vb.) Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Bilgi Sistemi ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşiv kayıtlarından; nüks ve sağkalıma ait veriler, hastane kayıtları ve İzmir Halk Sağlığı Müdürlüğü Kanser Şubesi Kanser Kayıt Merkezi (KİDEM) veritabanından elde edilmiştir.

-Çoklu primer tümör: İndeks primer tümörden farklı bir bölgede gelişen tümör olarak tanımlandı. Primer kanser ile birlikte veya operasyonu takiben ilk 6 ay içerisinde görülen tümörler “senkron tümör”, operasyon bölgesi nüksler dışlanacak şekilde, 6 aydan sonra gelişenler “Metakron” tümör olarak

tanımlandı(113). Metakron tümör olarak değerlendirilen olgularda cerrahi sınır pozitifliği yoktu.

-Uzak metastazlara ait verilerin eksiksiz ve güvenilir olmaması nedeniyle istatistik aşamasında değerlendirilmeden çıkarıldı.

### **3.3.Histopatolojik Değerlendirme**

Değerlendirme, geriye dönük yeniden inceleme yöntemi ile ve olguların, rezeksiyon materyallerine ait, %10 nötral tamponlu formalin ile 16-24 saat tespit edildikten sonra rutin doku takibi ile işlenen, parafine gömüldükten sonra 4 mikron kalınlığında kesilerek Hemotoksilen- eosin (HE) ile boyanan kesitler ile yapıldı.

### **3.4.Patolojik evre:**

AJCC-UICC TNM 7'ye göre yeniden değerlendirildi(2). İnvazyon derinliği (pT), metastatik lenf nodu sayısı (pN) kaydedildi. Bölgesel olmayan LNM'ları değerlendirme dışı bırakıldı.

### **3.5.Histolojik özellikler:**

Histolojik bulgular 2010 DSÖ'nün önerilerine göre yeniden değerlendirildi(2). Tümörün histolojik tipi, derecesi, satellit tümör odağı, lenfovasküler (LVI) ve perinöral invazyon (PNI) varlığı kaydedildi.

*Tümör Derecesi (diferansiyasyonu):* 2010 DSÖ'nün önerdiği biçimde glandüler diferansiyasyonun oranına göre (iyi-orta-kötü) olarak derecelendirildi(2). Tümörün en kötü diferansiye alanı %10'nun altında ise ve/veya tümörün infiltratif sınırında yer alıyorsa derecelendirme yapılırken göz ardı edildi. İstatistik değerlendirme aşamasında tümörler “düşük dereceli (İyi ve orta derece diferansiye tümörler)” ve yüksek dereceli (kötü ve andiferansiye tümörler)” olarak ayrıca dikotomize edildi.



### **3.6.MSI-H fenotipik özellikler:**

MSI-H tümör riski açısından değerlendirilecek özellikler, Bethesda kriterleri (81) yanı sıra literatürden derlenen verilere göre belirlendi.

-*Tümörü infiltre eden lenfositler (TIL):* Lenfositlerin H&E boyalı preparatlarda çevresinde halo bulunan küçük mavi nükleuslara sahip hücreler şeklinde görülmesine dayanılarak değerlendirildi. Her tümörde 10 Büyük büyütme alanındaki (BBA) TIL sayısı değerlendirilerek; ortalaması alındı. Bir BBA'da iki ve daha fazla TIL varlığı MSI-H fenotip açısından pozitif kabul edildi (108,110).

-*Crohn-benzeri lenfositik yanıt:* Tümörün infiltre olduğu alanlarda bir kesitte iki ve daha fazla lenfoid agregat bulunması pozitif reaksiyon olarak kabul edildi. Lenfoid agregatların peritümöral lenf nodları ve çevre mukozaki mukoza ilişkili lenfoid doku (MALT) ile ilişkisi olmamasına dikkat edildi (110).

-*Müsinöz Diferansiyasyon:* Tümörde ekstrasellüler müsin oranı %50'den fazla ise "müsinöz adenokarsinom"; %50'den az ise "fokal müsinöz diferansiyasyon" gösteren tümör olarak sınıflandırıldı (110).

-*Taşlı Yüzük Hücreli Diferansiyasyon:* %50'den fazla taşlı yüzük hücresi içeren tümörler "taşlı yüzük hücreli karsinom"; %50'den az taşlı yüzük hücresi içeren tümörler "fokal taşlı yüzük hücreli diferansiyasyon" olarak sınıflandırıldı (110).

-*MSI-H İlişkili Kötü Diferansiye Histolojik Tipler:* Medüller komponent, kribriiform-komedo komponent, mikropapiller komponent ve %5'den az gland formasyonu gösteren kötü diferansiye komponent içeren histolojik tipler tümörün %10'dan fazla alanını oluşturmaları durumunda MSI-H fenotip açısından pozitif olarak kabul edildi (2).

-*Tümörün İnfiltratif Sınırı:* Küçük büyütme (x4 objektif) ile değerlendirildi. Tümörün kolon duvarının derinine doğru ilerleyen bölümü çevre dokuları

itererek büyüyorsa “ekspansif”, dokuların içerisine girerek ilerliyorsa “infiltratif” olarak tanımlandı (110).

*-Tümör Tomurcuklanması (“Budding”):* Tümörün infiltratif sınırında ana tümör kitlesinden bağımsız tek tek ya da 5 hücreden daha az gruplar-kordonlar halinde infiltrasyon gösteren anaplastik karakterde tümör hücrelerinin varlığı değerlendirildi (106,110).

*-Kirli Nekroz:* Tümörde %10’dan fazla oranda hücre debrileri ve inflamatuvar hücre içeren “kirli” nekroz varlığı pozitif olarak kabul edildi. Tümörün hızlı büyümesine bağlı gelişen coğrafik nekroz varlığı dikkate alınmadı (110).

### **3.7.Makroarray-Multiblok Hazırlanması:**

***Makroarray hazırlanması:*** Her olgu için H&E boyalı preparatlar üzerinde tümörün ortalama diferansiyasyon derecesini gösteren bir alan seçilerek cam üzerinde işaretlendi. Preparat üzerinde işaretlenen alan ilgili blok üzerinde tespit edilerek, parafin bloktan 5 mm çapında 5 mm derinliğinde bir doku çıkarılmasını sağlayan manuel array cihazı (Sakkura; Tissue-Tek; Quick-Ray Tissue Microarray System) ile doku çıkarılarak temsili tümör örnekleri (makroarray) elde edildi (Resim 2).

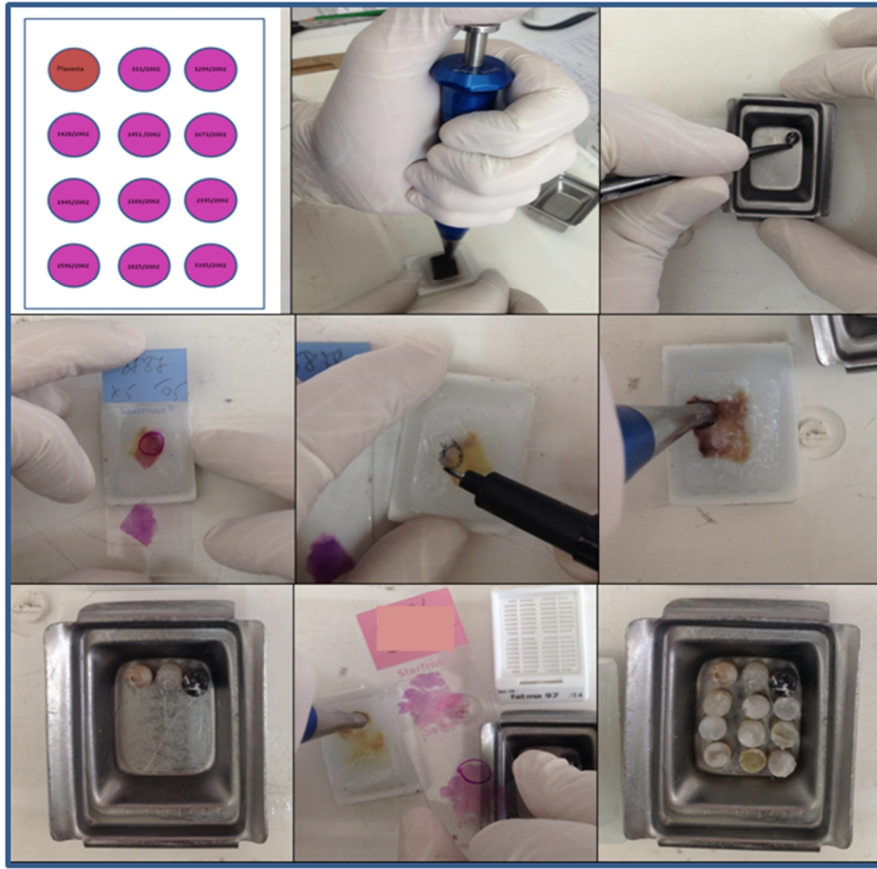
***Multiblok hazırlanması:*** Her olgunun tümörüne ait makroarrayler elde edildikten sonra içerisinde 11 olguya ait doku bulunan “multibloklar” hazırlandı. Yeniden bloklama öncesi her multiblok için, 11 hastaya ait patoloji biyopsi numaralarını ve kılavuz dokuya göre konumlarını gösteren “multiblok haritaları” oluşturuldu. Multiblok içerisine öncelikle, döküm, gömme ve mikroskop altında tarama sırasında oryantasyonun sağlanabilmesi amacıyla kolorektal mukoza dışı bir kılavuz doku (plasenta) yerleştirildi ve döküm bu haritalara göre yapıldı. Bu şekilde bir numaradan başlayan ve tekrar numaralandırılan toplam 95 adet multiblok elde edildi. (Resim 2)

### **3.8. İmmunhistokimyasal İnceleme:**

Hazırlanan multibloklardan İHK yapılmak üzere 4'er adet 5 µm kalınlıkta kesit hazırlandı ve elektrostatik yüklü lamlara (ISOTHERM, ca.75x25mm/3x1 inch, positive charged) alındıktan sonra 60°C'da bir gece kurutulmaya bırakıldı. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm İHK'sal boyama süreci tam otomatik İHK boyama cihazı ile gerçekleştirildi. İHK boyama sistemi olarak biyotinsiz, HRP multimer bazlı, hidrojen peroksit substrat ve 3, 3' – diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) kromojeni içeren (ultraView™ Universal DAB Detection Kit, Catalog number 760-500, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) ile tam otomatik İHK boyama cihazı (Ventana BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) kullanıldı. Primer antikolar otomatik olarak damlatılarak 37 Dk inkübe edildi. Zıt boyaması hematoksilin ve mavileştirici solüsyon ile cihazda tamamlanan kesitlerin dehidratasyonu, ksilen ile şeffaflandırılması ve lamel kapatılması aşamaları otomatik olarak (Dako Coverstainer, CS100-10073) yapılarak işlem sonlandırıldı. İHK incelemede MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 primer antikoları kullanıldı. Kullanılan primer antikolara ve dilüsyonlara ilişkin bilgiler Tablo 8'de, hazırlanan multibloklara ait kesit örnekleri Resim 3'de verilmiştir.

**Tablo 8: İmmunhistokimyasal incelemede kullanılan antikolar**

	<b>MSH6</b>	<b>MSH2</b>	<b>MLH1</b>	<b>PMS2</b>
<b>Lokalizasyon</b>	Nükleer	Nükleer	Nükleer	Nükleer
<b>Klon</b>	PU29	25D12	ES05	M0R4G
<b>Dilüsyon</b>	1/50	1/75	1/150	1/75
<b>Firma</b>	Novacastra/ Leica	Novacastra/ Leica	Novacastra/ Leica	Novacastra/ Leica
<b>Katalog No</b>	NCL-L- MSH6	NCL-MSH2	NCL-L- MLH1	NCL-L- PMS2



**Resim 2:** Makroarray ve multiblokların hazırlanması. Sırasıyla; blok haritalarının hazırlanması-kılavuz doku alımı ve gömülmesi-makroarray alınacak dokunun işaretlenmesi-bloktan array alınması- yeniden bloklama



**Resim 3:** Multiblok, multibloklardan hazırlanan kesitler ve immunhistokimyasal uygulama

### **3.9. İmmunhistokimyasal İnceleme sonuçlarının değerlendirilmesi**

Pozitif kontrol ve internal kontrol olarak dört antikor için de normal kolon mukozası ve doku içi lenfositler; negatif kontrol olarak da iskelet kası kullanıldı.

Değerlendirme sırasında her antikor için nükleer boyanma pozitif boyanma olarak kabul edildi ve boyanma heterojenitesi ayrıca değerlendirildi. Tümörlerde nükleer boyanma görülmemesi “Mismatch Repair Gen” proteinlerinde “kayıp” olarak değerlendirdi.

### **3.10. Sağkalım verilerinin değerlendirilmesi:**

Sağkalım analizleri, yaşayanlar için operasyon tanısı anından ölüm ve sağkalım bilgisinin son kontrol tarihi olan 2014 yılı Ocak ayına kadar geçen süre, vefat bilgisine ulaşılanlar için tanı anından ölüme kadar geçen süre “ay” cinsinden değerlendirilmek suretiyle “Genel sağkalım” üzerinden yapıldı. İlk 3 aya kadar olan erken postoperatif ölümler değerlendirme dışı bırakıldı. Beş yıllık sağkalım analizi için gözlem süresi 5 yıldan az olanlar dışlandı.

### **3.11. İstatistik değerlendirme:**

SPSS 18.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Olgulara ait klinikopatolojik veriler ve MMR protein İHK sonuçları “frekans analizi”, sağkalım süreleri “Kaplan-Meier” analizi ile değerlendirildi. MMR protein ekspresyon kaybı, klinikopatolojik veriler ve sağkalım sürelerinin karşılaştırması “nonparametrik testler” (Pearson Ki-kare ve gerektiğinde Fisher’s exact test) ile yaş, tümör çapı, metastatik LN ve TIL sayısı ile diğer verilerin çapraz karşılaştırmaları “Mann-Whitney U testi” ile yapıldı. Multivaryans analizlerde “Cox regresyon analizi” kullanıldı.

Tüm analizler için  $p < 0,05$  değeri “istatistiksel olarak anlamlı” kabul edildi.

## 4.BULGULAR

### 4.1.Klinikopatolojik Bulgular

Olguların klinikopatolojik bulguları Tablo 9’da özetlenmiştir.

**Yaş:** Çalışmaya alınan 1002 olgunun yaşları 22- 94 arasında olup, medyan yaş  $63\pm 12,7$  idi (Dağılım: 22-94). Tanı anında olguların %18’inin (n=180) 50 yaş altında olduğu görüldü.

**Cinsiyet:** Olguların 603’ü (%60,2) erkek, 399’u (%39,8) kadın idi. Kadınların tanı anındaki yaş ortalaması erkeklere göre daha düşüktü (medyan yaş  $61\pm 13,7$ ’e karşılık  $65\pm 11,9$ ). 50 yaş altındaki kadın hasta oranının erkeklerden daha yüksek olduğu görüldü (%22,6’a karşılık %14,9, p=0,001).

**Tümör Lokalizasyonu:** Olgulara ait tümörlerin 445’i (%45,4) rektumda; 324’ü (%32,3) sol kolonda; 223’ü (%22,3) sağ kolonda yerleşim göstermekteydi. Rektum dahil tüm sol kolon tümörlerinin oranı %77,7 (n=779) idi.

**Çoklu tümör:** Olguların 64’ünde (%6,4) izlendi. Bunların 36’sı (%56,3) tanı anında, 28’i (%43,8) operasyondan en az 6 ay sonra ve primer tümör bölgesinden farklı bir bölgede tespit edilmişti.

**Tümör Evresi (pT):** Tüm tümör evreleri değerlendirildiğinde olguların büyük çoğunluğunun ileri evrede opere oldukları görülmüştür. pT4 tümörlerin oranı %79,7 (n=798) iken; pT1 tümörlerin oranı sadece %1,5 (n=15)’dir.

**Lenf Nodu Sayısı ve Evresi (pN):** Çalışmaya alınan 1002 olgunun büyük çoğunluğu pN0 evresinde tanı almıştır (%47,9). Diseke edilen medyan LN sayısı  $14\pm 13,3$ ’dir. Dört yüz yetmiş iki (%47,2) olguda LNM saptanmış olup ortalama metastatik LN sayısı  $2,05\pm 3,8$ ’dir. Sekiz olguda LN diseksiyonu yapılamamıştır ve pNx olarak değerlendirilmiştir. LNM saptanmayıp satelit nodül saptanan olgu sayısı 38 (%3,8) olup; bu olgular pN1c kategorisinde incelenmiştir.

**Tümör Çapı:** Rezeksiyon materyallerinde medyan tümör çapı  $5\pm 2,3$  cm (Dağılım:1-26 cm) olarak saptanmıştır. Çoklu tümörü olanlarda ikinci tümörlerin çapı ayrıca değerlendirilmemiştir. Ana tümörün tümör çapı sağ kolon lokalizasyonunda tüm sol kolon lokalizasyonuna göre daha büyük olma eğiliminde oldukarı tespit edilmiştir ( $6,13\pm 2,7$ 'e karşılık  $5,1\pm 2,2$ ,  $p<0,05$ ).

#### ***4.2.Histolojik Bulgular:***

Olguların histolojik bulguları Tablo 10'da özetlenmiştir.

**Tümör Tipi:** Tümörlerin %89,6'sı ( $n=898$ ) adenokarsinom; %9,8'i ( $n=98$ ) müsinöz adenokarsinom; 0,6'sı ( $n=6$ ) taşlı yüzük hücreli karsinom histolojisinde izlenmiştir.

**Tümör Diferansiyasyonu ve Derecesi:** Adenokarsinom vakalarının %80,8'i ( $n=727$ ) orta derece diferansiye tümörlerden oluşmaktadır. Tümörler düşük ve yüksek dereceli olarak iki gruba ayrıldığında düşük dereceli tümörlerin adenokarsinomlar içinde ki oranı %91,2 olarak bulunmuştur. ( $n=821$ ). Tümörün invazyon sınırındaki az diferansiye hücre infiltrasyonu "budding" ayrıca değerlendirilmiştir.

**Lenfovasküler, perinöral invazyon-ve Satellit Nodül:** LVI ve PNI oranları birbiri ile yakın bulunmuştur (sırasıyla %25, %23,5). Olguların toplam %17,3'ünde de satellit nodül varlığı izlenmiştir.

#### ***4.3.MSI-H İlişkili Histolojik Bulgular:***

MSI-H ilişkili histolojik bulgular Tablo 11'de özetlenmiştir

#### **Tümör Çevresi Lenfositik Yanıt:**

Olguların %85,7'sinde TIL izlenmemiştir. TIL izlenen olgularda ise 1 BBA'nda en fazla 20 lenfosit bulunmuştur (ortalama: $0,42\pm 1,4$ , dağılım 1-20 lenfosit/1BBA). MSI-H fenotip ile ilişkili kabul edilen 1 BBA'nda 2 lenfosit varlığı baz alınarak yapılan incelemede; 104 olguda (%10,4) TIL sayımı

“pozitif” olarak kabul edilmiştir. Crohn-benzeri lenfositik yanıt ise 385 (%38,4) olguda saptanmıştır.

TIL ve Crohn-benzeri lenfositik yanıtla ilişkin örnekler Resim 4 ve 5’te verilmiştir.

**Müsinöz Tümör Komponenti:** Olguların 343’ünde (%34,4) fokal ya da diffüz müsinöz komponentin varlığı izlenmiştir. Bunlardan büyük çoğunluğu fokal müsinöz diferansiyasyon göstermektedir (n=238, %69,3). Müsinöz komponenti olan olgulardan 39 (%11,3) tanesi taşlı yüzük hücreli tümör komponenti içermektedir. (Resim 6)

**Diğer Tümör Komponentleri:** Olguların %5’inde (n=50) medüller tümör komponenti mevcuttur (Resim 6). Bunlar dışında 64 olguda kribriform-komodo nekrozlu tümör paterni; 30 olguda mikropapiller tümör paterni izlenmiştir.

**Kirli Nekroz ve Tümör İnfiltratif Sınırının Değerlendirilmesi:** Olguların yaklaşık olarak yarısında (n=544, %54,3) kirli nekroz varlığı izlenmiştir. Sadece 71 olguda (% 7,1) ekspansif tümör büyüme paterni saptanmıştır. İnfiltratif büyüme paterni gösteren olguların 238’inde (%25,5) tümör tomurcuklanması “budding” mevcuttur. (Resim 7)

**Sağ ve sol kolonda yerleşen tümörler karşılaştırıldığında:**

Sağ kolonda yerleşen tümörlerde müsinöz adenokarsinomlar ve fokal müsinöz diferansiyasyon (sırasıyla %17,5’e karşılık %8,5; %30,5’e karşılık %21,8, p<0,0001); kötü dereceli tümörler (%20’ye karşılık %5,9, (p<0,0001) taşlı yüzük hücreli tümör komponenti (%6,7’e karşılık %3,1; p=0,018 Fisher’s Exact Test), medüller tümör komponenti (%10,3’e karşılık %3,5; p<0,0001) daha sık görülmektedir. Sağ kolon yerleşimli tümörler ayrıca daha ileri evreye (pT3-pT4) sahiptir (pT3:%83,4’e karşılık %78,7; pT4:%12,6’e karşılık %7,8, p<0,0001). Sol kolonda yerleşen tümörlerde ise kirli nekroz oranı daha fazla görülmektedir (%56’ya karşılık %48,4, (p<0,0001).



#### ***4.4.MMR Protein Ekspresyon Kaybına İlişkin Bulgular:***

Çalışmaya dahil edilen 1002 olgudan 175 tanesinde (% 17,5) İHK'sal olarak bir veya daha fazla MMR proteininde ekspresyon kaybı izlendi. Bu olguların toplamda 60'ında (%6) MLH1, 124'ünde PMS2 (%12,4), 45'inde MSH2 (%4,5) ve 72 (%7,2)'sinde MSH6 kaybı saptandı. En sık MLH1-PMS2 (n=53, %30,2), izole PMS2 (n=40, %23) ve MSH2-MSH6 (n=24, %13,7) kaybı gözlemlendi.

MMR kaybı gösteren olgularda izlenen ekspresyon paterni örnekleri Resim 8-11'de verilmiştir.

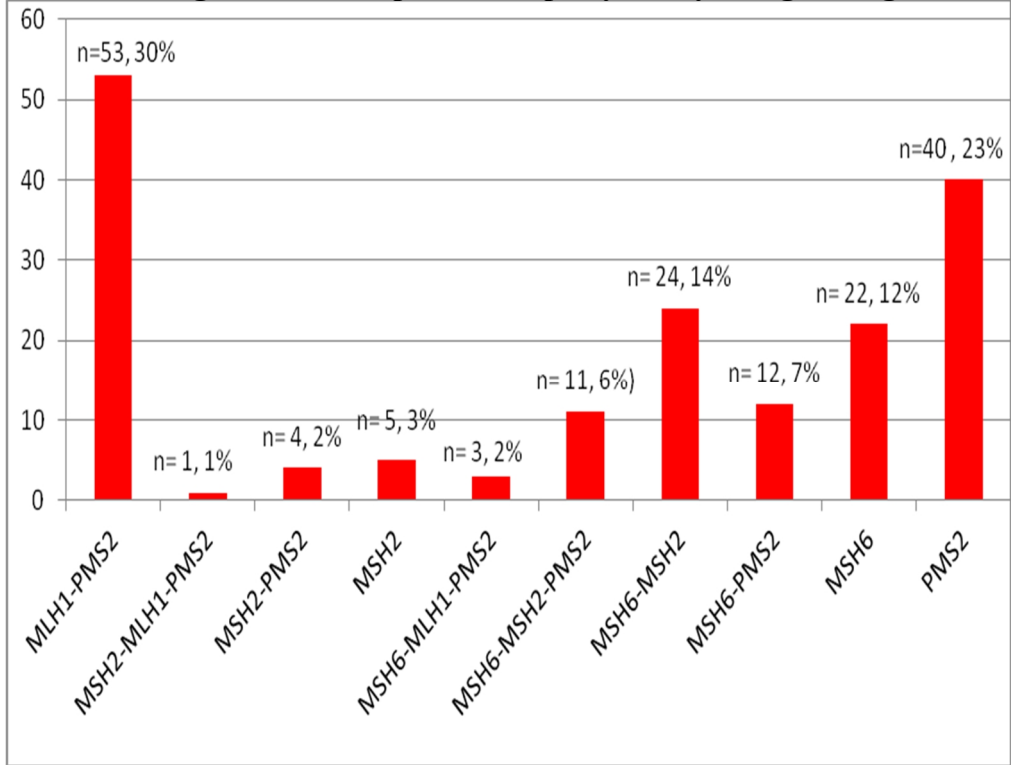
Olguların MMR protein ekspresyon kaybına göre dağılımı Grafik 1'de verilmiştir.

#### **Heterojenite**

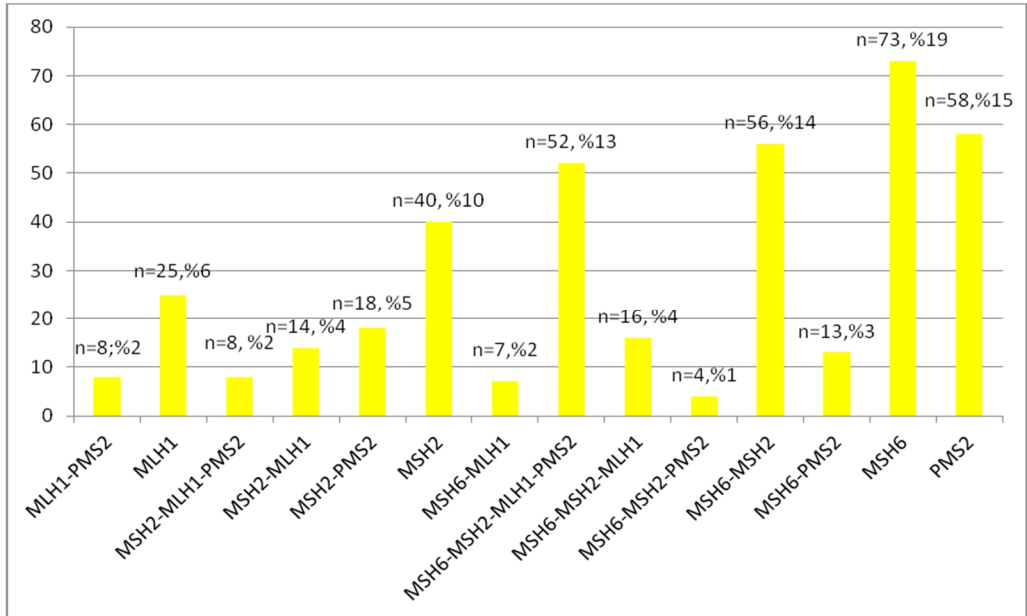
Tümörlerin %39,1'inde (n=392) boyanma yaygınlığı ve şiddetinde heterojen bir dağılım izlendi. Heterojenite en yüksek oranda MSH-6 (%19) ve PMS2 (%15) ekspresyonlarında izlenmekteydi.

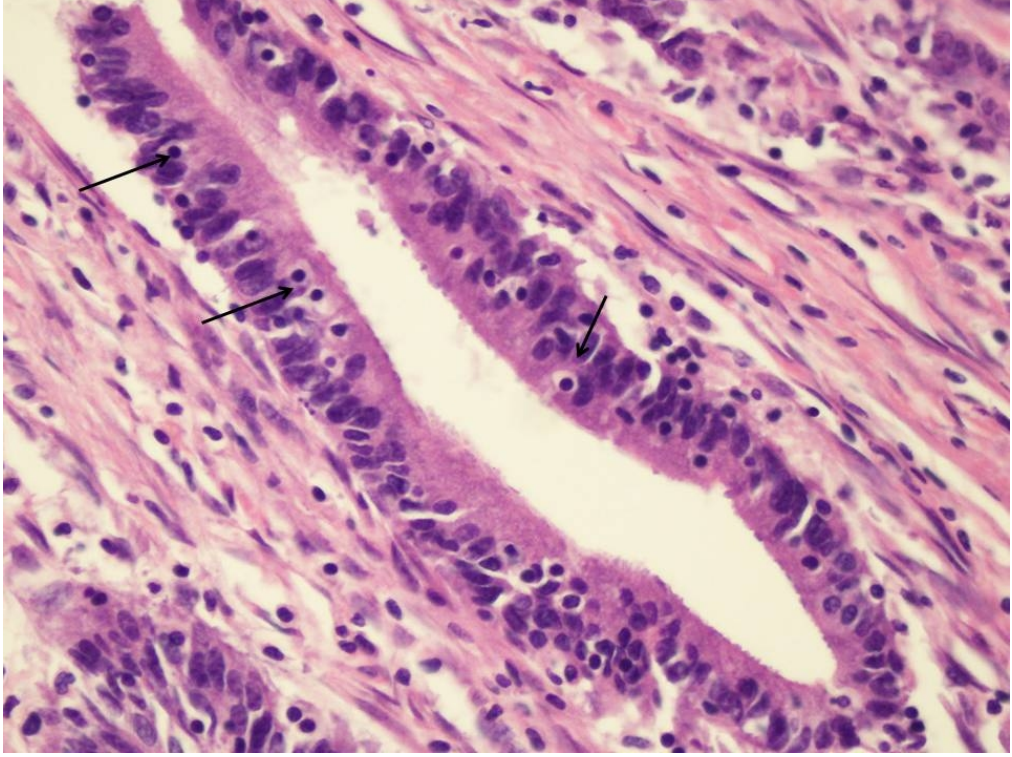
Heterojenite izlenen olguların dağılımı Grafik 2'de verilmiştir

**Grafik 1: Olguların MMR protein ekspresyon kaybına göre dağılımı**

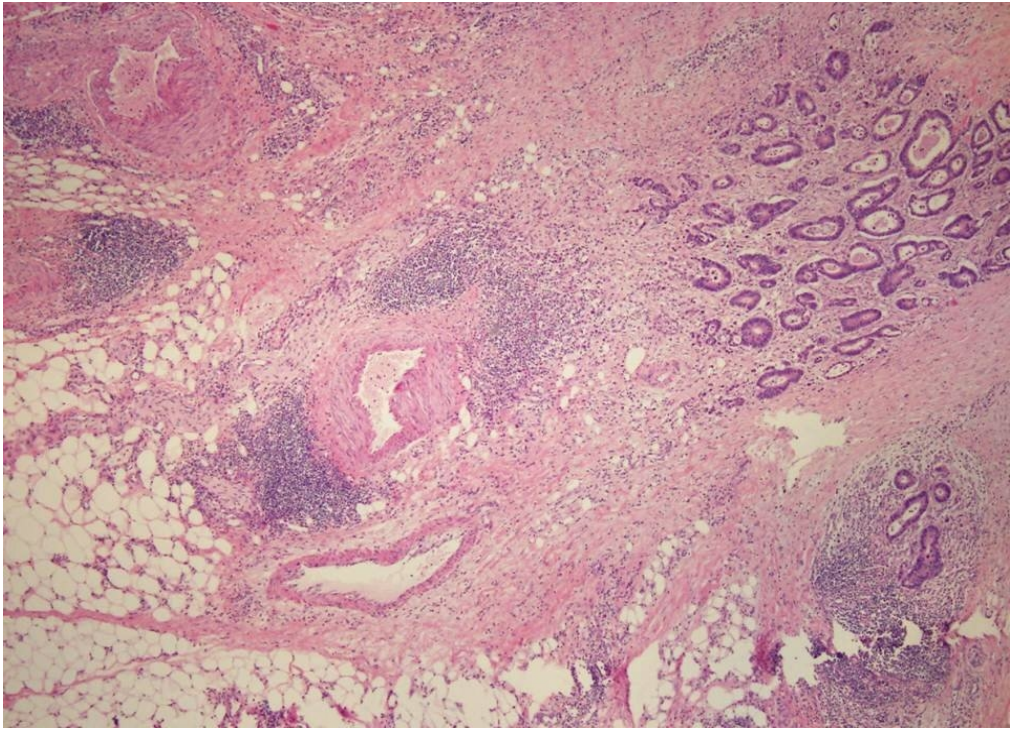


**Grafik 2: Heterojenite izlenen olguların dağılımı**

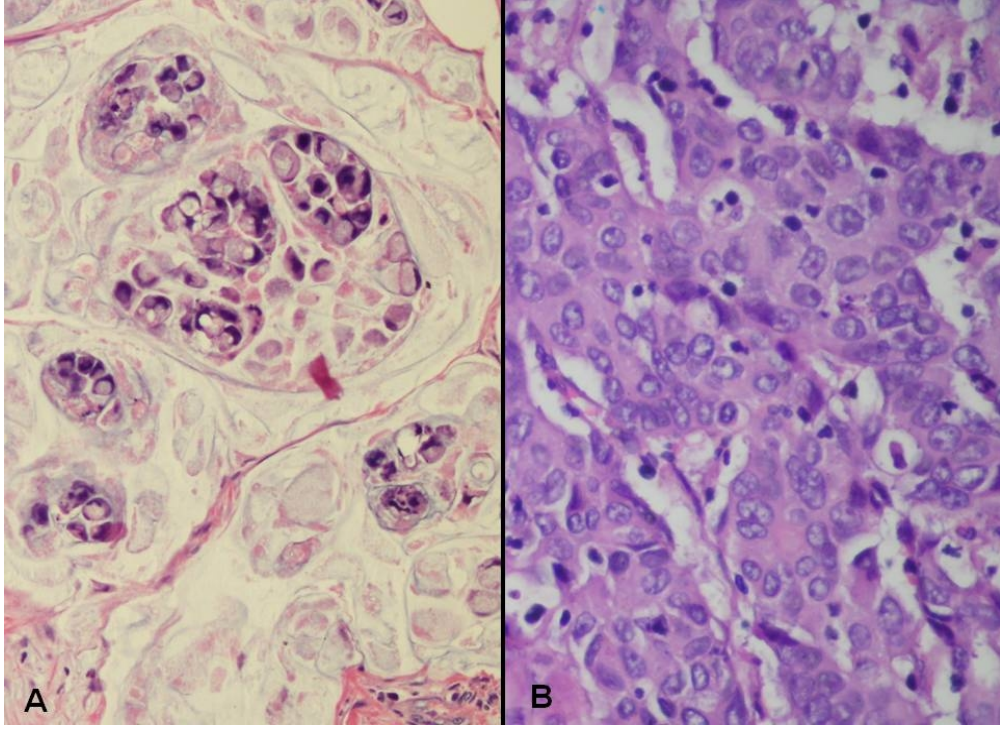




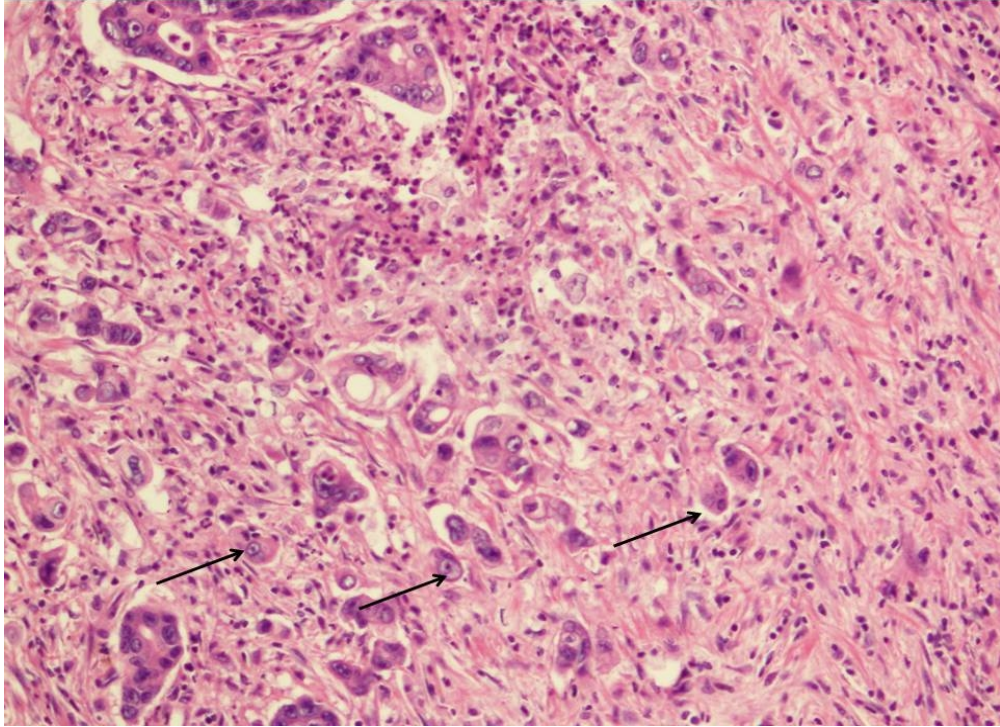
**Resim 4:** TIL: Tümör infiltre eden lenfositler. Tümöral glandlar içinde etraflarında şeffaf halo bulunan lenfositler görülüyor (oklar) (HE, x40).



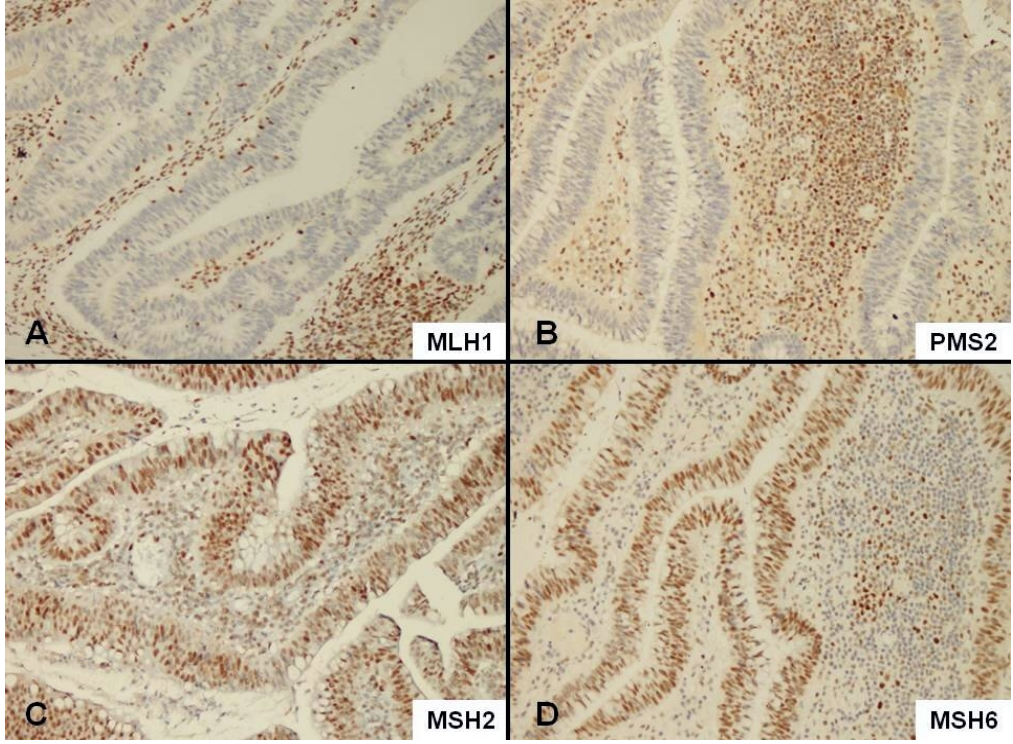
**Resim 5:** Crohn-benzeri lenfositik yanıt. Tümörün infiltratif sınırında lenfoid agregatlar izleniyor. (HE, x4).



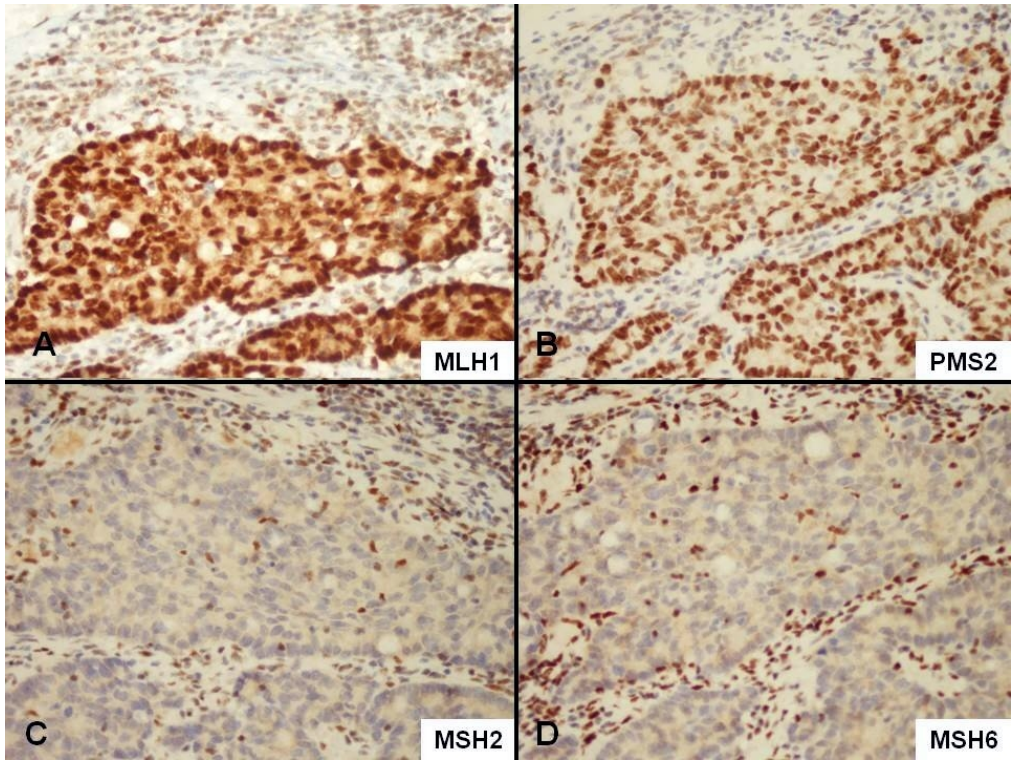
**Resim 6:** A-Taşlı yüzük hücreli component içeren adenokarsinom. (HE,x20). B-Medüller karsinom. Geniş eozinofilik sitoplazmalı, veziküler nükleuslu, nükleol belirginliği gösteren hücreler (HE, x20).



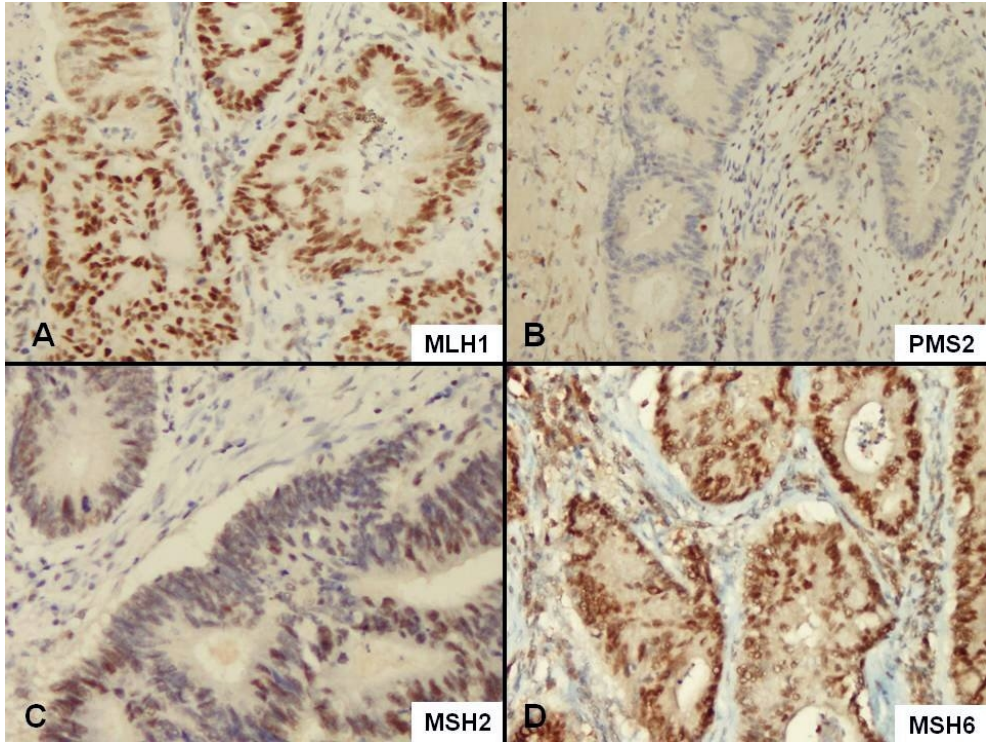
**Resim 7:** Tümör tomurcuklanması “budding”. Tümörün infiltratif sınırında pleomorfik az diferansiye hücreler dikkat çekici (oklar) (HE, x20).



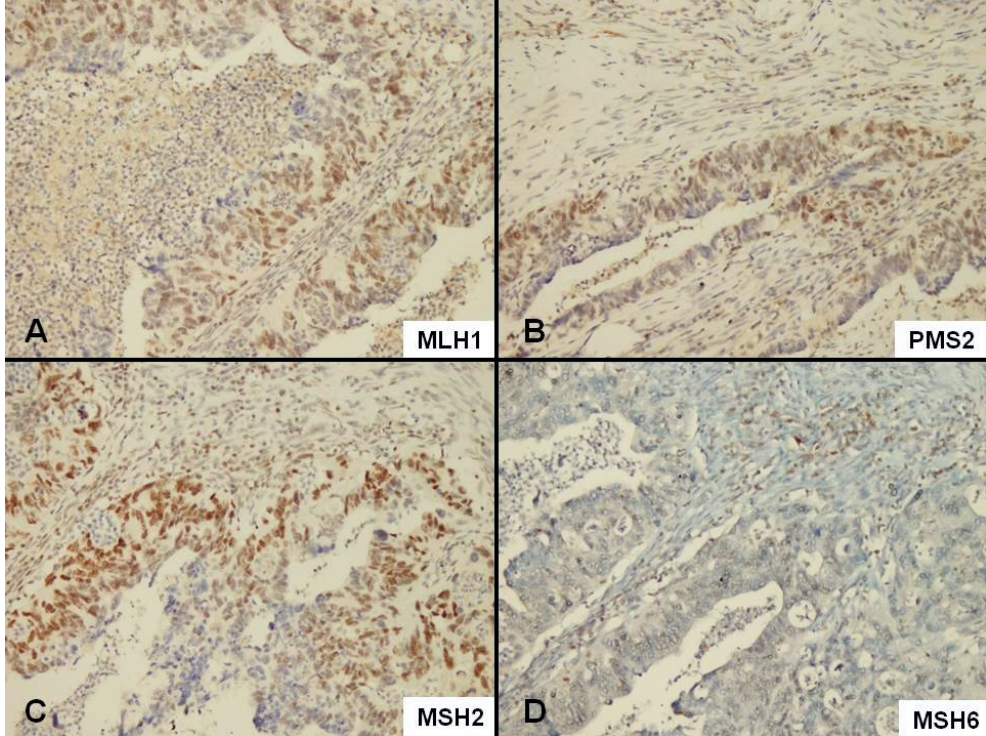
**Resim 8: MLH1-PMS2 protein ekspresyonu kaybı. MSH2-MSH6 protein ekspresyonları pozitif, MLH1 ve PMS2’de ise iç kontrol olarak lenfositlerin boyandığı görülüyor. (DAB, x10).**



**Resim 9: MSH2-MSH6 protein ekspresyonu kaybı. MLH1-PMS2 protein ekspresyonları pozitif, MSH2 ve MSH6’de ise lenfositlerin boyandığı görülüyor. (DAB, x10).**



**Resim 10: İzole PMS2 proteini ekspresyon kaybı.** MLH1-MSH2 ve MSH6 protein ekspresyonları pozitif; PMS2 ekspresyonunda ise kayıp olduğu görülmüyor. MSH2 ekspresyonundaki heterojen boyanma dikkat çekici. (DAB, x20).



**Resim 11: İzole MSH6 protein ekspresyonu kaybı.** MLH1-PMS2 ve MSH2 protein ekspresyonları pozitif; MSH6 ekspresyonunda ise kayıp olduğu görülmüyor. (DAB, x10).

#### **4.5.MMR Protein Ekspresyon Kaybının Klinikopatolojik, Histolojik ve**

##### **MSI-H İlişkili Bulgularla İlişkisi**

MMR protein ekspresyon kaybı erkeklerde daha fazla görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. MMR protein ekspresyon kaybı olan olgular ekspresyon kaybı olmayan olgulara göre daha genç yaşta idi (medyan yaş  $61\pm 14,9$ 'e karşılık  $64\pm 12,1$ ;  $p=0,01$ ). Sağ kolon yerleşimi (%45,1'e karşılık %17,4;  $p<0,0001$ ) daha sık, tümör çapı daha büyük olarak saptandı ( $6\pm 3,2$ 'e karşılık  $4,7\pm 2$ ;  $p<0,0001$ ).

MMR protein ekspresyon kaybı saptanan olgular daha sıklıkla kötü diferansiye ve yüksek dereceli tümörlerden oluşmaktaydı. Kötü diferansiye tümörlerin; MMR protein ekspresyon kaybı saptananlar arasındaki oranı %21,7 iken kayıp saptanmayanlar arasındaki oranı %6,1'di ( $p<0,0001$ ). Aynı şekilde düşük dereceli tümörlerin; MMR protein ekspresyon kaybı saptananlar arasındaki oranı %78,3 iken kayıp saptanmayanlar arasındaki oranı %93,9 idi ( $p<0,0001$ ).

MMR protein ekspresyon kaybı saptanan olgularda TIL varlığı daha fazla görülmekteydi ( $p<0,0001$ ) ve olguların %20'sinde TIL sayısı 2'den büyüktü (MMR protein ekspresyon kaybı saptanmayan olgularda bu oran %8,3 idi) TIL sayısı ortalaması  $0,87\pm 2$ 'di ve ekspresyon kaybı olmayanlara göre daha yüksekti ( $p<0,0001$ ).

Fokal müsinöz diferansiyasyon ve müsinöz adenokarsinom oranı (sırasıyla %28,6'ya karşılık %22,7 ve %13,7'ye karşılık %9,8;  $p=0,043$ ) ve medüller tümör komponenti gösteren olguların oran; (%14,9'a karşılık %2,9,  $p<0,0001$ ) daha yüksek olarak bulundu.

Tümör "budding" oranı (%16'a karşılık %25,4,  $p=0,008$ ) ve kirli nekroz oranı (%41,7'e karşılık %57,  $p<0,0001$ ) ise daha az oranda görülmekteydi.

MMR protein ekspresyon kaybı ile cinsiyet, tümör tipleri, tümör evresi (pT), lenf nodu metastazı sayısı ve evresi (pN), LVİ, PNI, satellit nodül,

Crohn-benzeri lenfositik yanıt, taşlı yüzük hücreli komponent ve tümörün infiltratif sınırının konfigürasyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. (Tablo 9)

MMR ekspresyon kaybı gösteren olgular ile MMR ekspresyonu olan olguların, klinikopatolojik, histolojik ve MSI-H fenotipik özellikler açısından karşılaştırması Tablo 9, 10 ve 11'de; olguların yaş, tümör çapı, metastatik lenf nodu sayısı ve TIL sayısı açısından karşılaştırmaları Tablo 12'de verilmiştir

#### ***4.6.MLH1 Ekspresyon Kaybı Gösteren Olguların Özellikleri***

MLH1 ekspresyon kaybı olan olgularda medyan yaş  $61\pm 15,82$  idi. MLH1 ekspresyon kaybı gösteren ve göstermeyen olgular karşılaştırıldığında, MLH1 ekspresyon kaybı olan tümörlerin;

Kadınlarda (%53,3'e karşılık %39,  $p=0,0027$ ), 50 yaş altında (%30,9'a karşılık %17,8,  $p=0,02$ ) ve sağ kolonda (%66,7'ye karşılık %33,3;  $p<0,0001$ ) görülme oranının daha yüksek olduğu görüldü.

Kötü diferansiye tümör oranı daha yüksekti (%34,6'e karşılık %7,2;  $p<0,0001$ ). Crohn-benzeri lenfositik yanıt (%51,7'e karşılık %37,6,  $p=0,03$ ), %50'den fazla müsinoz komponent (%15'e karşılık %10,2,  $p=0,029$ ) ve medüller komponenti (%25'e karşılık %3,7;  $p<0,0001$ ) olanlarda daha fazla izlendi. (Tablo 11). Ortalama tümör çapı ( $7,1\pm 3,2$ 'e  $5,1\pm 2,3$ ,  $p<0,0001$ ) ve TIL sayısı ( $1,05\pm 1,7$ 'e karşılık  $0,4\pm 1,5$ ;  $p<0,0001$ ), MLH1 kaybı göstermeyenlere göre daha yüksekti. Metastatik LN sayısı düşüktü ( $1,32\pm 3$ 'e karşılık  $2,1\pm 3,9$ ;  $p=0,0045$ ). Tümör "budding"i ve kirli nekroz ise daha az oranda izlendi (sırasıyla %11,7'e karşılık %24,5;  $p=0,023$  ve %28,3'e karşılık %55,9 idi  $p<0,0001$ ).



#### ***4.7.PMS2 Ekspresyon Kaybı Gösteren Olguların Özellikleri***

PMS2 ekspresyon kaybı olan olgularda medyan yaş  $61\pm 15,19$ 'di. PMS2 ekspresyon kaybı; erkeklerde ( $p=0,037$ ), sağ kolon yerleşimli olgularda (%47,6'ya karşılık %24,2;  $p<0,0001$ ), tümör diferansiasyonu kötü ve tümör derecesi yüksek olanlarda (% 69,8,'e karşılık % 7,1;  $p<0,0001$ ), TIL olanlarda ( $0,9\pm 1,8$ 'e karşılık  $0,4\pm 1,4$   $p<0,0001$ ), müsinöz (%15,3'e karşılık %9,8; $p=0,044$ ), medüller (%15,3'e karşılık %3,5;  $p<0,0001$ ) komponente sahip olanlarda ve kirli nekrozu olmayanlarda (%60,5'a karşılık %43,6;  $p<0,0001$ ) daha fazla idi.

Bu olgularda ayrıca tümör çapı daha fazla ( $6\pm 3,4$ 'e karşılık  $4,7\pm 2,1$ ,  $p<0,0001$ ), TIL sayısı ortalaması daha yüksekti ( $0,85\pm 1,8$ 'e karşılık  $0,36\pm 1,4$ ;  $p<0,0001$ ).

Tümör "budding"i ve kirli nekroz ise MLH1 kaybı olanlara benzer şekilde daha az oranda izlendi (sırasıyla %16,9'a karşılık %24,7;  $p=0,06$  ve %39,5'a karşılık %56,4 idi  $p<0,0001$ ).

#### ***4.8.MSH2 Ekspresyon Kaybı Gösteren Olguların Özellikleri***

MSH2 ekspresyon kaybı olan olgularda tümörler daha çok sağ kolon yerleşimli ( $p=0,05$ ) olup müsinöz, taşlı yüzük hücreli karsinom komponenti daha fazla idi (sırasıyla  $p=0,029$ ,  $p=0,021$ ; ki-kare). Medüller tümör komponentinin oranı; MSH2 ekspresyon kaybı olan olgularda %13,3 iken; MSH2 ekspresyon kaybı olmayan olgularda %4,6'di ( $p=0,021$  Fisher's Exact). Tümör "budding" oranı daha azdır (%8,9'a karşılık %24,5,  $p=0,017$ ). MSH2 ekspresyon kaybı olan olgularda tümör çapı daha büyük olarak saptandı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $6\pm 2,9$ 'a karşılık  $5\pm 2,3$ ;  $p=0,004$ ) daha genç olgulardır (medyan yaş  $61\pm 13,1$ 'e karşılık  $63\pm 13,6$ ,  $p=0,048$ ).

#### ***4.9.MSH6 Ekspresyon Kaybı Gösteren Olguların Özellikleri***

Sağ kolon yerleşimli tümörlerde MSH6 ekspresyon kaybı daha fazla izlendi (%10,3'e karşılık %6,2; p=0,04). MSH6 ekspresyon kaybı saptananlar arasındaki yüksek dereceli tümörlerin oranı %16,9 iken kayıp saptanmayanlar arasındaki oranı %8,1'di ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,016).

LVI oranı; MSH6 ekspresyon kaybı olan olgularda %13,9 iken; MSH6 ekspresyon kaybı olmayan olgularda %25,9'di (p=0,023). MSH6 ekspresyon kaybı saptanan olguların %20,8'inde TIL sayısı 2'den büyük iken; MSH6 ekspresyon kaybı saptanmayan olguların sadece %9,6'sında 2'den büyüktür ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmaktadır (p=0,003).

MSH6 ekspresyon kaybı olan olgularda medyan yaş  $60,5 \pm 13,7$ 'di ve ekspresyon kaybı olmayan olgulara ( $63 \pm 12,6$ ) göre daha genç yaş ortalamasına sahiptiler (p=0,036). MSH6 ekspresyon kaybı olan olgularda tümör çapı daha büyük olarak saptandı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $6 \pm 3,5$ 'a karşılık  $5 \pm 2,2$ ; p=0,002). TIL sayısı ortalaması  $0,96 \pm 2,4$ 'di ve ekspresyon kaybı olmayanlara göre daha yüksekti ( $0,38 \pm 1,3$ ; p=0,011).

#### ***4.10.Sağkalım***

Ortalama izlem süresi -olguların operasyonundan sonra geçen süre üzerinden değerlendirildiğinde-  $51,87 \pm 37,27$  ay (Dağılım: 0-145 ay) idi. Beş olguda operasyon kaydından başka bir bilgiye, 68 olguda ise son durum bilgisine ulaşamadı.

Sağkalım bilgisine ulaşılan 929 olgunun 517'sinin (%51,6) yaşıyor olduğu, 412'sinin (%41,1) ise kaybedildiği (eksitus), öğrenildi. Ölenlerin 59'u (%14,3) postoperatif ilk üç ay içerisinde kaybedilmişti. Bu olgular sağkalım analizlerinde değerlendirme dışı bırakıldı.

En az 5 yıllık takibi olan 663 olgu değerlendirildiğinde olguların 376'sının (%56,7 $\pm$ 0,19) bu sürenin sonunda sağ kaldığı, 287'sinin (%43,2) ise kaybedildiği görüldü. Sağ kalanların medyan yaşam süresi  $87,5 \pm 22,5$  ay (Dağılım: 61-145 ay), kaybedilenlerin medyan yaşam süresi  $24 \pm 15,25$  ay (Dağılım: 4-60 ay)'dı.

#### **4.10.1.Klinikopatolojik veriler-sağkalım ilişkisi**

Klinikopatolojik verilerin 5 yıllık sağkalımla ilişkisi Tablo 13'de verilmiştir.

Genel sağkalım süresini azaltan faktörler; müsinöz ve taşlı yüzük hücreli tümör komponenti ( $p=0,000$ ), ileri pT ( $p=0,000$ ), ileri pN ( $p=0,000$ ), LVİ ( $p=0,000$ ), PNİ ( $p=0,000$ ), satellit tümör nodülü varlığı ( $p=0,000$ ), müsinöz ( $p=0,011$ ) veya taşlı yüzük hücreli tümör komponenti varlığı ( $p=0,028$ ), ve tümör tomurcuklanması "budding" ( $p<0,0001$ ) olarak görülmüştür.

Düşük dereceli tümörlerde ( $p=0,015$ ), TİL izlenen tümörlerde ( $p=0,002$ ), Crohn-benzeri reaksiyonu olanlarda ( $p=0,002$ ), ve ekspansif tümörlerde ( $p=0,007$ ) ise sağkalım süresinin daha uzun olduğu görülmektedir.

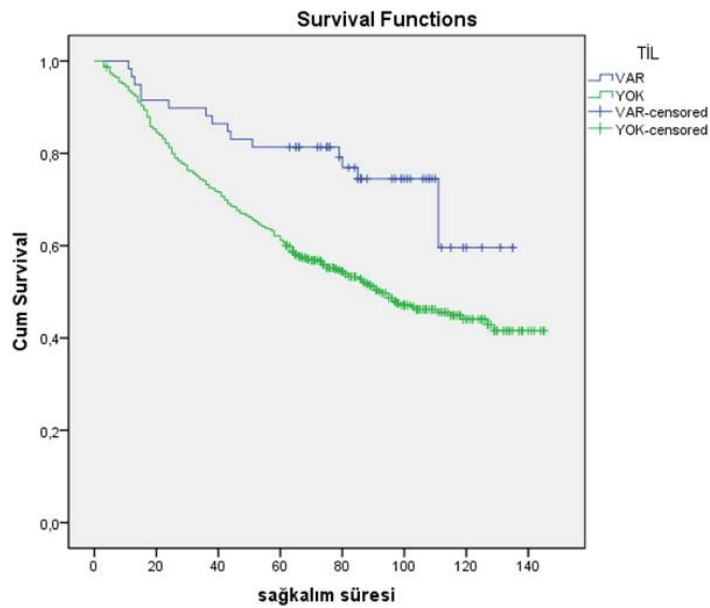
Lenf nodu metastazı olmayıp satelit tümörü olan (N1c) olguların, sağkalım süresi açısından N0 tümörlerden daha kısa sağkalıma sahip olup N1 tümörlere benzer özellik göstermesi dikkat çekicidir ( $p < 0,001$ ).

Multivaryasyon analizlerinde bu parametreler arasından özellikle TIL varlığı sağkalım üzerinde prediktif değere sahiptir.(odds ratio-OR:2,11; %95 Güvenlik aralığı-CI:1,25-3,67,  $p=0,008$ ), (Grafik 1).

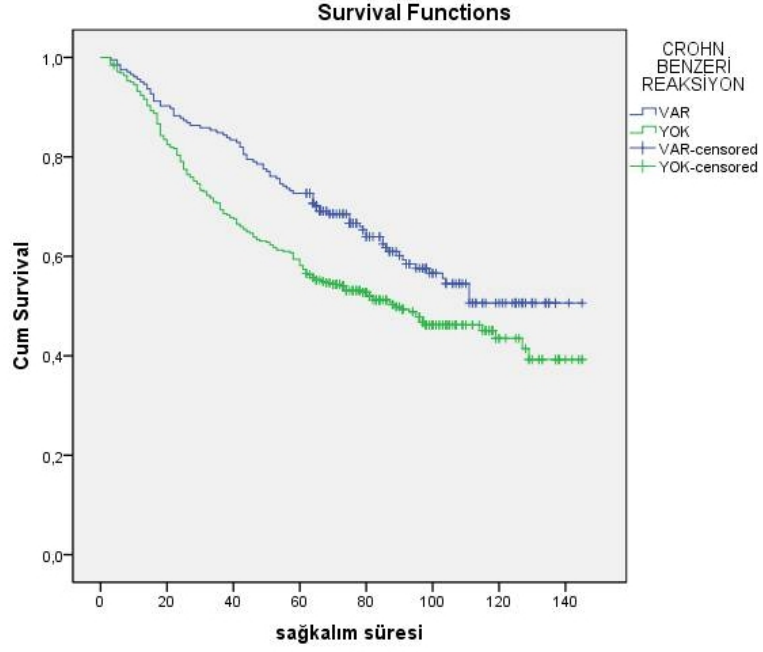
Crohn-benzeri lenfositik yanıt (OR:1,56;%95 CI:1,12-2,16,  $p=0,007$ ) (Grafik 2) ve tümör “budding”inin (OR: 2,28; %95 CI:1,59-3,28,  $p < 0,001$ ) yokluğunun (Grafik 3). 5 yıllık sağkalımla ilişkili olduğu görülmüş, ancak lojistik regresyon analizlerinde bu özelliklerinin prediktif değerinin önemini kaybettiği saptanmıştır. Beş yıllık sağkalım üzerinden sağkalanların eksituslara oranları TIL varlığı olanlarda (%13’e karşılık %6,6,  $p=0,007$ ), Crohn-benzeri lenfositik yanıtı olanlarda (%40,4’e karşılık %30,3,  $p=0,07$ ) daha fazla; tümör “budding”i olanlarda daha azdır (%17,6’ya karşılık %32,8,  $p=0,000$ )

MMR proteinlerinin ekspresyon kaybının 5 yıllık sağkalımla ilişkisi Tablo 13’de verilmiştir. Genel olarak MMR proteinlerinin ekspresyon kaybı ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki izlenmemiştir. Heterojenitenin de sağkalıma etkisi olmadığı görülmüştür.

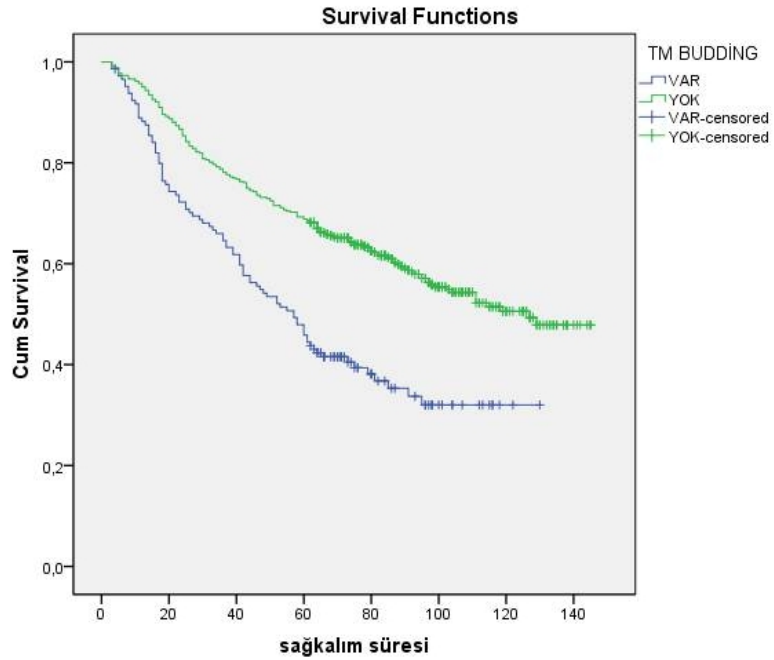
**Grafik 3:** TIL varlığı izlenen olgulardaki 5 yıllık sağkalım



**Grafik 4:** Crohn-benzeri lenfositik yanıt varlığı olan olgulardaki 5 yıllık sağkalım



**Grafik 5:** Tümör “budding” olan olgulardaki 5 yıllık sağkalım





## 5.TARTIŞMA

Kolorektal karsinogenezis ilk olarak 1990 yılında Vogelstein tarafından tanımlanmış (42) ve sonra hızla yeni karsinogenezis basamakları ortaya atılmıştır. Bu süreç içerisinde birçok moleküler gelişim basamağı aydınlatılmış ve yeni karsinogenezis yolları tanımlanmıştır. KRK hastalarının bireysel hedefe yönelik tedavi protokollerinin ve prognozlarının belirlenebilmesi için bu yolların tanımlanması önem taşımaktadır.

Kolorektal karsinogenezis yollarından birisi olan MSI yolağı sporadik kolorektal kanserlerin %15-20'sinden ve HNPCC (Lynch Sendromu) ile ilişkili tümörlerden sorumludur (5-7). Lynch Sendromu tüm KRK'lerin %2-5'nin gelişiminden sorumlu olan (80) ve MMR genlerinde mutasyonla karakterize otozomal dominant geçiş gösteren bir sendromdur(7). Kolon kanseri yanı sıra endometrium, pelvis renalis, ince barsak ve üreter tümör insidansında da artma görülür. Erken yaşta senkron ve metakron tümörler ile seyreden ve ailenin birçok jenerasyonunu etkileyen bir sendrom(34) olması nedeniyle Lynch Sendromlu bireyi tanımak diğer aile bireylerinin kanser gelişmeden taranabilmesine ve hasta yönetiminin daha etkili yapılabilmesine olanak vermektedir.

Lynch Sendromu açısından genetik inceleme yapılacak hasta seçimi için birçok yönerge altın standart olarak PCR-tabanlı MSI-test yapılmasını önermektedir (6,7). Ancak MSI-test, hem maliyetinin yüksek oluşu hem de zaman alıcı olması açısından tarama amaçlı kullanılabilecek bir yöntem değildir. Bu yüzden son yıllarda özellikle İHK'sal olarak belirlenen MMR proteinlerinde ekspresyonun kaybının analitik duyarlılığı ile PCR-tabanlı MSI-test sonuçlarını karşılaştıran çalışmalar yapılmıştır ve duyarlılığın benzer oranlarda olduğu saptanmıştır (16,85,88). Bu bilgiler ışığında İHK'sal olarak MMR protein ekspresyonu kaybının gösterilmesi Lynch Sendromu tanılma algoritmasında ilk basamağa alınmıştır. İHK'nın doğrudan MMR protein ekspresyonunu veya kaybını göstermesi ve mutasyon analizini direkt olarak protein kaybı bulunan gene yönlendirebilmesi ek bir avantaj olarak gösterilmektedir(5). Ayrıca sporadik kolorektal kanserlerde de MMR protein kaybının görülebilmesi ve bunun tedavi

yanıtı ya da prognozu öngörmedeki halen araştırılan olası rolü nedeniyle tüm KRK'de refleks İHK'sal çalışma yapılmasını öneren yayınlar da mevcuttur(7,18). Bununla birlikte İHK'sal incelemenin değerlendirilmesinde MMR proteinlerinin in vivo koşullardaki heteodimerizasyonu (birbirine bağlı olması) nedeniyle bazı zorluklar bulunmaktadır. Protein kaybı izole olabileceği (izole MSH6, izole PMS2 kaybı) gibi, bir başka protein kaybıyla da birliktelik (kombine MLH1-PMS2, MSH2-MSH6 kaybı gibi) gösterebilmektedir. Bu nedenle literatürde İHK'sal tarama için seçilecek antikörlerin hangileri olması gerektiği ile ilişkili farklı yaklaşımlar bulunmaktadır (17,85).

MSI tümörlerin tespiti ayrıca hasta sağkalımı hakkında prognostik bir belirteç olması ve KT seçiminde prediktif önem taşıması nedeniyle de önemlidir. Yapılan birçok çalışmada sporadik MSI tümörlerin, MSS tümörlere göre daha iyi prognoza sahip olduğu; genel sağkalımlarının daha yüksek olduğu belirtilmektedir (114,115). Bununla birlikte MSI-H tümörlerin, KRK'lerin klasik tedavisinde kullanılan 5-FU bazlı KT'ye genellikle kötü yanıt verdiği de bildirilmektedir (6,93). Bu yüzden KT seçimi öncesi MSI durumunun bilinmesi hasta bazlı tedavi modalitesinin seçiminde önemli yer tutmaktadır.

Bu çalışmada MMR protein kaybını öngörme değeri olabilecek histolojik ya da klinik (yaş, cinsiyet, lokalizasyon) parametreler incelenmiş, İHK'sal inceleme sonuçlarına dayanarak MSI olasılığının testi için aday olgu profilinin belirlenip belirlenemeyeceği araştırılmıştır.

Çalışma kapsamında 1002 olguda klinikopatolojik veriler (yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, tümör çapı, senkron-metakron tümör), histolojik veriler (tümör tipi, tümör derecesi, pT, pN, lenf nodu metastazı sayısı, LVİ, PNİ, satellit nodül varlığı) ve MSI-H fenotip ilişkili histolojik veriler (TIL, Crohn-benzeri lenfositik yanıt, müsinöz tümör komponenti, taşlı yüzük hücreli tümör komponenti, medüller tümör komponenti, mikropapiller tümör komponenti, kribriform-komodo nekrozlu tümör komponenti, kirli nekroz varlığı, tümör "budding" varlığı, tümörün infiltratif sınırı) değerlendirilmiş; Ocak 2014 tarihi itibari ile olguların genel sağkalım verileri elde edilmiş ve İHK'sal olarak değerlendirilen MMR protein ekspresyon kayıpları eşliğinde yorumlanmıştır.

### ***5.1.MMR Protein Ekspresyon Kaybı***



Olguların 175'inde (%17,5) DNA MMR proteinlerinden en az bir tanesinde ekspresyon kaybı görülmüştür. Farklı çalışmalarda sporadik KKR'da MMR ekspresyon kaybının %20'lere kadar çıktığı görülmektedir (8,112). MMR proteinlerinde ekspresyon kaybı gösteren olguların 60'ında MLH1, 124'ünde PMS2, 45'inde MSH2 ve 72'sinde MSH6 kaybı saptanmış olup; oranları sırası ile %6; %12,4; %4,5 ve %7,2'dir. Ayrıca olguların 53'ünde (%30,2) MLH1-PMS2; 24'ünde (%13,7) MSH2-MSH6 ekspresyon kaybı birlikte izlenmiştir. Hiçbir olguda izole MLH1 kaybı saptanmazken; 40 olguda izole PMS2; 22 olguda izole MSH6 kaybı, 5 olguda da izole MSH2 kaybı saptanmıştır (%4; %2,2; %0,5 sırasıyla). DNA MMR kaybı saptanan olguların büyük çoğunluğu literatürle uyumlu olacak şekilde MLH1 veya MSH2 kaybı (%60'ı) gösteren olgulardan oluşmaktadır (5). MSH2 ekspresyon kaybı genellikle germline mutasyonlar sonucunda meydana gelirken; MLH1 ekspresyon kaybı germline mutasyonlar yanı sıra somatik hipermetilasyonlar sonucu da oluşabilmektedir, bu nedenle en sık görülen ekspresyon kayıplarındandır (90). Ancak serimiz içerisinde önceki çalışmaların çoğundan farklı olarak en fazla ekspresyon kaybı gösteren proteinin PMS2 (%12,4) olması dikkat çekicidir (8,18,85,109). En sık gözlenen MMR protein kayıplarının nedenleri çok iyi bilinmemekle birlikte Chew ve ark.'larının Asya ırkından 50 yaş altı, 240 olgudan oluşan serilerinde en fazla ekspresyon kaybı gösteren proteinin %13 oranı ile PMS2 olarak saptanmış olması bu ekspresyonlarda coğrafi ve ırksal değişkenliklerin de rol oynayabileceğini düşündürmektedir (116).

MMR protein ekspresyon kaybı heterodimerler şeklinde değerlendirildiğinde en fazla görülen kombinasyon MLH1-PMS2 kaybı birlikteliği olmuştur ve bu sonuç literatür ile uyumludur (9,18,110). MLH1-PMS2 kaybı daha çok sporadik MSI tümörlerde, MSH2-MSH6 kaybı ise daha çok Lynch Sendromu ilişkili MSI tümörlerde gözlenmektedir (61)

### ***5.1.1.MMR Protein Ekspresyon Kaybının Klinikopatolojik Veriler ile İlişkisi***

**Yaş:** Çalışmamızda MMR protein ekspresyon kaybı olan olgularda tümör saptanma yaşı protein kaybı olmayan olgulara göre anlamlı olarak daha düşük olarak bulundu. Önceki çalışmalar da Lynch Sendromu ilişkili tümörlerin

sporadik KKK'lara göre daha erken yaşta başladığı konusunda hemfikirdir (8,82). Sporadik gelişen ve MMR proteinlerinde ekspresyon kaybı gösteren tümörlerde ise yaş aralığı büyük çoğunlukla 50 ile 74 yaşlar arasında saptanmıştır (8,114). Serimizdeki 50 yaş altı olguları incelediğimizde %28,2'sinde MMR protein ekspresyon kaybı saptadık ve bu oran 50 yaş üstü ekspresyon kaybı saptanmayan olguların oranından (%14,7) anlamlı olarak yüksekti. MMR protein ekspresyon kayıpları tek tek incelendiğinde MLH1, PMS2, MSH2 ve MSH6 kaybının da yine 50 yaş altındaki olgularda anlamlı olarak daha yüksek oranda olduğu görüldü bu bulgu da önceki çalışmalar ile uyum içerisindeydi (80,82).

**Cinsiyet:** Çalışmaya alınan olgular içerisinde kadınların oranı daha düşük (%39,8) olmakla birlikte MLH1 ve PMS2 ekspresyon kaybı gözlenen olguların gözlenmeyenlere göre kadınlarda daha fazla olması; genel MMR kaybı ve MSH2 ve MSH6 kaybında bu ilişkinin olmayışı ve PMS2 kaybı gözlenen olgular genel olarak değerlendirildiğinde erkeklerin daha fazla olması dikkat çekiciydi. Literatürde MMR protein ekspresyon kaybı olan olgular içerisinde kadın oranlarının yüksek olduğu gösteren yayınlar olmakla birlikte cinsiyet açısından anlamlılık saptamayan yayınlar da mevcuttur (115-117). Ancak Belizzi ve ark'nın, serilerindeki Lynch Sendromu ilişkili tümörlerde kadın erkek cinsiyeti açısından fark saptanmamışken; sporadik MSI tümörlerde kadın cinsiyetin baskınlığından söz eden çalışması ilgi çekicidir (118).

**Çap:** MMR protein ekspresyon kaybı gösteren tümörlerin daha büyük çaplara ulaştığını gösteren birçok çalışma mevcuttur (115-119). Biz de MMR protein ekspresyon kaybı olan olgularda tümör çapının daha büyük olduğunu saptadık. MMR protein ekspresyon kaybının ve MSI-H tümörlerin daha çok sağ kolon yerleşimli tümörlerde fazla olması (8,18,82) tümör çapının büyüklüğü ile ilişkilendirilebilir bir bulgu gibi görünmektedir.

**Lokalizasyon:** Serimizde MMR kaybı gösteren tümörler içerisinde sağ kolon yerleşimi öne çıkmaktadır. Aslında sağ kolon tümörlerinin oranı rektum dahil sol kolon tümörleriyle karşılaştırıldığında daha azdır ancak MMR kaybı göstermeyen olgulara kıyaslandığında yine sağ kolon baskınlığı görülmektedir. Chapusot ve ark.'ı MMR ekspresyon kaybı olan tümörlerde sağ kolon yerleşiminin %35 oranında bulunduğunu ve bu lokalizasyonun kötü diferansiyasyon

tümör gelişimi ile birlikte MMR kaybı için sensitivitesi yüksek bir prediktif değeri olduğunu vurgulamıştır (120). Serimizdeki çoklu tümörlerle MMR protein ekspresyon kaybının bir ilişkisinin olmadığı görülmüştür.

**Evre:** MSI-H fenotip tümörlerin tümör invazyon derecesi (pT) yüksek olma eğilimindeyken; genel TNM evreleri düşük olmaktadır. Genellikle lenf nodu metastazlarının az olduğu kabul görmüştür (115). Serimizdeki olgularda ise MMR kaybı ile pT ve pN arasında bir ilişki saptanmamıştır. Bunda olguların evrelere göre dağılımının heterojen olmayışı ve tümörlerin %80'inin T3 evresinde olmasının rolü olabileceği düşünülmüştür. Raut ve ark.'ları MMR kaybı olan vakalardaki LNM oranını; MMR kaybı olmayan vakalara göre daha düşük olarak (%35,3'e karşılık %57,5) saptamışlardır (115). Fakat bu çalışmada pN1c olguları lenf nodu metastazı olmayan gruba dahil edilmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 38 olguda izlenen pN1c evresi ayrı bir kategori olarak değerlendirilmiş ve MMR kaybı ile bir ilişkisi olmamakla birlikte karşılaştırılan diğer parametreler açısından pN1 kategorisinden bir farkının olmaması bu grup tümörlerin pN1 içerisinde değerlendirilmesini desteklemesi açısından anlamlı bulunmuştur.

### ***5.1.2.MMR Protein Ekspresyon Kaybının Histolojik Veriler ile İlişkisi***

**Tümör tipi ve diferansiyasyon:** Çalışmamızda kötü diferansiye tümörlerin; MMR protein ekspresyon kaybı saptananlar arasındaki oranı ekspresyon kaybı göstermeyenler arasındaki oranından anlamlı olarak daha yüksektir (%21,7'e karşılık %6,1'dir. Bu fark özellikle MLH1 ve PMS2 ekspresyon kaybı gösterenlerde ortaya çıkmaktadır. MMR protein ekspresyon kaybı saptanan olguların daha sıklıkla kötü diferansiye ve yüksek dereceli tümörlerden oluştuğu bildirilmekle birlikte (114-119) MMR ekspresyon kaybını öngörmedeki prediktif değerinin düşük olduğu da öne sürülmektedir (8,120). Ancak Bethesda kriterleri

içerisinde bu tür tümörlerin varlığının halen tanımlanıyor olması bu tür tümörlerin İHKsal olarak taranmasını halen gerekli kılmaktadır.

Fakat bu tümörlerin tanısı her zaman kolay değildir ve farklı çalışmalarda farklı kategoriler içerisinde değerlendiriliyor olmaları çalışma sonuçlarını yorumlamayı güçleştirmektedir. Örneğin medüller tümörler tüm KRK'lar içerisinde oldukça az bir orana sahiptirler. Bu yüzden çalışmalarda genellikle kötü diferansiye tümörler içerisine alınarak değerlendirilmektedirler (110). Bizim serimizde de medüller tümör benzeri alanları olan andiferansiye veya kötü diferansiye tümörleri medüller tümörden ayırt etmek sorunlu olmuştur. Medüller karsinomu olan olgulardan birinin çoklu tümörünün olması senkron olarak gelişmiş 2. tümörünün müsinöz adenokarsinom histolojisinde olması dikkat çekicidir. Medüller tümör komponenti olan olgular içerisinde MMR protein ekspresyon kaybı olan olguların oranı (%14,9'a karşılık %2,9) da olmayanlara göre anlamlı olarak yüksektir. Alexander ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada MMR ekspresyon kaybı saptanan olguların yaklaşık olarak %25'inde medüller tümör komponentinin varlığından söz edilmiş ve MMR ekspresyon kaybı öngörmede ki spesifitesinin %97 olduğu vurgulanmıştır (112).

MSI tümörler için bir diğer fenotipik özellik müsinöz tümör komponentidir. Birçok çalışmada da müsinöz komponentin MMR ekspresyon kaybı için en önemli prediktif özellik olduğu ortaya konulmuştur (109-119). Bu çalışmada da fokal müsinöz diferansiyasyon ve müsinöz adenokarsinomun MMR protein ekspresyon kaybı olan olgulardaki oranı anlamlı olarak yüksekti. Ancak sağkalım analizlerinde müsinöz komponent varlığı 50 yaş üstünde sağkalımı etkilemezken 50 yaş altında daha kısa sağkalımla ilişkili olduğu görülmüştür. Grenson ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada 528 olguda MMR ekspresyon kaybı olan tümörlerden %29,1'unda fokal müsinöz diferansiyasyon, %28,6'inde >%50 müsinöz komponent içerdiği gözlenmiştir (110). Yine aynı çalışmada MSI-H fenotip için müsinöz komponent varlığının sensitivitesinin %67,3; spesifitesinin %81,9 olduğu bildirilmiştir.

**TIL:** MSI-H fenotipik tümörlerin en fazla dikkat çeken histolojik özelliği tümöre karşı gelişen lenfositik yanıttır. Bu lenfositik yanıtlar içerisinde de TIL sayısı önemli bir yere sahiptir (108). Literatürde TIL sayımının yöntemi hakkında

görüş birliği yoktur. İHK'sal olarak T hücre markerları (CD3 ya da CD8) kullanarak yapılan TIL sayımları; HE ile boyalı preparatlardan yapılan sayımlara göre daha yüksek saptanmıştır (110,112). Kullanılan TIL sayım yöntemine göre de MSI-H fenotip ile ilişkili olabilecek TIL eşik değeri değişmektedir. İHK'sal yöntemler ile TIL sayımı yapılan çalışmalarda eşik değer olarak 4-7 lenfosit baz alan makaleler mevcutken (112,121); HE preparat üzerinden sayım yapan araştırmacılar 2-3 lenfosit eşik değer olarak kullanmışlardır (110,122). Greenson ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada HE üzerinden sayım yapılmış; MSI-H fenotip açısından en anlamlı eşik değer 2 lenfosit olduğu bulunmuştur. Bu çalışmaya göre 1 BBA'nda 2 ve üstü lenfosit varlığı MSI-H fenotip açısından %90,4 sensitif; %76,7 spesifiteye sahip prediktif bir değer olduğu savunulmuştur(110). Biz de çalışmamızda MMR protein ekspresyon kaybı saptanan olgularda TIL sayısı ortalamasını  $0,87 \pm 2$  saptadık ve ekspresyon kaybı olmayanlara göre daha yüksek ortalamaya sahip olduğunu belirledik. Eşik değer olarak Greenson ve ark.'nın önerdiği biçimde 2 lenfosit değerini kullandık (110). Bu değerlendirmeye göre MMR protein ekspresyon kaybı saptanan olguların %20'sinde TIL sayısı 2'den büyük iken; MMR protein ekspresyon kaybı saptanmayan olguların sadece %8,3'ünde 2'den büyük olarak saptandı ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. TIL varlığı özellikle MLH1, PMS2 ve MSH6 kaybı olan olgularda belirgin saptanmıştır.

***Crohn-benzeri lenfositik yanıt:*** Bir diğer tümöre karşı gelişen lenfositik yanıt paterni de Crohn-benzeri lenfositik yanıt (108,115). Crohn-benzeri lenfositik yanıt; çalışmamızda MMR ekspresyon kaybı saptanan olguların %43,4'ünde saptanmıştır. Ancak sadece MLH1 kaybı olan olgulardaki oranı anlamlıdır. Alexander ve ark.'nın yapmış olduğu 204 olguyu içeren çalışmada MSI-H fenotipik tümörlerde bu oran %49'a kadar çıkmaktadır (112). Fakat MSI-H fenotip açısından prediktif değerinin düşük olduğu vurgulanmıştır (120). Bu reaksiyonun bireyin immun sisteminin tümöre karşı vermiş olduğu bir yanıt olduğu ileri sürülmektedir. Bu yüzden metastaz oranı düşürdüğü, bir miktar sağkalımı artırdığı savunulmaktadır (120).

***Büyüme paterni:*** Tümör çevresi lenfositik yanıt yanısıra tümörün büyüme paterni de MSI-H fenotip açısından fikir verebilmektedir (8,109). Joost ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada ekspansif büyüme paterni MMR ekspresyon

kaybını gösteren en anlamlı parametre olarak ortaya çıkmaktadır (8). Bizim çalışmamızda ise bu yönde bir ilişki bulunmamıştır. Bu duruma ekspansif büyüme paternine sahip olguların oranının çok düşük olmasının neden olmuş olabileceği düşünülmüştür.

**Tümör “budding”:** İnfiltratif büyüme paternine sahip tümörlerin bir kısmında izlenen dediferansiye hücreler (tümör tomurcuklanması- “budding”)’in de olumsuz prognostik bir parametre olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur (14,106). Ancak tümör “budding” daha sıklıkla MMR protein ekspresyon kaybı göstermeyen olgularda görülmektedir (123). Bizim çalışmamızda da tümör “budding” oranı; MMR protein ekspresyon kaybı olmayan olgularda anlamlı olarak yüksektir. Kevans ve ark.’nın yapmış olduğu çalışmada da 258 evre II KRK olgusunda tümör “budding” saptanan tümörlerin %48’inin MSS olduğu bulunmuştur (123). Bizim serimizde de tümör “budding” olan olgularda MLH1, PMS2, MSH2 ve MSH6 kaybı daha az oranda saptanmıştır.

**Kirli nekroz yokluğu:** Son yıllarda MSI-H fenotip ile ilişkilendirilen bir diğer histolojik parametre kirli nekrozun bulunmamasıdır (110). Yine Greenson ve ark.’nın incelemiş olduğu seride kirli nekrozun bulunmaması MSI-H fenotip açısından %82,7 sensitivite; %76,6 spesifiteye sahip olduğu ortaya konmuştur (110). Bizim çalışmamızda da kirli nekroz oranı; MMR protein ekspresyon kaybı olan olgularda %41,7 iken; MMR protein ekspresyon kaybı olmayan olgularda %57 idi ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0,0001$ ).

MMR kaybı ile ilişkili olarak genel olarak ortaya çıkan özellikler her protein ekspresyon kaybında farklı oranlarda olmakla birlikte; 50 yaşında altında daha sık görülme, sağ kolon yerleşimi, kötü diferansiye ve yüksek dereceli tümörler, müsinöz, medüller komponent ile birliktelik, artmış oranda TIL, Crohn-benzeri lenfositik yanıt ile tümör “budding”i ve kirli nekroz oranının azlığı olarak gözlenmiştir.

### **5.1.3.MMR Protein Ekspresyon Kaybının Genel Sağkalım Üzerine Etkisi**

MSI’nin KRK için sağkalım üzerine prognostik bir belirteç olduğu bilinmektedir (114,115). Birçok çalışmada MMR ekspresyon kaybının hastalığa bağlı sağkalımı olumlu yönde etkilediği vurgulanmıştır (114-119). Gafa ve

ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada sporadik KRK'da histolojik parametreler (tümör çapı, lokalizasyonu, diferansiyasyonu, müsin içeriği, medüller özelliği, lenfositik yanıtı, ekspansif büyüme paterni) ile MSI durumunun hastalığa bağlı sağkalım üzerine etkileri araştırılmıştır ve hastalığa bağlı sağkalımı artıran en önemli prediktif değerin MSI durumu olduğunu saptamışlardır (124). Bizim alışmamızda olguların sadece genel sağkalım bilgilerine ulaşılabilmıştir. MMR ekspresyon kaybı olan hastalarda medyan beklenen genel sağkalım oranı daha düşüktür. Sağkalımı etkileyen faktörler arasında izlenen TIL, Crohn-benzeri lenfoid reaksiyon ve tümör tomurcuklanmasının da lojistik regresyon analizlerinde öngörücü önemini kaybettiği görülmüştür. Bulguların literatürden farklı olmasının, bunların görüldüğü tümörlerin tüm çalışma grubu içerisindeki oranının çok düşük olması ve "hastalığa" bağlı sağkalım bilgilerine ulaşılamamış olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Olguların lm nedenleri net olarak bilinmemektedir.

### ***5.2.MMR Ekspresyon Kaybının Belirlenmesinde İHK'nun Rolü***

1990'lı yılların yarısından itibaren PCR-tabanlı germline mutasyon analizine karşılık MMR proteinlerine karşı İHK'sal antikorlar geliştirilmeye başlanmıştır (85). İlk geliştirilen antikorlar MSH2 ve MLH1'dir. İlk yıllarda MSH2'de elde edilen İHK'sal sonuçlar PCR ile yakın korelasyon gösterirken; MLH1'de meydana gelen somatik mutasyonlar nedeni ile korelasyon daha düşük olarak saptanmıştır (17). Bunun sonucunda PMS2 ve MSH6 için antikorlar geliştirilmiş; dört antikor ile değerlendirilen olgularda PCR-tabanlı germline mutasyon analizleri ile uyumluluk artmıştır (17).

İHK, PCR-tabanlı MSI test analizine kıyasla oldukça kolay ve birçok patoloji laboratuvarında uygulanabilir bir tekniktir. Patologlar birçok merkezde klinik bilgiye ulaşmada güçlük yaşamaktadır. Histolojik düzeyde Lynch Sendromu ya da MSI-H fenotipten kuşku duyulan vakalarda n tarama amacıyla İHK'sal olarak MMR protein ekspresyon kaybı bakılabilmekte ve gerek görülen vakalarda germline mutasyon analizlerine yönlendirilmektedir (5). Son yıllarda yapılan çalışmalar dört antijeni içeren (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) İHK'sal incelemenin analitik duyarlılığının PCR-tabanlı MSI testle benzer olduğunu

ortaya koymaktadır (16,17, 85,89). Yapılan bir meta analiz çalışmasında İHK'nın sensitivitesinin %27-100; spesifitesinin %43-100 arasında olduğu saptanmıştır. Fakat bu meta analiz içerisinde 2 antikor (MLH1 ve MSH2) ve 4 antikor (MLH1-PMS2, MSH2-MSH6) ile çalışılan araştırmalar aynı analiz içerisinde kullanılmıştır (86). Shia ve ark.'larının yapmış oldukları literatür derlemesinde ise sonuçlar iki farklı grupta incelenmiş ve 4 antikoruda içeren İHK'sal incelemenin sensitivitesinin %92 olduğu saptanmıştır (17).

Günümüzde germline mutasyon analizi için seçilecek olgularda kullanılacak altın standart test PCR-tabanlı MSI testidir. Fakat Bethesda yönergelerinde belirlenen KRK'ya özgü 5 adet mikrosatellit bölgesine yönelik yapılan mutasyon analiz yöntemi olan PCR-tabanlı MSI test, oldukça pahalı bir yöntemdir. Aynı zamanda her patoloji laboratuvarında uygulanabilecek kolaylıkta olmayıp, özel ekipman yanı sıra; yorumlanabilmesi için özel deneyim gerektirmektedir.

Ayrıca İHK'sal olarak saptanan MMR protein ekspresyon kayıpları direkt olarak ilgili gen mutasyonu hakkında bilgi verebilmektedir. Böylece sadece mutant olan gene yönelik germline mutasyon analizi yapılabilmekte ve toplam maliyet açısından oldukça avantaj sağlayabilmektedir (5,85).

Fakat İHK'sal yöntemin bir takım sınırlılıkları bulunmaktadır. Bu sınırlılıkların bir kısmı yöntem kalitesi ile ilgilidir. Literatürde boyanma sorununa dair başlıca üç problemden söz edilmektedir. Bunlar fokal boyanma (heterojen ya da zayıf boyanma), internal kontrolün boyanmaması (genellikle negatif boyanan tümörlerde) ve sitoplazmik boyanma olarak sıralanmaktadır (85).

Bizim olgularımız arasında 392'sinin (%39,2) heterojen boyanma özelliği gösterdiğini saptadık ve en fazla heterojenite gösteren antikorun MSH6 (%22,1); en az heterojenite gösteren antikorun MLH1 olduğunu gördük (%12,1). Literatürde bu konu üzerinde fazla durulmamakla birlikte birkaç makalede heterojenite özelliğinin sıklıkla MLH1 ve MSH6 antikorunda görüldüğü belirtilmektedir (85,125). Heterojen boyanmanın mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Fakat tümör dokusunun mikroçevresel faktörleri nedeniyle; fokal alanlarda meydana gelen hipoksi sonucunda oluşan oksidatif stresin bu boyanma paternine yol açtığını savunanlar bulunmaktadır (126). Ayrıca dokunun



hızlıca tespit edilmesi ve doku takibinin doğru bir şekilde yapılması heterojen boyanma sorununu bir miktar çözebilmektedir (85).

Heterojen boyanma özelliği küçük biyopsi materyallerinin değerlendirilmesinde sorun yaratabilmekte ve yanlış negatif sonuçlara yol açabilmektedir. MMR proteinlerinin heterodimer olarak kayıp göstermesi bu sorunu bir miktar çözebilmekle birlikte izole MMR protein ekspresyon kaybı olabileceği de akılda tutulmalıdır. Bu yüzden MMR proteinlerinin İHK'sal olarak değerlendirilmesi zorunlu kalınmadıkça küçük biyopsilerde yapılmamalıdır.

İHK'sal yöntem sorunlarından bir diğeri de özellikle negatif olarak saptanan tümörlerde iç kontrollerinde (tümör içi lenfositler, stromal hücreler, çevre kolon mukozası) boyanmamasıdır. Literatür incelendiğinde bu olguların çalışma kapsamından çıkarılmış oldukları görülmüştür (17,85). Bu durumda önerilen İHK'nın tümörün farklı alanları kullanılarak tekrarlanmasıdır. İkinci İHK'sal inceleme sonucunda da iç kontrollerde boyanma elde edilmemesi durumunda İHK'sal olarak anormal bir boyanma paterni olduğunun söylenmesinin faydalı olacağı savunulmuştur. Shia ve ark'nın yapmış olduğu bir çalışmada endometrial karsinomlarda MMR ekspresyonu araştırılmış ve bir olguda MSH6 için iç kontroller de dahil olmak üzere boyanma elde edilememiştir ve yapılan germline mutasyon analizinde MSH6 geninde mutasyon saptanmıştır. Çalışmanın vurguladığı bir diğer konu bu olguda MSI testi ile 5 adet mikrosatellit bölgesinin hiç birinde mutasyon saptanmamış olmasıdır (85). Biz de çalışmamızda 57 (%5,6) olguda 4 antikoru hiç birinde iç kontrol boyanması da dahil olmak üzere boyanma elde edemedik. Tümörün farklı bir alanından tekrar ettiğimiz İHK'sal çalışmada 44'ünde (%4,4) iç kontrollerin boyanmış olduğunu saptadık. Fakat 13 olguda tekrar boyanma sonucunda da iç kontrol boyanması elde edemedik ve çalışma dışına çıkardık.

Bir diğer problem olan sitoplazmik boyanma özelliği, değerlendirilen anlamlı boyanmanın nükleer boyanma olması nedeniyle çok fazla problem yaratmamaktadır. Literatürde bu konu çok fazla irdelenmemiş olup; bizim çalışmamızda en fazla sitoplazmik boyanmanın MSH6 antikorida olduğunu izledik. Ancak nükleer boyanmanın ayırt edilebilir kontrastı nedeniyle değerlendirme güçlüğü yaşamadık.

Çalışmamızda saptadığımız bir diğer problem de ekspresyon kaybı saptanan olgularda ki alışlagelmişin dışındaki kombinasyonlardı. İzole ve heterodimer ekspresyon kayıpları dışında 1 olguda MLH1-PMS2-MSH2 kaybı, 3 olguda MLH1-PMS2-MSH6 kaybı, 11 olguda MSH2-MSH6-PMS2 kaybı 4 olguda MSH2-PMS2 kaybı, 12 olguda MSH6-PMS2 kaybı birlikte izlendi. Bu görülmesi beklenmeyen MMR protein kaybı kombinasyonları makro-array yönteminden kaynaklanmış olabileceğini öngördük. Makro-array için kullandığımız 5 cm çapa sahip doku; heterojen bir tümörün negatif bir alanını temsil ediyor olabilir bu nedenle yanlış negatifliğe neden olmuş olabileceğini düşündük. Ayrıca son yıllarda ortaya atılan bir teoriye göre de bazı Lynch Sendromuna sahip bireylerde zaman içerisinde sekonder bir mutasyon oluşmakta ve alışlagelmişin dışında İHK'sal boyanma sonuçlarına neden olmaktadır (17). Örneğin herediter olarak MLH1-PMS2 geninde mutasyon taşıyan bir bireyde zaman içerisinde MSH6 geninde somatik bir mutasyon gelişebilmektedir. Bu anormal kombinasyonlar genellikle MSH2-MSH6-PMS2 proteinlerinde saptanmakta; nadir olarak gelişmekte ve karsinogenezise yol açan süreç dışında geliştiği savunulmaktadır (85).

MMR protein ekspresyon kaybının MSI-testle korele edilmemiş olması çalışmamızdaki heterojen boyanmaların açıklamasını ve örneğin daha çok sporadik tümörlerde rastlanan MLH1-PMS2 kaybı ile herediter tümörlerde daha sık rastlanan MSH2-MSH6 kaybının serimiz içerisindeki klinikopatolojik verilerle karşılaştırılmasını olumsuz etkilemiştir. Buna rağmen MMR protein kaybının tespiti serimizdeki olguların değerlendirilmesinde önemli bir basamak olduğunu düşünüyoruz.

Çalışmamız şu ana kadar Türkiye'de bu konu üzerine yapılmış en geniş serilerden birini oluşturmaktadır ve literatürde MSI-H fenotip ile ilişkili olarak kullanılan neredeyse bütün histolojik parametreleri içermektedir. Değerlendirilen parametrelerin büyük çoğunluğunda literatürle uyumlu şekilde anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Uygulanan İHK'sal boyama için makroarray-multiblok hazırlanması düşük bütçe ile fazla sayıda olgunun çalışmaya alınmasına olanak sağlamıştır. Makroarray boyutu olarak en büyük boyut olan 0,5 cm çap seçilmiş ve mümkün olan en geniş alan değerlendirilmiştir. Kolonoskopik biyopsilerin ideal olarak 0,2-0,3 cm'lik biyopsiler şeklinde alındığı düşünüldüğünde

değerlendirilen alan küçük biyopsi boyutundan büyük olduğu görülmektedir. Ayrıca bir preparat üzerinde birden fazla doku olması, iç kontrollerinin olması İHK'sal boyanmanın kalitesini değerlendirmede kolaylık sağladı.

İHK'nın tespit ve takip sorunlarından etkilenen bir yöntem olması olguların bir kısmında değerlendirme güçlüğüne neden oldu. Özellikle PMS2 antikoruyla diğer antikorlara göre daha zayıf bir boyanma elde edildi bazı bloklarda tekrarlanma ihtiyacı doğdu. Farklı bloklardan alınarak hazırlanan makroarraylerde ki doku kalınlığının eşit olmaması; İHK için kesit hazırlanması sırasında multibloklarda ki bazı dokuların bitmesine neden oldu. Bu olgular için tekrar multibloklar hazırlandı.

Çalışmamızda MMR protein ekspresyon kaybını PCR ile doğrulayamadığımız için defektif gen konusunda yorum yapılamadı. Ayrıca MLH1-PMS2 kaybı olanlarda BRAF mutasyon analizi uygulanamadığı için sporadik ya da herediter olarak geliştiklerine dair yorum yapmak mümkün olmadı. Hastalısız sağkalım ya da hastalığa bağlı ölüm bilgilerine tüm olgular için ulaşılamadığı için olguların sadece genel sağkalım verileri ile yetinildi. Hastalığa bağlı sağkalım verilerinin tamamlanabilmesinin değerlendirmelerin daha sağlıklı olmasını sağlayacağını düşünüyoruz.

Çalışmamızda bölümümüz içinde daha önce uygulanmayan bir yöntem denenmiş ve yeni İHK'sal antikorlar çalışılmıştır. Bu sayede yöntem optimizasyonu oluşmasında fayda sağlanmıştır. Ayrıca MMR protein dağılımına yönelik genel bir bilgi vermiştir. Bu çalışma kapsamında derlenen veriler ileriki araştırmalar için bir temel teşkil edecektir.

Sonuç olarak; çalışmamız KRK'de %17,5 oranında MMR kaybı olduğunu göstermiştir. En sık görülen kayıp MLH1-PMS2 kaybıdır. MMR kaybının 50 yaş altında ve sağ kolonda daha sık görüldüğünü; tümörlerin daha büyük çapta, daha kötü diferansiye olduğunu saptadık. Bu tümörlerde müsinöz ve medüller komponentin sıklıkla eşlik ettiğini; ikiden fazla TIL sayısının daha fazla görüldüğünü; kirli nekroz ya da tümör "budding" in daha az görüldüğünü gözledik. Bu bulgular literatür ile uyumludur. Çalışmada düşük bütçe ile oldukça fazla olgunun MMR kaybı açısından taranması hedeflenmiş olup bu hedefe ulaşılmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler ile gereklilik duyulan

olgularda sporadik ya da herediter zeminini ortaya koyabilmek için BRAF mutasyon analizlerinin yapılması ya da aile öyküsüne de ulaşılabilen olguların germline mutasyon analizleri için yönlendirilmeleri sağlanabilecektir.

## 6. SONUÇLAR

- Çalışmada Ege Üniversitesi 2002-2011 yılları arasında kolon ve rektum adenokarsinomu nedeniyle opere edilen 1002 olgu değerlendirildi. Olguların 175'inde (%17,5) MMR proteinlerinde ekspresyon kaybı saptandı.
- Bulgular, altısı klinikopatolojik; altısı histolojik; dokuzu MSI-H ilişkili histolojik parametre olmak üzere toplam 21 parametre yanı sıra genel sağkalım verileri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.
- Olguların yaşları 22 ile 94 arasında olup, medyan yaş  $63\pm 12,7$  olarak saptandı ve %18'inin (n=180) 50 yaş altında bulundu. MMR protein ekspresyon kaybı olan olgularda medyan yaş  $61\pm 14,9$  idi ve MMR protein kaybı olmayan olgulara göre daha genç yaşta görülmekteydi ( $64\pm 12,1$ ;  $p=0,01$ ).
- Olguların 603'ü (%60,2) erkek, 399'u (%39,8) kadın olup kadınların tanı anındaki yaş ortalaması erkeklere göre daha düşüktü (medyan yaş  $61\pm 13,7$ 'e karşılık  $65\pm 11,9$ ). MMR protein ekspresyon kaybı ise erkeklerde daha fazla saptandı (%56'ya karşılık %44,  $p=0,214$ ).
- Rezeksiyon materyallerinde medyan tümör çapı  $5\pm 2,3$  cm (Dağılım:1- 26 cm) idi. MMR protein ekspresyon kaybı olan olgularda tümör çapı daha büyük olarak saptandı ( $6\pm 3,2$ 'e karşılık  $4,7\pm 2$ ;  $p<0,0001$ ).
- Sağ kolon yerleşimli tümörlerde MMR protein ekspresyon kaybı daha fazla izlendi (%45,1'e karşılık %17,4;  $p<0,0001$ ).
- MMR protein ekspresyon kaybı saptanan olgular daha sıklıkla kötü diferansiye ve yüksek dereceli tümörlerden oluşmaktaydı. Kötü diferansiye tümörlerin; MMR protein ekspresyon kaybı saptananlar arasındaki oranı %21,7 iken kayıp saptanmayanlar arasındaki oranı %6,1'di ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,0001$ ).

- MMR protein ekspresyon kaybı saptanan olguların %20'sinde TIL sayısı 2'den büyük iken; MMR protein ekspresyon kaybı saptanmayan olguların sadece %8,3'ünde 2'den büyüktü. TIL varlığı MMR protein ekspresyon kaybı olanlarda daha fazla görülmekte ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmaktaydı ( $p<0,0001$ ).

- Fokal müsinöz diferansiyasyon ve müsinöz adenokarsinom oranı MMR protein ekspresyon kaybı olan olgularda daha yüksek saptandı (%28,6'ya karşılık %22,7; %13,7'ye karşılık %9,8;  $p=0,043$ ; sırasıyla).

- Medüller tümör komponentinin oranı; MMR protein ekspresyon kaybı olan olgularda %14,9 iken; MMR protein ekspresyon kaybı olmayan olgularda %2,9'di ( $p<0,0001$ ).

- Tümör "budding" oranı; MMR protein ekspresyon kaybı olan olgularda %16 iken; MMR protein ekspresyon kaybı olmayan olgularda %25,4 idi ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı ( $p=0,008$ ).

- Kirli nekroz oranı; MMR protein ekspresyon kaybı olan olgularda %41,7 iken; MMR protein ekspresyon kaybı olmayan olgularda %57'di ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı ( $p<0,0001$ ).

- MMR ekspresyon kaybı olan hastalarda ortalama beklenen genel sağkalım 87,32 ay (Std.H:4,64, %95 güvenlik aralığı: 78,22-96,42) iken; MMR ekspresyon kaybı saptanmayan grupta ortalama beklenen genel sağkalım 92,56 ay (Std.H:2,26, %95 güvenlik aralığı: 88,13-96,99) olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak anlam saptanmamıştır ( $p=0.072$ ).

- MMR protein ekspresyon kaybı ile cinsiyet, tümör tipleri, tümör evresi (pT), lenf nodu metastazı sayısı ve evresi (pN), LVİ, PNI, satellit nodül, Crohn-benzeri lenfositik yanıt, taşlı yüzük hücreli komponent, tümörün infiltratif sınırının konfigürasyonu ve genel sağkalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

- Özetlenecek olursa, MMR kaybı gösteren tümörler ile ilişkili özellikler, her protein için farklı oranlarda olmakla birlikte; 50 yaşında altında daha sık görülme, sağ kolon yerleşimi, kötü diferansiasyon, yüksek dereceli tümörler, müsinöz ve medüller komponent ile birliktelik, artmış oranda TIL, Crohn-benzeri lenfositik yanıt ile tümör “budding”i ve kirli nekroz oranının azlığı olarak gözlenmiştir.

## **7.KAYNAKLAR**

1.Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. CA Cancer J Clin. 2011 Jul-Aug;61(4):212-36.

2.Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (Eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System, 4th edition. IARC Press: Lyon 2010.

3. Gatalica Z, Torlakovic E. Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. *Fam Cancer*. 2008;7(1):15-26. Epub 2007
4. Kumar V, Abbas AK, Fausto N (Eds): *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th Edition, Saunders Press Philadelphia 2010
5. Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Oct;135(10):1269-77.
6. Duval A, Collura A, Berthenet K et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: time to stop hiding! *Oncotarget*. 2011 Nov;2(11):826-7.
7. Whitehall V, Leggett B. Microsatellite instability: detection and management in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol*. 2011 Dec;26(12):1697-9.
8. Joost P, Bendahl PO, Halvarsson B et al. Efficient and reproducible identification of mismatch repair deficient coloncancer: validation of the MMR index and comparison with other predictive models. *BMC Clin Pathol*. 2013 Dec 17;13(1):33.
9. Karran P. Microsatellite instability and DNA mismatch repair in human cancer. *Semin Cancer Biol*. 1996 Feb;7(1):15
10. Leggett BA, Whitehall VLJ. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2010; 138:2088–100.
11. Benedix F, Meyer F, Kube R et al. Influence of anatomical subsite on the incidence of microsatellite instability, and KRAS and BRAF mutation rates in patients with colon carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2012 Oct 15;208(10):592-7.
12. Chapusot C, Martin L, Bouvier AM et al. Microsatellite instability and intratumoural heterogeneity in 100 right-sided sporadic colon carcinomas. *Br J Cancer*. 2002 Aug 12;87(4):400-4.
13. Ghazi S, Lindfors U, Lindberg G et al. Analysis of colorectal cancer morphology in relation to sex, age, location, and family history. *J Gastroenterol*. 2012 Jun;47(6):619-34.



14. Washington MK. Colorectal carcinoma: Selected issues in pathologic examination and staging determination of prognostic factors. *Arch Path Lab Med* 2008; 132:1600-1607

15. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med.* 2009;11(1):35–41.

16. Chubak B, Heald B, Sharp RR. Informed consent to microsatellite instability and immunohistochemistry screening for Lynch syndrome. *Genet Med.* 2011;13(4):356–360.

17. Shia J, Tang LH, Vakiani E, et al. Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(11):1639–1645.

18. Yoon YS, Yu CS, Kim TW et al. Mismatch repair status in sporadic colorectal cancer: immunohistochemistry and microsatellite instability analyses. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011 Dec;26(12):1733-9.

19. Hoogerbrugge N, Willems R, Van Krieken HJ et al. Very low incidence of microsatellite instability in rectal cancers from families at risk for HNPCC. *Clin Genet.* 2003 Jan;63(1):64-70.

20. Hong SP, Min BS, Kim TI et al. The differential impact of microsatellite instability as a marker of prognosis and tumour response between colon cancer and rectal cancer. *Eur J Cancer.* 2012 May;48(8):1235-43.

21. Sadler TW. (editor) *Gastrointestinal Embriyoloji. Başaklar AC (çeviren). Medikal Embriyoloji. 9'uncu baskı, Ankara, Palme Yayınevi, 2007;364-371.*

22. Mills SE. Colon. Dahl J, Greenson JK. *Histology for Pathologist. 3'th ed, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007; 627-643.*

23. Carlos L, *Basic Histology 8th Edition, Lange, 1998*

24. Buğra D. Kolon, Rektum, Anal Bölge Anatomisi. Kolorektal Özel Sayısı. Türkiye Klinikleri Journal of Surgery 2004;9(1):1-9.
25. Yıldırım M. Temel Anatomi. İstanbul; Nobel Tıp Kitabevi. 2000: 254–256.
26. Alemdaroğlu K, Akçal T, Buğra D. Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları. İstanbul: Türk Kolon ve Rektum Cerrahi Derneği; 2003.s.21-30.
27. Boyle P, Levin B (Eds.) World Cancer Report 2008 IARC Press; Lyon, France
28. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. Orphanet J Rare Dis. 2009 Oct 12;4:22.
29. Aretz S, Stienen D, Friedrichs N et al. W: Somatic APC mosaicism: a frequent cause of familial adenomatous polyposis (FAP). Hum Mutat 2007, 28:985-992.
30. Juhn E, Khachemoune A. Gardner syndrome: skin manifestations, differential diagnosis and management. Am J Clin Dermatol. 2010;11(2):117-22.
31. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. Nat Genet. 2002 Feb;30(2):227-32.
32. Choi HS, Park YJ, Park JG. Peutz-Jeghers syndrome: a new understanding. J Korean Med Sci. 1999 Feb;14(1):2-7
33. Lebrun C, Olschwanq S, Jeannin S et al. Turcot Syndrome confirmed with molecular analysis. Eur J Neurol. 2007;14(4):470-2.
34. Boland CR, Lynch HT. The history of Lynch syndrome. Fam Cancer. 2013 Jun;12(2):145-57.
35. Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. Carcinogenesis. 2008 Apr;29(4):673-80.

36. Arends MJ. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013 Mar;21(2):97-102.

37. Wiseman M. The second World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc Nutr Soc* 2008;67:253-6.

38. Pericleous M, Mandair D, Caplin ME. Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2013 Dec;4(4):409-23.

39. Imperiale TF. Aspirin and the prevention of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003 Mar 6;348(10):879-80.

40. Sebastian S, Hernández V, Myrelid P et al. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Results of the 3rd ECCO pathogenesis scientific workshop (I). *J Crohns Colitis*. 2014 Jan 1;8(1):5-18.

41. Levitt MD, Millar DM, Stewart JO. Rectal cancer after pelvic irradiation. *J R Soc Med*. 1990 Mar;83(3):152-4.

42. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61:759-767.

43. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):159-70.

44. Jass JR. Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin N Am* 82:891, 2002

45. Jass JR. Molecular genetics of colorectal cancer. *Pathology* 1999;31:354-64.

46. Li A, Chan B, Felix JC et al. Tissue-dependent consequences of Apc inactivation on proliferation and differentiation of ciliated cell progenitors via Wnt and notch signaling. *PLoS One*. 2013 Apr 30;8(4):e62215.

47. Hanson CA, Miller JR (2005) Non-traditional roles for the Adenomatous Polyposis Coli (APC) tumor suppressor protein. *Gene* 361: 1-12.

48.Sieber OM, Tomlinson IP, Lamlum H. The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor--genetics, function and disease. *Mol Med Today*. 2000 Dec;6(12):462-9.

49.Krausova M, Korinek V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell Signal*. 2013 Dec 2;26(3):570-579.

50.Fodde R.The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2002 May;38(7):867-71.

51.Luo F, Brooks DG, Ye H et al. Mutated K-ras(Asp12) promotes tumourigenesis in Apc(Min) mice more in the large than the small intestines, with synergistic effects between K-ras and Wnt pathways. *Int J Exp Pathol*. 2009 Oct;90(5):558-74.

52.Luo F, Brooks DG, Ye H et al. Conditional expression of mutated K-ras accelerates intestinal tumorigenesis in Msh2-deficient mice. *Oncogene*. 2007;26(30):4415-27.

53.Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-7.

54.Nasierowska-Guttmejer A, Trzeciak L, Nowacki MP et al. p53 protein accumulation and p53 gene mutation in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res*. 2000;6(4):275-9.

55.Rudolph KL, Millard M, Bosenberg MW et al. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet*. 2001;28(2):155-9.

56.Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008 Oct;135(4):1079-99.

57.Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8681-6.

58.Kang GH. Four molecular subtypes of colorectal cancer and their precursor lesions. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Jun;135(6):698-703.

59.Patai AV, Molnár B, Tulassay Z. Et al. Serrated pathway: alternative route to colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2013 Feb 7;19(5):607-15.

60.Liang JJ, Alrawi S, Tan D. Nomenclature, molecular genetics and clinical significance of the precursor lesions in the serrated polyp pathway of colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2008 Jan 1;1(4):317-24.

61.Beach R, Chan AO, Wu TT, White JA, Morris JS, Lunagomez S, Broaddus RR, Issa JP, Hamilton SR and Rashid A. BRAF mutations in aberrant crypt foci and hyperplastic polyposis. *Am J Pathol* 2005;166:1069-1075.

62.Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology.* 2007 Jan;50(1):113-30.

63.Dimitry A, Filip A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture.* 2006;255: 1–29

64.Silva FC, Valentin MD, Ferreira Fde O et al. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. *Sao Paulo Med J.* 2009 Jan;127(1):46-51.

65.Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev.* 2006 Feb;106(2):302-23.

66.Schofield M. J, Hsieh P, DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function, *Annu. Rev. Microbiol.* 2003; 57: 579-608

67.Studamire B, Quach T, Alani E. *Saccharomyces cerevisiae* Msh2p and Msh6p ATPase activities are both required during mismatch repair. *Mol Cell Biol.* 1998 Dec;18(12):7590-601.

68.Modrich P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem.* 2006;281(41):30305-9.

69.Marra G, Schär P. Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochem J.* 1999 Feb 15;338 ( Pt 1):1-13

70.Strand M, Earley MC, Crouse GF, Petes TD. Mutations in the MSH3 gene preferentially lead to deletions within tracts of simple repetitive DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Oct 24;92(22):10418-21.

71.Johnson RE(1), Kovvali GK, Prakash L, Prakash S. Requirement of the yeast MSH3 and MSH6 genes for MSH2-dependent genomic stability. *J Biol Chem*. 1996 Mar 29;271(13):7285-8.

72.MLH1 mutL homolog 1[Homo sapiens] Gene ID: 4292, updated on 12-Apr-2014

73.Mitchell R, Farrington SM, Dunlop MG, Campbell H. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2002 Nov 15;156(10):885-902.

74.Grandhi R, Deibert CP, Pirris SM, Lembersky B, Mintz AH. Simultaneous Muir-Torre and Turcot's syndrome: A case report and review of the literature. *Surg Neurol Int*. 2013 Apr 12;4:52.

75.Buchanan DD, Tan YY, Walsh MD et al. Tumor mismatch repair immunohistochemistry and DNA MLH1 methylation testing of patients with endometrial cancer diagnosed at age younger than 60 years optimizes triage for population-level germline mismatch repair gene mutation testing. *J Clin Oncol*. 2014 Jan 10;32(2):90-100

76.MSH2 mutS homolog 2[Homo sapiens] Gene ID: 4436, updated on 12-Apr-2014

77.Lawes DA, Boulos PB. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. *Cancer Lett* 2005; 239: 126-134

78.MSH6 mutS homolog 6[Homo sapiens] Gene ID: 2956, updated on 13-Apr-2014

79.PMS2 PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (*S. cerevisiae*)[Homo sapiens] Gene ID: 5395, updated on 16-Apr-2014

80.Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 2007; 133: 48–56.

81.Umar A, Bolan CR, Terdiman JP et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(4): 261-268

82.Perea J, Rodríguez Y, Rueda D et al. Early-onset colorectal cancer is an easy and effective tool to identify retrospectively Lynch syndrome. *Ann Surg Oncol.* 2011 Nov;18(12):3285-91

83.Boland CR, Shike M. Report from the Jerusalem workshop on Lynch syndrome-hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138(7):2197 e2191–2197.

84.Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer(HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;/116:/14536.

85.Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome, part I: the utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn.* 2008; 10(4):293–300.

86.Kheirleaid EA, Miller N, Chang KH et al. Mismatch repair protein expression in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2013 Dec;4(4):397-408.

87.Piñol V, Castells A, Andreu M et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditarynonpolyposis colorectal cancer. *JAMA.* 2005 Apr 27;293(16):1986-94.

88.Hampel H, Frankel WL, Martin E et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Dec 10;26(35):5783-8.

89.Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med.* 2009;11(1):35–41.

90.Herman JG, Umar A, Polyak K et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 9;95(12):6870-5.

91.Wang L, Cunningham JM, Winters JL et al. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res.* 2003 Sep 1;63(17):5209-12.

92.McGivern A, Wynter CV, Whitehall VL et al. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer.* 2004;3(2):101-7.

93.Sinicrope FA. DNA mismatch repair and adjuvant chemotherapy in sporadic colon cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010 Mar;7(3):174-7.

94.Mills SE (Sen Eds): *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. Volume Two 4th Edition*, Lippincott Williams and Wilkins Press: Philadelphia 2004

95.Courtney D, McDermott F, Heeney A et al. Clinical review: surgical management of locally advanced and recurrent colorectal cancer. *Langenbecks Arch Surg.* 2013 Nov 19.

96.Erichsen R, Baron JA, Stoffel EM et al. Characteristics and survival of interval and sporadic colorectal cancer patients: a nationwide population-based cohort study. *Am J Gastroenterol.* 2013 Aug;108(8):1332-40.

97.Sökmen S. Kolorektal Kanserde Prognoz, Kolorektal Özel Sayısı. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery* 2004;9:57-65.

98.Türkçapar N, Özden A. Tümör Markırları ve Klinik Önemi. *Güncel Gastroenteroloji* 2005;9 (4):271-81.



99.Jass JR, O'Brien J, Riddell RH, Snover DC. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma: Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. *Am J Clin Pathol.* 2008 Jan;129(1):13-23.

100.Washington MK. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Path Lab Med* 2009; 133:1539-1551.

101.Edge SB, Byrd DR, Carducci MA, Compton CC, eds. *AJCC Cancer Staging Manual.* 7th ed. New York, NY: Springer 2009.

102.Baxter NN, Virnig DJ, Rothenberger DA et al. Lymph node evaluation in colorectal cancer patients: a population-based study. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Feb 2;97(3):219-25.

103.Prandi M, Lionetto R, Bini A, et al. Prognostic evaluation of stage B colon cancer patients is improved by adequate lymphadenectomy. *Ann Surg.* 2002; 235:458– 463.

104.Joseph NE, Sigurdson ER, Hanlon AL, et al. Accuracy of determining nodal negativity in colorectal cancer based on the number of nodes retrieved on resection. *Ann Surg Oncol.* 2003;10:213–218.

105.Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features *Mod Pathol.* 2003 Apr;16(4):376-88.

106.Zlobec I, Lugli A. Invasive front of colorectal cancer: dynamic interface of pro-/anti-tumor factors. *World J Gastroenterol.* 2009 Dec 21;15(47):5898-906.

107.Väyrynen JP, Sajanti SA, Klintrup K et al. Characteristics and significance of colorectal cancer associated lymphoid reaction. *Int J Cancer.* 2013 Oct 8.

108.Ogino S, Nosho K, Irahara N et al. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node

count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res.* 2009 Oct 15;15(20):6412-20.

109.Kakar S, Aksoy S, Burgart LJ et al. Mucinous carcinoma of the colon: correlation of loss of mismatch repair enzymes with clinicopathologic features and survival. *Mod Pathol.* 2004 Jun;17(6):696-700.

110.Greenon JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O et al. Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol.* 2003 May;27(5):563-70.

111.Raut CP, Pawlik TM, Rodriguez-Bigas MA. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res.* 2004 Dec 21;568(2):275-82.

112.Alexander J, Watanabe T, Wu TT et al. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol.* 2001 Feb;158(2):527-35.

113.Moertel CG. Multiple primary malignant neoplasms: historical perspectives. *Cancer.* 1977;40(Suppl 4):1786-1792

114.Lim SB, Jeong SY, Lee MR, et al. Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2004; 19(6):533-7.

115.Raut CP, Pawlik TM, Rodriguez-Bigas MA. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res.* 2004 Dec 21;568(2):275-82.

116.Chew MH, Koh PK, Tan M et al. Mismatch repair deficiency screening via immunohistochemical staining in young Asians with colorectal cancers. *World J Surg.* 2013 Oct;37(10):2468-75.

117.Halvarsson B, Anderson H, Domanska K et al. Clinicopathologic factors identify sporadic mismatch repair-defective colon cancers. *Am J Clin Pathol.* 2008 Feb;129(2):238-44.

118. Bellizzi AM, Frankel WL. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol*. 2009 Nov;16(6):405-17.

119. Khoo JJ, Gunn A, Peh SC. Pattern of hMLH1, hMSH2 and hMSH6 expression and clinical characteristics in a sample of Malaysian colorectal carcinoma cases. *Malays J Pathol*. 2013 Jun;35(1):45-57.

120. Chapusot C, Martin L, Mungra N, et al. Sporadic colorectal cancers with defective mismatch repair display a number of specific morphological characteristics: relationship between the expression of hMLH1 and hMSH2 proteins and clinicopathological features of 273 adenocarcinomas. *Histopathology*. 2003; 43(1): 40-7.

121. Jass JR. Pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann NY Acad Sci* 2000;910:62–73.

122. Ward R, Meagher A, Tomlinson I, et al. Microsatellite instability and the clinicopathologic features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 2001;48:821–9.

123. Kevans D, Wang LM, Sheahan K et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) protein expression in a cohort of stage II colorectal cancer patients with characterized tumor budding and mismatch repair protein status. *Int J Surg Pathol*. 2011 Dec;19(6):751-60.

124. Gafà R, Maestri I, Matteuzzi M, et al. Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer*. 2000; 89(10): 2025-37.

125. Shia J, Ellis NA, Klimstra DS: The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene proteins. *Virchows Arch* 2004, 445:431–441

126. Chang CL, Marra G, Chauhan DP et al. Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, 283:C148–C154

