



**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**İLERİ EVRE KOLOREKTAL KARSİNOM OLGULARINDA
İMMÜNHİSTOKİMYASAL OLARAK CD144 VE CERB-B2
ÇALIŞMA SONUÇLARININ KRAS, NRAS, BRAF
MUTASYONLARI VE KLİNİKOPATOLOJİK
PARAMETRELERLE KORELASYONU**

EBRU KAYRA YILDIRIM

UZMANLIK TEZİ

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**DANIŞMAN
Prof. Dr. FAHRİ YILMAZ**

2023-SAKARYA

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İLERİ EVRE KOLOREKTAL KARSİNOM OLGULARINDA
İMMÜNHİSTOKİMYASAL OLARAK CD144 VE CERB-B2
ÇALIŞMA SONUÇLARININ KRAS, NRAS, BRAF
MUTASYONLARI VE KLİNİKOPATOLOJİK
PARAMETRELERLE KORELASYONU

EBRU KAYRA YILDIRIM

UZMANLIK TEZİ

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. FAHRİ YILMAZ

2023-SAKARYA

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan 29/1/21 tarihinde onay alarak hazırlanmıştır.

Bu çalışma, Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu Başkanlığı tarafından 2018-70-01-002 Numaralı proje ile desteklenmiştir.

Tarih:...../01/2023

Ebru Kayra Yıldırım

İmza

TEŐEKKÖR

Uzmanlık eğitime başladığım günden beri bilgi ve tecrübeleri ile beni aydınlatan sayın danışman hocam Prof. Dr. Fahri Yılmaz' a, eğitim sorumlumuz sayın Prof. Dr. Mustafa Kösem'e, desteklerini hiçbir zaman manevi olarak esirgememiş olan ve patolojik tanı ve raporlama sürecinde farklı perspektifler kazandıran uzmanlarımıza,

Hep arkamda olduklarını bilmenin bana güç verdiği, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, en büyük varlıklarım annem, babam, eşim ve kardeşime,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm teknikerlerimiz, sekreterlerimiz ve personelimize teşekkür ederim.

Saygılarımla

Dr. Ebru Kayra Yıldırım

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
RESİMLER LİSTESİ	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kolon Histolojisi	4
2.1.1. Tunika mukoza	4
2.1.2. Tunika submukoza	4
2.1.3. Tunika muskularis (muskularis propria)	4
2.1.4. Tunika seroza (visseral periton)	4
2.2. Kolorektal Kanserlerin İnsidansı ve Epidemiyolojisi	5
2.3. Kolorektal Kanser Öncüsü (Premalign) Lezyonlar	5
2.3.1. Konvansiyonel kolorektal adenom.....	5
2.3.1.1. Tübüler adenom, low grade displazili/ high grade displazili	6
2.3.1.2. Villöz adenom, low grade displazili/ high grade displazili	6
2.3.1.3. Tübülovillöz adenom, low grade displazili/high grade displazili.....	6
2.3.1.4. İlerlemiş (“Advanced”) adenom	7
2.3.2. Kolorektal serrated lezyonlar ve serrated polipler	7
2.3.2.1. Hiperplastik polipler	7
2.3.2.2. Sesil serrated lezyonlar	8
2.3.2.3. Displazili sesil serrated adenomlar	9

2.3.2.4 Traditional serrated adenomlar	9
2.3.2.5. Sınıflandırılmayan serrated adenomlar.....	9
2.4. KRK'ların Makroskopisi	10
2.5.KRK'ların Histopatolojik Varyantları/ Subtipleri.....	10
2.5.1. Müsinöz adenokarsinom	11
2.5.2. Taşlı yüzük hücreli karsinom (kötü koheziv karsinom).....	11
2.5.3. Medüller adenokarsinoma	12
2.5.4. Serrated adenokarsinoma	12
2.5.5. Mikropapiller adenokarsinoma	13
2.5.6. Adenom benzeri adenokarsinoma	13
2.5.7. Adenoskuamoz karsinoma	13
2.5.8. Sarkomatoid komponent içeren adenokarsinoma	13
2.5.9. İndiferansiye karsinoma, NOS	13
2.6. Grade (Derece)	14
2.7. Stage (Evre).....	15
2.8. Prognozu Etkileyen Faktörler.....	17
2.9. KRK'larda Hücre İçi Sinyal İletim Mekanizmaları	17
2.9.1. Konvansiyonel adenom-karsinom sekans yolağı	20
2.9.2. Serrated neoplazi-karsinom yolağı.....	21
2.10. Kolorektal Karsinomanın Moleküler Temeli	21
2.10.1. RAS genleri	23
2.10.2. RAF genleri	24
2.10.3. Kromozomal instabilite genleri.....	25
2.10.4. Mikrosatellit instabilite	25
2.10.5. “CpG” ada metilatör fenotip (CIMP)	27
2.11. VE- KADERİN (CDH5/ CD144).....	28
2.12. C-ERB-B2 (HER-2)	32
2.13. KRK'larda Anjiogenez, Yayılım ve Metastazın Mekanizması	34
2.13.1. Anjiogenez	34
2.13.2. Yayılım ve metastaz.....	35
2.13.2.1. Lokal invazyon	36
2.13.2.2. İntravazasyon.....	37

2.13.2.3. Ekstravazasyon	37
2.13.2.4. Metastatik koloni oluşumu.....	38
2.13.3. Adezyon molekülleri ve hücreler arası bağlantıların kanser metastazındaki rolleri.....	38
3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER.....	39
3.1. Olguların Seçimi ve Biyopsi Raporlarının Değerlendirilmesi	39
3.2. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	40
3.3. İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	40
3.4. İstatistiksel Yöntem.....	41
4. BULGULAR.....	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
6. KAYNAKLAR	61
7. EKLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
7.1. EK-1: Etik Kurul Onayı	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

AJCC	: American Joint Commission on Cancer
anti-EGFR	: Epidermal growth faktör reseptör antagonisti
APC	: Aktive protein C
CCDN1	: Siklin-D1
CEA	: Karsinoembriyogenik antijen
CIMP	: cPg island metilatör fenotip
CIN	: Kromozomal instabilite
DAB	: Diaminobenzidin
DALM	: Displazi assosiye lezyon
DSSL	: Displazili sesil serrated lezyon
ESM	: Ekstrasellüler matriks
EGF	: Epidermal growth faktör
EGFR	: Epidermal growth faktör reseptörü
EMT	: Epidermal mezenkimal transizyon
EPH	: Endotelyal progenitör hücreler
EphA-B	: Efrin reseptörü A-B
FAP	: Familyal adenomatöz polipozis
FGF	: Fibroblast growth faktör
GDP	: Guanozin difosfat
GİS	: Gastrointestinal sistem
GTP	: Guanozin trifosfat

HNPCC	: Herediter nonpolipozis kolorektal karsinom
HP	: Hiperplastik polip
IARC	: Uluslararası kanser araştırma ajansı
IgSF	: İmmünglobulin süper ailesi
İHK	: İmmünohistokimya
İİBH	: İdiopatik inflamatuvar barsak hastalığı
KRK	: Kolorektal karsinom
LOH	: Heterozigosite kaybı
LVI	: Lenfovasküler invazyon
MAPK	: Mitojen-aktive protein kinaz
mm	: Milimetre
MMPs	: Matriks metalloproteinazları
MMR	: Mismatch repair
MSI	: Mikrosatellit instabil
MSI-H	: Mikrosatellit instabil-high
MSI-L	: Mikrosatellit instabil- low
MSS	: Mikrosatellit stabil
NGF	: Sinir büyüme faktörü
NOS	: Spesifiye edilemeyen
NSAİİ	: Nonsteroid antiinflamatuvar ilaç
OS	: Overall survival (genel sağkalım)
PDGF	: Platelet derivated growth faktör
PFS	: Progresyonsuz sağ kalım

PI3K	: Fosfotiidil inozitol 3 kinaz
PNİ	: Perinöral invazyon
POLE	: POLD1 (DNA polimeraz epsilon)
RER	: DNA replikasyon hataları
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
SCNA	: Somatik kopya sayısı değişiklikleri
SH2	: Src-homology 2
SISH	: Silver in situ hibridizasyon
SSL	: Sesil serrated lezyon
SSP/SSA	: Sesil serrated polip/ sesil serrated adenom
TGF-Beta	: Tümör growth faktör-beta
TSA	: Traditional serrated adenom
UICC	: Union international centre cancer
VEGFR	: Vaskuloendotelyal büyüme faktör reseptörü
VEK	: VE-Kaderin (CD144, CDH5)
VM	: Vaskülojenik taklit (Vaskülojenik mimicry)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Kolorektal lezyonların makroskopik klasifikasyonu.....	10
Şekil 2.2: Konvansiyonel adenom-karsinom sekans yolağındaki morfolojik ve moleküler değişimlerin şeması.....	20
Şekil 2.3: Serrated neoplazi-karsinom yolağındaki morfolojik ve moleküler değişimler ile mismatch tamir genleri ile ilişki şeması RAS aracılı sinyal iletimi.....	22
Şekil 2.4: RAS sinyal iletiminde yer alan “down stream” moleküller ve rolleri.....	24
Şekil 2.5: Kanserde promotör CpG adası hipermetilasyonu	28
Şekil 2.6: VE-Kaderin yapışkan kompleksi.....	29
Şekil 2.7. Tümör anjigenezi ile ilişkili moleküller.....	37
Şekil 4.1: VE-Kaderin için boyanma olmayan, düşük boyanma ve yüksek boyanma olan gruplar arasındaki kümülatif sağkalım oranı eğrisi	51

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1: DSÖ 2019 sınıflaması kolorektal adenokarsinom histolojik alt tipleri.....	11
Tablo 2.2: Primer tümörün tanımı (T).....	15
Tablo 2.3: Bölgesel lenf nodları (N)	16
Tablo 2.4: Prognostik evre grupları.....	16
Tablo 2.5: Uzak metastaz (M)	17
Tablo 2.6: Prognostik faktörler.....	18
Tablo 4.1: Çalışmaya alınan 122 olgunun patolojik prognostik verileri.....	45
Tablo 4.2: Çalışmaya alınan 122 olgunun klinik verileri.....	46
Tablo 4.3: Çalışmaya alınan 122 olgunun VE-kaderin boyanma ve boyanmama durumunun klinikopatolojik veriler ile karşılaştırılması	47
Tablo 4.4: Çalışmaya alınan 122 olgunun; VE-kaderin düşük boyanma ve yüksek boyanma durumunun patolojik prognostik veriler ile karşılaştırılması.....	49
Tablo 4.5: Çalışmaya alınan 122 olgunun; VE-kaderin düşük boyanma ve yüksek boyanma durumunun klinik veriler ile karşılaştırılması	50
Tablo 4.6: VE-Kaderin için boyanma olmayan, düşük boyanma ve yüksek boyanma olan gruplar arasındaki öngörülen sağkalım sürelerinin karşılaştırılması.....	51

RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1: Kolonda tübüler adenom	7
Resim 2.2: Kolonda tübülovillöz adenom	7
Resim 2.3: Kolonda hiperplastik polip	8
Resim 2.4: Konvansiyonel adenokarsinom	12
Resim 2.5: Müsinöz adenokarsinom.....	12
Resim 2.6: Taşlı yüzük hücreli komponent içeren müsinöz adenokarsinom	12
Resim 2.7: Grade 1 KRK, H&E (x100)	14
Resim 2.8: a-b:Farklı Gradelere KRK'ların H&E görüntüleri. Grade 2 KRK (a), Grade 3 KRK (b) (x100)	14
Resim 2.9: a-b-c-d: Farklı KRK evrelerinin H&E görüntüleri. T1 evre KRK, H&E (x100) (Resim 2.9a.), T2 evre KRK, H&E (x40) (Resim 2.9b.), T3 evre KRK, H&E (x40) (Resim 2.9c.), T4 evre KRK, H&E (x100) (Resim 2.9d.)	15
Resim 2.10: a-b: KRK'lı vakaya ait lenfatik invazyon ve perinöral invazyon gösteren H&E kesitleri	28
Resim 4.1: a-b: VE-Kaderin (CDH5) için immün boyama. CDH5 için membranöz vasıfta immün boyanma sergileyen kolorektal kanser örneği (a) CDH5 için sitoplazmik vasıfta immün boyanma sergileyen kolorektal kanser örneği (b).....	43
Resim 4.2: a-b-c-d: VE-Kaderin için negatif immün boyanma sergileyen KRK örneği ve sıkışmış endotel hücreleri ve çevre inflamatuvar hücre sitoplazmalarında pozitif boyanma (a) VE-Kaderin için immün boyanma sergileyen, kolorektal kanser içindeki vasküler endotel hücreleri (b) KRK'lerde; VE-Kaderin boyanma kuvveti +1 (c) VE-Kaderin boyanma kuvveti +2 (d).....	44
Resim 4.3: a-b-c: Cerb-B2 (HER-2) için negatif immün boyanma sergileyen KRK örneği (a), KRK'larda; Cerb-B2 boyanma kuvveti Skor 1 (b), Cerb-B2 boyanma kuvveti Skor 3 (c)	44

ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Kolorektal kanserli hastaların ölümlerinin %50'si metastazlardandır. Prognozda temel faktör TNM evresidir. Fakat patolojik evrenin aynı olmasına rağmen prognostik farklılıklar prekürsör lezyonların karsinogenezdeki rollerinin anlaşılmasını zorunlu kılmıştır. Bunlardan VE-kaderin, anjiogenez, tümör invazyonu ve metastazında esas moleküldür. Epidermal-mezenkimal transizyonu düzenleyen RAS/RAF ve PI3K yolağı onkoproteinleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu ilişkiyi ortaya çıkarmak temel hedeflerimizdendir.

YÖNTEM: 2011-2021 yılları arasında tanı almış 122 metastatik KRK vakasının VE-Kaderin ekspresyonu ve Hematoksilen-Eozin kesitleri klinikopatolojik prognostik parametrelerle karşılaştırıldı. Arşivde bloklarına ulaşılamayan, yeterli tümör dokusu içermeyen vakalar dışlandı. Tümör volümü fazla, artefaktı ve perikolorektal yağ doku yoğunluğu az olan ve KRAS, NRAS, BRAF gen mutasyonlarından en az birinin analizinin yapıldığı vakalar seçildi. Analizler SPSS programında yapıp, istatistiki açıdan anlamlılık kriteri $p < 0.05$ kabul edildi. Vakalara Ki-kare, Man-whitney-u, Kaplan- Meier yöntemi ile Log-rank uygulandı.

BULGULAR: VE-kaderinin ekspresyonu, sadece vasküler endotelyal ve 38 vakada tümöral hücrelerde gözlendi. Boyanma olan ve olmayan gruplar arasında hastaların yaşları, cinsiyetleri, tümör boyutu, tipi ve derecesi, RAS-RAF pozitifliği, pozitif KRAS kodonları, T-N evresi, lenf nodu metastaz sayısı, lenfovasküler-perinöral invazyon varlığı anlamlı farklılık göstermedi. Düşük ve yüksek boyanma grupları arasında ise yüksek boyanma olan grupta anlamlı olarak erkek hasta oranı daha yüksek, KRAS pozitifliği ise daha düşük olarak bulundu.

SONUÇ: Farklı çalışmalarda olduğu gibi VE-kaderinin kanser progresyonunda rol oynadığı bulundu. VE-kaderinin klinikopatolojik parametreler ve KRAS, NRAS, BRAF ile ilişkisi henüz ülkemizde çalışılmamış olup literatürde ise sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Ancak VE-kaderin ile ilgili farklı evrelerdeki tümörlerde yeni çalışmalar yapılması önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: HER-2, KRAS, NRAS, vaskülojenik taklit, VE-kaderin

ABSTRACT

Correlation of immunohistochemically CD144 and Cerb-B2 study results with KRAS, NRAS, BRAF mutations and clinicopathological parameters in advanced stage colorectal carcinoma cases

AIM: 50% of deaths in patients with colorectal cancer (CRC) are due to metastases. The main factor in prognosis is TNM stage. However, despite being in the same pathological stage, prognostic differences necessitated understanding the roles of precursor lesions in carcinogenesis. Of these, VE-cadherin is the main molecule in angiogenesis, tumor invasion and metastasis. It is thought to be related to the RAS/RAF and PI3K pathway oncoproteins that regulate epidermal-mesenchymal transition. Revealing this relationship is one of our main goals.

MATERIALS AND METHODS: VE-Kaderin expression and Hematoxylin-Eosin sections of 122 metastatic CRC cases diagnosed between 2011-2021 were compared with clinicopathological prognostic parameters. Cases whose blocks could not be reached in the archive and did not contain sufficient tumor tissue were excluded.

Cases with large tumor volume, low artifact and low pericorectal adipose tissue density and at least one of the KRAS, NRAS, BRAF gene mutations were analyzed. Analyzes were made in SPSS program and $p < 0.05$ was considered statistically significant. Log-rank was applied to the cases with Chi-square, Man-whitney-u, Kaplan-Meier methods.

RESULTS: Expression of VE-cadherin was observed only in vascular endothelial and tumoral cells in 38 cases. Age, gender, tumor size, type and grade, RAS-RAF positivity, positive KRAS codons, T-N stage, number of lymph node metastases, presence of lymphovascular-perineural invasion did not differ significantly between the groups with and without staining. Between the low and high staining groups, the rate of male patients was found to be significantly higher in the high staining group, and KRAS positivity was found to be lower.

CONCLUSION: As in different studies, VE-cadherin was found to play a role in cancer progression. The relationship of VE-cadherin with clinicopathological parameters and KRAS, NRAS, BRAF has not been studied in our country yet, and there are limited studies in the literature. However, further studies are recommended for VE-cadherin-related tumors at different stages.

Keys words: HER-2, KRAS, NRAS, vasculogenic mimicry, VE-Kadherin



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal karsinoma (KRK) dünyada en sık görülen malignitelerden biridir (la Vecchia ve Sebatian, 2020). T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün yayınladığı Türkiye Veri Tabanı istatistikleri ve Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı'nın (IARC) yayınladığı GLOBOCAN 2018 verilerinde, kadınlarda görülen kanserler arasında dünyada, meme kanserinden sonra 2. sırada, ABD ve Türkiye'de ise 3. sırada olduğu belirtilmektedir. Erkeklerde ise dünyada, ABD'de ve Türkiye'de 1. sırada akciğer kanseri (%16,8), 2. sırada prostat kanseri (%14,8), 3. sırada ise KRK'lar (%10,1) gelmektedir (Baran Y, 2018). 25-69 yaş aralındaki kadınlarda bu 2. sıraya yükselmektedir. KRK'lar dünyada kansere bağılı ölümlerin en sık 4. nedenidir ve sıklığının 2030 yılına kadar %60'a ulaşacağı tahmin edilmektedir (Ferlay ve ark., 2013).

KRK'nın hedefe yönelik tedavisinde kullanılabilecek terapötik ajanların kısıtlı oluşu, bunlara karşı direnç gelişmesi ve tedavi maliyetleri, tedavi için yeni hedeflerin bulunmasını gerektirir. Bu nedenle prekürsör lezyonların tanınması, karsinogenezdeki rollerinin bilinmesi, kanserin ilerleme ve yayılmasındaki mekanizmaların anlaşılması zorunludur. Karsinogenezde rol oynayan moleküler değışiklikler bulunduğça, hedefe yönelik tedavi protokolleri de hızla ilerlemekte ve değışmektedir.

Son birkaç yılda endotelyal prekürsör hücrelerin güçlendirilmesi intussisepsiyon ve vaskülojenik taklit (VT) dahil olmak üzere birkaç başka tümör mikrosirkülasyon paterni tanımlanmıştır (Pezzella ve Gatter, 2015; Moschetta ve ark., 2014; Qian, 2013). Bunlar KRK'lerde aşırı eksprese olarak tümör progresyonu, epidermal-mezenkimal transizyonun (EMT) indüksiyonu, anjiogenez, migrasyon ve hücre sağ kalım süresinde rol oynar (Brabletz ve ark., 2005). VT, anjiogenez inhibe edildiğinde alternatif bir kan sağlayıcı yol olarak rol oynayabilir ve agresif tümör hücrelerinin benzersiz bir yeteneğidir (van der Schaft ve ark., 2004). VE-kaderin (VEK, CD144, CDH5) ise VT için önemli bir belirleyicidir (Zhang ve ark., 2007). Çünkü VEK içermeyen tümör hücreleri VT oluşumunda yetersiz bulunmuştur (Hendrix ve ark., 2001). VT varlığı yüksek tümör derecesi, histolojik farklılaşma, kısa sağkalım, invazyon ve metastazla

ilişkilidir ve hücre büyümesi, migrasyonu, vaskulogenezi ve vasküler yeniden şekillenmeyi sağlar. Vasküler endotelial hücreler, kaderin süper ailesinin çeşitli üyelerini, özellikle VEK'i eksprese ederler. VEK, endotelial aderens bağlantıların ana adezyon reseptörü ve majör transmembran proteinidir. Kaderin ailesinin bir üyesi olup endotel hücrelerini tübüler yapılara bağlar. Bununla birlikte EMT'yi düzenleyen diğer iki sinyal yolu olan RAS/RAF ve PI3K yolağı onkoproteinleri; KRAS, NRAS, BRAF ile ilişkili olabilir. Çalışmamızda bu ilişkiyi ortaya çıkarmak temel hedeflerimizden biri oldu. Ayrıca metastaz kanser tedavilerinde, sınırlayıcı bir faktördür ve kansere bağlı ölümlerin %90'ından sorumludur (Reymond ve ark., 2013). KRK'lı hastaların %50'sinin uzak metastazlardan dolayı öldüğü tahmin edilmektedir (Wang ve ark., 2018). Metastaz döngüsünün engellenmesi bu açıdan kanser tedavisinde büyük önem taşır.

Endotel hücre temaslarının sürdürülmesi ve kontrolü için E-kaderinin ana belirleyicisi rolüne benzer şekilde, VEK endotel hücre-hücre adezyonu sürdürülmesi, kontakt inhibisyonu ile kontrolü için hayati önem gösterir. VEK aracılı adezyonu düzenleyen mekanizmalar, vasküler geçirgenliğin, vasküler permeabilitenin kontrolünde, endotelden tümör göçünün inhibisyonunda çevre doku arasındaki bariyer formasyonunda ve lökosit ekstrasvazasyonunu kontrolde önemlidir. VEK adezyon fonksiyonuna ek olarak hücre proliferasyonu, apoptoz (VEGFR uyarılarını destekleyerek) gibi çeşitli hücre içi süreçleri düzenler ve VEGFR fonksiyonlarını modüle eder. Sonuç olarak; VEK, embriyogenez, anjiogenez, tümör invazyon ve metastazı sürecinde esas moleküldür. İşte bu, vasküler yapının geçirgenliği, endotel hücre temaslarının sürdürülmesinden ve kontrolünden sorumlu baskın adezyon molekülü olarak öne çıkan rolü ve kan damarı sisteminin morfogenezi sırasındaki temel rolü VEK'i adezyon molekülleri arasında başlıca araştırma hedefi haline getirmiştir (Vestweber, 2008; Mao ve ark., 2013).

İlginç bir şekilde, meme kanserlerinde, VEGFR'nin ekspresyonunun Cerb-B2 (HER-2) ekspresyonu ile doğrusal korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Raica ve ark., 2011; Nejatollahi ve ark., 2012.; Liu ve ark., 2013). Buna karşın şu ana kadar HER-2'nin VEK oluşumundaki rolü hakkında pek veri yoktur. Bir çalışmada VT varlığının, artan HER-2 ekspresyonu ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Inokuchi ve ark., 2017).

Bunun dışında KRAS mutant ve HER-2 overeksprese/amplifiye KKK subgruplarının daha agresif seyrettiği bildirilmiştir (Meric-Bernstam ve ark., 2019). Ancak KKK’da HER-2’nin güvenilirliği hala tartışmalıdır. Çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Tümör ilerlemesi, metastaz, ilaç direnci, TNM evresi, sağ kalımdaki etkileri ve genetikteki önemli rolü göz önüne alındığında VEK’in KKK’lı hastalarda klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini göstermek, günümüzde önemini koruyan KRAS, NRAS ve çeşitli tümörlerin prognozunda önemi gösterilmiş HER-2 ile korelasyonunu gözlemlemek ya da kolon anjiogenezindeki rolüyle ilgili yeni mekanizmaları ortaya koymak değerli olacaktır. VE-Kaderin ve HER-2 aşırı ekspresyonu arasındaki ilişki, tümör nüksü ve ilerlemesi açısından ana faktör olabilir. Ayrıca KRAS ve HER-2 pozitif hastalarda antiEGFR tedavisine cevapsızlıktan dolayı, bu ikisi arasındaki ilişki sağlıklı ortaya konulursa spesifik tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımına ortam hazırlayabilir. VEK’ in klinikopatolojik parametrelerle ve KRAS, NRAS, BRAF ve HER-2 ile ilişkisi henüz Türkiye’de gösterilmemiştir. Dünyada ise sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.

Biz bu çalışmada KKK tanılı hastalara ait arşivimizdeki parafin bloklardan VEK ve Cerb-B2 onkoproteinlerinin ekspresyon derecelerini immunohistokimyasal yöntemlerle belirledik. Hematoksilen & Eozin kesitlerinde değerlendirdiğimiz tümör evreleme ve prognozunun tayininde patoloji ve onkoloji pratiğinde kullanılan faktörler (evre, histopatolojik tanı, yaş, cinsiyet ve tümör lokalizasyonu, TN evresi, tümör derecesi, tümör büyüklüğü vs.) arasındaki ilişkiyi inceledik. KRAS, NRAS, BRAF V600 mutasyonları bakılan kolorektal kanser vakaları ile ekspresyon oranlarını karşılaştırdık ayrıca genel yaşam süresi üzerindeki etkilerini araştırdık. Bu bilgiler ışığı altında VEK ve Cerb-B2 mutasyonlarının klinik gidiş ile ilişkisini aydınlatmayı, kolorektal karsinogenezde KRAS, NRAS, BRAF V600 mutasyonları ile bu proteinlerin birbirini etkileyip etkilemediklerini göstermeyi amaçladık. Ayrıca VEK ve Cerb-B2 markırlarının rutin pratikte tedaviye ve prognozun değerlendirilmesine olan katkılarını bulmayı hedefledik.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon Histolojisi

Kolon duvarı içten dışa doğru tunika mukoza, tunika submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza tabakalarından oluşmaktadır. Bu tabakalar ise kolon epiteli, bağ dokusu ve düz kasdan oluşmaktadır (Eroschenko, 2001). İleoçekal valvin alt ve üst dudakları iki kat mukoza ve sirküler kaslardan meydana gelmiştir (Romolo, 1996).

2.1.1. Tunika mukoza

Kolumnar yüzey epiteli, lamina propria ile muskularis mukoza (dışta longitudinal, içte sirküler düz kas) tabakalarına ayrılır (Eroschenko, 2001). Kolonda karakteristik olarak villuslar bulunmaz. İntestinal glandlar (liberkühn kriptleri) uzun olup oldukça fazla goblet hücresi ve absorbtif hücre içerirler. Bu hücrelerin yanısıra andiferansiye ve immatür prekürsor hücreler, Paneth hücreleri ve endokrin hücreler bulundurulur. Çekum ve proksimal sağ kolon mukozasındaki Paneth hücreleri içerisinde lizozim, epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi ürünler barındıran çok sayıda eozinofilik sekretuar granüller yer alır (Kodner ve ark., 1999). Lamina propriada ise damar, sinir, düz kas ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu görmek mümkündür (Ross ve Reith, 1985).

2.1.2. Tunika submukoza

Arterler, venler, lenfatik damarlar, değişik boyutta lenfatik nodüller ve diffüz lenfoid doku ve sinir pleksuslarını ile arada düzensiz bağ dokudan oluşur. Meissner pleksusu, sinir lifleri ve ganglion hücrelerinden meydana gelir (Ross ve Reith, 1985).

2.1.3. Tunika muskularis (muskularis propria)

İçte sirküler, dışta longitudinal uzanım gösteren iki düz kas tabakasından oluşup aralarında Auerbach pleksusu bulunur (Ross ve Reith, 1985). Sirküler tabaka sürekliyken, dış longitudinal tabaka lifleri tenya koliler halinde düzenlenmiştir.

2.1.4. Tunika seroza (visseral periton)

Seroza, tek katlı mezotelyal hücreleri ile örtülü dış kolon yüzeyini oluşturup bir çeşit visseral peritondur. Mezotelyal hücrelerin hemen altında fibroelastik dokuca zengin,

mezenterik bölgede ise yağ dokudan zengin alan, subseroza olarak adlandırılır. Seroza apendiks, çekum, transvers ve sigmoid kolonu tamamen sararken; inen ve çıkan kolon, rektumun bazı kısımları ile anal kanal retroperitonealdir (Sternberg, 1992).

2.2. Kolorektal Kanserlerin İnsidansı ve Epidemiyolojisi

KRK, kolon epitelinden kaynaklanan klinik, morfolojik ve de genetik bakımdan çeşitli farklılıklar gösteren bir grup tümörü ifade eder. Adenokarsinomlar dünya literatürüne göre %85; T.C. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nce hazırlanmış 2016 yılı Türkiye Veri Tabanı istatistiklerine göre ise %96,1 oranla kolorektal kanserlerin en sık histolojik alt tipini oluşturmaktadır. Sindirim organlarıyla ilgili kanserlerin, yalnız ölüm bildirim oranları da 2012-2016 yılları arasında gittikçe artmış ve 2012'de %1,1 iken günümüzde %4,5'a ulaşmıştır (<https://seer.cancer.gov.tr>. Son Erişim Tarihi:15.03.2021; Nagtegaal ve ark., 2020; Odze ve Goldblum, 2014). Tüm dünyada yeni tanı almış farklı organların primer kanserleri içinde KRK'lar %9,7 orana sahip olup, yılda yaklaşık 1 849 518 yeni vaka bildirilmektedir. Yüksek gelirli ülkelerde KRK'nın azalan oranları gözlenirken, düşük ya da orta düzeyde gelire sahip ülkelerde insidans artmaktadır (Boyle ve Levin., 2008; Ferlay ve ark., 2013; Nagtegaal ve ark., 2020). İnsidansı ileri yaşlarda gittikçe artan KRK, genetik predispozisyon veya idiyopatik inflamatuvar barsak hastalığı (İİBH), herediter KRK sendromu gibi predispozan durumlar dışında, 40 yaştan önce nadir olarak görülür (Ferlay ve ark., 2013). Yaş ilerledikçe proksimalde lokalize tümörlerin görülme sıklığı artar (Nagtegaal ve ark., 2020; Stang ve Kluttig., 2008).

2.3. Kolorektal Kanser Öncüsü (Premalign) Lezyonlar

2.3.1. Konvansiyonel kolorektal adenom

Konvansiyonel adenomlar intraepitelyal neoplazilerdir. Genellikle, küçük ya da büyük, saplı veya sesil olabilirler. Bu açıdan makroskopik olarak geniş bir spektrumda görülebilirler. Kolon adenomlarının sıklığı 40 yaş öncesinde %20-30, 60 yaştan sonra %40-50 civarında olup herhangi bir cinsiyet üstünlüğü yoktur. Sporadik adenom gelişiminde ailesel eğilim bulunmakta olup, kolorektal bir adenoma sahip bireylerin birinci derece akrabalarında hem adenom hem de KRK gelişme riski dört kat daha fazladır (Turner, 2010). Bir adenomatöz polibin malignite riski; polibin çapı, histolojik

tipi ve epitelyal displazi derecesi olmak üzere birbirinden bağımsız üç durum ile korelasyon gösterir. Konvansiyonel adenomlar yapısal olarak villöz komponentin oranına göre 3 alt tipe ayrılır.

2.3.1.1. Tübüler adenom, low grade displazili/ high grade displazili

Tübüler adenomlar, konvansiyonel adenomların en yaygın alt grubunu oluşturmaktadır. Bu lezyonlarda tübül şeklinde gland yapıları hakimdir ancak villöz komponentin %25’den az bulunması kabul edilebilir. Tübüler adenomda normal kript mimarisi büyük ölçüde korunur, kriptler değişken derecede elongasyon gösterir ve glandlar sayıca artmıştır. Epitel, geniş hiperkromatik nükleuslu, değişken derecede nükleer iğsileşme ve polarite kaybı gösteren hücrelerden oluşur (Resim 2.1.).

Goblet hücreleri ve absorbtif hücrelerin sayısında azalma ile karakterize diferensiyasyon kaybı ve psödostratifikasyon vardır (Nagtegaal ve ark., 2020). Küçük olanları düzgün konturlu ve sesildir. Büyük lezyonlar ise, lobüle konturlara ve fibromusküler doku ve vasküler yapılardan oluşan sapa sahip olabilir (Turner, 2010).

2.3.1.2. Villöz adenom, low grade displazili/ high grade displazili

Villöz adenomların tanısı için histolojik olarak mukozadan viliform çıkıntıların adenomun %75’inden fazlasını oluşturması gerekir (Nagtegaal et al., 2020) En sık yaşlı hastalarda ve rektum ile rektosigmoid kolonda yerleşirler. Kadifemsi, 2 cm’den büyük çapta veya karnıbahar görüntüsünde kitleler oluştururlar. Displazi derecelerine göre, bazen oldukça düzensiz kolumnar epitel ile örtülüdürler (Turner, 2010).

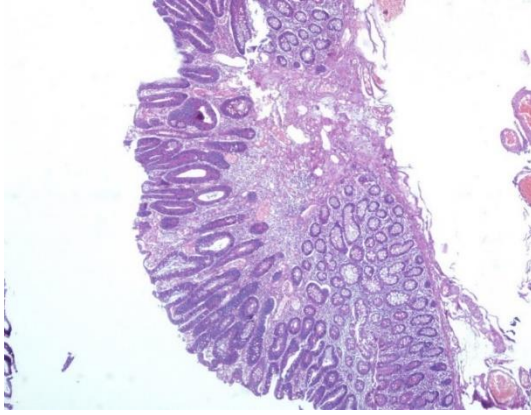
2.3.1.3. Tübülovillöz adenom, low grade displazili/high grade displazili

Tübüler ve villöz yapıların bir arada görüldüğü adenom çeşitidir. Tanı için villöz yapıların adenomun %25’inden çoğunu ve %75’inden azını oluşturması gerekir (Resim 2.2.). Bu lezyonlardan in-situ ya da invaziv karsinoma gelişme riski, villöz bölümün oranı ile doğru orantılıdır (Nagtegaal ve ark., 2020).

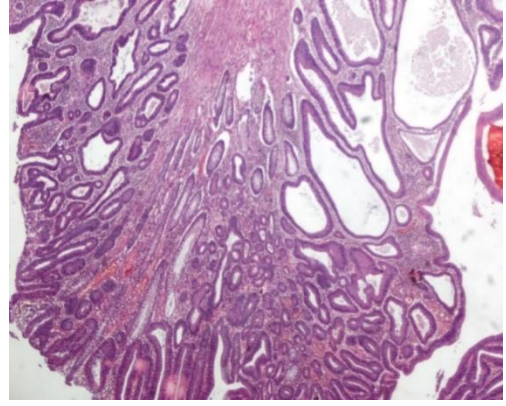
2.3.1.4. İlerlemiş (“Advanced”) adenom

Bu grup adenomlar, 10 mm boyutundan büyük, tübülovillöz ya da villöz yapıda ve/veya yüksek grade displazi gösteren tüm adenomlar ya da intramukozal

adenokarsinomları kapsar. Senkron ve metakron lezyonlarla ilişkisi nedeniyle total kolonoskopi ile sıkı bir takibe alınması gereklidir (Nagtegaal ve ark., 2020).



Resim 2.1. Kolonda tübüler adenom (x40)



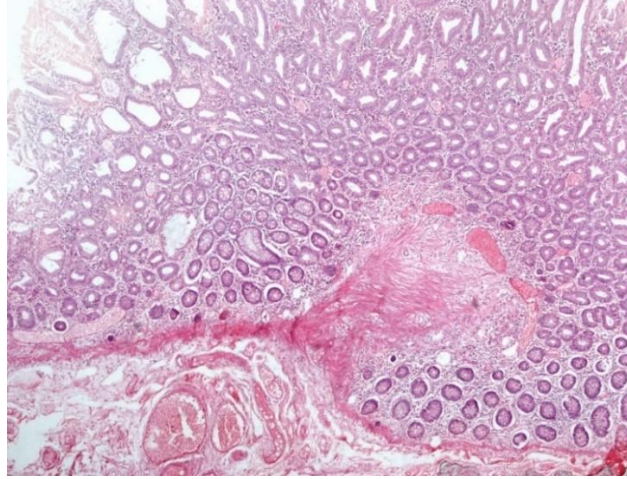
Resim 2.2. Kolonda tübülovillöz adenom (x100)

2.3.2. Kolorektal serrated lezyonlar ve serrated polipler

Bu lezyonlar biyolojik karakteristiklerine göre; sesil serrated lezyonlar (SSL), hiperplastik polipler (HP) ve traditional serrated adenomlar (TSA) olarak sınıflandırılır. Sesil serrated lezyon terimi WHO 5. Baskısında ilk defa tanımlanmıştır. Daha önceden bu terim sesil serrated polip ve adenomlar (SSP/SSA) olarak adlandırılmıştır. Bunlardan TSA ve hem mikroveziküler HP'ler hem de goblet hücrelerinden zengin tip HP'ler genelde distal kolon ve rektumda, SSL'lar özellikle displazinin eşlik ettiği SSL'lar (DSSL) %70-80 proksimal kolonda bulunurlar ve daha kötü prognozludurlar (Nagtegaal ve ark., 2020). Tüm KRK'ların %30'u serrated neoplazi yolağından gelişir. SSL ve TSA, karsinom prekürsörleri olarak bilinirken HP'ler özellikle SSL'nin bazen de TSA'nın prekürsörlüğünü yaparlar (Nagtegaal ve ark., 2020).

2.3.2.1. Hiperplastik polipler

HP'ler, yüzey epitelinde ve kriptlerin üst 2/3 parçasında görülen serrasyonlar ve huni şeklinde eşit aralıklı kriptlerle karakterizedir (Resim 2.3.). Kriptler bazal dilatasyon, önemli bir bozulma ya da submukozal yanlış yerleşme göstermezler ancak tek tek kript dallanmaları gösterebilirler (Nagtegaal ve ark., 2020).



Resim 2.3. Kolonda hiperplastik polip (x100)

2.3.2.1.1. Mikroveziküler tip HP'ler (MVHP)

Teşhisi, SSL kriterleri karşılanamadığında dışlama yoluyla konulabilen bir teşhistir. MVHP'de epitel erken olgunlaşır ve mikroveziküler epitel hücreleri (ince apikal vakuoller içeren yoğun sitoplazmalı hücreler) ile değişik sayıdaki goblet hücrelerini içerir. Nükleuslar küçük, yuvarlak ya da ovaldir ve bazalde lokalizedir (Nagtegaal ve ark., 2020).

2.3.2.1.2. Goblet hücrelerinden zengin tip HP'ler

Genelde küçüktürler ve hemen göze çarpmayan morfolojik değişiklikler içerirler. Epitel hiperplazisi veya reaktif değişiklik zannedilerek kolayca gözden kaçabilirler. Kript epiteli ve yüzey epiteli en çok küçük, uniform bazalde yerleşim gösteren nükleusa sahip goblet hücrelerinden oluşur. Bu lezyonlarda kriptlerin uzunluğu ve genişliği, normal mukozadakilerden daha fazladır. Nadiren dallanma ve tortiozite gösterirler. Enine kesitlerde kript lümenleri MVHP'dekinin aksine stellat değil yuvarlaklır (Nagtegaal ve ark., 2020).

2.3.2.2. Sesil serrated lezyonlar

SSL'ların TSA ve HP'lerden ayrımında esas olarak morfoloji önemli olmasına rağmen sitolojik özellikler de oldukça önemlidir. Sitolojik olarak selim görünümlü olup kriptler belirgin serrasyon içerirler. SSL'ler goblet hücreleri ile mikroveziküler müsin damlacıklarının her ikisini de beraber içerir. Normal kript yapısında özellikle proliferatif zonda genel bir bozulma gözlenir. SSL'larda kriptler muskularis mukoza

boyunca horizontal olarak seyrederler ve kript bazallerinde dilatasyon gösterirler. HP'deki yüzeyel serrasyonun aksine, kript bazallerine uzanan bir serrasyon ve asimetrik bir proliferasyon söz konusudur. Bunlardan en az birinin varlığı kript yapısının bozulduğunu gösterir. Nadiren dallanan kriptler görülebilir ancak bu SSL tanısı için gerekli değildir. SSL tanısında, bahsedilen serrated kript bozukluklarının, açık bir şekilde bir veya daha fazlası olması gereklidir (Nagtegaal ve ark., 2020).

2.3.2.3. Displazili sesil serrated adenomlar

Bu lezyonlarda displastik komponent SSL'dan keskin bir şekilde sınırlıdır ve çok morfolojik heterojenite içerir. Bu yapısal değişiklikler arasında villöz yapı, kript elongasyonu, kompleks olarak dallanmalar gösteren kript kalabalıklaşmaları, yoğun, artmış luminal sekresyon varlığı sayılabilir. Sitolojik olarak konvansiyonel adenomlardaki gibi intestinal displazi gösterebilir (Nagtegaal ve ark., 2020).

2.3.2.4 Traditional serrated adenomlar

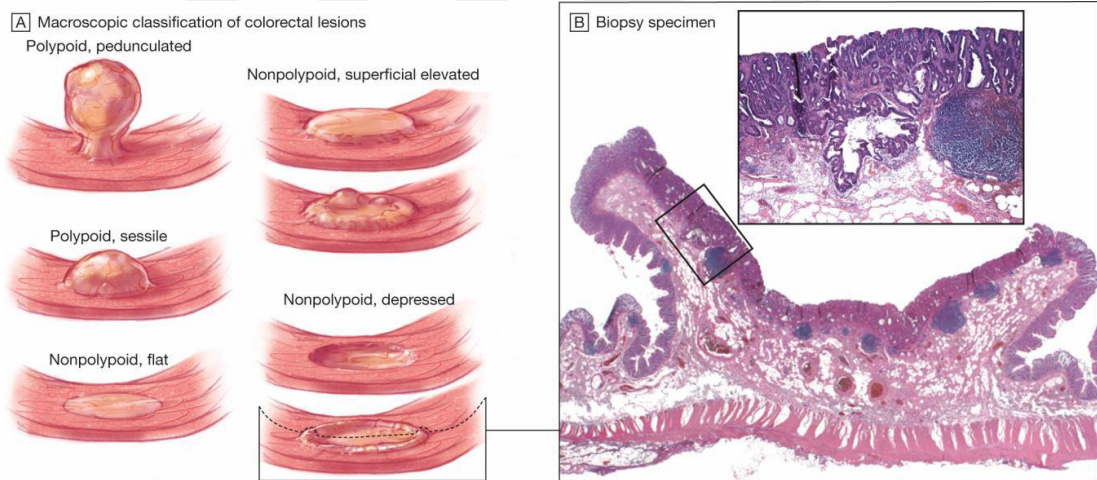
Büyük karnıbaharımsı ya da yassı olabilirler. Büyük olanlar genellikle distal kolonda, flat olanlar genellikle proksimal kolonda yerleşirler. TSA'ların iki en önemli özelliği yarık benzeri serrasyonlar göstermesi yani normal küçük intestinal mukozadaki dar yarıkları andırması ve kurşun kalem nükleuslar, yoğun eozinofilik sitoplazma içeren uzun kolumnar hücrelerin bulunmasıdır. Ektopik kript formasyonları, muskularis mukozayla bağlanmayan epitelyal tomurcuklar olarakda tanımlanır. Bu yapı her zaman karnıbaharımsı TSA'ların villöz projeksiyon alanları boyunca görülür ancak flat TSA'larda da olabilir ancak tanı için şart değildir. TSA'ların çoğu dağınık yerleşimli goblet hücreleri içerir. Ancak bir müsin/gobletten zengin TSA tanımlanmıştır. TSA'lara yandaş olarak HP ve SSL olabilir. Hem intestinal hem serrated displaziyi üstüste binmiş şekilde gösterebilir. Bu polipler çok gelişmiş lezyonları temsil etmektedir ve yüksek grade displazi gösteriyorsa raporda belirtilmelidir (Nagtegaal ve ark., 2020).

2.3.2.5. Sınıflandırılmayan serrated adenomlar

Bazı serrasyon gösteren displastik polipleri TSA veya SSL olarak gruplandırmak zordur. Bu gruba yakın zamanda tanımlanan serrated tubulovilloz adenomlar dahildir (Nagtegaal ve ark., 2020).

2.4. KRK'ların Makroskopisi

KRK'lar çok farklı makroskopik görüntü sergileyebilirler (Şekil 2.1.). En sık görünüm ülseratif tiptir. Bu tipte krater benzeri görünüm sergileyen, santral bölgede sert tümöral alan ile periferik kabarık ve daha adenomatöz, yumuşak alanlar bulunur. Bu tipin özel bir varyantı olan flat/deprese karsinom, genellikle adenomdan malign transformasyonla gelişmeyip, de novo yolla meydana geldiği düşünülmektedir. Proksimal kolon tümörleri ekzofitik büyüme eğilimi gösterirken inen kolon ve transvers kolon tümörleri genellikle endofitik ve annüler gelişim gösterir. Kesit yüzünde nekroz izlenebilir. Ülseratif tümörlerde çoğunlukla stromal desmoplazinin makroskopik izdüşümü olan sert kıvam seçilir. Ekzofitik tümörler ise daha yumuşak kıvamlı kolayca dağılan vasıftadır. Müsinöz tip adenokarsinomlarda ise genellikle makroskopik olarak saptanabilen müsin bulunur. Materyalin kesit yüzünün dikkatli incelenmesi; tümör derinliği hakkında bir fikir vereceğinden önemlidir (Rosai ve Ackerman, 2011; Harpaz ve Saxena., 2003).



Şekil 2.1. Kolorektal lezyonların makroskopik klasifikasyonu (Soetikno, 2008 kaynağından alıntılanmıştır.)

2.5. KRK'ların Histopatolojik Varyantları/ Subtipleri

Prognostik farklılıkları dolayısıyla KRK'ların histopatolojik alt tipler belirlenmelidir. DSÖ 2019 yılında tanımlandığı KRK'ların histopatolojik alt tipleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir (Nagtegaal ve ark., 2020). Kolorektal adenokarsinomlar, infiltratif seyirli hücrelerin ya da küçük hücre gruplarından oluşan yapısı bozulmuş glandlardan

meydana gelir. Tümör çevresinde daha yoğun olmak üzere değişik oranlarda inflamatuvar ve desmoplazik bir reaksiyon bulundurulur. Tümöral glandlar çoğunlukla kolumnar hücrelerden ve goblet hücrelerinden oluşmaktayken daha az sıklıkla sırasıyla nöroendokrin hücreler ve Paneth hücreleri de bu hücrelere eşlik edebilir. Gland lümenlerinde nükleer ve sellüler debrisle birliktelik gösteren, yoğun eozinofilik mukus ile karışık kirli nekroz gözlenebilir (Odze ve Goldblum, 2014) (Resim 2.4.).

Tablo 2.1. DSÖ 2019 sınıflaması kolorektal adenokarsinom histolojik alt tipleri (Nagtegaal ve ark., 2020 kaynağından uyarlanmıştır.)

Malign epitelyal tümörlerin histopatolojik tipleri	
Adenokarsinoma, NOS - Müsinöz adenokarsinoma - Taşlı yüzük hücreli karsinoma (Poorly koheziv karsinoma) - Medüller adenokarsinoma - Serrated adenokarsinoma - Mikropapiller adenokarsinoma - Adenom benzeri adenokarsinoma - Sarkomatooid komponent içeren adenokarsinoma - Adenoskuamöz karsinoma - İndiferansiye karsinoma, NOS	Nöroendokrin tümör, NOS -Nöroendokrin tümör, Grade 1-2-3 -L-hücreli tümör -Glukagon benzeri peptit salgılayan tümör -PP/PYY-salgılayan tümör -Enterokromaffin hücreli tümör -Serotonin salgılayan tümör Nöroendokrin karsinom, NOS -Küçük hücreli nöroendokrin karsinom -Büyük hücreli nöroendokrin karsinom Mikst nöroendokrin ve non-nöroendokrin karsinom (MiNEN)

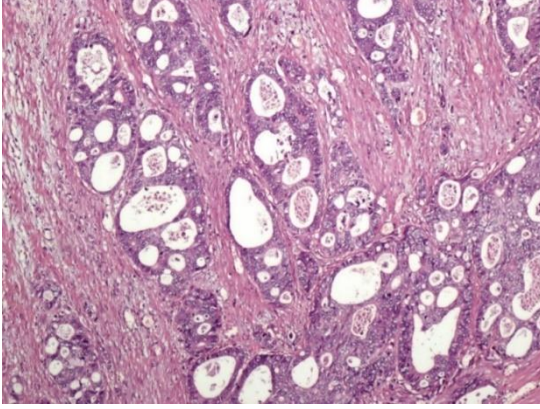
2.5.1. Müsinöz adenokarsinom

Bir tümöre müsinöz adenokarsinom denilmesi için tümörün %50'sinden fazlası; kümeler, tabakalar veya taşlı yüzük hücreleri de içeren tek tek malign tümör hücrelerinden ve ekstrasellüler müsin gölcüklerinden oluşması gerekir (Resim 2.5.). Bu tip, %5-20 arasında değişen bir prevalansa sahip olup, en yaygın adenokarsinom alt tipidir. Adenokarsinom NOS ile kıyaslandığında, bu tümörlerde MSI oranı artmıştır ve metastatik olgularda sistematik tedaviye nispeten zayıf bir yanıt vardır. Müsinöz alanları <%50 olan kanserler, müsinöz bileşene sahip olarak sınıflandırılır.

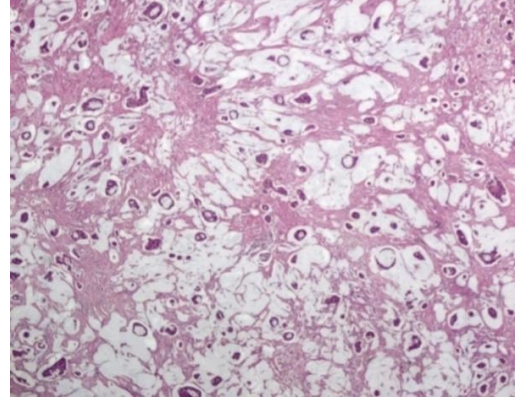
2.5.2. Taşlı yüzük hücreli karsinom (kötü koheziv karsinom)

Tümör hücrelerinin %50'sinden fazlası belirgin intrasitoplazmik müsin içermelidir. Tipik olarak nükleusun yer değiştirmesi ve moldingi ile birliktedir. Tümörler sıklıkla ileri evrelerde bulunur. Ayrıca aynı evredeki adenokarsinom, NOS ve müsinöz karsinoma göre daha kötü prognozladır. Metastazlar hızla ve KRK için tipik olmayan çok sayıda yerde gelişir. Bu tümörlerde yüksek bir MSI insidansı, Lynch sendromu ile

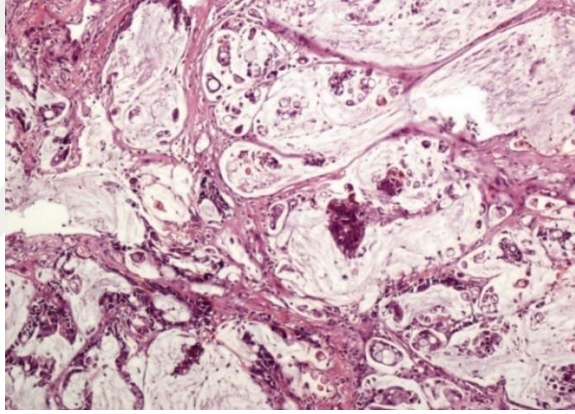
güçlü bir ilişki saptanmıştır. Tümörün <%50'sinde taşlı yüzük hücre komponenti varsa, taşlı yüzük hücre bileşenine sahip karsinom olarak sınıflandırılır (Resim 2.6.).



Resim 2.4. Konvansiyonel adenokarsinom, H&E (x100)



Resim 2.5. Müsinöz adenokarsinom, H&E (x40)



Resim 2.6. Taşlı yüzük hücreli komponent içeren Müsinöz Adenokarsinom, H&E (x100)

2.5.3. Medüller adenokarsinoma

Bu subtip, veziküler nükleuslu, belirgin nükleollü ve yoğun eozinofilik sitoplazmalı malign hücre tabakaları ve belirgin mikst tipte infiltrasyon alanları ile karakterizedir. Sıklıkla MSI içerir, en sık olarak BRAF mutasyonları ile seyreder ve iyi prognoz gösterirler (Adenokarsinom, NOS'tan bile). Bu tip KRK, CDX2 ve CK20 kaybıyla birlikte anormal bir immünohistokimyasal patern gösterir (Nagtegaal ve ark., 2020).

2.5.4. Serrated adenokarsinoma

Bu subtip, glandüler serrasyon varlığı gibi serrated poliplerle benzer morfolojiye sahip

tümörlerdir ve müsinöz alanlar bu tümöre eşlik eder. Bu tümörler düşük nükleus/sitoplazma oranı gösterirler. Yaklaşık tüm KRK'ların %10-15 ini oluştururlar (Nagtegaal ve ark., 2020).

2.5.5. Mikropapiller adenokarsinoma

Bu subtip, stromal alan içerisindeki küçük tümör hücre toplulukları ile karakterizedir. Tanı için bu görüntünün tümörün %5'inde ya da daha fazlasında olması gerekir. Bu subtipde lenf nodu metastaz riski yüksektir. (Nagtegaal ve ark., 2020).

2.5.6. Adenom benzeri adenokarsinoma

Bu subtip, invaziv alanların %50'si ya da daha fazlasının düşük dereceli bir görünümde olduğu ve villöz yapıları ile adenom benzeri bir görünüme sahip olduğu invaziv bir adenokarsinom olarak tanımlanır. Desmoplastik reaksiyon minimaldir ve itici bir büyüme paterni vardır. Yüksek bir KRAS mutasyon oranına sahiptir ve iyi bir prognoz ile karakterize edilir (Nagtegaal ve ark., 2020).

2.5.7. Adenoskuamoz karsinoma

İnsidansı çok düşüktür (<%0,1). Adenokarsinom ve skuamoz hücreli karsinom özelliklerini beraber gösterir (Nagtegaal ve ark., 2020).

2.5.8. Sarkomatoid komponent içeren adenokarsinoma

Undiferansiye komponent, iğsi hücreler ve rabdoid özellikler gibi sarkomatoid alanlar ile karakterizedir. Tümör tipik olarak geniş sitoplazmalı ve intrasitoplazmik, eozinofilik rabdoid cisimcikler bulunduran rabdoid hücreler içerir. Tümör hücreleri sıklıkla kohezyon kaybı gösterir ve miksoid matriks içerisine gömülüdür. Pleomorfik dev hücreler yanısıra glandüler farklılaşma alanları da görülebilir. Nükleer INI1 kaybı karakteristiktir (Nagtegaal ve ark., 2020).

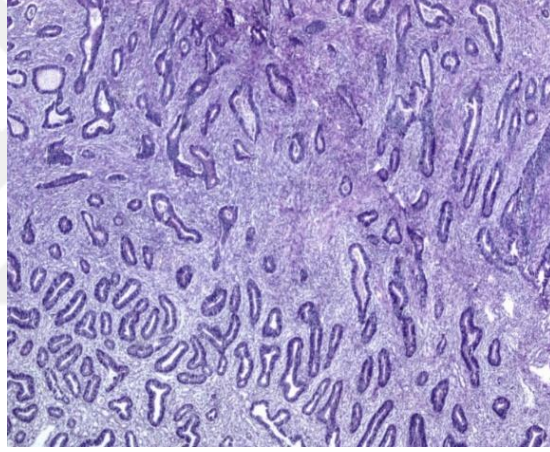
2.5.9. İndiferansiye karsinoma, NOS

Diğer epitelyal tümörlerden ayırımında morfolojik, immünohistokimyasal ve moleküler olarak farklı bir bulgusu yoktur. Medüller karsinomdan pushing sınırlarının olmayışı, sinsityal büyüme paterninin ve belirgin lenfositik infiltratın yokluğu ile ayrılır. Sadece nadiren MSI gösterirler (Nagtegaal ve ark., 2020).

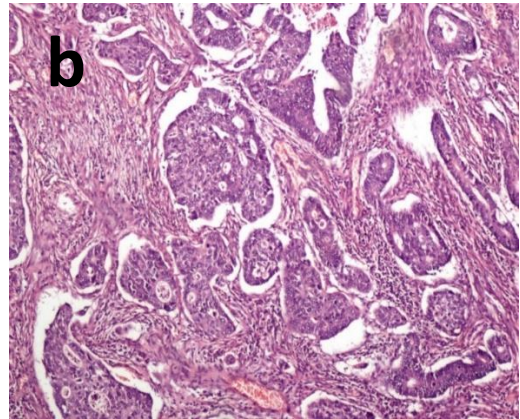
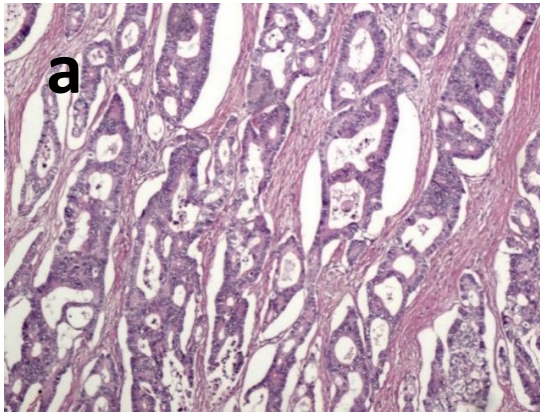
2.6. Grade (Derece)

Kolorektal adenokarsinom, bez oluşumuna göre derecelendirilir. Grade verilirken en az diferansiye komponent baz alınır. İnvaziv cephe, EMT'nin bir işareti olması ve tümör tomurcuklanması ile kötü farklılaşan kümelerin oluşumunun meydana geldiği yer olması bakımından, tümör derecelendirmesine katılmamalı, ancak ayrı olarak bildirilmelidir (Nagtegaal ve ark., 2020) (Resim 2.7, Resim 2.8 a-b).

- Grade 1 İyi diferansiye (gland yapısı >%95'tir.)
- Grade 2 Orta derecede diferansiye (gland yapısı %50-95 arasındadır.)
- Grade 3 Kötü diferansiye (gland yapısı <%50'dir.)
- Grade 4 Farklılaşmamış (indiferansiye) (gland yapısı veya müsin yoktur; skuamoz veya nöroendokrin diferansiyasyon yoktur.)



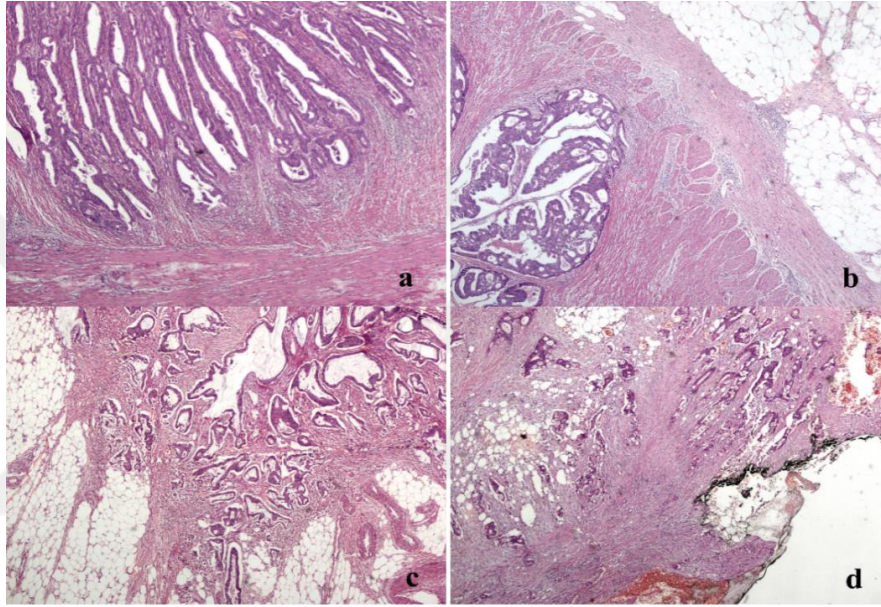
Resim 2.7. Grade 1 KRK, H&E (x100)



Resim 2.8 a-b. Farklı Gradelere KRK'lerin H&E görüntüleri. Grade 2 KRK (a), Grade 3 KRK (b) (x100)

2.7. Stage (Evre)

Bugün kullanılan TNM (tümörün penetrasyon derinliği- lenf nodu metastazı- uzak organ metastazı) evreleme sistemi, 1954 tarihinde 'Denoix' tarafından önerilmiş, 'Beahrs ve Myers' tarafından uyarlanmıştır (Denoix,1954; Beahrs ve ark., 1988). Bu evreleme sistemi 'Union International Contre Cancer' (UICC) ve 'American Joint Commission On Cancer' (AJCC) komitelerince kabul görmektedir (Jessup ve ark., 2017) (Tablo 2.2., Tablo 2.3., Tablo 2.4., Tablo 2.5. ve Resim 2.9.).



Resim 2.9. Farklı KRK evrelerinin H&E görüntüleri. T1 evre KRK, H&E (x100) (Resim 2.9a.), T2 evre KRK, H&E (x40) (Resim 2.9b.), T3 evre KRK, H&E (x40) (Resim 2.9c.), T4 evre KRK, H&E (x100) (Resim 2.9d.)

Tablo 2.2. Primer tümörün tanımı (T) (Nagtegaal ve ark., 2020'den uyarlanmıştır.)

T Kategorisi	Tanımı
Tx	Primer tümör boyutu değerlendirilemedi.
T0	Primer tümör mevcut değil.
Tis	Karsinoma in situ, intramukozal karsinom
T1	Tümör submukozayı invaze etmiştir.
T2	Tümör muskularis propriayı invaze etmiştir.
T3	Tümör subserozayı ya da nonperitoneal perikolik/perirektal dokuyu invaze etmiştir.
T4	Tümör direk olarak ya çevre organ ya da dokuları invaze etmiş ve/veya viseral peritonu perforé etmiştir.
T4a	Tümör viseral peritonu perforé etmiştir.
T4b	Tümör çevre organ ya da dokuları direk invaze etmiştir.

Tablo 2.3. Bölgesel lenf nodları (N) (Nagtegaal ve ark., 2020’den uyarlanmıştır.)

N Kategorisi	Tanımı
Nx	Lenf nodu değerlendirilemedi.
N0	Lenf nodu metastazı saptanmadı.
N1	Bir-üç arası lenf nodu pozitifliği
N1a	Bir adet lenf nodu pozitifliği
N1b	İki veya üç adet lenf nodu pozitifliği
N1c	Metastaz yok, fakat subseroza, mezenter, nonperitoneal perikolik veya perirektal/mezorektal dokuda yerleşimli tümör deposit varlığı
N2	Dört veya daha fazla sayıda lenf nodu pozitifliği
N2a	Dört-altı arası lenf nodu pozitifliği
N2b	Yedi veya daha fazla lenf nodu pozitifliği

Tablo 2.4. Prognostik evre grupları (Nagtegaal ve ark., 2020’den uyarlanmıştır.)

Klinik evre	T evresi	N evresi	M evresi
0	Tis	N0	M0
IIA	T1, T2	N0	M0
IIB	T3	N0	M0
IIC	T4a	N0	M0
IIIA	T4b	N0	M0
IIIA	T1, T2	N1	M0
IIIB	T1	N2a	M0
IIIB	T3, T4a	N1	M0
IIIB	T2, T3	N2a	M0
IIIC	T1, T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
IIIC	T3, T4a	N2b	M0
IVA	T4b	N1, N2	M0
IVB	Herhangi T	Herhangi N	M1a
IVC	Herhangi T	Herhangi N	M1b
	Herhangi T	Herhangi N	M1c

Tablo 2.5. Uzak metastaz (M) (Nagtegaal ve ark., 2020’den uyarlanmıştır.)

M Kategorisi	Tanımı
M0	Uzak metastaz izlenmedi.
M1	Uzak metastaz mevcut
M1a	Peritoneal metastaz olmaksızın bir organda metastaz varlığı (bölgesel olmayan lenf nodu/nodları, akciğer, karaciğer, over)
M1b	Organ metastazının birden fazla olması
M1c	Organ metastazının eşlik edip etmemesine bakılmaksızın periton metastazının olması

2.8. Prognozu Etkileyen Faktörler

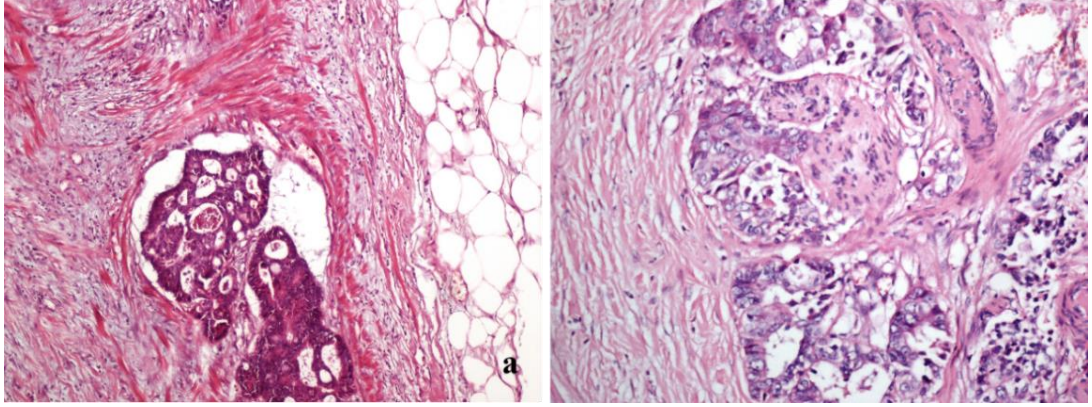
KRK’larda tümör evresi (TNM), en önemli prognostik belirleyicidir. Santral deprese alanda tümörün derinliği, karaciğer metastazı ve lenf nodu pozitifliği insidansı ile doğru orantılıdır. Metastatik lenf nodu sayısında artış olması ise kötü prognoz ile ilişkilidir (Rosai ve Ackerman, 2011; Kang ve ark., 2005). Bunun dışında prognozda etkili diğer faktörler Tablo 2.6.’da gösterilmiştir.

2.9. KRK’larda Hücre İçi Sinyal İletim Mekanizmaları

Genetik hasar gelişiminde, DNA tamir genleri, proto-onkogenler, tümör supresör genler ve apoptozu düzenleyen genler hedeflenir. DNA tamir genlerinde oluşan mutasyonlar bahsedilen diğer genlerde oluşan genetik hasarın tamirinde duraklama sonucu dolaylı olarak etki gösterirler ve genomda neoplastik dönüşüme yol açabilecek bir dizi mutasyonun oluşmasına zemin hazırlarlar. Mutasyona maruziyet ve tolerans “genomik instabilite” olarak adlandırılır ve KRK gelişimi için belirleyicidir. Kolorektal karsinogenezde yapılan en son çalışmalarda genomik instabiliteye neden olan 3 farklı moleküler temele dayalı mekanizmanın rol aldığı kabul edilmektedir. Bunlardan ilki kromozomal instabilite (CIN) ara yoludur. Bu yol WNT ile ilişkili, APC tümör supresör geninin başlatıcı olduğu, KRAS gibi protoonkogenler ve TP53, DCC gibi tümör supresör genlerdeki mutasyonlar sonucu devam eden bir yoldur. CIN, küçük bir gen grubunu etkileyen DNA kazanımları/amplifikasyonları ve kayıpları/delesyonları ile yüksek düzeyde DNA somatik kopya sayısı değişiklikleri (“Somatic copy number alteration”: SCNA) ile sonuçlanır (Nagtegaal ve ark., 2020).

Tablo 2.6. Prognostik faktörler (T) (Rosai ve Ackerman, 2011; Kumar ve ark., 2005’den uyarlanmıştır.)

Cinsiyet	Kadınlarda daha iyi prognozludur.
Yaş	Prognoz, çok genç ve çok yaşlılarda kötüdür.
Mikroskopik tümör tipi	Müsinöz ve taşlı yüzük hücreli adenokarsinom, klasik adenokarsinoma göre daha kötü prognozludur.
Histolojik grade yüksekliği	Tümör invazyon derinliğinden bağımsız kötü diferansiye adenokarsinomalarda lenf nodu metastazının %50’den fazla olduğu görülmüştür.
Tümör lokalizasyonu	Rektosigmoid kolon tümörleri tanı anında dahi daha geniş bir yayılım gösterdiklerinden genellikle diğer lokalizasyonlara göre daha kötü prognozludur.
Birden fazla tümör mevcudiyeti	Senkron veya metakron tümörde görülen sağ kalım soliter tümör varlığındakiyle eşdeğerdir.
Tümörün boyutu	Güvenilir bir prognostik faktör değildir.
Tümör kenarlarının görünümü	Düz ya da deprese kenarlı tümörler, polipoid kenarlı tümörlere göre daha kötü prognozludur.
Cerrahi sınırlar	Radial cerrahi sınır pozitifliği görülmesi lokal rekürrensler bakımından oldukça önemlidir. Bu oran tümör cerrahi sınıra 2 mm’den daha yakın ise artar.
Tümör invazyon sınırları ve inflamatuvar reaksiyon	Ekspansif gelişim gösteren tümörler, infiltratif olanından daha iyi prognozlu olup, tümör dokusuna karşı gelişen inflamatuvar yanıtın varlığı iyi prognoz göstergesidir.
Vasküler invazyon varlığı	Ven invazyonu olan KRK vakalarında 5 yıllık sağ kalım süresi kısalmaktadır. Evre 3 hastalarda lenfatik yayılım ise kötü prognostik bir göstergedir (Resim 2.10.).
Perinöral invazyon varlığı	İleri evredeki hastahğa işaret eder. Dolayısı ile kötü prognostik bir faktördür (Resim 2.10.).
Obstrüksiyon ve perforasyon varlığı	Evrelemeden bağımsız kötü prognoz göstergesidir.
Asiner morfolojinin varlığı	Mikroasiner tipte büyüme paterni kötü prognozla ilişkilidir.
Anjiogenez	Nüks gelişimine neden olduğu için, sağ kalım süresini kısaltır.
Lenf nodu reaksiyonu varlığı	Tümöre karşı verilen immün yanıtın göstergesidir ve sağ kalım süresini uzatmaktadır.
Nöroendokrin hücrelerin varlığı	Kromogranin ekspresse eden hücrelerin varlığı kötü prognoz göstergesidir.
Müsin ile ilişkili antijenlerin varlığı	MUC-1 pozitifliği bağımsız bir prognostik faktördür.
Mikrosatellit instabilitenin (MSI)	MSI bulunması iyi prognostik bir faktör olarak belirlenmiştir.
Onkojen ekspresyonu	Rekürren hastahğı olanlarda KRAS mutasyonunun çok daha sık olduğu izlenmiştir. P53’ün artmış ekspresyonu ve p27’deki ekspresyon kaybı da kötü prognoz ile ilişkilidir.
DNA ploidi	Anöploidi varlığının rektal karsinomlardaki rekürrens ile ilişki olduğu görülmüştür.
Kromozom 18 q allelik kaybının olması	Bu kromozomal değişikliğin negatif prognoz ile ilişkilidir.



Resim 2.10. KRK'lı vakaya ait lenfatik invazyon (resim 2.10a) ve perinöral invazyon (resim 2.10b) gösteren H&E kesitleri (x400).

2. arayol, DNA tamir genlerinin inaktivasyonu ile oluşan, yüksek mutasyon oranına sahip (hipermutant) MSI sonucu karsinom gelişimi ile karakterize yoldur (Nagtegaal et al., 2020). MSI kanserler adenomlar üzerinden de gelişebilir ve genellikle sağ kolon lokalizasyonludur. Prognozları daha iyidir (Costedio ve Church, 2011). Gelişmiş ülkelerde, sporadik KRK'ların %15'i ve HNPCC vakalarının neredeyse tamamı bu yol üzerinden gelişirler (Chan ve ark., 2005; Hamelin ve ark., 2008).

3.arayol ise, kolorektal karsinogenezin serrated arayolu olarak bilinen CIMP yoludur. Bu yol genomda meydana gelen çok sayıda metilasyon ile bazı tümör supresör genleri de içeren çok geniş sayıda gen grubunda baskılanmaya neden olarak, düzeltici polimeraz fonksiyonunda çok yüksek mutasyon oranına sahip (ultramutant) hata sonucu karsinogeneze yol açar. Bu arayolun olası öncü lezyonunun serrated poliplerdir (Costedio ve Church, 2011; Toyota ve ark., 2000).

KRK'lar bu 3 arayolun birinin üzerinden gelişebileceği gibi, birden fazla arayolu kullanarak daha karmaşık bir moleküler mekanizma ile de oluşabilirler. KRK'ların yaklaşık %35'inde çeşitli genlerin promotor bölgelerinde metilasyonlar izlenmekte ve CIMP üzerinden gelişen tümörlerde MSS ile MSI, TP53, KRAS ve BRAF mutasyonları da izlenebilmektedir (Hamilton ve ark., 2010; Toyota et al., 2000).

KRK'ların yaklaşık %90'ı sporadiktir ve yaklaşık %10'unda genetik sendromlar rol alır (Fleming ve ark., 2012; Nagtegaal ve ark., 2020; Yang, 1999). Her iki durumdaki KRK'larda kanser gelişimi 2 temel mekanizmaya dayanır (Nagtegaal et al., 2020);

✓ Konvansiyonel adenom-karsinom sekans yolağı

- ✓ Serrated neoplazi-karsinom yolağı (hipermutant veya ultramutant yolak)

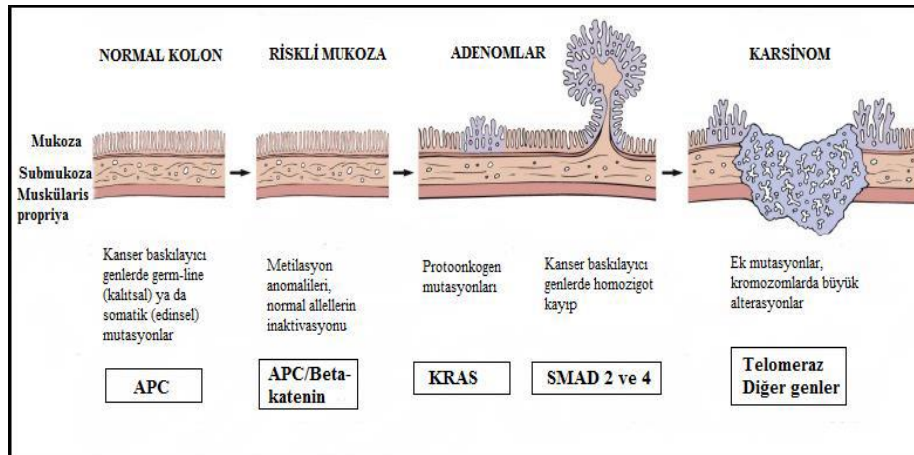
KRK'ların yaklaşık %85'i ilk yolak üzerinden gelişir. Bu mekanizmada konvansiyonel adenomlar 10-20 yıl süre içinde karsinoma dönüşmeye başlar (Baran ve ark., 2018; Roncucci ve ark., 1998). KRK'ların yaklaşık %15'i ise 2. Yolakta kaynaklanır (Nagtegaal ve ark., 2020). Serrated lezyonların karsinoma progresyon riski, konvansiyonel adenomlardan oldukça düşüktür (Baran ve ark., 2018).

2.9.1. Konvansiyonel adenom-karsinom sekans yolağı

Normal kolon epitelinin sırasıyla adenoma, invaziv ve metastatik karsinoma dönüşümünün gerçekleştiği çok basamaklı genetik değişikliklerin olduğu yolaktır. Bu yolda en sık görülen ve en karakteristik gen değişiklikleri;

- Kromozomal instabilite yolağı genleri; TP53, APC, KRAS, SMAD4 ve PIK3CA, vakaların %84'ü),
- Mismatch tamir genlerindeki değişiklikler (mikrosatellit instabilite hipermutant yolağı, vakaların %13'ü)
- POLE (DNA polimeraz epsilon; ultramutant yolak, vakaların %3'ü) olarak tanımlanmıştır (Nagtegaal ve ark., 2020) (Şekil 2.2).

Aberran kript odağı, tek bir adet ya da 200 veya daha fazla kriptten oluşabilir (Baran Y, 2018; Inokuchi ve ark., 2017). Burada gerçekleşen APC gen değişiklikleri, adenom gelişimini uyaran en erken değişikliktir. Konvansiyonel adenom-karsinomun sekans yolağının %80'inde tespit edilmiştir (Nagtegaal ve ark., 2020).



Şekil 2.2. Konvansiyonel adenom-karsinom sekans yolağında gözlenen morfolojik ve moleküler değişimlerin şeması (Kumar ve ark., 2015 kaynağından alıntılanmıştır.)

APC normalde intrasitoplazmik β -katenini parçalayıp, hücre içindeki seviyelerini dengeler. APC proteinindeki mutasyon olursa, β -katenin parçalanamaz ve dolayısıyla sitoplazmadaki miktarı yükselir. Bunun sonucunda fazla β -katenin sitoplazmadan nükleusa geçip burada birikir. Nükleusta artan β -katenin ise WNT yolağı üzerinden etkiyerek büyüme sinyalini başlatır (Akyol, 2014; Nagtegaal ve ark., 2020). Normal koşullarda inaktif halde bulunan KRAS proteini, bu mutasyona sekonder aktif halde sabit kalır ve Mitojen-aktif protein (MAPK) arayolu üzerinden mitozu indükler. KRAS aynı zamanda PI3K ile ilişkili apoptoz-baskılayıcı yolağı uyararak da karsinom gelişimine destek olur. PI3K aktivasyonu PIK3CA veya PTEN gen mutasyonları sonucunda da ortaya çıkabilir. %60-70 KKK vakasında, adenomdan karsinom gelişiminin ilerleyen ve SMAD 4 burada rol alan SMAD genleridir. Olguların çoğunda (%60), SMAD 4 geni delesyon ile inaktivasyona uğrayarak, TGF- β inhibitör yolağındaki sinyalleri azaltıp karsinom gelişimine yol açar.

KKK'ların %60'ında adenomdan karsinom gelişiminin geç basamaklarında ise p53'ü kodlayan, ayrıca bir tümör süpresör gen olan, TP53'de de mutasyon gerçekleşir. (Nagtegaal ve ark., 2020). Alternatif bir yol olarak da tümör süpresör genler, normal metilasyonlarını kaybederken, içerdikleri CpG zengin zonun ya da CpG adacıklarının metilasyonu sonucu susturulabilirler (Kumar ve ark., 2015).

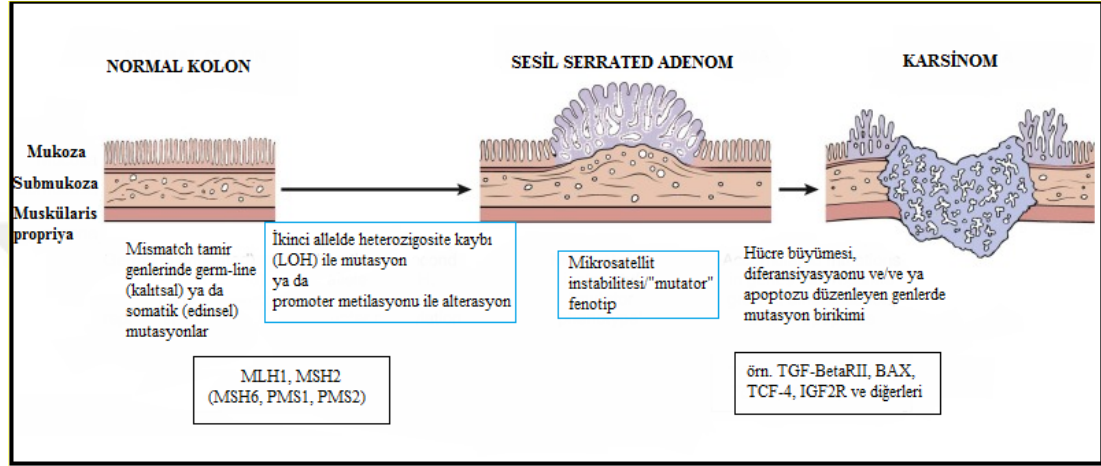
2.9.2. Serrated neoplazi-karsinom yolağı

Konvansiyonel adenomdan karsinom gelişimi yolağındaki gibi bu yolda da genetik değişikliklerin birikimi söz konusudur. Sadace mutasyonların gerçekleştiği genler değişiktir (Şekil 2.3). Serrated neoplazi-karsinom yolağı, temelde DNA mismatch tamir (MMR) genlerindeki mutasyonlardan etkilenirler. DNA MMR genlerinin kaybı sonucu MSI gelişir. Bu nedenle KKK'la sonuçlanan bu yol, MSI yolağı olarak adlandırılmıştır. Bu yolağın prekürsör lezyonları sıklıkla BRAF ile, daha nadiren KRAS aktive edici mutasyonlarla ve CIMP ile ilişkilidir. (Kumar ve ark., 2015).

2.10. Kolorektal Karsinomanın Moleküler Temeli

İnsan genomundaki genlerin %20'si sinyal iletiminde görevli proteinleri kodlar (Blume-Jensen ve Hunter, 2001). Bu proteinler arasında hücre membran reseptörleri, G-proteinler ve sinyal iletiminde görev alan enzimler bulunur. Ayrıca sinyal iletimi sırasında protein kinazlar, protein fosforilasyonunu böylece aktivasyonunu sağlarlar.

Protein kinazlar, membranda yerleşim gösteren reseptör tirozin kinazlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olarak 2 temel grupta incelenir. Bu proteinler, katalitik özelliklerine göre de serin/treonin ve tirozin kinazlar olarak sınıflandırılır. Reseptör tirozin kinaz (RTK) süper ailesinde aralarında, insülin reseptörü, Efrin (EphA, EphB) ve büyüme faktör (VEGF, EGF, PDGF, FGF, NGF) reseptörlerinin de yer aldığı, 58 transmembran protein bulunmaktadır (Pawson, 2002).



Şekil 2.3. Serrated neoplazi-karsinom yolağında görülen morfolojik ve moleküler değişimler ile bu yolağın mismatch tamir genleri ile ilişkisi (Kumar, Abbas, Aster, 2015 kaynağından alıntılanmıştır.)

RTK'ların, sitoplazmik bölgelerinde aktivasyondan sorumlu tirozin kinaz bölgeleri bulunur. İstirahat halindeki normal bir kolon hücresinde RTK'nın aktif ve inaktif formları denge halindedir. RTK reseptörleri, büyüme faktörleri ile (örneğin: EGFR) bağlanınca aktif hale geçer ve intrasitoplazmik hedef proteinleri ile etkileşerek RAS sinyal iletim arayolunu başlatırlar. Yani RTK aktivasyonu, reseptörün kendi kendine gerçekleştirdiği fosforilasyon ile başlar. İkinci aşamada, fosforile olan bu bölgelere bir takım adaptör protein bağlanır ve uyarı hücre içine iletilmiş olur. Adaptör proteinler, ortak yapısal özellikleri olan SH2 (Src-homology-2) bölgeleriyle reseptöre bağlanıp, RTK ile sitoplazmada yerleşen efektör proteinler arasında köprü görevi sürdürür. RAS proteinleri sayesinde de farklı iki sinyal iletim ara yolu başlatılır. Ara yollardan ilki, RAS ile aktive olan RAF'ın aktive ettiği MAPK ara yoludur. İkincisi ise, fosfotidil inozitol 3 kinaz (PI3K) proteini ile aktive olan PDK1-AKT sinyal ara yoludur. Bu iki ara yol, ekstrasellüler sinyalleri; büyüme, migrasyon, diferansiyasyon, proliferasyon

ve apoptoz gibi temel hücre olgularını kontrol eden mekanizmaya ileten kaskadlardır. Bu nedenle, bu ara yollarda görev alan proteinlerin moleküler aberasyonları, kanser gelişimi ve ilerlemesinde önemli sorumluluklar üstlenmektedirler.

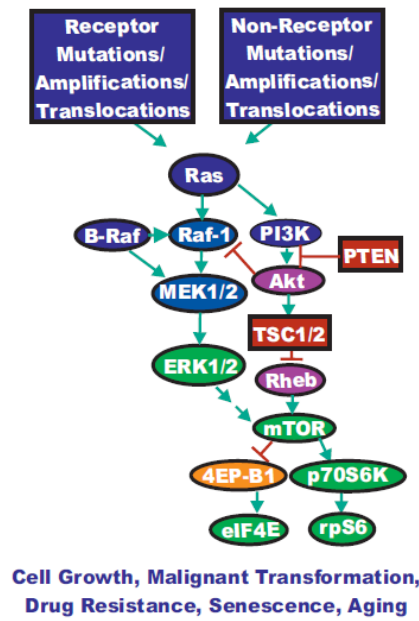
Karsinogenez sürecinde ise, RTK aktivitesi sürekli ve kontrolsüzdür, RAS sürekli aktif kalır ve sinyal üretimi sürekli hale gelir (Blume-Jensen ve Hunter, 2001; Tannapfel ve ark., 2010). PI3K ve RAS arayollarının komplementer ya da paralel olarak çalıştıklarından dolayı optimal tedavi yanıtı için her iki arayolun inhibisyonunun sağlanması gerektiği düşünülmektedir (Chappell ve ark., 2011).

2.10.1. RAS genleri

GTPaz ile ilgili protein ailesinden bir proteindir. Bu onkogenlerin mutasyonları, insan kanserlerinde en yaygın olan mutasyonlar arasındadır. RAS onkogeni, hücre membranının iç yüzeyinde lokalize olup, monomeriktir. RAS ailesi, 3 proteinden oluşur: KRAS, NRAS ve HRAS. RAS ailesi proteinleri, büyüme faktörlerinin hücre yüzeyinde yerleşim gösteren spesifik serin/treonin kinaz reseptörlerine bağlanmasının ardından, hücre içi sinyal iletiminde görev alır (Şekil 2.4.). İnaktif durumdaki RAS proteini, guanozin difosfat (GDP) ile bağlı haldedir. Büyüme faktörleri ya da başka reseptör ligandları ile etkileşime girerek fosforile edilir. Bunun sonucunda guanozin trifosfat (GTP) ile bağlanarak aktifleşir. Aktive olan RAS ise kinaz (MAPK) ara yolunu aktive ederek, nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu sağlar. Böylece mitoz kolaylaşır. RAS proteinleri ayrıca RAF/MEK/ERK sinyal kaskadını da aktive ederek, hücre bölünmesi ve büyümesine aracılık eder. Bunun yanı sıra, PI3K/AKT/mTOR yolağını da aktivasyonunu sağlar. Normal hücrede, intrinsek GTPaz aktivitesi ile, GTP GDP'ye hidrolize olur ve RAS yeniden inaktif duruma gelir.

Bir RAS gen ailesi üyesi olan KRAS, 21 kD ağırlığında GTP bağlı küçük bir proteini kodlayıp, hücreye gelen sinyalleri aktive durumdaki yüzey reseptörlerinden nükleusa transferini sağlar. KRAS ve NRAS genlerinde 12, 13, 59, 61 gibi kodonlar bulunmaktadır. Uluslararası kılavuzlar, bu kodonların ve ek olarak yine bu gen kodonları olan kodon 117 ve 146'nın analizini tavsiye etmektedir. Çünkü bunlar genellikle EGFR'nin (HER-1) ekstrasellüler domainini hedefleyen monoklonal antikorlara direnç ile ilişkilidir. Setuksimab ve panitumumab bu antikorların önde gelen örneklerindendir ve EGFR dimerizasyonunu takip eden onkojenik sinyal

yollarını önler (Silvestris ve ark., 2009). KRK'ların yaklaşık %30–40'ında yapısal KRAS aktivasyonu izlenir ve bu EGFR yolağının aktive olmasında önemli görevler gören, çoğunlukla ekzon 2'nin 12 ve 13. kodonlarında görülen, nokta mutasyonları sonucunda ortaya çıkar (Frans En ve ark., 2004). KRAS mutasyonları, HP'lerin ve aberan kript odaklarının çoğunda gözlenir (Chan et al., 2003; Pretlow, 2005). Adenomatöz poliplerde, KRAS mutasyon oranı, lezyonun büyüklüğü ve displazi derecesiyle koreledir; eğer adenom 1 cm.'den küçükse, KRAS mutasyonu görülme oranı yaklaşık %10 oranında iken, büyük olanlarda %40-50'dır (Vogelstein et al., 2010). Son yıllarda mikrosatellit stabil olup KRAS mutasyonu bulunduran KRK'larda az diferansiye olma eğiliminin olduğu bildirilmiştir (Haigis ve ark., 2008). KRAS genindeki bir mutasyon hücreler arası bağlantıyı bozduğundan, epitelyal hücre polaritesini de düzenlediği saptanmıştır (Smakman ve ark., 2005).



Şekil 2.4. RAS sinyal iletiminde yer alan “down stream” moleküller ve rolleri (Kang ve ark., 2005 kaynağından alıntı yapılmıştır)

2.10.2. RAF genleri

A-RAF, B-RAF ve C-RAF'tan (Raf-1) oluşan RAF gen ailesinden BRAF geni, 7q34 üzerinde lokalizedir ve 18 ekzondan oluşur. BRAF geni, MAPK arayolunda rol oynayan serin/treonin kinaz aktivitesi gösteren, bir proteini kodlayarak, KRAS gibi hücre bölünmesi, hücre içi sinyal iletimi ve sekresyonların kontrolü açısından önemli

fonksiyonlar üstlenir. Konjenital BRAF mutasyonları, kardiyo-fasiyo-kutanöz sendromların oluşmasına, kazanılmış mutasyonlar ise, KRK'lar, melanoma ve tiroid karsinomaları gelişimine neden olmaktadır (Tannapfel ve ark., 2010). Mutasyonlar, en sık V600E'de gözlenir ve prognozu kötü etkiler. BRAF, KRAS üzerinden etkisini göstererek hücre bölünmesini kontrol eder. Bunu yaparken MEK1 ve MEK2 gibi MAPK efektörlerinde aktivasyona neden olan bir protein kinazı kodlamaktadır. BRAF gen mutasyonları, KRK'ların yaklaşık %5-10'unda gözlenir (Rajagopalan ve ark., 2002). BRAF mutasyonu pozitif olan tümörler, KRAS mutasyonu bulunduran tümörlerden histomorfolojik ve klinik seyir bakımından farklıdır (Roock ve ark., 2011). Bununla birlikte, KRK'daki BRAF mutasyonlarının düşük prevalansına bağlı olarak, şu anda daha az kesin olsa da, birkaç çalışma BRAF pV600E somatik gen mutasyonlarına sahip hastaların, metastatik KRK'lı hastalarda kullanılan monoklonal antikorlar olan, cetuximab ile panitumumab gibi anti-EGFR tedavilerine karşı direnç gelişimi bildirmiştir. Klinik olarak bu durum terapötik karar verme sürecinde yararlanılabilir (Nagtegaal et al., 2020).

2.10.3. Kromozomal instabilite genleri

Sporadik KRK'ların yaklaşık %75'i ve Lynch Sendromu harici herediter geçişli KRK'ların büyük bir çoğunluğu bu ara yolu kullanarak gelişir. WNT ile ilişkilidir. APC/ β catenin yolağı ya da adenom-karsinom sekansı olarak da bilinir. Bu arayol üzerinden gelişen kanserlerde kromozomun geniş bir segmentinde delesyon veya duplikasyonlar, anöploid karyotip gibi büyük kromozom anormallikleri izlenir (Cho ve Vogelstein, 1992). Oluşan tümörlerde %90 üstü oranda APC, %50 oranda KRAS, %70 oranda ise TP53 mutasyonu bulunur (Rosai ve Ackerman, 2011). APC'deki bi-allellik inaktivasyonunu takiben, KRAS, TP53 ve DCC genlerinde mutasyonlar izlenir. Çeşitli tümör süpressör genler ve onkogenlerde izlenen seri mutasyonların birikimi sonucu oluşan, tümör supresör genlerde heterozigosite kaybı, yaygın metilasyon kaybı nedeniyle, kolonun fokal epitel proliferasyonunu takiben küçük adenomların gelişimi görülür. Bu küçük adenomlar zamanla büyür, daha displazik hale gelir ve sonuçta invaziv kanser gelişir (Turner ve ark., 2010).

2.10.4. Mikrosatellit instabilite

Sporadik KRK'ların yaklaşık %15'i ile Lynch Sendromlu hastalarda gözlenen KRK

vakalarının tamamı MSI arayolu üzerinden gelişir (Chan ve ark., 2005; Hamelin ve ark., 2008; Ferlay ve ark., 2013). DNA “mismatch” onarım genlerindeki inaktivasyon sonucunda onarımın bozularak KRK oluşma süreci başlar. İnsandaki “mismatch” onarım genleri; MLH1, PMS1, PMS2, MSH2 ve MSH6’dır. Bu genlerden birinde ortaya çıkan kalıtsal (germline) mutasyonlar, DNA onarımını etkileyip Lynch sendromunun gelişmesine neden olurlar. DNA replikasyonu sırasında insersiyonlar ya da delesyonlar sebebiyle, hatalı dizilim oluşturmaya eğilimli nükleotid tekrarlarına mikrosatellit denir. “Mismatch” onarımı, genellikle bu hatalı dizilimleri düzeltir. Böylece mikrosatellitlerin ilk uzunluklarında kalmalarını sağlar. Bu tamir mekanizması bozulursa, insersiyon ya da delesyon dizilerinde bozukluk varken replikasyon devam edeceğinden, değişen uzunluklarda çok sayıda allelin yaygın alterasyonu ile karakterli MSI gelişir. Yani MSI, hatalı DNA mismatch onarımının moleküler belirteçidir. İnsan genomunda fizyolojik olarak, yaklaşık 50.000-100.000 mikrosatellit vardır. Ancak mikrosatellit dizilerinin çoğu intron olarak adlandırılan, genlerin kodlanmayan bölgelerinde bulunur ve bu sebepten dolayı, bu genlerdeki mutasyonlar çoğunlukla bir probleme yol açmaz. Bununla birlikte, Tip II TGF- β reseptörü ile BAX gibi bazı mikrosatellit dizileri genlerin kodlanan bölümlerinde ya da hücre çoğalmasının düzenlenmesinde görevli genlerin promotor bölgelerinde yer almaktadır. TGF- β sinyali kolondaki epitel hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder. BAX geni ise apoptoza yol açar. “Mismatch” tamir bozukluğunda, bu genlerde ve çoğalmayı düzenleyen diğer genlerde mutasyonlar artar. Böylece KRK gelişimine neden olurlar (Kumar ve ark., 2008).

MSI durumu, Bethesda paneli olarak adlandırılan değişik büyüklükteki, 5 adet mononükleotid ve dinükleotid tekrar dizilerinin (D17S250, D5S346, D2S123, BAT25, BAT26) varlığına göre sınıflandırılır (Boland ve ark., 1998; Ferlay ve ark., 2013; Sinn ve ark., 2009). KRK’lar bu mikrosatellit instabilitesinin sıklığı bakımından; mikrosatellit stabil (MSS), mikrosatellit instabil, “high” (MSI-H), mikrosatellit instabil- “low” (MSI-L) olmak üzere 3 gruba ayrılır. MSI-H, yukarıdaki beş mikrosatellit belirteciden en az ikisinde değişiklik meydana gelmesine denir. Sporadik MSI-H KRK’larda, Lynch sendromunda görülenlere göre daha büyük mikrosatellit değişiklikleri görülür. Mikrosatellit stabil tümörlerde Bethesda panelindeki instabiliteler izlenmemektedir. MMR proteininde nükleer ekspresyon

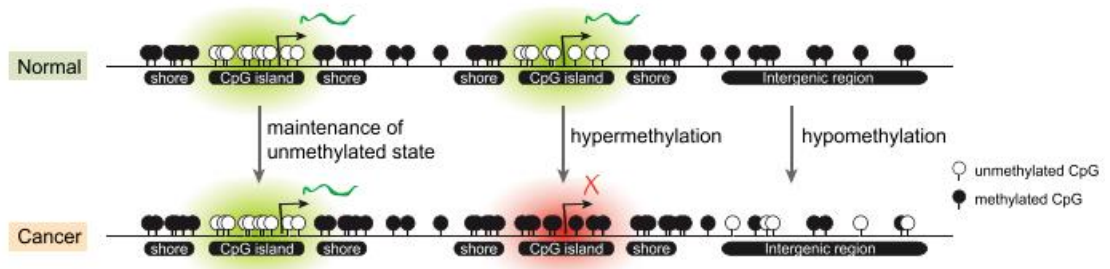
kaybı yoktur, MMR genleri intakttır. Bu paneldeki belirteçlerden sadece birinde veya birden fazlasında ancak totalin %40'ını geçmeyen bozukluklar bulunduran tümörler MSI-L olarak isimlendirilir. MSS tümörlerin klinikopatolojik özellikler ve birçok genetik profili, MSI-L ile benzer, MSI-H tümörlerinkinden ise oldukça farklıdır. Şu anda, klinik araştırmalar MSS-L ve MSS'yi tek tür olarak sınıflandırma eğilimindedir. Sporadik MSI-H KRK'lar çoğunlukla MMR geni MLH1'in epigenetik susturulmasından kaynaklanır. MSI-H tümörlerinin aksine, MSI-L tümörler, MSS tümörlerine benzer şekilde kromozomal instabilite karsinogenez yolu ile ortaya çıkıyor gibi görünmektedir. Ancak MSI-L grubunun gerçekten varlığı konusunda tartışmalar devam etmektedir (Li ve ark., 2020).

Sporadik ya da Lynch sendromuyla ilişkili MSI-H tümörlerin, kromozomal instabilite arayoluyla gelişen tümörlerden morfolojik olarak farklılıkları bulunmaktadır. Bu tümörler, müsinöz veya bazen medüller histolojide ve daha çok sağ kolon lokalizasyonunda yerleşimli tümörlerdir. Crohn hastalığı benzeri lenfositik infiltrasyonu peritümöral ve intramural olarak sıklıkla bulundurlar. Kirli nekroz içermez ve ekspansif büyüme gösterirler. Evreleri daha düşük, prognozları daha iyi olan tümörlerdir (Ferlay ve ark., 2013; Gatalica ve Torlakovic, 2008; Jenkins ve ark., 2007).

2.10.5. “CpG” ada metilatör fenotip (CIMP)

Normal koşullarda DNA'nın bazı fonksiyonlarının korunmasında, kronik inflamasyon ve hasara bağlı hücre yaşlanmasında CpG adalarında metilasyon izlenir. Ancak DNA metilasyonu karsinogenezde instabilite ile ilişkili anormal epigenetik bir yoldur (Raica ve ark., 2011). Çoğu genin, promotor bölgelerinde, sitozin ve guanin dinükleotidlerinde zengin “CpG” adaları olarak adlandırılan bölümler bulunur. Bu sitozin kalıntılarının metilasyonu, p16 (CDKN2A) ile MLH1 gibi DNA tamir genlerinde ve IGF-2 gibi tümör supresör genlerde, kromozomal yapıda değişikliğe sebep olur. Böylece mutasyon olmaksızın, gen ekspresyonunu baskılayarak fonksiyon kaybı oluşturur (Şekil 2.5). CIMP üzerinden meydana gelen tümörlerin %50'den fazlası MSS tümörlerdir. Ancak birazdan bahsedileceği gibi MMR genlerinde metilasyon olursa, MSI tümörler de izlenebilir ve TP53, KRAS ve BRAF mutasyonları da görülebilir. Çok sayıda MSI-H ve BRAF mutasyonlu tümörler CIMP 1; oldukça

fazla miktarda KRAS mutasyonu içeren CIMP tümörler ve MSS tümörler ise CIMP 2 olarak isimlendirilir (Hamilton ve ark., 2010). Bu tipteki çoğu tümörde, BRAF gen aktivasyonuna yol açan bir mutasyon, karsinogenezin başlamasına neden olan esas olaydır ve kolon epitel hücrelerinde fizyolojik olarak görülen apoptozun inhibisyonu ile sonuçlanır. Sonuç olarak ortaya çıkan hiperplastik veya “serrated” lezyonlarda, genlerin çoğunda, promotor metilasyonu izlenir.



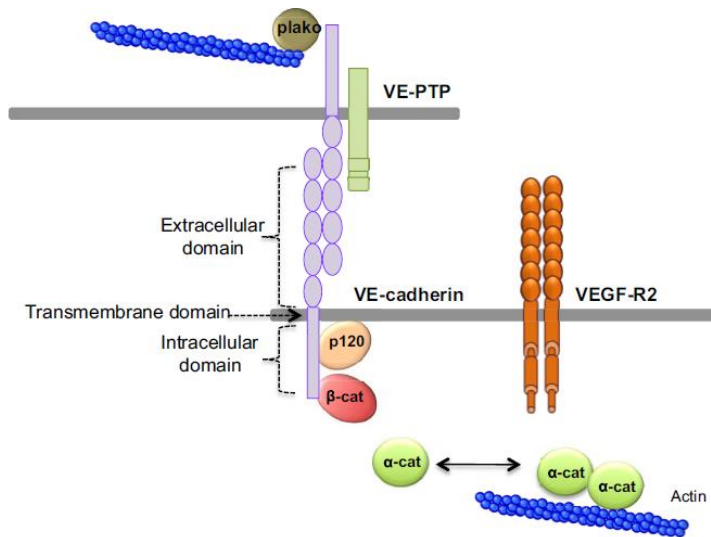
Şekil 2.5. Kanserde promotör CpG adası hipermetilasyonu (Skvortsova ve ark., 2020 kaynağından alıntılanmıştır.)

Bu genlerin herhangi birinde indirekt inaktivasyonu (“epigenetic silencing”) indükleyebilmektedir. Bu olgularda, MLH1 promotor metilasyonu sıkça görülür. Sonuçta, MSI sporadik karsinom gelişimi görülür ve Lynch sendromunda izlendiği gibi, hızla gelişen çok sayıda ek mutasyonlar, hızlı tümör progresyonuna neden olur (Perea ve ark., 2011).

2.11. VE- KADERİN (CDH5/ CD144)

Kadherinler, hücre-hücre yapışmasından ve normal mimarisinin korunmasından sorumlu transmembran glikoproteinlerdir. Doku homeostazında ve disfonksiyonunda önemli rol oynarlar (Colás-Algora ve Millán, 2019; Oda ve Takeichi, 2011; Shapiro ve Weis, 2009). Kadherinler, kateninlerle birlikte, aktin hücre iskeleti ile adherens junctionlar aracılığıyla etkileşime girer ve embriyonik gelişim sırasında olduğu kadar neoplastik dönüşüm ve ilerleme sırasında da hücresel süreçleri düzenlerler. Kanserde, hücre-hücre ve hücre-matriks yapışmasındaki herhangi bir bozukluk, tümörün ilerlemesi ile ilişkilidir. Ek olarak kanserli hücrelerin daha hareketli hale gelmesine, vasküler invazyona, hücre dışı matrisin bozulmasına ve uzak metastaz oluşturmaya olanak tanır (Sousa ve ark., 2019; Tanaka ve ark., 2012). Vasküler endotelial hücreler,

kaderin süper ailesinin çeşitli üyelerini, özellikle endotelial adherens bağlantılarının ana adezyon reseptörü ve majör transmembran proteini olan VEK'ı eksprese ederler. VEK, vasküler bütünlükte bariyer görevi görür ve endotel hücreleri tübüler yapılara bağlar (Delgado-Bellido ve ark., 2019; Hendrix ve ark., 2001). Adherens (AJ) ve sıkı (TJ) bağlantılar ile bariyerin kısıtlayıcılığını korurken, boşluk bağlantıları bitişik endotel hücrelerini birbirine bağlar. VEK'ın hücre içi alanı, VEK membran tutulmasına katılan p120-katenin (p120) ve b-katenin (b-cat) bağlanır. Aktin hücre iskeleti, a-katenin (a-cat) veya plakoglobin (plako) yoluyla VEK'e bağlanır (Şekil 2.6). VEGF-A ise adherens bağlantıları ve sıkı bağlantıları zayıflatarak vasküler geçirgenliği artırır ve endotelial hücre-hücre temaslarının geçici olarak açılmasına neden olur (Gavard ve Gutkind., 2006). Aslında, VEGF-A, β -katenin, plakoglobin ve p120, Src'ye bağlı mekanizma yoluyla VEK'nin tirozin fosforilasyonunu ve farklı ortaklara bağlanmasını destekler (Eliceiri ve ark., 1999). VEK/p120-katenin stabilitesi EC bağlantılarını güçlendirmek için gerekliken, yüksek pVEK'nin varlığı kanser hücrelerine ek bir plastisite kazandırır ve tümör ile endotel hücreler arasındaki bağlantıyı sağlar (Delgado-Bellido ve ark., 2019). Endotel hücre temaslarının sürdürülmesi ve kontrolü için E-kaderinin ana belirleyicisi rolüne benzer şekilde, VEK endotel hücre-hücre adezyonu sürdürülmesi, kontakt inhibisyonu ile kontrolü için hayati önem gösterir.



Şekil 2.6. VE-Kaderin yapışkan kompleksi (Azzi ve ark., 2013 kaynağından alıntılanmıştır.)

VEK aracılı adezyonu düzenleyen mekanizmalar, vasküler geçirgenliğin, vasküler permeabilitenin kontrolünde, endotelden tümör göçünün inhibisyonunda çevre doku arasındaki bariyer formasyonunda ve lökosit ekstrasvazasyonunun kontrolünde önemlidir. Adezyon fonksiyonuna ek olarak hücre proliferasyonu, apoptoz (VEGFR uyarılarını destekleyerek) gibi çeşitli hücre içi süreçleri düzenler (Cavallaro ve ark., 2006; Vestweber, 2008). Kanser hücrelerinin endotelial transdiferansiyasyonu sırasında VEK, “endotelial anahtar” olarak tanımlanır. Çünkü VEK içermeyen tümör hücreleri tüp benzeri yapı (VT) oluşturamaz. Bir çalışmada EMT markırı olan VEK, EphA2 ve VEGFR ile VT formasyonunun ilişkili olduğu belirtilmiş (Wang ve ark., 2008), Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise VT’in; VEK, matriks metalloproteinazları (MMPs) ve Efrin TipA reseptörü 2 (Epha2) tarafından düzenlendiği ve EMT’da rol oynadığı konfirme edilmiştir (Yang ve ark., 2013).

VT varlığı, yüksek tümör derecesi, kısa sağkalım, invazyon ve metastaz ile ilişkilidir. VEK normal epitelde ifade edilmezken, VT ile ilişkili belirli kanser tiplerinde VEK anormal ekstrasvasküler ekspresyonu gözlenmiştir. Örneğin; agresif olmayan uveal melanom hücre çizgisi VEK’i ifade etmezken, oldukça agresif hücre çizgileri MUM 2B (uveal) ve C8161 (kutanöz) yüksek seviyelerde VEK eksprese ettiği gözlenmiştir (Delgado-Bellido ve ark., 2019; Hendrix ve ark., 2001), bir çalışmada ise VEK geninin inaktivasyonunun veya VEK’in sitoplazmik alanının kesilmesinin, vasküler yetmezlik nedeniyle embriyonik dönemde öldürücü olduğu gösterilmiştir (Carmeliet ve ark., 2011). Murin embriyonik kök hücrelerinde VEK geni boş mutasyonları, embriyonik gövdelerde organize damar sistemi olmayan dağınık bir endoteliuma yol açtığı bildirilmiştir (Vittet ve ark., 1997). Başka bir çalışmada ise VEK’in silinmesi veya sitozolik kesilmesinin, vasküler ağların yeniden şekillenmesini ve olgunlaşmasını bozduğu bulunmuştur (Luo ve Radice, 2005; Giannotta ve ark., 2013). Sonuç olarak; VEK, embriyogenez, anjiogenez, vasküler bakım ve yaralanmadan sonra vasküler bütünlüğün restorasyonu, tümör invazyon ve metastazı sürecinde esas moleküldür. (Cavallaro ve ark., 2006; Gentil-dit-Maurin ve ark., 2010; Mao ve ark., 2013). Ayrıca VEK hem anjiyogenezde hem de tümör vaskülogenezinde rol oynadığından, tümör beslemesini engellemeyi amaçlayan antitümör tedavilerinin geliştirilmesinde iki sürecin de dikkate alınması gerekir. Son 5 yıl içinde, gastrik karsinomlar, küçük hücre dışı akciğer karsinomları, metastatik meme karsinomları, melanomlar, gliomalar ve

KRK'larda yapılan çalışmalarda VEK'in özellikle VT süreci sonucu kanser progresyonunda anahtar rol oynadığı gözlenmektedir.

Yin ve arkadaşlarının Grade 3 gastrik kanserli olgularda yaptığı bir çalışmada yüksek VEK ve düşük VEK ekspresyonu gösteren hastalar arasında, sağkalım ve ölüm oranları, tümör evresi, vasküler infiltrasyon, Ca19.9 sayısı, tümör infiltrasyonu açısından istatistiksel olarak farklılık görülmüştür. Yine aynı çalışmada düşük dereceli adenokarsinomda, TNM evreleme sisteminin nod (N) evresi N3 olan vakalarda VEK daha yüksek ekspresyon göstermiştir (Yin ve ark., 2020). Ayrıca, meme kanseri hücrelerinin, VEK'in fosforilasyonunu indükleyerek ve TGF- β sinyalini uyararak, endotelial yapışma bağlantılarının bozulmasına neden olduğu böylece tümör hücresi proliferasyonunu ve invazyonunu desteklediği gösterilmiştir (Labelle ve ark., 2008; Haidari ve ark., 2012; Rezaei ve ark., 2012)

Kim ve arkadaşlarının melanomlar üzerinde yaptığı çalışmada ise esas olarak endotel hücrelerinde VEK ekspresyonu bulunmuş, VEK'in, Vasküler Sızıntı Sendromu özelliklerine sahip olduğu belirlenmiştir (Kim ve ark., 2014). Başka bir çalışmada melanom hücrelerinde VEK gen ya da protein ekspresyonu, agresif tümör tiplerinde daha güçlü eksprese edilirken, non-agresif tümör tiplerinde VEK ekspresyonunda down-regülasyon görülmüştür (Hendrix ve ark., 2001). Glioma hücrelerinde VEK mRNA seviyesi, daha agresif tümör davranışı ve kötü sağkalımla ilişkili bulunmuş, VEK'in devreden çıkarılması özellikle hipoksi varlığında VT'i inhibe etmiştir (Mao ve ark., 2013). Yine gliomalar ve epitelooid tümörlerde yapılan çalışmalarda, fare modellerinde monoklonal antikorlarla VEK fonksiyonunu bloke etmenin, mikrodamar geçirgenliğinde bir artışa yol açarak veya VEK aracılı hücre-hücre adezyonunu bozulması ile adherens junction oluşumunun inhibisyonundan kaynaklanan yeni vasküler yapıların birleşmesini bozarak tümör anjiogenezini ve büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Corada ve ark., 2002; Liao ve ark., 2000).

Bunların yanında birçok onkojenik sinyal yolu, kaderin hücre-hücre adezyonunu değiştirir. En yaygın olarak açıklananlar, siklin kinaz inhibitörü p27 aracılı sinyalizasyon, MAPK, Ras, Rac1 sinyalizasyonları, PI3K/AKT ve Hippo sinyallemidir (Kaszak ve ark., 2020). Bu nedenle EMT'yi düzenleyen sinyal yollarından olan RAS/RAF ve PI3K yolağı onkoproteinleri ile VEK ilişkili olabileceği

düşünülmüştür. Ancak VEK veya EphA2'nin PI3K'yı hücre zarına alan reseptör olarak görev görüp görmediği açık henüz değildir (Hendrix ve ark., 2001).

2.12. C-ERB-B2 (HER-2)

HER-2 (ERBB2, Cerb-B2) kromozom 17q21'de bulunur ve 185 kD'luk bir transmembran proteini kodlar (Reymond ve ark., 2013). Ayrıca EGFR (ERBB1), HER3 (ERBB3) ile HER4 (ERBB4) içeren membrana bağlı reseptörlerden oluşan ERBB reseptör tirozin kinaz (RTK'ler) ailesinin bir üyesidir. Bu RTK'lar, özellikle RAS/RAF/MEK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR yolları olmak üzere birden fazla aşağı akış sinyal yolunu yönetir ve hem normal biyolojide hem de onkogeneizde temel ve çeşitli roller oynar. ERBB ailesi üyelerinin kendisinde veya ERBB ailesi RTK'ları tarafından yönlendirilen aşağı akış sinyal yollarının temel bileşenlerinde meydana gelen değişikliklerin, çok çeşitli malignitelerde en yaygın onkojenik etkenlerden bazıları olduğu açıkça ortaya çıkmıştır (Bailey ve ark., 2018). Bu kanserde proliferasyonu ve malign fenotipi destekleyen anahtar bir mekanizmadır.

Yaygın tümör tipleri arasında, ERBB2 amplifikasyon oranları meme kanserinde yaklaşık %15 ila %20 ve gastroözofageal kanserde %7 ila %38'dir (Cancer Genome Atlas Network, 2012,2014,2017). Gastroözofageal kanserde, ERBB2 amplifikasyonu ayrıca prognostik önem taşır ve ERBB2'yi hedef alan bir monoklonal antikor olan trastuzumab'a yanıtı tahmin eder. Ek olarak, ERBB2 amplifikasyonu, akciğer adenokarsinomu gibi tümörlerde daha düşük bir oranda ve tükürük kanalı karsinomu gibi birkaç nadir tümör tipinde daha yüksek bir sıklıkta prognoz ve prediktiviteyi değerlendiren çalışmalarda tanımlanmıştır (Kim ve ark., 2017; Thorpe ve ark., 2017).

İn vitro ve in vivo kanıtların artması, HER-2'nin EGFR'ye bağımlı (tümü wild tip) tümörleri olan olgularda daha sık aşırı eksprese edilebileceğini düşündürmektedir (Richman ve ark., 2016). HER-2 proteini, EGFR inhibisyonuna direnç mekanizmasıdır. Ayrıca, bu protein, kazanılmış EGFR inhibitör direncinde yukarı regüle edilebilir ve buna eşlik eden HER-2 blokajı sinerjik bir şekilde etkinliği artırabilir ve aktiviteyi uzatabilir (Schuell ve ark., 2006). EGFR, yıllarca KRK'da önemli bir patojenik yüzey reseptörü olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, kanıtlanmış klinik yararı ile KRAS, NRAS ve BRAF için wild-tip hasta popülasyonu içinde KRK'da geçerli bir hedef olmaya devam etmektedir (Adams ve ark., 2018). HER-2

amplifikasyonu da KRK'larda ilgili bir genetik değişikliktir. Bu biyobelirtecın KRAS-wild tip KRK'lı hastalarda görölme sıklığı yaklaşık %5'tir (Siena ve ark., 2018). Seo ve ark. klinikopatolojik değişkenler ve HER-2 durumu arasındaki farklı korelasyonlar araştırılmıştır. HER-2'nin aşırı ekspresyonu, cinsiyet ve MSI ile ilişkili değildi ancak derin invazyon, lenfatik metastazlar, uzak metastazlar, perinöral invazyonun varlığı ve rektumdaki en yüksek insidans olması ile distal kolon yerleşimi gibi agresif bir tümör davranışı ile ilişkili olarak bulunmuştur (Ingold Heppner ve ark., 2014; Missiaglia ve ark., 2014; Seo ve ark., 2014). HER-2, anti-EGFR terapiler için öngörücü bir faktör olabilir. İki retrospektif klinik seri, HER-2 sinyal aktivasyonunun setuksimab direncini belirleyebileceği fikrini desteklemektedir (Bertotti ve ark., 2011; Martin ve ark., 2013; Nam Seo ve ark., 2016; Yonesaka ve ark., 2011).

Anti-EGFR tedavisi ile medyan RAS aracılı sinyal iletimi, HER-2 amplifikasyonu olan ve olmayan hastalar kıyaslandığında, olanlarda anlamlı olarak daha kısa bulunmuştur (8,1 aya karşı 2,9 ay, $P < 0.0001$) (Siena ve ark., 2018). Li'nin meta-analizi, HER-2 aşırı ekspresyonunun muhtemelen KRK'lı hastalarda OS üzerinde minör etkisinin olduğunu göstermiştir (Li ve ark., 2014).

HER-2 amplifikasyonu yüksek oranda çoğalan hücreler ve kemoterapiye direnç ile ilişkilidir (Burstin, 2005). Ingold Heppner ve ark., 1.945 seçilmemiş metastatik KRK (mKRK) hastasından oluşan bir veri setini analiz ederek, HER-2 amplifikasyonunu barındıran mKRK'lı hastaların sağkalımının, olmayanlara göre daha kötü olduğunu bildirmiştir (Ingold Heppner ve ark., 2014). Bu arada Richman ve ark. PICCOLO ve FOCUS çalışmalarının bir meta-analizinde HER-2 amplifikasyon durumu ile hayatta kalma verileri arasında anlamlı bir ilişki olmadığını raporlamıştır. Bu çalışmada HER-2 amplifikasyonu olan hastaların prognozu, wild-tip RAS/BRAF hastalarından daha kötü olma eğiliminde bulunmuştur (Richman ve ark., 2016). Tüm bunlar gösteriyor ki, HER-2'nin KRK'lardaki prognostik rolü belirsizliğini korumaktadır ve HER-2 amplifikasyonunun mKRK'da kötü prognoz ile ilişkisi net değildir.

Liu ve arkadaşlarının meme kanserleri üzerinde yaptığı bir çalışmada HER-2'nin yapısal aktivasyonu, artan hücre göçünü ve VEK ekspresyonunu indüklediği görölmüştür. Bu nedenle HER-2 aktivitesinin VEK ekspresyonunu teşvik ederek VT oluşum potansiyelini destekleyebileceği yorumu yapılmıştır. Ayrıca, yüksek HER-2

seviyelerini ifade eden meme kanserlerinde tanımlanan daha fazla VT sayısı, bu VT kanallarının mikro sirkülasyon oluşturma'nın alternatif bir yolu olarak hizmet edebileceğini, böylece metastazı kolaylaştırdığını ve HER-2 pozitif tümörler için olumsuz sonuçları indükleyebileceğini düşündürmektedirler (Liu ve ark., 2013). Yapılan başka bir çalışmada KRK'lı hastalarda HER-2 overekspresyonunun %80,3, KRAS pozitif vakaların %62,1'inin HER-2'de pozitif olduğu gösterilmiş, bu nedenle KRAS mutant ve HER-2 overeksprese/amplifiye KRK subgruplarının daha agresif seyrettiği bildirilmiştir (Bar ve ark., 2012). Ancak KRK'da HER-2'nin güvenilirliği hala tartışmalıdır.

2.13. KRK'larda Anjiogenez, Yayılım ve Metastazın Mekanizması

2.13.1. Anjiogenez

Günümüzde solid malign tümörlerinin büyümesi ve metastazının anjiyogeneze bağımlı bir süreç olduğu düşünülmektedir (Asahara ve ark., 1999; Kumar ve ark., 2005). Endotelial progenitor hücreler (EPH) kemik iliği başta olmak üzere yağ doku, damar duvarının özellikle adventisyası, dalak, karaciğer ve bağırsakta bulunabilir ve endotel hücrelerine farklılaşırlar (Zampetaki ve ark., 2008). VEGF stromal ve mezenkimal hücrelerden salgılanarak, yaşamın postnatal döneminde anjioblastların endotel hücrelerine farklılaşmasını düzenler ve kontrolsüz anjiyogenezi yönetir (Kumar ve ark., 2005).

Bir tümörde kan damarlarının oluşumu için 204 mikrosirkülasyon paterni bulunur (Eichler ve ark., 2011). Bunlardan bazıları; anjiogenez (mevcut damarlardan yeni damarların oluşumu), vaskülogenez (öncü endotel hücrelerinden yeni damar sistemi oluşumu), “intussusception” (intersitisyel doku kolonlarının mevcut damar lümenine doğru sokulmasıyla damarın yeniden şekillenip genişlemesi), “co-option” (damarlar boyunca kanser hücrelerinin çoğalması sonucu), VT (kanser hücrelerinin vasküler yapılar boyunca sıralanması)'dir. Bu sayede kanser hücrelerinin endotel hücrelerine diferansiyasyonu gerçekleşir ve kanser kök hücrelerine benzer hücreler, damarın lümenal yüzeyi gibi bir şekil alır (Carmeliet ve Jain, 2011). Coğu insan tümörü karsinogenezin erken basamaklarında anjiogenezi uyarmayıp yıllarca in-situ olarak kalır. Sonradan bazı tümör hücreleri anjiogenik fenotipe dönüşebilir. Bu değişiklik anjiogenik anahtar (“switch”) olarak adlandırılır (Bergers ve Benjamin, 2003). p53'ün

her iki alelinin mutasyonla inaktivasyonu ile trombospondin-1 düzeyi düşer ve VEGF artar (Jain, 1998). Böylece kanserde, anti-anjiyogenik ve pro-anjiyogenik faktörler arasındaki denge, pro-anjiyogenik büyüme faktörlerinin artmış ekspresyonu lehine değişir. Bunun neticesinde, yapısal ve işlevsel olarak anormal olan kan damarlarında, sıklıkla kan akımı yavaşlayıp, geçirgenlik artar (Crowther ve ark., 2001; Kumar ve ark., 2005). MMP'ları ile ise ana damarların bazal membranlarında proteolitik yıkım sonucu ve plazminojen aktivatörü ile vasküler endotel hücreleri arasındaki hücre-hücre bağlantısını bozulur (Egeblad ve Werb, 2002; Kumar ve ark., 2005).

Tümörlerin anjiyogenez inhibe edildiğinde, endotel hücrelerinin katılımı olmaksızın alternatif yollar kullanarak kendilerini beslediği durum, VT olarak bilinir (Liu ve ark., 2013). VT, tümör hücreleri tarafından perfüzyon yollarının oluşumunu temsil eder. VT ve kan damarları arasındaki fiziksel bağlantı, tümör hücrelerinin hematojen yayılmasını da kolaylaştırabilir. Bu nedenle, tümörlerde VT'in varlığı, daha agresif bir biyolojik davranışla ilişkilidir (Raica ve ark., 2011). VEK ise VT'in ayırt edici bir özelliğidir (Chen ve ark., 2020). Ayrıca WNT sinyalizasyonunun da özellikle embriyogenez sırasında vasküler gelişim ve anjiyogenezde önemli bir işlevi vardır. Bu yolun mutasyonlarının aktivasyonu ile oluşan anormal WNT sinyali özellikle KRK'ler olmak üzere, tümörögenizde çok önemlidir (Reis ve Liebner., 2013).

Qi L. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada WNT-3a aşırı ekspresyonu olan hücrelerde VT ile ilişkili endotelial fenotip proteinlerinin en temsili olan VEK ve VEGFR-2'nin artmış ekspresyonu görülmüştür (Qi ve ark., 2015). VT; VEK, MMP'ler ve EphA2 tarafından düzenlenir ve EMT 'de rol alır (Meng ve ark., 2014; Qiao ve ark., 2015). EMT ise, kanserde VT'yi teşvik edebilen bir süreçtir. VEK, EphA2'nin ekspresyonunu ve fosforilasyonunu düzenler. EphA2'nin fosforilasyonu da VEK fosforilasyonunu teşvik eder. Bu da hücreler arasında nihai yapışma kaybına neden olur ve ardından hücre göçüne ve infiltrasyona yol açar (Hess ve ark., 2001; Liu ve ark., 2016).

2.13.2. Yayılım ve metastaz

Malign tümörlerin, aşırı ve hızlı büyüüp lokal invazyon ve yeni damar oluşumunu başlatabilme ile uzak metastaz yapabilme yeteneklerine mevcuttur. Ayrıca bu hücreler, apoptozis direnci gibi mekanizmalar aracılığıyla hücre çoğalmasını inhibe eden faktörlerden kaçabilirler (Junttila ve Evan, 2009). Moleküler düzeyde tümöral

heterojenitenin ve tümör progresyonunun sorumlusu, farklı hücrelerde birbirlerinden bağımsız olarak gelişen mutasyonların neden olduğu; bu yetenekler açısından farklılıklar gösteren alt klonların gelişimidir (Reymond ve ark., 2013). Metastaz kaskadı 6 basamakla açıklanmıştır. Bunlar; tümör hücrelerinin çevre dokuya lokal invazyonu, dolaşım sistemine intravazasyonu (EMT), dolaşımda sağ kalımı, uzak organ parankimlerine ekstrasvazasyonu (transendotelyal migrasyon/diapedez), mikrometastaz oluşumu ve uzak organlarda metastatik koloni oluşumu sonucu makroskopik tümör görülmesidir (Pachmayr ve ark., 2017; Valastyan ve Weinberg, 2011).

2.13.2.1. Lokal invazyon

EMT, embriyogenezde (EMT Tip 1), yara iyileşmesi ile doku yenilenmesinde (EMT Tip 2) normal ve reversibl bir süreçken, tümör metastazında (EMT Tip 3) patolojik olarak görülür (Knights ve ark., 2012). EMT'yi başlatan uyarılar içeriden (gen mutasyonları) veya dışarıdan (büyüme faktörleri) olabilir (Sökeland ve Scumacher, 2019). Ayrıca karsinomlarda, EMT, tümör mikroçevresinin sinyalleri ve hipoksi gibi birçok onkojenik sinyal yolu tarafından başlatılabilir ve desteklenebilir (Gloushankova ve ark., 2018). Patolojik EMT sürecinde hücre-hücre adezyonu, hücre-ESM adezyonu bozulmaya ve hücre polaritesi kaybedilmeye başlar, ilgili moleküllerde down regülasyon görülür (Şekil 2.7). Adezyon moleküllerinin mezenkimal hücre yüzeyinde upregülasyonu gerçekleşerek mezenkimal-kök hücre görünümlü invaziv hücre dönüşümü gerçekleşir (Sökeland ve Scumacher, 2019). Tümör hücreleri, metastaz ile ilişkili EMT sürecinde bazal membran ve lamina propriayı aşarak bağ dokuyu invaze eder. Normal epitel hücreleri ESM bağlantısını kaybetmesi sonucu apoptoza giderken, tümör hücreleri primer tümör hücrelerinden ayrılıp invazyon ve metastaz yapmak üzere mekanizmalar geliştirirler. EMT sürecinde kanser hücrelerinin E-kaderin ekspresyonu kaybolur ve de novo olarak N-kaderin ekspresyonunda artış görülür. E-kaderin ekspresyonunun kaybolması, apiko-bazal hücre polaritesinin, epitel hücreleri arasındaki bağlantıların ve bunun sonucunda da epitel yapısının bozulmasına neden olurken, lenf nodu metastazı, vasküler invazyon, ileri stage ve kötü diferansiyasyona sebebiyet verir (Bremnes ve ark., 2002). N-kaderin ekspresyonundaki artış da kanser hücrelerinin primer dokudan serbestleşmesini, invaziv özellik kazanımını kolaylaştırır. Bu olay kaderin değişimi ("cadherin-switch") olarak isimlendirilir (Gheldof ve Berx.,

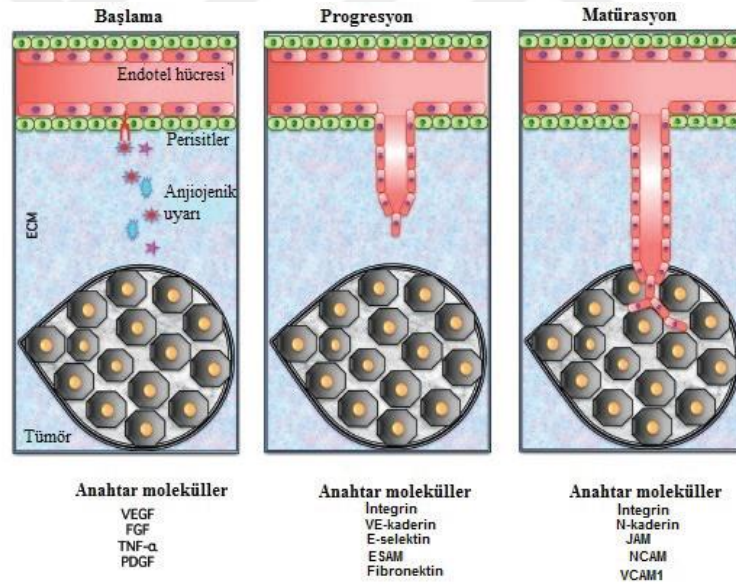
2013). Yani EMT ile epitelyal hücreler, invazyon ve metastaz yapabilen, apoptozise dirençli mezenkimal türevlerine dönüşür (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.13.2.2. İntravazasyon

Tümör hücrelerinin salgıladıkları MMP-1, MMP-2 ve MMP-9 ile birlikte kan ve lenf damarlarına girmesine “intravazasyon” adı verilir (Pachmayr ve ark., 2017). İntravazasyon perisit ve endotel bariyerinden tümör hücre geçişini kolaylaştıran VEGF ve TGF- β gibi moleküller aracılığıyla hızlanır (Anderberg ve ark., 2013; Reymond ve ark., 2013).

2.13.2.3. Ekstravazasyon

Ektravazasyon lökositlerde olduğu gibi tümör hücrelerinde de üç aşamada gerçekleşir: Yuvarlanma (rolling), adezyon, vasküler endotelial geçiş (diapedez, transmigrasyon). Lökositler transmigrasyonda paraselüler yolun yanında transselüler yolu kullanırlar.



Şekil 2.7. Tümör anjigenezi ile ilişkili moleküller (Farahani ve ark., 2014) kaynağından uyarlanmıştır).

1.Yolda iki endotel hücresi arasından madde geçişi olur, bu yüzden hücreler arası bağlantılar bozulur. 2. Yolda ise endotel hücreleri içerisinden madde geçişi olur ve hücreler arası bağlantılar bozulmaz. Kanser hücreleri lökositlerden daha büyük boyutta oldukları için lökositler gibi endotel arasına sıkışıp kalamazlar ve endotelial bağlantıları bozarak paraselüler şekilde geçerler (Sökeland ve Scumacher, 2019).

Tümör hücrelerinden ekprese edilen ICAM-1/2 vasıtasıyla lökositlerdeki $\beta 2$ integrinlerle (LFA1, Mac-1) bağlanır ve bu sayede endotelde bulunan VEK fosforilasyona uğrayarak endotel arası bağlantılar gevşer (Strell ve Entschladen, 2008).

2.13.2.4. Metastatik koloni oluşumu

Metastaz bölgesinde daha önceden gerçekleşmiş olan EMT tersine dönerek mezenkimal-epitelyal dönüşüm gerçekleşir (MET). Bunun sonucunda tümör hücreleri çoğalıp organda makro koloniler oluşturur (Sökeland ve Scumacher, 2019). Kanser hastalarının %50'sinde makroskopik metastazlar gelişir. Oluşan mikrometastazlar da farklı dokulara dağılıp makrometastazlar oluşturabilir (Pachmayr ve ark., 2017).

2.13.3. Adezyon molekülleri ve hücreler arası bağlantıların kanser metastazındaki rolleri

Adezyon molekülleri esas olarak hücre-hücre ve hücre-ESM arasındaki bağlanmayı sağlayan, hücre sinyalizasyonu, hücre ve doku yapısının korunması, yara iyileşmesi, doku tamiri, bağışıklık (lökosit göçü) ile tümör metastazı gibi süreçlerde görev alan hücre yüzey proteinleridir. Hücre adezyon molekülleri; kaderinler, hücre-hücre adezyonunda görev yapan selektinler, ESM'e bağlanan integrinler, immünoglobulin süper ailesi (IgSF) ve diğer adezyon molekülleri (müsin vb.) olmak üzere 5 gruptur. Bunlardan Kaderinler isimlerinden de anlaşıldığı üzere yapı ve fonksiyonlarında kalsiyum bağımlıdır (Harjunpää H ve ark., 2019; Makrilia ve ark., 2009). Hücre polaritesi ve organizasyonunda biri diğeri ile etkileşime geçerek hücre-hücre yapışması için aracılık yaparlar. Metastazlarda tümör hücre dizileri birbirleriyle temas geçemez, bu yüzden organizasyonları bozulur ve primer tümör kitlesinden ayrılabilir duruma gelirler (Valastyan ve Weinberg, 2011). Hücreler arası bağlantılar; desmozomlar, sıkı bağlantılar ("tight junctions"), aderens bağlantılar ("adherens junctions") olmak üzere 3'e ayrılırlar. Hücreler arası sinyallerin iletilmesinde, hücre adezyonunun sağlanmasında, hücrelerin bir arada tutulmasında ve tümöral hücrelerde EMT sürecine direnç göstererek epitelyal bütünlüğü korunmasında görev alırlar. Onkogenik transformasyon ve metastaz sırasında hücresel bağlantılar ile ilişkili genlerin ekspresyonlarında değişiklikler ve hücre-hücre adezyonunda düzensizlik, bozulmalar meydana getirirler (Knights ve ark., 2012).

3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

3.1. Olguların Seçimi ve Biyopsi Raporlarının Değerlendirilmesi

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'na 05.01.2021 tarihinde yaptığımız 20 sayılı başvurumuz sonucunda, 29.01.2021 tarihinde E-71522473-050.01.04.6042 sayılı etik kurul onayı alındı. Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda, elektronik hastane veri tabanındaki raporlar incelenerek, 2011-2021 yılları arasında tanı almış ve KRAS, NRAS, BRAF gen mutasyonlarından en az birinin analizi yapılan 122 adet vaka çalışmaya alınmıştır. Vakaların tümü ileri evre ve/veya metastatik KRK olgularından oluşmaktadır. Vakaların yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, uzak organ metastazi, tedavi bilgileri, 1. progresyon tarihleri ve sağkalım ile ilgili prognostik bilgilere hastane otomasyon sisteminden ve Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalı'ndaki hastaların izlem dosyalarından ulaşılmıştır.

Vakalara ait Hematoksilen-Eozin (HE) boyalı preparatlar ve parafin bloklar arşivden çıkarılmış, daha önce klinisyen tarafından istenilen KRAS, NRAS ve BRAF mutasyon olup olmadığını ve hangi kodonlarda var olduğunu gösteren analiz sonuçları derlenmiştir. Tüm olgulara ait formalin kullanılarak tespit edilip, parafine gömülmüş doku örneklerinden hazırlanan HE boyalı preparatlar hem tümör yeterliliği hem de morfolojik histopatolojik parametreler açısından tekrar değerlendirilmiştir. Her olguda tümörü en bol içeren blok veya bloklar seçilerek arşivde blokları olmayan, blokta ve HE kesitlerde yeterli tümör dokusu olmayan vakalar çalışma dışı bırakılmıştır.

HE kesitler morfolojik ve histopatolojik açıdan tekrar değerlendirilip tümörü boyutu ve yeterliliği en iyi olan, çeşitli tümör derecelerinde immünohistokimyasal değerlendirme yapılabilecek alanlar içeren, artefaksız veya olabildiğince az artefaktlı, tespit ve takip kalitesi iyi, düzgün kesit alınabilmesi açısından perikolorektal yağ doku yoğunluğu az olan ve de birden fazla heterojen bölgeyi kapsayan en temsili bloklar seçilmiştir. Çoğul tümör varlığında, en büyük boyutu gösteren tümörün histopatolojik ve klinik özellikleri esas alınmıştır. Tümörler DSÖ'ye göre histolojik alt gruplara ayrılmıştır.

Elde edilen veriler prognostik ve klinikopatolojik parametreler kullanarak karşılaştırıldı. Ardından, KRAS, NRAS ve BRAF mutasyon varlığına yönelik Omnigen'in Biocartis NW cihazında otomatik olarak yapılan mutasyon analizi sonuçları ile VEK ve HER-2 ekspresyonları karşılaştırılmıştır. Aynı immünohistokimyasal antikorlarla; histolojik tümör alt tipi, histopatolojik grade, evre, tümör boyutu, LVI, PNI, lenf nodu ve uzak organ metastazı varlığı, yaş, cinsiyet, tümör yerleşimi, uygulanan tedavi protokolü ve tedavi süresi, metastaz ve 1. Progresyon tarihi, genel sağ kalım oranları, ölüm durumu vb. Antiteler ile arasındaki ilişki değerlendirildi.

3.2. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

%10'luk tamponlanmış formalin içerisinde tespit edilmiş ve ardından parafine gömülmüş dokulardan hazırlanmış bloklardan, 3 mikrometre kalınlığında kesitler 90 Rodajlı lizinli lam üzerine alındı. Kesitlere Ventana Benchmark XT otomatik boyama cihazında, kromojen olarak VENTANA ultraView Universal DAB (diaminobenzidin) kiti, HER-2/Cerb-B2 Rabbit monoklonal antikoru [klon: SP3 (1:200)] ile VEK monoklonal antikoru [klon: E6N7A (1:200-800)] kullanılarak immünohistokimyasal boyama işlemi gerçekleştirildi. Antijen açığa çıkarma ve deparafinizasyon işlemleri de dahil, boyama sürecinin tamamı, immünohistokimya boyama cihazında gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak, VEK için önce vasküler yapılar ardından CD144 pozitif olan çalışmaya dahil edilen bir bloktan elde edilen tümörlü dokular; HER-2 için ise daha önce bölümümüzde pozitifliği gösterilmiş meme kanserli dokular kullanıldı. Negatif kontrol olarak bu iki antijenle immünohistokimyasal boyanmanın izlenmediği, meme ve kolon kanserli hücreler kabul edildi.

3.3. İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Boyaması yapılan preparatlar hastaların sonuçlarından habersiz bağımsız iki gözlemci tarafından VEK ve HER-2'nin immünreaktiviteleri ile immünohistokimyasal ekspresyonun her iki antikor için boyanma yaygınlığı, paterni ve şiddeti esas alınarak ışık mikroskopunda x20'lik büyütmede değerlendirildi.

VEK ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada gastrik karsinomlarda yapılan birkaç çalışmadaki skora sistemini kullanılarak boyanma yoğunluğu ile hem membranöz hem de sitoplazmik boyanan tümör hücre yüzdesi değerlendirildi.

VEK pozitif tümör hücrelerinin yoğunluğuna göre;

0 puan: hiç boyanma olmaması,

1 puan: zayıf sitoplazmik veya membranöz boyanma,

2 puan: orta derecede veya kuvvetli sitoplazmik veya membranöz boyanma.

Boyanma kapsamı da tümör hücrelerinin boyanma yüzdeleri, immün marker pozitif hücre alanı / toplam alan şeklinde belirlendi ve aşağıdaki sistem uygulandı;

0 : tümör hücre boyanma yüzdesi $< \%10$

1 : tümör hücre boyanma yüzdesi $\%10 - \%50$,

2 : tümör hücre boyanma yüzdesi $> \%50$

İstatistiksel analiz için, bileşim puanları yoğunluk ve kapsam puanları eklenerek hesaplandı. Buna göre;

≥ 3 puan : yüksek ekspresyon,

< 3 puan : düşük ekspresyon olarak tanımlandı (Inokuchi ve ark., 2017; Yin ve ark., 2020).

HER-2 immunreaktivitesinin değerlendirilmesinde sadece membranöz boyanmalar dikkate alındı. HER-2 kolon rezeksiyon materyallerinde skorlama Heracles Skorlama Sistemine göre yapıldı;

$< \%10$ kanser hücresinde boyanma ya da hiç boyanma olmaması: skor 0,

$> \%10$ kanser hücresinde zayıf, zorlukla algılanan segmental ya da granüler boyanma: skor 1,

$> \%10$ kanser hücresinde zayıf orta şiddette sirkumfarensiyel, bazolateral ya da lateral boyanma: skor 2,

$> \%10$ kanser hücresinde yoğun sirkumfarensiyel, bazolateral ya da lateral boyanma: skor 3 (Valtorta ve ark., 2015).

HER-2 skoru 0 ve 1 olanlar negatif, 3 olanlar pozitif olarak değerlendirildi.

3.4. İstatistiksel Yöntem

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde, en düşük ve en yüksek medyan değerleri ile ortalama, standart sapma değerleri kullanılmıştır. Nicel bağımsız verilerin analizinde

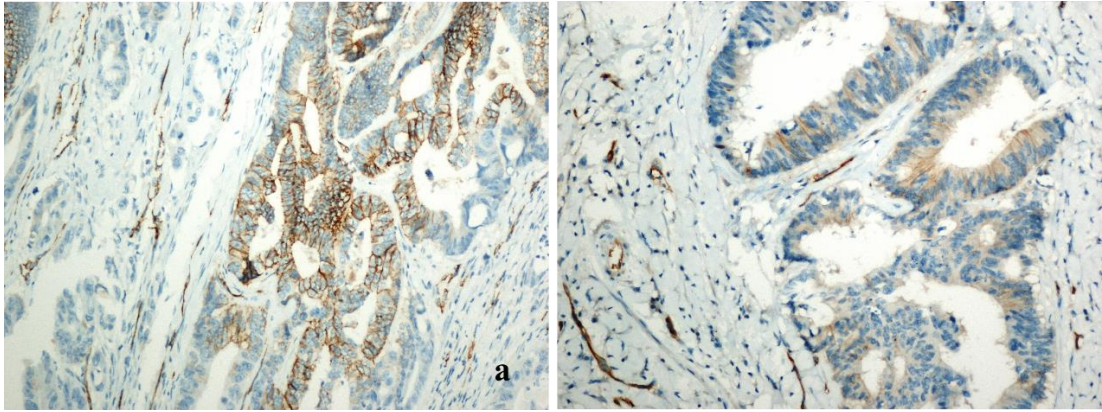
Mann-whitney u testi; Nitel bağımsız verilerin analizinde Ki-kare testi, bu testin koşulları sağlanmadığında Fischer test kullanılmıştır. Genel sağkalım (OS), KRK nedeniyle yapılan ameliyattan ölüme kadar geçen süre olarak hesaplanmış ve hastalar son takipte yaşıyorlarsa son muayene tarihi esas alınmıştır.

OS için sağkalım eğrileri ve diğer hayatta kalma parametreleri Kaplan – Meier yöntemi kullanılarak tanımlandı ve hayatta kalma analizi için Log-rank, numaralandırma verilerini analiz etmek için Ki-kare testi ve Man-whitney-U testi kullanıldı. Tüm analizler, SPSS 28.0 programı kullanılarak yapıldı. $p < 0.05$ olduğunda, edinilen sonuçlar anlamlı kabul edildi (Valtorta ve ark., 2015) (249).



4. BULGULAR

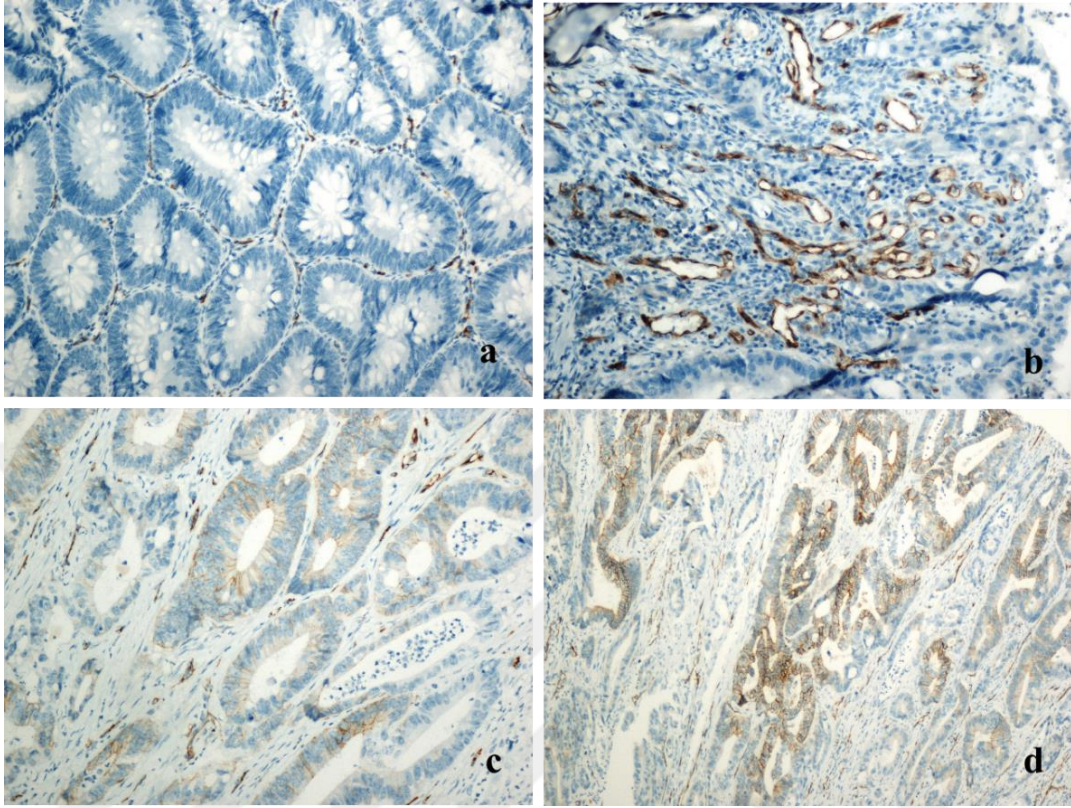
Çalışmamızda 122 tane parafine gömülü KRK örneği VEK ve HER-2 ekspresyonu/amplifikasyonu için analiz edildi. Bölümümüzde daha önce yapılan KRAS, NRAS ve BRAF mutasyon analizleri ve hangi Eksonda somatik mutasyon olduğu değerlendirildi. VEK ile tümöral hücrelerin hem sitoplazmasında hem de membranlarında boyanma izlendi. VEK ekspresyonu, kanser hücrelerinde, ayrıca kanseri mevcut olan ya da olmayan dokulardaki vasküler endotel hücrelerinde ve bazı inflamatuvar hücre sitoplazmalarında görüldü. Ancak kanserli olmayan hiçbir epitel hücresinde VEK ekspresyonu izlenmedi. Hiçbir vakada VEK ile diffüz bir boyanma olmadı. Vakaların çoğunda VEK boyanması yamasal vasıftaydı. Aynı preparatın farklı alanlarında sitoplazmik, farklı alanlarında membranöz boyanma, bazı bölgelerde yoğunlukları bakımından Skor 1 ve Skor 2 boyanma olurken bazı bölgelerinde boyanma görülmeydi (Resim 4.1- Resim 4.2). Çalışmaya alınan vakaların patolojik ve klinik prognostik verileri Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’ de gösterilmiştir.



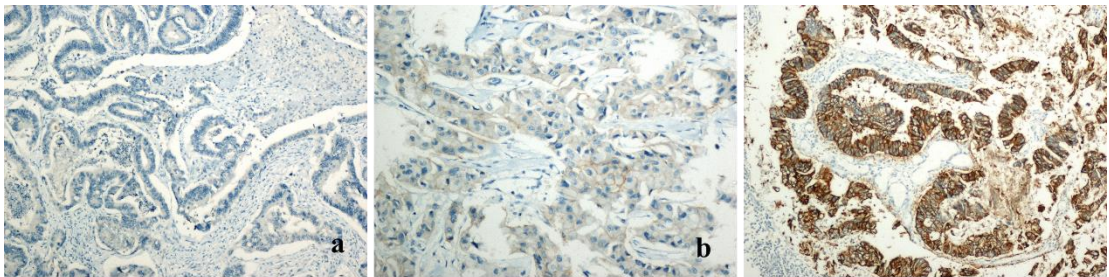
Resim 4.1. VE-Kaderin için immün boyama. VEK için membranöz vasıfta immün boyanma sergileyen KRK örneği ($\times 400$). (a) VEK için sitoplazmik vasıfta immün boyanma sergileyen KRK örneği (b) ($\times 400$).

HER-2 boyaması diffüz olup sadece bir vakada pozitif. Bir vakada Skor 1, bir vakada da Skor 3 boyanma görüldü (Resim 4.3). Bu nedenle HER-2’nin klinikopatolojik

verilerin, VEK ve KRAS, NRAS, BRAF genetik sonuçları ile sağlıklı bir karşılaştırılması yapılamadı.



Resim 4.2. VE-Kaderin için negatif immün boyanma sergileyen KRK örneği ve sıkışmış endotel hücreleri ve çevre inflamatuvar hücre sitoplazmalarında pozitif boyanma (VEK×200) (a), VE-Kaderin için immün boyanma sergileyen, KRK içindeki vasküler endotel hücreleri (VEK×100) (b), KRK’larda; VE-kaderin boyanma kuvveti +1 (VEK×200) (c), VE-Kaderin boyanma kuvveti +2 Büyütme (VEK×100) (d).



Resim 4.3. Cerb-B2 (HER-2) için negatif immün boyanma sergileyen KRK örneği (VEK×100) (a), KRK’larda; Cerb-B2 boyanma kuvveti Skor 1 (b), Cerb-B2 boyanma kuvveti Skor 3 (VEK ×200) (c).

Tablo 4.1. Çalışmaya alınan 122 vakanın patolojik prognostik verileri

		Min-Mak	Medyan	Ort.±ss/n-%	
Tümör Boyutu (cm)		2,0 - 15,0	5,0	5,3 ± 2,2	
Tümör Yerleşimi	Proksimal Kolon			30	24,8%
	Distal Kolon			50	41,3%
	Rektum			41	33,9%
Histolojik Tip	Klasik Adenokarsinom			113	92,6%
	Müsinöz Adenokarsinom			6	4,9%
	Diğer			3	2,5%
Grade	I			29	23,8%
	II			73	59,8%
	III			20	16,4%
Lenfovasküler invazyon	(-)			43	35,2%
	(+)			79	64,8%
Perinöral invazyon	(-)			65	53,3%
	(+)			57	46,7%
T Evresi	III			66	54,1%
	IV			56	45,9%
N Evresi	0			34	27,9%
	1A			26	21,3%
	1B			22	18,0%
	2A			22	18,0%
	2B			18	14,8%
Lenf Nodu Metastaz Sayısı		0,0 - 40,0	2,0	3,6 ± 5,6	
KRAS	(-)			58	47,5%
	(+)			64	52,5%
NRAS	(-)			62	88,6%
	(+)			8	11,4%
BRAF	(-)			102	97,1%
	(+)			3	2,9%
Pozitif KRAS Kodonları	12			38	74,5%
	13			8	15,7%
	Diğer			5	9,8%
CerbB2 Boyanması	Skor 0			120	98,4%
	Skor1			1	0,8%
	Skor 2			0	0,0%
	Skor 3			1	0,8%
VE-Kaderin Boyanması	Yok			84	53,3%
	Var			38	46,7%
VE-Kaderin Boyanma Derecesi	Düşük			19	50,0%
	Yüksek			19	50,0%

Tablo 4.2. Çalışmaya alınan 122 vakanın klinik verileri

		Min-Mak	Medyan	Ort.±ss/n-%
Yaş		27,0 - 85,0	63,0	60,7 ± 13,4
Cinsiyet	Kadın			48 39,3%
	Erkek			74 60,7%
Karaciğer metastazı				81 66,4%
Akciğer metastazı				71 58,2%
Peritoneal Metastaz				52 42,6%
Metastaz şekli	Senkron			80 65,6%
	Metakron			42 34,4%
Ölüm durumu	Sağ			69 56,6%
	Ölü			53 43,4%
Takip Süresi		0,4 - 81,4	18,7	23,3 ± 17,1
Progresyon Süresi		0,1 - 52,8	11,1	14,2 ± 11,7
Biyolojik Ajan Kullanımı	(-)			17 13,9%
	(+)			105 86,1%
Kullanılan Biyolojik Ajanlar				
	Cetuxcimab ve/veya Panitumumab			14 11,5%
	Bevalizumab			63 51,6%
	1 ve 2 Birlikte			28 23,0%

Yapılan istatistiksel analizlerde; VEK boyanması olan ve olmayan gruplar arasında tümör boyutları bakımından, hastaların yaşları ve cinsiyet dağılımları arasında anlamlı farklılık görülmedi ($p>0.05$). Yine VEK boyanması olan ve olmayan gruplar arasında grade, T evresi, histolojik tip, tümör yerleşimi, lenf nodu metastaz sayısı, lenfovasküler ve perinöral invazyon oranı arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0.05$). Ayrıca VEK boyanması olan ve olmayan gruplar arasında karaciğer metastazı, akciğer metastazı ve peritoneal metastaz oranı ile metastazın senkron/metakron olma oranı anlamlı istatistiksel farklılık göstermedi ($p>0.05$). Aynı gruplar arasında verilen tedavi protokolü, Cetuksimab, Bevalizumab veya Panitumumab kullanılıp kullanılmaması ya da birlikte kullanılması bakımından anlamlı bir istatistiksel farklılık yoktur ($p>0.05$) (Tablo 4.3.).

Düşük VEK ekspresyonu gösteren ve yüksek VEK ekspresyonu gösteren gruplar arasında hastaların yaşları, tümör boyutu ve tümör yerleşimi anlamlı farklılık göstermedi ($p>0.05$). Yüksek boyanma olan grupta erkek hasta oranı düşük boyanma olan gruptakine oranla görece anlamlı olarak daha yüksek olarak bulundu ($p<0.05$). KRK prevalansı erkeklerde ($n = 30$) kadınlara ($n = 20$) göre daha yüksekti.

Tablo 4.3. Çalışmaya alınan 122 olgunun VE-kaderin boyanma ve boyanmama durumunun klinikopatolojik veriler ile karşılaştırılması

		Kaderin Boyanma (-)		Kaderin Boyanma (+)		p
		Ort.±ss/n-%	Medyan	Ort.±ss/n-%	Medyan	
Yaş		60,2 ± 13,4	63,0	61,8 ± 13,3	62,5	0,580 ^m
Cinsiyet	Kadın	36	42,9%	12	31,6%	0,238 ^{X2}
	Erkek	48	57,1%	26	68,4%	
Tümör Boyutu (cm)		5,3 ± 2,0	5,0	5,4 ± 2,6	5,0	0,679 ^m
Grade	I	17	20,2%	12	31,6%	0,375 ^{X2}
	II	52	61,9%	21	55,3%	
	III	15	17,9%	5	13,2%	
Histolojik Tip						
Klasik Adenokarsinom		78	92,9%	35	92,1%	0,820 ^{X2}
Müsinöz Adenokarsinom		4	4,8%	2	5,3%	0,738 ^{X2}
Diğer		2	2,4%	1	2,6%	1,000 ^{X2}
Tümör Yerleşimi	Proksimal Kolon	23	27,7%	7	18,4%	0,496 ^{X2}
	Distal Kolon	32	38,6%	18	47,4%	
	Rektum	28	33,7%	13	34,2%	
	Bilgi Yok	1				
Lenfovasküler invazyon	(-)	29	34,5%	14	36,8%	0,804 ^{X2}
	(+)	55	65,5%	24	63,2%	
Perinöral invazyon	(-)	43	51,2%	22	57,9%	0,492 ^{X2}
	(+)	41	48,8%	16	42,1%	
T-Evresi	III	42	50,0%	24	63,2%	0,177 ^{X2}
	IV	42	50,0%	14	36,8%	
N Evresi	0	23	27,4%	11	28,9%	0,866 ^{X2}
	1A	17	20,2%	9	23,7%	
	1B	14	16,7%	8	21,1%	
	2A	17	20,2%	5	13,2%	
	2B	13	15,5%	5	13,2%	
Lenf Nodu Metastaz Sayısı		3,5 ± 4,7	2,0	3,8 ± 7,2	1,0	0,582 ^m
KRAS	(-)	42	50,0%	16	42,1%	0,419 ^{X2}
	(+)	42	50,0%	22	57,9%	
NRAS	(-)	44	84,6%	18	100,0%	0,077 ^{X2}
	(+)	8	15,4%	0	0,0%	
BRAF	(-)	68	95,8%	34	100,0%	0,549 ^{X2}
	(+)	3	4,2%	0	0,0%	
Pozitif	12	23	69,7%	15	83,3%	0,286 ^{X2}
KRAS	13	6	18,2%	2	11,1%	
Kodonları	Diğer	4	12,1%	1	5,6%	

^m Mann-whitney u test / ^{X²} Ki-kare test(Fischer test)

Tablo 4.3. Çalışmaya alınan 122 olgunun VE-kaderin boyanma ve boyanmama durumunun klinikopatolojik veriler ile karşılaştırılması (Devam)

		Kaderin Boyanma (-)		Kaderin Boyanma (+)		p
		Ort.±ss/n-%	Medyan	Ort.±ss/n-%	Medyan	
Karaciğer	(-)	24	28,6%	17	44,7%	0,080 ^{X²}
metastazı	(+)	60	71,4%	21	55,3%	
Akciğer	(-)	35	41,7%	16	42,1%	0,964 ^{X²}
metastazı	(+)	49	58,3%	22	57,9%	
Peritoneal	(-)	48	57,1%	22	57,9%	0,938 ^{X²}
Metastaz	(+)	36	42,9%	16	42,1%	
Senkron		56	66,7%	24	63,2%	0,706 ^{X²}
Metakron		28	33,3%	14	36,8%	
Ölüm durumu	Sağ	42	50,0%	27	71,1%	0,030 ^{X²}
	Ölü	42	50,0%	11	28,9%	
Takip Süresi		22,4 ± 16,2	18,5	25,1 ± 19,0	21,1	0,545 ^m
Progresyon Süresi		14,6 ± 12,8	11,2	13,2 ± 9,1	11,0	0,977 ^m
Tedavide biyolojik ajan kullanımı						
	(-)	10	11,9%	7	18,4%	0,496 ^{X²}
	(+)	74	88,1%	31	81,6%	
Kullanılan Biyolojik Ajanlar						
	Cetuximab & Panitumumab	6	7,1%	8	21,1%	
	Bevalizumab	47	56,0%	16	42,1%	
	1 ve 2 Birlikte	21	25,0%	7	18,4%	

^m Mann-whitney u test / ^{X²} Ki-kare test(Fischer test)

Önceden yapılmış gen analizinde KRAS geninin 12 ve 13 numaralı kodonlarındaki somatik mutasyon baskın olarak saptandı. Düşük VEK ekspresyonu gösteren ve yüksek VEK ekspresyonu gösteren gruplar arasında pozitif KRAS kodonlarının dağılımları anlamlı olarak farklı değildi ($p>0.05$). Yüksek boyanma olan grupta KRAS pozitifliği oranı düşük boyanmanın görüldüğü gruba göre anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0.05$).

NRAS pozitifliği ve BRAF pozitifliği açısından ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktaydı ($p>0.05$). Düşük boyanma ve yüksek boyanma grupları arasında grade, T evresi, lenf nodu metastaz sayısı, histolojik tip, LVİ ve PNI oranı anlamlı farklılık göstermedi ($p>0.05$). Yine düşük boyanma ve yüksek boyanma grupları arasında karaciğer metastazı, akciğer metastazı ve peritoneal metastaz oranı tümör

metastazının senkron/metakron olma durumu bakımından anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 4.4.ve Tablo 4.5.).

Tablo 4.4. Çalışmaya alınan 122 olgunun; VE-kaderin düşük boyanma ve yüksek boyanma durumunun patolojik prognostik veriler ile karşılaştırılması

		Düşük Boyanma		Yüksek Boyanma		p
		Ort.±ss/n-%	Medyan	Ort.±ss/n-%	Medyan	
Yaş		65,3 ± 11,9	68,0	58,3 ± 14,0	56,0	0,125 ^m
Cinsiyet	Kadın	9	47,4%	3	15,8%	0,036 ^{X²}
	Erkek	10	52,6%	16	84,2%	
Tümör Boyutu (cm)		5,0 ± 2,6	4,5	5,8 ± 2,6	5,0	0,106 ^m
Grade	I	8	42,1%	4	21,1%	0,375 ^{X²}
	II	9	47,4%	12	63,2%	
	III	2	10,5%	3	15,8%	
Histolojik Tip						
Klasik Adenokarsinom		19	100,0%	15	78,9%	0,230 ^{X²}
Müsinöz Adenokarsinom		0	0,0%	2	10,5%	
Diğer		0	0,0%	2	10,5%	
Tümör Yerleşimi	Proksimal Kolon	4	21,1%	3	15,8%	0,228 ^{X²}
	Distal Kolon	11	57,9%	7	36,8%	
	Rektum	4	21,1%	9	47,4%	
Lenfovasküler invazyon	(-)	6	31,6%	8	42,1%	0,501 ^{X²}
	(+)	13	68,4%	11	57,9%	
Perinöral invazyon	(-)	11	57,9%	11	57,9%	1,000 ^{X²}
	(+)	8	42,1%	8	42,1%	
T Evresi	III	13	68,4%	11	57,9%	0,501 ^{X²}
	IV	6	31,6%	8	42,1%	
N Evresi	0	5	26,3%	6	31,6%	0,206 ^{X²}
	I	11	57,9%	6	31,6%	
	II	3	15,8%	7	36,8%	
Lenf Nodu Metastaz Sayısı		2,5 ± 3,7	1,0	5,2 ± 9,5	1,0	0,699 ^m
KRAS	(-)	5	26,3%	11	57,9%	0,049 ^{X²}
	(+)	14	73,7%	8	42,1%	
NRAS	(-)	6	30,0%	12	60,0%	1,000 ^{X²}
	(+)	14	70,0%	8	40,0%	
BRAF	(-)	18	100,0%	16	100,0%	1,000 ^{X²}
	(+)	0	0,0%	8	0,0%	
Pozitif KRAS Kodonları	12	10	90,9%	5	71,4%	0,528 ^{X²}
	13	0	0,0%	2	28,6%	
Diğer Bilgi Yok	Diğer	1	9,1%	0	0,0%	
		3		1		

^m Mann-whitney u test / ^{X²} Ki-kare test(Fischer test)

Ayrıca Bevalizumab, Cetüksümab, Panitumumab kullanımları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmamaktaydı ($p>0.05$). Bu gruplar mortalite oranı ve takip süresi açısından da anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$). Vakaların takip süreleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamaktaydı ($p>0.05$).

VEK boyaması olan grupta ölüm oranı, VEK boyaması olmayan gruptaki ölüm oranından anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0.05$). Kaderin boyanma olmayan grupta (35,0 ay), düşük boyanma grubunda (48,5 ay), yüksek boyanma grubunda (50,3 ay) arasında öngörülen sağkalım süresi açısından anlamlı farklılık görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 4.6., Şekil-4.1). Öngörülen sağ kalım süreleri ve VEK boyanma ve boyanmama durumu ile ekspresyon oranı karşılaştırılması Tablo 4.6.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Çalışmaya alınan 122 olgunun; VE-kaderin düşük boyanma ve yüksek boyanma durumunun klinik veriler ile karşılaştırılması

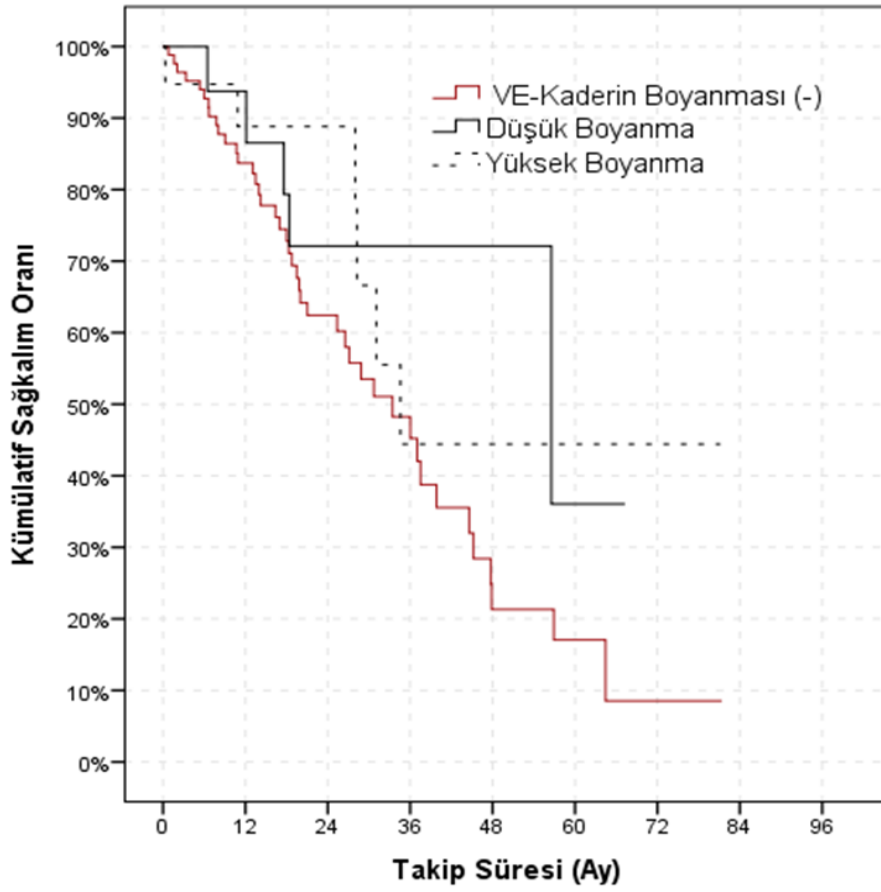
		Düşük Boyanma		Yüksek Boyanma		p
		Ort.±ss/n-%	Medyan	Ort.±ss/n-%	Medyan	
Karaciğer	(-)	7	36,8%	10	52,6%	0,328 ^{X²}
metastazı	(+)	12	63,2%	9	47,4%	
Akciğer	(-)	7	36,8%	9	47,4%	0,551 ^{X²}
metastazı	(+)	12	63,2%	10	52,6%	
Peritoneal	(-)	13	68,4%	9	47,4%	0,189 ^{X²}
Metastaz	(+)	6	31,6%	10	52,6%	
Metastaz tipi						
Senkron		11	57,9%	13	68,4%	0,501 ^{X²}
Metakron		8	42,1%	6	31,6%	
Ölüm durumu	Sağ	14	73,7%	13	68,4%	0,721 ^{X²}
	Ölü	5	26,3%	6	31,6%	
Takip Süresi		23,0 ± 18,1	18,6	27,3 ± 20,2	22,7	0,511 ^m
Aldığı Tedavi						
Biyolojik Ajan	(-)	4	21,1%	3	15,8%	0,676 ^{X²}
	(+)	15	78,9%	16	84,2%	
Cetuxcimab ve/veya Panitumumab		3	15,8%	5	26,3%	
Bevalizumab		10	52,6%	6	31,6%	
1 ve 2 Birlikte		2	10,5%	5	26,3%	

^m Mann-whitney u test / ^{X²} Ki-kare test(Fischer test)

Tablo 4.6. VE-Kaderin için boyanma olmayan, düşük boyanma ve yüksek boyanma olan gruplar arasındaki öngörülen sağkalım sürelerinin karşılaştırılması

	Öngörülen Sağkalım Süresi (Ay)				p
	Ortalama	% 95 GA	Medyan	% 95 GA	
Kaderin Boyanma Yok	35,0	28,6 - 41,5	33,4	23,7 - 43,2	0,125
Düşük Boyanma	48,5	36,1 - 61,0	56,6	2,2 - 110,9	
Yüksek Boyanma	50,3	33,0 - 67,5	34,6	24,5 - 44,7	
Toplam	39,8	33,6 - 46,1	36,0	29,8 - 42,3	

Kaplan Meier (Log Rank)



Şekil 4.1. VE-Kaderin için boyanma olmayan, düşük boyanma ve yüksek boyanma olan gruplar arasındaki kümülatif sağkalım oranı eğrisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Vasküler dokular, malign tümörlerin ilerlemesinde önemlidir ve yalnızca tümör lezyonlarına zengin bir kan temini sağlamak ve tümör hücrelerinin proliferasyonunu teşvik etmekle kalmaz, aynı zamanda mikrometastaz ve tümör hücrelerinin kan transferi için uygun bir ortam yaratır (Mathew ve Perez., 2011). Daha yüksek CD144 ekspresyonu seviyesi vaskülojenik taklitçiliği teşvik edip, mikrovezikül (MV) yollarının oluşumu ile metastazda yer alır.

Akciğer kanseri, glioblastoma ve melanomdaki bu mekanizmanın, tümörün uzak metastazı ile ilişkili olduğu raporlanmıştır (Higuchi ve ark., 2017; Inokuchi ve ark., 2017; Kirschner ve ark., 2017; Labelle ve ark., 2008; Rocha ve ark., 2018;). Ne kadar bol vasküler doku oluşursa, o kadar fazla CD144 ve b-katenin kompleksi MV yoluyla membrandan oluşur, sonunda mikrometastaz oluşumuna yol açar (Magkouta ve ark., 2019). Özofagus kanseriyle ilgili önceki bir çalışma, VEK hedeflenerek VT oluşumunun engellenebileceğini bulunmuştur (Tang ve ark., 2014). Ayrıca CD133+ kanser kök hücrelerinin endotel hücre fenotipi kazanabileceği ve VT oluşumunu teşvik etmek için VEK eksprese edebileceği öne sürülmüştür (Wang ve ark., 2016). Farklı bir yayın, artmış anjiyogenez ve metastaz görülen akciğer kanseri hücrelerinde, VEK ekspresyonunun arttığını göstermiştir (Hung ve ark., 2016).

Bizim çalışmamızda morfolojik olarak, VEK ekspresyonu yüksek olan vakalarda intratümöral damar yoğunluğunun daha fazla olduğu görüldü. Bu da diğer çalışmalarla korele olarak KRK'lerde VEK'in mikrodamar oluşumuyla ilgili olduğunu göstermektedir. Sulkowska ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada VEK ile KRK'ların klinikopatolojik özellikleri arasında bir ilişki bulunamamıştır (Sulkowska ve ark., 2006). Inokuchi ve arkadaşlarının gastrik kanserlerde yaptığı çalışmada yüksek CDH5 ekspresyonu ile, erkek cinsiyet, yüksek yaş, diferansiye tip, tümör nüksü ve hematolojik rekürrensin arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (Inokuchi ve ark., 2017).

Çalışmamızda da kolon kanserli hastalarda yüksek VEK protein seviyelerinin olduğunu gözlemledik ancak benzer şekilde bir seviyedeki VEK proteini ile

klınkopatolojik parametrelerden histolojik grade, metastatik lenf nodu sayısı, patolojik T evresi, histolojik tümör alt tipi, tümör boyutu, LVI, PNI, uzak organ metastazı, yaş, tümör yerleşimi, alınan tedavi ve tedavi süresi, metastaz ve 1. progresyon tarihi, genel sağ kalım oranları, ölüm durumu vb. arasında anlamlı bir ilişki bulamadık. Başka bir çalışmada kolon kanserinde VEK yanında VEGFR de değerlendirilmiş, VEK ve VEGFR, kontrol hastalarına göre yükselmiştir. Bu bulgu ayrıca VEK ve VEGF'nin kolon kanserinde anjiyogenezin bağımsız belirteçleri gibi görüldüğünü de düşündürmektedir (Sulkowska ve ark., 2006).

Bizim çalışmamızda da HER-2 durumu ile VEK ile kıyaslanmış olup anlamlı bir ilişki saptanmadı. Bu nedenle, VEK'in HER-2'den bağımsız bir risk faktörü olabileceğini düşünölmekle birlikte, düşük HER-2 oranlarından dolayı da bu sonuca ulaşılmış olabilir. Yine başka bir çalışmada VE-cadherin ekspresyon seviyesi normal tükürük bezi dokusunda ve farklı histolojik mukorpidermoid karsinom derecelerinde incelenmiştir. Bu çalışma, yüksek dereceli tümörlerin, düşük dereceli ve orta dereceli numunelere kıyasla daha yüksek VEK ekspresyon seviyesi gösterdiğini ortaya koymuştur. Ancak bu seviyelerin prognostik belirteçler veya tedaviye yanıtın bir göstergesi olarak hizmet edip edemeyeceğinden emin olmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu bildirmiştir. Agresif melanom üzerinde yapılmış çalışmada, tümör hücreleri tarafından VEK'in yüksek ekspresyonunu gösterilmiştir (Hamilla ve ark., 2014).

VEK'in düşük ekspresyonunun ve yüksek ekspresyonun olduğu gruplardaki yaş ortalaması (sırayla 61,8/60,2) ve medyan değerleri (sırasıyla 62,5/63) neredeyse aynıdır. VEK negatif vakalarda erkek kadın predominansı yokken, boyanmanın olduğu grupta oransal olarak çoğunluğu erkek hastaların oluşturması dikkati çekmektedir. Bu durum, KRK'lerin ve metastatik KRK'lerin oranının erkeklerde daha sık görülmesiyle açıklanabilir. Çalışmaya alınan vakalardan 84 tanesi VEK negatifken, 19 tanesi düşük boyanma (boyananların %50'si), 19 tanesi yüksek boyanma (boyananların %50'si) göstermiştir. Görüldüğü üzere tüm vakalar metastatik olmasına rağmen aralarında VEK negatif olanlar bulunmaktadır.

Ayrıca VEK ekspresyonu hem vasküler endotelial hücrelerde hem de tümör hücrelerinde belirgindir. Boyama paternleri farklı histolojik kanser alt tipleri arasında

farklılıklar göstermiştir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi insan meme kanserinde de tümör hücrelerinin membranında ve sitoplazmasında boyanma bulunurken, hepatosellüler karsinom (HCC) içindeki sinüzoid benzeri kapiller yapıların sadece endotelial hücrelerinde belirgin bir boyanma görülmüştür (Hendrix ve ark., 2001; Pachmayr ve ark., 2017).

Çalışmamızdaki VEK ile düşük ve VEK ile yüksek boyanma gösteren gruplar ve ayrıca VEK boyanması göstermeyen gruplar ile düşük ve yüksek boyanma gösteren gruplar, genel ve progresyonsuz sağ kalım (ölüm tarihi – metastaz tarihi) açısından karşılaştırıldığında, bu gruplarla yukarıdaki parametreler arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. Örneklem grubumuzdaki VEK negatif gruptaki vakaların, pozitif olan vakaların sayısından fazla olmasından ve KRK tedavi yanıtınlığı ya da nüksü nedeniyle ölen hastaların VEK boyanmasının fazla olduğu grupta olmasından dolayı bu sonuca ulaştığımızı düşünmekteyiz. Ayrıca tüm hastaların ileri evrelerde ve metastatik olması ve Grade'i 1 olan vakaların yüksek boyanma gösteren grupta olması zaten prognozlarının kötü olacağından bu duruma sebebiyet vermiş olabilir.

Bunun yanı sıra istatistiksel açıdan anlamlı olmamakla birlikte yüksek ekspresyon gösteren grubun içerisinde sağ kalımı hem iyi hem de kötü olanlar mevcuttur ($p>0,05$). Düşük boyanma olan grupta, sağ kalımı iyi olan hastalar belirgin olarak daha fazladır. Ayrıca literatürde birbirine benzeyen halihazırda dört adet sınıflandırma bulunmaktadır. Ancak bunların her biriyle ayrı ayrı vakalar gruplandırıldığında sağ kalım analizlerinde istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir. Biz bu çalışmamızda sadece birini kullanarak yaptığımız analizimizi bildirdik. Bununla birlikte metastaz görülen vakalar ile ölüm gerçekleşme miktarı VEK boyanma miktar ve yoğunluğu az olan grupta daha fazladır.

Tüm bu sebepler sağkalım analizlerindeki bu sonuçlara neden olmuş olabilir. İrani ve arkadaşlarının özofagus skuamoz hücreli karsinomlarında yaptığı çalışmada Grade ile VEK ekspresyon düzeyi arasında pozitif bir ilişki izlenmiştir ($P<0.000$). Bu çalışmada tüm yüksek dereceli numunelerde güçlü VEK ekspresyon seviyesi bulunmuş, VEK ekspresyon seviyesi, tümör derecesi artışının artmasıyla artmıştır. Bu nedenle VEK'in özofagus skuamoz hücreli karsinomlarında anjiyogenez ve vaskülojenik oluşumla, dolayısıyla tümör progresyonu ve metastazıyla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (İrani

ve Dehgha., 2018). Bizim çalışmamızda ise istatistiksel olarak tümör derecesi ile VEK in yüksek ve düşük ekspresyon grupları arasında anlamlı bir ilişki yoktur. Ancak bu durum örnekleme aldığımız çoğu vakanın benzer derecelerde, ileri evrede olması ve örneklem büyüklüğünün sınırlılığı nedeni ile açıklanabilir. Grade açısından yapılan bir çalışmada VEK ekspresyonu için immün boyama endotel hücreleri, iyi farklılaşmış HCC veya orta derecede farklılaşmış HCC ile karşılaştırıldığında, zayıf farklılaşmış HCC içinde daha güçlü olarak bulunmuştur (Roock ve ark., 2010). Ancak bazı çalışmalarda bu açıdan bizim çalışmamızla korele bulgular elde edilmiştir (Raica ve ark., 2011; Sulkowska ve ark., 2006).

Histolojik tümör tipi açısından bakacak olursak, literatürdeki vakaların çoğuna göre, VEK boyanmasının yüksek olduğu grupta daha kötü prognozlu olduğu bildirilmiştir. Bu açıdan klasik adenokarsinomdan ziyade prognozu kötü olan müsinöz ve taşlı yüzük hücreli karsinomlarda VEK'in yüksek boyanma göstermesini beklerdik. Ancak vakalarımızın müsinöz adenokarsinomların düşük sıklığı göz önüne alındığında (%92 lik bir kısmını klasik adenokarsinomlar oluşturmaktadır) bu kıyaslamayı yapabilmek için çok daha geniş ve uygun sayıda histolojik adenokarsinom tipleri içeren bir örnekleme çalışmak gerektiğini düşünüyoruz.

Sonuç olarak; VEK tespiti, bir dereceye kadar, Hamilla ve ark.'larının mukoepidermoid karsinomlar üzerinde yaptığı çalışmada da görüldüğü gibi prognozu belirlemek için önemli ölçüde artan bir değere sahiptir. Tıpkı bizim çalışmamızda olduğu gibi VEK'in, anjiyogenezin kontrolünde önemli olsa da anjiyogenezin kontrolünde yer alan tek gen olmadığı düşünülmektedir. Yine görünüşe göre VEK hücre-hücre birleşiminde endotel hücreleri tarafından eksprese edilmesine ve endotelin bütünlüğünün onlara bağlı olmasına rağmen, kanser hücresi göçü daha fazla çalışma yapılmasını gerektiren, oldukça karmaşık bir süreçtir (Hamilla ve ark., 2014). Ayrıca sonuçlarımız, VT'e karşı bir hedefleme stratejisine en acil şekilde ihtiyaç duyulduğunu ve VEK'in tümör biyolojisinin birçok yönünü hedefleyeceği için tedavi için uygun bir hedef olabileceğini göstermektedir.

Son zamanlarda monoklonal antikorlardaki mevcut gelişmeler ile tedavi rejimlerinde olumlu değişikliklere gidilmektedir. Bu durum prognostik marker ve tedavi hedefi olacak moleküler ve biyolojik ajanların arayışına yönelik araştırmalara, ağırlık

verilmesine neden olmaktadır. Cerb-B2 onkogeni EGFR ile homologtur. EGF reseptörü tümörün büyümesi ve progresyonundan sorumludur. Cerb-B2'nin overekspresyonu ve amplifikasyonu aralarında kolon kanserlerinin de olduğu birçok malignitede araştırmasına yol açmış, meme, mesane, mide ve akciğer kanseri gibi pek çok kanserde tanımlanmıştır.

Son on yılda HER-2, birkaç küçük çalışmada metastatik KRK'da terapötik bir hedef olarak araştırılmıştır (Richman ve ark., 2016; Sartore-Bianchi ve ark., 2016). HER-2 KRK'lar için prognostik biomarker olarak kabul edilmesine yönelik hala fikir ayrılıkları bulunmaktadır (Li Q. ve ark., 2011). Şimdiye kadar, ERBB2 amplifikasyonunun prognostik önem taşıdığına dair çok az kanıt bulunmuştur. Bununla birlikte HER-2 proteini genellikle kolonik epitelin membranında ve/veya sitoplazmasında zayıf bir şekilde eksprese edilirken, tümör hücre membranı çeşitli boyama paternlerine sahip olabilir (Blok ve ark., 2013). HER-2 amplifikasyonunun ve/veya aşırı protein ekspresyonunun insidansı kolon adenokarsinomunda görülme sıklığı %0 ila %83 gibi oldukça geniş bir aralıkta değişmektedir (Lee ve ark., 2014; Ross ve McKenna, 2001; Schuell ve ark., 2006). Vakalarımız arasında, RAS WT grubunda ve çalışmaya alınan total KRK vakalarının sadece 1'inde (1/122) HER-2 pozitifliği gözlemledik. Çalışmamızdaki düşük HER-2 pozitifliği yüzdesi, diğer bazı yazarlar tarafından bildirilen rakamlarla uyumludur (Mao ve ark., 2013; Valtorta ve ark., 2015). Seçilmemiş popülasyonda metastatik KRK vakalarının insidansı ise %1 ila %6 arasında farklılık göstermektedir (Kavuri ve ark., 2015; Marx ve ark., 2010; Siena ve ark., 2018) ve yine metastatik KRK'da HER-2 gen amplifikasyonu ve HER-2 aşırı ekspresyonu hakkındaki raporlar da uyumsuzdur. Bu kadar geniş bir aralığın, teknik yaklaşımlardaki, kullanılan antikorlardaki pozitifliği tanımlamak için kullanılan puanlama protokollerindeki farklılıkları ve ayrıca hasta seçimiyle ilişkili çalışma yanlışlıklarını yansıtabileceği konusunda genel olarak kabul edilmektedir (Farzand ve ark., 2014; Wolff ve ark., 2013). Ek olarak, artefaktif veya spesifik olmayan arka plan boyamaları teorik olarak membranöz ekspresyondan ziyade sitoplazmik olarak değerlendirilip, pozitif vakaların sayısını gerçekten olduğundan fazla tahmin edebilir. Çalışmaların çoğu, %0 ila %15 arasında membranöz aşırı ekspresyon oranları göstermiştir. Not olarak, bazı çalışmalar hem membranöz hem de sitoplazmik aşırı ekspresyonun %60'a varan daha yüksek oranlarını bildirmiştir. Örneğin Park ve ark.

tarafından bildirilen çalışmada (n:137), HER-2 İHK skorları 3+ olanların (n:37) sadece %7,4'ünde (2/27) FISH ile HER-2 amplifikasyonu görülmüştür (Park ve ark., 2007). Essapen ve arkadaşları çalışmaya aldıkları 170 KRK'lı olgunun %41'inde membran boyanması, %87'sinde ise sitoplazmik boyanma saptamış ve evre III tümörlerde sitoplazmik ekspresyonun daha iyi prognostik bir gösterge olduğunu ifade etmişlerdir (Essapen ve ark., 2004). Bununla birlikte Osako ve arkadaşlarının çalışmalarında 146 KRK'lı olgunun %3'ü membranöz ekspresyon, %68,5'i ise sitoplazmik ekspresyon tespit etmiş, evre II tümörlerde sitoplazmik ekspresyonun daha kötü prognoz göstergesi olduğunu bildirmişlerdir (Osako ve ark., 1998). KRK'da HER-2 İHK çalışmalarının karşılaştırılmasındaki başlıca engeller, kullanılan antikörlerin klon çeşitliliği ve doku sabitleme, slayt saklama prosedürleri, antijen alımı ve inkübasyon süresi gibi teknik konuların protokoller arasında nasıl farklı şekilde ele alındığıdır. Bu tür sorunların mahal vermemek için standart ve tekrarlanabilir bir boyama prosedürüne son derece ihtiyaç vardır (Ross ve ark., 2009; Nazemalhosseini-Mojarad ve ark., 2013). Bununla birlikte, eski doku örneklerinde HER-2 antijeninin kaybı nedeniyle bu değerin hafife alınmaması gereklidir (Seo ve ark., 2014). HER-2 ekspresyonunun her düzeyde (nükleer, sitoplazmik ve hücre yüzeyi) değerlendirilmesindeki anlaşmazlık, tek başına İHK değerlendirmesinin kullanılmasının sınırlamalarını vurgular.

Çalışmamızda HER-2 puanlaması mide kanserinde HER-2 testi kılavuzlarına göre yapılmış olup, sadece membranöz ekspresyon Cerb-B2 pozitifliği olarak kabul edildi (Ruschoff, ve ark., 2012). Tümör hücrelerinde görülen hafif sitoplazmik boyanmalar artefaktif olabileceğinden değerlendirme dışı bırakıldı. Yakın tarihli bir raporda, HER-2 aşırı ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, boyut, invazyon derinliği, lenf nodu metastazları veya uzak metastazlar arasında bir ilişki gözlenmemiştir (Tu ve ark., 2015). Tersine bazı yayınlarda HER-2 pozitifliği, tanı sırasındaki daha yüksek evre ve nodal metastaz varlığı ile anlamlı olarak korele olarak bulunmuş, primer doku örneğindeki HER-2 durumu ile rezeke edilen bölgesel düğümler arasında hiçbir fark bildirilmemiştir.

Daha kötü prognoza yönelik bir eğilime rağmen, HER-2 pozitifliğinin sağkalım üzerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır (Ingold Heppner ve ark., 2014). Bazı veriler, HER-2'nin aşırı ekspresyonunu azalmış sağkalım ile ilişkilendiriyor gibi görünse de ve HER-2'nin potansiyel negatif prognostik faktör olabileceğini düşündürse de başka

alışmalar bu sonucu desteklememiştir (Seo ve ark., 2014). Bu yüzden HER-2'nin KKK'lı hastalarda terapötik açıdan potansiyel bir hedef olarak kullanılıp kullanılamayacağı belirsizdir (Lee ve ark., 2014). Yine Tu J ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HER-2 amplifikasyonu olan veya olmayan tümörler arasında önemli bir sağkalım farkı kaydedilmemiştir (Tu ve ark., 2015). Bugüne kadar yayınlanmış en büyük çalışmalardan birinde genel sağkalımda daha kötü bir eğilim tespit edilmesine rağmen, prognoz ile net bir ilişki göstermemiştir (Ingold Heppner ve ark., 2014). Başka bir çalışmada Cerb-B2 immunreaksiyonu ile sağkalım arasında ilişki saptanmazken, tümörün çapı ve uzak organ metastazı riski arasında korelasyon bulunmuştur (Li ve ark., 2011).

Benzer sonuçlar Kavanagh ve arkadaşları tarafınca da raporlanmıştır. 132 KKK olgusundan oluşan serilerinde %11 olguda ekspresyon saptandığını ve sadece 2 olguda kuvvetli membranöz boyanma izlediklerini ifade etmişlerdir (Kavanagh ve ark., 2009). Demirbaş ve arkadaşları CerbB-2 ekspresyonunun tümör çapı (>5cm), lokalizasyon, diferansiyasyon ve LVİ ile korele olduğunu tespit etmiştir (Demirbaş ve ark., 2006).

Bizim alışmamızda ise; CerbB-2 ekspresyonunun, histolojik tümör derecesi, tümör lokalizasyonu ve boyutu, patolojik TNM evresi, histolojik tümör alt tipi, LVİ, PNİ, yaş, tümör yerleşimi, metastaz, alınan tedavi protokolü ve süresi ile korele olmadığı gösterildi. Jesus ve arkadaşlarının çalışmasında c-erbB-2 ekspresyonunun yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu ve sağkalımla korele olmadığı gösterilmiştir (Jesus ve ark., 2005). Baiocchi ve arkadaşları ise çalışmalarında %8,3 oranında membranöz ekspresyon saptarken, membranöz immünohistokimyasal boyanmanın prognoz veya nüks ile korele olmadığını belirtmiştir (Baiocchi ve ark., 2009). Görülüyor ki, KKK'de HER-2'nin klinik önemi hala tartışmalıdır.

Bunlarla birlikte, KKK'lar, pratik bir bakış açısından, bazı hücresel klonların spesifik terapilere duyarlı olacağı, diğerlerinin olmayacağı anlamına gelen oldukça heterojen bir hastalıktır. Ayrıca, bu heterojenlik tedavi basıncı altında dinamik olarak değişir. Duyarlı klonlar kaybolmaya başlarken, dirençli klonlar sonunda ortaya çıkar ve genişleyerek hastalığın ilerlemesine neden olurlar. Bu noktada, yeni bir tedavi, önceki bileşiklere karşı direncin üstesinden gelebilir ve başka bir kanser klonunun yeniden

şekillenmesini belirleyebilir (Dienstmann ve ark., 2015; Siravegna ve ark., 2015; Stahl ve ark., 2015).

KRK'ların kapsamlı moleküler karakterizasyonunun TCGA22 tarafından rapor edilmesinden sonra, farklı genetik veya klinik geçmişlerde hızla artan miktarda veri birikmiştir (Chang ve ark., 2013; Chiu ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2015). Moleküler testler, KRK'ların tedavisi açısından giderek daha önemli hale gelmiştir. KRAS, NRAS ve BRAF gibi genlerdeki mutasyonlar, EGFR hedefli tedaviler için önemli negatif öngörücü belirteçler haline gelmiştir (Benson ve ark., 2017; Chang ve ark., 2013; Gattenlohner ve ark., 2009). Bu nedenle, tahmin ve prognozları için KRAS mutasyonlu hastaların genetik profillerini anlamak özellikle gereklidir. 2013'ten beri, RAS mutasyonları, mKRK'da anti-EGFR tedavisine direncin en önemli öngörücü biyobelirteci ve klinik kullanım için onaylanmış tek belirteç olarak kabul edilmiştir (van Krieken ve ark., 2016).

Literatürde, KRK'larda HER-2 amplifikasyonu ile KRAS durumu arasında ise tutarlılık bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada bu iki antite arasında istatistiksel bir anlamlılık görülmemiştir ($p=0,052$), bu sonuç, başka bir rapor ile desteklenmektedir (Lee ve ark., 2014). Ayrıca, KRAS'ın HER-2 amplifikasyonu ile birbirini dışlayan başka bir raporu da vardır (Ross ve ark., 2018). Bu uyumsuzluğun nedeni kısmen, KRK'larda HER-2 pozitifliği kriterlerinin henüz geniş bir fikir birliğine ulaşmamış olmasıdır.

Bazı patologlar KRK'daki HER-2 pozitifliği kriterlerinin meme veya mide kanserinde bundan farklı olması gerektiğine inanmaktadır (la Vecchia ve Sebastian., 2020). Çalışmamızda da bu iki antite arasında anlamlı bir ilişki izlemedik. Ancak KRK'da HER-2 için İHK test kılavuzlarını düzeltmek için daha fazla bulguya ihtiyaç vardır. HER-2, boyama olan vaka sayısı az olması nedeniyle VEK, RAS-RAF proteinleri ve klinikopatolojik prognostik faktörlerin karşılaştırılması sağlıklı değildir. Sonuç olarak; bu çalışmanın kısıtlı alanlarından biri olan örneklem büyüklüğü, HER-2'nin ve anti-HER-2 tedavilerinin sağkalım üzerindeki prognostik etkisi ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi hakkında herhangi bir sonuca varmak adına çok küçüktür.

HER-2 amplifikasyonu zayıf bir prognostik faktör olabilir, ancak bu analizlerimizin küçük örneklem büyüklüğü ile sınırlı olmasına da bağlı olabilir. ERBB2 ile amplifiye

edilmiş tümörlerin nispi nadirliği göz önüne alındığında, ERBB2 amplifikasyon durumunun gerçek bir prognostik önemi olup olmadığını belirlemek için ek büyük ölçekli çalışmalar gerekli olacaktır. Ayrıca RAS proteinleri, EGFR ailesi gibi, RTK özelliği gösteren çeşitli büyüme faktör reseptörlerine de aracılık ettiğinden KRK'ların neredeyse %50'si RAS mutasyonu bulundurur ve bu nedenle bu vakalar anti-EGFR antikoru ile tedaviye dirençlidir. Bununla birlikte, RAS-negatif tip vakaların sadece %40-60'ında bu tedaviye cevap görülür (Silvestris ve ark., 2009). Bu bize karsinogeneze ve tedavi belirlenmesinde daha karmaşık bir biyoloji olduğunu düşündürmüştür. Bu da tedavinin etkisini tahmin etmek için diğer genom değişiklikleriyle ilgili çok daha fazla bilimsel çalışmaya ihtiyaç duyulmasına neden olacaktır. Çalışmamız Türkiye'de VEK' in KRK tümörögenezi üzerine ve prognostik faktörlerle kıyaslanması açısından yapılmış ilk araştırmadır. Ayrıca bu konuyla ilgili literatürde yeterince yayın mevcut değildir. Bu nedenle çalışmamızın başka çalışmalara ışık tutacağını düşünüyoruz.

6. KAYNAKLAR

- Adams, R., Brown, E., Brown, L., Butler, R., Falk, S., Fisher, D., Kaplan, R., Quirke, P., Richman, S., Samuel, L., Seligmann, J., Seymour, M., Shiu, K. K., Wasan, H., Wilson, R., & Maughan, T. (2018). Inhibition of EGFR, HER2, and HER3 signalling in patients with colorectal cancer wild-type for BRAF, PIK3CA, KRAS and NRAS (FOCUS4-D): a phase 2–3 randomised trial. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 3(3), 162-171.
- Akyol A. (2014). Kolorektal kanserlerin moleküler sınıflaması. *Güncel Gastroenterol Dergisi*, 2, 120-129.
- Amin, M. B., Edge, S. B., Greene, F. L., Schilsky, R. L., Brookland, R. K., Washington, M. K., Gershenwald, J. E., Compton, C. C., Hess, K. R., Sullivan, D. C., Jessup, M. J., Brierley, J. D., Gaspar, L. E., Balch, C. M., Winchester, D. P., Asare, E. A., Madera, M., Gress, D. M., & Meyer, L. R. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *A Cancer Journal for Clinicians*, 67(2), 93-99
- Anderberg, C., Cunha, S. I., Zhai, Z., Cortez, E., Pardali, E., Johnson, J. R., Franco, M., Páez-Ribes, M., Cordiner, R., Fuxe, J., Johansson, B. R., Goumans, M.-J., Casanovas, O., ten Dijke, P., Arthur, H. M., & Pietras, K. (2013). Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(3), 563-579.
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Wagner, M., & Isner, J. M. (1999). Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circulation Research*, 85, 221–228.
- Azzi, S., Hebda, J. K., & Gavard, J. (2013). Vascular Permeability and Drug Delivery in Cancers. *Frontiers in Oncology*, 3, 211-224.
- Bailey, M. H., Tokheim, C., Porta-Pardo, E., Sengupta, S., Bertrand, D., Weerasinghe, A., Colaprico, A., Wendl, M. C., Kim, J., Reardon, B., Ng, P. K. S., Jeong, K. J., Cao, S., Wang, Z., Gao, J., Gao, Q., Wang, F., Liu, E. M., Mularoni, L., Rubio-Perez, C., Nagarajan, N., Cortés-Ciriano, I., Zhou D. C., Liang, W. W., Hess, J. M., Yellapantula, V. D., Tamborero, D., Gonzalez-Perez, A., Suphavitai, C., Ko, J. Y., Khurana, E., Park, P. J., Van Allen, E. M., Liang, H.; MC3 Working Group; Cancer Genome Atlas Research Network, Lawrence, M. S., Godzik, A., Lopez-Bigas, N., Stuart, J., Wheeler, D., Getz, G., Chen, K., Lazar, A. J., Mills, G. B., Karchin, R. (2018). Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell*, 173(2), 371-385.
- Baiocchi, G., Lopes, A., Coudry, R. A., Rossi, B. M., Soares, F. A., Aguiar, S., Guimarães, G. C., Ferreira, F. O., & Nakagawa, W. T. (2009). ErbB family immunohistochemical expression in colorectal cancer patients with higher risk of recurrence after radical surgery. *International Journal of Colorectal Disease*, 24(9), 1059-1068.
- Bar, J. K., Lis-Nawara, A., Lebioda, A., Jonkisz, A., Jeleń, M., & Dobosz, T. (2012). KRAS mutation in relation to HER2 overexpression/amplification in colorectal cancer. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 10 Suppl 4, A25.

- Baran, B., Mert Ozupek, N., Tetik, Y., Acar, E., Bekcioglu, O., & Baskin, Y. (2018). Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Research*, 11(4), 264-273.
- Baran Y. (2018). *Kanser Moleküler Biyolojisi*. 1. Basım. Ankara: Hipokrat Kitabevi, p:45-195.
- Barresi, V., Reggiani Bonetti, L., Ieni, A., Domati, F., & Tuccari, G. (2015). Prognostic significance of grading based on the counting of poorly differentiated clusters in colorectal mucinous adenocarcinoma. *Human Pathology*, 46(11), 1722-1729.
- Bellizzi, A. M., & Frankel, W. L. (2009). Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Advances in Anatomic Pathology*, 16(6), 405-417.
- Benson, A. B., Venook, A. P., Cederquist, L., Chan, E., Chen, Y. J., Cooper, H. S., Deming, D., Engstrom, P. F., Enzinger, P. C., Fichera, A., Grem, J. L., Grothey, A., Hochster, H. S., Hoffe, S., Hunt, S., Kamel, A., Kirilcuk, N., Krishnamurthi, S., Messersmith, W. A., Mulcahy, M. F., Murphy, J. D., Nurkin, S., Saltz, L., Sharma, S., Shibata, D., Skibber, J. M., Sofocleous, C. T., Stoffel, E. M., Stotsky-Himelfarb, E., Willett, C. G., Wu, C. S., Gregory, K. M., Freedman-Cass, D. (2017). Colon Cancer, Version 1.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 15(3), 370-398.
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 401-410.
- Bertotti, A., Migliardi, G., Galimi, F., Sassi, F., Torti, D., Isella, C., Corà, D., di Nicolantonio, F., Buscarino, M., Petti, C., Ribero, D., Russolillo, N., Muratore, A., Massucco, P., Pisacane, A., Molinaro, L., Valtorta, E., Sartore-Bianchi, A., Risio, M., Trusolino, L. (2011). A Molecularly Annotated Platform of Patient-Derived Xenografts ("Xenopatients") Identifies HER2 as an Effective Therapeutic Target in Cetuximab-Resistant Colorectal Cancer. *Cancer Discovery*, 1(6), 508-523.
- Blok, E. J., Kuppen, P. J., van Leeuwen, J. E., & Sier, C. F. (2013). Cytoplasmic Overexpression of HER2: a Key Factor in Colorectal Cancer. *Clinical Medicine Insights. Oncology*, 7, 41-51.
- Blume-Jensen, P., & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411(6835), 355-365.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, & Srivastava S. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Research*, 58(22), 5248-5257.
- Boyle, P., Levin, B., & International Agency for Research on Cancer. (2008). *World cancer report*. 1st ed. Lyon: IARC Press, p: 510.
- Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A., & Kirchner, T. (2005). Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer: Epithelial-Mesenchymal Transition, Mesenchymal-Epithelial Transition, Stem Cells and β -Catenin. *Cells Tissues Organs*, 179(1-2), 56-65.

- Bremnes, R. M., Veve, R., Hirsch, F. R., & Franklin, W. A. (2002). The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer*, 36(2), 115-124.
- Bugra D. (2004). Rektum, Anal Bölge Anatomisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery*, 9(1), 1-10.
- Burstein, H. J. (2005). The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *The New England Journal of Medicine*, 353(16), 1652-1654.
- Cancer Genome Atlas Network, T. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487, 330-337.
- Cancer Genome Atlas Research Network, T. (2014). ARTICLE Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517), 202-9.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298-307.
- Cavallaro, U., Liebner, S., & Dejana, E. (2006). Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Experimental Cell Research*, 312(5), 659-667.
- Cecilia M. (2008). *Gastrointestinal pathology: an atlas and text*. 3rd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, p: 735-739.
- Chambers, W. M., Warren, B. F., Jewell, D. P., & Mortensen, N. J. M. (2005). Cancer surveillance in ulcerative colitis. *British Journal of Surgery*, 92(8), 928-936.
- Chan, A. O., Soliman, A. S., Zhang, Q., Rashid, A., Bedeir, A., Houlihan, P. S., Mokhtar, N., Al-Masri, N., Ozbek, U., Yaghan, R., Kandilci, A., Omar, S., Kapran, Y., Dizdaroglu, F., Bondy, M. L., Amos, C. I., Issa, J. P., Levin, B., & Hamilton, S. R. (2005). Differing DNA Methylation Patterns and Gene Mutation Frequencies in Colorectal Carcinomas from Middle Eastern Countries. *Clinical Cancer Research*, 11(23), 8281-8287.
- Chang, Y. S., Chang, S. J., Yeh, K. T., Lin, T. H., & Chang, J. G. (2013). RAS, BRAF, and TP53 gene mutations in Taiwanese colorectal cancer patients. *Onkologie*, 36(12), 719-724.
- Chappell, W. H., Steelman, L. S., Long, J. M., Kempf, R. C., Abrams, S. L., Franklin, R. A., Bäsecke, J., Stivala, F., Donia, M., Fagone, P., Malaponte, G., Mazzarino, M. C., Nicoletti, F., Libra, M., Maksimovic-Ivanic, D., Mijatovic, S., Montalto, G., Cervello, M., Laidler, P., Milella M., Tafuri A., Bonati A., Evangelisti C., Cocco L., Martelli A. M., Mccubrey, J. A. (2011). Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR Inhibitors: Rationale and Importance to Inhibiting These Pathways in Human Health. In *Oncotarget*, 2(3), 135-164.
- Chen, J., Chen, S., Zhuo, L., Zhu, Y., & Zheng, H. (2020). Regulation of cancer stem cell properties, angiogenesis, and vasculogenic mimicry by miR-450a-5p/SOX2 axis in colorectal cancer. *Cell Death & Disease*, 11(3), 173-185.
- Chiu, J. W., Krzyzanowska, M. K., Serra, S., Knox, J. J., Dhani, N. C., Mackay, H., Hedley, D., Moore, M., Liu, G., Burkes, R. L., Brezden-Masley, C., Roehrl, M. H., Craddock, K. J., Tsao, M.-S., Zhang, T., Yu, C., Kamel-Reid, S., Siu, L. L., Bedard, P. L., & Chen, E. X. (2018). Molecular Profiling of Patients With Advanced Colorectal Cancer: Princess Margaret Cancer Centre Experience. *Clinical Colorectal Cancer*, 17(1), 73-79.

- Cho, K. R., & Vogelstein, B. (1992). Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer*, 70 Suppl 6, S1727-1731.
- Cho, Y. B., Chun, H. K., Yun, H. R., Kim, H. C., Yun, S. H., & Lee, W. Y. (2009). Histological grade predicts survival time associated with recurrence after resection for colorectal cancer. *Hepato-Gastroenterology*, 56(94-95), 1335-1340.
- Colás-Algora, N., & Millán, J. (2019). How many cadherins do human endothelial cells express? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76, 1299-1317.
- Coon, B. G., Baeyens, N., Han, J., Budatha, M., Ross, T. D., Fang, J. S., Yun, S., Thomas, J. L., & Schwartz, M. A. (2015). Intramembrane binding of VE-cadherin to VEGFR2 and VEGFR3 assembles the endothelial mechanosensory complex. *The Journal of Cell Biology*, 208(7), 975-986.
- Corada, M., Zanetta, L., Orsenigo, F., Breviario, F., Lampugnani, M. G., Bernasconi, S., Liao, F., Hicklin, D. J., Bohlen, P., & Dejana, E. (2002). A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood*, 100(3), 905-911.
- Costedio, M., & Church, J. (2011). Pathways of carcinogenesis are reflected in patterns of polyp pathology in patients screened for colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, 54(10), 1224-1228.
- Crowther, M., Brown, N. J., Bishop, E. T., & Lewis, C. E. (2001). Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors; Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(4), 478-90.
- Delgado-Bellido, D., Serrano-Saenz, S., Fernández-Cortés, M., & Oliver, F. J. (2017). Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin. *Molecular Cancer*, 16(1), 348-361.
- Demirbaş, S., Sücüllü, I., Yildirim, S., & Celenk, T. (2006). Influence of the c-erb B-2, nm23, bcl-2 and p53 protein markers on colorectal cancer. *Turkish Society of Gastroenterology*, 17(1), 13-19.
- Derwinger, K., Kodada, K., Bexé-Lindskog, E., & Taflin, H. (2010). Tumour differentiation grade is associated with TNM staging and the risk of node metastasis in colorectal cancer. *Acta Oncologica*, 49(1), 57-62.
- Dienstmann, R., Salazar, R., & Tabernero, J. (2015). Overcoming Resistance to Anti-EGFR Therapy in Colorectal Cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, e149-156.
- Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 161-174.
- Eichler AF, Chung E, Kodack DP, Loeffler JS, Fukumura D, & Jain RK. (2011). The biology of brain metastases-translation to new therapies. *Nature Publishing Group*, 8(6), 344-356.
- Eliceiri, B. P., Paul, R., Schwartzberg, P. L., Hood, J. D., Leng, J., & Cheresch, D. A. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Molecular Cell*, 4(6), 915-924.

- Eroschenko, V. P. (2001). diFiore's atlas of histology. Çeviren: Demir, R. Di Fiore'nin histoloji atlası. 9. basım, Palme Yayıncılık, Ankara, s: 206-209.
- Essapen, S., Thomas, H., Green, M., de Vries, C., Cook, M. G., Marks, C., Topham, C., & Modjtahedi, H. (2004). The expression and prognostic significance of HER-2 in colorectal cancer and its relationship with clinicopathological parameters. *International Journal of Oncology*, 24(2), 241-248.
- Fan, Y. L., Zheng, M., Tang, Y. L., & Liang, X. H. (2013). A new perspective of vasculogenic mimicry: EMT and cancer stem cells (Review). *Oncology Letters*, 6(5), 1174-1180.
- Farahani, E., Patra, H. K., Jangamreddy, J. R., Rashedi, I., Kawalec, M., Rao Pariti, R. K., Batakis, P., & Wiechec, E. (2014). Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. *Carcinogenesis*, 35(4), 747-759.
- Farzand, S., Siddique, T., Saba, K., & Bukhari, M. H. (2014). Frequency of HER2/neu overexpression in adenocarcinoma of the gastrointestinal system. *World Journal of Gastroenterology*, 20(19), 5889-5896.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., Forman, D., & Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49(6), 1374-1403.
- Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(3), 153-173.
- Gatalica, Z., & Torlakovic, E. (2008). Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. *Familial Cancer*, 7(1), 15-26.
- Gattenlohner, S., Germer, C., & Muller-Hermelink, H.-K. (2009). K-ras mutations and cetuximab in colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 360(8), 835-836.
- Gavard, J., & Gutkind, J. S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature Cell Biology*, 8(11), 1223-1234.
- Gentil-dit-Maurin, A., Oun, S., Almagro, S., Bouillot, S., Courçon, M., Linnepe, R., Vestweber, D., Huber, P., & Tillet, E. (2010). Unraveling the distinct distributions of VE- and N-cadherins in endothelial cells: a key role for p120-catenin. *Experimental Cell Research*, 316(16), 2587-2599.
- Gheldof, A., & Berx, G. (2013). Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 116, 317-336.
- Giannotta, M., Trani, M., & Dejana, E. (2013). VE-cadherin and endothelial adherens junctions: Active guardians of vascular integrity. *Developmental Cell*, 26(5), 441-454.
- Gloushankova, N. A., Zhitnyak, I. Y., & Rubtsova, S. N. (2018). Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Progression. *Biochemistry. Biokhimiia*, 83(12), 1469-1476.

- Gyde, S. N., Prior, P., Allan, R. N., Stevens, A., Jewell, D. P., Truelove, S. C., Lofberg, R., & Hellers, G. (1988). Colorectal cancer in ulcerative colitis: a cohort study of primary referrals from three centres. *Gut*, 29(2), 206-217.
- Haidari, M., Zhang, W., Caivano, A., Chen, Z., Ganjehei, L., Mortazavi, A., Stroud, C., Woodside, D. G., Willerson, J. T., & Dixon, R. A. F. (2012). Integrin $\alpha 2\beta 1$ mediates tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin induced by invasive breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(39), 32981-32992.
- Haigis, K. M., Kendall, K. R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M. C., Glickman, J. N., Niwa-Kawakita, M., Sweet-Cordero, A., Sebolt-Leopold, J., Shannon, K. M., Settleman, J., Giovannini, M., & Jacks, T. (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature Genetics*, 40(5), 600-608.
- Hamelin, R., Chalastanis, A., Colas, C., el Bchiri, J., Mercier, D., Schreurs, A.-S., Simon, V., Svrcek, M., Zaanen, A., Borie, C., Buhard, O., Capel, E., Zouali, H., Praz, F., Muleris, M., Fléjou, J.-F., & Duval, A. (2008). Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers. *Bulletin Du Cancer*, 95(1), 121-132.
- Hamilla, S. M., Stroka, K. M., & Aranda-Espinoza, H. (2014). VE-cadherin-independent cancer cell incorporation into the vascular endothelium precedes transmigration. *PloS One*, 9(10), e109748.
- Hamilton, S., & Bofetta, P. (2010). Carcinoma of the Colon and Rectum. In: WHO Classification of tumours of the digestive system. 4th ed. Lyon: IARC Press, p:134-146.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Harbeck, N., & Gnant, M. (2017). Breast cancer. *The Lancet*, 389(10074), 1134-1150.
- Harjunpää H., Lloret Asens M., Guenther C., & Fagerholm S. C. (2019). Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 10, 1078-1101.
- Harpaz, N., & Saxena, R. (2003). Large Intestine. In Weidner N, Cote RJ, Suster SS, & Weiss LM, eds. *Modern surgical pathology*. 1st ed. Philadelphia: Saunders, p: 749-852.
- Hendrix, M. J. C., Seftor, E. A., Meltzer, P. S., Gardner, L. M. G., Hess, A. R., Kirschmann, D. A., Schatteman, G. C., & Seftor, R. E. B. (2001). Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 8018-8023.
- Hess, A. R., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Carles-Kinch, K., Schneider, G. B., Seftor, R. E., Kinch, M. S., & Hendrix, M. J. (2001). Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2). *Cancer Research*, 61(8), 3250-3255.
- Higuchi, K., Inokuchi, M., Takagi, Y., Ishikawa, T., Otsuki, S., Uetake, H., Kojima, K., & Kawano, T. (2017). Cadherin 5 expression correlates with poor survival in human gastric cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 70(3), 217-221.

- Hoos, A., Protsyuk, D., & Borsig, L. (2014). Metastatic growth progression caused by PSGL-1-mediated recruitment of monocytes to metastatic sites. *Cancer Research*, 74(3), 695-704.
- Hung, M. S., Chen, I. C., Lung, J. H., Lin, P. Y., Li, Y. C., & Tsai, Y. H. (2016). Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Enhances Expression of Cadherin-5 in Lung Cancer Cells. *PLOS ONE*, 11(6), e0158395.
- Imai, K., & Yamamoto, H. (2008). Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis*, 29(4), 673-680.
- Ingold Heppner, B., Behrens, H.-M., Balschun, K., Haag, J., Krü Ger, S., Becker, T., & Röcken, C. (2014). HER2/neu testing in primary colorectal carcinoma. *British Journal of Cancer*, 111(10), 1977-1984.
- Inokuchi, M., Higuchi, K., Takagi, Y., Tanioka, T., Nakagawa, M., Gokita, K., Okuno, K., & Kojima, K. (2017). Cadherin 5 is a significant risk factor for hematogenous recurrence and a prognostic factor in locally advanced gastric cancer. *Anticancer Research*, 37(12), 6807-6813.
- Jain, R. K. (1998). The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nature Medicine*, 4(6), 655-657.
- Jansen, M., de Leng, W. W. J., Baas, A. F., Myoshi, H., Mathus-Vliegen, L., Taketo, M. M., Clevers, H., & Giardiello, F. M. (2006). Mucosal prolapse in the pathogenesis of Peutz-Jeghers polyposis. *Gut*, 55(1), 1-5.
- Jenkins, M. A., Hayashi, S., Burgart, L. J., Smyrk, T. C., Shimizu, D., Waring, P. M., Ruzskiewicz, A. R., Pollett, A. F., Redston, M., Barker, M. A., Baron, J. A., Casey, G. R., Dowty, J. G., Giles, G. G., Limburg, P., Newcomb, P., Young, J. P., Walsh, M. D., Thibodeau, S. N., Lindor N. M., Lemarchand L., Gallinger S., Haile R. W., Potter J. D., Hopper J. L., Jass, J. R. (2007). Pathology Features in Bethesda Guidelines Predict Colorectal Cancer Microsatellite Instability: A Population-Based Study. *Gastroenterology*, 133(1):48-56.
- Jesus, E. C., Matos, D., Artigiani, R., Waitzberg, A. F. L., Goldenberg, A., & Saad, S. S. (2007). Assessment of staging, prognosis and mortality of colorectal cancer by tumor markers: receptor erbB-2 and cadherins. *Acta Cirurgica Brasileira*, 20(6), 422-427.
- Junttila, M. R., & Evan, G. I. (2009). p53--a Jack of all trades but master of none. *Nature Reviews. Cancer*, 9(11), 821-829.
- Kang, H., O'Connell, J. B., Maggard, M. A., Sack, J., & Ko, C. Y. (2005). A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Diseases of the Colon and Rectum*, 48(6), 1161-1168.
- Kaszak, I., Witkowska-Piłaszewicz, O., Niewiadomska, Z., Dworecka-Kaszak, B., Toka, F. N., & Jurka, P. (2020). Role of cadherins in cancer—a review. In *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7624.
- Kavanagh, D. O., Chambers, G., O'Grady, L., Barry, K. M., Waldron, R. P., Bennani, F., Eustace, P. W., & Tobbia, I. (2009). Is overexpression of HER-2 a predictor of prognosis in colorectal cancer? *BMC Cancer*, 9(1), 1-6.

- Kavuri, S. M., Jain, N., Galimi, F., Cottino, F., Leto, S. M., Migliardi, G., Searleman, A. C., Shen, W., Monsey, J., Trusolino, L., Jacobs, S. A., Bertotti, A., & Bose, R. (2015). HER2 activating mutations are targets for colorectal cancer treatment. *Cancer Discovery*, 5(8), 832-841.
- Kim, D. W., Zloza, A., Broucek, J., Schenkel, J. M., Ruby, C., Samaha, G., & Kaufman, H. L. (2014). Interleukin-2 alters distribution of CD144 (VE-cadherin) in endothelial cells. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 1-6.
- Kim, E. K., Kim, K. A., Lee, C. Y., & Shim, H. S. (2017). The frequency and clinical impact of HER2 alterations in lung adenocarcinoma. *PLoS One*, 12(2), e0171280.
- Kirschner, K. M., Sciesielski, L. K., Krueger, K., & Scholz, H. (2017). Wilms tumor protein–dependent transcription of VEGF receptor 2 and hypoxia regulate expression of the testis-promoting gene Sox9 in murine embryonic gonads. *Journal of Biological Chemistry*, 292(49), 20281-20291.
- Knights, A. J., Funnell, A. P. W., Crossley, M., & Pearson, R. C. M. (2012). Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread. *Trends in Cancer Research*, 8, 61-69.
- Kodner, J. R. (1999). Colon, rectum, anus. In: Schwartz S, Shires T, Spencer F, & Husser CW eds. *Schwartz's Principles of Surgery*. 7th ed. New York: Mc Graw Hill Co, p: 1265-1382.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. (2005). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. Philadelphia; Elsevier Saunders, p: 1112 – 1195.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. (2007). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. Philadelphia; Elsevier Saunders, p: 1132 – 1199.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. (2010). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. Philadelphia; Elsevier Saunders, p: 1193 – 1208.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C. (2015). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, p: 1205 – 1214.
- Kvist, N., Jacobsen, O., Kvist, H. K., Nørgaard, P., Ockelmann, H. H., Schou, G., & Jarnum, S. (2009). Malignancy in Ulcerative Colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 24(4), 497-506.
- Kyung Nam, S., Yun, S., Koh, J., Kwak, Y., Na Seo, A., Un Park, K., Kim, D. W., Kang, S. B., Ho Kim, W., & Seung Lee, H. (2016). BRAF, PIK3CA, and HER2 Oncogenic Alterations According to KRAS Mutation Status in Advanced Colorectal Cancers with Distant Metastasis. *PLoS One*, 11(3): e0151865.
- la Vecchia, S., & Sebastián, C. (2020). Metabolic pathways regulating colorectal cancer initiation and progression. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 98, 63-70.
- Labelle, M., Schnittler, H. J., Aust, D. E., Friedrich, K., Baretton, G., Vestweber, D., & Breier, G. (2008). Vascular Endothelial Cadherin Promotes Breast Cancer Progression via Transforming Growth Factor B Signaling. *Cancer Research*, 68(5), 1388-1397.

- Läubli, H., Spanaus, K. S., & Borsig, L. (2009). Selectin-mediated activation of endothelial cells induces expression of CCL5 and promotes metastasis through recruitment of monocytes. *Blood*, 114(20), 4583-4591.
- Lee, W. S., Ho Park, Y., Nam Lee, J., Baek, J. H., Lee, T. H., & Yeon Ha, S. (2014). Comparison of HER2 expression between primary colorectal cancer and their corresponding metastases. *Cancer Medicine*, 3(3), 674-680.
- Li, C., Liu, D., Ye, L., Huang, L., Jaiswal, S., Li, X., Wang, H., & Chen, L. (2014). HER-2 overexpression and survival in colorectal cancer: a meta-analysis. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 15(6), 582-589.
- Li, K., Luo, H., Huang, L., Luo, H., & Zhu, X. (2020). Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell International*, 20, 16-28.
- Li, Q., Wang, D., Li, J., & Chen, P. (2011). Clinicopathological and prognostic significance of HER-2/neu and VEGF expression in colon carcinomas. *BMC Cancer*, 11(1), 277-282.
- Liao, F., Li, Y., O'Connor, W., Zanetta, L., Bassi, R., Santiago, A., Overholser, J., Hooper, A., Mignatti, P., Dejana, E., Hicklin, D. J., & Bohlen, P. (2000). Monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin is a potent inhibitor of angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Cancer Research*, 60(24), 6805-6810.
- Liu, Q., Qiao, L., Liang, N., Xie, J., Zhang, J., Deng, G., Luo, H., & Zhang, J. (2016). The relationship between vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transitions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(9), 1761-1769.
- Liu, T., Sun, B., Zhao, X., Gu, Q., Dong, X., Yao, Z., Zhao, N., Chi, J., Liu, N., & Ma, Y. (2013). HER2/neu expression correlates with vasculogenic mimicry in invasive breast carcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1), 116-122.
- Liu, T. J., Sun, B. C., Zhao, X. L., Zhao, X. M., Sun, T., Gu, Q., Yao, Z., Dong, X. Y., Zhao, N., & Liu, N. (2013). CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene*, 32(5), 544-553.
- Loeb, L. A., Loeb, K. R., & Anderson, J. P. (2003). Multiple mutations and cancer. *The National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(3), 776-781.
- Lu, X., & Kang, Y. (2009). Chemokine (C-C motif) ligand 2 engages CCR2+ stromal cells of monocytic origin to promote breast cancer metastasis to lung and bone. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(42), 29087-29096.
- Luo, Y., & Radice, G. L. (2005). N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 169(1), 29-34.
- Magkouta, S., Kollintza, A., Moschos, C., Spella, M., Skianis, I., Pappas, A., Vazakidou, M.-E., Stathopoulos, G., & Kalomenidis, I. (2019). Role of angiopoietins in mesothelioma progression. *Cytokine*, 118, 99-106.
- Makrilia, N., Kollias, A., Manolopoulos, L., & Syrigos, K. (2009). Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer Investigation*, 27(10), 1023-1037.
- Mao, X. G., Xue, X. Y., Wang, L., Zhang, X., Yan, M., Tu, Y. Y., Lin, W., Jiang, X. F., Ren, H. G., Zhang, W., & Song, S. J. (2013). CDH5 is specifically activated in glioblastoma

stemlike cells and contributes to vasculogenic mimicry induced by hypoxia. *Neuro-Oncology*, 15(7), 865-879.

Martin, V., Landi, L., Molinari, F., Fountzilas, G., Geva, R., Riva, A., Saletti, P., de Dosso, S., Spitale, A., Tejpar, S., Kalogeras, K. T., Mazzucchelli, L., Frattini, M., & Cappuzzo, F. (2013). HER2 gene copy number status may influence clinical efficacy to anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer*, 108(3), 668-675.

Marx, A. H., Burandt, E. C., Choschzick, M., Simon, R., Yekebas, E., Kaifi, J. T., Mirlacher, M., Atanackovic, D., Bokemeyer, C., Fiedler, W., Terracciano, L., Sauter, G., & Izbicki, J. R. (2010). Heterogenous high-level HER-2 amplification in a small subset of colorectal cancers. *Human Pathology*, 41(11), 1577-1585.

Mathew, J., & Perez, E. A. (2011). Trastuzumab emtansine in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Current Opinion in Oncology*, 23(6), 594-600.

Mazzone, M., Dettori, D., Leite de Oliveira, R., Loges, S., Schmidt, T., Jonckx, B., Tian, Y. M., Lanahan, A. A., Pollard, P., Ruiz de Almodovar, C., de Smet, F., Vinckier, S., Aragonés, J., Debackere, K., Luttun, A., Wyns, S., Jordan, B., Pisacane, A., Gallez, B., Lampugnani M. G., Dejana E., Simons M., Ratcliffe P., Maxwell P., Carmeliet, P. (2009). Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell*, 136(5), 839-851.

Meng, J., Sun, B., Zhao, X., Zhang, D., Zhao, X., Gu, Q., Dong, X., Zhao, N., Liu, P., & Liu, Y. (2014). Doxycycline as an inhibitor of the epithelial-to-mesenchymal transition and vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(12), 3107-3122.

Meric-Bernstam, F., Hurwitz, H., Raghav, K. P. S., McWilliams, R. R., Fakih, M., VanderWalde, A., Swanton, C., Kurzrock, R., Burris, H., Sweeney, C., Bose, R., Spigel, D. R., Beattie, M. S., Blotner, S., Stone, A., Schulze, K., Cuchelkar, V., & Hainsworth, J. (2019). Pertuzumab plus trastuzumab for HER2-amplified metastatic colorectal cancer (MyPathway): an updated report from a multicentre, open-label, phase 2a, multiple basket study. *The Lancet Oncology*, 20(4), 518-530.

Missiaglia, E., Jacobs, B., D'Ario, G., di Narzo, A. F., Soneson, C., Budinska, E., Popovici, V., Vecchione, L., Gerster, S., Yan, P., Roth, A. D., Klingbiel, D., Bosman, F. T., Delorenzi, M., & Tejpar, S. (2014). Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Annals of Oncology*, 25(10), 1995-2001.

Moore, K. L., Persaud, T. V. N. (2002). The digestive system. In *The developing human: clinically oriented embryology*. Çeviren: Yıldırım M, Okar İ, Dağçık H. Klinik yönleri ile insan embriyolojisi. Bölüm çevirisi Ertem D. 6. basım, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, s: 271-302.

Moschetta, M., Mishima, Y., Sahin, I., Manier, S., Glavey, S., Vacca, A., Rocco, A. M., & Ghobrial, I. M. (2014). Role of endothelial progenitor cells in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1846(1), 26-39.

Nagtegaal, I. D., Odze, R. D., Klimstra, D., Paradis, V., Rugge, M., Schirmacher, P., Washington, K. M., Carneiro, F., Cree, I. A., & WHO Classification of Tumours Editorial

Board. (2020). The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*, 76(2), 182-188.

Nazemalhosseini-Mojarad, E., Kishani Farahani, R., Mehrizi, M., Baghaei, K., Yaghoob Taleghani, M., Golmohammadi, M., Peyravian, N., Ashtari, S., Pourhoseingholi, M. A., Asadzadeh Aghdaei, H., & Zali, M. R. (2020). Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutation in Relation to Colorectal Cancer Survival in Iranian Patients: Correlated to Microsatellite Instability. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 51(1), 53-62.

Nejatollahi, F., Asgharpour, M., & Jaberipour, M. (2012). Down-regulation of vascular endothelial growth factor expression by anti-her2/neu single chain antibodies. *Medical Oncology*, 29(1), 378-383.

Oda, H., & Takeichi, M. (2011). Evolution: structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *The Journal of Cell Biology*, 193(7), 1137-1146.

Odze, R.D., & Goldblum, J.R. (2009). Epithelial Neoplasms of the Large Intestine. In: Redston M. ed. *Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, p 597-637.

Odze, R.D., & Goldblum, J.R. (2014). Epithelial Neoplasms of the Large Intestine. In: *Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, p: 1632-1638.

Orlando, F. A., Tan, D., Baltodano, J. D., Khoury, T., Gibbs, J. F., Hassid, V. J., Ahmed, B. H., & Alrawi, S. J. (2008). Aberrant Crypt Foci as Precursors in Colorectal Cancer Progression. *Journal of Surgical Oncology*, 98(3), 207-213.

Osako, T., Miyahara, M., Uchino, S., Inomata, M., Kitano, S., & Kobayashi, M. (1998). Immunohistochemical Study of c-erbB-2 Protein in Colorectal Cancer and the Correlation with Patient Survival. *Oncology*, 55(6), 548-555.

Pachmayr, E., Treese, C., & Stein, U. (2017). Underlying Mechanisms for Distant Metastasis-Molecular Biology. *Visceral Medicine*, 33(1), 11-20.

Park, D. I., Kang, M. S., Oh, S. J., Kim, H. J., Cho, Y. K., Sohn, C. I, Jeon, W. K., Kim, B. I., Han, W. K., Kim, H., Ryu, S. H., & Sepulveda, A. R. (2007). HER-2/neu overexpression is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease*, 22(5), 491-497.

Pawson, T. (2002). Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *European Journal of Cancer*, 38(5), 3-10.

Perea, J., Lomas, M., & Hidalgo, M. (2011). Molecular basis of colorectal cancer: towards an individualized management? *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas: Organo Oficial de La Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*, 103(1), 29-35.

Pezzella, F., & Gatter, K. (2015). Non-angiogenic tumours unveil a new chapter in cancer biology. *The Journal of Pathology*, 235(3), 381-383.

Qi, L., Song, W., Liu, Z., Zhao, X., Cao, W., & Baocun Sun, B. S. (2015). Wnt3a promotes the vasculogenic mimicry formation of colon cancer via Wnt/ β -Catenin signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18564-18579.

- Qian, B., Deng, Y., Im, J. H., Muschel, R. J., Zou, Y., Li, J., Lang, R. A., & Pollard, J. W. (2009). A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PloS One*, 4(8), e6562.
- Qian, C. N. (2013). Hijacking the vasculature in ccRCC—co-option, remodelling and angiogenesis. *Nature Reviews Urology*, 10(5), 300-304.
- Qiao, L., Liang, N., Zhang, J., Xie, J., Liu, F., Xu, D., Yu, X., & Tian, Y. (2015). Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(2), 315-326.
- Raica, M., Cimpean, A. M., Ceausu, R., & Ribatti, D. (2011). Lymphatic microvessel density, VEGF-C, and VEGFR-3 expression in different molecular types of breast cancer. *Anticancer Research*, 31(5), 1757-1764.
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Velculescu, V. E. (2002). RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*, 418:6901, 418(6901), 934-934.
- Reis, M., & Liebner, S. (2013). Wnt signaling in the vasculature. *Experimental Cell Research*, 319(9), 1317-1323.
- Reymond, N., Borda, B., & Ridley, A. J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 858-870.
- Rezaei, M., Friedrich, K., Wielockx, B., Kuzmanov, A., Kettelhake, A., Labelle, M., Schnittler, H., Baretton, G., & Breier, G. (2012). Interplay between neural-cadherin and vascular endothelial-cadherin in breast cancer progression. *Breast Cancer Research*, 14(6), 154-168.
- Richman, S. D., Southward, K., Chambers, P., Cross, D., Barrett, J., Hemmings, G., Taylor, M., Wood, H., Hutchins, G., Foster, J. M., Oumie, A., Spink, K. G., Brown, S. R., Jones, M., Kerr, D., Handley, K., Gray, R., Seymour, M., & Quirke, P. (2016). HER2 overexpression and amplification as a potential therapeutic target in colorectal cancer: analysis of 3256 patients enrolled in the QUASAR, FOCUS and PICCOLO colorectal cancer trials. *Journal of Pathology*, 238, 562-570.
- Rocha, R., Torres, Á., Ojeda, K., Uribe, D., Rocha, D., Erices, J., Niechi, I., Ehrenfeld, P., San Martín, R., & Quezada, C. (2018). The Adenosine A3 Receptor Regulates Differentiation of Glioblastoma Stem-Like Cells to Endothelial Cells under Hypoxia. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1228-1239.
- Romolo, J.L. (1996). Embryology and anatomy of the colon. In: Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, Vol. 4. Philadelphia: W.B. Saunders, p: 3-16.
- Roncucci L, Modica S, Pedroni M, Tamassia M G, Ghidoni M, Losi L, Fante R, Gregorio Di, Manenti A, Gafa L, & Ponz De Leon M. (1998). Aberrant crypt foci in patients with colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 77(12), 2343-2348.
- Roock, W. de, Vriendt, V. de, Normanno, N., Ciardiello, F., & Tejpar, S. (2011). KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *The Lancet Oncology*, 12(6), 594-603.

Rosai, J., & Ackerman, L.V. (2011). Gastrointestinal Tract: Esophagus- Stomach- Small bowel- Appendix- Large bowel– Anus. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 10th ed. New York: Mosby, p: 938-1022.

Ross, H. M., & Reith, J. E. (1985). Histology. A Text and Atlas. *Annals of Internal Medicine*, 81(2), 414-438.

Ross, J. S., Fakih, M., Ali, S. M., Elvin, J. A., Schrock, A. B., Suh, J., Vergilio, J. A., Ramkissoon, S., Severson, E., Daniel, S., Fabrizio, D., Frampton, G., Sun, J., Miller, V. A., Stephens, P. J., & Gay, L. M. (2018). Targeting HER2 in colorectal cancer: The landscape of amplification and short variant mutations in ERBB2 and ERBB3. *Cancer*, 124(7), 1358-1373.

Ross, J. S., & McKenna, B. J. (2001). The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Investigation*, 19(5), 554-568.

Ross, J. S., Slodkowska, E. A., Symmans, W. F., Puztai, L., Ravdin, P. M., & Hortobagyi, G. N. (2009). The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *The Oncologist*, 14(4), 320-368.

Schoppmann, S. F., Tamandl, D., Roberts, L., Jomrich, G., Schoppmann, A., Zwrtek, R., Dubsy, P., Gnant, M., Jakesz, R., & Birner, P. (2010). HER2/neu expression correlates with vascular endothelial growth factor-C and lymphangiogenesis in lymph node-positive breast cancer. *Annals of Oncology*, 21(5), 955-960.

Schreibman, I. R., Baker, M., Amos, C., & McGarrity, T. J. (2005). The hamartomatous polyposis syndromes: a clinical and molecular review. *The American Journal of Gastroenterology*, 100(2), 476-490.

Schuell, B., Gruenberger, T., Scheithauer, W., Zielinski, C., & Wrba, F. (2006). HER 2/neu protein expression in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 6(1), 123-127.

Seo, A. N., Kwak, Y., Kim, D.-W., Kang, S.-B., Choe, G., Kim, W. H., & Lee, H. S. (2014). HER2 status in colorectal cancer: its clinical significance and the relationship between HER2 gene amplification and expression. *PloS One*, 9(5), e98528.

Shapiro, L., & Weis, W. I. (2009). Structure and Biochemistry of Cadherins and Catenins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(3), a003053-21.

Siena, S., Sartore-Bianchi, A., Marsoni, S., Hurwitz, H. I., McCall, S. J., Penault-Llorca, F., Srock, S., Bardelli, A., & Trusolino, L. (2018). Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) oncogene in colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 29(5), 1108-1119.

Silvestris, N., Tommasi, S., Petriella, D., Santini, D., Fistola, E., Russo, A., Numico, G., Tonini, G., Maiello, E., & Colucci, G. (2009). The Dark Side of the Moon: The PI3K/PTEN/AKT Pathway in Colorectal Carcinoma. *Oncology*, 77 Suppl 1, S69-74.

Sinn, D. H., Chang, D. K., Kim, Y. H., Rhee, P. L., Kim, J. J., Kim, D. S., Park, C. K., Kim, J. W., Yun, S. H., Lee, W. Y., Chun, H. K., & Rhee, J. C. (2009). Effectiveness of each Bethesda marker in defining microsatellite instability when screening for Lynch syndrome. *Hepato-Gastroenterology*, 56(91-92), 672-676.

Siravegna, G., Mussolin, B., Buscarino, M., Corti, G., Cassingena, A., Crisafulli, G., Ponzetti, A., Cremolini, C., Amatu, A., Lauricella, C., Lamba, S., Hobor, S., Avallone, A.,

- Valtorta, E., Rospo, G., Medico, E., Motta, V., Antoniotti, C., Tatangelo, F., Bellosillo, B., Veronese, S., Budillon, A., Montagut, C., Racca, P., Marsoni, S., Falcone, A., Corcoran, R. B., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F., Siena, S., Sartore-Bianchi, A., Bardelli, A. (2015). Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nature Medicine*, 21(7), 795-801.
- Skvortsova, K., Masle-Farquhar, E., Luu, P.-L., Song, J. Z., Qu, W., Zotenko, E., Gould, C. M., Du, Q., Peters, T. J., Colino-Sanguino, Y., Pidsley, R., Nair, S. S., Khoury, A., Smith, G. C., Miosge, L. A., Reed, J. H., Kench, J. G., Rubin, M. A., Horvath, L., Bogdanovic, O., Lim, S. M., Polo, J. M., Goodnow, C.C., Stirzaker, C., Clark, S. J. (2019). DNA Hypermethylation Encroachment at CpG Island Borders in Cancer Is Predisposed by H3K4 Monomethylation Patterns. *Cancer Cell*, 35(2), 297-314.
- Smakman, N., Borel Rinkes, I. H. M., Voest, E. E., & Kranenburg, O. (2005). Control of colorectal metastasis formation by K-Ras. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1756(2), 103-114.
- Soetikno, R. M. (2008). Prevalence of Nonpolypoid (Flat and Depressed) Colorectal Neoplasms in Asymptomatic and Symptomatic Adults. *JAMA*, 299(9), 1027-1035.
- Sousa, B., Pereira, J., & Paredes, J. (2019). Molecular Sciences The Crosstalk Between Cell Adhesion and Cancer Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1933.
- Sökeland, G., & Schumacher, U. (2019). The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Molecular Cancer*, 18(1), 12-30.
- Stahl, P. R., Schnellert, J., Koop, C., Simon, R., Marx, A., Izbicki, J. R., Sauter, G., & Quaas, A. (2015). Determination of Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancers Using Heterogeneity Tissue Microarrays. *Pathology & Oncology Research*, 21(4), 1183-1189.
- Stang, A., & Kluttig, A. (2008). Etiologic insights from surface adjustment of colorectal carcinoma incidences: an analysis of the U.S. SEER data 2000-2004. *The American Journal of Gastroenterology*, 103(11), 2853-2861.
- Sternberg, S. S. (1992). Colon. In Sternberg SS ed. *Histology for pathologists*. 2nd ed. New York: Raven Press, p: 573-588.
- Strell, C., & Entschladen, F. (2008). Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Communication and Signaling*, 6(1), 10-22.
- Su, M., Feng, Y. J., Yao, L. Q., Cheng, M. J., Xu, C. J., Huang, Y., Zhao, Y. Q., & Jiang, H. (2008). Plasticity of ovarian cancer cell SKOV3ip and vasculogenic mimicry in vivo. *International Journal of Gynecological Cancer*, 18(3), 476-486.
- Sulkowska, M., Famulski, W., Wincewicz, A., Moniuszko, T., Kedra, B., Koda, M., Zalewski, B., Baltaziak, M., & Sulkowski, S. (2018). Levels of VE-cadherin increase independently of VEGF in preoperative sera of patients with colorectal cancer. *Tumori*, 92(1), 67-71.
- Tanaka, T., Iino, M., & Goto, K. (2012). Knockdown of Sec6 improves cell-cell adhesion by increasing α -E-catenin in oral cancer cells. *FEBS Letters*, 586(6), 924-933.
- Tang, N. N., Zhu, H., Zhang, H. J., Zhang, W. F., Jin, H. L., Wang, L., Wang, P., He, G. J., Hao, B., & Shi, R. H. (2014). HIF-1 α induces VE-cadherin expression and modulates

vasculogenic mimicry in esophageal carcinoma cells. *World Journal of Gastroenterology*, 20(47), 17894-17904.

Tannapfel, A., Neid, M., Aust, D., & Baretton, G. (2010). Original article: The origins of colorectal carcinoma. *Deutsches Arzteblatt*, 107(43), 760-766.

Thorpe, L. M., Schrock, A. B., Erlich, R. L., Miller, V. A., Knost, J., Le-Lindqwister, N., Jujjavarapu, S., Ali, S. M., & Liu, J. J. (2017). Significant and durable clinical benefit from trastuzumab in 2 patients with HER2-amplified salivary gland cancer and a review of the literature. *Head & Neck*, 39(3), E40-44.

Toyota, M., Ohe-Toyota, M., Ahuja, N., & Issa, J. P. J. (2000). Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 710–715.

Tu, J., Yu, Y., Liu, W., & Chen, S. (2015). Significance of human epidermal growth factor receptor 2 expression in colorectal cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(1), 17-24.

Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292.

Valtorta, E., Martino, C., Sartore-Bianchi, A., Penault-Llorca, F., Viale, G., Risio, M., Rugge, M., Grigioni, W., Bencardino, K., Lonardi, S., Zagonel, V., Leone, F., Noe, J., Ciardiello, F., Pinto, C., Labianca, R., Mosconi, S., Graiff, C., Aprile, G., Frau, B., Garufi, C., Loupakis, F., Racca, P., Tonini, G., Lauricella, C., Veronese, S., Truini, M., Siena, S., Marsoni, S. Gambacorta, M. (2015). Assessment of a HER2 scoring system for colorectal cancer: Results from a validation study. *Modern Pathology*, 28(11), 1481-1491.

van der Schaft, D. W. J., Seftor, R. E. B., Seftor, E. A., Hess, A. R., Gruman, L. M., Kirschmann, D. A., Yokoyama, Y., Griffioen, A. W., & Hendrix, M. J. C. (2004). Effects of Angiogenesis Inhibitors on Vascular Network Formation by Human Endothelial and Melanoma Cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(19), 1473-1477.

van Krieken, J. H. J., Rouleau, E., Ligtenberg, M. J. L., Normanno, N., Patterson, S. D., & Jung, A. (2016). RAS testing in metastatic colorectal cancer: advances in Europe. *Virchows Archiv*, 468(4), 383-396.

Vestweber, D. (2008). VE-cadherin: The major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(2), 223-232.

Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E., & Huber, P. (1997). Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), 6273-6278.

Wang, J. Y., Sun, T., Zhao, X. L., Zhang, S. W., Gu, Q., Wang, X. H., Zhao, N., Qie, S., & Sun, B. C. (2008). Functional significance of VEGF-a in human ovarian carcinoma: Role in vasculogenic mimicry. *Cancer Biology and Therapy*, 7(5), 758-766.

Wang, S., Gao, X., Liu, X., Gao, S., Fan, Y., Jiang, Y., Ma, X., Jiang, J., Feng, H., Chen, Q., Tang, Y., Tang, Y., & Liang, X. (2016). CD133+ cancer stem-like cells promote migration

and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma by inducing vasculogenic mimicry formation. *Oncotarget*, 7(20), 29051-29062.

Wang, S., Zhang, Z., Qian, W., Ji, D., Wang, Q., Ji, B., Zhang, Y., Zhang, C., Sun, Y., Zhu, C., & Sun, Y. (2018). Angiogenesis and vasculogenic mimicry are inhibited by 8-Br-cAMP through activation of the cAMP/PKA pathway in colorectal cancer. *OncoTargets and Therapy*, 11, 3765-3774.

Wang, Y., Liu, H., Hou, Y., Zhou, X., Liang, L., Zhang, Z., Shi, H., Xu, S., Hu, P., Zheng, Z., Liu, R., Tang, T., Ye, F., Liang, Z., & Bu, H. (2018). Performance validation of an amplicon-based targeted next-generation sequencing assay and mutation profiling of 648 Chinese colorectal cancer patients. *Virchows Archiv*, 472(6), 959-968.

Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Hicks, D. G., Dowsett, M., McShane, L. M., Allison, K. H., Allred, D. C., Bartlett, J. M. S., Bilous, M., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R. B., Mangu, P. B., Paik, S., Perez, E. A., Press, M. F., Spears, P. A., Vance, G. H., Viale, G., & Hayes, D. F. (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast. *Journal of Clinical Oncology*, 31(31), 3997-4013.

Yang, D., Wang, J., Xiao, M., Zhou, T., & Shi, X. (2016). Role of Mir-155 in Controlling HIF-1 α Level and Promoting Endothelial Cell Maturation. *Nature Publishing Group*, 6, 35316-35325.

Yang, J., Shi, Q. D., Song, T. B., Feng, G. F., Zang, W. J., Zong, C. H., & Chang, L. (2013). Vasoactive intestinal peptide increases VEGF expression to promote proliferation of brain vascular endothelial cells via the cAMP/PKA pathway after ischemic insult in vitro. *Peptides*, 42, 105-111.

Yang, V. W. (1999). The molecular genetics of colorectal cancer. *Current Gastroenterology Reports*, 1(5), 449-454.

Yin, X., Fang, T., Zhang, L., Lin, X., Yang, Y., Lou, S., Li, C., Yu, X., & Xue, Y. (2020). Impact of CD144 gene expression on outcomes in stage III gastric cancer patients. *Pathology*, 52(6), 657-669.

Yonesaka, K., Zejnullahu, K., Okamoto, I., Satoh, T., Cappuzzo, F., Souglakos, J., Ercan, D., Rogers, A., Roncalli, M., Takeda, M., Fujisaka, Y., Philips, J., Shimizu, T., Maenishi, O., Cho, Y., Sun, J., Destro, A., Taira, K., Takeda, K., Okabe, T., Swanson, J., Itoh, H., Takada M, Lifshits E, Okuno K, Engelman JA, Shivdasani RA, Nishio K, Fukuoka M, Varella-Garcia, M., Nakagawa, K., Jänne, P. A. (2011). Activation of ERBB2 Signaling Causes Resistance to the EGFR-Directed Therapeutic Antibody Cetuximab. *Science Translational Medicine*, 3(99), 99ra86.

Yücel A. H. (2018). *Dere Anatomi Atlası ve Ders Kitabı*. 7. Basım. Adana: Akademisyen Kitabevi, p: 229-242.

Zampetaki, A., Kirton, J. P., & Xu, Q. (2008). Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovascular Research*, 78(3), 413-421.

Zhang, J., Zheng, J., Yang, Y., Lu, J., Gao, J., Lu, T., Sun, J., Jiang, H., Zhu, Y., Zheng, Y., Liang, Z., & Liu, T. (2015). Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Chinese colorectal cancer patients: analysis of 1,110 cases. *Scientific Reports*, 5, 18678-18685.

Zhang, S., Zhang, D., & Sun, B. (2007). Vasculogenic mimicry: current status and future prospects. *Cancer Letters*, 254(2), 157-164.

Zhang, T., Nanney, L. B., Luongo, C., Lamps, L., Heppner, K. J., DuBois, R. N., & Beauchamp, R. D. (1997). Concurrent overexpression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) in intestinal adenomas from multiple intestinal neoplasia (Min) mice and human familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Research*, 57(1), 169-175.

Zuidema, G.D., & Condon, E. R. (1996). Colon. In: Shackelford's surgery of the alimentary tract. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, p: 114-126.

