

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
PROF. DR. TUNCER KARPUZOĞLU ORGAN NAKLİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

**KOLON KANSERİ HASTALARINDA LOKAL LENF
NODUNDA T HÜCRE POPÜLASYONUNUN
EVREYE GÖRE KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

Derya KIVRAK SALİM

DOKTORA TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
PROF. DR. TUNCER KARPUZOĞLU ORGAN NAKLİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

**KOLON KANSERİ HASTALARINDA LOKAL LENF
NODUNDA T HÜCRE POPÜLASYONUNUN
EVREYE GÖRE KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

Derya KIVRAK SALİM

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sadi KÖKSOY

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2020-5451 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

Prof.Dr.Tuncer Karpuzoğlu Organ Nakli Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından İmmünoloji Anabilim Dalı İmmünoloji Doktora Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 21/05/2019

İmza

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Sadi KÖKSOY
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof Dr. Ender TERZİOĞLU
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof Dr. Fahri Uçar
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof Dr.Banu ÖZTÜRK
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Üye : Doç Dr.Fatih ÇELMELİ
Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü
Prof Dr Ömer Özkan

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci
Derya KIVRAK SALİM

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sadi KÖKSOY

TEŐEKKÖR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi Prof. Dr. Tuncer Karpuzoğlu Organ Nakli Enstitüsü İmmünoloji Bilim Dalında doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum, yetişmemde emeği olan, tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sadi KÖKSOY'a;

Eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ender TERZİOğLU'na ve Sayın Prof. Dr. Veli YAZISIZ'a; bilimsel araştırmalara ve doktora araştırma projemize destek veren rektörümüz Sayın Prof. Dr. Özlenen ÖZKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezi çalışmalarım sırasında hastalarımın toplanması ve verilerin değerlendirilmesinde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. İsmail GÖMCELİ, Sayın Doç. Dr. Canan SADULLAHOğLU ve Sayın Uzm. Dr. Orhan ARAS'a; istatistik analizde emeği olan Deniz ÖZEL ve Başak OğUZ'a ve Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına ayrıca teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Birinci amacımız, Kolon kanseri hastalarında T lenfosit infiltrasyon oranı ve tümörü drene eden lenf nodundaki T hücre alt gruplarının karşılaştırmalı analizini yapmaktır. İkinci amacımız ise, belirlediğimiz T hücre alt grupların oranlarının evre, KRAS mutasyonu, MSI durumu ve diğer prognostik faktörlere göre ilişkisini tanımlamaktır.

Yöntem: Antalya Eğitim Araştırma Hastanesinde kolon kanseri operasyonu yapılan hastaların primer tümörü drene eden lenf nodundan izole edilen mononükleer hücreler sıvı nitrojenle donduruldu. Örnek toplama işlemi sonrasında hücreler çözülürölerek naive T hücreler, CTL, Th1, Th2, TREG, $\gamma\delta$ T hücreleri, Th17, hafıza hücreleri alt grupların rölafif oranları ve CTLA4, PD1, CCR4 ekspresyon oranları flow sitometrik immün fenotiplendirme ile belirlendi.

Bulgular: Çalışmaya 36 hasta (%41 kadın, %59 erkek) dahil edildi. Çalışma popölasyonunun yaş ortalaması $63,14 \pm 11,94$ izlendi. 13 hasta erken evre, 13 hasta bölgesinde ilerlemiş hastalık ve 10 hasta metastatik evrede izlendi. KRAS mutasyon oranı %22 izlenmiştir. Evre progresyonunda Th1 ve Th2 hücre oranlarında anlamlı bir farklılık görölmemiştir. Artan evre ile Th17 ekspresyonunun korele bir şekilde arttığı belirlenmiştir. MSI-H alt grupta immün baskılayıcı Th2 oranı azalırken TREG oranlarının anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir. Evreye göre $\gamma\delta$ T, Th, CTL, TREG, hafıza ve naive T hücrelerinde fark izlenmediği gibi MSI, KRAS mutasyonu gibi moleköler değışikliklere göre $\gamma\delta$ T, Th, CTL, naive T ve hafıza hücrelerinin oranında da farklılık izlenmemiştir.

Sonuç: Th17 hücre ve inhibitör reseptör PD1 düzeylerinin evre ile paralel artışı, invazyon durumu ve evreyi belirlemede, baskılayıcı immün unsurların efektör hücrelere göre daha etkin rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolon kanseri, T-hücre immün yanıt

ABSTRACT

Objective: Primary aim was to make a comparative analysis of T lymphocyte infiltration rate and T cell subset ratios in the tumor-draining lymph nodes in colon cancer patients. Secondary aim was to determine the relationship between frequencies of T cell subgroups and stage, KRAS mutation, MSI status and other prognostic factors.

Method: Mononuclear cells isolated from the primary tumor-draining lymph nodes of patients who underwent colon cancer surgery in Antalya Education and Research Hospital were stored in liquid nitrogen. At the end of recruitment, cells were thawed and relative ratios of naive T cells, CTL, Th1, Th2, TREG, $\gamma\delta$ T cells, Th17, memory cells, and CTLA4, PD1, CCR4 expression rates were calculated by flow cytometric immune phenotyping.

Results: Thirty-six patients (%41 female, %59 male) were included in the study. The mean age of the study population was 63.14 ± 11.94 years. Thirteen patients had early stage, 13 patients had locally advanced disease, and 10 patients were in metastatic stage. KRAS mutation rate was 22%. No significant difference was observed in Th1 and Th2 cell ratios according to stage. Th17 cells were increased in correlation with increasing stage. While the immunosuppressive Th2 ratio decreased in the MSI-H subgroup, the TREG ratios increased significantly. No difference was observed in $\gamma\delta$ T, Th, CTL, TREG, naive T cells and memory T cells according to the stage, and there was no difference in the ratio of $\gamma\delta$ T, Th, CTL, naive T and memory T cells according to molecular changes such as MSI and KRAS mutation.

Conclusion: The increase in Th17 cells and immune inhibitory receptor PD1 levels with stage suggests that cells and molecules that suppress the immune response rather than effector cells play a more effective role in determining the invasion status and stage.

Key words: colon cancer, T-cell immune response

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii

1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş	1
1.1.1.Amaç	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1.Kolon Kanseri İnflamatuvar Patogenezi	5
2.1.1.İntratümöral ve Peritümöral Lenfosit Yanıt	9
2.1.2.Lenfovasküler İnvazyon	10
2.1.3. Perinöral İnvazyon	11
2.1.4. Tümör Tomurcuklanma Skoru	11
2.2.Kolon Kanseri Moleküler Patogenezi	12
2.2.1 KRAS	12
2.2.2.NRAS ve HRAS	13
2.2.3.BRAF	13
2.3.Kolon Kanseri ve TNM Evresi	14

2.4.Kolon Kanseri ve MSI	15
2.5. Kolon Kanseri, İmmun Mikroçevre ve T Hücre Konstitüsü	16
2.5.1.CTL	18
2.5.2.Th & Naive T hücreleri	19
2.5.3.Th1	19
2.5.4.Th2	20
2.5.5.Th17	20
2.5.6.TREG	21
2.5.7. Gamma/Delta T hücreleri	22
2.5.8. Santral Hafıza T Hücreleri ve Efektör Hafıza T Hücreleri	24
2.4.9. İmmün Checkpoint Reseptörleri	24
2.5.10.CD4/CD8 Oranı	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1.Gereçler	27
3.1.1.Hasta seçimi	27
3.1.2.Evleme	27
3.1.3.Cerrahi Örneklerin Alınması	27
3.1.4. İmmünotiplendirme Antikor ve Malzemeleri	28
3.1.5.Etik Kurul Onayı	30

3.2.Yöntemler	30
3.2.1.Gen Mutasyon Analizi	30
3.2.2.İnatümöral ve Peritümöral TIL Analizi	30
3.2.3. İmmühistokimyasal Analiz	31
3.2.3.1.LVI	31
3.2.3.2.PNI	31
3.2.3.3.Tümör Tomurcuklanma Skoru	31
3.2.3.4.MSI	31
3.2.4. T hücre İmmüfenotiplendirme &Flow sitometrik Analiz	32
3.2.4.1. Lenf Nodundan Lenfosit İzolasyonu ve Saklanması	32
3.2.4.2. Dondurulmuş Lenfositlerin Eritilmesi, Yüzey ve İnataselüler	
Boyama	32
3.2.4.3.T Hücre İmmüfenotiplendirmesi	34
3.2.4.3.1.CTL rölatif oranı	35
3.2.4.3.2.Th rölatif oranı	36
3.2.4.3.3.Naive T rölatif oranı	36
3.2.4.3.4.Th1 rölatif oranı	37
3.2.4.3.5.Th2 rölatif oranı	38
3.2.4.3.6.Th17 rölatif oranı	38
3.2.4.3.7.TREG rölatif oranı	39

3.2.4.3.8.Total Gamma/Delta T hücreleri	39
3.2.4.3.9. CD4+ $\gamma\delta$ ve CD4- $\gamma\delta$ T hücre rölatif oranı	40
3.2.4.3.10.TEM & CM rölatif oranı	41
3.2.4.3.11.ICP1-CTLA4 ekspresyonu	41
3.2.4.3.12.ICP2-PD1 ekspresyonu	42
3.2.4.3.13.CCR4 ekspresyonu	42
3.2.5. İstatistik Analiz	43
4. BULGULAR	44
4.1.Klinik ve Histopatolojik Özellikler	44
4.2.T Hücre Alt Gruplarının ve Reseptör Ekspresyonlarının Ortalamaları	45
4.3.Evreye Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar	45
4.4.KRAS Mutasyonuna Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar	48
4.5.MSI'ye Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar	48
4.6.Intratümöral ve Peritümöral Lenfosit Yanıtı Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar	50
4.7.LVI Varlığına Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar	51
4.8.PNI Varlığına Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar	52
4.9. Tümör Tomurcuklanma Skoruna Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar	53
4.10. Lenf Nodu Tümöral İnfiltrasyon Durumuna Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar	54

5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	76



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	Hastaların tümöral histopatolojik özellikleri	44
Tablo 2.	Evreye göre tümör özellikleri	46
Tablo 3.	Evreye göre T hücre alt grupları ve reseptör ekspresyon oranları	47
Tablo 4.	T hücre alt grupları ve reseptör ekspresyon oranların evre ile korelasyonu	47
Tablo 5.	KRAS mutasyon durumuna göre T hücre alt grup ve reseptör ekspresyon oranları.	48
Tablo 6.	MSI durumuna göre T hücre alt grup ve reseptör ekspresyon oranları.	49
Tablo 7.	İntratümöral lenfosit yanıtına durumuna göre T hücre alt grup ve reseptör ekspresyon oranları.	50
Tablo 8.	Peritümöral lenfosit yanıt durumuna göre T hücre alt grup ve reseptör ekspresyon oranları.	51
Tablo 9.	LVI varlığına göre T hücre alt grup ve reseptör ekspresyon oranları.	52
Tablo 10.	PNI varlığına göre T hücre alt grup ve reseptör ekspresyon oranları.	53
Tablo 11.	Tümör Tomurcuklanma skoruna göre T hücre alt grup ve reseptör ekspresyon oranları.	53
Tablo 12.	Çalışılan lenf nodunun tümör infiltrasyon durumuna göre hücre ekspresyon oranları ve reseptör ekspresyonları	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	VEGFR ve EGFR sinyal yollarının ve hedefe yönelik tedavilerin mekanizması şeması	6
Şekil 2.1.	Karsinogenez mekanizması şeması	8
Şekil 2.2.	İnvaziv marjin şeması	10
Şekil 2.3.	Kolon kanseri 8. AJCC TNM sınıflama Şeması	14
Şekil 2.4.	Kolon kanseri 8. AJCC TNM sınıflama Şeması	15
Şekil 3.	Lenfosit kapısı ve single hücrelerin seçimi flow sitometri görüntüsü	34
Şekil 4.	CD3 kapısı şeması flow sitometri histogram görüntüsü	35
Şekil 5.	CTL (CD3+CD8+) hücrelerin flow sitometrik histogram ve density plot bivariate histogram görüntüsü	35
Şekil 6.	Thelper (CD3+CD4+) hücrelerin flow sitometrik density plot bivariate histogram görüntüsü	36
Şekil 7.	Naive T (CD4+CCR7+ CD45RO negatif) hücrelerin CD4C/D45RO flow sitometrik density-plot bivariate histogram görüntüsü ve CCR7 pozitif alt popülasyon histogram görüntüsü	37
Şekil 8.	Thelper 1 (CD4+T-bet+) hücrelerin flow sitometrik density plot bivariate histogram görüntüsü	37
Şekil 9.	Thelper 2 (CD4+GATA-3+) hücrelerin flow sitometrik density plot bivariate histogram görüntüsü	38
Şekil 10.	Thelper 17 (CD4+ROR γ T+) hücrelerin flow sitometrik density plot bivariate histogram görüntüsü	38

Şekil 11.	TREG (CD4+CD25+FOXP3) hücrelerin CD4+CD25BRI+ flow sitometrik density plot bivariate histogram ve TREG histogram görüntüsü	39
Şekil 12.	$\gamma\delta$ T (CD3+ $\gamma\delta$ +) hücrelerin flow sitometrik density plot bivariate histogram görüntüsü	40
Şekil 13.	CD4+ $\gamma\delta$ T (CD3+ $\gamma\delta$ + CD4+) ve CD4- $\gamma\delta$ T (CD3+ $\gamma\delta$ + CD4negatif) hücrelerin flow sitometrik density plot bivariate histogram görüntüsü	40
Şekil 14.	CM (CD4+CD45RO+CCR7+) &TEM (CD4+CD45RO+CCR7negatif) hücrelerin CD45 RO flow sitometrik histogram ve CD4/CCR7 dot-plot bivariate histogram görüntüsü	41
Şekil 15.	CTLA4 eksprese eden T hücrelerin flow sitometrik univariate histogram görüntüsü	41
Şekil 16.	PD1 eksprese eden T hücrelerin flow sitometrik univariate histogram görüntüsü	42
Şekil 17.	CCR4 eksprese eden T hücrelerin flow sitometrik univariate histogram görüntüsü	42
Şekil 18.	T hücre alt grupların oranlarının ve CTLA4, PD1, CCR4 reseptör ekspresyonların ortalamaları	45
Şekil 19.	Evreye göre Th17 hücre oranlarının karşılaştırılması	46
Şekil 20.	MSI durumuna göre a)Th2 hücrelerin karşılaştırılması, b) TREG hücrelerin karşılaştırılması	49
Şekil 21.	İntratümöral lenfosit yanıtına göre Th1 hücrelerin karşılaştırılması	50

Şekil 22.	LVI varlığına göre a)Th17 hücrelerin karşılaştırması b)TREG hücrelerin karşılaştırılması	51
Şekil 23.	PNI varlığına göre Naive T hücrelerin karşılaştırılması	52
Şekil 24.	Lenf nodunun tümör infiltrasyon durumuna göre a) Th17 hücrelerin karşılaştırması, b) $\gamma\delta$ T hücrelerin karşılaştırması, c)CCR4 ekspresyonunun karşılaştırması	54



SİMGELER ve KISALTMALAR

ADCC	:	Antikor Bağımlı Hücrel Sitotoksite
AJCC	:	American Joint Committee on Cancer
AKT	:	Protein Kinaz B
APC	:	Adenomatöz Polipozis Koli
Bcl-xL	:	B-cell lymphoma-extra large gene
CCR4	:	C-C Kemokin Reseptörü Tip 4
CCR7	:	C-C Kemokin Reseptörü Tip 7
CD	:	Cluster of Differentiation
CM	:	Santral Memory/Hafıza T hücresi
CT/IT	:	Santral Tümör/İntra Tümör
BRAF	:	v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B
DFS	:	Disease Free Survival / Hastalıksız Sağ Kalım
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
EGFR	:	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	:	Epithelial to Mesenchymal Transition
ERK1	:	Extracellular Signal-Regulated Kinase 1
ERK2	:	Extracellular Signal-Regulated Kinase 2
FACS	:	Fluorescence Activated Cell Sorter
FBS	:	Fetal Bovine Serum
FFPE	:	Formalin ile Fikse Parafine Gömülmüş
FOXP3	:	Forkhead Box P3
GATA-3	:	GATA binding protein-3
$\gamma\delta$ T	:	Gamma Delta/ $\gamma\delta$ T hücreleri

GDP	:	Guanozin Difosfat
GTP	:	Guanozin Trifosfat
HDI	:	Human Development Index
H&E	:	Hematoksilen - Eozin Boyama
HNPCC	:	Hereditör Non-Polipozis Kolorektal Kanser
HRAS	:	Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
ICP	:	İmmün checkpoint/kontrol Noktası
IL-10	:	İnterlökin-10
IQR	:	Inter Quantile Range
ITK	:	IL-2-inducible T-cell kinase
İHC	:	İmmunhistokimya
İM	:	İnvaziv Marjin
KRAS	:	Kirsten rat sarcoma virüs
LVI	:	Lenfovasküler İnvazyon
MAPK	:	Mitogen-Activated Protein Kinases
MEK 1	:	Mitogen-Activated Protein Kinase 1
MEK 2	:	Mitogen-Activated Protein Kinase 2
MG	:	Myastenia Gravis
MMR	:	Mismatch Repair
MS	:	Multiple Sclerosis
MSI	:	Mikrosattelit Instabilite
MSI-H	:	Mikrosattelit Instabilite- Yüksek
NK	:	Natural Killer/ Doğal Öldürücü Hücreler
NLR	:	Nötrofil/Lenfosit oranı
NRAS	:	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog

NOS	:	Nitric Oxide Synthase
OS	:	Overall Survival/Genel Sağ Kalım
PBMCs	:	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	:	Phosphate-Buffered Saline
PD1	:	Programlanmış Hücre Ölüm Proteini 1
PI3K	:	Phosphoinositide 3-Kinase
PKC	:	Protein Kinase C
PLC	:	Phospholipase C
PNI	:	Peri-Nöral İnvazyon
PP2A	:	Protein Fosfataz 2
RORγt	:	Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma
RPMI	:	Roswell Park Memorial Institute
SHP2	:	Src Homology 2-SH2-Containing Protein Tyrosine Phosphatase 2
STAT 4	:	Signal Transducer and Activator of Transcription 4
STAT 6	:	Signal Transducer and Activator of Transcription 6
Th	:	Helper/Yardımcı T lenfosit
TIL	:	Tümörü İnfiltrate Eden Lenfosit
TCM	:	Santral Memory/Hafıza T hücresi
TEM	:	Efektör Memory/Hafıza T hücresi
TIL	:	Tümörü İnfiltrate eden Lenfosit
TLO	:	Tersiyer Lenfoid Organlar
TLR	:	Toll Benzeri Reseptör
TMB	:	Tümör Mutasyon Yüğü

TNM	:	Tümör-Nod-Metastaz
TREG	:	Regülatuvar T lenfosit
TTS	:	Tümör Tomurcuklanma Skoru
VEGF	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
5-FU	:	5- Fluorouracil
ZAP 70	:	Zeta-chain-associated protein kinase-70



1. GİRİŞ

1.1.Giriş

Kolorektal kanserler yıllık 1,9 milyon yeni vaka ve 935 bin ölüm ile dünyada üçüncü en sık görülen ve ikinci en sık öldüren kanserlerdir (Sung et al., 2021). Kolon kanserinin ciddiyetini, yayılımını ve prognozunu tanımlayan en sık kullanılan araç TNM evrelemesidir. T tümör boyut ve lokal yaygınlığı, N lenf nodu tutulumunu ve M uzak metastazı ifade etmektedir.

Tümör mikro-çevresi, tümörün biyolojik davranışını etkileyen birçok hücresel ve moleküler faktörler içerir. Tümörü infiltre eden immün hücreler bu mikroçevrenin esas oyuncularıdır. İmmün gözetim sadece tümörün eliminasyonunda değil aynı zamanda denge ve kaçış fazında da tümör kontrolünde görevlidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla mikro-çevrede etkili farklı immün hücrelerin bir kısmının iyi prognoz ile ilişkili olup bir kısmının ise immün gözetimi engellediği, anjiogenezi ve invazyon yeteneğini arttırdığı gösterilmiştir (Blank, Haanen, Ribas, & Schumacher, 2016). Kolon kanseri prognozu sadece tümöre ait moleküler değişikliklerle değil epigenetik ve immünolojik faktörler ile de belirlenir. Kolon kanserinde lokal ve sistemik immün yanıtta tümörü infiltre eden T lenfositleri (TIL) özellikle CD8+ sitotoksik T lenfositler invazyon/metastaz durumu ve sağ kalımı belirleyen en önemli alt gruptur (Leman, Sandford, Rhodes, & Kemp, 2018). Ayrıca yardımcı T lenfositler tümöre karşı gelişen immünitede rol alan tüm hücrelerin üzerinde düzenleyici olduğundan en az sitotoksik T lenfositler kadar önemlidir. Kolon kanserlerinde Th1, Th2, Th17 ve TREG'ler yardımcı T lenfosit alt grupları olarak tanımlanmıştır ve araştırılmıştır. Fakat hafıza T hücre alt grupları (santral hafıza T hücreleri, efektör hafıza T hücreleri) ve gamma delta ($\gamma\delta$ T) hücrelerin kolon kanseri immün gözetimi, anjiogenez ve invazyon mekanizması üzerine etkileri bilinmemektedir.

T hücresi uygun tümör antijeni ve MHC kompleksi ile birleşimi sonrası hızlı bir şekilde aktive olarak farklılaşmaya uğrar. Tümör antijenine karşı oluşturulan nihai T hücre cevabı hastalığın sonlanışını olumlu veya olumsuz etkileyebilir. Th1 hücreleri; sitotoksik T hücre (CTL) ve antikor bağımlı hücresel sitotoksikite (ADCC) yardım yoluyla tümöre

karşı savunma sağlar. T-bet (T-box transkripsiyon faktör) Th1 hücre farklılaşmasında rol alır. Th2 hücreleri ise hücre dışında yerleşik olan tehditlere karşı immüniteden sorumludur ve Th1'e karşıt şekilde CTL antagonizmi yapabilir. GATA-3 transkripsiyon faktörü; Th2 farklılaşmasında görevlidir (K. M. Murphy & Reiner, 2002). CCR4 Th2'ler tarafından eksprese edilen kemokin reseptörüdür; ayrıca TREG'ler, Th17 hücreler ve Th22 hücrelerince de eksprese edilir (Yoshie & Matsushima, 2015). CCR4'ün kolon kanseri yayılımı ve invazyonunda görevi olduğu ileri sürülmüştür (Al-haidari, Syk, Jirstrom, & Thorlacius, 2013). TREG'ler tümör toleransında görevlidir ve literatürde kanserlerde hem iyi hem de kötü prognostik olduklarını gösteren çalışmalar mevcuttur. TREG farklılaşmasında görevli transkripsiyon faktörü Foxp3 dür (Hanke et al., 2015; Tosolini et al., 2011). Th17 hücreleri tümör progresyonunda etkilidir. Transkripsiyon faktörü ROR γ t'dir. Th1 veya Th2 hücre aracılı intestinal inflamasyonu engelledikleri gösterilmiştir (Blatner et al., 2012). Gamma delta T hücreleri, hücre yüzeyinde $\gamma\delta$ T hücre reseptörü/ TCR taşır ve dolaşımdaki tüm T hücre popülasyonunun %1-5'ini, sindirim sisteminde ise %50'den fazlasını oluşturmakla birlikte **lenf nodlarındaki popülasyon oranları bilinmemektedir**. Gamma delta T hücreleri doğal immünite ve adaptif immünite arasında bağ kurar, kolon kanserinde anti-tümör etkinliği olduğu gibi anti-tümör etkinliği durdurucu olarak da rol alabilir (Lo Presti, Dieli, & Meraviglia, 2014). Sağlıklı kontrol kolon mukoza dokusu ile karşılaştırıldığında kolon adenokanser dokusunda naıve T hücrelerin ve hafıza T hücrelerin sayısal olarak azaldığı bildirilmiştir (Gianotti et al., 2008). Santral hafıza T hücreleri (CM) dokuda uzun süre latent kalabilen ve yüzeylerinde CD45RO isoform ve CCR7 eksprese eden hücrelerdir. Antijen ile uyarı durumunda hızlı bir yanıt verirler. Gelişen tümör durumunda, tümör antijeni ile tekrarlayan karşılaşmalar 'hafıza hücrelerine homeostatik konversiyon' yapabilirler. Tümör hücresine karşı hafızayı oluşturup tümöre karşı koruma sağlarlar (de Mey et al., 2018; Xiang, Lode, Gillies, & Reisfeld, 1999). Effektör hafıza T hücreleri (TEM) yüzeylerinde CD45RO eksprese eden fakat lenf nodlarında CCR7 ekspresyonunu kaybederek periferik dokulara göç eden hafıza hücrelerdir (Gattorno et al., 2005). Tümör dokusunda yüksek yoğunluklu efektör hafıza T hücrelerine sahip olan kolorektal kanserlerin daha uzun hastalıksız ve genel sağ kalıma sahip olduğu ve CD45RO+ hafıza

T hücrelerinin varlığının kolorektal kanser için bağımsız bir prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (Pages et al., 2005).

1.1.1.Amaç

Kolon kanserinde intratümöral CD8+ TIL'lerin ve TREG'lerin birçok çalışmada epidemiyolojik, tedavi yararı ve mikrosatellit durumu ile ilişkisi araştırılmıştır. Fakat, bu hücrelerle birlikte diğer bilinen T hücre alt gruplarının tümörü drene eden lenf nodundaki sayısal dağılımı araştırılmamıştır. Ayrıca, lokal lenf nodu T hücre yanıtı ile MSI ilişkisi de literatürde tanımlanmamıştır. **Yapılmış çalışmalarda genellikle lokal immün yanıt sadece tümörü infiltre eden ve stromadaki lenfositler üzerinden değerlendirilmiş ve anti-tümöral immün yanıtın geliştiği tümörlü dokuyu drene eden lenf nodlarındaki hücresel kompozisyon literatürde tanımlanmamıştır.**

Kolon kanserlerinde intratümöral ve sistemik Th1, Th2, Th17 ve TREG hücrelerin birçok çalışmada epidemiyolojik, tedavi yararı ve mikrosatellit durumu ile ilişkisi araştırılmıştır. Fakat, bu hücrelerle birlikte diğer bilinen T hücre alt gruplarının sayısal dağılımı araştırılmamıştır. Ayrıca, tümöre spesifik edinsel immün yanıtın olduğu lenf nodlarındaki T hücre alt gruplarının sayısal ve fonksiyonel dağılımlarının karşılaştırmalı analizi literatürde tanımlanmamıştır. Kolon kanserine karşı lokal lenf nodundaki ve intratümöral alandaki T hücre yanıtının MSI ile ilişkisini gösteren herhangi bir çalışmaya da literatürde rastlanmamıştır.

Bu çalışmadaki hipotezimiz, lokal lenf nodu T hücre popülasyonundaki kalitatif ve kantitatif farklılıkların kolon kanseri evresi ile ilişkili olduğudur. Hipotezimizi test etmek için ilk olarak, intra- ve peri-tümöral alanda T lenfosit infiltrasyon oranı ve tümörü drene eden lenf nodundaki lokal T hücre alt gruplarının karşılaştırmalı analizini yapmak amaçlanmıştır. İkinci amacımız ise, belirlediğimiz sayısal ve fonksiyonel T hücre alt grup dağılımının evre, KRAS mutasyonu, MSI durumu, intratümöral ve peritümöral lenfosit yanıt durumu, LVI varlığı, PNI varlığı, tümör tomurcuklanma skoru ve incelenen lenf nodunun tümöral infiltrasyon durumuna göre ilişkisini tanımlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Kolon kanseri gastrointestinal sistem kanserlerinin en sık görülen tipidir. Kolon kanserinin patogeneğinde kalıtsal epigenetik ve genetik değışiklikler rol alırken ayrıca beslenme alışkanlıkları ve yaşam şekli tercihleri bu sürece katkıda bulunabilir. Düşük gelişmişlik düzeyi (HDI) hayvan kaynaklı yiyeceklerin fazla tüketilmesi, azalmış aktivite ile sedentar yaşam ve artan vücut ağırlığı kolorektal kanser gelişimi ile ilişkili bağımsız risk faktörleridir. Aşırı alkol tüketimi, sigara içiciliği ve işlenmiş kırmızı et tüketimi kolon kanseri riskini arttıran diğer faktörler iken öğütülmemiş tam tahılların ve lifli gıdaların tüketimi, süt ürünleri veya kalsiyum takviyelerinin kullanımı riski azaltır (Sung et al., 2021).

Kolon kanserinin ciddiyetini, yayılımını ve prognozunu tanımlayan en sık kullanılan araç TNM evrelemesidir. T tümör boyut ve lokal yaygınlığı, N lenf nodu tutulumunu ve M uzak metastazı ifade etmektedir. Lokalize ya da erken evre hastalık, kanserin kolon dışına çıkmadığı evre I, IIA ve IIB kanserleri; Bölgesinde yayılmış hastalık kanserin kolon dışına çıkıp çevre dokulara veya bölgesel lenf nodlarına ulaştığı evre IIC ve III kanserleri; Uzak metastatik hastalık kanserin karaciğer, akciğer, uzak lenf nodları gibi vücudun uzak bölgelerine yayıldığı evre IV kanseri ifade eder. Kanserde sağ kalım oranları, aynı kanser türü ve evresine sahip kişilerin yüzde kaçının, teşhis edildikten sonra belirli bir süre -genellikle 5 yıl- hala hayatta olduğunu gösterir. Kolon kanseri için 5 yıllık rölatif sağ kalım oranı lokalize hastalıkta %91; bölgesinde yayılmış hastalıkta %72; uzak metastatik hastalıkta %14'tür (Siegel, Miller, Fuchs, & Jemal, 2021). Her ne kadar TNM sınıflaması prognoz ve tedavi kararı için önemli bilgi verse de kişiye özel tedavi yanıtları ve sağ kalım sonuçlarını predikte edemez.

Kolon kanseri hastalarında geleneksel patolojik risk değerlendirmesinde primer tümörün boyutu, atipik hücre morfolojisi, histolojik gradı, protein ve genetik belirteçlerin anormal ekspresyonları, proliferasyon indeksi, bölgesel lenf nodu tutulumu ve invaziv marjın gibi histo-patolojik özelliklere dikkat edilirken; klinik risk değerlendirmede radyolojik uzak organ metastazı ve lenf nodu tutulumunu da içeren tümör invazyon parametrelerinin tanımlandığı TNM evrelemesi sıklıkla kullanılır. Yine de bu geleneksel sınıflamalarla

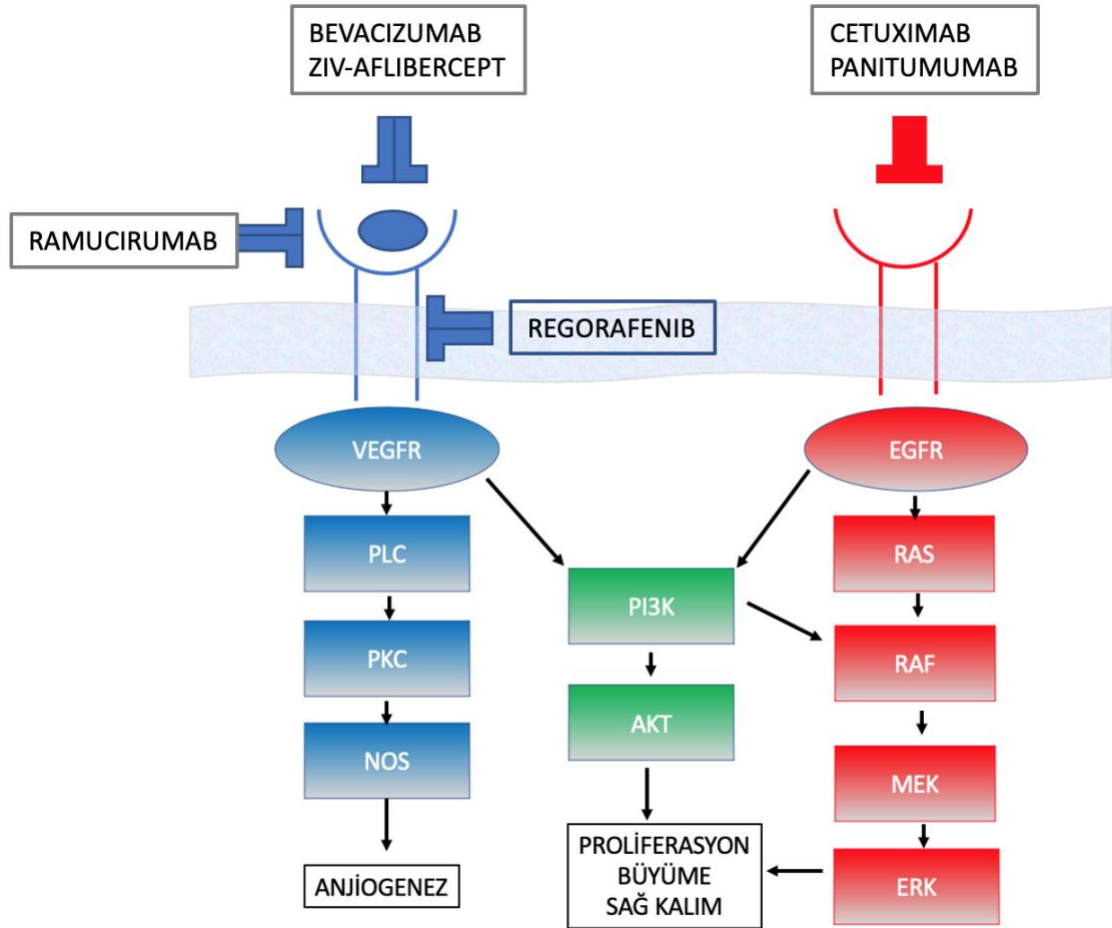
hasta prognozu veya nüks riski ile ilgili sınırlı tahminde bulunulabilir (Galon et al., 2012). Kanseri sınıflamasının iyileştirilmesi için son zamanlarda geliştirilen yeni girişimler arasında tümörün biyobelirteçlerinin immün-histokimyasal analizi, immün hücre alt gruplarının akım-sitometrik analizi, moleküler gen imzaları, proteomik ve genetik özelliklerinin belirlenmesi bulunmaktadır (Bruni, Angell, & Galon, 2020).

Karsinogenez sürecinde invaziv tümör ile konağın bağışıklık sistemi arasında kanserin ilerlemesini şekillendiren sürekli bir etkileşim vardır. ‘İmmün düzen’ olarak da adlandırılan bu etkileşim; bir tümör içinde immün hücrelerin tipi, yoğunluğu, hücre içi lokalizasyonu, immün fonksiyonel oryantasyonu ile belirlenen immün parametrelerin bütün halinde düzenlenmesidir (Angell, Bruni, Barrett, Herbst, & Galon, 2020; Bruni et al., 2020).

2.1.Kolon Kanseri İnflamatuvar Patogenezi

Kolon kanseri patogenezinde kalıtsal genetik değişiklikler önemli rol alır. Monozigotik ve dizigotik ikizlerle yapılmış büyük bir çalışmaya göre genetik defektlere bağlı kansere yatkınlık oranı kolorektal kanserler için %35 (Galon et al., 2006; Lichtenstein et al., 2000) olarak saptanmıştır. Kolon kanseri çoğunlukla uzun bir süreçte displastik premalign öncü lezyonlardan gelişir. Kolon adenomlarının %80’inde gelişen APC gen mutasyonları çok basamaklı kolon kanseri oluşum sürecinin ilk evresidir. Adenomdan karsinomaya geçiş sırasında onkogen KRAS aktivasyon mutasyonları ve TP53 tümör supresyon gen inaktivasyon mutasyonları izler. Çoğunlukla kromozom sayısı ve yapılarındaki değişikliklerin yol açtığı kromozomal instabilite de karsinogenezde rol alan karakteristik mutasyonlara katkı sağlar (Brenner, Kloor, & Pox, 2014). KRAS gen ürünü olan KRAS proteini; hücrenin yüzeyindeki bir reseptörden hücrenin çekirdeğindeki DNA’ya sinyal ileten hücre içindeki protein zinciri MAPK/ERK yolunun (Ras/Raf/MAPK/ERK yolu olarak da bilinir) parçasıdır ve GTP molekülünü GDP molekülüne dönüştüren hidrolaz enzim ailesinden GTPaz olarak görev alır. KRAS mutasyonları genellikle kendi kendini sınırlayan bir hiperplastik adenom veya borderline lezyona yol açar, ancak öncesinde bir APC mutasyonundan sonra ortaya çıkarlarsa genellikle kansere ilerler (Vogelstein & Kinzler, 2004). KRAS, protein dinamiklerini kullanarak hücre içi sinyalizasyonda, büyüme faktörü yayılımında, hücre

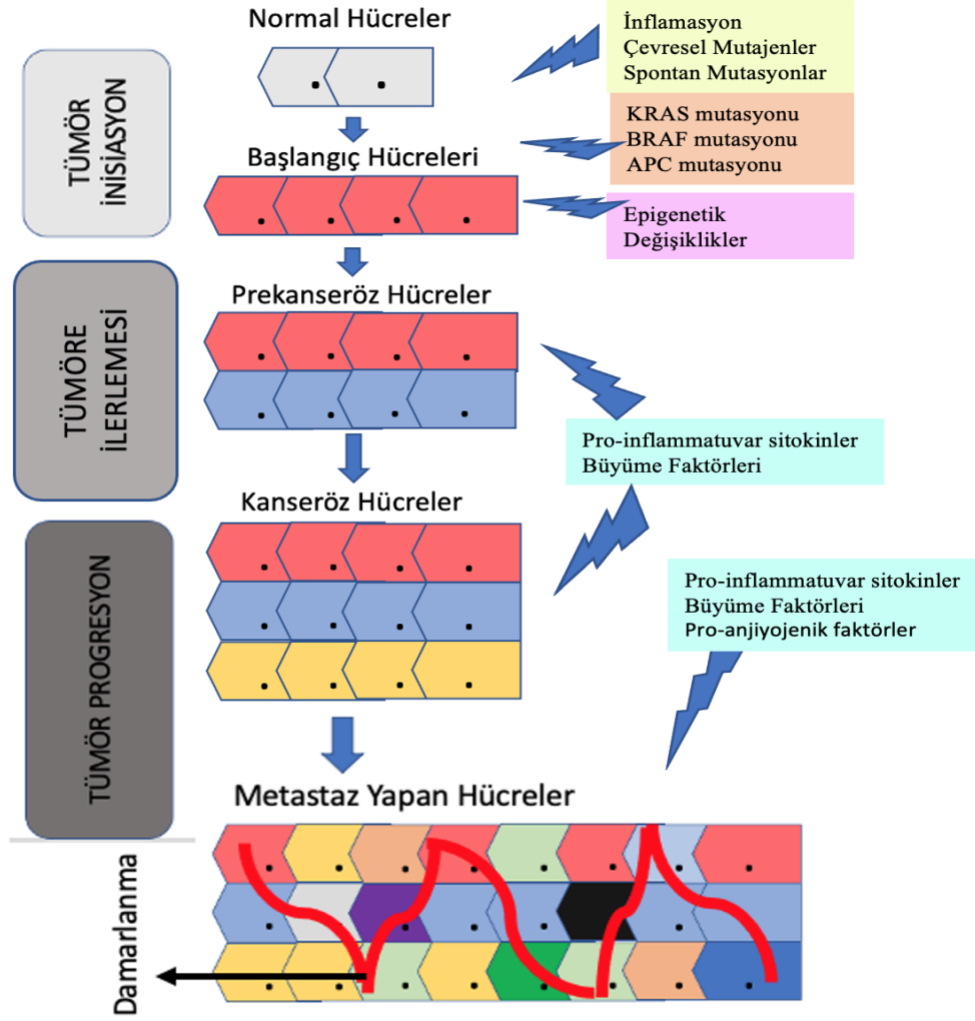
proliferasyonunda ve kanser hücresi metabolizmasında Warburg etkisi ile sağ kalımı sağlayan anahtar moleküldür. MAPK yolağında RAS en fazla mutasyona uğrayan basamaktır. Son yıllardaki çalışmalarla kolon kanseri moleküler patogenezi, prognozu ve tedavi yanıtı arasındaki bağlantılar daha da anlaşıldı. Kolon kanseri hastalarında KRAS kodon 12 veya 13 mutasyon sıklığı %37.7 izlenirken; mutasyonu olan hastalarda prognoz daha kötü izlenmiştir (Andreyev, Norman, Cunningham, Oates, & Clarke, 1998). MAPK yolağı bağımlı kolon kanseri metastazların tedavisinde EGFR hedefli tedavilerin EGFR'nin ekstraselüler domainine bağlanarak pro-onkojenik yolda down-regülasyon yaptığı; proliferasyon, migrasyon, anjiogenez ve adezyonu engelleyerek anti-tümör etkinlikle hastanın sağ kalım sürelerini uzattığı yapılan klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır (Şekil 1.)(Piawah & Venook, 2019).



Şekil 1. VEGFR ve EGFR sinyal yollarının ve hedefe yönelik tedavilerin mekanizması (Piawah & Venook, 2019).

Bir kısım kolon kanseri ise DNA hasar tamir genlerindeki (mismatch repair genleri) bozukluğa bağlı mikrosatellit instabilitesi (MSI) ile ilişkili bulunmuştur (Lindor et al., 2004). Mismatch onarım sistemi DNA replikasyonu sırasında kimyasal veya fiziksel hasar nedeniyle oluşan anormalliklerin tanınması ve eksize edilmesinden sorumludur. Kolon kanserinin heterojen moleküler patogenezi sebebi ile kalıtsal familial adenomatöz polipozis ve non-polipozis kolon kanser (Lynch sendrom/HNPCC) dışında kolon kanseri riskini belirleyen genetik faktörler hala tam olarak anlaşılamamıştır. Lynch sendrom ilişkili kanserlerde DNA mismatch repair genlerin eksikliği görülür ve MSI-H tümörlerdir; Oysa familial adenomatöz polipozis ile ilişkili kanserler klasik adenoma-karsinoma sırasını takip ederler. HNPCC ve sporadik kolon kanserlerin %15'inde MSI-H fenotip gözlenir ve MSI-H kolon kanserlerin evre-spesifik prognozunun daha iyi olduğu gösterilmiştir (Lindor et al., 2004).

Karsinogenez sürecinde spontan mutasyonlar, çevresel mutajenler veya inflamasyon kaynaklı epigenetik değişiklikler normal kolon epitel hücresinden kolon kanser hücresine dönüşümü başlatır ve bu aşamaya 'Tümör İnisiyasyon=Başlangıç' evresi denir. Başlangıç hücreleri salınan büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler aracılığı ile tümör mikro-çevresindeki diğer hücrelerle etkileşim halindedir. İnflamatuvar mikroçevre sadece tümör oluşumuna katkıda bulunmaz aynı zamanda büyüme faktörleri ve proinflamatuvar sitokinler sağlayarak tümöre ilerleme ve progresyonu da destekler (**Şekil 2.1**). Tümör mikroçevresi üç ana hücre tipinden oluşur: Tümör ilişkili fibroblastlar, vasküler hücreler ve mikroçevreyi infiltre eden immün hücreler (Schmitt & Greten, 2021). Kolon kanserinin davranışını, prognozunu ve tedavi yanıtını predikte edecek histopatolojik incelemelerde stroma, immün infiltratlar, sinirler ve damarlar bütün bir mikroçevre olarak incelenir.



Şekil 2.1.Karsinogenez mekanizması

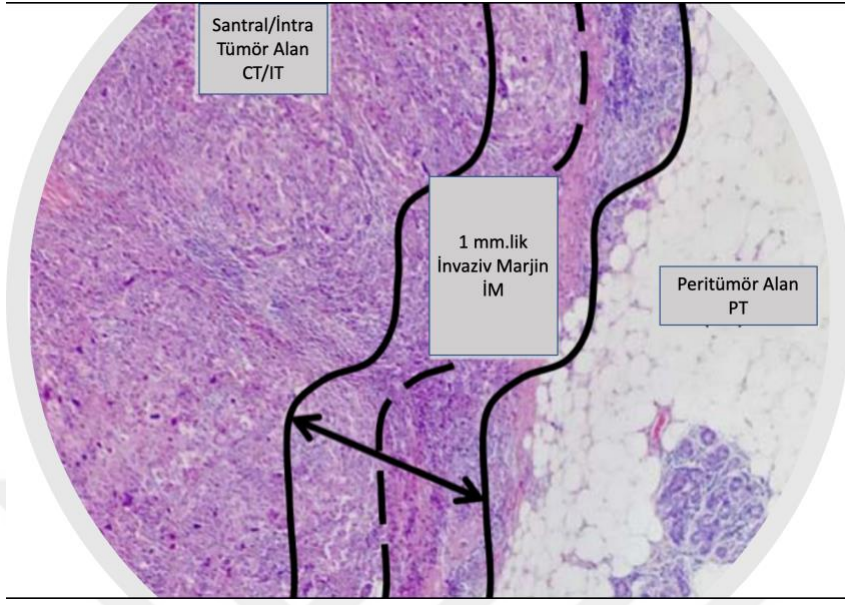
Kolon kanseri oluşumu ve progresyonu immün homeostaz yetersizlikleri ile sıkı ilişkili olup son zamanlarda yapılan araştırmalarda NLR, peri-tümöral lenfositik reaksiyon, intra-tümöral lenfositik reaksiyon, TIL yoğunluğu ve tümör immünoskor kolorektal kanser, immün durumunu tanımlamada kullanılmıştır (Galon et al., 2006; Guo, Wang, Qiu, Pu, & Chang, 2020). İmmün skor özellikle CD3+ ve CD8+ T hücrelerinin hem intratümöral/tümör merkezinde hem de peritümöral/invazyon marjinde ölçülmesi ile hesaplanır (Angell et al., 2020).

Farklı tümör tiplerinde ve farklı hastalarda tümörü infiltre eden hücreler de farklılık gösterir. Bir tümörde makrofajlar, dendritik hücreler, mast hücreleri, NK hücreleri, naive

ve hafıza lenfositler, B hücreleri, Th1, Th2, Th17, TREGs, T foliküler yardımcı hücreler ve CTL'ler de dahil tüm immün hücreler bulunabilir. Yapılmış insan kanser çalışmalarında İHC ve immün gen analiz yöntemleri ile bu immün hücreler tümör içinde, tümörün invaziv marjinde veya drene eden komşu tersiyer lenfoid dokularda lokalize olabileceği bildirilmiştir (Fridman, Pages, Sautes-Fridman, & Galon, 2012; Galon, Fridman, & Pages, 2007; Galon et al., 2012). Detaylı histopatolojik analizler sonucu tümör immün infiltrasyonların rastlantısal dağılmadığını; tümörün merkezinde, invazyon marjinde ve bitişindeki drene eden sekonder-tersiyer lenfid organlarda yoğun infiltratlar şeklinde lokalize ve organize olduğu gösterilmiştir (Galon et al., 2012). Ayrıca İHC yöntemi ile değerlendirilen TIL'lerin tümör büyümesini baskılayan immün hücrelerin toplanmasını, olgunlaşmasını ve aktivasyonunu da sağladığı gösterilmiştir (Idos et al., 2020).

2.1.1. İntratümöral ve Peritümöral Lenfosit Yanıt

'İmmün düzen' içinde lenfositler, farklı yoğunluklarda, tümör merkezinde intratümöral veya tümör invazyon marjinin dışında (**Şekil 2.2**) peritümöral şekilde lokalize olabilirler. İmmün fonksiyonel oryantasyonu da belirleyen bu yerleşim paternleri hastalar arasında ve farklı tümörler arasında değişiklik gösterebilir (Angell et al., 2020; Bruni et al., 2020). Tümör içindeki immün infiltratların değerlendirilmesi çoğunlukla 'TIL' olarak adlandırılır ve son zamanlarda artmış hastalık kontrolü ve sağ kalımların izlendiği immunoterapiler için de hem prognostik hem de prediktif optimal bir biyobelirteç olarak da kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmaların çoğunda alt grup tayini olmadan genel lenfosit infiltrasyonu IHC yöntemi ile bakılırken son zamanlarda yapılan çalışmalarda CD3+ ve CD8+ TIL subgrupları sıklıkla kullanılmıştır; birkaç çalışmada da FOXP3+ veya CD45RO+ TIL'ler de İHC yöntemleri ile araştırılmıştır. Daha önce yapılan epidemiyolojik ve klinik çalışmalarda kolorektal kanserlerin mevcut çalışmalarda kullanılan TIL skorum sistemi farklı tümörlerde değişiklikler gösterse de kolon kanseri için tanımlanmış skorum 'Uluslararası İmmüno-Onkoloji Biyobelirteç Çalışma Grubu' tarafından formalin ile fikse parafine gömülmüş (FFPE) dokularda tanımlanmış ve standardize edilmiştir (Hendry et al., 2017).



Şekil 2.2. İnvaziv Marjin (IM): konak doku ile malign hücre yuvalarını 1mm mesafede ayıran sınırın merkezinde kalan alan olarak tanımlanır (Hendry et al., 2017).

‘Uluslararası İmmuno-Onkoloji Biyobelirteç Çalışma Grubu’nun önerisine göre semikantitatif H&E bazlı TIL değerlendirmesi geniş ölçekli randomize klinik araştırmalar, preklinik araştırmalar ve günlük patoloji pratiğinde, klinik ilişkili bilgileri değerlendirmede kullanılabilir bir yöntemdir. Malign melanoma ve akciğer kanserine benzer şekilde kolon kanserinde de TIL’ler homojen dağılmadığından daha çok IM TIL’ler daha fazla prognostik bulunduğu için IM ve CT/IT TIL’lerin ayrı ayrı bildirilmesi önerilmektedir (Hendry et al., 2017; Pages et al., 2010). Yapılmış birçok İHC çalışmalarında TIL lokalizasyonu, yoğunluğu, farklı alt grupları değerlendirilmiş olup hem erken evre adjuvan tedavi alacak hastalarda hem de metastatik ileri evre hastalarda hastalıksız sağ kalım (DFS) ve genel sağ kalım (OS) prediksyonunda TNM evresine ilave olarak (Ferris & Galon, 2016; Mei et al., 2014; Pages et al., 2010) kuvvetli bir prognostik faktör olarak immün sınıflamada yerini almıştır.

2.1.2.Lenfovasküler İnvazyon/LVI

Kolorektal kanserde lenfovasküler invazyon, evreden bağımsız güçlü bir prognostik faktör olarak kabul edilir ve Evre II tümörlü hastalarda adjuvan kemoterapiye ilişkin

kararları etkiler. Evre II yüksek risk opere edilmiş hastalarda LVI varlığında hastalarda daha kısa DFS ve OS ile ilişkili iken; evre I hastalarda ise OS etkilenmeden sadece DFS üzerine negatif etki gösterilmiştir (Gao et al., 2021; Yuan et al., 2017).

H&E ile boyanmış patolojik slaytın incelenmesinde LVI'nın histolojik teşhisi için kriterler şunları içerir (Harris et al., 2008): bir vasküler boşluk içinde tümör hücrelerinin varlığı; tümör hücrelerini çevreleyen eritrositlerin varlığı; boşluğu kaplayan endotel hücrelerinin tanımlanması; tümörü çevreleyen elastik bir laminanın varlığı; ve tümör hücrelerinin damar duvarına bağlanması.

2.1.3. Perinöral İnvazyon/PNI

Perinöral invazyon lokal progresyon belirtici olan sinirlerin neoplastik invazyonudur. Tümör hücreleri sinirin içinde, çevresinde veya 3 sinir katmanından herhangi biri arasında büyüyebilir. PNI durumunda tümör hücreleri ilişkili sinirin çevresinin %33'ünden fazlasını sarar (Knijn, Mogk, Teerenstra, Simmer, & Nagtegaal, 2016). Farklı tümörlerde farklılık gösterse de en sık pankreas adenokarsinomlarında (%98), kolanjiokarsinomlarda (%75 ila %85 arasında), prostat kanserinde (%75) ve mide adenokarsinomları (%60) PNI izlenir. Kolorektal kanserler için PNI insidansı %12-25 gibi çok daha düşüktür (Gao et al., 2021; Harris et al., 2008; Knijn et al., 2016). Kolorektal kanserler için PNI bağımsız bir kötü prognoz göstergesidir ve azalmış sağ kalım, artmış lenf nodu metastazı ve lokal rekürrenslerle ilişkili bulunmuştur (Al-Sukhni et al., 2017; Hu, Li, & Hu, 2020; Knijn et al., 2016).

2.1.4. Tümör Tomurcuklanma Skoru

Tümör tomurcuklanma skoru (Clarke et al.), invaziv marjinde tek bir tümör hücresi veya beşten az hücre içeren tek bir tümör kümesi varlığı olarak tanımlanır. TTS peritümöral tomucuklanma ve intratümöral tomurcuklanma olarak gruplanabilir fakat prognostik etkisi analiz yapılan lokasyondan bağımsızdır (Gao et al., 2021; Lugli et al., 2017). Tümör tomurcuklanması kolon kanseri için bağımsız bir kötü risk faktörüdür; ileri evre, yüksek tümör gradı, artmış rekürrens riski, kısa sağ kalım, LVI ile lenf nodu ve uzak metastaz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lugli et al., 2017). International Tumor Budding Consensus Conference 2016'da kolon kanserinde tümör tomurcuklanma skoru değerlendirme ve raporlamasının standardize önerileri yapılmıştır. Tomurcuklanma

skoru H&E slaytında peritümöral inflamasyonun olmadığı, glandular fragmentasyon izlenmeyen invaziv marjinde 0.785 mm²'lik (20X büyütme) bir 'hotspot' alanda değerlendirilmelidir (Lugli et al., 2017). H&E slaytta 20X büyütme alanında skorlama için invazyon marjinde en fazla tomurcuklanma olan alan seçilir, 'hotspot' alanı belirlemek için X10 büyütme alanında 10 alan taranır, seçilen 'hotspot' alanda X20 büyütme tümör tomucuklanmaları sayılır. 0.785 mm²'lik bir 'hotspot' alanda tomurcuklanma sayısı 0-4 arası ise düşük; 5-9 arası ise orta; ≥10 ise yüksek tomurcuklanma skoru olarak değerlendirilir (Lugli et al., 2017).

2.2.Kolon Kanseri Moleküler Patogenezi

Son 20 yılda kolon kanserinin heterojen moleküler patogenezinin ve kalıtsal kolorektal kanser formlarının tanımlanması sonrası moleküler patogenezi ile prognoz ve tedavi yanıtı arasındaki bağlantılar daha belirgin hale gelmiştir. Kolon adenomlarının %80'inde gelişen APC gen mutasyonları çok basamaklı kolon kanseri oluşum sürecinin ilk evresidir. Adenomdan karsinomaya geçiş sırasında onkogen RAS aktivasyon mutasyonları- HRAS, NRAS ve KRAS'ı içerir- ve TP53 tümör supresyon gen inaktivasyon mutasyonları izler. Çoğunlukla kromozom sayısı ve yapılarındaki değişikliklerin yol açtığı kromozomal instabilite de karsinogenezde rol alan karakteristik mutasyonlara katkı sağlar (Brenner et al., 2014). RAS aktivasyon mutasyonu tüm kanserlerinin %30'unda izlenirken en yüksek prevalans sırasıyla: pankreas kanserlerinin %90'ında, kolon kanserlerinin %50'sinde, tiroid kanserlerinin %50'sinde, akciğer kanserlerinin %30'unda ve malign melanomların %25'inde izlenir (Roberts & Der, 2007). RAS birçok yolak efektörlerini etkinleştirerek hücre yüzeyinden hücre içine sinyalizasyonu sağlar (**Şekil 1.1**). Öncelikle PI3K/AKT ve RAF kinazı yolağını aktifler. RAF aracılığı ile aşağıya doğru MEK 1 ve 2, sonrasında da ERK 1 ve 2 takip eden aktivasyonları ile tümör hücre proliferasyonu, uzayan sağ kalım, invazyon ve migrasyon gerçekleşir (Maffeis, Nicole, & Cappellessio, 2019).

2.2.1 KRAS

Kolon kanseri moleküler belirteçlerinin en belirgin örneği Ras/Raf/MAPK/ERK yolağında %36-43'lük insidans ile en sık mutasyona uğrayan ve metastatik hastalarda rutin klinik pratikte kullanılan KRAS mutasyonudur (Lievre et al., 2006; Maffeis et al.,

2019). Kolon kanseri KRAS onkogeni %80 sıklıkla en sık kodon 12 ve %15 sıklıkla kodon 13' de gerçekleşirken diğer KRAS mutasyon alt tipleri kodon 59, 61, 117 ve kodon 146'da izlenir. KRAS mutasyonu, etkilenen hastalarda anti-EGFR antikoru ile monoterapiye yanıt oranlarının %20'den %0'a düşmesine ve tedavi yanıtınlığına sebep olur (Maffeis et al., 2019) . RAS sinyalizasyonu aynı zamanda EMT'da da rol alır. KRAS mutant tümörlerde MMR defekt olasılığı daha düşük izlenip daha yüksek gradlı ve proksimal sağ kolonda daha fazla yerleşim göstermişlerdir (Gonsalves et al., 2014). KRAS wild metastatik kolon kanseri hastalarının cetuximab ve panitumumab gibi EGFR hedefli tedavilere daha iyi yanıt verdiği ve bu tedavilerle daha uzun sağ kalımlar izlendiği bildirilmiştir (Lievre et al., 2006).

2.2.2.NRAS ve HRAS

Kolon kanseri vakalarında NRAS mutasyon insidansı %5-8 iken HRAS mutasyonu %3 gibi çok nadir izlenir (Maffeis et al., 2019).

2.2.3.BRAF

BRAF geni, Ras/Raf/MAPK/ERK yolağındaki anahtar genlerden biridir. Hücresel büyüme, çoğalma, farklılaşma, göç ve apoptozis gibi birçok temel hücresel süreci düzenler (Dhillon, Hagan, Rath, & Kolch, 2007). BRAF mutasyonları, MAPK sinyal yolunun yapısal aktivasyonuna yol açar ve artmış kinaz aktivitesi sonucunda azalmış apoptozis, artan invazyon ve metastazlar izlenir. BRAF mutasyonlarının birkaç alt tipi vardır ama en sık görüleni kodon 600'de gelişen BRAF V600E mutasyonudur ve kolon kanserinde insidansı %10-15'tir (Cen et al., 2021; Gonsalves et al., 2014). BRAF mutasyonu daha çok proksimal sağ kolon kanserlerinde izlenip yüksek gradlı kötü diferansiasyon ile, MSI-H, lenf nodu ve peritoneal metastaz ile seyreder. Son çalışmalarla MAPK aktivasyonunun, IL-10, VEGF, PD-1, TREG vb. gibi immünsupresif faktörlerin artışına yol açtığı ve BRAF mutant kolon kanserlerin geleneksel tedavilere dirençli olduğu gösterilmiştir (Cen et al., 2021; Reddy, Reuben, & Wargo, 2016).

2.3.Kolon Kanseri ve TNM Evresi

Tümör invazyon derinliği, lenf nodu ve uzak organ tutulumlarına dayanan geleneksel TNM sınıflaması (Şekil 2.3 ve 2.4) prognoz ve tedavi kararı için önemli bilgi verse de kişiye özel tedavi yanıtları ve sağ kalım sonuçlarını predikte edemez.

Lokalize ya da erken evre hastalık, kanserin kolon dışına çıkmadığı evre I, IIA ve IIB kanserleri; Bölgesinde yayılmış hastalık kanserin kolon dışına çıkıp çevre dokulara veya bölgesel lenf nodlarına ulaştığı evre IIC ve III kanserleri; Uzak metastatik hastalık kanserin karaciğer, akciğer, uzak lenf nodları gibi vücudun uzak bölgelerine yayıldığı evre IV kanseri ifade eder. Kolon kanseri için 5 yıllık rölatif OS oranı lokalize hastalıkta %91; bölgesinde yayılmış hastalıkta %72; uzak metastatik hastalıkta %14'tür (Siegel et al., 2021). Kolon kanseri heterojenitesi ve moleküler alt sınıfların tanımlanması ile lokal immün düzenin DFS ve OS için en önemli prognostik faktör (Pages et al., 2010) olduğu gösterilse de klinik pratikte tedavi ve takip kararı hala TNM evrelemesine göre yapılmaktadır.

T	TÜMÖR
Tis	Intramukozal karsinom (lamina propria ile sınırlı)
T1	Tümör submukozaya invaze
T2	Tümör muskularis propriaya invaze
T3	Tümör muskularis propriayı geçip perikolorektal dokulara invaze
T4a	Tümör viseral peritona invaze (büyük kolon perforasyonu da dahil)
T4b	Tümör direkt olarak çevre dokulara yapışmış veya invaze etmiş
N	LENF NODU
N0	Lenf nodu metastazı yok
N1a	1 Bölgesel lenf nodu metastazı
N1b	2 veya 3 bölgesel lenf nodu metastazı
N1c	Bölgesel lenf nodu metastazı yok fakat subseroza, mezenter ve peritonsuz perikolik dokularda tümör depositleri mevcut
N2a	4 -6 bölgesel lenf nodu metastazı
N2b	7 veya daha fazla bölgesel lenf nodu metastazı
M	METASTAZ
M0	Metastaz yok
M1a	Periton metastazı olmadan tek uzak organ metastazı
M1b	Periton metastazı olmadan ≥ 2 uzak organ metastazı
M1c	Periton metastazı ± uzak organ metastazı

Şekil 2.3. Kolon kanseri 8. AJCC TNM sınıflaması

	T	N	M
EVRE 0	Tis	N0	M0
EVRE 1	T1, T2	N0	M0
EVRE 2A	T3	N0	M0
EVRE 2B	T4a	N0	M0
EVRE 2C	T4b	N0	M0
EVRE 3A	T1-T2	N1/N1c	M0
EVRE 3A	T1	N2a	M0
EVRE 3B	T3-T4a	N1/N1c	M0
EVRE 3B	T2-T3	N2a	M0
EVRE 3B	T1-T2	N2b	M0
EVRE 3C	T4a	N2a	M0
EVRE 3C	T3-T4a	N2b	M0
EVRE 3C	T4b	N1-N2	M0
EVRE 4A	Herhangi T	Herhangi N	M1a
EVRE 4B	Herhangi T	Herhangi N	M1b
EVRE 4C	Herhangi T	Herhangi N	M1c

Şekil 2.4. Kolon kanseri 8. AJCC TNM sınıflaması

2.4.Kolon Kanseri ve MSI

Mikrosatellitler insan genomu boyunca dağınık yerleşimli, çiftler halinde tekrar eden kısa DNA dizileridir. Mikrosatellitlerde oluşan hatalar MMR genleri tarafından düzeltilir. Mismatch onarım sistemi DNA replikasyonu sırasında kimyasal veya fiziksel hasar nedeniyle oluşan anormalliklerin tanınması ve eksize edilmesinden sorumludur. MSI durumu, DNA mismatch onarım aktivitesinin kaybından kaynaklanan değişken bir fenotiptir. MSI, tüm kolon kanseri hastaların yaklaşık %15'inde tespit edilir. Bunların %3'ü Lynch sendromunda izlenirken ve diğer %12'sine ise sporadik veya MLH1 geninin promotörün kazanılmış hipermetilasyonu neden olur.

MSI farklı şekilde tanımlanmadığı sürece MSI-H/ MSI yüksek anlamına gelen ve Bethesda kılavuzuna göre mikrosatellit panelin %30'unun mutasyona uğradığı durum olarak tanımlanır. En az 1 mikrosatellit mutasyonu olup ama panelin <%30 olan kolon kanserleri MSI-L/düşük MSI-H tümörlerdir. MSI, PCR ve İHC yöntemi ile değerlendirilebilir. Kolorektal kanserlerde bu iki yöntemin sonuçlarının benzer olduğu gösterilmiştir. Genetik analiz yapılamayan durumda MMR genlerin eksprese ettiği MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 proteinler İHC yöntemle tayin edilerek MSI durumu belirlenebilir (Boland & Goel, 2010). Tam negatiflik kayıp olarak kabul edilmektedir.

En sık MLH1 ve MSH2 de kayıp bildirilmiştir. MLH1'e PMS2 kaybı, MSH2'e MSH6 kaybı eşlik edebilir. Lynch sendromunda çoğunlukla MLH1 ve MSH2 germline mutasyonları izlenirken sporadik kolon kanserlerinde MLH1'in hipermetilasyonu veya eşlik eden BRAF mutasyonu saptanır (K. M. Murphy et al., 2006).

Kolorektal kanserlerin yaklaşık %15'i, DNA mismatch onarım gen hasarı sonucu MSI-H formunda prezente olur ve bu tümörlerde özellikle CD8+ T lenfosit infiltrasyonu artmış izlenmiştir (Pages et al., 2010). Mismatch onarım defektleri sonucunda multiple immünojenik peptidler oluşur ve anti-tümör immün yanıtı uyarır. Artmış TIL olan MSI-H tümörlerin sağ kalımları MSI-L tümörlerden daha uzun olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda MSI, kemoterapi yanıt predikasyonu için de araştırılmış ve MSI-H kolon kanserlerin kemoterapiden yarar görmediği; opere edilmiş MSI-H kolon kanserinde adjuvan 5-FU bazlı kemoterapi ile ölüm riskinin evre II'de 3 kat, evre III'de 2 kat arttığı bildirilmiştir (Boland & Goel, 2010; Ribic et al., 2003). Mekanik olarak, MSI-H kolon kanserinde genetik instabiliteye bağlı üretilen neoantijenlerin potansiyel tümöre özgü efektör T hücrelerinin sayısını arttırdığı düşünülmektedir ve bu efektör T hücreler ICI'ler tarafından aktive edilebilir. Bu hipoteze dayanarak MSI-H kolon kanserlerinde immünoterapötik tedavilerin etkinliği son dönemlerde kanıtlanmıştır.

2.5. Kolon Kanseri, İmmün Mikroçevre ve T Hücre Konstitüsüyonu

İmmün sistem ana işlevi savunma olan, dolaşım sistemi ve bağışıklık sisteminin parçası bir organ sistemidir. Geniş bir lenf ağından, lenfatik damarlardan, lenf düğümlerinden, lenfoid organlardan ve lenfoid dokulardan oluşur. Primer lenfoid organlar, olgunlaşmamış progenitör hücrelerden lenfositler üretir. Timus ve kemik iliği, lenfosit dokularının üretimi ve erken klonal seçiminde rol oynayan primer lenfoid organları oluşturur. Lenf nodlarını ve dalağı içeren sekonder lenfoid organlar, olgunlaşmış naive lenfositleri barındırır ve adaptif immün yanıtı başlatır. Sekonder lenfoid organlar, antijen aracılı lenfosit aktivasyon bölgeleridir. Aktivasyon klonal genişlemeye ve afinite olgunlaşmasına yol açar. Olgun lenfositler, spesifik antijenleriyle karşılaşana kadar kan ve sekonder lenfoid organlar arasında dolaşır (Ruddle & Akirav, 2009). Tersiyer lenfoid organlar; kronik enfeksiyon, transplante organ rejeksiyonu, bazı kanserler ve otoimmün

hastalıklar gibi kronik inflamasyon bölgelerinde periferik dokularda oluşan anormal lenf düğümü benzeri yapılardır. T ve B hücrelerinin bu organize birikimleri sekonder lenfoid organlara benzer ve oto-reaktif efektör hücreler üretir. Lenf nodları ve tersiyer lenfoid organlar arasındaki dikkate değer bir fark, birincisinin kapsüllenmiş olması, ikincisinin ise bir organ veya doku içinde sınırlı immün ve stromal hücrelerden oluşmasıdır (Yin, Mohanta, Maffia, & Habenicht, 2017).

İmmün sistem, kanserlerin oluşumunda ve ilerlemesinde de önemli rol oynar. İmmün kontrol noktasının bloke edilmesinin, birçok tümör tiplerinde anti-tümör bağışıklık tepkisini iyileştirmede etkili olduğu kanıtlandıktan sonra bile tümör immünoterapisi hala birçok bilinmeyen ile araştırılmaktadır. Lenf nodları ve tersiyer lenfatik dokuların kanser immün mikroçevresinde önemli modülatör rolleri olduğunu (Lin, Hu, Zhang, & Hu, 2019) ve lokal anti-tümör immün yanıt etkinliğini desteklediği bildirilmiştir (Colbeck, Ager, Gallimore, & Jones, 2017).

Tümör mikro-çevresi, tümörün biyolojik davranışını etkileyen birçok hücrel ve moleküler faktörler içerir. Tümörü infiltre eden immün hücreler bu mikroçevrenin esas oyuncularıdır. İmmün gözetim sadece tümörün eliminasyonunda değil aynı zamanda denge ve kaçış fazında da tümör kontrolünde görevlidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla mikro-çevrede etkili farklı immün hücrelerin bir kısmının iyi prognozla ilişkili olup bir kısmının ise immün gözetimi engellediği, anjiogenezi ve invazyon yeteneğini arttırdığı gösterilmiştir (Blank et al., 2016).

CD8+sitotoksik T lenfositler, CD4+ Th, NK hücreleri, makrofajlar gibi doğal ve adaptif immün sistem hücreleri ile bunlardan salgılanan interferon gama ve IL-12 gibi sitokinler insan karsinomunun şekillendirilmesi ve ortadan kaldırılmasında yer aldığı gösterilmiştir (Hou et al., 2013). T hücresi uygun tümör antijeni ve MHC kompleksi ile birleşimi sonrası hızlı bir şekilde aktive olarak farklılaşmaya uğrar. Tümör antijenine karşı oluşturulan nihai T hücre cevabı hastalığın sonlanışını olumlu veya olumsuz etkileyebilir. Kansere karşı immün sistemi kontrol etmedeki anahtar rollerinden dolayı T hücreleri ve immünoterapötik ajanlarla etkinleştirilmesi onkolojide devrim niteliğinde bir değişim yaratmıştır.

Yapılmış çalışmalarda CTL, hafıza T hücreleri ve yardımcı T hücre alt popülasyonları kanserin prognozunda önemli olduğu; özellikle CD8+ CTL tümör infiltrasyonu iyi bir prognoz ile ilişkili olduğu buna karşılık, diğer yardımcı T hücre alt popülasyonlarının iyi veya kötü prognostik etkilerinin kullanılan yöntem ve araştırılan kansere göre değiştiği bildirilmiştir. Son çalışmalarda immün infiltrasyon tayininin AJCC TNM sınıflandırma sisteminden daha fazla prognostik önemi olduğu gösterilmiştir. Kolon kanseri sınıflamasında günümüze kadar histolojik morfoloji, moleküler yollar, mutasyon durumları ve tümör gen ekspresyonları gibi çok sayıda özellik kullanılmış olsa da rekürrens ve ölüm için yüksek risk altındaki hastaları tahmin etmede etkili intratümöral veya peritümöral immün yanıt belirteçleri sınıflamada kullanılmamıştır (Pages et al., 2018).

Lenfoid dokularda immün hücre profillemesinde en sık kullanılan yöntem İHC-mikroarray analiz ve Flow sitometri analizidir. Flow sitometrik yöntem birçok belirteç/antikor kullanılarak immün hücrelerin küçük alt popülasyonları da dahil immün profil karakterizasyonu ve kantitatif ölçümünü yapabilen yaygın bir inceleme tekniğidir. Yöntemin kalitatif ve kantitatif avantajlarının yanında dezavantajları da vardır; örneğin flowsitometrik analizlerde taze doku gereklidir ve immün infiltratların dağılımı, organizasyonu veya mikroçevre ile ilişkisi hakkında bilgi veremez.

2.5.1. CTL

Naive CD8 T hücreleri, MHC sınıf I molekülleri üzerinde sunulan antijenleri tanır ve aktive edildiğinde CTL'ler haline gelir. Dendritik hücreler gibi APC'ler tipik olarak TCR ve CD8 koreseptör-CD80/86- tarafından tanınan MHC sınıf I aracılığıyla endojen peptitler sunar. Kanser hücrelerinden kaynaklanan değişmiş veya aşırı eksprese edilen peptitler dendritik hücrelerce veya tümör hücreleri üzerinde direk sunulur ve TCR angajmanı ile antijen spesifik CTL'ler aktive olur. CTL'ler, anti-tümör bağışıklığının ana güçleri olarak kabul edilir. Tümör antijenlerinin tanınması ve tümöral hücrelerin doğrudan veya TNF aracılı indirekt öldürülmesi yoluyla tümör immün reddine aracılık eder. Tümör mikroçevresindeki CTL'ler, sitotoksiteyi destekleyen IL-2, IL-12 ve IFN γ üreterek antitümör etkinliği artırarak prognozu iyileştirir. Kanser immün yanıtında

aktive olan CTL'lerin çoğu kısa süreli anti-tümör etkilerinden sonra apoptozis ile hücre ölümüne gider (K. Murphy & Weaver, 2016).

Kolon kanserinde lokal ve sistemik immün yanıtta tümörü infiltre eden T lenfositleri - TIL- özellikle CD8+ CTL invazyon/metastaz durumu ve sağ kalımı belirleyen en önemli alt gruptur (Leman et al., 2018). Cerrahi ile tedavi edilen erken evre ve bölgesel yayılmış hastalıkta immün infiltratın prognoz üzerindeki etkisi değerlendirilmiş, hem merkezi hem de invaziv marjinde düşük CD3+ ve CD8+ lenfosit yoğunlukları sağ kalım süreleri açısından en kötü post-operatif sonuçları göstermiştir.

2.5.2.Th & Naive T hücreleri

Naive T hücreleri, maturasyonunu tamamlamış ve timustan ayrılmış fakat henüz karşılık gelen antijeniyle karşılaşmamış bir T hücresidir. Başka bir deyişle, naive T hücreleri olgunluk ve aktivasyon arasındaki aşamadır. Her naive T hücresi, belirli bir antijeni tanıyan benzersiz bir TCR'ye sahiptir. Naive T hücrelerinin aktivasyonu sekonder lenfoid dokularda gerçekleşir. Naive T hücre yüzey markerları CD4+CCR7+CD45RO negatif olarak tanımlanmıştır (Larbi & Fulop, 2014).

İmmün yanıtının erken evrelerinde antijene özgü T hücreleri ko-stimülatör moleküller ve sitokinler aracılığı ile efektör T hücrelere polarize olur. T hücre polarizasyonu 'lineage spesifik transkripsiyon faktörlerince' düzenlenir ve çok sayıda sitokini upregüle ederek efektör T hücrelerin farklı tiplerine 'irreversible' dönüşmesini sağlar (O'Shea & Paul, 2010). Aktive edildikten sonra, naive CD4+ T hücreleri, sırasıyla IFN- γ ve IL-4 salgılamasına bağlı Th1 ve Th2 hücreleri adı verilen fonksiyonel alt kümelere; FOXP3 ve IL-17 salgılamasına bağlı TREG ve Th17 hücrelerine farklılaşır (Zhou, Chong, & Littman, 2009). Yeni sitokinlerin araştırılması ile Th9, Th22 ve Th25 gibi ek yeni Th alt grupları da tanımlanmıştır (Tuzlak et al., 2021).

2.5.3.Th1

Hem NK hücreleri hem de T hücreleri tarafından üretilen IFN-y'nin yanı sıra doğal bağışıklık hücreleri tarafından üretilen IL-12, STAT4, STAT1 ve T-bet transkripsiyon faktörü etkisi ile hücreleri Th1 hücre farklılaşma programına doğru polarize eder (Seder

& Ahmed, 2003; Szabo et al., 2000). Th1 hücreleri, tüberküloz gibi çeşitli hücre içi enfeksiyonlara karşı koruma için gereklidir.

Hayvan çalışmalarında kolon kanseri xenograflarda kronik stres ile kolon kanseri progresyonunun indüklendiği ve hem dolaşım hem de tümör mikroçevresinde Th1 yanıtından Th2 yanıtına immün kayma olduğu gösterildi (Hou et al., 2013). İnsan klinik çalışmalarında da kolon kanserinde Th1 hücrelerin suprese olduğu ve hayvan çalışmalarına benzer şekilde Th1 yanıtın Th2'ye kaydığı desteklendi (Nakayama, Kitayama, Muto, & Nagawa, 2000).

2.5.4.Th2

Th2 farklılaşmasında, TLR stimülasyonuna yanıt olarak antijen sunan hücrelerden üretilen IL-4 varlığında, STAT6 ve transkripsiyon faktörü GATA-3 ekspresyonu artar, Th'lar IL-4 üreten Th2 hücrelerine polarize olurlar (Pepper & Jenkins, 2011; Seder & Ahmed, 2003). Th2 hücreleri IL-4, IL-5 ve IL-13 üretir ve helmintleri ve diğer hücre dışı patojenleri kontrol etmek için humoral bağışıklık için gereklidir (Zhou et al., 2009). Th2 baskınlığı astımda, atopik dermatitte, neoplastik hastalıklarda özellikle kolon kanserinde izlenir (Nakayama et al., 2000).

CD4+ efektör T hücrelerinin immünosupresif Th2 hücrelerine doğru polarizasyonunun sitokin salınımını ve T hücre anerjisini indüklediği, bunun da tümör ile ilişkili makrofajların (TAM'ler) M2 polarizasyonuna yol açarak pro-tümörijenik bir mikroçevre sağladığı ve anti-tümör bağışıklığı azalttığı bildirilmiştir. Yüksek Th2 oranları ile agresif tümör özellikleri ve tümörü destekleyen immün çevre arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Ellyard, Simson, & Parish, 2007).

2.5.5.Th17

Th17 hücreleri IL-17, IL-17F ve IL-22 üretir ve özellikle mukozal yüzeylerde hücre dışı bakteri ve mantarların temizlenmesinde önemli roller oynar. Th17 hücre farklılaşması, STAT3 fosforilasyonunu aktive eden proinflamatuvar sitokinler IL-6, IL-21 ve IL-23 ile kombine TGF- β tarafından indüklenen bir transkripsiyon faktörü olan ROR γ 'i gerektirir (Colbeck et al., 2017). Literatürde Th17 ile ilgili çelişkili sonuçlara varan çalışmalar mevcuttur. Çalışmaların çoğunda Th17 kolon kanseri, akciğer kanseri,

hepatoselüler karsinomada kötü prognostik tanımlanırken bazı çalışmalarda tümör regresyonunda rol alabileceği bildirilmiştir (Bruni et al., 2020; Fridman et al., 2012; Schmitt & Greten, 2021). Th17 hücrelerin salgıladığı IL17'nin tümör hücrelerinden ve tümör ilişkili stromadan protümörijenik faktörler salgılattığı gösterilmiştir. Ayrıca Th17'lerin birbirinden farklı dual prognostik özellikleri olduğunu gösteren çalışmalar intraepitelyal Th17 hücrelerin daha uzun sağ kalım ile ilişkili olduğunu ama stromal Th17 hücrelerin olmadığını göstermiştir (Amicarella et al., 2017; Bruni et al., 2020).

2.5.6.TREG

TREG hücreleri Foxp3'ün ekspresyonu ile karakterize edilir. Foxp3, Treg hücrelerinin fonksiyonel programını belirlemede ve sürdürmede kritik bir rol oynar. Foxp3+ Treg hücrelerinin iki ana grubu tanımlanmıştır: Timusta doğal olarak ortaya çıkan CD4+ CD25+ Foxp3+ TREG hücreleri ve periferde üretilen TGF- β ile indüklenen iTREG hücreleri (Zhou et al., 2009). IL-10, aktive edilmiş TREG'ler tarafından salınan majör immünosupresif sitokindir. Hem Th1 hem de Th2 hücrelerini baskılar, böylece ko-stimülatör sinyallerin B hücrelerine iletilmesini engeller. Her iki tip de periferik toleransın korunması ve otoimmünitinin önlenmesinde görevlidir.

İlginç bir şekilde insan timusu, kan, lenf düğümleri ve dalaktaki TREG oranı tüm CD4+ T hücrelerinin %6 ila %10'unu oluşturur. Bu da farklı lenfoid bölümler arasında TREG hücrelerinin eşit dağılımı olduğunu göstermektedir (Wei, Kryczek, & Zou, 2006). Dolaşımdaki CD4+ T hücrelerinin %5'i TREG iken intestinal lamina propriadaki CD4+ T hücrelerin %20-30'unu TREG'ler oluşturur (Virella, 2020). İntestinal TREG'ler pTREG olarak tanımlanır ve mikrobiyotaya verilen immün yanıtı baskırlar, ancak enfeksiyon sırasında bu hücreler proinflamatuvar Th1'lere veya Th2'lere dönüşebilirler (Virella, 2020). Kemik iliğinde ise dikkat çeken önemli bir özellik CD4+ popülasyonun %25'den fazlasını TREG'lerin oluşturması ve diğer lenfoid dokulardan çok daha fazla rezervuara sahip olmasıdır (Wei et al., 2006).

Meme, over, mide kanserlerinde kötü prognostik faktör olarak bildirilen TREG infiltrasyonu kolon kanserlerinde tartışmalıdır; iyi prognostik olduğunu bildiren çalışmalar (Hu, Li, & Wang, 2017; Ling et al., 2016) olduğu gibi daha kötü sağ kalım ile

ilişkili olduğunu gösteren çalışmalarda mevcuttur (Yaqub et al., 2008; Zhang, Kelaria, Kerstetter, & Wang, 2015). Yapılmış çalışmalarda kolon kanserinde TREG infiltrasyonunun iyi prognozla ilişkili olduğu, FOXP3+TREGlerin artmış intratümöral veya peritümöral infiltrasyon yoğunluklarının OS ile pozitif korelasyonda, TNM evresi ile negatif korele olduğu bildirilmiştir (Hu et al., 2017; Ling et al., 2016).

2.5.7. Gamma/Delta T hücreleri

CD3+ T hücrelerin büyük çoğunluğu $\alpha\beta$ TCR içerirken küçük bir kısmı alternatif $\gamma\delta$ TCR heterodimerini eksprese eder. $\gamma\delta$ T hücreleri, $\alpha\beta$ T hücreleri ile tüm sitotoksik özellikleri paylaşan ancak aynı zamanda innate lenfositlere benzer şekilde NK reseptörleri de eksprese eder. Bu şekilde MHC-sınırlamasız çeşitli antijenleri-proteinleri, peptid olmayan antijenleri tanıyabilirler ayrıca timusta olgunlaşır ve önceden aktive edilmiş bir durumu korur, yani bir efektör T hücresine klonal genişleme veya farklılaşma gerektirmezler (Nussbaumer & Koslowski, 2019). Patojen tanıma ve temizleme, APC'lerin toplanması ve maturasyonu, $\alpha\beta$ T hücrelerine direk antijen sunumu ve stimülasyonu gibi tanımlanmış işlevlerinden dolayı doğal ve adaptif immün sistemleri arasında önemli bir köprü olarak kabul edilir. Ek olarak, $\gamma\delta$ T hücreleri doku homeostazına ve yara iyileşmesine de katkıda bulunur (Nussbaumer & Koslowski, 2019).

Tümör hücreleri, yüzeylerinde MHC sınıf I molekülleri düşük eksprese etmeleri ve tümör antijenlerin immün hücrelere sunum öncesi işleme dönemindeki defektleri sayesinde tümör spesifik T hücre saldırısından kaçabilme yeteneğine sahiptirler (Di Carlo et al., 2013). Gamma/Delta T hücreleri antijen spesifikliğinin önemli bir yönü adaptif bağışıklıktan önce tümör hedeflerini direk tanıma ve öldürme kapasiteleridir (Gober et al., 2003). Bir çok kanser türünün çalışmalarında $\gamma\delta$ T hücrelerinin TIL'lerin önemli bir komponenti olduğu gösterilse de periferik kan T lenfositlerin <%0,5-5'i $\gamma\delta$ T hücreleridir fakat lenf nodu ve dalakta bu oran daha düşük bildirilmiştir (Di Carlo et al., 2013; Lee, Chung, & Kim, 2020).

TCR- $\gamma\delta$ 'yi eksprese eden T hücreleri, olağandışı bir doku dağılımına sahip benzersiz bir lenfosit popülasyonunu temsil eder. Bu hücrelerin, epitel için herhangi bir özel tropizm

olmaksızın hem organize lenfoid dokularda hem de deri ve bağırsakla ilişkili lenfoid sistemlerde bolca olduğu (Gober et al., 2003) ve yüzey markerı pan- $\gamma\delta$ TCR taşıdığı tanımlanmıştır (Moncunill, Han, Dobano, McElrath, & De Rosa, 2014). V δ 1 and V δ 2 subgroupları olup periferik kanda en sık V δ 2 variant görülür. Bu iki subgroup dışında fenotipik olarak $\gamma\delta$ T hücrelerinin yaklaşık %40-60'ı CD28 eksprese eder ve $\gamma\delta$ T hücrelerinin aktivasyonu üzerine CD28 ekspresyonu azalır (Lee et al., 2020). Gamma/Delta T lenfositler çoğunlukla **CD4⁻ CD8⁻** double negatif veya **CD4⁻ CD8⁺** izlenirler. Nadir bir şekilde IL-2-inducible Tcell kinase -ITK- eksikliğinde **CD4⁺** $\gamma\delta$ T hücrelerinin artmış gelişimi izlenmiştir (Qi et al., 2009).

IL-2-inducible Tcell kinase -ITK- nonreseptör tirozin kinaz olan TEC kinaz ailesinin bir üyesidir ve T hücrelerince eksprese edilirken TCR sinyalizasyonundan sorumludur. TCR aktivasyonunda, ITK, fosfolipaz- γ 1'i fosforile eder ve aktive eder, bu da kalsiyum akışına ve ayrıca nükleer faktör- κ B'nin aktivasyonuna, aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörüne ve RAS yolağı aktivasyonuna yol açar (Qi et al., 2009). ITK'nın $\gamma\delta$ T hücrelerinin farklılaşmasını ve işlevini düzenlediği gösterilmiştir. Bu hücreler baskın bir $\gamma\delta$ TCR taşır, ancak bu onların gelişimi için bir gereklilik değildir. Bu hücreler, MHC sınıf I veya sınıf II ekspresyonunun yokluğunda da gelişir, bu da klasik T hücrelerinin yanı sıra NKT hücreleri ve innate hafıza T hücreleri gibi nonkonvansiyonel T hücrelerinden bağımsız bir gelişim yolu olduğunu düşündürür. CD4⁻ ve CD4⁺ $\gamma\delta$ T hücreleri, $\gamma\delta$ T hücrelerinin 2 bağımsız alt kümesi olabilir ve bu CD4⁺ $\gamma\delta$ T hücreleri genel olarak IL-4 salgılayabilir (Qi et al., 2009).

Gamma/Delta T hücreleri, NK hücre reseptörlerini yüksek ekspresyonları sayesinde stres ligandlarına MHC-sınırlamasız, klonal olmayan şekilde ve TCR spesifik ligandlara bağlandıkları anda cevap oluştururlar. Fas ligand ve TNF ilişkili apoptozis indükleyici ligand aracılı direk sitotoksite, Th1 sitokin sekresyonu, granzim ve perforin sekresyonu ile doğal immünite; APC toplanması ve maturasyonu, T hücre ve B hücre aktivasyonu ile adaptif immüniteyi yönetir (Nussbaumer & Koslowski, 2019).

2.5.8. Santral Hafıza T Hücreleri ve Efektör Hafıza T Hücreleri

PBMC'lerdeki CD4⁺ hafıza T hücrelerinin alt grupları, yüksek endotelyal venler yoluyla lenf nodlarına 'homing'e aracılık eden bir molekül olan CCR7'nin hücre yüzeyinde ekspresyonuna dayalı olarak tanımlanır (Pepper & Jenkins, 2011).

Antijen ile aktivasyon sonrası oluşan, hücre yüzeylerinde CD45RO eksprese eden efektör Th'ların %5-10'luk bir kısmı uzun süreli yaşayabilen, farklı fenotiplerdeki hafıza hücrelerine dönüşür. Bu hafıza hücre fenotiplerinden biri sekonder ve tersiyer lenfoid dokular arasında dolaşan 'santral hafıza T hücreleridir. Bu hücreler esas olarak lenfoid dokularla sınırlıdır ve lenfoid 'homing' molekülleri CD62L ve CCR7'yi eksprese ederler. CM hücrelerin yüzey markerları CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁺ olarak tanımlanmıştır (Larbi & Fulop, 2014; K. Murphy & Weaver, 2016). Santral hafıza T hücreleri tekrar efektör T hücrelerine dönüşebilmek için sekonder veya tersiyer lenf nodlarında yeniden uyarılmaları gereklidir.

Hafıza T hücre fenotiplerinden bir diğeri de lenfoid dışı periferik dokular arasında dolaşan 'efektör hafıza T hücreleridir. Bu hücreler enfeksiyonlara ve tümörlere karşı ilk immün savunma hattıdır. Hızlı efektör fonksiyonlara aracılık ederler, dolaşımda ve lenfoid dışı dokularda bulunurlar. Efektör hafıza T hücreleri CD45RO⁺ olup lenfoid 'homing' molekülleri CD62L ve CCR7'yi hiç eksprese etmez ya da çok az eksprese ederler. TEM hücrelerin yüzey markerları CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁻ negatif olarak tanımlanmıştır (Larbi & Fulop, 2014; K. Murphy & Weaver, 2016).

2.4.9. Immün Checkpoint Reseptörleri

Patojenlere ve mutasyonlu veya aşırı eksprese edilen tümör antijenlerine karşı geliştirilen kontrolsüz immün yanıt arkasında maruziyet bölgesinde inflamatuvar doku hasarı bırakarak normale döner. CTLA4 ve PD1 gibi immün checkpoint-ICP-molekülleri, işte bu oluşabilecek immün hasarı önlemek için immün yanıtların negatif düzenleyicileridir. Bu kontrol noktası düzenleyiciler, enfeksiyonların immün savunmasında, otoimmünitenin önlenmesinde, transplantasyonun rejeksiyonunun önlenmesinde ve tümörün immün gözetimden kaçmasında aktif olarak rol alır (Miko, Meggyes, Doba, Barakonyi, & Szereday, 2019).

İmmün checkpoint reseptörleri birçok immün hücrenin üzerinde bulunan moleküllerdir. İlk tanımlanan ICP CTLA4'tür. CTLA-4, immün co-stimlatör CD28'in bir homoloğu olan transmembran glikoproteinidir. CTLA-4, CD28'in işlevini nötralize ederek kendi proteinlerine karşı periferik tolerans geliştirmede önemli bir rol oynar. TCR'nin antijen ile birleşmesini takiben, CD28, APC'ler üzerindeki CD80 ve CD86 proteinlerine bağlanarak T hücresi aktivasyonu için ikinci sinyali sağlar. CTLA-4, bu CD80/86 proteinlerini yaklaşık 20 kat daha fazla affinite ile bağlar ve bu nedenle bağlanma için CD28'i geride bırakabilir. T hücreleri üzerindeki inhibitör etkilerini indüklemek için CTLA-4, sinyal yolları bağımlı veya bağımsız mekanizmalarını kullanır. CTLA-4, CD80/86 proteinlerine bağlandıktan sonra fosforile olur ve ardından PI3K'yı bağlar. Bu, SHP2 ve PP2A fosfatazlarının aktivasyonuna yol açar. CTLA-4'ün SHP2'yi aktive etmesi CD3 ζ zincirinin fosforilasyonuna yol açar, böylece TCR'nin sinyal potansiyelini sınırlar. Sinyal yolağı bağımsız mekanizmalar aracılığıyla CTLA-4, transendositoz yoluyla CD80 ve CD86'yı APC yüzeyinden aktif olarak çıkarabilir, böylece aktivasyon durdurulabilir (Pardoll, 2012; Passardi, Canale, Valgiusti, & Ulivi, 2017).

PD-1, lenfoid organlarda T hücresi aktivasyonunu düzenlemenin aksine, çoğunlukla dokular ve tümörler içindeki efektör T hücre aktivitesini düzenler (Pardoll, 2012). CTLA-4 esas olarak naif T hücrelerini etkilerken, PD-1 birincil olarak periferik dokulardaki ve tümör mikroçevresindeki olgun T hücrelerinde, B hücrelerinde, APC'lerde ve NK hücrelerinde de eksprese edilir. PD-1 sinyal yolağı, PD-L1 ve PD-L2 ligandları ile etkileşim ile başlar, T hücre kinaz ZAP70'in fosforilasyonuna ve inaktivasyonuna ve SHP2'nin aktivasyonuna, SHP2 aracılı PI3K'ın de-fosforilasyonuna yol açarak Akt yolağını durdurur. Bu inhibisyon da inflamatuvar sitokinlerin ve Bcl-xL gibi hücre sağ kalım proteinlerinin üretiminin azalmasına yol açar. CTLA-4'e benzer şekilde, PD-1, Treg'lerde yüksek oranda eksprese edilir ve ligand bağlanması üzerine proliferasyonlarını ve baskılayıcı aktivitelerini artırır (Pardoll, 2012; Passardi et al., 2017).

ICP'lerin, T hücrelerinin kendi proteinlerine ve tümör antijenlerine verdiği yanıtları modüle ederek immün homeostazı düzenlemede önemli rol aldığı yapılan klinik ve preklinik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Daha sonrasında ICP yollarının bloke

edilmesinin anti-tümör immünite üzerine etkili olup olmadığını araştırılmış ve preklinik çalışmalarda ICP inhibitörlerle kanser modellerinde başarılı anti-tümör immün yanıt alınmasından sonra klinikte bir çok kanser türünde denenmiş, antitümör etkinlikleri ve sağ kalımları iyileştirdikleri kanıtlanmıştır. Kolon kanserinde de anti-tümör immün yanıtı geliştirmek için multiple ICP'ler hedeflenmiştir (Pardoll, 2012; Passardi et al., 2017).

Her ne kadar kolon kanserinde ICP inhibitör tedavilerin prelinik ve klinik verilerde etkinlikleri sınırlı da olsa kolon kanserinde uygun immünoterapötik yaklaşımları bulmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Öte yandan MSI, TIL, 'TMB/tümör mutasyon yükü' ve immün hücre ekspresyonları gibi immünoterapi etkinliği için predikte edecek biyobelirteçlerin kullanılması ICP inhibitörlerinin etki etme şansının artmasına neden olabilir. MSI-H metastatik kolon kanseri hastalarında ICP inhibitörleri klinik yarar gösterebilse de yaklaşık %25'i bu tedavilere dirençlidir (Galindo-Pumarino, Collado, Herrera, & Pena, 2021).

2.5.10.CD4/CD8 Oranı

CD4⁺/CD8⁺ oranı, Th'ların CTL'lere oranıdır. Sağlıklı yetişkinlerin periferik kanındaki CD4⁺/CD8⁺ oranı yaklaşık 2:1'dir ve değişmiş bir oran, HIV enfeksiyonundaki gibi immün yetmezlik veya MS, MG gibi otoimmünite ile ilgili hastalıkları gösterebilir. Kolon mukozasının İHC analizinde CD4/C8 oranının hiperplastik polipler ve kolonik adenomlarda normal kolon mukozasına göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Bedossa et al., 1990). Yapılan klinik çalışmada multiple primeri olan kanser hastalarında CD4/CD8 oranının sağlıklı kontrollerden düşük olduğu, hatta ikinci primer kolon kanserlerinde bu oranın meme kanserlerine göre daha da düşük izlendiği bildirilmiştir (Robinson et al., 1999). Başka bir çalışmada da bu bulguların tersine kolon kanseri hastalarında artmış CD4⁺/CD8⁺ oranının azalmış DFS ile körele olduğu bildirildi (Flaherty et al., 2016).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Gereçler

3.1.1.Hasta Seçimi

Haziran 2020-Temmuz 2021 tarihleri arasında Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi Gastrocerrahi Kliniğinde yeni tanı kolon kanseri olup opere edilen hastalardan çalışma kriterlerini karşılayanlar çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilme kriterleri: 18-70 yaş arası olmak; daha önce kanser tedavisi almamış olmak; otoimmün veya inflamatuvar hastalığı olmamak; immünomodülatör, immünosuppressif tedavi ve non steroidal anti-inflamatuvar ilaç kullanmamak; son 6 ayda antibiyotik kullanım öyküsü bulunmamak; ciddi alerji öyküsü olmamak; senkron ikinci bir malignitesi olmamak; kolonoskopik biyopsisi alınıp histolojik olarak adenokanser tanısı almış olmaktır.

Tüm hastalar kolon kanseri tanısı aldıktan sonra onkoloji polikliniğinde cerrahi öncesi klinik evrelemesi ve muayenesi yapılarak çalışma ile ilgili onamları alındı.15/6/2020 de hasta alımına başlandı.

Çalışmaya 44 hasta dahil edildi, lenfosit izolasyon ve dondurma işlemleri sonrası flowsitometrik analiz için kontrolde lenfosit canlılığını kaybeden 8 hasta çalışma dışı bırakıldı ve 36 hastanın immünprofilleme çalışmaları yapılarak analiz edildi.

3.1.2.Evreleme

Cerrahi öncesi hastalar klinik olarak evrelense de nihai evreleme cerrahi sonrası patolojik incelemenin sonucunda patolojik AJCC TNM sınıflamasına göre yapılmıştır.

3.1.3.Cerrahi Örneklerin Alınması

Intraoperatif primer tümörü drene eden palpable sentinel ilk tek lenf nodu omentumdan ayıklanarak yarısı lokal T hücre alt gruplarının immünfenotiplemesi için izotonik NaCl solüsyonu içinde doku alımını takiben ilk 30 dakikada lenfosit izolasyonu için Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama-SBAUM- laboratuvarına transfer edildi. Lenf nodunun diğer yarısı patolojik evreleme analizi için formol içinde tıbbi patoloğa gönderildi.

3.1.4. İmmunfenotiplendirme Antikor ve Malzemeleri

İmmunfenotiplendirme antikorlarından CD4, PD1 ve ROR γ T BD firmasından diğer tüm antikorlar ve malzemeler BIOLEGEND firmasından temin edilmiş ve aşağıda listelenmiştir.

1. Anti-human CD3 FITC- Biolegend Cat No:344804
2. Anti- human CD4 APC/Cy7 -BD Cat No: 641398
3. Anti- human CD8 APC-Biolegend Cat No:344722
4. Anti- human CD25 PerCP/Cy5-Biolegend Cat No:302626
5. Anti human -T-bet PE/Cy7-Biolegend Cat No:644824
6. Anti human -GATA3 PE-Biolegend Cat No:653804
7. Anti human -FOXP3 FITC-Biolegend Cat No:320106
8. Anti- Hu ROR Gamma T Alexa 488-BD Cat No:563621
9. Anti human TCR- $\gamma\delta$ PE/Cy7-Biolegend Cat No:331222
10. Anti human -CD45RO APC-Biolegend Cat No:304210
11. Anti human -CD194/CCR4 APC-Biolegend Cat No:359408
12. Anti human -CD197/CCR7 FITC-Biolegend Cat No:353216
13. Anti human -CD152 /CTLA4 PE-Biolegend Cat No:349906
14. Anti human -CD279 /PD1 PE-BD Cat No:557946
15. Cell Staining Buffer-Biolegend Cat No: 420201
16. True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set-Biolegend Cat No:424401
17. APC Mouse IgG2a, κ isotype Ctrl-Biolegend Cat No:400220
18. FITC Mouse IgG1, κ isotype Ctrl -Biolegend Cat No:400108
19. FITC Mouse IgG2a, κ isotype Ctrl- Biolegend Cat No:400210
20. PE Mouse IgG1, κ isotype Ctrl- Biolegend Cat No:400114

21. PE Mouse IgG2b, κ isotype Ctrl- Biolegend Cat No:400314

22. PE/Cyanine7 Mouse IgG1, κ isotype Ctrl- Biolegend Cat No:400126

Boyanma özelliklerine göre immün hücreler;

Naive T hücreler: CD4+CD45RO neg +CCR7+,

CTL: CD3+CD8+,

Th1: CD3+CD4+Tbet+,

Th2: CD3+CD4+GATA3+,

TREG: CD4+CD25+FOXP3+,

Total $\gamma\delta$ T hücreleri: CD3+ $\gamma\delta$ +,

Th17:CD4+ROR γ T+,

TEM: CD4+CD45RO+CCR7 negatif,

CM: CD4+CD45RO+CCR7+,

ICP'ler *ICP1*:CTLA4 + ve *ICP2*:PD1+ ekspresyon düzeyleri T hücreler üzerindeki ekspresyon olarak analiz edildi.

CCR4: kemokin reseptörü olarak ekspresyon düzeyleri T hücreler üzerindeki ekspresyon olarak analiz edildi.

Tüm hastalarda immün T hücre alt grupların rölatif oranları BD-FACS Canto II Flowsitometri cihazında hesaplandı ve yüzde olarak istatistik analize sokuldu.

3.1.5.Etik Kurul Onayı

Çalışmamıza Sağlık Bilimleri Üniversitesi Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi Etik Kurul Başkanlığı tarafından 26.9.2019 tarihinde 21/19 karar nolu etik kurul onayı

verilmiştir. Çalışmamız Akdeniz Üniversitesi Tez çalışma önerisi protokol no: 28/370, belge sayı: 1/2 ile kabul edilmiştir.

3.2.Yöntemler

3.2.1.Gen Mutasyon Analizi

KRAS, NRAS, BRAF mutasyonları real time PCR yöntemiyle tümör dokusundan çalışılmıştır. KRAS analizde Easy®KRAS kit-Diatech Pharmacogenetics ile Ekzon 2 /Kodon 12 ve 13, Ekzon 3 /Kodon 59 ve 61 ve Ekzon 4 / Kodon 117 ve 146; NRAS analizde Easy®NRAS kit-Diatech Pharmacogenetics ile Ekzon 2 /Kodon 12 ve 13, Ekzon 3 /Kodon 59 ve 61 ve Ekzon 4 /Kodon 117 ve 146; BRAF analizde Easy®BRAF kit-Diatech Pharmacogenetics ile Ekzon 15 / Kodon 600 Qiagen Rotor-Gene Q.sürüm 1.1.87 real time PCR cihazında incelendi.

3.2.2.İntratümöral ve Peritümöral TIL Analizi

TIL skorlamada kolon kanseri için tanımlanmış ‘Uluslararası İmmuno-Onkoloji Biyobelirteç Çalışma Grubu’ tarafından FFPE dokularda tanımlanmış ve standardize edilmiş skorlama (Hendry et al., 2017) kullanılmıştır. Öncelikle tümör alanını düşük büyütmede seçildi. Stromal ve intratümöral alanları belirlendi. Tümör sınırları dışındaki, nekrotik alanlardaki, fibrotik alanlardaki, abse alanlarındaki, in situ ve displastik alanlardaki TIL’ler haricindeki tümör sınırı etrafındaki stromal alanda mononükleer hücrelerle dolu alanın yüzdesini yüksek büyütmede değerlendirildi. Tüm mononükleer hücrelerden lenfositler ve plasmositler skorlanırken nötrofiller/granulositler skorlamaya dahil edilmedi (Fuchs et al., 2020; Hendry et al., 2017). Değerlendirilen dört yüzdeliklerin ortalaması hesaplandı ve bir ‘immünoskor’a dönüştürüldü. Üç kategorili immünoskor analizinde %0-25’lik bir yoğunluk hafif olarak, %25 ile %70 arasında bir yoğunluk hafif-orta ve %70 ile %100 arasında bir yoğunluk belirgin olarak değerlendirildi (Pages et al., 2018).

3.2.3. İmmünohistokimyasal Analiz

3.2.3.1.LVI

H&E ile boyanmış patolojik slaytlar, LVI histolojik teşhis kriterlerine göre değerlendirildi (Harris et al., 2008).

3.2.3.2.PNI

H&E ile boyanmış patolojik slaytlar, PNI histolojik teşhis kriterlerine göre değerlendirildi (Knijn et al., 2016).

3.2.3.3.Tümör Tomucuklanma Skoru

İnvazyon marjinde ilerleyen tek tümör hücresi veya 5 hücreden az tümör hücresi grupları tümör tomurcuğu kabul edildi. H&E slaytta 20X büyütme alanında skarlama için invazyon marjinde en fazla tomurcuklanma olan alan seçildi. X20 büyütmede tümör tomucuklanmaları sayıldı. Mikroskopta 20'lik büyütme alanda tomurcuklanma sayısı 0-4 arası ise düşük; 5-9 arası ise orta; ≥ 10 ise yüksek tomurcuklanma skoru olarak değerlendirildi.

3.2.3.4.MSI

Parafin içindeki tümörlü ve tümörsüz doku 4 μ m kalınlıkta kesildi. Deparafinizasyon sonrası sitrat buffer ile 10 dakika ısıtıldı. 30 dakika oda ısısında monoklonal antikorlar ile inkübe edildi. Sekonder antikor uygulaması sonrası ışık mikroskopisinde incelendi. Aynı hastaya ait normal kolonik mukoza pozitif kontrol olarak kullanıldı. Tümör hücrelerinde $>10\%$ boyama pozitif kabul edildi. Tümör hücrelerinde $<10\%$ boyama negatif kabul edildi. MLH1, MLH6, MSH2, PMS2 proteinlerindeki kayıp MSI-H olarak gruplandı. MMR protein kaybı olmayanlar MSI-L olarak değerlendirildi. Çalışmamızda Ventana Medical Systems MSI IHC paneli kullanıldı. anti-MLH1/M1 klon, anti-MSH2/G219-1129 klon, anti-MSH6/SP93 klon ve anti PMS2/A16-4 klon Ventana BenchMark ULTRA otomatik boyama cihazında çalışıldı.

3.2.4. T hücre İmmüfenotiplendirme &Flow Sitometrik Analiz

3.2.4.1. Lenf Nodundan Lenfosit İzolasyonu ve Saklanması

Lenf nodu örnekleri alımını takiben 30 dakika içinde laboratuvarında laminar flow kabini içerisinde bistüri ile 3 mL RPMI medium içinde diseke edildikten sonra 2mL'lik enjektör pistonun arkası kullanılarak mezenterik lenf nodundan lenfositler nazikçe ezilerek mediuma geçirildi. Lenf nodu kapsülü ve omentum dokuları bistüri yardımı ile uzaklaştırıldı pipetaj ile tek hücre süspansiyonu elde edildi. RPMI medyumunda süspanse edilen lenfositler üzerine bire bir %0.01 PBS içeren yıkama solüsyonu eklenerek 15 mL'lik konik tüpte 2500g de 7 dakika santrifüj edilerek yıkandı, yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı. Santrifüj sonrası süpernatant dökülerek pellet üzerine 2 mL %70 RPMI-1640, %20 serum FBS, %10 DMSO içeren dondurma mediumu eklenerek yeniden süspanse edildi ve cryo-tüplere aktarıldı. Lenfositler %20 FBS ve %10 DMSO içeren RPMI medyumunda içinde kademeli dondurmaya tabi tutularak nihayetinde -180°C de sıvı nitrojende saklandı. Laboratuvarımızda sıklıkla yaptığımız bu işlem ile eritme sonrası 6 ay dondurma süresini geçmeyen hücrelerin %80 ve üzeri canlılıklarını koruduğu izlenmektedir. İzole edilen lenfositler yüzey ve intraselüler belirteç tayini amacıyla uygun flöresan boya kombinasyonları ile boyanacağı güne kadar nitrojen tankında saklandı.

3.2.4.2. Dondurulmuş Lenfositlerin Eritilmesi, Yüzey ve İntraselüler Boyama

Her bir hastanın dondurulmuş lenfositleri 37°C sıcak su banyosunda çözündürüldü ve hücreler 30 dakika 37°C medyumda bekletildikten sonra akım-sitometri cihazında canlılık kontrolü yapıldı. Saklama sırasında canlılığını kaybetmiş hücreler ileri boyamalar yapılmadan çalışma dışı bırakıldı. 15 ml'lik tüplere alınan hücreler Cell Staining Buffer (Biolegend Cat No: 420201) ile 5 mL'ye tamamlandı, 2500 rpm'de 5 dakika çevrildi, supernatant döküldü. Yedi panel ve 1 boyasız toplam 8 tüp hazırlandı. 900 µL Cell Staining Buffer ve pellet ile süspansiyon hazırlandı. Her tüpe süspansiyondan 100 µL izole edilmiş lenf nodu lenfositleri pipetlendi. Yüzey boyama için her tüpe kendi panelinin 5 µL uygun yüzey antikorları eklendikten sonra vortex ile karıştırıldı. Buz üstünde 20 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama yapmadan her tüpe 2 ml Cell Staining Buffer eklenerek 2500 rpm'de 5 dakika çevrilerek bu şekilde 2 tur yıkama yapıldı. Yıkamalar sonrası hücre içi boyaması yapılacak olan tüplerin süpernatanı dökülerek 1ml True-Nuclear™ 1X Fix konsantresi

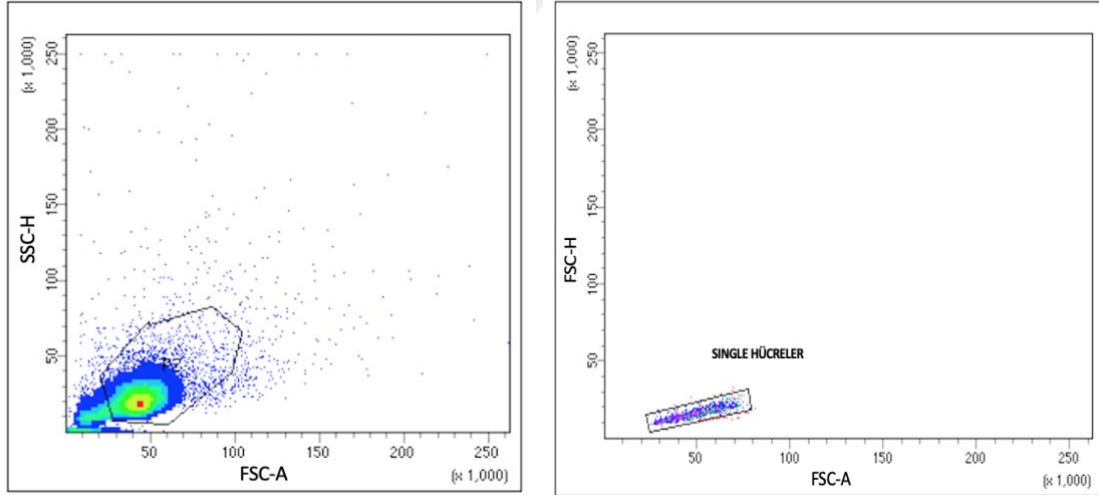
her bir tüpe eklendi, vortex ile karıştırıldı ve oda ısısında karanlıkta 60 dakika fiksasyon için inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, hücre içi boyamalardan önce hücre membranının permeabilizasyonu için yine yıkama yapmadan 2ml True-Nuclear™ 1X Perm Buffer her bir tüpe eklendi, 2500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant dökülerek her tüpe 2ml daha True-Nuclear™ 1X Perm Buffer eklendi. Tekrar 2500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Daha sonra hücre pelleti 100µL True-Nuclear™ 1X Perm Buffer ile resüspande edilerek her tüpe kendi panelinin 5 µL uygun hücre içi antikorları olan T-bet, GATA-3, FOXP3 ve ROR g-T transkripsiyon faktörü antikorlarını ve izotip kontrollerini, True-Nuclear™ 1X Perm Buffer içinde dilüe edilerek eklendi ve oda ısısında karanlıkta en az 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 2 ml True-Nuclear™ 1X Perm Buffer eklenerek yine oda ısısında 2500 rpm’de 5 dakika santrifüj ile yapılan yıkama 2 kere tekrarlandı. Son yıkamadan sonraki süpernatant dökülerek 0.5 mL Cell Staining Buffer eklenerek immün hücrelerin fenotipleri BD-FACS Canto II Flow sitometri cihazında önce okutuldu sonra da FACSDiva 8.1 programı kullanılarak analiz edildi.

İlk olarak lenfositler FSC ve SSC bölgesine göre morfolojik olarak kapılandı. Bütün analizlerde uygun izotipik kontroller ile negatiflik/pozitiflik ayrımı yapıldı. Lenfosit kapısı alındıktan sonra CD3⁺ T hücreleri tanımlandı. Daha sonra T hücre alt grupları- CTL, Th, $\gamma\delta$ T hücreleri- tayini için kapılamaya geçildi. CTL’lerin sıklığını değerlendirmek lenfosit kapısından CD3⁺ kapılı popülasyonda CD8+yüzey antikor pozitif olan hücrelerin analizi yapıldı. $\gamma\delta$ T hücrelerinin sıklığını değerlendirmek için ise, lenfositler önce FSC/SSC profili temelinde kapılandı, ardından CD3⁺ kapılı popülasyonda $\gamma\delta$ T-hücre intraselüler transkripsiyon faktörü pozitif olan hücrelerin analizi yapıldı. Yardımcı T hücre alt grupları için lenfositler önce FSC/SSC profili temelinde kapılandı, ardından CD3⁺ kapılı popülasyonda CD4+hücrelerde immünolojik kapı alındı. CD4⁺ immünolojik kapı sonrası her bir yardımcı T hücre tanımlayıcı yüzey antikor veya intraselüler transkripsiyon antikor pozitifliğine göre : *Th1* hücreler Tbet⁺, *Th2* hücreler GATA3⁺, *Th17* hücreler ROR γ T⁺ boyanma profillerine göre tanımlandı ve rölatif oranları kaydedildi. Diğer yardımcı T hücreler olan TREG hücreleri CD3⁺CD4⁺ immünolojik kapılama sonrası CD25^{BRI} ve FOXP3’ü birlikte eksprese eden hücreler olarak , TEM hücreleri CD3⁺CD4⁺ immünolojik kapılama sonrası CD45RO +

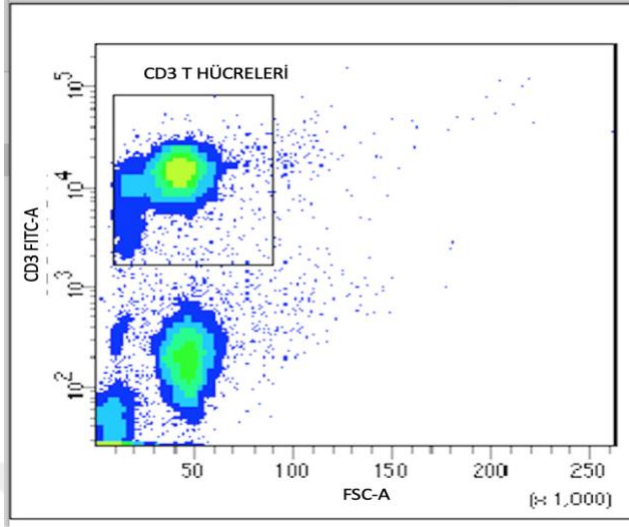
ve CCR7 negatif eksprese eden hücreler olarak, CM hücreleri CD3+CD4+ immünolojik kapılama sonrası CD45RO ve CCR7 birlikte eksprese eden hücreler olarak tanımlandı ve rölatif oranları kaydedildi.

3.2.4.3. T hücre immünfenotiplendirmesi

Tüm çalışma popülasyonunda tümörü drene eden lenf nodundan izole edilen hücrelerden öncelikle Side scatter (SSC)/Forward scatter (FSC) özelliklerine göre (büyüklük ve granülarite) kapı alınarak lenfositler tanımlandı. Lenfositler içinde klump yapmış dublet hücreler Forward Scatter Area ve Forward Scatter Height grafiği kullanılmak suretiyle çıkarılarak (doublet exclusion) sadece single hücreler daha sonraki analizlere dahil edildi. Lenfosit popülasyonu single hücreler üzerinden CD3 kapısı alınarak T lenfositler belirlendi. Belirlenen her bir T hücresi alt grubuna ait birer örnek aşağıda gösterilmektedir. Analizlerde negatiflik/pozitiflik belirlemede uygun izotipler kullanılmış ve görüntülemelerde density plotlar ve histogramlar tercih edilmiştir.



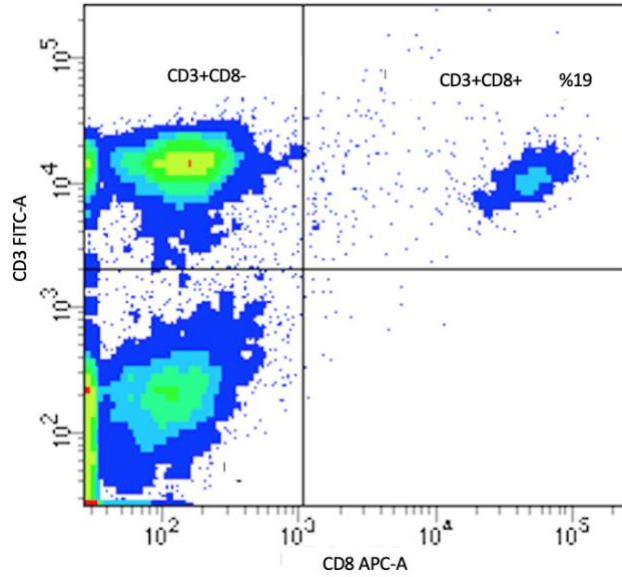
Şekil 3. Lenfosit kapısı ve single hücrelerin seçimi flow sitometri görüntüsü



Şekil 4. CD3 kapısı şeması flow sitometri histogram görüntüsü

3.2.4.3.1.CTL rölatif oranı

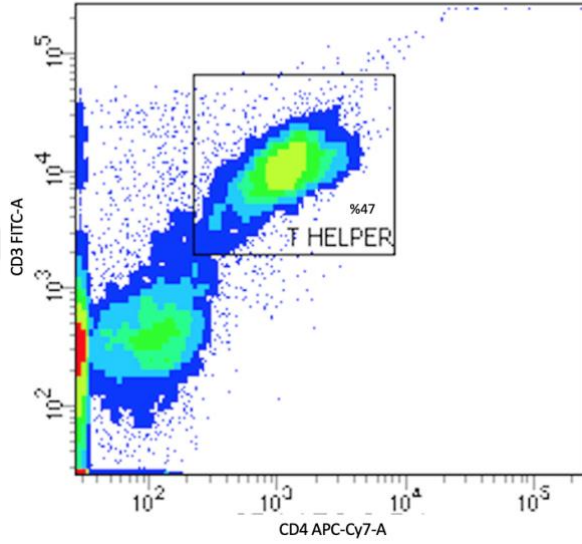
Lenfosit popülasyonu single hücreler üzerinden CD3 immünolojik kapı alınarak T lenfositler belirlendi. CTL'lerin sıklığını değerlendirmek için lenfosit kapısından CD3+ popülasyonda CD8+yüzey antikor pozitif olan hücrelerin oranı ölçüldü.



Şekil 5.CTL (CD3+CD8+) hücrelerin flow sitometrik density plot bivariate histogram görüntüsü

3.2.4.3.2.Th rölatif oranı

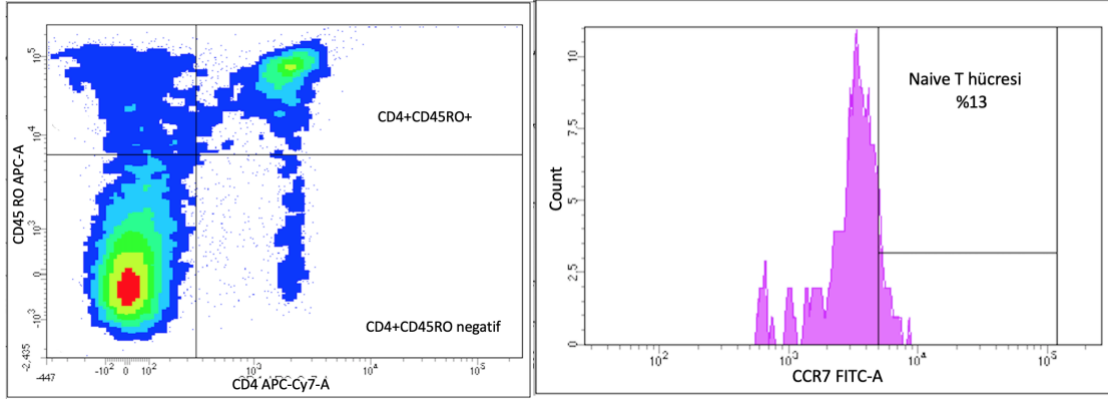
Lenfosit popülasyonu single hücreler üzerinden CD3 immünolojik kapı alınarak T lenfositler belirlendi. Th hücrelerin sıklığını değerlendirmek için lenfosit kapısından CD3+ popülasyonda CD4+yüzey antikoru pozitif olan hücrelerin oranı ölçüldü.



Şekil 6.Thelper (CD3+CD4+) hücrelerin flow sitometrik density plot bivariate histogram görüntüsü

3.2.4.3.3.Naive T hücresi rölatif oranı

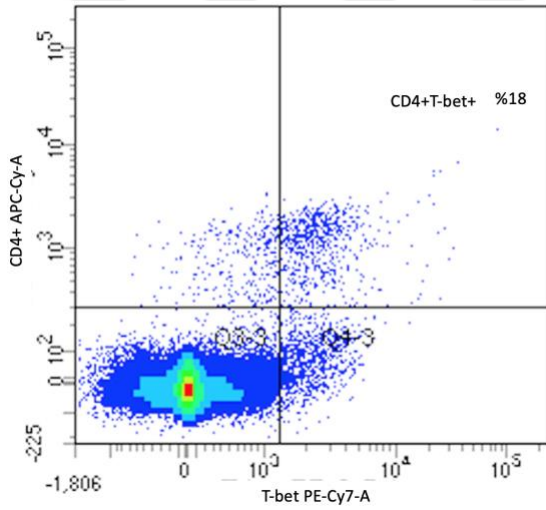
Lenfosit popülasyonu single hücreler üzerinden CD3 immünolojik kapı alınarak T lenfositler belirlendi. Naive T hücrelerin sıklığını değerlendirmek için lenfosit kapısından CD3+ popülasyonda yüzey antikorları “CD4+CD45 RO” negatif hücre popülasyonu seçildi. “CD4+CD45RO” negatif popülasyon üzerinden “CCR7” yüzey antikoru pozitif olan hücrelerin oranı ölçüldü.



Şekil 7. Naive T (CD4+CCR7+ CD45RO negatif) hücrelerin CD4C/D45RO flow sitometrik density-plot bivariate histogram görüntüsü ve CCR7 pozitif alt popülasyon histogram görüntüsü

3.2.4.3.4.Th1 rölatif oranı

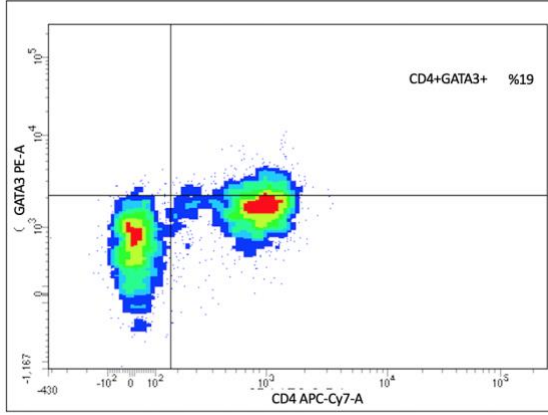
Lenfosit popülasyonu single hücreler üzerinden CD3 immünolojik kapı alınarak T lenfositler belirlendi. Th1 hücrelerin sıklığını değerlendirmek için lenfosit kapısından CD3+ popülasyonda “CD4+T-bet+” çift pozitif olan hücrelerin oranı belirlendi.



Şekil 8. Thelper 1 (CD4+T-bet+) hücrelerin flow sitometrik density plot bivariate histogram görüntüsü

3.2.4.3.5.Th2 rölatif oranı

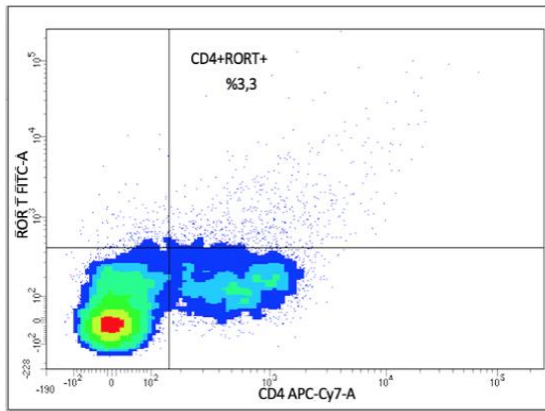
Lenfosit popülasyonu single hücreler üzerinden CD3 immünolojik kapı alınarak T lenfositler belirlendi. Th2 hücrelerin sıklığını değerlendirmek için lenfosit kapısından CD3+ popülasyonda “CD4+GATA3 +”  ift pozitif olan hücrelerin oranı belirlendi.



Şekil 9.Thelper 2 (CD4+GATA-3+) hücrelerin flow sitometrik density plot bivariate histogram görüntüsü

3.2.4.3.6.Th17 rölatif oranı

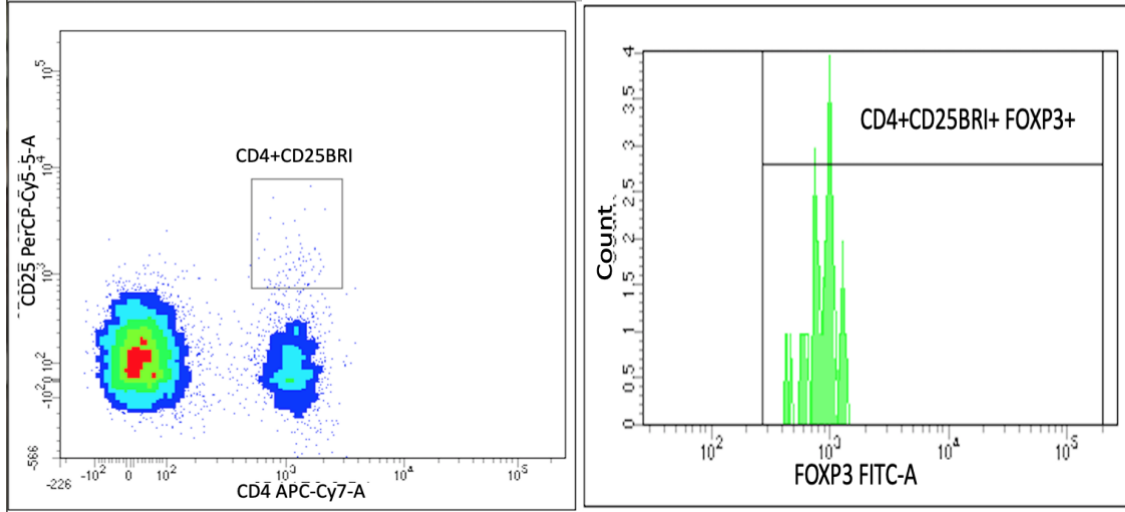
Lenfosit popülasyonu single hücreler üzerinden CD3 immünolojik kapı alınarak T lenfositler belirlendi. Th17 hücrelerin sıklığını değerlendirmek için lenfosit kapısından CD3+ popülasyonda CD4+RORT (intraselüler transkripsiyon faktörü)+ antikoru çift pozitif olan hücrelerin oranı belirlendi.



Şekil 10. Thelper 17 (CD4+RORT+) hücrelerin flow sitometrik density plot bivariate histogram görüntüsü

3.2.4.3.7.TREG rölatif oranı

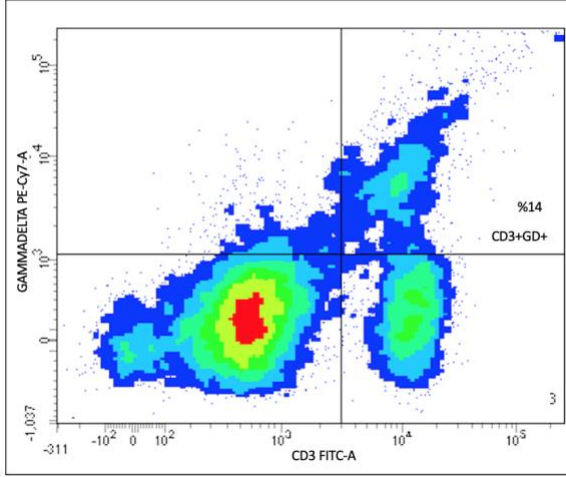
Lenfosit popülasyonu single hücreler üzerinden CD3 immünolojik kapı alınarak T lenfositler belirlendi. TREG hücrelerin sıklığını belirlemek için lenfosit kapısından CD3+ popülasyonda “CD4+CD25^{BRI}” yüzey antikoru çift pozitif olan hücrelerin seçildi. “CD4+CD25^{BRI}” hücrelerde FOXP3+ olan hücrelerin oranı belirlendi.



Şekil 11. TREG (CD4+CD25+FOXP3) hücrelerin CD4+CD25BRI flow sitometrik density plot bivariate histogram ve TREG histogram görüntüsü

3.2.4.3.8.Total    T rölatif oranı

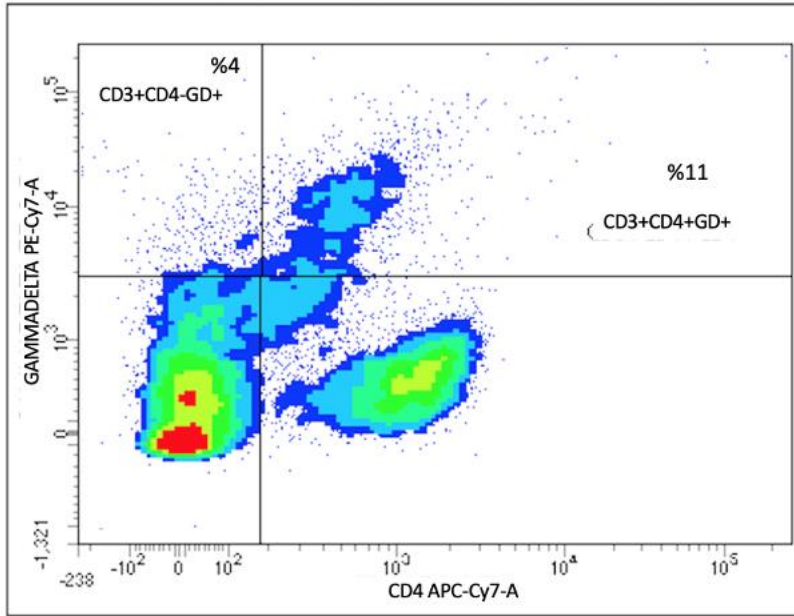
Lenfosit popülasyonu single hücreler üzerinden CD3 immünolojik kapı alınarak T lenfositler belirlendi.    T hücrelerin sıklığını değerlendirmek için lenfosit kapısından CD3+ popülasyonda    TCR yüzey antikoruna pozitif olan hücrelerin oranı belirlendi.



Şekil 12. $\gamma\delta$ T (CD3+ $\gamma\delta$ +) hücrelerin flow sitometrik density plot bivariate histogram görüntüsü

3.2.4.3.9. CD4⁺ $\gamma\delta$ ve CD4⁻ $\gamma\delta$ T hücre rölatif oranı

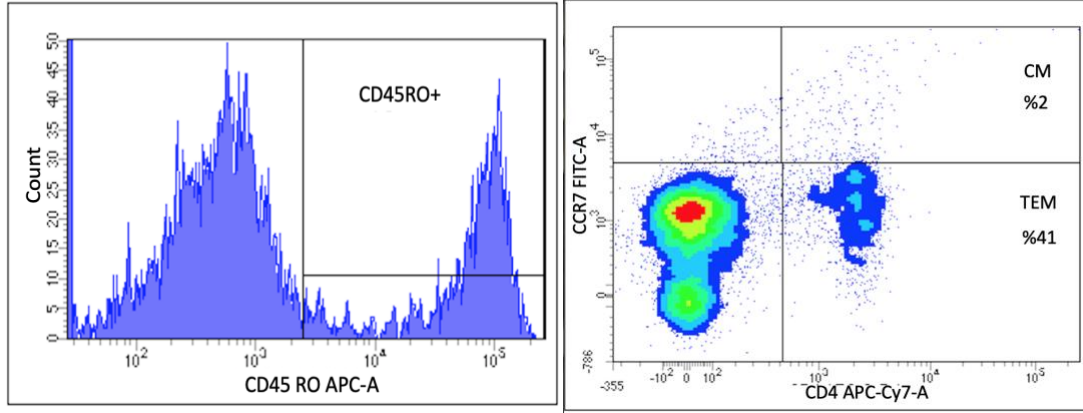
Lenfosit popülasyonu single hücreler üzerinden CD3 immünolojik kapı alınarak T lenfositler belirlendi. $\gamma\delta$ T hücrelerin CD4 pozitif ve CD4 negatif alt grupları tayini için lenfosit kapısından CD3+ popülasyonda $\gamma\delta$ TCR ve CD4 yüzey antikoruna çift pozitif olanlar CD4+ $\gamma\delta$ T hücreleri, $\gamma\delta$ TCR+ CD4 negatif olanlar CD4 negatif $\gamma\delta$ T hücreleri olarak oranları belirlendi.



Şekil 13. CD4+ $\gamma\delta$ T (CD3+ $\gamma\delta$ + CD4+) ve CD4- $\gamma\delta$ T (CD3+ $\gamma\delta$ + CD4negatif) hücrelerin flow sitometrik density plot bivariate histogram görüntüsü

3.2.4.3.10.TEM & CM rölatif oranı

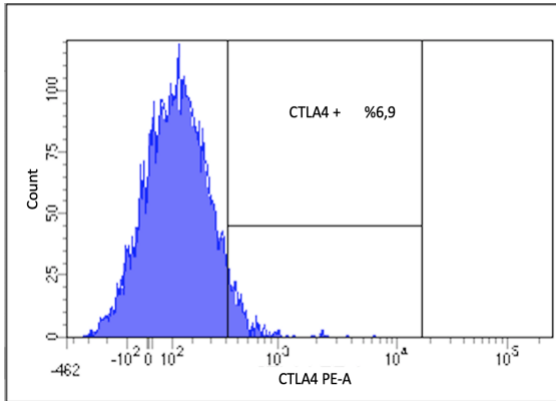
Lenfosit popülasyonu single hücreler üzerinden CD3 immünolojik kapı alınarak T lenfositler belirlendi. HafızaT hücrelerin sıklığını değerlendirmek için lenfosit kapısından CD3+ popülasyonda yüzey antikoru CD45 RO pozitif hücre popülasyonu seçildi. CD45RO pozitif popülasyon üzerinden CD4 ve CCR7 yüzey antikoru çift pozitif olanlar CM, CD4+CCR7 negatif olanlar TEM hücreleri olarak oranları belirlendi.



Şekil 14. CM (CD4+CD45RO+CCR7+) &TEM (CD4+CD45RO+CCR7negatif) hücrelerin CD45 RO flow sitometrik histogram ve CD4/CCR7 dot-plot bivariate histogram görüntüsü

3.2.4.3.11.ICP1-CTLA4 ekspresyonu

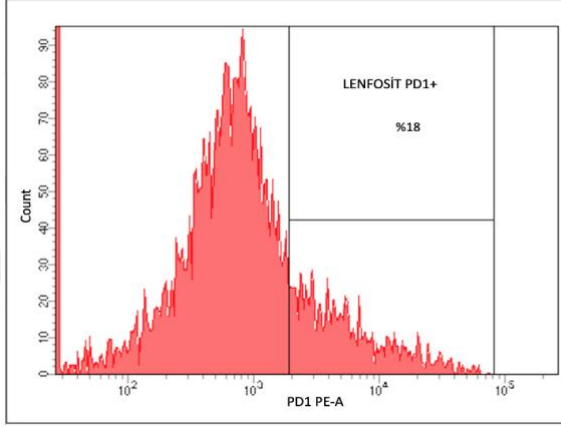
Lenfosit popülasyonu single hücreler üzerinden CD3 immünolojik kapı alınarak T lenfositler belirlendi. T lenfositlerin ICP1 CTLA4 reseptör ekspresyon oran tayini için CTLA4 yüzey antikoru pozitif olan hücrelerin oranı belirlendi.



Şekil 15. CTLA4 eksprese eden T hücrelerin flow sitometrik univariate histogram görüntüsü

3.2.4.3.12.ICP2-PD1 ekspresyonu

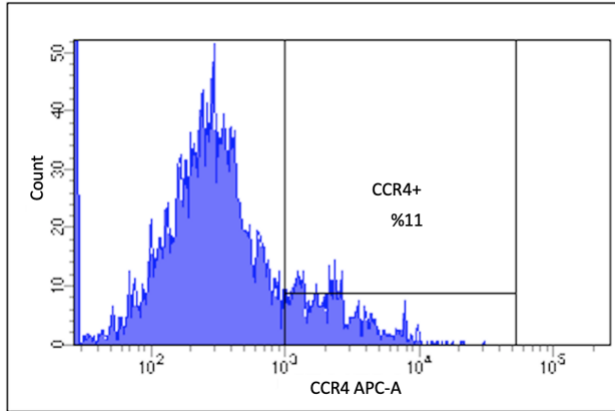
Lenfosit popülasyonu single hücreler üzerinden CD3 immünolojik kapı alınarak T lenfositler belirlendi. T lenfositlerin ICP2 PD1 reseptör ekspresyon oran tayini için PD1 yüzey antikoruna pozitif olan hücrelerin oranı belirlendi.



Şekil 16. PD1 eksprese eden T hücrelerin flow sitometrik univariate histogram görüntüsü

3.2.4.3.13.CCR4 ekspresyonu

Lenfosit popülasyonu single hücreler üzerinden CD3 immünolojik kapı alınarak T lenfositler belirlendi. T lenfositlerin bir kemokin reseptörü olan CCR4 reseptörü ekspresyon oran tayini için CCR4 yüzey antikoruna pozitif olan hücrelerin oranı belirlendi.



Şekil 17. CCR4 eksprese eden T hücrelerin flow sitometrik univariate histogram görüntüsü

3.2.5. İstatistik Analiz

Tanımlayıcı istatistikler kategorik değişkenler için frekans (n) ve yüzde (%), normal dağılım sürekli değişkenler için ortalama±standart sapma (SS) ve normal dağılmayanlar için medyan (IQR) değerleri ile sunulmuştur. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkilerin analizinde Pearson ki-kare test ve Fisher's Exact test kullanılmıştır. Normal dağılım varsayımı Shapiro Wilk testi ile kontrol edilmiştir. İki grubun ölçüm değerleri arasındaki farkın analizinde normal dağılıma uymadığı durumda Mann-Whitney U testi, uyduğu durumda ise Student's t-test kullanılmıştır. Üç ve daha fazla grubun sürekli değişkenlerinin parametrik olmayan karşılaştırmasında Kruskal Wallis testi kullanılırken, anlamlı çıkan durumlar için post-hoc testlerde Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır. Normal dağılım varsayımı sağlandığı durumda üç ve daha fazla grubun karşılaştırılmasında One-way ANOVA testi ve post-hoc test olarak Tukey HSD testi kullanılmıştır. Sıralı (ordinal) veya normal dağılıma uymayan sürekli değişkenler arasındaki ilişkiler için Spearman korelasyon testi yapılmıştır. Tüm analizler IBM SPSS 23.0 paket programı (IBM Corp., Armonk, NY) ile yapılmış ve 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1.Klinik ve Histopatolojik Özellikler

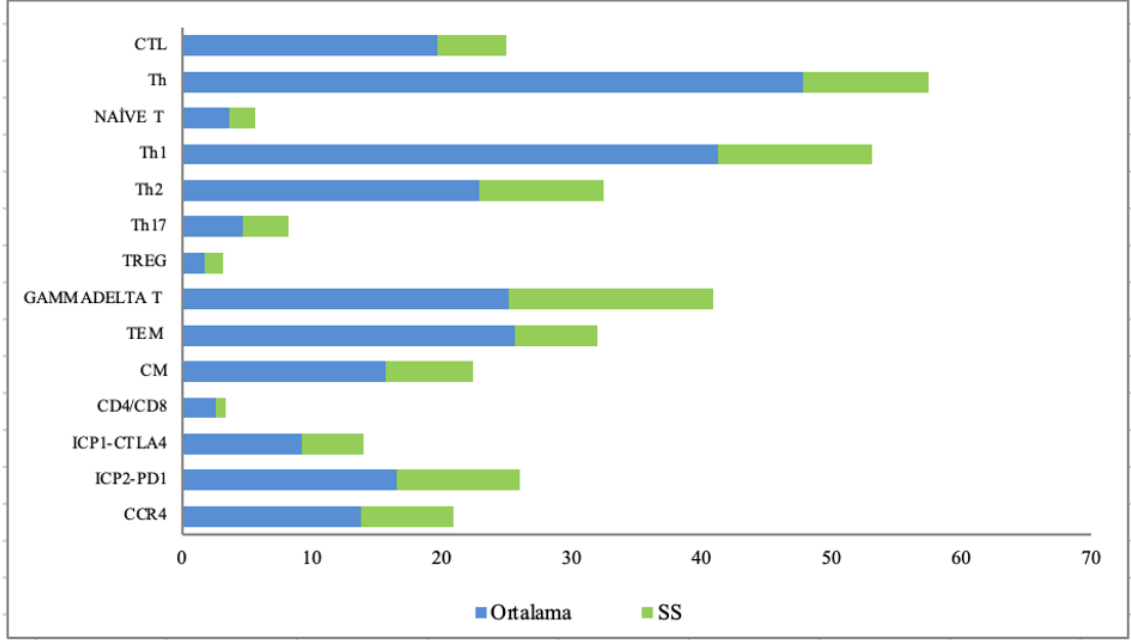
Çalışmaya dahil edilen 36 hastanın %41'i kadın, %59'u erkekti. Çalışma popülasyonunun yaş ortalaması $63,14 \pm 11,94$ idi. Rezeksiyon materyallerinde 20 (%55.6) hastada lenf nodu metastazı izlendi. On üç hasta (%36) erken evre, 13 hasta (%36) bölgesinde ilerlemiş hastalık ve 10 hasta (%28) metastatik evre ile prezente izlendi. KRAS mutasyon oranı %22 izlenirken NRAS ve BRAF mutasyon izlenmedi. Hastaların tümöral histopatolojik ve prognostik özellikleri **Tablo 1.** de gösterilmiştir.

Tablo 1.Hastaların tümöral histopatolojik özellikleri

Değişkenler	n	%
TNM Evre		
1-2	13	36,1
3	13	36,1
4	10	27,8
MSI-H		
Düşük MSI-H	30	83,3
MSI-H	6	16,7
İntratümoral lenfosit İnfiltrasyonu		
Yok	10	27,8
Var/ Hafif-Orta	26	72,2
Peritümoral lenfosit İnfiltrasyonu		
Hafif-Orta	26	74,3
Belirgin	9	25,7
LVI		
Yok	18	50,0
Var	18	50,0
PNI		
Yok	28	77,8
Var	8	22,2
Tomurcuklanma skoru		
Düşük	28	77,8
Orta-Yüksek	8	22,2
Grade		
1	5	13,9
2	28	77,8
3	3	8,3

4.2.T Hücre Alt Gruplarının ve Reseptör Ekspresyonlarının Ortalamaları

Kolon kanseri drene eden lenf nodunda en fazla eksprese edilen T hücresi alt tipi Th1 olup onu $\gamma\delta$ T hücreleri, Th2 ve TEM hücreleri takip ettiği izlendi (Şekil 18).



Şekil 18. T hücre alt grupların oranlarının ve CTLA4, PD1, CCR4 reseptör ekspresyonların ortalamaları

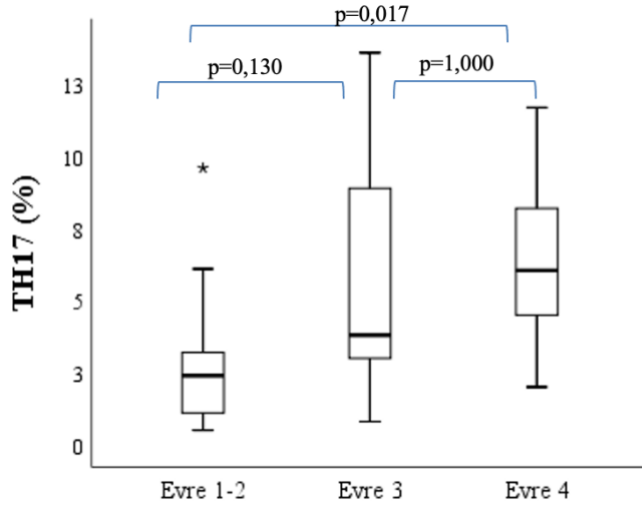
4.3.Evreye Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar

Kolon kanseri hastalarında evre I-II hastalıkta evre III ve IV'e göre daha az LVI izlendi ($p=0,006$). Evreye göre tümör özellikleri **Tablo 2.** de gösterilmiştir. T hücre popülasyonunun evreye göre karşılaştırmalı analizinde Th17 hücreleri evre 4 hastalıkta daha fazla izlendi ($p=0,015$) (Şekil 19 ve **Tablo 3**). Yapılan analizde hastalık evresi ile Th17 arasında belirgin pozitif korelasyon izlendi ($r=0,481$; $p=0,003$) (**Tablo 4**). Evreye göre karşılaştırmalı analizde ICP2-PD1 reseptör ekspresyonu evre 4 hastalıkta daha fazla eksprese edildiği izlendi ($p=0,05$) (**Tablo 3**). PD1 düzeyinin evre ile korele olduğu saptandı ($r=0,405$; $p=0,014$) (**Tablo 4**).

Tablo 2. Evreyeye göre tümör özellikleri

Değişkenler	Evre 1-2 n:13	Evre 3 n:13	Evre 4 n:10	p
MSI-H, n(%)				
Düşük MSI-H	11(84,6)	11(84,6)	8(80)	0,999
MSI-H	2(15,4)	2(15,4)	2(20)	
KRAS, n(%)				
Mutant	3(23,1)	4(30,8)	1(10)	0,536
Wild	10(76,9)	9(69,2)	9(90)	
İntratümoral lenfosit, n(%)	11(84,6)	10(76,9)	5(50)	0,212
Peritümoral lenfosit, n(%)				
Hafif-Orta	9(69,2)	8(61,5)	9(100)	0,113
Belirgin	4(30,8)	5(38,5)	0(0)	
LVI, n(%)	2(15,4) ^a	10(76,9) ^b	6(60) ^b	0,006
PNI, n(%)	2(15,4)	3(23,1)	3(30)	0,878
Tomurcuklanma skoru, n(%)				
Düşük	12(92,3)	10(76,9)	6(60)	0,218
Orta-Yüksek	1(7,7)	3(23,1)	4(40)	

Kruskal-Wallis test, Fisher's Exact test. Post-hoc testlerde anlamlı çıkan sonuçlar farklı küçük harfler ile gösterildi.

**Şekil 19.** Evreyeye göre Th17 hücre oranlarının karşılaştırılması

Tablo 3. Evreye göre T hücre alt grupları ve reseptör ekspresyon oranları

Oranlar %	Evre 1-2 (n:13)	Evre 3 (n:13)	Evre 4 (n:10)	p
<i>CTL</i>	18,85±5,92	20,56±4,54	19,66±5,77	0,724
<i>Th</i>	48,01±10,33	45,5±6,63	50,59±12,22	0,471
<i>NAİVE T</i>	3,4(2,3-4,3)	3,1(1,5-5,3)	4,4(1,7-5,4)	0,926
<i>Th1</i>	33,9(32,55-45,05)	45,1(30,7-57,2)	46(31,9-50,9)	0,382
<i>Th2</i>	19,5(14,7-31,05)	25,2(17,1-34,2)	17,65(15,5-30,7)	0,832
<i>Th17</i>	2,4(1,1-3,2) ^a	3,8(3-8,9) ^{a,b}	6,05(4,5-8,2) ^b	0,015
<i>TREG</i>	2,1(1,2-2,5)	1,8(0,5-2,7)	1,1(0,3-1,5)	0,309
<i>γδ T</i>	13,9(10,7-28,4)	22,9(15,5-49,1)	27,2(11,8-31,7)	0,339
<i>TEM</i>	27,5(21,4-29,5)	23,5(20,7-29,6)	28,1(26,9-31,5)	0,420
<i>CM</i>	11,4(9,6-15)	12,9(10,5-18,6)	18,5(13-23,4)	0,306
<i>CD4/CD8</i>	2,73±0,82	2,35±0,74	2,7±0,84	0,418
<i>ICP1-CTLA4</i>	7,2(5-8,3)	8,1(6,5-14)	8,15(7,4-9,4)	0,280
<i>ICP2-PD1</i>	9,1(6,6-16)	16,8(11,2-21,2)	21,75(14,2-27,1)	0,05
<i>CD4+ γδ T</i>	11,7(9,8-21,5)	14,7(10,8-20,8)	22,85(8,1-30,3)	0,371
<i>CD4- γδ T</i>	2,6(1,3-7,2)	8,2(3,2-10,9)	2,5(1,7-4,4)	0,309
<i>CCR4</i>	12(7,8-13,3)	14,8(9,2-26,5)	10,35(9,3-13,5)	0,286

Normal dağılımlı bulgular ort±SS , normal dağılımı olmayanlar medyan (IQR) ile verildi. Tek yönlü ANOVA, Kruskal-Wallis test. Post-hoc testlerde anlamlı çıkan sonuçlar farklı küçük harfler ile gösterildi.

Tablo 4. T hücre alt grupları ve reseptör ekspresyon oranların evre ile korelasyonu

Oranlar	r	p
<i>CTL</i>	0,001	0,994
<i>Th</i>	0,086	0,617
<i>NAİVE T</i>	0,033	0,847
<i>Th1</i>	0,191	0,280
<i>Th2</i>	-0,022	0,898
<i>Th17</i>	0,481	0,003
<i>TREG</i>	-0,226	0,198
<i>γδ T</i>	-0,171	0,319
<i>TEM</i>	0,166	0,333
<i>CM</i>	0,246	0,148
<i>CD4/CD8</i>	-0,059	0,731
<i>ICP1-CTLA4</i>	0,220	0,198
<i>ICP2-PD1</i>	0,405	0,014
<i>CD4+γδ T</i>	0,249	0,177
<i>CCR4</i>	0,040	0,817

4.4.KRAS Mutasyonuna Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar

KRAS mutasyon durumuna göre mutant ve wild tip hastalıkta T hücre alt tipleri ve reseptör ekspresyonları açısından bir fark izlenmedi (**Tablo 5**).

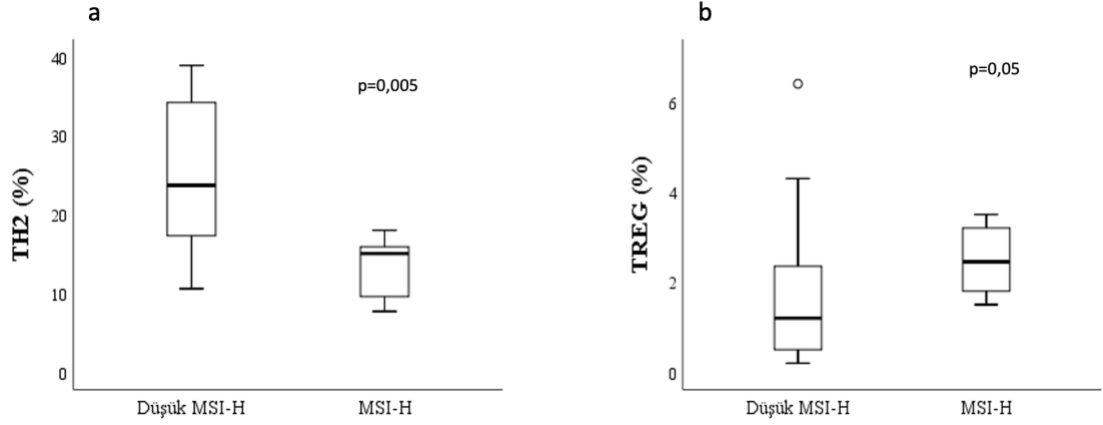
Tablo 5. KRAS mutasyon durumuna göre T hücre alt grup ve reseptör ekspresyon oranları.

Oranlar %	KRAS mutant (n:8)	KRAS wild (n:28)	p
<i>CTL</i>	20(18,7-21,3)	20,4(15,4-24,7)	0,999
<i>Th</i>	41,7(36,15-44,55)	49,6(42,05-55,8)	0,059
<i>NAİVE T</i>	4,4(2,45-6,2)	3,05(1,85-5,1)	0,320
<i>Th1</i>	47(33,4-56,6)	35,2(31,9-52,9)	0,452
<i>Th2</i>	30,5(20,55-34,6)	17,7(14,6-30,7)	0,154
<i>Th17</i>	7,6(2,45-9,55)	3,35(1,8-6,05)	0,116
<i>TREG</i>	0,6(0,4-2,4)	1,6(1-2,7)	0,335
<i>γδ T</i>	25,9(15,5-27,5)	20,6(12,4-31,7)	0,815
<i>TEM</i>	30,3(21,05-31,55)	27,2(21,75-29,15)	0,284
<i>CM</i>	15(10-23,4)	13,8(10,2-20,35)	0,896
<i>CD4/CD8</i>	2(1,82-2,56)	2,74(1,99-3,29)	0,099
<i>ICP1-CTLA4</i>	7,1(5,75-12,85)	7,9(6,55-9,95)	0,837
<i>ICP2-PD1</i>	19,8(9,4-30,6)	14,65(8,6-20,85)	0,302
<i>CD4+ γδ T</i>	15(13,1-21,8)	15,5(8,1-25,9)	0,897
<i>CD4- γδ T</i>	7,15(3,40-10,3)	3,0(11,75-7,6)	0,253
<i>CCR4</i>	14,05(10,4-26,65)	11,3(7,95-14,75)	0,168

Bulgular medyan (IQR) ile verildi. Mann-Whitney U test.

4.5.MSI'ye Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar

MSI-H kolon kanserinde tümörü drene eden lenf nodunda Th2 oranları düşük MSI-H/MSS tümörlere göre azalmış izlenirken ve TREG oranları artmış izlendi (sırasıyla p=0,005 ve 0,05) (**Şekil 20** ve **Tablo 6**).



Şekil 20. MSI durumuna göre a) Th2 hücrelerin karşılaştırılması, b) TREG hücrelerin karşılaştırılması

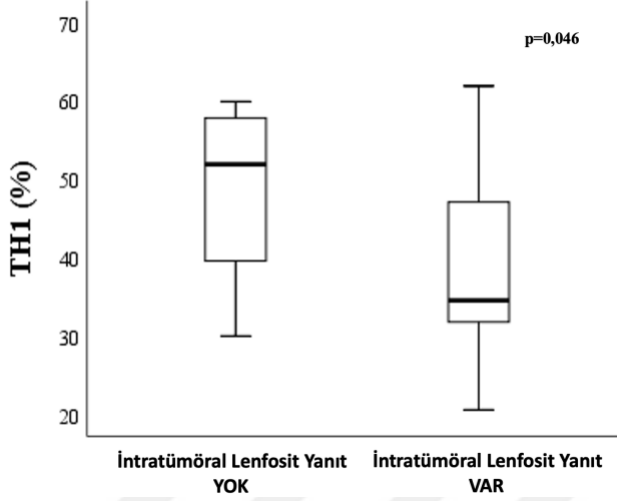
Tablo 6. MSI durumuna göre T hücre alt grup ve reseptör ekspresyon oranları.

Oranlar %	Düşük MSI-H (n:30)	MSI-H (n:6)	p
CTL	19,95(15,5-23)	20,65(17-21,5)	0,951
Th	47,5(40,2-55,8)	48(41,8-55,2)	0,885
NAİVE T	3,55(2,3-5,4)	1,5(1,2-3,9)	0,135
Th1	44,15(32,95-54)	33,3(27,1-36,4)	0,100
Th2	23,7(17,3-34,2)	15,05(9,6-15,9)	0,005
Th17	3,75(2,4-6,8)	2,85(0,8-6,6)	0,548
TREG	1,2(0,5-2,35)	2,45(1,8-3,2)	0,05
$\gamma\delta T$	23,6(12,9-31,3)	17,3(10,4-28,4)	0,448
TEM	27,65(22,8-29,6)	23,25(17,3-30,1)	0,605
CM	15,05(10,5-21)	10,9(7,2-13)	0,146
CD4/CD8	2,43(1,94-3,1)	2,57(1,94-3,25)	0,918
ICP1-CTLA4	7,9(6,3-11,6)	7,2(5-8,1)	0,442
ICP2-PD1	14,65(8,1-23,6)	15,9(9,3-25,2)	0,694
CD4+ $\gamma\delta T$	18,7(10,8-40,9)	10,95(5-21,8)	0,123
CD4- $\gamma\delta T$	4,45(2,4-8,2)	2,15(1,3-3,20)	0,107
CCR4	10,55(7,8-18)	13,75(13,3-14,3)	0,159

Bulgular medyan (IQR) ile verildi. Mann-Whitney U test.

4.6. İntratümöral ve Peritümöral Lenfosit Yanıtı Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar

Kolon kanseri hastalarında intratümöral lenfosit yanıtı olmayan tümörlerde tümörü drene eden lenf nodunda Th1 ekspresyon oranı artmış izlendi ($p=0,046$) (Şekil 21 ve Tablo 7).



Şekil 21. İntratümöral lenfosit yanıtına göre Th1 hücrelerin karşılaştırılması

Tablo 7. İntratümöral lenfosit yanıtına durumuna göre T hücre alt grup ve reseptör ekspresyon oranları.

Oranlar	Yok (n:10)	Var (n:26)	p
CTL	20,75±4,12	19,28±5,72	0,466
Th	48,42±8,66	47,59±10,24	0,822
NAİVE T	4,75(2,7-6)	3,25(1,5-4,9)	0,177
Th1	51,9(39,6-57,8)	34,55(31,8-47,1)	0,046
Th2	20,2(17,6-30,7)	18(14,8-31,7)	0,760
Th17	5,65(3,7-6,8)	3,15(1,6-6,6)	0,393
TREG	1,1(0,3-2,2)	1,7(0,9-2,6)	0,209
$\gamma\delta$ T	26,4(11,8-29,2)	19,9(12,9-31,3)	0,917
TEM	26,55(23-30,5)	27,65(20,7-29,6)	0,794
CM	14,4(10,6-21)	13,8(9,6-20,6)	0,664
CD4/CD8	2,4±0,55	2,66±0,87	0,302
ICP1-CTLA4	8,05(5,8-14)	7,7(6,5-10,3)	0,931
ICP2-PD1	14,65(9,1-24,1)	14,35(8,1-23,6)	0,794
CD4+ $\gamma\delta$ T	18,25(7,9-28,5)	14,7(10,6-21,8)	0,574
CD4- $\gamma\delta$ T	4,35(2-7,20)	3,25(1,8-8,20)	0,724
CCR4	11,9(9,7-18,1)	12,05(7,8-14,8)	0,614

Bulgular ort±SS veya medyan (IQR) ile verildi. Student's t-test, Mann-Whitney U test.

Peritümöral lenfosit yanıt oranına göre T hücre alt grupları ve ICP'ler için fark izlenmedi (**Tablo 8**).

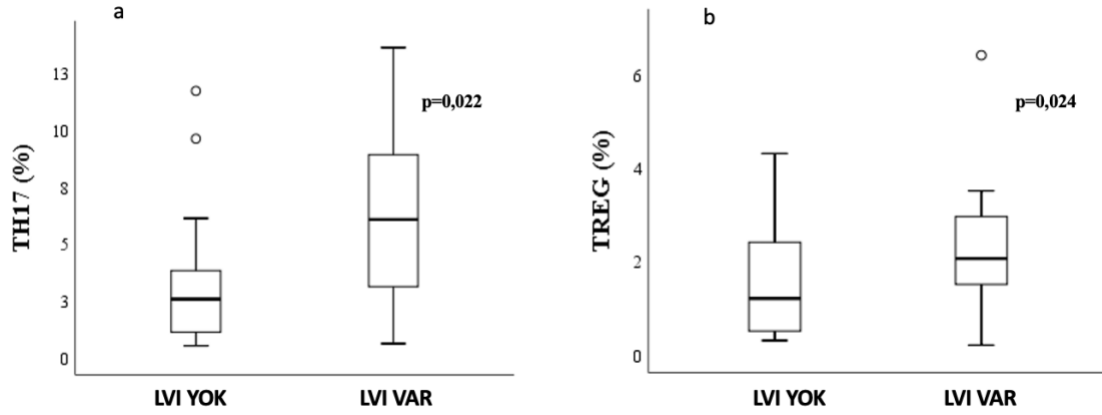
Tablo 8. Peritümöral lenfosit yanıt durumuna göre T hücre alt grup ve reseptör ekspresyon oranları.

Oranlar	Hafif-Orta (n:26)	Belirgin (n:9)	p
<i>CTL</i>	18,7(15,3-22)	20,7(19,8-25,8)	0,149
<i>Th</i>	46,25(39-55,2)	49,4(44,1-55,8)	0,540
<i>NAİVE T</i>	3,45(1,7-5,4)	3,9(2,4-5,3)	0,697
<i>Th1</i>	34,8(32,2-51,9)	46,6(36,4-53,8)	0,272
<i>Th2</i>	19,9(15,5-31)	17,3(15,9-34,3)	0,999
<i>Th17</i>	3,75(2-6,8)	3,1(0,9-6,1)	0,469
<i>TREG</i>	1,2(0,5-2,45)	2,4(2-2,5)	0,131
<i>$\gamma\delta T$</i>	0,55(0,3-1,4)	0,5(0,3-1,8)	0,956
<i>TEM</i>	24,9(20,7-29,4)	29,6(28,6-30,5)	0,061
<i>CM</i>	12,2(9,9-20,6)	15,1(12,9-18,6)	0,469
<i>CD4/CD8</i>	2,74(1,94-3,29)	2,25(1,8-2,89)	0,271
<i>ICP1-CTLA4</i>	7,4(6,2-9,4)	11,6(8,1-12,1)	0,093
<i>ICP2-PD1</i>	12,7(7,1-21,2)	16,8(12,7-25,2)	0,197
<i>CD4+ $\gamma\delta T$</i>	14,7(9,8-28,5)	15(5,5-20,8)	0,335
<i>CD4- $\gamma\delta T$</i>	3,3(2-8,0)	6,6(1,8-10,5)	0,571
<i>CCR4</i>	12(9,2-15,2)	10,3(7,8-13,3)	0,492

Bulgular medyan (IQR) ile verildi. Mann-Whitney U test.

4.7.LVI Varlığına Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar

Kolon kanserinde LVI olan tümörlerde tümörü drene eden lenf nodunda Th17 ve TREG hücrelerin oranı artmış izlendi (sırasıyla p=0,022 ve p=0,024) (**Şekil 22, Tablo 9**).



Şekil 22. LVI varlığına göre a)Th17 hücrelerin karşılaştırması b)TREG hücrelerin karşılaştırılması

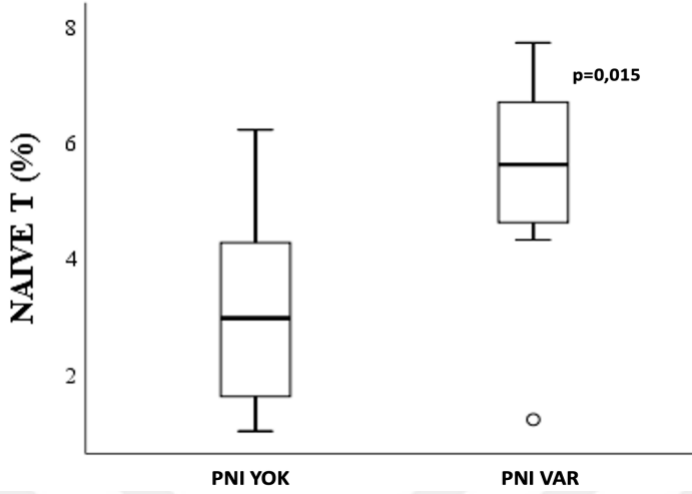
Tablo 9. LVI varlığına göre T hücre alt grup ve reseptör ekspresyon oranları.

Oranlar %	Yok (n:18)	Var (n:18)	p
<i>CTL</i>	19,36±6,16	20,02±4,46	0,715
<i>Th</i>	49,84±10,68	45,79±8,45	0,216
<i>NAİVE T</i>	3,9(2-5,9)	3,05(1,5-4,6)	0,265
<i>Th1</i>	35,2(33,3-48,3)	39,6(31,9-53,8)	0,999
<i>Th2</i>	19,1(14,8-31,7)	19,25(16,2-31)	0,935
<i>Th17</i>	2,55(1,1-3,8)	6,05(3,1-8,9)	0,022
<i>TREG</i>	1,2(0,5-2,4)	2,15(1,5-3,3)	0,024
<i>γδ T</i>	21,3(12,9-28,3)	24,55(11,8-49,1)	0,399
<i>TEM</i>	27,75(20,7-29,7)	26,55(22,8-29,6)	0,839
<i>CM</i>	14,8(9,6-21)	12,95(10,5-19,7)	0,864
<i>CD4/CD8</i>	2,76±0,85	2,41±0,72	0,185
<i>ICP1-CTLA4</i>	7,7(6,5-9,4)	7,85(6,3-12,1)	0,584
<i>ICP2-PD1</i>	11,25(6,6-20,5)	16,8(11,2-24,1)	0,134
<i>CD4+ δ T</i>	15(10,8-21,8)	15,9(7,6-30,3)	0,999
<i>CD4- γδ T</i>	2,95(1,3-7,20)	4,35(2,4-9,7)	0,319
<i>CCR4</i>	11,4(7,8-14,8)	12,75(9,3-23,6)	0,308

Normal dağılımlı bulgular ort±SS , normal dağılımı olmayanlar medyan (IQR) ile verildi. Student's t-test, Mann-Whitney U test.

4.8.PNI Varlığına Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar

Kolon kanserinde PNI olan tümörlerde tümörü drene eden lenf nodunda Naive T hücre oranları artmış izlendi (p=0,015) (Şekil 23 ve Tablo 10).



Şekil 23. PNI varlığına göre Naive T hücrelerin karşılaştırılması

Tablo 10. PNI varlığına göre T hücre alt grup ve reseptör ekspresyon oranları.

Oranlar	Yok (n:28)	Var (n:8)	p
CTL	20,15(16,2-22,6)	19,75(16,3-23,1)	0,955
Th	48,25(41,15-55,5)	45,8(35,75-54,1)	0,588
NAİVE T	2,95(1,6-4,25)	5,6(4,6-6,68)	0,015
Th1	34,7(31,7-52,9)	47,2(35,2-57,9)	0,151
Th2	19,5(16,05-31,35)	17,3(13,5-34,3)	0,643
Th17	4,15(2,55-6,7)	2,2(1,25-5,6)	0,207
TREG	1,65(0,6-2,5)	1,5(0,55-3,75)	0,705
$\gamma\delta T$	24,1(11,25-31,5)	19,9(14,1-27,5)	0,999
TEM	27,2(21,05-29,45)	29,25(22,1-31)	0,378
CM	12,65(10-18,4)	19,6(13,3-22,25)	0,156
CD4/CD8	2,49(1,95-3,17)	2,31(1,88-3,17)	0,695
ICP1-CTLA4	7,55(6-9,05)	11,2(7,4-14,05)	0,059
ICP2-PD1	13,45(7,35-23,85)	16,8(11,45-25,2)	0,251
CD4+ $\gamma\delta T$	15,35(8-24,25)	15(10,8-23,1)	0,627
CD4- $\gamma\delta T$	4,75(1,5-8,2)	2,7(2,3-3,85)	0,568
CCR4	12,05(9,05-18,05)	10,6(7,35-14,35)	0,358

Bulgular medyan (IQR) ile verildi. Mann-Whitney U test.

4.9. Tümör Tomurcuklanma Skoruna Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar

Kolon kanserinde tümör tomurcuklanma skoruna oranına göre tümörü drene eden lenf nodunda T hücre alt tipleri ve reseptör ekspresyonları açısından bir fark izlenmedi (Tablo 11).

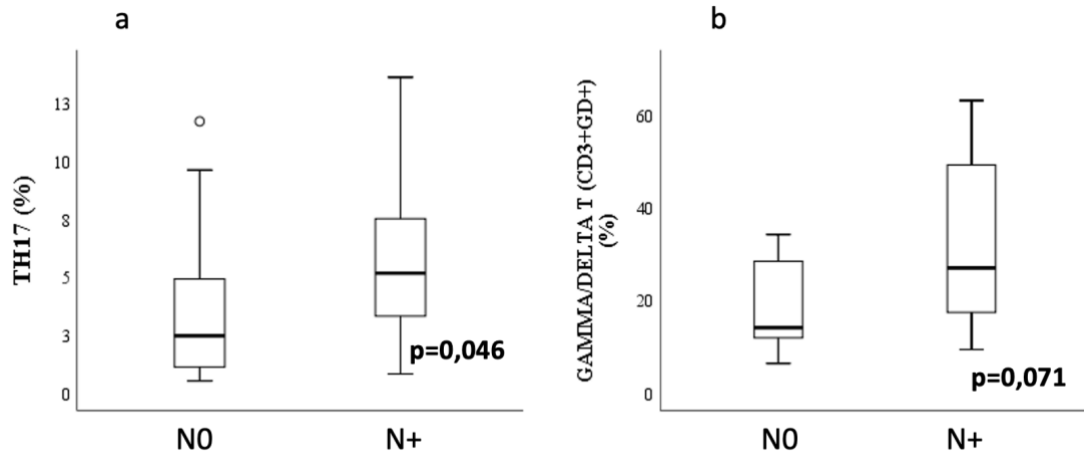
Tablo 11. Tümör Tomurcuklanma skoruna göre T hücre alt grup ve reseptör ekspresyon oranları.

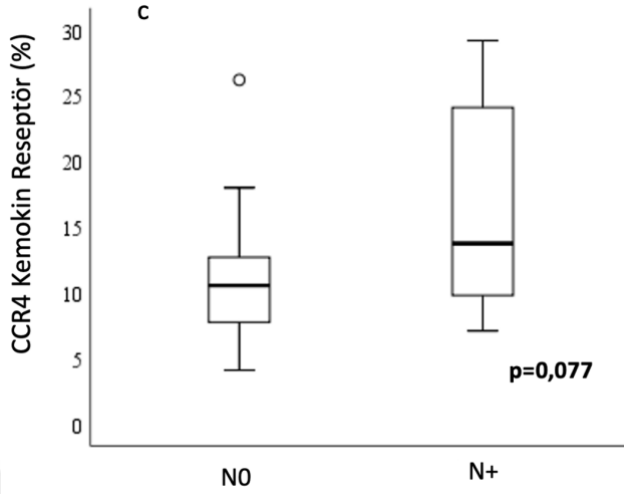
Oranlar	Düşük (n:28)	Orta-Yüksek (n:8)	p
CTL	19,95(16,25-21,5)	23,45(14,2-25,9)	0,399
Th	47,8(39,6-55,8)	47,5(41,95-52,85)	0,896
NAİVE T	3,45(2,15-5,35)	3,15(1,45-5,1)	0,641
Th1	40,6(32,5-52,9)	37,4(33,1-48,85)	0,921
Th2	19,1(15,9-31,7)	20,7(14,5-33,35)	0,985
Th17	3,7(1,95-6,7)	4,4(1,8-7,55)	0,926
TREG	1,7(0,6-2,5)	1,2(0,5-2,7)	0,504
$\gamma\delta$ T	23,6(12,35-30)	17,3(12,4-62)	0,729
TEM	27,2(21,05-29,9)	28,1(22,1-29,15)	0,955
CM	12,95(10-20,8)	15,4(11,15-22,45)	0,641
CD4/CD8	2,65(1,95-3,17)	2,04(1,93-3,06)	0,668
ICP1-CTLA4	8,2(6,25-11,65)	7,3(6,7-7,65)	0,489
ICP2-PD1	12,75(7,35-20,85)	20,2(12,6-24,15)	0,180
CD4+ $\gamma\delta$ T	15,65(8,95-22,45)	14,7(10,6-41,8)	0,695
CD4- $\gamma\delta$ T	3,7(1,5-7,85)	4,95(2,5-14,95)	0,270
CCR4	12(7,95-15)	12,15(9,45-25,55)	0,588

Bulgular medyan (IQR) ile verildi. Mann-Whitney U test.

4.10. Lenf Nodu Tümöral İnfiltrasyon Durumuna Göre Karşılaştırmalı Sonuçlar

İmmunfenotiplenin yapıldığı lenf nodunun tümör infiltrasyonu olan (N+) grupta Th17 hücreleri N0 gruba göre anlamlı artmış izlendi ($p=0,046$). Metastatik lenf nodundan $\gamma\delta$ T hücre oranları ve CCR4 reseptör ekspresyonlarında izlenen artış istatistiksel anlamlılığa kavuşmamıştır (Tablo 12, Şekil 24).





Şekil 24. Lenf nodunun tümör infiltrasyon durumuna göre a) Th17 hücrelerin karşılaştırması, b) $\gamma\delta T$ hücrelerin karşılaştırması, c) CCR4 ekspresyonunun karşılaştırması

Tablo 12. Çalışılan lenf nodunun tümör infiltrasyon durumuna göre hücre ekspresyon oranları ve reseptör ekspresyonları

Oranlar	N0 (n:16)	N+ (n:20)	p
<i>CTL</i>	19,27±5,5	20,03±5,27	0,680
<i>Th</i>	47,64±10,2	47,96±9,57	0,924
<i>NAİVE T</i>	3,7(2,3-5,4)	3,05(1,45-5,35)	0,440
<i>Th1</i>	34,7(32,6-46,6)	48,3(30-56,6)	0,286
<i>Th2</i>	19,1(14,1-31,7)	20,85(17,2-32,6)	0,479
<i>Th17</i>	2,45(1,1-4,9)	5,15(3,3-7,5)	0,046
<i>TREG</i>	1,4(0,55-2,45)	1,6(1-2,7)	0,746
<i>$\gamma\delta T$</i>	14(11,8-28,3)	26,9(17,3-49,1)	0,071
<i>TEM</i>	26(21,05-29,6)	27,8(21,75-30,05)	0,718
<i>CM</i>	12(9,6-16,4)	15,65(10,4-21,05)	0,283
<i>CD4/CD8</i>	2,63±0,79	2,55±0,82	0,769
<i>ICP1-CTLA4</i>	7,45(5,6-9,15)	7,9(6,4-13,05)	0,290
<i>ICP2-PD1</i>	11,25(7,1-18,65)	16,8(10,35-24,15)	0,149
<i>CD4+ $\gamma\delta T$</i>	11,5(9,8-21,5)	17,1(13,1-30,3)	0,173
<i>CD4- $\gamma\delta T$</i>	4,75(1,5-8,2)	2,7(2,3-3,85)	0,568
<i>CCR4</i>	10,55(7,75-12,7)	13,75(9,8-24,1)	0,077

5. TARTIŞMA

Kolon kanseri, tümör evolüsyonu sırasında gelişen driver (sürücü) mutasyonlar ve passenger (yolcu) mutasyonlar; bu somatik mutasyonların sonucunda gelişen neoantijenler ve bu neoantijenlere karşı geliştirilen, özellikle de T hücrelerinde gözlemlenen farklı immün yanıtlar nedeniyle, heterojen bir biyolojiye sahiptir. Bu farklılıklar hem sitotoksik tedavilere hem de immünoterapilere yanıtların değişken olmasına, sağ kalım farklılıklarına sebep olarak heterojen bir klinik ile karşımıza gelir. Birçok çalışma, sistemik bir anti-tümör immün yanıtının immünoterapi etkinliği için gerekli olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, kanser gelişiminin lenfatik ve dolaşım sisteminin sistemik bağışıklık durumunu nasıl etkilediğine dair kapsamlı bir tanım eksikliği mevcuttur (Allen et al., 2020). Tümörü drene eden lenf nodları, anti-tümör immün yanıtlar için primer bölgelerdir ve bu lenf nodlarındaki aktive lenfositlerin fare tümör modeline adoptif transferinin tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (Okamoto, Harada, Shinomiya, Matsuzaki, & Nomoto, 1995).

Klinik veriye göre kanser hastalarında Th1/Th2 dengesinin Th2 lehine kaymış olarak izlendiği bildirilmiştir. CTL ve Th1 polarizasyonu iyi prognostik kabul edilirken, Th2 baskınlığı kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Hou et al., 2013). Preklinik immün makro-çevrenin araştırıldığı bir çalışmada 8 farklı fare tümör modelinde tümör, kan, lenf nodu, dalak ve kemik iliğindeki immün kompozisyon değişiklikleri kütle sitometrisi ile değerlendirildiğinde lokal immün infiltrat ile periferik immün organizasyonun uyuşmadığı izlenmiştir (Allen et al., 2020). Aynı çalışmada dalak, kan ve kemik iliği benzer immün kompozisyon gösterirken tümörü drene eden lenf nodundaki immün bileşenler farklı izlenmiştir. Lenf nodu analizinde, CD4+ T hücrelerin ve Th1 yanıtın azaldığı, CTL ve TREG'lerin dinamik değişkenlik gösterdiği kanıtlanmıştır. Gastrointestinal sistem kanserlerini konu alan klinik başka bir çalışmada progresyonun hem dolaşım hem de tümörü drene eden lenf nodunda Th1 yanıtından Th2 yanıtına immün kaymaya sebep olduğu gösterilmiştir (Nakayama et al., 2000). Bizim çalışmamızda, evre progresyonunda Th1 ve Th2 hücre oranlarında anlamlı bir farklılık izlenmemiştir. Nakayama ve arkadaşlarının çalışmalarında tümörü drene eden lenf

nodundan IFN γ sekrete eden Th1 ekspresyonu ortalama $7,9 \pm 4,8$ iken IL-2 sekrete eden Th1 ekspresyonu ortalama $16,5 \pm 6,4$ bulunmuş ve bu değerler kanser hastalarının PBMC Th1 ekspresyonu ile benzer olup sağlıklı donörlerin PBMC Th1 ekspresyonundakinden yarı yarıya düşük olduğu izlenmiş fakat sonuçlar tümör tiplerine ve evrelerine göre alt grup analizi yapılmamıştır (Nakayama et al., 2000). Bizim çalışmamızda ise kolon kanseri hastalarında tümörü drene eden lenf nodunda Th1 ekspresyonu tüm evreler için ortalama $41,29 \pm 11,88$ olarak saptanmış ve Nakayamanın çalışmasına göre oran olarak daha fazla değerlendirilmiştir. Bu farklılık, kanser popülasyonlarının aynı olmamasına ve farklı evrelerdeki hastalıklar olmasına bağlı olabilir. Başka bir çalışmada kolorektal kanserlerde TNM evresi, peritümöral lenfositik invazyon ve LVI arttıkça İHC ile değerlendiren T-bet ekspresyonlarının ve buna bağlı Th1 oranının azaldığı bildirilmiştir (Ling et al., 2016). Bizim çalışmamızda ise farklı olarak, evreye ve LVI'ya göre Th1 oranının değişmediği, tam aksine peritümöral değil intratümöral lenfosit yanıt artışı olan grupta Th1 artışı olduğu saptanmıştır. MSI-H tümörlerde Th1 oranları artarken KRAS mutant hastalıkta azaldığı bildirilmiş, fakat bizim çalışmamızda bu iki moleküler tipte de Th1 oranları açısından fark izlenmemiştir.

Pellegrini ve arkadaşları kolon kanseri hastalarının PBMC'lerde Th2 oranının arttığını ve kolorektal kanser metastazı izlenen lenf nodunda da hücresel baskınlığın Th2 lehine kaydığını bildirmiştir. Aynı çalışmada, IL-4 salgılayan Th2'lerin ve IL-4 ekspresyon oranlarının evre ile birlikte arttığı da izlenmişti (Pellegrini et al., 1996). Bizim çalışmamızda ise, lenf nodunda Th2 oranının Th1 oranından düşük olduğu ve lenf nodu metastazı olanlarda da değişen evrelerde de Th2 oranının farklı olmadığı izlenmiştir. MSI-H kolon kanserinde Th'ların düşük MSI-H olanlara göre artmış olduğu bildirilmiş fakat Th2 alt tipinin MSI'a göre durumu literatürde bildirilmemiştir. Bizim çalışmamızda, literatürde **ilk defa** MSI-H kolon kanserinde Th2 alt-popülasyonun düşük MSI-H gruba göre azaldığı gösterilmiştir.

Naive T hücreleri tümörlerde nadir izlense de (Pages et al., 2005), bildirilen rölatif oranları evre I-II sol kolon tümörlerinde 3.74 ± 0.63 , sağ kolon tümörlerinde 4.18 ± 1.22 ; evre III-IV sol kolon tümörlerinde 4.92 ± 0.73 , sağ kolon tümörlerinde 5.86 ± 0.86 olarak belirlenip, tümör lokalizasyonu ve TNM evresine göre farklılık göstermediği

bildirilmiştir (Di et al., 2017). Bizim çalışmamızda ise naive T hücre oranı evre I-II hastalıkta %3.4, evre III hastalıkta %3.1, evre IV hastalıkta %4.4 olarak saptanmıştır ve evrelemeye göre hücrelerde farklılık izlenmemiştir. Naive T hücreleri, CTL'lerin tam tersine düşük MSI-H tümörlerde artmış olduğu gösterilirken (Narayanan et al., 2019) bizim çalışmamızda MSI durumuna göre ekspresyon oranlarında farklılık izlenmemiştir. Ayrıca PNI olan kolon tümörlerinde, PNI olmayanlara göre naive T hücre oranlarının anlamlı olarak arttığını literatürde **ilk kez** bildirilmiştir.

Sitotoksik T lenfositlerin, anti-tümör bağışıklığının en önemli efektör mekanizmalarından birini oluşturduğu iyi bilinmektedir. CTL intratümöral ekspresyonunun artmasının, erken metastatik olayların yokluğu ve azalmış kanser nüksü oranı ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir (Deschoolmeester, Baay, Lardon, Pauwels, & Peeters, 2011). Ropponen ve arkadaşları, intratümöral ve peritümöral TIL'lerin varlığı ile tümör evresi arasında ters bir korelasyon göstermişlerdir, yani çalışmalarında TIL'ler evre III ve IV gibi ileri evrelerde daha azalmış bulunmuş ama evre I ve II gibi erken evrelerde daha fazla olarak belirlenmiştir (Ropponen, Eskelinen, Lipponen, Alhava, & Kosma, 1997). Benzer şekilde, MSI-H kolon kanserinde düşük MSI-H tümörlere göre CTL'ler de daha fazla izlendiği bildirilmiştir (Narayanan et al., 2019). Bizim çalışmamızda ise CTL oranları TNM evresi, MSI durumu ya da TIL gibi bakılan diğer tüm histopatolojik prognostik faktörlere göre farksız olarak izlenmiştir.

Zou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sağlıklı insan donörlerinde TREG hücrelerinin fraksiyonunun kemik iliğinde 5.5 ± 3.5 , timusta 1.5 ± 1.2 , lenf nodunda 0.5 ± 0.3 ve kanda $0.5 \pm 0.4\%$ olduğu; kemik iliğinde diğer lenfoid dokulardan daha fazla TREG rezervuarı olduğu (Zou et al., 2004) ve intratümöral TREG sıklığının ise 5.6 ± 3 olduğu bildirilmiştir (Szeponik et al., 2021). Gastrointestinal sistem kanserleri olan hastaların PBMC'lerinde TREG oranı sağlıklı kontrollere göre artmış bildirilmiştir (Sasada, Kimura, Yoshida, Kanai, & Takabayashi, 2003). Sekiz kolon kanseri hastasıyla mezenterik lenf nodundan yapılan TREG çalışmasında sağlıklı lenf nodu donörü alamadıkları için inflamatuvar barsak hastalığı (İBH) olan hastalardan elde edilen lenf nodunu kontrol olarak kullanmışlar ve kolon kanserinde İBH'dan daha fazla TREG ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir (Clarke et al., 2006). Clarke ve arkadaşları kolon

kanseri mezenterik lenf nodunda TREG ekspresyon düzeyini ortalama %1 olarak bildirmiştir. Bizim çalışmamızda ise kolon kanseri hastalarında tümörü drene eden lenf nodunda TREG ekspresyonu tüm evreler için ortalama $2,32 \pm 2,57$ bulunmuş olup sağlıklı insanlarda bildirilen lenf nodu ekspresyonundan 4 kat fazla, Clarke ve arkadaşlarının çalışmasından 2 kat fazla fakat literatürdeki intratümöral TREG oranından daha az olarak saptanmıştır. Yaqub ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kolon kanseri dokusunda ve drene eden lenf nodunda, sağlıklı kolon mukozasına göre İHC ile daha önce bildirilen değerlerden çok daha fazla olan %30'a yakın $CD3^+FOXP3^+TREG$ infiltrasyonu olduğu bildirilmiştir (Yaqub et al., 2008). Hu ve arkadaşlarının 17 çalışmanın sonuçlarını değerlendirdiği meta-analizde hem intratümöral hem de peritümöral alanda TREG infiltrasyonu birlikte artışı TNM evre I-II hastalıkla ilişkili bulunurken sadece intratümöral ya da peritümöral TREG artışı evre ile ilişkisiz bildirilmiştir (Hu et al., 2017). Bizim çalışmamızda ise, Hu ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak TREG ekspresyon oranları ile TNM evreleri arasında ilişki izlenmemiştir. MSI-H kolorektal kanserlerde intratümöral TIL ile birlikte $FOXP3^+TREG$ 'lerin de artmış izlendiği farklı çalışmalarda bildirilmiş olup (Michel et al., 2008; Zhang et al., 2015) benzer şekilde bizim çalışmamızda da MSI-H tümörlerde TREG ekspresyonu düşük MSI-H tümörlere göre artmış izlenmiştir, fakat intratümöral veya peritümöral lenfosit invazyonu ile ilişkili bulunmasa da LVI olan kolon kanserinde TREG oranlarının artmış olduğu belirlenmiştir. Kolon kanserinde immünoterapilerin etkinliklerinin gösterildiği tek grup olan MSI-H grupta ve kötü prognostik LVI olan grupta TREG düzeyindeki anlamlı artış düşünüldüğünde, $CD4^+CD25^+TREG$ hücrelerin ortadan kaldırılması, tümör hücrelerinin immünojenisitesini artırmaya yönelik mevcut girişimlerle birleştirilirse, tümör bağışıklığını artırmak için yeni ve etkili bir strateji olarak kullanılabilir. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz diğer prognostik histopatolojik faktörlerle (lenf nodu pozitifliği, KRAS mutasyonu, tümör tomurcuklanma skoru ve PNI) TREG oranlarında herhangi bir farklılık izlenmemiştir.

Aktive T lenfositlerde PD1 ve CTLA4 gibi immün checkpoint inhibitör co-reseptörler immün yanıtı sınırlamak için artar. Son yıllarda yapılan immünoterapi çalışmalarında, kolon kanserinde immünoterapötiklerin etkinliğinin MSI-H kolon kanserlerle sınırlı

olduğu ve bu durumun MSI-H tümörlerde ICP reseptörlerin, sayıları da artan TIL'ler ve myeloid hücreler üzerinde selektif olarak upregüle olmasına bağlı olabileceği bildirilmiştir (Sillo, Beggs, Morton, & Middleton, 2019). Bizim çalışmamızın genel popülasyonunda evre ile ICP'lerden sadece ICP2-PD1 arasında pozitif korelasyon izlenirken, ne MSI-H tümörlerde ne de KRAS mutasyonu olan grupta ICP'lerin oranında artış izlenmemiştir. Çalışmamızın sonucu, artan ICP2-PD1 düzeyi ile artan immün inhibitör aktivite sonrasında evre progresyonu olabileceğine işaret etmektedir.

Th17 ile ilgili literatürde birbiri ile çelişen çalışmalar olsa da Th17 hücreleri kolon kanseri için kötü prognostik faktör olarak değerlendirilmiş ve daha kısa sağ kalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Amicarella et al., 2017; Bruni et al., 2020; Fridman et al., 2012). Th17 ekspresyonunun kolon kanseri dokusunda sağlıklı doku ve kandan daha fazla olduğu ama hasta ve sağlıklı donörün PBMC'leri arasında ekspresyon farkı olmadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada kolorektal kanseri infiltre eden IL17+ hücrelerin oranının flow sitometrik analiz ile 27 ± 24 olduğu ve stromal IL17+ hücre infiltrasyonunun sağ kalımlarla ilişkisi olmadığı da bildirilmiştir (Amicarella et al., 2017). Bizim çalışmamızda ise, kolon kanserini drene eden lenf nodunda Th17 hücre oranı $4,68 \pm 3,47$ olarak hesaplanmıştır. Bu farklılık IL17'nin Th17 hücreleri dışındaki hücrelerce de eksprese edilebilirliğinden kaynaklanabileceği gibi analiz edilen hücre popülasyon alanının kemokin mikroçevresinden de kaynaklanabilir. Kolorektal kanserlerde de İHC ile Th17 düzeyinin T evresi için migrasyon ve invazyon ile ilişkisi olduğu, ayrıca lenf nodu metastazı olan hastalarda intratümöral Th17 ekspresyonunun da arttığı gösterilmiştir (Sui, Qiu, Yu, Kong, & Zhen, 2019). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da artan evre ile Th17 ekspresyonunun korele bir şekilde arttığı gösterilmiş ve evreden bağımsız olarak lenf nodu metastazı ile de ilişkili bulunmuştur. Bir diğer kötü prognostik risk faktörü olan PNI ile Th17 hücre oranlarında anlamlı artış saptasak da diğer prognostik histopatolojik faktörlerle (KRAS mutasyonu, tümör tomurcuklanma skoru ve PNI) Th17 hücre oranlarında herhangi bir farklılık izlenmemiş olması literatürdeki çelişkili sonuçlarla (Amicarella et al., 2017; Bruni et al., 2020) benzerlik göstermektedir.

$\gamma\delta$ T hücreleri, sağlıklı bireylerin periferik kan T lenfositlerin $<0,5-5\%$ 'i ni oluşturur fakat lenf nodu ve dalakta bu oran daha düşük olarak bildirilmiştir (Di Carlo et al., 2013; Lee et al., 2020). $\gamma\delta$ T hücreleri direkt ve indirekt antitümör sitotoksik özelliklerinden dolayı çeşitli kanser tiplerinde adoptif hücre tedavisi şeklinde immünoterapiler arasında yerini almıştır. Bunun tersine, $\gamma\delta$ T hücrelerin birçok kanserde artmış anjiogenez, kötü prognoz ve daha kısa sağ kalım ile ilişkisi de gösterilmiştir (Zhao, Niu, & Cui, 2018). Bu antitümör ve protümör dual aktivitelerinden dolayı $\gamma\delta$ T hücrelerin 'dost' mu 'düşman' mı olduğu hala araştırılmaktadır. $\gamma\delta$ T hücrelerin çoğunluğu subkutanöz ve mukozal alanlarda dağılmış olarak bulunduğundan, kolon mukozasında da intraepitelyal lenfositlerin insanda $20-30\%$ 'unu oluşturmaktadır (Suzuki, Hayman, Kilbey, Edwards, & Coffelt, 2020). Amicarella ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kolorektal kanseri infiltre eden $CD3^+$ $\gamma\delta$ T hücrelerin oranı ortalama $24\pm5\%$ olarak hesaplanmıştır (Amicarella et al., 2017). Bizim çalışmamızda kolon kanserini drenen sekonder lenf nodlarında $CD3^+$ $\gamma\delta$ T hücrelerin oranı ortalama $25,18\pm15,68\%$ olarak saptanmıştır. Çalışmamızda total $\gamma\delta$ T hücreleri analiz edilmiş fakat $V\delta1^+$ veya $V\delta2^+$ ayrımı yapılmamıştır. Literatürde $\gamma\delta$ T lenfositler çoğunlukla **$CD4^- CD8^-$** double negatif veya **$CD4^- CD8^+$** olarak bildirilse de (Lee et al., 2020; Ma, Yuan, Guo, Yan, & Li, 2020) bizim kolon kanseri hastalarından oluşan tüm popülasyonumuzda immünofenotiplemeye göre $CD4^-$ ve $CD4^+$ $\gamma\delta$ hücrelerin rölatif ekspresyonları karşılaştırıldığında bilinen standardın aksine $CD4^+$ $\gamma\delta$ T hücrelerinin daha fazla olduğu izlenmiştir. Literatürde **ilk kez** olarak bildirdiğimiz bu bulgu daha önce de literatürde tanımlanmış ITK aracılı RAS yolak aktivasyonuna (Qi et al., 2009) bağlı olabileceği düşünülerek KRAS mutasyonu olan ve olmayan hastaların alt grubu ile değerlendirildiğinde, hem mutant hem de wild tipte $CD4^+$ $\gamma\delta$ T hücrelerin oranının, $CD4^-$ $\gamma\delta$ T hücrelerin oranından yüksek olduğu izlenmiştir. Kolon kanserinde yapılmış *in vitro* adoptif $\gamma\delta$ T hücreleri tedavisi, direk sitotoksik aracılı antitümör etkinlik gösterse de, $\gamma\delta$ T hücreleri IL17 salgılayarak protümöral etkinlik de gösterebilirler (Ma et al., 2020). MSI-H kolon kanserinde literatürde bildirilen artmış TIL oranlarıyla orantılı olarak intra tümöral total $\gamma\delta$ T hücrelerin anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (Narayanan et al., 2019). Bizim çalışmamızda primer amaç olan evreye göre total $\gamma\delta$ T hücrelerinde fark izlenmediği gibi

MSI, KRAS mutasyonu gibi moleküler değişikliklere göre veya diğer bakılan prognostik histopatolojik özelliklere göre de $\gamma\delta$ T hücrelerin oranında farklılık izlenmemiştir.

Di ve arkadaşları evre I-II Kolon kanserinde CM & TEM ayrımı yapılmadan bakılan CD4+ hafıza T hücre oranları sol kolon tümörlerinde 6.69 ± 1.01 , sağ kolon tümörlerinde 5.83 ± 0.82 ; evre III-IV hastalıkta sol kolon tümörlerinde 11.82 ± 1.51 , sağ kolon tümörlerinde 10.69 ± 2.18 olarak hesaplanıp, tümör lokalizasyonu ile fark göstermediği, fakat TNM evresi ile pozitif ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Di et al., 2017). Bu bulguların tersine başka bir çalışmada ise CD4+ hafıza T hücre yoğunluklarının lokal tümör invazyon oranları ile ters ilişkili olduğu gösterilmiş ve bu hücreler, T4 tümörde T1 tümöre göre daha azalmış oranlarda izlenmiştir (Fridman et al., 2012). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde CM median oranı evre I-II hastalıkta %11, evre III hastalıkta %12, evre IV hastalıkta %18, TEM median oranı evre I-II hastalıkta %27, evre III hastalıkta %23, evre IV’de %28 olarak saptanmıştır ve değişen evre ile hafıza hücreleri alt tipleri arasında fark izlenmemiştir. Ayrıca LVI ve bir diğer invazyon belirteci olan lenf nodu tutulumu durumunda CM ve TEM hücrelerin oranlarında da farklılık da izlenmemiştir.

Kolon kanserinde Tümör Tomucuklanma Skoru ile T lenfosit yanıtını karşılaştıran daha önce herhangi bir çalışma yapılmamış olup çalışmamız bu konuda yapılmış **ilk** çalışmadır. Yaptığımız analizde tümör tomucuklanma skoruna göre T hücre alt gruplarında farklılık izlenmemiştir.

Yapılan çalışmalarda, sağlıklı gönüllülerle karşılaştırıldığında ortalama helper suppressor oranı (CD4/CD8) kanser hastalarında daha düşük olarak izlenmiştir. Meme kanseri ile yapılmış çalışmalarda CD4/CD8 oranının artışının iyi prognostik kriter olup relaps ve aksillar lenf nodu metastazı ile negatif ilişkili olduğu gösterilmiştir (Nicolini et al., 1996). Renal hücreli kanser hastalarında da interferon tedavisi sonrası artan CD4/CD8 oranının tümör regresyonunu pozitif predikte ettiği bildirilmiştir (Hernberg, Muhonen, & Pyrhonen, 1997). Çift primer kolon kanseri olan hastalarda PBMC’de CD4/CD8 oranları 0.72 ± 0.26 olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise tüm popülasyonda oranlar 2.59 ± 0.79 olarak Th lehine artmış olarak belirlenmiştir. Evre,

MSI, KRAS mutasyonu ve diğer histopatolojik risk faktörlerle CD4/CD8 oranı arasında bir fark veya ilişki saptanmamıştır.

Kolon kanserinde prognozu belirleyen en önemli hücresel belirteç olarak intratümöral efektör ve hafıza hücreleri olduğu bildirilse de (Sillo et al., 2019), yaptığımız çalışmada tüm popülasyonda en önemli prognostik belirteç olan evreye göre hem intratümöral hem de peritümöral lenfosit yanıtı ek olarak tümörü drene eden lenf nodunda sadece immün baskılayıcı Th17 hücrelerin ve immün inhibitör reseptör PD1 düzeylerinin evre ile arttığını literatürde **ilk olarak** gösterilmiştir. Bir başka deyişle çalışmamızda, invazyon durumu ve evreyi belirlemede efektör hücrelerden çok immün yanıtı baskılayan hatta durduran hücre ve moleküllerin rol alabileceği gösterilmiştir. Benzer şekilde, literatürde evre I-III kolon kanseri için MSI-H durumu iyi prognostik kriter olarak kabul edilse de evre 4 hastalıkta MSI-H tümörlerin daha kötü prognoz ile seyrettiği bildirilmiştir. Erken evrelerdeki bu avantaj tümör mikro-çevresinde daha aktif ve daha fazla bir efektör hücre infiltrasyonuna atfedilmiştir (Sillo et al., 2019). Çalışmamızın genel popülasyonundaki immün baskılayıcı Th17 ve PD1 oranların evre ile artışına benzer şekilde MSI-H hastalık durumunda da yine immün baskılayıcı TREG oranlarının anlamlı şekilde arttığı fakat bir diğer immün baskılayıcı kabul edilen Th2 hücrelerin oranlarının anlamlı şekilde azaldığını gösterilmiştir.

Kolon kanserinin PBMC veya TIL ilişkisi ve prognostik etkileri birçok çalışmada araştırılmıştır. Çalışmalarda çoğunlukla İHC yöntemler ve hem tek hücreli hem de toplu çoklu omik veri kümeleri kullanan analitik araçlar kullanılmıştır. Flow sitometrik araştırmalar ise ya preklinik hücre dizisi veya hayvan çalışmaları ya da sınırlı az sayıda hastalar üzerinde klinik çalışma olarak yapılmıştır. Lenf nodu analizi ile yapılmış literatürde yer alan az sayıdaki çalışmadan daha fazla hasta sayısı ile yaptığımız bizim çalışmamızda diğerlerinden farklı olarak kolon kanserini direne eden lenf nodunda **tek hücre değil geniş bir T hücre paneli** ve immün inhibisyon ilişkili moleküller analiz edilmiş ve T hücre alt gruplarının oranları belirlenmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Lenfositler tarafından tümör hücresine karşı immün yanıt lenf nodlarında gelişir. Tümörle ilişkili sekonder lenfoid organlardaki immün düzen ile kolon kanseri arasındaki ilişki ise hala tam olarak açıklanmamıştır. Bizim çalışmamızda, kolon kanserini drene eden lenf nodları incelenerek kolon kanseri hastalarında sekonder lenfoid organlarda **literatüre göre daha fazla hasta sayısı ile daha detaylı olarak T hücre profili belirlenmiştir.**

Kanser hastalarında Th1/Th2 dengesi Th2 lehine kaymış izlendiği bildirilmiştir. CTL ve Th1 polarizasyonu iyi prognostik kabul edilirken Th2 baskınlığı kötü prognozla ilişkilendirilmiştir fakat bizim çalışmamızda evre progresyonunda Th1 ve Th2 hücre oranlarında anlamlı bir farklılık izlenmemiştir ve tüm popülasyonda lenf nodunda Th2 oranının Th1 oranından düşük olduğu ve lenf nodu metastazı olanlarda da değişen evrelerde de Th2 oranının farklı olmadığı izlenmiştir. Çalışmamızda kolon kanseri hastalarında tümörü drene eden lenf nodunda TREG ekspresyonu tüm evreler için daha önce literatürde bildirilmiş sağlıklı kontrollerdeki lenf nodu ekspresyonundan 4 kat fazla, az sayıda hastayla yapılan kolon kanseri mezenterik lenf nodu ekspresyonundan 2 kat fazla ve intratümöral TREG oranından daha az olarak saptanmasına rağmen evreye göre anlamlı fark izlenmemiştir. Artan evre ile Th17 ekspresyonunun korele bir şekilde arttığı ve evreden bağımsız olarak lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, LVI olan kolon tümörlerinde naive T hücre oranlarının anlamlı olarak arttığını literatürde **ilk kez** biz bildiriyoruz. Literatürde kolon kanserinde hafıza hücrelerinin alt gruplarının çalışılması bildirilmediği gibi evre, LVI ve lenf nodu tümöral tutulumu ile kolon kanserini drene eden lenf nodunda TEM ve/veya CM hücre oranlarının değişmediğini literatürde **ilk kez** biz bildiriyoruz. Kolon kanserinde intratümöral tomucuklanma skoru ile sekonder lenf nodlarındaki immün hücre alt gruplarında değişiklik izlenmemiştir. Daha önce kolon kanserinde Tümör Tomucuklanma Skoru ile immün T lenfosit yanıtını karşılaştıran bir çalışma yapılmamış olup çalışmamız bu konuda yapılmış **ilk çalışmadır.** Çalışmamızda çalışmanın genel popülasyonundan farklı olarak MSI-H alt grupta immün baskılayıcı Th2 ve TREG oranlarının anlamlı

şekilde arttığı literatürde **ilk kez** olarak gösterilmiştir. Son olarak çalışmamızda, literatürde kolon kanseri hastalarında **ilk kez** olarak CD4+ $\gamma\delta$ T hücre popülasyonunun varlığı belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada tüm popülasyonda en önemli prognostik belirteç olan evreye göre hem intratümöral hem de peritümöral lenfosit yanıtı ek olarak tümörü drene eden lenf nodunda immün hücre popülasyonlarının dağılımını değerlendirdiğimizde sadece immün baskılayıcı Th17 hücrelerin ve immün inhibitör reseptör PD1 düzeylerinin evre ile paralel olarak arttığını göstererek **invazyon durumu ve evreyi belirlemede efektör hücrelerden çok immün yanıtı baskılayan hatta durduran hücre ve moleküllerin rol alabileceğini bildiriyoruz.**

KAYNAKLAR

- Al-haidari, A. A., Syk, I., Jirstrom, K., & Thorlacius, H. (2013). CCR4 mediates CCL17 (TARC)-induced migration of human colon cancer cells via RhoA/Rho-kinase signaling. *Int J Colorectal Dis*, 28(11), 1479-1487. doi:10.1007/s00384-013-1712-y
- Al-Sukhni, E., Attwood, K., Gabriel, E. M., LeVea, C. M., Kanehira, K., & Nurkin, S. J. (2017). Lymphovascular and perineural invasion are associated with poor prognostic features and outcomes in colorectal cancer: A retrospective cohort study. *Int J Surg*, 37, 42-49. doi:10.1016/j.ijsu.2016.08.528
- Allen, B. M., Hiam, K. J., Burnett, C. E., Venida, A., DeBarge, R., TenVooren, I., .Spitzer, M. H. (2020). Systemic dysfunction and plasticity of the immune macroenvironment in cancer models. *Nat Med*, 26(7), 1125-1134. doi:10.1038/s41591-020-0892-6
- Amicarella, F., Muraro, M. G., Hirt, C., Cremonesi, E., Padovan, E., Mele, V., Iezzi, G. (2017). Dual role of tumour-infiltrating T helper 17 cells in human colorectal cancer. *Gut*, 66(4), 692-704. doi:10.1136/gutjnl-2015-310016
- Andreyev, H. J., Norman, A. R., Cunningham, D., Oates, J. R., & Clarke, P. A. (1998). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst*, 90(9), 675-684. doi:10.1093/jnci/90.9.675
- Angell, H. K., Bruni, D., Barrett, J. C., Herbst, R., & Galon, J. (2020). The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond. *Clin Cancer Res*, 26(2), 332-339. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1851
- Bedossa, P., Poynard, T., Bacci, J., Naveau, S., Lemaigre, G., Chaput, J. C., & Martin, E. (1990). Expression of histocompatibility antigens and characterization of the lymphocyte infiltrate in hyperplastic polyps of the large bowel. *Hum Pathol*, 21(3), 319-324. doi:10.1016/0046-8177(90)90233-u
- Blank, C. U., Haanen, J. B., Ribas, A., & Schumacher, T. N. (2016). CANCER IMMUNOLOGY. The "cancer immunogram". *Science*, 352(6286), 658-660. doi:10.1126/science.aaf2834
- Blatner, N. R., Mulcahy, M. F., Dennis, K. L., Scholtens, D., Bentrem, D. J., Phillips, J. D., . . . Khazaie, K. (2012). Expression of RORgammat marks a pathogenic regulatory T cell subset in human colon cancer. *Sci Transl Med*, 4(164), 164ra159. doi:10.1126/scitranslmed.3004566
- Boland, C. R., & Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073-2087 e2073. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.064
- Brenner, H., Kloor, M., & Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *Lancet*, 383(9927), 1490-1502. doi:10.1016/S0140-6736(13)61649-9

- Bruni, D., Angell, H. K., & Galon, J. (2020). The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer*, 20(11), 662-680. doi:10.1038/s41568-020-0285-7
- Cen, S., Liu, K., Zheng, Y., Shan, J., Jing, C., Gao, J., Liu, Z. (2021). BRAF Mutation as a Potential Therapeutic Target for Checkpoint Inhibitors: A Comprehensive Analysis of Immune Microenvironment in BRAF Mutated Colon Cancer. *Front Cell Dev Biol*, 9, 705060. doi:10.3389/fcell.2021.705060
- Clarke, S. L., Betts, G. J., Plant, A., Wright, K. L., El-Shanawany, T. M., Harrop, R., Godkin, A. J. (2006). CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PLoS One*, 1, e129. doi:10.1371/journal.pone.0000129
- Colbeck, E. J., Ager, A., Gallimore, A., & Jones, G. W. (2017). Tertiary Lymphoid Structures in Cancer: Drivers of Antitumor Immunity, Immunosuppression, or Bystander Sentinels in Disease? *Front Immunol*, 8, 1830. doi:10.3389/fimmu.2017.01830
- de Mey, S., Jiang, H., Wang, H., Engels, B., Gevaert, T., Dufait, I., De Ridder, M. (2018). Potential of memory T cells in bridging preoperative chemoradiation and immunotherapy in rectal cancer. *Radiother Oncol*, 127(3), 361-369. doi:10.1016/j.radonc.2018.04.003
- Deschoolmeester, V., Baay, M., Lardon, F., Pauwels, P., & Peeters, M. (2011). Immune Cells in Colorectal Cancer: Prognostic Relevance and Role of MSI. *Cancer Microenviron*, 4(3), 377-392. doi:10.1007/s12307-011-0068-5
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., & Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), 3279-3290. doi:10.1038/sj.onc.1210421
- Di Carlo, E., Bocca, P., Emionite, L., Cilli, M., Cipollone, G., Morandi, F., Prigione, I. (2013). Mechanisms of the antitumor activity of human Vgamma9Vdelta2 T cells in combination with zoledronic acid in a preclinical model of neuroblastoma. *Mol Ther*, 21(5), 1034-1043. doi:10.1038/mt.2013.38
- Di, J., Zhuang, M., Yang, H., Jiang, B., Wang, Z., & Su, X. (2017). Clinical significance of circulating immune cells in left- and right-sided colon cancer. *PeerJ*, 5, e4153. doi:10.7717/peerj.4153
- Ellyard, J. I., Simson, L., & Parish, C. R. (2007). Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens*, 70(1), 1-11. doi:10.1111/j.1399-0039.2007.00869.x
- Ferris, R. L., & Galon, J. (2016). Additional Support for the Introduction of Immune Cell Quantification in Colorectal Cancer Classification. *J Natl Cancer Inst*, 108(8). doi:10.1093/jnci/djw033

Flaherty, D. C., Lavotshkin, S., Jalas, J. R., Torisu-Itakura, H., Kirchoff, D. D., Sim, M. S., . . . Bilchik, A. J. (2016). Prognostic Utility of Immunoprofiling in Colon Cancer: Results from a Prospective, Multicenter Nodal Ultrastaging Trial. *J Am Coll Surg*, 223(1), 134-140. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2016.03.003

Fridman, W. H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., & Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 298-306. doi:10.1038/nrc3245

Fuchs, T. L., Sioson, L., Sheen, A., Jafari-Nejad, K., Renaud, C. J., Andrici, J., Gill, A. J. (2020). Assessment of Tumor-infiltrating Lymphocytes Using International TILs Working Group (ITWG) System Is a Strong Predictor of Overall Survival in Colorectal Carcinoma: A Study of 1034 Patients. *Am J Surg Pathol*, 44(4), 536-544. doi:10.1097/PAS.0000000000001409

Galindo-Pumarino, C., Collado, M., Herrera, M., & Pena, C. (2021). Tumor Microenvironment in Metastatic Colorectal Cancer: The Arbitrator in Patients' Outcome. *Cancers (Basel)*, 13(5). doi:10.3390/cancers13051130

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Pages, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 313(5795), 1960-1964. doi:10.1126/science.1129139

Galon, J., Fridman, W. H., & Pages, F. (2007). The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. *Cancer Res*, 67(5), 1883-1886. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4806

Galon, J., Pages, F., Marincola, F. M., Angell, H. K., Thurin, M., Lugli, A., Fox, B. A. (2012). Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med*, 10, 205. doi:10.1186/1479-5876-10-205

Gao, Z., Cao, H., Xu, X., Wang, Q., Wu, Y., & Lu, Q. (2021). Prognostic value of lymphovascular invasion in stage II colorectal cancer patients with an inadequate examination of lymph nodes. *World J Surg Oncol*, 19(1), 125. doi:10.1186/s12957-021-02224-3

Gattorno, M., Prigione, I., Morandi, F., Gregorio, A., Chiesa, S., Ferlito, F., Pistoia, V. (2005). Phenotypic and functional characterisation of CCR7+ and CCR7- CD4+ memory T cells homing to the joints in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7(2), R256-267. doi:10.1186/ar1485

Gianotti, L., Sargenti, M., Galbiati, F., Nespoli, L., Brivio, F., Rescigno, M., & Nespoli, A. (2008). Phenotype and function of dendritic cells and T-lymphocyte polarization in the human colonic mucosa and adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol*, 34(8), 883-889. doi:10.1016/j.ejso.2008.01.026

Gober, H. J., Kistowska, M., Angman, L., Jenö, P., Mori, L., & De Libero, G. (2003). Human T cell receptor gamma delta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med*, 197(2), 163-168. doi:10.1084/jem.20021500

Gonsalves, W. I., Mahoney, M. R., Sargent, D. J., Nelson, G. D., Alberts, S. R., Sinicrope, F. A., Alliance for Clinical Trials in, O. (2014). Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147. *J Natl Cancer Inst*, 106(7). doi:10.1093/jnci/dju106

Guo, L., Wang, C., Qiu, X., Pu, X., & Chang, P. (2020). Colorectal Cancer Immune Infiltrates: Significance in Patient Prognosis and Immunotherapeutic Efficacy. *Front Immunol*, 11, 1052. doi:10.3389/fimmu.2020.01052

Hanke, T., Melling, N., Simon, R., Sauter, G., Bokemeyer, C., Lebok, P., Marx, A. H. (2015). High intratumoral FOXP3(+) T regulatory cell (Tregs) density is an independent good prognosticator in nodal negative colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(7), 8227-8235. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26339391>

Harris, E. I., Lewin, D. N., Wang, H. L., Lauwers, G. Y., Srivastava, A., Shyr, Y., Washington, M. K. (2008). Lymphovascular invasion in colorectal cancer: an interobserver variability study. *Am J Surg Pathol*, 32(12), 1816-1821. doi:10.1097/PAS.0b013e3181816083

Hendry, S., Salgado, R., Gevaert, T., Russell, P. A., John, T., Thapa, B., . . . Fox, S. B. (2017). Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Adv Anat Pathol*, 24(5), 235-251. doi:10.1097/PAP.0000000000000162

Hernberg, M., Muhonen, T., & Pyrhonen, S. (1997). Can the CD4+/CD8+ ratio predict the outcome of interferon-alpha therapy for renal cell carcinoma? *Ann Oncol*, 8(1), 71-77. doi:10.1023/a:1008293117223

Hou, N., Zhang, X., Zhao, L., Zhao, X., Li, Z., Song, T., & Huang, C. (2013). A novel chronic stress-induced shift in the Th1 to Th2 response promotes colon cancer growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 439(4), 471-476. doi:10.1016/j.bbrc.2013.08.101

Hu, G., Li, L., & Hu, K. (2020). Clinical implications of perineural invasion in patients with colorectal cancer. *Medicine (Baltimore)*, 99(17), e19860. doi:10.1097/MD.00000000000019860

Hu, G., Li, Z., & Wang, S. (2017). Tumor-infiltrating FoxP3(+) Tregs predict favorable outcome in colorectal cancer patients: A meta-analysis. *Oncotarget*, 8(43), 75361-75371. doi:10.18632/oncotarget.17722

Idos, G. E., Kwok, J., Bonthala, N., Kysh, L., Gruber, S. B., & Qu, C. (2020). The Prognostic Implications of Tumor Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep*, 10(1), 3360. doi:10.1038/s41598-020-60255-4

Knijn, N., Mogk, S. C., Teerenstra, S., Simmer, F., & Nagtegaal, I. D. (2016). Perineural Invasion is a Strong Prognostic Factor in Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Am J Surg Pathol*, 40(1), 103-112. doi:10.1097/PAS.0000000000000518

Larbi, A., & Fulop, T. (2014). From "truly naive" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A*, 85(1), 25-35. doi:10.1002/cyto.a.22351

Lee, H. W., Chung, Y. S., & Kim, T. J. (2020). Heterogeneity of Human gammadelta T Cells and Their Role in Cancer Immunity. *Immune Netw*, 20(1), e5. doi:10.4110/in.2020.20.e5

Leman, J. K., Sandford, S. K., Rhodes, J. L., & Kemp, R. A. (2018). Multiparametric analysis of colorectal cancer immune responses. *World J Gastroenterol*, 24(27), 2995-3005. doi:10.3748/wjg.v24.i27.2995

Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, 343(2), 78-85. doi:10.1056/NEJM200007133430201

Lievre, A., Bachet, J. B., Le Corre, D., Boige, V., Landi, B., Emile, J. F., Laurent-Puig, P. (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*, 66(8), 3992-3995. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0191

Lin, L., Hu, X., Zhang, H., & Hu, H. (2019). Tertiary Lymphoid Organs in Cancer Immunology: Mechanisms and the New Strategy for Immunotherapy. *Front Immunol*, 10, 1398. doi:10.3389/fimmu.2019.01398

Lindor, N. M., Sloan, J., Goldberg, R., Bowen, D., Nigon, S., Roche, A., Morlan, B. W. (2004). Colorectal tumour microsatellite instability test results: perspectives from patients. *Hered Cancer Clin Pract*, 2(2), 69-75. doi:10.1186/1897-4287-2-2-69

Ling, A., Lundberg, I. V., Eklof, V., Wikberg, M. L., Oberg, A., Edin, S., & Palmqvist, R. (2016). The infiltration, and prognostic importance, of Th1 lymphocytes vary in molecular subgroups of colorectal cancer. *J Pathol Clin Res*, 2(1), 21-31. doi:10.1002/cjp2.31

Lo Presti, E., Dieli, F., & Meraviglia, S. (2014). Tumor-Infiltrating gammadelta T Lymphocytes: Pathogenic Role, Clinical Significance, and Differential Programming in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, 5, 607. doi:10.3389/fimmu.2014.00607
Lugli, A., Kirsch, R., Ajioka, Y., Bosman, F., Cathomas, G., Dawson, H., Quirke, P. (2017). Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the

International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol*, 30(9), 1299-1311. doi:10.1038/modpathol.2017.46

Ma, R., Yuan, D., Guo, Y., Yan, R., & Li, K. (2020). Immune Effects of gammadelta T Cells in Colorectal Cancer: A Review. *Front Immunol*, 11, 1600. doi:10.3389/fimmu.2020.01600

Maffeis, V., Nicole, L., & Cappellesso, R. (2019). RAS, Cellular Plasticity, and Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Front Oncol*, 9, 1255. doi:10.3389/fonc.2019.01255

Mei, Z., Liu, Y., Liu, C., Cui, A., Liang, Z., Wang, G., Li, C. (2014). Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*, 110(6), 1595-1605. doi:10.1038/bjc.2014.46

Michel, S., Benner, A., Tariverdian, M., Wentzensen, N., Hoefler, P., Pommerencke, T., Kloor, M. (2008). High density of FOXP3-positive T cells infiltrating colorectal cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer*, 99(11), 1867-1873. doi:10.1038/sj.bjc.6604756

Miko, E., Meggyes, M., Doba, K., Barakonyi, A., & Szereday, L. (2019). Immune Checkpoint Molecules in Reproductive Immunology. *Front Immunol*, 10, 846. doi:10.3389/fimmu.2019.00846

Moncunill, G., Han, H., Dobano, C., McElrath, M. J., & De Rosa, S. C. (2014). OMIP-024: pan-leukocyte immunophenotypic characterization of PBMC subsets in human samples. *Cytometry A*, 85(12), 995-998. doi:10.1002/cyto.a.22580

Murphy, K., & Weaver, C. (2016). *Janeway's immunobiology* (9th edition. ed.). New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC.

Murphy, K. M., & Reiner, S. L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*, 2(12), 933-944. doi:10.1038/nri954

Murphy, K. M., Zhang, S., Geiger, T., Hafez, M. J., Bacher, J., Berg, K. D., & Eshleman, J. R. (2006). Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *J Mol Diagn*, 8(3), 305-311. doi:10.2353/jmoldx.2006.050092

Nakayama, H., Kitayama, J., Muto, T., & Nagawa, H. (2000). Characterization of intracellular cytokine profile of CD4(+) T cells in peripheral blood and tumor-draining lymph nodes of patients with gastrointestinal cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 30(7), 301-305. doi:10.1093/jjco/hyd078

Narayanan, S., Kawaguchi, T., Peng, X., Qi, Q., Liu, S., Yan, L., & Takabe, K. (2019). Tumor Infiltrating Lymphocytes and Macrophages Improve Survival in Microsatellite Unstable Colorectal Cancer. *Sci Rep*, 9(1), 13455. doi:10.1038/s41598-019-49878-4

- Nicolini, A., Ferrari, P., Spinelli, R., Carpi, A., Sagripanti, A., & Ambrogi, F. (1996). Cell-mediated immunity in breast cancer patients. *Biomed Pharmacother*, 50(8), 337-343. doi:10.1016/s0753-3322(96)89665-x
- Nussbaumer, O., & Koslowski, M. (2019). The emerging role of $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy. *Immuno-Oncology Technology*, 1, 3-10. doi:10.1016/j.iotech.2019.06.002
- O'Shea, J. J., & Paul, W. E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells. *Science*, 327(5969), 1098-1102. doi:10.1126/science.1178334
- Okamoto, T., Harada, M., Shinomiya, Y., Matsuzaki, G., & Nomoto, K. (1995). The antitumor effect of tumor-draining lymph node cells activated by both anti-CD3 monoclonal antibody and activated B cells as costimulatory-signal-providing cells. *Cancer Immunol Immunother*, 40(3), 173-181. doi:10.1007/BF01517349
- Pages, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molitor, R., Galon, J. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*, 353(25), 2654-2666. doi:10.1056/NEJMoa051424
- Pages, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M. C., Tartour, E., Sautes-Fridman, C., & Fridman, W. H. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29(8), 1093-1102. doi:10.1038/onc.2009.416
- Pages, F., Mlecnik, B., Marliot, F., Bindea, G., Ou, F. S., Bifulco, C., Galon, J. (2018). International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet*, 391(10135), 2128-2139. doi:10.1016/S0140-6736(18)30789-X
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 252-264. doi:10.1038/nrc3239
- Passardi, A., Canale, M., Valgiusti, M., & Ulivi, P. (2017). Immune Checkpoints as a Target for Colorectal Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*, 18(6). doi:10.3390/ijms18061324
- Pellegrini, P., Berghella, A. M., Del Beato, T., Cicia, S., Adorno, D., & Casciani, C. U. (1996). Disregulation in TH1 and TH2 subsets of CD4⁺ T cells in peripheral blood of colorectal cancer patients and involvement in cancer establishment and progression. *Cancer Immunol Immunother*, 42(1), 1-8. doi:10.1007/s002620050244
- Pepper, M., & Jenkins, M. K. (2011). Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nat Immunol*, 12(6), 467-471. doi:10.1038/ni.2038
- Piawah, S., & Venook, A. P. (2019). Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer*, 125(23), 4139-4147. doi:10.1002/cncr.32163

- Qi, Q., Xia, M., Hu, J., Hicks, E., Iyer, A., Xiong, N., & August, A. (2009). Enhanced development of CD4⁺ gammadelta T cells in the absence of Itk results in elevated IgE production. *Blood*, 114(3), 564-571. doi:10.1182/blood-2008-12-196345
- Reddy, S. M., Reuben, A., & Wargo, J. A. (2016). Influences of BRAF Inhibitors on the Immune Microenvironment and the Rationale for Combined Molecular and Immune Targeted Therapy. *Curr Oncol Rep*, 18(7), 42. doi:10.1007/s11912-016-0531-z
- Ribic, C. M., Sargent, D. J., Moore, M. J., Thibodeau, S. N., French, A. J., Goldberg, R. M., Gallinger, S. (2003). Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*, 349(3), 247-257. doi:10.1056/NEJMoa022289
- Roberts, P. J., & Der, C. J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26(22), 3291-3310. doi:10.1038/sj.onc.1210422
- Robinson, E., Segal, R., Struminger, L., Faraggi, D., El'ad-Yarum, R., & Mekori, T. (1999). Lymphocyte subpopulations in patients with multiple primary tumors. *Cancer*, 85(9), 2073-2076. doi:10.1002/(sici)1097-0142(19990501)85:9<2073::aid-cncr26>3.0.co;2-j
- Ropponen, K. M., Eskelinen, M. J., Lipponen, P. K., Alhava, E., & Kosma, V. M. (1997). Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol*, 182(3), 318-324. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199707)182:3<318::AID-PATH862>3.0.CO;2-6
- Ruddle, N. H., & Akirav, E. M. (2009). Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. *J Immunol*, 183(4), 2205-2212. doi:10.4049/jimmunol.0804324
- Sasada, T., Kimura, M., Yoshida, Y., Kanai, M., & Takabayashi, A. (2003). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer*, 98(5), 1089-1099. doi:10.1002/cncr.11618
- Schmitt, M., & Greten, F. R. (2021). The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*, 21(10), 653-667. doi:10.1038/s41577-021-00534-x
- Seder, R. A., & Ahmed, R. (2003). Similarities and differences in CD4⁺ and CD8⁺ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol*, 4(9), 835-842. doi:10.1038/ni969
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*, 71(1), 7-33. doi:10.3322/caac.21654
- Sillo, T. O., Beggs, A. D., Morton, D. G., & Middleton, G. (2019). Mechanisms of immunogenicity in colorectal cancer. *Br J Surg*, 106(10), 1283-1297. doi:10.1002/bjs.11204

Sui, G., Qiu, Y., Yu, H., Kong, Q., & Zhen, B. (2019). Interleukin-17 promotes the development of cisplatin resistance in colorectal cancer. *Oncol Lett*, 17(1), 944-950. doi:10.3892/ol.2018.9645

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. doi:10.3322/caac.21660

Suzuki, T., Hayman, L., Kilbey, A., Edwards, J., & Coffelt, S. B. (2020). Gut gammadelta T cells as guardians, disruptors, and instigators of cancer. *Immunol Rev*, 298(1), 198-217. doi:10.1111/imr.12916

Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100(6), 655-669. doi:10.1016/s0092-8674(00)80702-3

Szeponik, L., Ahlmanner, F., Sundstrom, P., Rodin, W., Gustavsson, B., Bexé Lindskog, E., . . . Quiding-Jarbrink, M. (2021). Intratumoral regulatory T cells from colon cancer patients comprise several activated effector populations. *BMC Immunol*, 22(1), 58. doi:10.1186/s12865-021-00449-1

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., . . . Galon, J. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res*, 71(4), 1263-1271. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2907

Tuzlak, S., Dejean, A. S., Iannacone, M., Quintana, F. J., Waisman, A., Ginhoux, F., . . . Becher, B. (2021). Repositioning TH cell polarization from single cytokines to complex help. *Nat Immunol*, 22(10), 1210-1217. doi:10.1038/s41590-021-01009-w

Virella, G. (2020). *Medical immunology* (7th edition. ed.). Boca Raton: Taylor & Francis.

Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 10(8), 789-799. doi:10.1038/nm1087

Wei, S., Kryczek, I., & Zou, W. (2006). Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood*, 108(2), 426-431. doi:10.1182/blood-2006-01-0177

Xiang, R., Lode, H. N., Gillies, S. D., & Reisfeld, R. A. (1999). T cell memory against colon carcinoma is long-lived in the absence of antigen. *J Immunol*, 163(7), 3676-3683. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490962>

Yaqub, S., Henjum, K., Mahic, M., Jahnsen, F. L., Aandahl, E. M., Bjornbeth, B. A., & Tasken, K. (2008). Regulatory T cells in colorectal cancer patients suppress anti-tumor immune activity in a COX-2 dependent manner. *Cancer Immunol Immunother*, 57(6), 813-821. doi:10.1007/s00262-007-0417-x

Yin, C., Mohanta, S., Maffia, P., & Habenicht, A. J. (2017). Editorial: Tertiary Lymphoid Organs (TLOs): Powerhouses of Disease Immunity. *Front Immunol*, 8, 228. doi:10.3389/fimmu.2017.00228

Yoshie, O., & Matsushima, K. (2015). CCR4 and its ligands: from bench to bedside. *Int Immunol*, 27(1), 11-20. doi:10.1093/intimm/dxu079

Yuan, H., Dong, Q., Zheng, B., Hu, X., Xu, J. B., & Tu, S. (2017). Lymphovascular invasion is a high risk factor for stage I/II colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 8(28), 46565-46579. doi:10.18632/oncotarget.15425

Zhang, X., Kelaria, S., Kerstetter, J., & Wang, J. (2015). The functional and prognostic implications of regulatory T cells in colorectal carcinoma. *J Gastrointest Oncol*, 6(3), 307-313. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2015.017

Zhao, Y., Niu, C., & Cui, J. (2018). Gamma-delta (gammadelta) T cells: friend or foe in cancer development? *J Transl Med*, 16(1), 3. doi:10.1186/s12967-017-1378-2

Zhou, L., Chong, M. M., & Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*, 30(5), 646-655. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.001

Zou, L., Barnett, B., Safah, H., Larussa, V. F., Evdemon-Hogan, M., Mottram, P., Zou, W. (2004). Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res*, 64(22), 8451-8455. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1987

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı	DERYA	Uyruğu	TC
Soyadı	KIVRAK SALİM	Tel no	
Doğum tarihi		E-posta	

EĞİTİM BİLGİLERİ

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise		
Lisans		
UZMANLIK		
YANDAL UZMANLIK		
Doktora		

İŞ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre yıl-yıl
ASİST.DR		
UZM.DR		
UZM.DR		
DOÇ.DR		

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İNGİLİZCE		
İNGİLİZCE		

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre Yıl-Yıl

BURLAR-ÖDÜLLER: -

YAYINLAR VE BİLDİRİLER:

YAYINLAR:

1. Kıvrak Salim D, Sahin M, Köksoy S, Adanir H, Süleymanlar İ. Local Immune Response in Helicobacter pylori Infection. Medicine Baltimore. 2016 May;95: e3713.
2. Kıvrak Salim Derya, Bayram Selami, Gömceli İsmail, Çekin Ayhan Hilmi, Karaca Mustafa, Koçer Murat, Yıldız Mustafa. Palliative resection of primary site in advanced gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors improves survivals. The Turkish Journal of Gastroenterology, 30, 910-916., Doi: 10.5152/tjg.2019.19168
3. Salim DK, Yıldız M. Comparison Of Three First-Line Treatments In Advanced Pancreatic Cancer Patients Older Than 65 Years Of Age: Single-Centre Experience. Turkish Journal of Geriatrics, 2019;22:384-390. DOI: 10.31086/tjgeri.2020.116
4. Salim DK, Mutlu H, Eryılmaz MK, Salim O, Musri FY, Tural D, Gündüz Ş, Coşkun HŞ. Neutrophil to lymphocyte ratio is an independent prognostic factor in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell cancer. Mol Clin Oncol. 2015 Jul; 3:839-842.
5. Salim DK, Mutlu H, Eryılmaz MK, Musri FY, Tural D, Gunduz S, Coskun HS. Molecular types and neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer- while molecular shifting is more common in luminal a tumors, the pathologic complete response is most frequently observed in her-2 like tumors. Asian Pac J Cancer Prev. 2014; 15:9379-83.
6. Salim O, Toptaş T, Kıvrak Salim D, Yücel O.K, Deveci B, Karadoğan İ, Ündar L. Retrospective Analysis of Toxicity Profiles of two Platinum-Based Salvage Regimens in Relapsed/ Refractory Lymphoma: DHAP versus ESHAP. International Journal of Hematology and Oncology, 26, 1-9.
7. Tural D, Kıvrak Salim D, Mutlu H, Erkilic M, Gunduz S, Karakurt M, Musri F, Tuna S, Boz A, Aydın F, Karayalcin B, Bozcuk H, Senol Coskun H. Is there any relation between PET-CT SUVmax value and prognostic factors in locally advanced breast cancer? J BUON. 2015 Sep-Oct; 20:1282-6.

8. Mutlu H, Salim DK, Gündüz Ş, Eryılmaz MK, Musri FY, Coşkun HŞ. Docetaxel plus cisplatin plus fluorouracil versus carboplatin plus fluorouracil-cetuximab in first-line setting in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell cancer who did not previously receive neoadjuvant or adjuvant chemotherapy, which is standard? *J Cancer Res Ther.* 2017 Jul-Sep; 13:510-513. doi: 10.4103/0973-1482.161933
9. Goksu SS, Tastekin D, Arslan D, Gunduz S, Tatli AM, Unal D, Salim D, Guler T, Coskun HS. Clinicopathologic features and molecular subtypes of breast cancer in young women age ≤ 35 . *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15:6665-8.
10. Uyeturk U, Tatli AM, Gucuk S, Oksuzoglu B, Ulas A, Avci N, Ozbay MF, Gunduz S, Akinci MB, Salim DK, Sonmez OU, Akdag F, Ergenc H. Risk factors for stage IV breast cancer at the time of presentation in Turkey. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14:7445-9.
11. Eryilmaz MK, Mutlu H, Salim DK, Musri FY, Tural D, Coskun HS. The neutrophil to lymphocyte ratio has a high negative predictive value for pathologic complete response in locally advanced breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15:7737-40.
12. Mutlu H, Eryılmaz MK, Musri FY, Gunduz S, Salim DK, Coskun HS. Mean Platelet Volume as an Independent Predictive Marker for Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Locally Advanced Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016; 17:2089-92.
13. Eryilmaz MK, Mutlu H, Ünal B, Salim DK, Musri FY, Coşkun HŞ. The importance of stromal and intratumoral tumor lymphocyte infiltration for pathologic complete response in patients with locally advanced breast cancer. *J Cancer Res Ther.* 2018 Apr-Jun; 14: 619-624. doi: 10.4103/0973-1482.174550
14. Müsri FY, Mutlu H, Karaağaç M, Gündüz Ş, Eryılmaz MK, Salim DK, Tazegül G, Musri Ö.C, Göksu S, Coşkun HŞ. Does Primary Tumor Resection Affect Survival in elderly Patients with Metastatic Gastric Cancer? *Turkish Journal of Geriatrics.* 2016; 19:169-173
15. Can A, Dogan E, Bayoglu IV, Tatli AM, Besiroglu M, Kocer M, Dulger AC, Uyeturk U, Kivrak D, Orakci Z, Bal O, Kacan T, Olmez S, Turan N, Ozbay MF,

- Alacacioglu A. Multicenter epidemiologic study on hepatocellular carcinoma in Turkey. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15:2923-7.
16. Musri FY, Mutlu H, Eryilmaz MK, Salim DK, Gunduz S, Coskun HS. The Neutrophil to Lymphocyte Ratio is an Independent Prognostic Factor in Patients with Metastatic Gastric Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016; 17:1309-12.
17. Kıvrak Salim D, Akın Telli T, Tatlı AM, Kılıçkap S, Yumuk PF. Comparison of two different carboplatin and weekly paclitaxel schedule in elderly advanced non-small cell lung cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019 Jun; 83:1137-1145. doi: 10.1007/s00280-019-03839-w.
18. Çifçili Serap, Ünal C Pemra, Kıvrak Salim Derya, Karaca Gürkan, Necim Yalçın, Uzuner Arzu . Frequency and Risk Factors of Sleep Problems Among High School Students Who Will Undergo University Entrance Exam as a Stressful Experience. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 30, 8-16.
19. Kıvrak Salim D, Onder A. Outcomes and clinical features of leptomeningeal carcinomatosis: A single center experience. *Marmara Medical Journal* , 32 , 81-85 . DOI: 10.5472/marumj.570913
20. Kıvrak Salim D, Yıldız M. 65 Yaş ve Üzeri Tek Odak Glioblastome Multiforme Hastalarında Gross Total Rezeksiyon Uygulanan ve Uygulanmayan Hastalarda Genel Sağ Kalım ve Kemoradyoterapiye Yanıt Farklılıkları. *ATD* 2019; 5: 324-329. DOI: 10.17954/amj.2019.1755
21. Kıvrak Salim D. Nadir endometriyal kanserler. Dinçer M, editör. Nadir Tümörler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020. p.130-9.
22. Kıvrak Salim D, Sezgin Göksu S, Koçak H, Coşkun HŞ. Poor outcomes of solid organ cancers after renal transplantation: A single-center experience. *Akd Med J* 2021; 7:36-44.
23. Kıvrak Salim D, Mutlu H, Karakurt Eryilmaz M, Yalçın Musri F, Tural D, Coşkun HŞ. Metronomic maintenance chemotherapy in patients presenting with paraneoplastic autoimmune hepatitis with recurrent thymic carcinoma. *J Oncol Pharm Pract*. 2016 Apr; 22:313-5.

24. Salim DK. Continuous angiogenesis inhibition in the treatment for von Hippel–Lindau-related hemangioblastomas of retina and spinal cord. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 2019; 25:2049-2051. Doi:10.1177/1078155219827635
25. Salim O, Salim DK, Berker S, Undar L. T-cell prolymphocytic leukemia presenting with leukemic serous effusion in a prostate cancer patient. *J Cancer Res Ther*. 2015 Oct-Dec; 11:950-3. doi: 10.4103/0973-1482.163707.
26. Musri FY, Mutlu H, Kıvrak Salim D, Karakurt Eryılmaz M, Ünal B, Tural D, Şenol Coşkun H. Sorafenib-induced severe urticaria in a patient with hepatocellular cancer. *J Oncol Pharm Pract*. 2016 Apr; 22:350-3.
27. Mutlu H, Balkarlı H, Musri FY, Salim DK, Eryılmaz MK, Ünal B, Coşkun HŞ. Gastrointestinal stromal tumor and isolated anterior tibial muscle metastasis as first recurrence. *J Cancer Res Ther*. 2015 Oct-Dec; 11:1037. Doi: 10.4103/0973-1482.151862.
28. Müsri FY, Mutlu H, Eryılmaz MK, Salim DK, Coşkun HŞ. Experience of bevacizumab in a patient with colorectal cancer after renal transplantation. *J Cancer Res Ther*. 2015 Oct-Dec; 11:1018-20.
29. Eryılmaz MK, Mutlu H, Salim DK, Musri FY, Coşkun HŞ. Fatal posterior reversible leukoencephalopathy syndrome associated coma induced by bevacizumab in metastatic colorectal cancer and review of literature. *J Oncol Pharm Pract*. 2015 Oct 13.
30. Eryılmaz MK, Mutlu H, Salim DK, Musri FY, Tural D, Başsorgun I, Coşkun HŞ. Ipilimumab may increase the severity of cutaneous toxicity related to radiotherapy. *J Oncol Pharm Pract*. 2016 Jun; 22:533-6.
31. Eryılmaz MK, Mutlu H, Yalçın Müsri F, Salim DK, Tazegül G, Coşkun HŞ. Severe periocular bleeding induced by bevacizumab in a patient with recurrent glioblastoma multiforme. *J Oncol Pharm Pract*. 2016 Apr 22. pii: 1078155216643858.
32. Eryılmaz MK, Mutlu H, Tazegül G, Eryılmaz RMusri FY, Salim DK, Ünal B, Coskun HS. Multiple Pelvic Cysts in a Patient with Familial Mediterranean Fever: Benign Cystic Mesothelioma. *J Cancer Res Ther*. 2017 Oct-dec; 13:1047-1049
33. Musri FY, Mutlu H, Eryılmaz MK, Salim DK, Tazegul G, Coşkun HŞ. Hypercalcemia associated with squamous cell carcinoma of renal pelvis: A case and

review of the literature. J Cancer Res Ther. 2019;15: S170-S172. doi:10.4103/0973-1482.187236. Review.

34. Karakurt Eryilmaz M, Yalcin Musri F, Kivrak Salim D, Tazegul G, Coskun H. Sunitinib-Associated Acute Pancreatitis: A Case Report. EJMO. 2017; 1: 115-117

35. Karakurt Eryilmaz, Mutlu H, Yalçın Musri F, Tazegül G, Kivrak salim D, Coskun HS. Glossodynia induced by panitumumab in metastatic colorectal cancer: report of two cases. Journal of Turgut Ozal Medical Center 2016;23: 331-335.

BİLDİRİLER:

1. D Kivrak Salim, H Altunbaş, M.K Balcı. Lingual ektopik tiroid bezi ve hipotiroidi ile başvuran erişkin hasta. 14. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, Antalya ,3-7 Ekim, 2012

2. D Kivrak Salim, H Adanır, M Şahin, S Köksoy, İ Süleymanlar. Helicobacter pylori enfeksiyonunda lokal immün yanıt. 29. Ulusal Gastroenteroloji Haftası, Antalya, 20-25 Kasım,2012

3. D Kivrak Salim,T Şahin, İ Süleymanlar. İlaça bağlı fulminan hepatit: ender bir etken famsiklovir.29. Ulusal Gastroenteroloji Haftası, Antalya, 20-25 Kasım,2012

4. D Kivrak Salim, H Adanır, M Şahin, S Köksoy, İ Süleymanlar. Helicobacter pylori ile enfekte benign ve malign lezyonlarda TWIST1 mRNA ekspresyonu. 29. Ulusal Gastroenteroloji Haftası, Antalya, 20-25 Kasım,2012

5. D Kivrak Salim, E Alkan, E Çoban, İ Süleymanlar. İnce bağırsak tutulumlu lenfomada perforasyona dikkat. 29. Ulusal Gastroenteroloji Haftası, Antalya, 20-25 Kasım,2012

6. D Kivrak Salim, H Adanır, M Şahin, S Köksoy, İ Süleymanlar. Helicobacter pylori ile enfekte benign ve malign lezyonlarda TWIST1 mRNA ekspresyonu. 29. Ulusal Gastroenteroloji Haftası, Antalya, 20-25 Kasım,2012

7. D Kivrak Salim, O Salim, L Ündar. İleri evre diffüz büyük B hücreli lenfoma tanılı olguda paraneoplastik IgA ilişkili kutanöz lökositoklastik vaskülit. 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya, 31 Ekim-3 Kasım 2012.

8. D Kıvrak Salim, H Adanır, M Şahin, S Köksoy, İ Süleymanlar. Helicobacter pylori Pozitif mide adenokanserinde FGF1 ve FGF2 mRNA ekspresyonu. 20. Ulusal Kanser Kongresi, Antalya, 19- 23Nisan,2013 -sözel bildiri
9. D Kıvrak Salim, H Adanır, M Şahin, S Köksoy, İ Süleymanlar. Helicobacter pylori Pozitif mide adenokanserinde RUNX2 mRNA ekspresyonu. 20. Ulusal Kanser Kongresi, Antalya, 19-23Nisan,2013
10. D Kıvrak Salim, H Adanır, M Şahin, S Köksoy, İ Süleymanlar. Helicobacter pylori Pozitif mide adenokanserinde FOXP3 mRNA ekspresyonu. 20. Ulusal Kanser Kongresi, Antalya, 19-23Nisan,2013
11. D Kıvrak Salim, H Adanır, M Şahin, S Köksoy, İ Süleymanlar. Helicobacter pylori Pozitif mide adenokanserinde BMP7 mRNA ekspresyonu. 20. Ulusal Kanser Kongresi, Antalya, 19-23Nisan,2013
12. S Sezgin Göksu, D Kıvrak Salim, B Nazlım, S Uzun, H.Ş Coşkun. Nadir bir paraneoplastik sendrom: Paraneoplastik Pemfigus. 20. Ulusal Kanser Kongresi, Antalya, 19-23Nisan,2013
13. D Kıvrak Salim, O Salim, HŞ Coşkun, S Sezgin Göksu. Çok Ender Bir Olgu: Küçük Hücreli Disi Akciğer Adenokanserinde Pleurodesis Sonrası Trombotik Trombositopenik Purpura. 6. Ulusal Akciğer Kanseri Kongresi.Antalya.8-11 Mayıs 2014
14. D Kıvrak Salim,H mutlu, F Yalçın Musri, M Karakurt Eryılmaz, HŞ Coşkun.Metastatik Bronşial Karsinoid Tümörde Kemoterapi ve Peptid Reseptör Radioligand Tedavisi:Olgu Sunumu.Ege Hematoloji Onkoloji Kongresi.İzmir.13-15 Mart 2015
15. D Kıvrak Salim, M Karakurt Eryılmaz, HŞ Coşkun. Filgrastim Sonrası Gelişen Multisitem Tutulumu ile Seyreden Hipersensitivite Vaskülit:Olgu Sunumu. 5.Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya. 19-23 Mart 2014
16. D Kıvrak Salim, Ş Gündüz, M Karakurt Eryılmaz, HŞ Coşkun, H Mutlu,H Bozcuk. Nöroendokrin Tümörler Aynı mıdır? 5 Yıllık Tek merkez Deneyimi ve Çoklu Analiz Sonuçları. 5.Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya .19-23 Mart 2014

17. D Kıvrak Salim, Ş Gündüz, M Karakurt Eryılmaz,H Mutlu, H Bozcuk, HŞ Coşkun. Evre IV KBY ve Nöroendokrin Tümör Tanılı Hastada Everolimus Kullanımı. 5.Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya. 19-23 Mart 2014
18. D Kıvrak Salim, M Karakurt Eryılmaz, H Mutlu, H Bozcuk, HŞ Coşkun. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Olgusunda Düşük Moleküler Ağırlıklı Heparin Tedavisi Sonrası Heparin İlişkili Trombopeni ve Fondaparinux Kullanımı. 5.Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya. 19-23 Mart 2014
19. D Kıvrak Salim, B Yılmaz, M Karakurt Eryılmaz, HŞ Coşkun, H Mutlu, H Bozcuk. Atipik Prezantasyonlu Nöroendokrin Tümör: 2 Olgu. 5.Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya. 19-23 Mart 2014
20. D Kıvrak Salim, M Karakurt Eryılmaz,H Bozcuk, HŞ Coşkun, H Mutlu.Nadir Bie Adrenal İncidentaloma: Senkron Schwannoma Vakası. 5.Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya .19-23 Mart 2014)
21. D Kıvrak Salim, M Karakurt Eryılmaz, HŞ Coşkun, H Bozcuk. HER2+ Mide Adenokanser Olgusunda Paraneoplastik Oligoartiküler Effüzyon ile Progresyon. 5.Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya. 19-23 Mart 2014
22. M Karakurt Eryılmaz, HŞ Coşkun, D Kıvrak Salim, H Bozcuk. Adjuvan Glivec Kullanan GIST Hastasında Kolon Adenomu Gelişen Bir Olgu Sunumu. 5.Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya. 19-23 Mart 2014
23. D Kıvrak Salim, M Karakurt Eryılmaz, HŞ Coşkun. Ender Bir Olgu: Erişkin Supratentorial Primitif Nöroektodermal Tümör. 5.Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya .19-23 Mart 2014
24. M Karakurt Eryılmaz, HŞ Coşkun, D Kıvrak Salim, H Bozcuk. Sunitinibe Bağlı Lökositoklastik Vaskülit. 5.Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya 19-23 Mart 2014
25. RA Torun, D Kıvrak Salim, H Mutlu, HŞ Coşkun. Primeri Bilinmeyen Karsinomda Spontan Tümör Lizis Sendromu. 21.Ulusal Kanser Kongresi.Antalya 22-26 Nisan 2015
26. D Kıvrak Salim, H Mutlu, M Karakurt, O Salim, F Yalçın, Musri, HŞ Coşkun. Rekürren Metastatik Baş Boyun Yassı HücreliKanserlerde Nötrofil/Lenfosit Oranı Bağımsız Bir Prognostik Faktördür. 21.Ulusal Kanser Kongresi.Antalya 22-26 Nisan 2015

27. D Kıvrak Salim, O Salim, H Mutlu, OK Yücel, M Karakurt Eryılmaz, F Yalçın Musri, HŞ Coşkun. Gebe Meme Kanseri Hastasında Sıtma Enfeksiyonu: Olgu Sunumu. 21.Ulusal Kanser Kongresi.Antalya 22- 26 Nisan 2015
28. D Kıvrak Salim, H Mutlu, M Karakurt Eryılmaz, F Yalçın Musri, HŞ Coşkun. Erlotinibe Bağlı Cilt Döküntüsüne Sekonder İnfeksiyon: Olgu Sunumu. 21.Ulusal Kanser Kongresi.Antalya 22-26 Nisan 2015
29. M Dilbil, D Kıvrak Salim, H Mutlu, HŞ Coşkun. 5-FLUOURACİL Sonrası Gelişen Anjionöritik Ödem Olgusu. 21.Ulusal Kanser Kongresi.Antalya 22-26 Nisan 2015
30. M Karakurt Eryılmaz, H Mutlu, D Kıvrak Salim, F Yalçın Musri, D Tural, İ Başsorgun, HŞ Coşkun. İpilimumab Radyoterapi İlişkili Cilt Toksitesinin Ciddiyetini Arttırabilir. 21.Ulusal Kanser Kongresi.Antalya 22-26 Nisan 2015
31. F Yalçın Musri, M Karakurt Eryılmaz, D Kıvrak Salim, H Mutlu, HŞ Coşkun. Adrenal Kitle ile Prezente Olan Ekstragonadal Seminomlu bir Olgu. 21.Ulusal Kanser Kongresi.Antalya 22-26 Nisan 2015
32. M Karakurt Eryılmaz, F Yalçın Musri, D Kıvrak Salim, H Mutlu, HŞ Coşkun. Atnalı Böbrekli Bir Hastada Renal Hücreli Karsinom Gelişimi. 21.Ulusal Kanser Kongresi.Antalya 22-26 Nisan 2015
33. S Oflaz, HŞ bozcuk, HŞ Coşkun, H Mutlu, M Karakurt Eryılmaz, A Merdin, F Avcı Merdin, D Salim, F Yalçın. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Küçük Hücreli ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri ve Sistemik Kemoterapi Uygulamaları. 21.Ulusal Kanser Kongresi.Antalya 22-26 Nisan 2015
34. D Kıvrak Salim, E Aykın, M Karakurt Eryılmaz, F Yalçın Musri, S Sezgin Göksu, H Mutlu, HŞ Coşkun. Multiple İntrakranial Kitleler ile Başvuran Nadir Bir Multiple Skleroz Olgusu. 6. Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya 23-27 Mart 2016
35. T Yerlikaya, F Yalçın Musri, M Karakurt Eryılmaz, D Kıvrak Salim. Temozolamid İlişkili Generalize Kutanoz Erupsiyonu Olan Anaplastik Astrositomlu Bir Olgu. 6. Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya 23-27 Mart 2016
36. N Güneş, D Kıvrak Salim, M Karakurt Eryılmaz, F Yalçın Musri, S Sezgin Göksu, H Mutlu, HŞ Coşkun. Ender Bir Olgu MUIR-TORRE Sendromu. 6. Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya 23-27 Mart 2016

37. E Aykın, G Tazegöl, D Kıvrak Salim, M Karakurt Eryılmaz, F Yalçın Musri, S Sezgin Göksu, H Mutlu, HŞ Coşkun. Metakron Gastrointestinal Stromal Tümör ve Ekstremitte Sarkomu: Olgu Sunumu. 6. Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya 23-27 Mart 2016
38. E Avanaz, D Kıvrak Salim, RE Altekin, M Karakurt Eryılmaz, F Yalçın Musri, S Sezgin Göksu, H Mutlu, HŞ Coşkun. Cyclophosphamide-Doxorubicin-Vincristine Sonrası Akut İnferoposterior Myokardial Enfarkt. 6. Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya 23-27 Mart 2016
39. T Saygın Öğüt, D Kıvrak Salim, M Karakurt Eryılmaz, F Yalçın Musri, S Sezgin Göksu, H Mutlu, HŞ Coşkun. 5-Fluorouracile Bağlı Akut Strok: Ender Bir Olgu Sunumu. 6. Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya 23-27 Mart 2016
40. M Karakurt Eryılmaz, F Yalçın Musri, D Kıvrak Salim, B Ünal, S Sezgin Göksu, H Mutlu, HŞ Coşkun. Dosetaksel ile Tedavi Edilen Akciğer Adenokarsinomlu Bir Hastada Akral Eritem ve Bilateral İntertrijinöz Hiperpigmentasyon. 6. Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya 23-27 Mart 2016
41. F Yalçın Musri, H Mutlu, M Karakurt Eryılmaz, D Kıvrak Salim, Ş Gündüz, S Sezgin Göksu, HŞ Coşkun. Metastatik Gastrik Kanseri Hastalarda Bağımsız Bir Prognostik Faktör Olarak Nötrofil Lenfosit Oranı. 6. Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya 23-27 Mart 2016
42. E Ayık, M Özcan, D Kıvrak Salim, M Türkay, HŞ Coşkun, İH Özbudak. Akciğer Adenokarsinomlarında ROS-1 Gen Yeniden Düzenlenmesinin FISH ve Immunhistokimyasal Yöntemle Araştırılması. 27. Ulusal Patoloji Kongresi. Antalya 15-18 Kasım 2017
43. D Kıvrak Salim, E Avanaz, O Salim. Multiple Myeloma İkincil Primer Meme Kanseri. 22. Ulusal Kanser Kongresi. Antalya 19-23 Nisan 2017
44. AH Önder, E Kayıkçıoğlu, AA Aydın, S Göktaş, D Kıvrak Salim, B Öztürk, AM Tatlı, M Yıldız. Akut Monoartrit ve Motor Nöron Defisiti Gelişen Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Olgusu. 22. Ulusal Kanser Kongresi. Antalya 19-23 Nisan 2017
45. AM Tatlı, AH Önder, E Kayıkçıoğlu, AA Aydın, S Göktaş, D Kıvrak Salim, B Öztürk, M Yıldız. Akciğer Kanseri Diyabetik Olguda Erlotinib Tedavisine Yanıt ile

Birlikte Diyabet Regülasyonunun Sağlanması. 22.Ulusal Kanseri Kongresi.Antalya 19-23 Nisan 2017

46. D Kıvrak Salim,B Deveci, AA Aydın, AM Tatlı, , B Öztürk, İ Karadoğan. Meme Kanseri Hastasında Anemi Tedavisinde Eritropoez Uyarıcı Ajan Kullanımı. 22.Ulusal Kanseri Kongresi.Antalya 19-23 Nisan 2017

47. AH Önder,E Kayıkçıoğlu, AA Aydın,S Göktaş,D Kıvrak Salim, AM Tatlı, B Öztürk, M Yıldız. Bevacizumab Sonrası Akut Pankreatit Gelişen Over Kanseri Olgusu. 22.Ulusal Kanseri Kongresi.Antalya 19-23 Nisan 2017

48. D Kıvrak Salim, M Karakurt Eryılmaz, HŞ Coşkun. Onkoloji Hastasında Nadir Bir Olgu Sunumu: Kafa

İç Basınç Artışı. 7. Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi. Antalya 21-25 Nisan 2018

49. D Kıvrak Salim, H Adanır, M Şahin, S Köksoy, İ Süleymanlar. Gastrik kanserde FOXP3 gen ekspresyon değişikliği. 1.Gençlerle Onkolojiye Bakış Kongresi, Antalya, 15-18 Şubat 2018.SÖZEL BİLDİRİ

50. D Kıvrak Salim. Evre IV Gastroenteropankreatik Nöroendokrin Tümörlerde Primer Tümör Rezeksiyonun Sağ Kalıma Etkisi. 2. Ulusal İmmunoterapi ve Onkoloji Kongresi, Antalya, 31 Ekim-4 Kasım 2018.SÖZEL BİLDİRİ

51. D Kıvrak Sali. 65 Yaş ve Üzeri Tek Odak GBM Hastalarında Gross Total Rezeksiyonun Sağ kalım ve Yanıt Oranlarına Etkisi. 3.Geriatrik Onkoloji Kongresi, Antalya, 9-11 Kasım 2018.SÖZEL BİLDİRİ

52. D Kıvrak Salim, T Akin Telli, A.M Tatlı, S Kiliçkap, P.F. Yumuk. 65 yaş ve üzeri, ileri evre Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri hastalarında haftalık paklitaksel ve 2 farklı karboplatin uygulamasının retrospektif değerlendirilmesi 3. Geriatrik Onkoloji Kongresi, Antalya, 9-11 Kasım 2018.SÖZEL BİLDİRİ

53. D Kıvrak Salim. Gastrik kanserde TWIST1 gen ekspresyon değişikliği. 2.Eskişehir Onkoloji Günleri, Eskişehir 5-7 Nisan 2019.SÖZEL BİLDİRİ

54. Derya Kıvrak Salim. Hepatoselüler Kanseri Hastalarında Klinik ve Epidemiyolojik Faktörler ve Genel Sağ Kalım Üzerine Etkisi. Sağlık Bilimleri Üniversitesi 2. İç Hastalıkları Kongresi, İstanbul 19-22 Haziran 2019.SÖZEL BİLDİRİ