

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

**MİKROSATELLİT İNSTABİL KOLOREKTAL KARSİNOM
OLGULARINDA CDX2, SOX2, STAT1 VE BRAF V600E
EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK ÖNEMİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Özgecan Demir

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Semin Ayhan

Manisa, 2022

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

**MİKROSATELLİT İNSTABİL KOLOREKTAL KARSİNOM
OLGULARINDA CDX2, SOX2, STAT1 VE BRAF V600E
EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK ÖNEMİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Özgecan Demir

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Semin Ayhan

Manisa, 2022

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana yol gösterici ve destek olan, enerjisi ve titizliğine hayran olduğum tez danışmanım Prof. Dr. Semin Ayhan'a; sonsuz hoşgörüsü ve sabrıyla her konuda desteğini ve emeğini esirgemeyen Prof. Dr. Aydın İşisağ'a; deneyimleri ve bilimsel bakış açısıyla eğitimime yön veren, pratiklik ve hızlı düşünmenin patolojideki önemini bize öğreten Prof. Dr. Ali Rıza Kandiloğlu'na; zorlu asistanlık süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, şefkati ve hoşgörüsü ile eğitimime büyük katkı sağlayan Prof. Dr. Peyker Temiz'e; bilgisi, azmi ve çalışkanlığına hayran olduğum, gerektiğinde bizimle arkadaş gibi olma tevazusunu gösterebilen Prof. Dr. Nalan Neşe'ye; yoğun iş temposuna rağmen bize yardımcı olmaya çalışan, neşesi ve çalışkanlığı ile örnek tablo oluşturan Dr. Öğr. Ayça Tan'a, titizliği ve patolojiye olan sevgisiyle örnek bir patolog olan Öğr. Gör. Dr. Seda Mavili ve Öğr. Gör. Dr. Ömer Atmış'a, tezimin istatistiksel değerlendirmesinde emeği geçen Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Beyhan Cengiz Özyurt'a; birlikte çok güzel hatıralar biriktirdiğim, beraber çalışmaktan büyük zevk duyduğum asistan arkadaşlarıma; asistanlığım süresince birlikte çalıştığım ve tez süresince bana yardımcı olan, laboratuvar ekibi, personel ve sekreter arkadaşlarıma; yanımda olmasından güç aldığım, desteğini hiç esirgemeyen sevgili Özgür'e; tüm hayatım boyunca bana destek veren, sevgilerini eksik etmeyen geniş ve güzel aileme, teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Özgecan Demir

İÇİNDEKİLER

I.	GİRİŞ	1
II.	GENEL BİLGİLER	5
	i. Epidemiyoloji	5
	ii. Etiyoloji	6
	iii. Klinik	6
	iv. Lokalizasyon	7
	v. Makroskopik özellikler	7
	vi. Mikroskopik özellikler	10
	vii. Tümör evrelemesi	19
	viii. Karsinogenez	22
	ix. BRAF	32
	x. SOX2	32
	xi. CDX2	33
	xii. STAT1	33
III.	GEREÇ VE YÖNTEM	35
IV.	BULGULAR	44
V.	TARTIŞMA	96
VI.	SONUÇ ve ÖNERİLER	121
VII.	ÖZET	124
VIII.	İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	127
IX.	KAYNAKLAR	130

Kısaltmalar

AJCC: American Joint Committee on Cancer / Amerikan Kanser Komitesi

APC: Adenomatozis polipozis koli

BBA: Büyük büyütme alanı

BT: Bilgisayarlı tomografi

CAP: Collage of American Pathologist

CDX2: Kaudal tip homeobox 2

CGH: Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon

CIMP: CpG ada metilatör fenotipi

CIMP-H: yüksek seviyede CpG ada metilasyonu

CIMP-L: Düşük seviyede CpG ada metilasyonu

CIMP-0: CpG ada metilasyonu içermeme

CIN: Kromozomal instabilite

COX-2: Siklooksijenaz-2

CS: Cerrahi sınır

CSC: Kök hücre benzeri kanser hücreleri

DMA: Doku mikroarray

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

EGFR: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü

EMVI: Ekstramural vasküler invazyon

FAP: Familyal adenomatöz polipozis

FISH: Floresan in situ hibridizasyon

GS: Genel sağkalım

GLOBOCAN: Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence

HNPCC: Herediter nonpolipozis kolorektal kanser

HP: Hiperplastik polip

H&E: Hematoksilen & Eozin

IFN- α : İnterferon alfa

IFN- γ : İnterferon gama

IHK: İmmünohistokimya

IL-6: İnterlökin 6

IMVI: İntramural vasküler invazyon

ITBCC: Uluslararası tümör tomurcuklanması konsensus konferansı

KRAS: Kirsten-rat sarkom 2 viral onkogen homoloğu proto-onkogeni

KRK: Kolorektal karsinom

KT: Kemoterapi

LEF-1: Lenfoid enhancing faktör-1

LN: Lenf nodu

LOH: Heterozigosite kaybı

LVİ: Lenfovasküler invazyon

MAPK: Mitojen aktivatör protein kinaz

MDM 2: Murine Double Minute 2

mm: Milimetre

MMR: Mismatch tamir

MRG: Manyetik rezonans görüntüleme

MSI: Mikrosatellite instabilite

MSI-H: Yüksek seviyede mikrosatellit instabilite

MSI-L: Düşük seviyede mikrosatellit instabilite

MSS: Mikrosatellit stabilite

mTOR: Mammalian target of rapamycin

MVHP: Mikroveziküler tip hiperplastik polip

NSAİİ: Non-steroid antiinflamatuar ilaç

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PDC: Poorly differentiated clusters / Az diferansiye kümeler

PDGF: Trombositten Türetilen Büyüme Faktörü

PD-1: Programlı ölüm reseptörü-1

PD-L1: Programlı ölüm ligandı-1

PET-CT: Pozitron emisyon tomografisi

PNİ: Perinöral invazyon

PS: Progresyonsuz sağkalım

RUNX3: RUNX ailesi transkripsiyon faktör-3

RUNX3/SOCS1: RUNX ailesi transkripsiyon faktör-3/sitokin sinyal süpresörü

RT: Radyoterapi

SMAD2: SMAD family member 2

SMAD4: SMAD family member 4

SOX: SRY-ilişkili HMG-box

SSA: Sesil serrated adenom

SSA/P: Sesil serrated adenom/polip

STAT1: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 1 aktivatörü

TCF-1: T-cell faktör-1

TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü-beta

TIL: Tümörü infiltre eden lenfositler

TNM: Tümör-lenf nodu-metastaz

TSA: Traditional serrated adenom

TT: Tümör tomurcuklanması

5-FU: 5-Flourourasil

I.GİRİŞ

Kolorektal kanserler (KRK) dünya genelinde en sık görülen dördüncü kanser olması ve kanser kaynaklı ölümler sıralamasında üçüncü sırada yer alması nedeniyle önemli bir sağlık problemidir (1). Kolorektal kanserlerin gelişimsel sürecine moleküler karsinogenez açısından bakıldığında %15-20'sinde Mikrosatellit instabilite (MSI) yolağının etkili olduğu görülmektedir. MSI, insan genomunda yaklaşık yarım milyon civarında bulunan mikrosatellit tekrarlarla ilişkilidir. Tekrarlayan yapıları nedeniyle, mikrosatellitler, DNA replikasyonu sırasında DNA polimeraz enzimi tarafından hatasız kodlanması zor olan bu bölgelerde DNA dizisi kaymaları ile sonuçlanan replikasyon hatalarına eğilimlidir. Replikasyon hataları normal şartlarda, DNA replikasyonu sırasında kimyasal veya fiziksel hasar nedeniyle oluşan anormalliklerin tanınması ve eksizye edilmesinden sorumlu Mismatch Repair (MMR) sistemi tarafından tamir edilebilecek hatalardır (2). MSI, MMR genlerindeki altta yatan bozukluğa bağlı olarak gelişir. MSI, esas olarak dört ana MMR genlerinden birinin (MLH1, MSH2, MSH6 veya PMS2) mutasyonla inaktivasyonundan kaynaklanır (3, 4). MSI kolon tümörleri, mikrosatellit stabil (MSS) olanlardan farklı klinik ve patolojik özelliklere sahiptir ve kolon adenokarsinomlarında mikrosatellit instabilite iyi prognostik faktör olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada MSI KRK'larda prognostik olabilecek faktörleri araştırmak ve MSS tümörler ile MSI tümörler arasındaki farkları daha iyi tanımlayabilmek için bazıları prognostik olduğu bilinen, bazıları ise kanser onkogenezinde yeni araştırılmaya başlanmış CDX2, STAT1, BRAF ve SOX2 immünohistokimyasal belirteçleri incelenerek bu iki tümör grubunda ekspresyon farklılıklarını ve sağkalıma etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

CDX2, intestinal kanal epitelinin gelişimini ve farklılaşmasını düzenleyen, KRK'da progresyonu ve yayılmayı inhibe eden bir tümör supresördür (5). CDX2 ekspresyonunun kaybı, kötü diferansiasyon, ileri hastalık evresi, proksimal yerleşim ve mikrosatellit instabilite ile ilişkilendirilmiştir (6). Yakın zamanda, geniş bir kolorektal karsinom grubunda, CDX2 ekspresyon kaybının daha kısa genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (7, 8).

BRAF onkogeni, 7q34 kromozom kolunda bulunan Raf kinaz ailesinin bir üyesidir ve mitojenle aktive olan protein kinaz sinyal yolağında önemli bir bileşendir. KRK'lı hastaların yaklaşık %10'unda BRAF mutasyonu bulunur ve bu mutasyon hücresel proliferasyon ve tümör büyümesi ile sonuçlanır (9). BRAF p.V600E mutasyonu, MLH1 promoter hipermetilasyonu sonucu MSI tümör oluşumuna yol açar ve bu yolla daha fazla izlenir (10). BRAF mutant kolon tümörleri kadın cinsiyet, ileri yaş, proksimal yerleşim, ileri TNM evresi, diferansiasyon kaybı ve müsinöz histoloji ile ilişkilendirilmiştir (11-13). Bununla birlikte sonraki çalışmalarda BRAF mutasyonunun MSI ve MSS tümörlerde farklı prognostik etkiye sahip olduğu görülmüştür (14-16).

STAT1'in (sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 1 aktivatörü) hücre proliferasyonunu baskılayarak ve immün yanıtı regüle ederek anti-onkojenik rol oynadığını bildiren çalışmalar mevcuttur (17). Ancak IFN ilişkili hücre içi sinyal yolağında önemli bir transkripsiyon faktörü olup pro-onkojenik bir molekül olarak hareket edebilir. Ek olarak, tümör immün gözetimi üzerinde olumsuz etki yapabilir. STAT1, tümör hücrelerinde T hücresi ve NK hücre fonksiyonlarını inhibe eden PD-L1 ekspresyonunu indükler (18). STAT1 ve PD-1/ PD-L1 ekspresyonu arasındaki pozitif korelasyona dayanarak, STAT1'in MSI kolorektal kanserlerde pro-onkojenik bir rol oynaması mümkündür (18). Bugüne kadar bildirilen kanserler için STAT1'in prognostik potansiyeli değişken ve hatta bazen tartışmalı olmuştur.

SOX2, 3q26.3 – q27 kromozomunda yer alır ve cinsiyeti belirleyen Y bölgesi (SRY) benzeri kutu (SOX) gen ailesinin bir üyesidir. SOX2 proteini, transkripsiyonel bir faktör olarak, embriyonik kök hücrenin kendini yenilemesi

ve pluripotensinin korunmasında önemli rol oynar. SOX2'nin ayrıca tümörijeniteye dahil olduğu bildirilmiştir. Çok sayıda çalışma, SOX2'nin meme kanseri, over kanseri, akciğer kanseri ve sindirim sistemi kanserleri gibi çeşitli tümörlerle ilişkili olduğunu göstermiştir (19). Yakın zamanda, SOX2'nin KRK'larda yüksek TNM evresi, lenf nodu metastazları ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (20-23). Bununla birlikte, SOX2'nin aşırı ekspresyonunun, mTOR yolağının inhibisyonu yoluyla KRK hücresi proliferasyonunu baskıladığını gösteren raporlar da vardır (24). SOX2, KRK'da olası bir prognostik belirteç olabilir. Bununla birlikte bu konuda kesin yargıya ulaştıran yeterli çalışma yoktur.

MSI kolorektal karsinogenezde önemli basamakları kontrol eden, prognostik ve tedavi ilişkili özellikleri olan bu belirteçlerin ekspresyonunu değerlendirmek, bu tümör grubunu daha iyi tanımamızı ve MSI yolaktaki moleküler süreçleri daha iyi anlamamızı sağlayacaktır. Aslında bu belirteçlerin özellikleri MSS tümörlerde de yeterince aydınlatılabilmiş değildir. MSS ve MSI tümörler arasındaki farkı daha iyi anlamak, KRK hastalarında daha hızlı tanısal yaklaşımlar ve daha doğru tedavi protokolleri sonucunu beraberinde getirecektir. Çalışmamızda öncelikle 2000-2018 yılları arasında hastanemizde kolon rezeksiyonu yapılan veya konsültasyon materyali değerlendirilen kolorektal adenokarsinomu olgularında, immünohistokimyasal yöntemlerle (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) mikrosatellit instabil (MSI) tümörler saptanacaktır. MSI ve MSS tümörlerde immünohistokimyasal olarak STAT1, BRAF, SOX2 ve CDX2 ekspresyonu araştırılacak ve rutin histopatolojik parametreler (histolojik tip, grade v.b.) yanı sıra klinikopatolojik parametreler de incelenerek aralarındaki ilişkiler değerlendirilecektir. Son olarak da tüm çalışma grubu içinde, hastanemizde tedavi alan ve düzenli izlemi yapılan olgular prognostik değerlendirme için elde edilen verileri ile ayrı bir grup olarak ele alınıp MSI ve MSS kolon tümörlerinin sağkalım analizleri yapılacaktır.

Çalışmamızın MSI kolorektal karsinogenez süreçlerinin daha iyi anlaşılmasına ve elde edilen verilerin yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmesine katkıda bulunmasını umuyoruz.



II. GENEL BİLGİLER

1. Epidemiyoloji

KRK, tüm cinsiyetlerde 4., erkeklerde 3., kadınlarda ise 2. sıklıkta görülür. Ölüm oranı açısından toplamda 3. sıradadır, erkeklerde akciğer ve prostattan sonra 3., kadınlarda ise meme, akciğer ve serviksten sonra 4. sırada gelir. Dünya çapında tüm kanser tanılarının %10'unu oluşturmakta olup, insidansı giderek artmaktadır. 2020'de 1,9 milyondan fazla yeni olgu tanımlanmıştır ve yaklaşık 935.000 kanser ölümünden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (1). 2035 yılına kadar rektum ve kolon kanserinden toplam ölüm sayısının sırasıyla %60 ve %71,5 oranında artacağı tahmin edilmektedir (25). Küresel olarak, bölgesel KRK insidansı 10 kattan fazla değişmektedir. En yüksek insidans oranları Avustralya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da; en düşük oranlar ise Afrika ve Güney-Orta Asya'dadır. Bu coğrafi farklılıklar, genetik duyarlılığın yanı sıra beslenme ve çevresel maruziyetlerdeki farklılıklara bağlanmaktadır (26).

Türkiye'de 2020 verilerine bakıldığında kolorektal kanser tüm yaş gruplarında %9,1'lik oranla 3. sırada yer almaktadır. İnsidansı 21.191 olarak hesaplanmıştır. Türkiye'de kadınlarda meme ve tiroid kanseri ilk sırada yer alırken 3. sırada ise KRK yer almaktadır. Erkeklerde ise ilk iki sıradaki akciğer ve prostat kanserinden sonra kolorektal kanser yine 3. sırada görülür. Türkiye'de kanser ölümlerine bakıldığında KRK, erkeklerde ve kadınlarda 4. sırada yer almaktadır (1).

2. Etiyoloji

Kolorektal kanser etiyolojisinde batılı yaşam tarzı önemli yer tutar (27). Belirlenmiş risk faktörleri arasında işlenmiş ve kırmızı et ve alkol tüketimi ile obezite bulunmaktadır (27-29). Sigara içmenin KRK ile ilişkisi tartışmalıdır (30). Diyetsetel lif ve süt ürünleri tüketimi, fiziksel aktivite, kadınlarda uzun süreli NSAİİ ve hormon replasman tedavisinin riski azalttığı bilinmektedir (27, 31-33). Bu faktörlerin altında yatan moleküler yolaklar, karmaşık etkileşimler nedeniyle yeterince anlaşılmamıştır (34). Genetik yatkınlık, mutasyon tipine bağılı olarak önemli bir risk faktörüdür. FAP'lı hastalarda yaşam boyu KRK gelişme riski %100'dür. İnflamatuvar barsak hastalığı, belirlenmiş bir diğerk risk faktörüdür. Nadir fakat iyi tanımlanmış risk faktörleri ise pelvik radyasyon, kistik fibrozis, üreterosigmoidostomi ve akromegalidir (35-38).

3. Klinik

Yaygın semptomlar barsak alışkanlığında değışiklik, rektal kanama, anemi ve karın ağrısıdır. Ancak tarama programlarının artmasıyla birlikte asemptomatik hasta sayısı da artış göstermiştir. Bu hastalar kabul edilen tarama stratejisine bağılı olarak, gaitada gizli kan taraması gibi çeşitli tarama testleri ile taranır. Şüpheli bulunan hastalara uygulanan endoskopik incelemelerle lezyon tespit edilir (39). Endoskopik değerkendirme, KRK ve öncü lezyonların görüntülenmesini sağlar. Erken lezyonların terapötik olarak çıkarılması, snare polipektomi, endoskopik mukozal rezeksiyon veya submukozal disseksiyon ile yapılabilir (40). Narrow band görüntüleme ve büyütme kromoendoskopi gibi gelişmiş teknikler ise bu lezyonların endoskopik olarak saptanmasını ve değerkendirilmesini kolaylaştırır (41).

Klinik görüntülemenin ana kullanımı KRK evrelemesi içindir. Çeşitli yardımcı teknikler kullanılabilir; erken rektum kanserlerinde invazyon derinliğini belirlemek için endorektal ultrasonografi uygulanmaktadır (42). Daha ileri lezyonlar için, özellikle tümörün mezorektal fasya ile ilişkisinin

belirlenmesinde MRG incelemesi önemlidir (43). Görüntüleme yöntemleri lenf nodu değerlendirilmesinde anlamlı yarar sağlamamaktadır (44). Uzak metastazları belirlemek için BT veya PET-CT kullanılabilir. Son zamanlarda tümör yanıtının (yeniden evreleme, ypT) görüntüleme kullanılarak değerlendirilmesi mümkün hale gelmiştir (45, 46).

4. Lokalizasyon

Pratikte, kolorektal karsinomlar lokasyona göre üç gruba ayrılır: sağ veya proksimal kolon karsinomları (çekum, çıkan kolon ve transvers kolon), sol kolon karsinomları (splenik fleksuradan sigmoide kadar olan bölüm) ve rektal karsinomlar. Kolorektal kanserlerin çoğu sol taraflı veya rektum yerleşimlidir. Yüksek olasılıkla artan endoskopi sıklığına bağlı, sol taraflı KRK insidansında kısmi bir azalma olmuştur. Gaitada gizli kan testi de dahil olmak üzere tarama yöntemleri sol taraflı neoplaziler için daha duyarlıdır.

KRK'un moleküler yolakları da lokalizasyona özgü özellikler gösterir ve tedavi farklılıkları içerir. Özellikle rektal karsinomlarda neoadjuvan radyoterapi veya radyokemoterapinin belirgin bir rolü vardır. Sağ kolon kanserinin tedavisinde cerrahi komplikasyonlar daha sık görülmektedir (47). Lokalizasyonun aynı zamanda metastatik KRK'larda prognostik önemi bulunmaktadır ve sistemik tedavi başarısı ile ilişkilidir (48-50). MSI yolağı daha çok sağ kolon yerleşimli tümörlerde izlenmektedir (51).

5. Makroskopik Özellikler

KRK'lar belirgin ekzofitik/ fungatif biçimde intraluminal büyüme, endofitik biçimde intramural büyüme ya da kolorektal duvarı çepeçevre tutarak annüler şekilde büyüme ile lümenal daralma yapabilir. Ayrıca nadiren diffüz infiltratif gelişim göstererek linitis plastica görünümüne sebep olabilir. Ülserasyon sık gözlenir. Proksimal kolon tümörleri sıklıkla ekzofitik kitleler oluştururken, inen kolon tümörleri endofitik veya annüler kitleler şeklindedir. Kesit yüzleri genellikle gri-beyaz renkte, solid nitelikte izlenmekle birlikte

nekroz görülebilir. Müsinöz tümörlerde ise jelatinöz görünüm mevcuttur. Mikrosatellit instabil tümörler genellikle iyi sınırlı olma eğilimi gösterir ve bu tümörlerin %20'si müsinöz tiptedir (52).

5.1. Büyüme paterni

İki tür büyüme paterni klinik olarak önem taşır; infiltratif büyüme ve itici sınırlarla büyüme (53). İtici sınırlar, iyi prognoz ve erken evre ile ilişkilidir (54).

5.2. Perforasyon

KRK'da, tümör alanından geçerek peritona açılan perforasyonun, kötü prognozu belirleyen en önemli faktörlerden biri olduğu bilinmektedir (55, 56). Tümöral perforasyon tanımı, makroskopik olarak tümörden geçen ve serozal dış yüzeye veya komşu organa açılan doku defektlerini kapsar. AJCC 8. baskısında yer alan evreleme sisteminde, bu tümörler pT4a şeklinde evrenir (57, 58). Tümöral perforasyon, biyolojik süreçte gelişen doku defektleri için geçerlidir. Fakat cerrahi işlem sırasında, barsak segmenti karın boşluğu içinde olduğu süreçte iyatrojenik perforasyonun gelişmesi de batin içi yayılımın olabileceği göz önüne alınarak, pT4a olarak evrenir. Kolon segmenti karından çıkarıldıktan sonra iyatrojenik perforasyonun gerçekleşmesi, pT evresini etkilemez. Bu nedenle, patoloji istem kağıdında, cerrahın detaylı bir şekilde süreci yansıtmayı önemlidir. Yüzeyinde visseral peritonu korunan peritümöral apse kavitesi, tümör perforasyonu olarak kabul edilmez ve pT3 olarak evrenir. Distalde tıkaçıcı tümörün bulunması nedeniyle, tümörden uzak bir alanda gelişen kolon perforasyonu tümör perforasyonundan farklıdır. Bu durum pT4 olarak evrelemeye yol açmaz ancak yüksek mortalite riski ile ilişkili olduğundan raporda yer almalıdır (59).

5.3. Mezokolik eksizyon seviyesi

Mezokolik eksizyonda uygulanan cerrahi işlemin kalitesinin, kolon karsinomlu hastalarda prognozu etkilediği retrospektif ve gözlemsel randomize çalışmalarda gösterilmiştir. Mezokolik seviyede uygulanan eksizyon sınırı, yüksek sayıda lenf nodu disseksiyonuna olanak sağlar. Yüksek vasküler ligasyon uygulanan komplet mezokolik eksizyonlarda, lokal nüks riskinin azaldığı ve sağkalım süresinin uzadığı belirlenmiştir (60). Bu nedenlerle rezeksiyon materyalinin açılmadan önce aşağıda tarif edildiği gibi detaylı incelenmesi ve değerlendirmenin en kötü alana göre yapılması gereklidir (61).

Mezokolik Seviye: Dış yüzey düzgündür. Mezokolik fasyada çapı ve derinliği 5 mm'den az doku kaybı alanları görülebilir.

İntramezokolik Seviye: Dış yüzeyde düzensizlikler bulunur. Mezokolik fasyada çapı ve derinliği 5 mm'den fazla ancak muskularis propriaya ulaşmayan doku kaybı alanları saptanır.

Muskularis Propria Seviyesi: Muskularis propriaya uzanan doku kaybı alanları vardır.

Rektum yerleşimli tümörlerde de benzer şekilde mezorektal eksizyon seviyesi değerlendirilir.

5.4. İnvazyon seviyesinin peritona uzaklığı

pT3 tümörler için, invazyon derinliğinin peritona uzaklığı prognostik önem taşır. Ölçüm, periton yüzeyinden, en derin invazyon seviyesine kadar yapılır. Periton ile primer tümör arasındaki mesafenin 1 mm'den az olması, pT3 tümörler arasında kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (62).

5.5. Cerrahi rezeksiyon sınırları

Cerrahi rezeksiyon materyallerinde proksimal, distal, radyal (çevresel veya lateral) ve vasküler bağ (mezo kökü) cerrahi sınırlarının (CS)

değerlendirmesi, makroskopik ve mikroskopik incelemeye dayanır. Proksimal ve distal cerrahi sınırlar ayırt edilmesi en kolay olanlardır. Bu sınırlar nadiren pozitifdir, ancak tümör bu sınırlara yakınsa lokal nüks riski artar (63). Radyal (çevresel veya lateral) CS, tümöre en yakın alandaki periton ile örtülü olmayan, visseral fasya ile örtülü olması beklenen, adventisyel yumuşak doku sınırır. Radyal CS, periton içermeyen KRK'larda değerlendirilir. Radyal CS'ye tümör uzaklığı ≤ 1 mm ise CS pozitif olarak kabul edilir. Radyal CS pozitifliği, KRK'larda lokal nüks ve sağkalım ile ilişkili bulunmuştur (64, 65).

6. Mikroskopik Özellikler

KRK'ların büyük kısmı (%90) adenokarsinom morfolojisindedir. Mukozadan başlayan neoplastik süreç muskularis mukozayı aşarak submukoza invazyonu oluşturur. Çoğu olgu adenokarsinom, NOS olarak tanı alsa da, spesifik klinik ve moleküler özelliklerle birkaç histopatolojik alt tip ayırt edilebilir (66).

6.1. Histopatolojik subtipler

6.1.1. Müsinöz adenokarsinom

Lezyonun %50'sinden fazlasını ekstrasellüler müsin gölcükleri oluşturur. Bu müsin gölcüklerinin içinde yuvalar, tabakalar halinde ya da tek tek düşmüş neoplastik epitelial hücreler izlenir. Tek tek düşmüş hücreler taşlı yüzük morfolojisinde olabilir. %5 ile %20 arasında değişen bir prevalans ile en yaygın alt tiptir (67). Adenokarsinom, NOS ile karşılaştırıldığında prognostik bir fark yoktur, ancak metastatik lezyonları sistemik tedaviye daha zayıf yanıt verir (68, 69). Adenokarsinom, NOS ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranda MSI tümörlerdir. MSI varlığının bağımsız prognostik değeri yoktur (70, 71). Bu nedenle müsinöz tümörlerin derecelendirmesi, glandüler

oluşum ve epitelyal matürasyona dayalı olmalıdır. Müsinöz alanları <%50 olan karsinomlar, müsinöz bileşene sahip KRK olarak kategorize edilir (66).

6.1.2. Taşlı yüzük hücreli karsinom

Tümör hücrelerinin %50'sinden fazlası belirgin intrasitoplazmik müsin içerir. Tipik olarak çekirdek periferite itilir ve taşlı yüzük görünümü alır. Tüm KRK'lar arasında %1 oranında görülmekle birlikte, sağ kolon yerleşimli tümörlerde daha sık izlenir (72). Bu tümörler sıklıkla ileri evrelerde saptanırlar ve benzer evredeki adenokarsinom NOS ve müsinöz karsinom ile karşılaştırıldığında daha kötü gidişlidir (73). Erken metastaz yapar ve metastazları KRK için atipik lokalizasyonlarda izlenir (74). MSI insidansı yüksektir ve Lynch sendromu ile güçlü bir ilişkisi bulunmaktadır (75). Tümörün <%50'sinde taşlı yüzük hücreleri içeren karsinomlar, taşlı yüzük hücre bileşenine sahip olarak sınıflandırılır (66).

6.1.3. Medüller karsinom

Belirgin lenfositik ve nötrofilik infiltrasyonun eşlik ettiği veziküler çekirdekli, belirgin nükleollü ve bol eozinofilik sitoplazmalı neoplastik hücre tabakaları ile karakterizedir. Tek merkezli çalışmalar, prevalansını %4 olarak tahmin etmektedir (76, 77). Histopatolojik ayrımı güç olduğu için kanser kayıtlarında bu alt tipin eksik bildirildiği düşünülmektedir (78). Mikrosatellit instabilite ve BRAF mutasyonları sık izlenir (76). İyi bir klinik gidişle ilişkilidir (77). CDX2 ve CK20 negatifliğiyle anormal bir immünofenotip sergiler (79). Nöroendokrin belirteçlerle de boyanma göstermez (66).

6.1.4. Serrated adenokarsinom

Bu alt tip, glandüler serrasyonlara sahip olup serrated poliplerle morfolojik benzerlikler gösterir. Müsinöz alanlar eşlik edebilir. Tümör hücreleri düşük

nükleer/sitoplazmik orana sahiptir. Tüm KRK'ların yaklaşık %10-15'i serrated adenokarsinom olarak sınıflandırılır (80).

6.1.5. Mikropapiller adenokarsinom

Vasküler kanalları andıran stromal boşluklar içindeki küçük tümör hücre kümeleri ile karakterizedir. Bu tanı için tümörün en az %5'i bu morfolojide olmalıdır. Tek merkezli serilerde insidansı %5 ile %20 arasında değişmektedir (81-83). Bu alt tipte lenf nodu metastazı riski yüksektir ve lenfatik invazyon, ektramural vasküler invazyon (EMVI) ve perinöral invazyon gibi kötü prognostik faktörler sıklıkla bulunur (66).

6.1.6. Adenom benzeri adenokarsinom

Daha önce "villöz adenokarsinom" ve "invaziv papiller adenokarsinom" olarak tanımlanan bu alt tip, invaziv alanların en az %50'sinin villöz yapılarla sahip adenom benzeri bir görünümüne sahip olduğu invaziv bir adenokarsinom olarak tanımlanır (84-86). Minimal desmoplastik reaksiyon gözlenir ve itici bir büyüme paterni vardır. İnsidansı %3 ile %9 arasında değişmektedir (82, 87). Bu alt tipte küçük biyopsilerde invaziv bileşeni tanımak zor olabilir. KRAS mutasyon oranı yüksektir ve iyi prognoz ile karakterizedir (87).

6.1.7. Adenoskuamöz karsinom

Bu nadir alt tipin insidansı <%0,1'dir (88, 89). Hem adenokarsinom hem de skuamöz hücreli karsinom özellikleri, gastrointestinal sistemin başka yerlerinde görülen adenoskuamöz karsinomlara benzer (66).

6.1.8. Sarkomatoid komponenti olan karsinomlar

Küçük bir KRK alt grubu indifferansiye morfolojide olup iğsi hücreler veya rabdoid özellikler gibi sarkomatoid yönlerle karakterizedir (90-92). Genel

olarak bu hastaların prognozları kötüdür (89). Tümörler tipik olarak büyüktür ve bol miktarda intrasitoplazmik, eozinofilik rabdoid cisimleri olan rabdoid hücreler içerir. Sıklıkla miksoid matrikste diskoheziv tümör hücreleri görülür. Pleomorfik, dev veya iğsi hücreler, glandüler farklılaşma alanları bulunabilir. SWI/SNF kromatin yeniden modelleme kompleksinin bir alt birimi olan SMARCB1 (INI1) için nükleer immün boyanma kaybı karakteristiktir (90). Bu tümörler, SMARCA4, SMARCA2 ve/veya SMARCB1 dahil olmak üzere SWI/SNF protein ailesinin birçok üyesinin kaybı/koaktivasyonuna sahip gibi görünmekte olup bazılarında ARID1A anormallikleri bulunmaktadır (66).

6.1.9. İndiferansiye karsinom

Bu karsinomlar, epitelyal bir tümör için morfolojik, immünohistokimyasal ve moleküler kanıtlardan yoksundur. İtici sınırları ve sinsityal büyüme paternine sahip olmamaları ile medüller karsinomlardan ayrılırlar. Ayrıca belirgin lenfoplazmasitik infiltrat içermezler ve nadiren mikrosatellit instabil tümörlerdir (66).

6.2. Derecelendirme

KRK için bir dizi derecelendirme sistemi önerilse de yaygın kabul edilen bir standart derecelendirme sistemi yoktur. AJCC, TNM kılavuzunun 8. baskısında kolorektal kanser için dört kademeli bir derecelendirme sisteminin kullanımını belirlemiştir (93):

- Derece 1: İyi diferansiye (>%95 bez oluşturan tümörler)
- Derece 2: Orta derecede diferansiye (%50-95 oranında bez oluşturan tümörler)
- Derece 3: Az diferansiye (<%50 bez oluşturan tümörler)
- Derece 4: İndiferansiye tümörler (bez oluşturmayan veya müsin içermeyen, skuamöz veya nöroendokrin farklılaşma göstermeyen tümörler)

Önemli derecede gözlemciler arası değişkenliğe rağmen, histolojik derecenin birçok çalışmada önemli bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir ve diferansiasyon kaybı ile kötü klinik gidiş arasında güçlü bir korelasyon mevcuttur (94-97).

DSÖ'nün önerisi doğrultusunda, uygulama kolaylığı ve prognozu belirleme açısından üstün olduğu öne sürülerek, günümüzde ikili derecelendirme sisteminin (iyi farklılaşma ve kötü farklılaşma) uygulanması önerilmektedir. İkili sisteme göre, 3-4'lü sistemde grade 1 ve grade 2 tümörler iyi farklılaşma, grade 3 ve 4 tümörler kötü farklılaşma gösteren tümörler olarak değerlendirilir. Derecelendirme, tümörün en az farklılaşma gösterdiği alan göz önüne alınarak yapılmalıdır. Derecelendirmede, tümör tomurcuklanması ve az diferansiye gruplar göz önüne alınmaz. Adenokarsinom, NOS ve müsinöz adenokarsinom derecelendirilir. Adenokarsinom, NOS dışındaki morfolojik alt tipler neoplastik hücrelerin bez oluşturmalarını esas alan derecelendirme sistemine uygun olmamakla birlikte, kendilerine özgün prognostik yansımaları vardır. Müsinöz adenokarsinom derecelendirmesi; tümör hücrelerinin bez yapma yeteneklerine ve matürasyon derecelerine dayanır. Taşlı yüzük komponenti olan müsinöz adenokarsinom, kötü farklılaşma olarak derecelendirilir. Müsinöz adenokarsinom gibi bazı histolojik tümör tiplerinde, MMR durumunun klinik davranışı etkileyen ana unsur olduğu düşünülmekle birlikte, bazı çalışmalar morfolojik derecelendirmenin daha etkin olduğunu göstermiştir (66).

6.3. Lenfovasküler invazyon

Lenfovasküler invazyon, lenfatik-kapiller ve venül seviyesindeki damarlar içerisinde tümör hücrelerinin varlığı şeklinde tanımlanır. Yanlış pozitifliklere neden olabilecek bıçak bulaşına, retraksiyon artefaktına ve stromal fibroblastlara dikkat edilmelidir (98). Lenfovasküler invazyon, kolorektal adenokarsinomlarda önemli bir prognostik faktördür (99). Vasküler yapılarla ilişkiyi değerlendirmede immünohistokimyasal çalışmalar yardımcı olabilir (100).

6.4. İntramural ve ektramural venöz invazyon

Venöz invazyon lokalizasyona göre alt sınıflara ayrılabilir: barsak duvarı içinde, intramural vasküler invazyon (IMVI) ve barsak duvarının dışında, ektramural vasküler invazyon (EMVI). IMVI'nin %4-40'lık bir insidansa sahip olduğu bildirilmekte olup kötü prognozla ilişkilidir (101). EMVI insidansı IMVI'den daha yüksektir, ancak bu özelliğin patoloji raporlarında eksik bildirildiği düşünülmektedir. EMVI'nin olumsuz prognostik etkisi IMVI'den (102, 103) daha yüksektir. Elastin boyama veya immünohistokimya bazen saptanmasını kolaylaştırmak için kullanılır (66).

6.5. Perinöral invazyon

Tanımı gereği tümör hücreleri sinirin en az üçte birini çevrelemeli ve üç katmandan (epineurium, perinurium ve endoneurium) herhangi birinde bulunmalıdır (104). KRK'larda görülme sıklığı %20 civarında bildirilmektedir. Rektumda, ileri evre tümörlerde ve diğer risk faktörlerinin (örn. vasküler ve lenfatik invazyon) varlığında insidansı artar. Perinöral invazyon, lokal ve uzak nüks yanı sıra azalmış sağkalım ile ilişkilidir (105).

6.6. Tümör tomurcuklanması

Primer tümörün derin invazyon alanında, izole ve/veya küçük gruplar halinde, 4 veya daha az neoplastik hücre, tümör tomurcuklanması (TT) olarak tanımlanır (106). Tümörde epitelyal-mezenkimal dönüşümün yansıması olarak kabul edilir (107). Çok sayıda çalışma, T1 tümörlerde yüksek tümör tomurcuklanmasının, nodal tutulum için önemli bir risk faktörü olduğunu öne sürmüştür (108-113). Benzer şekilde, Evre II hastalarda yüksek tümör tomurcuklanmasının prognozu olumsuz etkilediği gösterilmiş olup bu hastaları yüksek riskli kabul edip kemoterapi verilmesi gerektiği savunulmaktadır (109, 111). Literatürde tümör tomurcuklanmasını

değerlendirmek ve raporlamak için farklı kriterler izlenmiştir. 2016 yılında uluslararası bir tümör tomurcuklanma konsensus konferansı (ITBCC), tümör tomurcuklanmasını değerlendirmek için aşağıdaki kriterleri önermiştir (106):

1. Mikroskopun x20 büyütmesi altında, rezeksiyon materyallerinde en derin invazyonun izlendiği 10 alan, poliplerde tüm kesi düzlemi taranır ve en yoğun TT izlenen odak ("hotspot" yaklaşımı) saptanır.
2. Yangı gibi engelleyici faktörlerin olduğu durumlarda, tümör tomurcuklarını daha iyi değerlendirmek için sitokeratin immünohistokimya boyaması yapılabilir, ancak skorlama H&E kesitlerde yapılmalıdır.
3. TT sayısını 0.785 mm²'lik alanda, x20 büyütme ile, 20 mm lens alan çapında verebilmek için, mikroskopta kullanılan lens alan çapına bağlı normalizasyon faktörü kullanılarak TT sayısı hesaplanır (Tümör tomurcuklanma sayısı / 0.785 mm² = tümör tomurcuklanma sayısı (x20 objektif) / normalizasyon faktörü).

Seçilen hotspot odakta H&E kesitlerde sayım yapılır ve 3 kategoride derecelendirilir: düşük (0-4 tomurcuk), orta (5-9 tomurcuk) ve yüksek (10 veya daha fazla tomurcuk).

6.7. Az diferansiye kümeler ("poorly differentiated clusters"; PDC)

Tümör ana kitlesinde veya derin invazyon alanında, bez yapısı oluşturmayan küçük gruplar halinde, 5 veya daha fazla neoplastik hücre grubu olarak tanımlanır (114). Kötü prognostik faktördür (115). Tanımı gereği, sadece tümörün invaziv alanında değil, aynı zamanda tümör stromasında da bulunabilirler (116).

Mikroskop altında x4'lük büyütme alanında kesitler incelendikten sonra en yüksek az diferansiye küme odağını içeren odaklar saptanır ve x20 büyütme ile (ana eksen 1 mm olan mikroskobik alan) sayılır. Hotspot odakta sırasıyla <5, 5-9, ≥ 10 az diferansiye gruplar sırasıyla düşük, orta, yüksek olarak

derecelendirilir (112). Az diferansiye kümeler KRAS ve BRAF mutasyonu ile ilişkili olup, EGFR tedavi yanıtını öngörme açısından etkindir (117, 118).

6.8. İmmün yanıt

KRK'lara karşı gelişen immün yanıtın, biyolojik, moleküler ve klinik yansımaları bulunmaktadır. Tümör mikroçevresinde izlenen immün hücreler, KRK'ların moleküler ve histopatolojik tipinden bağımsız olarak yaşam süresi ile ilişkilidir. İntratümöral (tümör hücreleri arasında) ve peritümöral alanlarda (tümör stroması içinde veya tümörün invazyon gösteren alanlarında) izlenen lenfositik infiltrasyonla karakterize adaptif yanıtın prognoz ile direkt korelasyon gösterdiği ve tedavi açısından yönlendirici olduğunu öne süren çok sayıda çalışma mevcuttur. Günümüzde, immün yanıtı değerlendirmek amaçlı, rutin kullanım açısından standardize edilen bir uygulama olmasa da, patoloji raporlarında intratümöral lenfosit sayısı, düşük seviyede (<50/BBA) ve yüksek seviyede (>50/BBA); peritümöral lenfosit sayısı, düşük seviyede (<200/BBA) ve yüksek seviyede (>200/BBA) olarak raporda belirtilebilir.

Crohn benzeri lenfoid reaksiyon tümörün derin invazyon alanlarında bulunan ve bir kısmı follikül merkezi içeren lenfoid folliküllerdir. Çap, yoğunluk ve matürasyon derecelerine paralel olarak düşük lokal nüks ve uzak metastaz risk oranı saptanmış; yaşam süresini olumlu etkilediği farklı yayınlarda ortaya konmuştur. MSI tümörlerle ilişkilidir, ancak prognoz üzerine olumlu etkisi MSI durumundan bağımsızdır (54). Günümüzde, rutin kullanım açısından standardize edilen bir uygulama bulunmamasına karşın, patoloji raporlarında varlığı belirtilebilir.

6.9. Tedavi yanıtı

Ameliyat öncesi uygulanan neoadjuvan kemoterapi ve radyoterapiye tümörün regresyon yanıtı değerlendirilmeli ve raporda belirtilmelidir. Tümör regresyon değerlendirmesi, rezeksiyon materyalindeki primer tümör bölgesinde uygulanmaktadır ve genelde gözlemciler arası uyumun iyi olduğu

gözlendiği için yaygın olarak kullanılmaktadır. Tedaviye yanıt, rezidüel canlı karsinom alanlarına karşılık fibrozis ya da fibroenflamasyon alanlarının miktarı değerlendirilerek saptanır. Fibrozis, nekroz ve asellüler müsin regresyon bulgularını oluşturur. Tedavi yanıtının yüksek olması daha iyi klinik seyir ile ilişkili bulunmuştur (119, 120). Tam patolojik yanıt (Skor 0) örneklerde canlı tümör hücrelerinin hiç saptanmaması ve tüm lezyonun yoğun fibrozis veya fibroenflamasyon içeren bir dokuya dönüşmesidir. Tam yanıt yorumu yapabilmek için tümör yatağının tümüyle örneklenmesi gereklidir. Rezidüel tümör hücrelerinin görülmesi kısmi yanıt olarak değerlendirilir. Ayrıca regresyon bulguları gösteren lenf nodlarının (LN) sayısı ve/veya metastatik odaklardaki regresyon oranları da değerlendirilmeli ve patoloji raporu içinde yer almalıdır. Ryan ve ark.'nın önerdiği sistemin bir modifikasyonu olan dörtlü sistem neoadjuvan tedavi yanıtını değerlendirme amaçlı önerilmektedir (121).

- Skor 0: Tam yanıt (canlı tümör hücresi yok)
- Skor 1: Tama yakın yanıt (izole tümör hücreleri ve/veya az sayıda canlı tümör hücre grupları)
- Skor 2: Kısmi yanıt (regresyon bulguları gösteren canlı tümör hücre grupları)
- Skor 3: Zayıf yanıt / Yanıt yok (regresyon bulgularının izlenmediği yaygın karsinom)

7. Tümör Evrelemesi

Tümör evrelemesinde AJCC kanser evreleme kılavuzu tarafından yayınlanan TNM evreleme sistemi ve prognostik evre grupları kullanılmaktadır (93).

7.1. İnvazyon derinliği: Cerrahi rezeksiyon materyalinin makroskopik ve mikroskopik değerlendirmesine dayanan tümör invazyon derinliği, KRK'larda en belirleyici prognostik faktördür ve evrelemede pT'yi belirler.

KRK'larda T evresi tablo 1'de detaylı incelenmiştir.

Tablo 1: KRK'larda T evresi

T kategorisi	Tanımı
TX	Primer tümör değerlendirilemedi
T0	Primer tümör saptanmadı
Tis in-situ karsinom	Lamina propria invazyonu (İntramukozal karsinom)
T1	Submukoza invazyonu
T2	Muskularis propria invazyonu
T3	Subseroza veya peritonsuz kolon segmentlerinde perikolik veya perirektal doku invazyonu
T4	Diğer organ veya yapılara direkt invazyon ve/veya visseral periton perforasyonu
T4a	Visseral periton perforasyonu
T4b	Diğer organ veya yapılara direkt invazyon

7.2. Lenf nodları: KRK'da, bölgesel LN metastazı, adjuvan tedavi uygulanması için yönlendiricidir. Bölgesel olmayan LN metastazı, uzak metastaz (pM1) olarak kabul edilir. Materyal üzerinden ayıklanan LN sayısı; kolon segmentinin uzunluğuna, çıkarılan mezenter miktarına, hastanın yaşına ve neoadjuvan tedaviye bağlıdır.

N evresi tablo 2'de ayrıntılı biçimde gösterilmiştir.

Tablo 2: KRK'larda N evresi

N kategorisi	Tanımı
NX	Bölgesel LN değerlendirilemedi
N0	Bölgesel LN metastazı saptanmadı
N1	1-3 bölgesel LN metastazı
N1a	1 bölgesel LN metastazı
N1b	2-3 bölgesel LN metastazı
N1c	Subseroza veya peritonsuz perikolik/ perirektal fibroadipöz dokuda, LN metastazı olmaksızın tümör depoziti
N2	4 veya daha fazla bölgesel LN metastazı
N2a	4-6 bölgesel LN metastazı
N2b	7 veya daha fazla bölgesel LN metastazı

7.3. Uzak metastaz: Primer tümör rezeksiyon materyalinde (periton veya omentum) veya ana materyalden ayrı gönderilen örneklerde histolojik olarak saptanan metastaz raporlanır ve UICC/AJCC 8. baskısında yer alan evreleme kriterleri doğrultusunda patoloji raporunda belirtilir. Patolog, yalnız gönderilen materyallerde değerlendirme yapabileceği için, patoloji raporlarında pM0 veya pMX kullanılmamalıdır.

KRK'larda M evresi tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3: KRK'larda M evresi

M kategorisi	Tanımı
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz
M1a	Periton metastazı olmaksızın, bir organa sınırlı (karaciğer, akciğer, over, bölgesel olmayan LN) metastaz
M1b	Birden fazla organ metastazı
M1c	Periton metastazı (-/+ organ metastazı)

7.4. AJCC Prognostik Evre Grupları

Tablo 4: KRK'larda prognostik evre grupları

T evresi	N evresi	M evresi	Klinik evre
Tis	N0	M0	0
T1,T2	N0	M0	I
T3,T4	N0	M0	II
T3	N0	M0	IIA
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
Herhangi bir T	N1,N2	M0	III
T1,T2	N1	M0	IIIA
T1	N2a	M0	
T1,T2	N2b	M0	IIIB
T2,T3	N2a	M0	
T3,T4a	N1	M0	
T3,T4a	N2b	M0	IIIC
T4a	N2a	M0	
T4b	N1,N2	M0	
Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1	IV
Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a	IVA
Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1b	IVB
Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1c	IVC

Kolorektal karsinomlar için CAP tarafından oluşturulan kılavuza göre cerrahi işlemin türü, tümör lokalizasyonu, boyutu, tümör perforasyonu, mezorektum bütünlüğü, histolojik tip, histolojik derece, tümör invazyon derinliği, proksimal-distal-radial cerrahi sınırlar, tedavi etkisi (neoadjuvan tedavi alan olgular için), lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, tümör tomurcuklanması, invaziv karsinomun geliştiği adenom zemini varlığı, tümör depoziti, lenf nodu varlığı, sayısı ve metastaz durumu, AJCC kanser evreleme kılavuzuna göre tümör evresi, non-neoplastik kolon mukozasının özellikleri prognostik faktörler olup, patoloji raporlarında yer almalıdır (93, 102).

8. Kolorektal Karsinogenez

KRK'lar onkogenezi açısından tümörlerin yerleşim yerlerine göre proksimal ve distal ya da sağ ve sol kolon tümörleri olarak iki ana grupta incelenmektedir. Sağ ya da proksimal kolon; çekum, çıkan kolon, hepatik fleksura, transvers kolon ve splenik fleksurayı; sol ya da distal kolon tanımı ise inen kolon, sigmoid kolon ve rektumu kapsamaktadır. Ancak yerleşim yerine bakılmaksızın sonuçta KRK patogenezi heterojendir ve kompleks, çok basamaklı moleküler yolakları içermektedir. Bu moleküler mekanizma ve yolaklar belli başlı genetik ve epigenetik değişikliklerin varlığı ya da yokluğuna göre çeşitlilik gösterir (122). Bu yolakların başlıcaları adenom karsinom yolağı ve serrated yolak olup, sorumlu genetik mekanizmaların da en bilinenleri kromozomal instabilite (CIN), mikrosatellit instabilite (MSI) ve CpG ada metilasyonudur (CIMP) (123). Mekanizma ve yolakların farklılıkları kolorektal prekürsör lezyonlara yansımakta, bu lezyonların yerleşim yerleri, invaziv kansere dönüşme yolları ve morfolojileri de çeşitlilik göstermektedir (122). Günümüzde çoklu kolorektal neoplazi yolağı modeli kabul görmektedir (124). Bu modelde en iyi tanımlanmış olan süreçler; kromozomal instabilite ve mikrosatellit instabilite ile ilerleyen adenom karsinom yolağı ve CpG ada metilasyonu ve mikrosatellit instabilite ile ilerleyen serrated neoplazi yolağıdır (125). Bu yolakların esas mekanizmaları farklı olmakla birlikte birbirlerinden tamamen ayrı değildir. Serrated yolak daha sık sağ kolon tümörlerinde etkilidir. Sağ kolon tümörleri moleküler olarak BRAF mutant, yüksek seviyede CpG ada metilasyonu içeren (CIMP-H), MSI profile sahiptir, sol kolon ve rektum tümörleri ise KRAS mutant, düşük seviyede CpG ada metilasyonu içeren ya da CpG ada metilasyonu içermeyen (CIMP-L ya da CIMP-0), MSS profil sergilerler (126).

8.1. Adenom-karsinom sekansı ve kromozomal instabilite (CIN) yolağı

Bu yolağın prekürsör lezyonu konvansiyonel adenomdur. Konvansiyonel adenomlar sıklıkla sol kolon ve rektum lokalizasyonunda olma eğilimi gösterirler. Displazinin şiddetine göre düşük ve yüksek dereceli olmak üzere

ikiye, villöz komponent oranına göre ise tübüler, tübülovillöz ve villöz olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Yüksek dereceli ve villöz adenomlar, düşük dereceli ve tübüler adenomlara göre daha fazla kansere ilerleme eğilimi göstermektedir (127, 128). Adenom karsinom sekansı sonucu gelişen tümörlerde izlenen başlıca mekanizma kromozomal instabilitedir (126).

CIN ilk olarak 1988 yılında Vogelstein ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır ve çok basamaklı adenom-karsinom sekansını ifade eder (129). Sporadik kolorektal karsinomların yaklaşık %70-80'inin gelişiminden sorumludur (130). CIN, kromozomal materyalde kayıp ya da artış; delesyon ya da duplikasyon sonucu hücresel DNA içeriğindeki değişiklikler ile karakterizedir. Kolorektal karsinomlar bu kromozom sayı anormalliklerine ek olarak kromozom kollarında fokal kayıp ve kazanımlar gibi somatik hücrelerde kromozom kopya sayısı anormallikleri de içerir (131). Bu kromozomal dengesizlik hücrelerin karyotipinde değişiklikler ve sonrasında genlerde heterozigosite kaybı (LOH) ile sonuçlanır (132).

CIN yolağı spesifik tümör supresör genler ve onkogenlerdeki mutasyonlar sonucu oluşur (133). Çok sayıda mutasyon basamağı tanımlanmış olsa da, mutasyonların birikimi ve çeşitliliği farklılık gösterir, çok az sayıda tümör tüm basamaklarda moleküler değişiklikler gösterir (134). Kromozomal instabil tümörler hemen her zaman APC mutasyonu, %50 oranında KRAS mutasyonu, %70 oranında TP53 mutasyonu ve %80 oranında 18q allelik kaybı gösterirler. Bazı tümörler KRAS mutasyonu yerine BRAF mutasyonu içerirler ve tümörlerin %25'inde PIK3CA mutasyonu bildirilmiştir (135, 136). Bu yolakta adenomdan tümöre gelişim 10-15 yıl zaman almaktadır (127). CIN varlığını göstermek için sitometri, karyotip analizi, LOH analizi, floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) yöntemleri kullanılır (133).

APC (5q21): Erken adenom gelişiminde rol oynayan başlatıcı mutasyon Wnt yolağında bulunan adenomatöz polipozis koli (APC) genindeki mutasyondur (137). Bu genin germline mutasyonu sonucu ailesel adenomatöz polipozis koli sendromu (FAP) gelişir. Mutant olmayan APC proteini, β -katenin ve GSK-3 β kompleksini oluşturarak ubiquitin-proteozom yolağı ile β -katenin

degradasyonundan sorumludur (138). APC'nin inaktivasyonu sonucu hücre sitoplazmasında β -katenin birikir ve biriken β -katenin, T-cell faktör-1 (TCF-1), lenfoid enhancing faktör-1 (LEF-1) ve güçlü onkogenetik etkileri olduğu bilinen c-myc transkripsiyon faktörlerini uyarır. Bu uyarım kolorektal hücrelerde proliferasyon artışına sebep olur (139). APC aynı zamanda hücre iskelet sistemi etkileşimlerinde yer almaktadır; hücre hücre adezyonu, migrasyon, kromozomal ayrışma (genom stabilitesi) ve apoptozda direkt etkili olduğu bilinmektedir (138, 140).

KRAS mutasyonu: Erken adenom gelişiminde yer alan ikinci önemli mutasyon Kirsten-rat sarkom 2 viral onkogen homologu K-RAS proto-onkogenindeki mutasyondur. K-Ras proteini mitojen aktiveli protein kinaz (MAPK) kaskadında yer alan GTPaz aktivitesine sahip bir proteindir. KRAS mutasyonu KRK'ların %30-40'ında nokta mutasyonu şeklinde izlenmektedir. Bu mutasyonlar en sık kodon 12,13 ve 61'de meydana gelmektedir. KRK'larda en sık kodon 12'de G12D mutasyonu meydana gelmektedir (137). K-Ras proteinleri hücre içi sinyal iletiminde rol oynamakta olup hücre proliferasyonu ve apoptozis için önemlidir (141). KRAS mutasyonu KRK'larda cetuximab ya da panitumumab tedavisine direncin önemli bir göstergesidir. KRAS mutasyonun adenomlarda da sık görülmesi erken adenom gelişiminde rol oynadığını desteklemektedir. Adenomlarda boyut artışı ile birlikte KRAS mutasyonu sıklığının artması ise bu mutasyonun adenomlara büyüme avantajı sağladığını göstermektedir (142).

18q kaybı: 18q allelik kaybı kolorektal karsinomların yaklaşık %70'inde bulunmaktadır (143). Günümüzde bu bölgede SMAD2 ve SMAD4 tümör supresör genlerinin yerleştiği bilinmektedir (144). Bu iki genin protein ürünleri transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) sinyalizasyon yolağının hücre içi düzenleyicileridir. TGF- β bilindiği gibi çok sayıda hücrede hücre büyümesi, farklılaşma, matriks üretimi ve apoptoz gibi geniş bir yelpazede yer alan olayların düzenlenmesinde rol almaktadır (144). 18q kaybı genellikle p53 kaybı ile birlikte izlenmektedir. Kombine kayıp kolorektal karsinomların yaklaşık %65'inde görülmektedir (145).

TP53 mutasyonu: 17p kromozomunun üzerinde yer alan p53 tümör supresör geninin mutasyonu kolorektal karsinogenezin geç evrelerinde yer alan bir mutasyondur. Genom bekçisi olarak isimlendirilen p53, genom kararlığı üzerinde esas rolü oynayan genlerden biridir. Normal hücrelerde p53 proteini çok kısa ömürlüdür, mutant p53 proteini ise MDM2-ubiquitin aracılı proteolize dayanıklı hale gelmektedir (146). Bunun sonucu yıkılamayan p53 patolojik incelemelerde immunohistokimyasal olarak da saptanabilir hale gelmektedir. p53 mutasyonu ya da 17p'nin allelik kaybı adenomlarda ortalama %4-26, yüksek dereceli displazili adenomların %50'sinde ve adenokarsinomların %50-75'inde izlenmektedir. Bu sonuçlara dayanarak p53 mutasyonunun adenom karsinom geçişinde rol oynamakta olduğu düşünülmektedir (147).

8.2. Mikrosatellit instabilite (MSI) yolağı

Bu yolak mikrosatellitlerin keşfinden sonra ilk olarak 1993 yılında Lynch sendromu ile ilişkili olarak bulunmuş ve kolorektal karsinogenezde alternatif bir yol olduğu düşünülmüştür. Lynch sendromunda germline mutasyonlarla ilişkili iken, sporadik olgularda somatik mutasyon veya MLH1 epigenetik mutasyonu ile ilişkilidir ve genellikle metilasyon yolağı ile birliktelik gösterir (135, 148). Herediter geçişte genin bir allelinde germline mutasyon görülürken diğer allelde somatik inaktivasyon görülür. Sporadik olgularda ise her iki allelde de somatik mutasyon gerçekleşir (149).

Kolorektal karsinomların yaklaşık %15'inden sorumlu yolaktır. Olguların %2-4 kadarı Lynch sendromuna bağlı gelişir (150). Mikrosatellitler genomda çok sayıda mononükleotid, dinükleotid veya diğer nükleotid tekrarları şeklinde bulunan, 1-6 bazlık kısa DNA dizileridir. Bu tekrarlar sırasında replikasyon hataları oluşursa Mismatch tamir (MMR) sistemi ile tamir edilir. MMR sistemi, DNA replikasyonu sırasında, DNA dizisinde gerçekleşen hasarların düzeltilmesinde görev alan MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 proteinlerinden oluşan bir sistemdir. Bu dört protein DNA zincirindeki yanlış eşleşmeleri tespit eder ve zincirden ayırır. DNA polimeraz enzimi ile yeniden DNA zincir sentezini ve DNA ligaz enzimi ile de yeni oluşan zincirin bağlanmasını sağlar. Mikrosatellit diziler, DNA polimerazın DNA sentezi

sırasındaki hataları sonucu mutasyon birikimine eğilimlidir. DNA MMR sistemi, DNA polimerazın hata okuma yeteneğinde oluşan hataları replikasyon sonrası tamir edebilir (151). Ancak MMR sisteminde yer alan proteinlerin insersiyon veya delesyonu sonucunda fonksiyon kaybına neden olacak şekilde uzunluklarında değişim meydana gelebilmektedir.

Mikrosatellitlerde görülen bu insersiyon veya delesyon DNA'nın kodlanan bölgelerinde oluştuğunda çerçeve kayması mutasyonu meydana gelir. MMR sistemi baz-baz yanlış eşleşmelerini ve insersiyonları tanır ve hatalı genetik bilgi içeren DNA dizisini tamir eder (152). Bu hatalar tamir edilemezse genom boyunca tekrarlayan mikrosatellitlerin sayısında artış veya azalma ("instabilite") görülür ve MSI gerçekleşir. MSI genin kodlanan bölgelerinde gerçekleştiğinde onkogenik potansiyele sahiptir (152, 153).

Lynch sendromu: Herediter nonpolipozis kolorektal kanser (HNPCC) olarak da adlandırılan, DNA MMR sisteminde yer alan 4 gendeki germline mutasyon sonucu gelişen en sık görülen ailesel kolorektal kanser sendromudur. Otozomal dominant geçişlidir (154). Lynch sendromu erken başlangıçlı kolorektal ve endometrial kanserler ile karakterize olmakla birlikte, gastrointestinal kanal, üriner sistem, kadın genital sistem tümörleri de eşlik edebilir. Bu hastalarda yaşam boyu kolorektal kanser gelişim riski kadınlarda %52,2, erkeklerde %68,7 olarak bulunmuştur. Sporadik olgulara göre daha erken yaşlarda, sağ kolon lokalizasyonunda, multipl tümör odakları şeklinde görülme olasılığı yüksektir (155). Lynch sendromu olgularını belirlemek, tanı ve tedavi yönetimini planlamak amacıyla 2002 yılında Revize Bethesda Rehberi yayınlanmıştır (156). KRK hastaları ve akrabalarında prognoz, uygun tedavi ve risk değerlendirmesini belirlemek için MSI durumu değerlendirilmelidir (157). Lynch sendromunda en sık MLH1, MSH2 germline mutasyonları tanımlanmış olup, MSH6, PMS2 ve MLH3 mutasyonu daha nadirdir (66, 158).

Mikrosatellit instabilitede klinikopatolojik bulgular: MSI tümörler ileri yaş, kadın cinsiyet, erken evre ve sağ kolon yerleşimi ile karakterizedir. Genellikle kötü diferansiye tümörlerdir. Ekspansif büyüme paterni, müsinöz

diferansiasyon, taşlı yüzük hücre diferansiasyonu, Crohn-benzeri lenfositik reaksiyon ve medüller büyüme paterni de sık görülmektedir (51, 159).

Mikrosatellit instabilite varlığını gösteren test yöntemleri: MSI varlığı, PCR yöntemi, DNA sekanslama ve immünohistokimyasal olarak gösterilebilir.

a. PCR yöntemi: Kişideki sağlıklı doku ve tümör dokusu arasında değişen mikrosatellit tekrar boyutlarının farkına dayanmaktadır (160). 5 mononükleotid (BAT25, BAT26, NR-21, NR-24, MONO-27) ve 2 pentanükleotidden (PentaC ve PentaD) oluşan bir panel geliştirilmiştir (161). PCR değerlendirme sonuçlarına göre kolorektal kanserler MSI-H, MSI-L, MSS olarak gruplandırılır. Tanımlanan 5 belirteçten 2'sinde veya daha geniş bir panel kullanılıyor ise $\geq 30\%$ 'unda instabilite varlığı "MSI-H", birinde instabilite varlığı "MSI-L", instabilite saptanmaz ise "MSS" olarak adlandırılır.

b. DNA sekanslama yöntemi: DNA tamir enzimleri tarafından kodlanan genlerdeki mutasyonları direkt gösteren tek yöntemdir. Pahalı ve zaman gerektiren bir yöntem olduğu için her olguda kullanımı zordur (162).

c. İmmunhistokimyasal yöntem: 4 mikrosatellit (MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2) ekspresyon kaybı olup olmadığına bakılır. İmmunohistokimyasal olarak MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2'nin nükleer ekspresyonu tümörde MMR sisteminin sağlam olduğunu göstermektedir. İnternal kontrol pozitif iken (mononükleer hücreler ve stromal hücreler) tümöral hücrelerde kayıp MMR sisteminin hatalı olduğunu gösterir. İnternal kontrol ve tümörün negatif olduğu durumlarda ise işlem tekrar edilmelidir. Mutant ya da metile olmuş MLH1; MLH1 ve PMS2'de nükleer ekspresyon kaybına, benzer şekilde mutant MSH2; MSH2 ve MSH6'da nükleer ekspresyon kaybına sebep olmaktadır. Sadece MLH1'de meydana gelen ekspresyon kaybı Lynch sendromu ilişkili KRK'yı sporadik KRK'dan ayırt ettirmez. Bu ayırmda BRAF mutasyon analizi ya da MLH1 hipermetilasyon testi yapılması gereklidir. MSH2, MSH6'da ekspresyon kaybı ya da izole PMS2 ekspresyonu genellikle Lynch sendromu ilişkilidir. Bu durumda hedeflenmiş germline mutasyon testi uygulanmalıdır (66).

Sporadik MSI-H tümörler aynı zamanda APC, BRAF ve nadiren KRAS mutasyonu içerebilir. Lynch sendromu ilişkili kanserler ise APC'ye alternatif olarak CTNNB1 mutasyonu içerebilir, ancak BRAF mutasyonu göstermezler (163). Bu sebeple MLH1 kaybı gösteren sporadik vakaları ayırt etmek için BRAF mutasyonu analizi faydalı olabilir (126).

Mikrosatellit instabilitenin tedavideki rolü: MSI durumunun prognostik ve prediktif rolü olduğu bilinmektedir. MSI kolorektal karsinomların kişiselleştirilmiş adjuvan kemoterapi (KT), hedef tedavi ve immün kontrol noktası inhibitör tedavisinden yarar gördüğü bildirilmekle birlikte 5-flourourasil (5-FU) tedavisinden fayda görmediğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (157). Evre II ve III MSI kolorektal karsinomlarda 5-FU tedavisinin etkisiz olduğu hatta KT'ye bağlı görülebilecek yan etkiler nedeniyle zararı olabileceği öne sürülmüştür (164). Evre III MSI kolorektal karsinomlarda lökovorin ve 5-FU tedavisinin yerine, oksaliptatin kullanılmasının hastalıksız sağ kalımı arttırdığı bildirilmiştir (165). MSI kolorektal karsinom olgularının topoizomeras inhibitörü irinotekan tedavisinden de yarar görebileceği öngörülmüştür. MSI gösteren tümörlerin rekürrens açısından daha düşük risk taşıdığı bildirilmiştir (166). Evre II MSI tümörlerde cerrahi rezeksiyon sonrası ek tedaviye gerek olmadığı, tümör perforasyonu ya da obstrüksiyonu, adhezyon, etraf doku invazyonu gibi risk faktörleri bulunduğu takdirde, her olgu özelinde ayrı ayrı değerlendirilerek karar verilmesi gerektiği ileri sürülmektedir (167). Onkolojik tedavi araştırmaları immün kontrol inhibitörleri ve immünoterapi yönünde de hız kazanmıştır. Metastatik ve dirençli KRK olgularında programlı ölüm reseptörü-1 (PD-1) ilacı pembrolizumab tedavisinin kullanılabileceği söylenmektedir. Programlı ölüm ligandı-1 (PD-L1) tümör hücrelerinden, PD-1 ise T lenfositlerden eksprese edilir. PD-1 ve PD-L1 birleşmesi sonucunda T hücresi inaktive olur, böylece tümör hücreleri immün sistemden kaçma yeteneği geliştirirler (168). MSI tümörlerde mutasyon yükünün artmasıyla orantılı olarak neoantijenlerin immün sistemi tümöre karşı uyarması ve anti PD-1 yanıtı artışı meydana gelir (169). 2015 yılında anti PD-1 ilacı pembrolizumab tedavisinin metastatik ve dirençli MSI kolorektal

karsinomlarda kullanılabileceği bildirilmiştir (168). Monoterapi olarak kullanılan PD-1/PD-L1 inhibitörleri, tümör boyutunu küçültür ve uzun süreli etkiye sahiptir.

8.3. CpG ada metilasyonu

CpG ada metilasyon fenotipi (CIMP) genlerin promoter bölgelerinde bulunan CpG dinükleotidlerinin yaygın hipermetilasyonu ile karakterizedir. TP16 ve MLH1 gibi tümör supresör gen inaktivasyonunun temel mekanizmasıdır (170). İnsan genomunda metilasyon, CpG dinükleotid yapısındaki sitozinin 5. karbonunda meydana gelir ve 5-metil sitozin insan genomundaki sitozinlerin %4'ünde mevcuttur. Normal hücrelerde promoterde yerleşim gösteren, özellikle tekrarlayan DNA bölgelerinde bulunan CpG adaları diğer bölgelere göre metilasyona daha yatkındır. CpG ada hipermetilasyonu sonucu aktif olarak eksprese edilen tümör supresör genlerin ve tümör ilişkili genlerin inaktivasyonu, hücre proliferasyonunun durdurulmasını ya da yaşlanmayı ve apoptozisi engelleyerek karsinogenezise sebep olur (170, 171). CpG ada metilasyonuna sebep olabilecek çok sayıda genetik ve çevresel etken suçlanmış olsa da promoter bölgelerindeki CpG adalarının metilasyona eğilimli olmasının sebebi tam olarak bilinmemektedir. Promoter CpG ada hipermetilasyonu hemen her tipte kanserde görülmekle birlikte KRK'larda çok sayıda genin promoter bölgesinde saptanır ve bu durum "CpG ada metilatör fenotipi" (CIMP) olarak tanımlanır. CIMP kolorektal karsinomun yeni keşfedilen en önemli moleküler mekanizmalarından biridir ve CIMP karsinomların klinikopatolojik özellikleri kendilerine özgüdür (172) Bu tümörler sıklıkla kadınlarda, ileri yaşlarda görülürler ve proksimal kolon yerleşimlidirler (135). Histolojik olarak bu tümörler az diferansiye, müsinöz veya taşlı yüzük hücre morfolojisindedir (173).

8.4. Serrated neoplazi yolağı, kolorektal kanserin alternatif yolu

DSÖ'nün son sınıflamasında kolorektal polipler; konvansiyonel adenomlar ve serrated polipler olarak sınıflandırılmaktadır. Serrated polipler genel olarak kript epitelinde testere dişi görünümü ile karakterize olup hiperplastik polipler (HP), sesil serrated adenom/polip (SSA/P) ve traditional serrated adenom (TSA) olmak üzere üç alt grupta incelenmektedir (66). SSA/P, kolorektal karsinomların %15-30'unun gelişiminden sorumlu olan serrated neoplazi yolağının esas prekürsörleridir (171, 174). TSA da sıklıkla rektumda yerleşen premalign lezyonlardır ancak çok nadir görülmeleri sebebiyle onkogenetik mekanizmaları net değildir (175). Çeşitli çalışmalarda serrated yolakta mikroveziküler tip HP (MVHP) / SSA/P / displazili SSA/P / kolorektal karsinom sırasıyla tümör geliştiği belirtilmiştir (176).

Serrated neoplazi yolağı hipermetilasyon ve bunun sonucu gerçekleşen tümör supresör genlerin sessizleşmesi yanı sıra BRAF mutasyonu ile karakterizedir (174). Serrated polipozis sendromlu hastalarda yapılan genetik analizler serrated neoplazi yolağının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Bu yolakta meydana gelen onkogenezin karakteristik özelliği tümör supresör genlerin promoter bölgelerinde yer alan CpG adalarının hipermetilasyonudur (CIMP) ve bu genlerin sessizleşmesi ile sonuçlanır (177). Yapılan çalışmalarda serrated poliplerde ortalama %20-26, proksimal SSA/P'lerde ise %63 oranında CIMP-high fenotip saptanmıştır. Bu da serrated polipler ile CIMP-high KRK'lar arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. Bu sebepten serrated neoplazi yolağına CIMP yolağı da denir (178). CIMP-high tümör gelişiminde MLH1'in hipermetilasyonu ve sessizleşmesi önemli bir basamak olup, MMR sisteminin fonksiyon kaybına ve bunun sonucunda MSI gelişimine yol açar (142). Her ne kadar MLH1 hipermetilasyonu kritik bir basamak olsa da CIMP-high tümörlerin yaklaşık %8'i mikrosatellit stabildir (171). Yapılan çalışmalarda MSI ile birlikte olan CIMP+ karsinomların yaşı hastalar, proksimal yerleşim, müsinöz histoloji, belirgin lenfoid infiltrasyon, RUNX3/SOCS1 promoter metilasyonu, BRAF mutasyonu ile birliktelik gösterdiği, MSS ve CIMP+ tümörlerin ise daha erken yaş, distal yerleşim ve KRAS mutasyonu gösterdiği görülmektedir. Bu da sağ kolon kaynaklı

CIMP+, MSI tümörlerin öncülünün SSA/P iken, sol kolon kaynaklı CIMP+, MSS tümörlerin öncülünün TSA olduğunu desteklemektedir (179). BRAF mutasyonu serrated neoplazi yolağının bir başka önemli bileşenidir. BRAF, MAPK kaskadında rol oynar ve KRAS aktivitesi tarafından kontrol edilir. BRAF mutasyonu kontrolsüz hücre proliferasyonuna sebep olur. Yapılan çalışmalarda MVHPlerde %72, SSA/P'lerde %70-80, adenomlarda ise %1 oranında BRAF mutasyonu görüldüğü belirtilmiştir (176). Yine yapılan başka çalışmalarda BRAF mutasyonu ile CIMP-high fenotip arasında kuvvetli bir korelasyon bulunmuştur. Bu sonuçlar da serrated poliplerden kaynaklı, CIMP-high, BRAF mutant kanserlere sebep olan serrated neoplazi yolağının varlığını desteklemektedir (126).

KRK'lerde çok basamaklı moleküler yolakların varlığı, her biri çok çeşitli mutasyonlar içeren çok sayıda genin kolon kanseri gelişiminde yer alması sonucunu doğurmaktadır. Günümüzde bu yolaklar içerisinde MSI yolağı, özgün klinikopatolojik bulgular içermesi ve MSI durumunun prognostik ve prediktif rolü nedeniyle KT ve immünoterapi çalışmalarının hedefi olmuş ve kolon kanseri tedavisinde başarılı gelişmeler sağlanmıştır. Planladığımız araştırmada kolon karsinogenezinde rol oynadığı gösterilmiş olan bazı gen mutasyonları ve transkripsiyon faktörü ekspresyonlarının MSI kolon tümörlerinde prognozu öngörmeye etkinliği ve yeni tedavi protokolleri geliştirilmesine katkısı olup olmayacağı tartışılacaktır.

9. BRAF

RAF gen ailesinde yer alan, 7. kromozomun uzun kolunda (7q34) bulunan bir onkogendir. BRAF geni MAPK sinyal yolağında görev alan bir serin/treonin kinaz aktivitesi olan proteini kodlamaktadır. Bu protein hücre farklılaşması ve proliferasyonunda rol alır. BRAF gen dizisinin 15. ekzonunda yerleşmiş 1796. nükleotidde Timin-Adenin transversiyonu olduğunda, 600. pozisyonda bulunan valin yerine glutamik asit kodlanır. Bu durumda V600E yanlış anlamlı mutasyonu oluşur (136). BRAF mutasyonu tüm kolorektal karsinomlarda %8 oranında görülür. MSI ile birlikteliği sık olup, bu tümörlerde %39 oranında, MSS kolorektal karsinomlarda ise %4

oranında izlenmektedir (180). Bu durum BRAF p.V600E mutasyonunun MLH1 promoter hipermetilasyonu sonucu MSI tümör oluşumuna yol açmasından kaynaklanır (10). BRAF mutant kolon tümörleri kadın cinsiyet, ileri yaş, proksimal yerleşim, ileri TNM evresi, diferansiasyon kaybı ve müsinöz histoloji ile ilişkilendirilmiştir (11-13). Bununla birlikte sonraki çalışmalarda BRAF mutasyonunun MSI ve MSS tümörlerde farklı prognostik etkiye sahip olduğu görülmüştür (14-16). BRAF mutasyonunun MSS tümörlerde kötü prognostik faktör iken MSI tümörlerde erken evre ile ilişkili olup iyi prognoz göstergesi olduğu ileri sürülmektedir (9, 181-183). Bu mutasyonun varlığı Lynch sendromunu dışlamaktadır (157). BRAF molekülü, EGFR sinyal yolağında rol alır ve hücresel proliferasyon, motilite ve sağkalımda etkilidir. Bu gende oluşan mutasyonda EGFR sinyal yolağı sürekli aktif olur, bu da kontrolsüz hücre sinyali ve proliferasyonu sonuştırır. Dolayısıyla BRAF 600. kodonunda meydana gelen nokta mutasyonu anti-EGFR immünoterapisini etkisiz kılar.

10. SOX2

SRY-ilişkili HMG-box (SOX) ailesinin bir üyesidir ve hücre farklılaşmasının ve embriyonik gelişim sırasında pluripotent kök hücrelerin bakımı için gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür (184-190). Kök hücre benzeri kanser hücreleri (CSC) ise, gelişmiş tümörjeniteye, sınırsız kendini yenileme kapasitesine ve kemorezistansa sahip kanser hücreleridir (191). Bir dizi kanser modelinde yapılan prelinik çalışmalar, SOX2+ kanser hücrelerinin karakteristik CSC özellikleri sergilediğini göstermiştir (192-197). SOX2+ kanser hücrelerinin, tedaviye direnç kazandırdığı, immün tanımayı önleyebildiği ve metastatik nişler oluşturabildiği gösterilmiştir (193, 196). Yakın zamanda, SOX2 ekspresyonunun kolorektal karsinomlarda lenf nodu metastazı ve uzak metastaz ile ilişkili olup, kötü prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (20-23). SOX2, kolorektal kanserde olası bir prognostik belirteç olabilir. Bununla birlikte bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

11. CDX2

Kaudal tip homeobox 2 (CDX2) intestinal kanal epiteline spesifik bir transkripsiyon faktörüdür (198). İntestinal kanal epitelinin gelişimini ve farklılaşmasını düzenler (199). İntestinal diferansiasyonun en sensitif ve spesifik belirtecidir (198). Kolorektal kanserde ilerlemeyi ve yayılımı engelleyen bir tümör baskılayıcıdır (200-202). İmmünohistokimyasal olarak CDX2 analizi, primeri bilinmeyen intestinal epitel farklılaşmasını göstermek için kullanılır. KRK'lı hastaların bir kısmında ekspresyon kaybı izlenmektedir ve bu kötü prognostik göstergedir (7, 203-209). Ayrıca, CDX2 ekspresyonunun kaybının, diferansiasyon kaybı, ileri evre hastalık, sağ kolon lokalizasyonu ve MSI ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (6).

12. STAT1

STAT1'in kanser biyolojisinde çok sayıda rol oynadığı bildirilmiştir. STAT1 (sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 1 aktivatörü), IFN ile ilgili hücre içi sinyalleşme için bir ana transkripsiyon faktörüdür. STAT molekülleri, sitoplazmada reseptörle ilişkili kinazlar tarafından fosforile edilir, homo- veya heterodimerizasyona uğrayarak aktive olur ve çekirdeğe giderek translokasyona neden olur. Spesifik olarak STAT1, İnterferon alfa (IFN- α), İnterferon gama (IFN- γ), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Trombositten Türetilen Büyüme Faktörü (PDGF) veya İnterlökin 6 (IL-6) gibi birkaç ligand tarafından aktive edilebilir (210, 211). STAT1, kaspazların siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A'nın ve IFN düzenleyici faktör 1'in upregulasyonu yoluyla veya BCL2 ailesinin down regülasyonu ile anti-onkogenik rol oynayabilir (210-214). STAT1'in KRK başlangıcının erken aşamalarında, apoptoz ve hücre proliferasyonu gibi mekanizmaları kontrol etmenin yanı sıra immün yanıtı modüle ederek bir tümör baskılayıcı molekül olarak rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır (17). Öte yandan, STAT1 pro-onkogenik bir molekül olarak da hareket edebilir. Örneğin, bir laboratuvar çalışmasında STAT1 overekspresyonu, myeloid derive supresör hücrelerin aktivasyonuna yol açarak farelerde agresif tümör gelişimine neden olmuştur (215). Ek olarak,

STAT1 tümör immün sürveyansı üzerinde olumsuz etki gösterebilir. Tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu indükleyerek T hücresi ve NK hücre fonksiyonlarını inhibe edebilir (216-218). Bir çalışmada MSI kolorektal kanserlerde STAT1 ve PD-1/PD-L1 ekspresyonu arasında saptanan pozitif korelasyona dayanarak, STAT1'in MSI kolorektal kanserlerde pro-onkojenik bir rol oynadığı savunulmaktadır (18). STAT1'in kolorektal karsinogenezde rol oynadığı bilinmekle birlikte, prognostik değeri netlik kazanmamıştır.



III. GEREÇ VE YÖNTEM

1. Etik Kurul İzni

2021-062 numaralı projemiz, 09.06.2021 tarihli toplantıda 20.478.486 karar no ile Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

2. Olgular

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde yer alan, 2000-2018 yılları arasında kolon rezeksiyon materyalinde ya da konsültasyon olarak gönderilen rezeksiyon bloklarında tanı almış 603 kolorektal karsinom olgusu ile çalışmaya başlandı. Olguların hematozilen&eozi (HE) boyalı preparatları ve parafin blokları arşivden çıkarıldıktan sonra tüm preparatlar incelendi ve histopatolojik tanı, derece ve tümör evresi yanı sıra histopatolojik prognostik verileri tekrar değerlendirildi.

İncelenen 603 olgudan neoadjuvan tedavi almış ve tedaviye tam yanıt göstermiş 6 olgu, FAP'lı 3 olgu ve 1 mikst adenonöroendokrin karsinom olgusu çalışma dışı bırakıldı ve geriye kalan 593 olgu çalışma grubuna alındı. Konsültasyon olgularından bazılarında rapordaki eksiklikler nedeniyle bir kısım veriye ulaşılamadı ancak bu olgular çalışmadan dışlanmadı.

Her olgu için tüm preparatlar incelendikten sonra lezyonu temsil eden, en çok tümör dokusu içeren preparat ve parafin blok seçildi. Bu bloklardan doku mikroyarray yöntemi kullanılarak çalışma blokları hazırlandı.

3. Doku Mikroarray Yöntemi

Doku mikroarray (DMA) teknolojisi ilk olarak 1998 yılında tanımlanmış olup dünyada birçok araştırmacı tarafından benimsenen ve yüksek örnek sayısına sahip histoloji-patoloji çalışmalarında kullanılan bir teknik olarak yerini almıştır (219). Doku mikroarray tekniği; formalin ile tespit edilmiş ve parafine gömülmüş dokularda; ilgi duyulan lezyonlu bölgelerden alınan örneklerin alıcı bir parafin bloğa aktarılması ve çok sayıda dokunun tek bir kesitte temsil edilmesi olarak tanımlanır (220). Bu sayede, 20-150 arası farklı örneği içeren alıcı blok kesitlerinin değerlendirilmesi ile aynı laboratuvar koşullarında, hızlı, ekonomik ve eş zamanlı patolojik incelemeler yapılabilmektedir (221). Doku mikroarray tekniği, özellikle rutin histopatolojik inceleme sonrasında, doku kesitlerinde DNA, mRNA veya proteinlerin in-situ hibridizasyon ve immunohistokimyasal testlerle işaretlenmesine ihtiyaç duyulduğunda tercih edilmektedir (220, 221). Bunun nedeni, doku kesitlerinde uygulanan moleküler patoloji ve immunopatoloji tekniklerinin test başına olan maliyetlerinin ve laboratuvar işgücü gereksinimlerinin yüksek olmasıdır (222).

Doku mikroarray kullanımında manuel, yarı otomatik ve tam otomatik sistemlerden yararlanılmaktadır. Temel olarak parafin bloklara gömülmüş olan dokulardan, farklı çaptaki iğneler (0,6 mm, 1 mm, 2 mm, 3 mm) ile alınan örneklerin önceden dizayn edilen çukurların oluşturulduğu alıcı bloklara yerleştirilmesi ile çalışma bloğu şekillenmektedir (223, 224). Alınan örnekler, verici parafin bloktan alınan ve tüm dokuyu içeren histolojik kesitlerin HE ile boyanması, mikroskopta incelenmesi ve DMA için kullanılacak ilgili bölgenin işaretlenmesi ile belirlenmektedir (225).

Temelde, DMA yönteminin yapılandırılması için basitçe, 1- Verici parafin doku blokları, 2- Doku punch aleti veya metal spacer aleti ve 3- Alıcı delikler içeren parafin bloklar gereklidir (226-228).

DMA tekniği ile;

1. Tek bir preparat üzerinde bulunan çok sayıda doku örneğinin incelenmesini ve çok sayıda farklı belirteçin DNA ve protein düzeyinde analizini sağlayan multi-tümör incelemeleri,
2. Özellikle tanısal amaçlı veya terapötik hedef olarak potansiyel yararlılığı araştırılan hedef gen için kullanılan ve özellikle beyin, kalp, karaciğer ve kemik iliğı gibi vital organların normal dokularının ele alındığı çalışmalar,
3. Özel bir hastalığın ya da tümörün farklı evrelerini içeren dokuların ele alındığı progresyon çalışmaları,
4. Klinik izlem bilgileri elde edilen tümörlerin örneklerinin birarada değerlendirildiğı, klinik verilerle DMA bulgularının korele edildiğı prognoz çalışmaları,
5. Hücre dizileri veya ksenogreftler için kullanılan, optimal hücre dizisini seçmeye yarayan deneysel (eksperimental) çalışmalar,
6. Frozen dokuların kullanıldığı, RNA ve protein analizinde yararlanılan krio-mikroarray çalışmaları yapılabilir (227-231).

Doku mikroarray bloklarının ve kesitlerinin hazırlanması:

1. Seçilen HE boyalı preperatlar üzerinde mikroskop altında uygun tümör alanı işaretlendi. Aynı alan, preparata ait parafin blok üzerinde de işaretlendi.
2. DMA yöntemine geçiş aşamasında, önce mikroarray yöntemine uygun bloklar elde etmek için gereken özel parafin hazırlandı. Bu parafinin hazırlanmasında rutinde kullanılan normal parafin yanı sıra balmumuna benzer (wax) (Merck® ürün no:1115449020) bir çeşit parafin kullanıldı. Bu iki parafin, karışım oranı wax/parafin=1/10 olacak şekilde karıştırılıp wax'ın erime noktası olan 64°C'de eritildi.
3. DMA bloğunu hazırlamak için DMA aletinin (3DHISTECH Manuel TMA Kit) parçaları biraraya getirilerek uygun düzenek yapılandırıldı. DMA aleti blokta 60 adet (6 satır, 10 sütun) 2 mm çapında çukur yuva oluşturmak için hazırlanan özel bir düzeneğdir. Bu düzenek hazırlandıktan sonra üzerine blok oluşturmak için bu aletle uyumlu çerçeve biçimli özel kaset yerleştirildi.

4. Daha önceden hazırlanan, etüvde saklanan erimiş parafin taşmayacak ölçüyle kaset yerleştirilen alet üzerine döküldü. Oluşturulan blok, DMA aleti ve kasetle birlikte 0°C de 1 dk donması için buzdolabının buzluğunda bekletildi. Parafin donduktan sonra cihaz üzerindeki vidalar sıkıştırılarak bloğun DMA aletinden ayrılması sağlandı. Böylece üzerinde 60 adet boş yuva bulunan bir blok elde edildi.
5. DMA için kullanılacak örneğin alınacağı, tümör alanı işaretlenmiş bloklardan DMA aletinin bir parçası olan ve zımba benzeri bir görev yapan punch kaleminin butonuna basarak 2 mm'lik hedef dokular alındı. Her bir doku DMA blokları üzerindeki çukurlara sırayla gömüldü. Bu işlem sırasında kalemin butonuna basılı olarak DMA bloğuna girip kalemin ucu çukura iyice yerleştikten sonra butondan parmağımızı çekmek suretiyle doku yerleştirildi.
6. Çalışmamızda öncelikle 60 çukurun merkezinde bulunan 6x6'lık bir ekim alanı tercih edildi ve her bir blokta 36 doku olacak şekilde gömme işlemi yapıldı. Bu sırada olguya ait protokol no, dokunun yerleştirildiği koordinatlar belirtilecek şekilde şema ile kaydedildi. Yerleşim oryantasyonunu kaybetmemek için gömmenin başlangıç noktasına fazladan farklı bir doku örneği gömüldü.
7. Daha kolay kesit alabilmek ve dökülme oranını minumuma indirmek için yüzeyini düzlemek amacıyla üzerine lam konan blok, 1 dk etüvde bekletildikten sonra çıkarılıp donmadan lamdan yavaşça ayrıldı. Kesilecek yüzü yukarıda kalacak şekilde (dokuların kayıp seviye farkı oluşturmamasına engel olmak amacıyla) donması için birkaç saat buzlukta bekletildi.
8. Olası hataları engellemek için bloktan keserken ve sudan preparat üzerine alırken işarete denk düşen başlangıç alanının sağ üst köşeye denk gelmesine özen gösterildi.
9. Her bir preparattan HE boyamak üzere 1 kesit ve lizinli lama 15 kesit alındı.

4. Klinik ve İzlem Bilgileri

Hastalara ait klinik özellikler, hastalığın klinik evresi, klinik gidişi (tanı aldığı andan itibaren yaşam süresi, son durumu vb.), tedavisi (kemoterapi kaç kür, ne süreyle aldığı, radyoterapi alıp almadığı), nüks olup olmadığı gibi klinik veriler çalışmanın klinisyen araştırmacısı tarafından öğrenildi ve prognostik analizler için kaydedildi. Çalışmaya dahil edilen 593 olgudan 243'ünde söz konusu klinik izlem verilerine ulaşılamazken kalan 353 olguda bu bilgiler elde edilebildi ve prognostik değerlendirmeler sadece bu grupta yapılabildi.

5. Histopatolojik Değerlendirme

Kolon rezeksiyon materyallerine ait tüm H&E boyalı kesitler histopatolojik tanı, histolojik derece, lenfovasküler invazyon, venöz invazyon, perinöral invazyon, tümör tomurcuklanması, az diferansiye kümeler, intratümöral ve peritümöral lenfositik yanıt, crohn benzeri yangısal yanıt, fokal müsinöz diferansiasyon, invazyon seviyesi, T3 tümörler için invazyon seviyesinin visseral peritona uzaklığı, neoadjuvan tümör yanıtı, tümör depoziti, lenf nodu metastazı, TNM evresi, proksimal, distal ve radyal cerrahi sınırların durumu, mezokolik ve mezorektal eksizyon seviyesi ve tümör perforasyonu açısından yeniden incelendi.

Histopatolojik tanı ve histolojik derece DSÖ (2019), tümör evresi AJCC (8. Baskı, 2017) kanser evreleme kılavuzu ve CAP (2021) kılavuzuna göre değerlendirildi.

Histolojik derece: Histolojik derecelendirme derece 1 (iyi diferansiye) ve derece 2 (az diferansiye) olarak yapıldı.

Tümör tomurcuklanması: Mikroskopun x20'lik büyütmesinde tümörün en derin 10 invazyon alanı tarandı, seçilen hotspot odakta H&E kesitlerde sayım yapıldı ve 3 kategoride derecelendirildi: düşük (0-4 tomurcuk), orta (5-9 tomurcuk) ve yüksek (10 veya daha fazla tomurcuk).

Az diferansiye kümeler: Mikroskop altında x4'lük büyütme alanında kesitler incelendikten sonra en yüksek az diferansiye küme odağı saptandı ve x20'lik büyütmede sırasıyla <5, 5-9, ≥ 10 PDC'ye sahip KRK'lar belirlendi.

İntratümöral lenfosit sayısı: 10 BBA tarandı ve lenfositlerin ortalaması alındı. Düşük seviyede (<50/BBA) ve yüksek seviyede (>50/BBA) olmak üzere 2 kategoride incelendi.

Peritümöral lenfosit sayısı: 10 BBA tarandı ve lenfositlerin ortalaması alındı. Düşük seviyede (<200/BBA) ve yüksek seviyede (>200/BBA) olmak üzere 2 kategoride incelendi.

Crohn benzeri yangısal yanıtın değerlendirilmesi: Tümörün barsak duvarını invaze ettiği en derin alana ait tüm örneklerin kesitleri incelendi, lenfoid folliküller var ya da yok şeklinde değerlendirildi. Mukoza yerleşimli olan lenfoid folliküller, lenf nodu görünümünde olanlar, düzensiz şekilli agregat formunda olanlar değerlendirme dışı bırakıldı.

İnvazyon seviyesinin peritona uzaklığı: pT3 tümörlerde ölçüm, periton yüzeyinden, en derin invazyon seviyesine kadar yapıldı.

Mezokolik/mezorektal eksizyon seviyesi, tümör perforasyon durumu, tümör yerleşimi ve tümör boyutu: Makroskopi raporundaki değerlendirme esas alındı.

Cerrahi sınırlar: Makroskopi raporu yanı sıra mikroskobik ölçümler de yapıldı.

Neoadjuvan tedavi yanıtı: Skor 0: Tam yanıt (canlı tümör hücresi yok), Skor 1: Tama yakın yanıt (izole tümör hücreleri ve/veya az sayıda canlı tümör hücre grupları), Skor 2: Kısmi yanıt (regresyon bulguları gösteren canlı tümör hücre grupları), Skor 3: Zayıf yanıt / Yanıt yok (regresyon bulgularının izlenmediği yaygın karsinom) şeklinde 4 kategoride değerlendirildi.

6. İmmunohistokimyasal İnceleme

DMA bloklarından elde edilen 3,5 mikron kalınlığındaki kesitler pozitif yüklü elektrostatik lamlara (Isotherm Technical Laboratory Glass Materials) alındı ve 58°C'lik etüvde 4 saat tutuldu ve ardından barkodları basılarak çalışmaya hazır hale getirildi. Elde edilen tüm kesitler tam otomatik immünohistokimyasal boyama cihazına (BenchMark Ultra automated IHC/ISH slide staining system, Ventana Medical Systems; BenchMark XT automated IHC/ISH slide staining system, Ventana Medical Systems) yerleştirildi. İmmünohistokimyasal boyamalar için cihaz ile uyumlu Ultraview Universal DAB Detection Kit (CDX2, SOX2, STAT1 için), Optiview Universal DAB Detection Kit (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, BRAF V600E için) ve EZ prep, LCS, SSC, Cell Condition 1 (CC1), Reaction Buffer Concentrate solüsyonları ile Hematoksilen ve Blue Reagent kullanıldı.

İmmünohistokimyasal boyama için konsantre veya predilue monoklonal, rabbit, anti-human MLH1 (Klon M1, Ventana), konsantre veya predilue monoklonal, rabbit, anti-human MSH2 (Klon G219-1129, Ventana), konsantre veya predilue monoklonal, rabbit, anti-human MSH6 (Klon SP93, Ventana), konsantre veya predilue monoklonal, rabbit, anti-human PMS2 (Klon A16-4, Ventana), konsantre veya predilue SOX2 (Klon EP103, Cell Marque), monoklonal, rabbit, anti-human, konsantre veya predilue CDX2 (Klon EPR2764Y, Cell Marque), monoklonal, rabbit, anti-human, konsantre veya predilue BRAF V600E (Klon VE1, Abcam) ve monoklonal, rekombinant, konsantre veya predilue STAT1 (Klon EPR21057-141, Abcam) antikorları kullanıldı. Cihazda boyama işlemi tamamlandıktan sonra lamalar ılık deterjanlı su ile yıkanıp alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve EntellanR (Merck and Co., Berlin) ile kapatıldı.

7. İmmunohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi

Tüm değerlendirmeler standart ışık mikroskopunda, iki çalışmacı (Ö.D. ve S.A.) tarafından yapıldı. MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 için kontrol olarak

normal kolon dokusu, SOX2 için testis germ hücreli tümörü, CDX2 için normal kolon mukozası, BRAF V600E için tiroid papiller karsinomu ve STAT1 için tonsil dokusu kullanıldı.

MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 antikorumları: Tümör hücrelerinde DNA onarım gen proteinlerinin retansiyonunu ya da kaybını değerlendirmek için %10 cut-off değeri kullanıldı. MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 antikorumlarının hepsi ile %10'nun üzerinde tümör hücresinde nükleer ekspresyon saptanması MSS olarak değerlendirildi. Tümör hücrelerinde MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 antikorumlarından en az biri ile nükleer ekspresyon kaybı saptanması durumunda MSI olarak değerlendirildi. Normal kolon mukozası, inflamatuvar hücreler ve stromal hücreler pozitif internal kontrol olarak kabul edildi.

CDX2 antikoru: Tümör hücrelerinde değerlendirmek için %10 cut-off değeri kullanıldı. Hiç nükleer boyanma olmaması durumunda negatif, %10'un altında tümör hücresinde nükleer boyanma zayıf pozitif, %10'un üzerinde tümör hücresinde nükleer boyanma ise güçlü pozitif olarak değerlendirildi.

SOX2 antikoru: Tümör hücrelerinde değerlendirmek için %10 cut-off değeri kullanıldı. Hiç nükleer boyanma olmaması durumunda negatif, tümör hücrelerinde %10'u aşan herhangi bir oranda nükleer boyanma olması durumunda pozitif olarak değerlendirildi.

BRAF V600E antikoru: Sitoplazmik boyanmalar esas alındı. Tümör hücrelerinde reaksiyon saptanmaması: 0, zayıf derecede sitoplazmik reaksiyon: 1, orta derecede sitoplazmik reaksiyon: 2, kuvvetli derecede sitoplazmik reaksiyon: 3 olarak skorlandı.

STAT1 antikoru: Nükleer ve sitoplazmik boyanma ayrı ayrı değerlendirildi. Nükleer ekspresyon var ya da yok şeklinde skorlandı. Sitoplazmik ekspresyon ise boyanma yoğunluğuna göre 4 kategoride skorlandı:

-Hiç sitoplazmik boyanma olmaması: Negatif, -Hafif boyanma: +1, -Orta derecede boyanma: +2, -Güçlü boyanma: +3

STAT1 değerlendirmesinde standart kurallar olmadığı için farklı varyasyonlarda STAT1'i analizleri yapılmıştır:

- **STAT1 Nükleer:** Nükleer boyanma varlığı ya da yokluğu
- **STAT1-Sitoplazmik 1 (STAT1 – St1):** Negatif / +1 / +2 ve +3 olarak değerlendirildi.
- **STAT1- Sitoplazmik 2 (STAT1 – St2):** Negatif ve +1 / +2 ve +3 olarak değerlendirildi.
- **STAT1-Sitoplazmik 3 (STAT1 – St3):** Negatif, +1 ve +2 / +3 olarak değerlendirildi.
- **STAT1 (+/-):** STAT1'de nükleer ya da sitoplazmik farketmeksizin herhangi bir boyanma olması pozitif, hiçbir boyanma olmaması negatif olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Değerlendirme:

Çalışma sonucunda elde edilen tüm veriler kişisel bilgisayarda SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 26. sürümü ile incelendi. Sağkalım analizleri için Kaplan-Meyer yöntemi, sağ kalım eğrilerinin istatistiksel karşılaştırması için log-rank testi kullanıldı. Sağkalım dışındaki parametrelerin korelasyonunun araştırılmasında Pearson ki-kare ve Fisher'ın Exact testleri kullanıldı. Tüm değerlendirmelerde istatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edildi. p değeri 0,05 ile 0,10 arasında ise sınırda anlamlılık olarak değerlendirildi.

IV. BULGULAR

1. Olguların Klinik, Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Bulguları

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde yer alan, 2000-2018 yılları arasında kolon rezeksiyon materyalinde ya da konsültasyon olarak gönderilen rezeksiyon bloklarında tanı almış 603 kolorektal karsinom olgusu ile çalışmaya başlandı. Bu olgular içinde yeterli dökümantasyonu sağlanamayan olgular dışlandıktan sonra 353'ü hastanemizde onkoloji kliniğinde takipli olmak üzere toplam 593 olgunun verileri değerlendirildi. Tüm olgularda MMR proteinlerinin ekspresyonu immünohistokimyasal olarak incelendi ve ardından BRAFV600E, SOX2, STAT1 ve CDX2 immünohistokimyasal boyaları uygulandı. Prognostik çalışmalar ise izlem verileri elde edilen 353 olguda yapıldı.

Olguların yaş aralığı 16 ile 88 arasında değişmekte olup, ortalama yaş 62,65, ortanca yaş 63'tü. Tümörlerin boyutu <1 mm ile 140 mm arasındaydı ve ortalama 46,89 mm idi.

Olgularda yaklaşık 1,5 kat erkek baskınlığı bulunmaktaydı. Tümörlerin büyük kısmı sol kolon lokalizasyonlu olup sıklıkla rektum ve sigmoid yerleşimli idi.

Çalışmaya dahil edilen olguların klinikopatolojik özellikleri tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5: Olguların klinikopatolojik özellikleri

Klinikopatolojik özellikler	En düşük – en yüksek (Ort. ± SD)
Yaş	16-88 (62,65±12,252)
Tümör boyutu (mm)	<1-140 (46,89 ± 20,423)
Cinsiyet	n (%)
Kadın	241 (40,6)
Erkek	352 (59,4)
Tümör lokalizasyonu	n (%)
Sağ kolon	167 (28,2)
İleoçekal valv	1 (0,2)
Çekum	60 (10,1)
Çıkan kolon	74 (12,5)
Hepatik fleksura	7 (1,2)
Transvers kolon	26 (4,4)
Sol kolon	405 (68,3)
Splenik fleksura	7 (1,2)
İnen kolon	61 (10,3)
Sigmoid kolon	149 (25,1)
Rektosigmoid	2 (0,3)
Rektum	176 (29,7)
Anal kanal	7 (1,2)

Olguların yaklaşık 5’te birinde makroskopi piyesinde tümör dışında adenomatöz polip, %6,9’unda tümöre bağlı perforasyon izlendi. Olguların çoğunluğu 5 cm’den küçüktü. Distal ya da proksimal cerrahi sınır pozitifliği gösteren olgular %1,9, radyal cerrahi sınır pozitifliği ise %17,5 oranında görüldü.

Olgulara ait makroskopik özellikler tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6: Olguların makroskopik özellikleri

Makroskopik özellikler	Var	Yok
	n (%)	n (%)
Adenomatöz polip	114 (19,2)	479 (80,8)
Tümör perforasyonu	41 (6,9)	551 (93,1)
Tümör boyutu	< 50 mm	≥50 mm
	314 (56,3)	244 (43,7)
Cerrahi sınırlar	Pozitif	Negatif
Proksimal-Distal CS	11 (1,9)	581 (98,1)
Radyal CS	33 (17,5)	156 (82,5)

Olguların çoğunluğu adenokarsinom, NOS morfolojisindeydi. Histolojik subtiplerden medüller karsinom morfolojisinde tümör saptanmadı. Nöroendokrin karsinom ve mikst nöroendokrin-nöroendokrin dışı neoplazi (MİNEN) olguları çalışma dışı bırakıldı. Olguların büyük kısmı iyi diferansiye tümörler olup yalnızca adenokarsinom, NOS ve müsinöz adenokarsinomlar derecelendirildi. Diğer histopatolojik parametreler arasında fokal müsinöz diferansiasyon, lenfovasküler, venöz ve perinöral invazyon, tümör depoziti, tümöre karşı immün yanıt (peritümöral ve intratümöral lenfositik yanıt ve crohn benzeri yangısal yanıt), tümör tomurcuklanması ve az diferansiye kümeler değerlendirildi.

Olgulara ait bu histopatolojik özellikler tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7: Olguların histopatolojik özellikleri

Histopatolojik tip	n (%)		
Adenokarsinom, NOS	522 (88)		
Müsinöz	35 (5,9)		
Adenom benzeri	17 (2,9)		
Serrated	12 (2)		
Mikropapiller	2 (0,3)		
Taşlı yüzük hücreli	5 (0,8)		
Histolojik derece	n (%)		
İyi diferansiye	492 (83)		
Az diferansiye	66 (11,1)		
Diğer özellikler	Var	Yok	
	n (%)	n (%)	
Fokal müsinöz dif.	124 (20,9)	434 (73,2)	
Lenfovasküler invazyon	412 (69,5)	181 (30,5)	
Venöz invazyon	62 (10,5)	531 (89,5)	
Perinöral invazyon	217 (36,6)	376 (63,4)	
Tümör depoziti	54 (9,1)	536 (90,4)	
Lenf nodu metastazı	240 (40,5)	351 (59,2)	
Crohn benzeri yanıt	375 (63,2)	218 (36,8)	
Diğer özellikler	Yok	Düşük	Yüksek
	n (%)	n (%)	n (%)
İntratümöral lenfositik yanıt	109 (18,4)	398 (67,1)	86 (14,5)
Peritümöral lenfositik yanıt	3 (0,5)	258 (43,5)	332 (56)
Tümör tomurcuklanması	147 (24,8)	168 (28,3)	278 (46,9)
Az diferansiye kümeler	155 (26,1)	180 (30,4)	258 (43,5)

Olguların büyük kısmı T3 evresinde bulunmaktaydı. Yaklaşık yarısında lenf nodu metastazı saptanmadı. Klinik bilgisine ulaşılan olguların (353 olgu) ise çoğunda uzak metastaz yoktu ve büyük kısmı tanı anında evre 2 ya da evre 3 hastalık evresindeydiler.

Olgulara ait TNM ve klinik evre detaylı olarak tablo 8’de incelenmiştir.

Tablo 8: Olguların TNM ve klinik evreleri

T evresi	n (%)
T1	15 (2,5)
T2	44 (7,4)
T3	329 (55,5)
T4a	177 (29,8)
T4b	28 (4,7)
N evresi	n (%)
N0	271 (45,7)
N1a	77 (13)
N1b	80 (13,5)
N1c	21 (3,5)
N2a	83 (14)
N2b	59 (9,9)
M evresi	n (%)
Uzak metastaz var	58 (16,4)
Uzak metastaz yok	295 (83,6)
Klinik evre	n (%)
Evre 1	13 (3,7)
Evre 2	140 (39,7)
Evre 3	142 (40,2)
Evre 4	58 (16,4)

Olguların immünohistokimyasal belirteçle boyanma oranları tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9: Olguların immunohistokimyasal boyanma oranları

	Skor	n (%)
CDX2	Zayıf	43 (7,3)
	Güçlü	541 (91,2)
	Negatif	9 (1,5)
BRAF	Negatif	544 (91,7)
	Artı 1	23 (3,9)
	Artı 2	19 (3,2)
	Artı 3	7 (1,2)
SOX2	Negatif	561 (94,6)
	Pozitif	32 (5,4)
STAT1 (Nükleer)	Negatif	370 (62,4)
	Pozitif	222 (37,4)
STAT1 (Sitoplazmik-1)	Negatif	350 (59)
	+1	160 (27)
	+2, +3	82 (13,8)
STAT1 (Sitoplazmik-2)	Negatif ve +1	511 (86,2)
	+2, +3	82 (13,8)
STAT1 (Sitoplazmik-3)	Negatif	350 (59)
	+1, +2, +3	243 (41)
STAT1 (+/-)	Negatif	323 (54,5)
	Pozitif	269 (45,4)

2. MSI ve MSS Olguların Klinikopatolojik ve Histopatolojik Özellikleri

593 olgunun 113'ü (%19,1) MSI gösterirken, 480'i (%80,9) MSS olarak belirlendi. En sık (%60) MLH1 ve PMS2 ekspresyon kaybı saptandı. %10,6 oranında MSH2 ve MSH6 kaybı, %7,7 oranında izole PMS2 kaybı ve %3,6 oranında izole MSH6 kaybı izlendi. %18,1 oranında olgu ise beklenmeyen, sıradışı ekspresyon kaybı göstermekteydi.

Olguların mikrosatellit instabilite durumu ve ekspresyon kaybı patern dağılımları tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10: MSI ve MSS grubun oranı ve MSI olguların ekspresyon paterni

Mikrosatellit instabilite durumu	n (%)
MSS (Mikrosatellit stabil)	480 (80,9)
MSI (Mikrosatellit instabil)	113 (19,1)

MSI tümörlerde ekspresyon kaybı paternleri	
Klasik formlar	n (%)
MLH1(-) ve PMS2(-)	68 (60)
MSH2(-) ve MSH6(-)	12 (10,6)
PMS2(-)	9 (7,7)
MSH6(-)	4 (3,6)
Sıradışı formlar	n (%)
4'lü (-)	8 (7,2)
MLH1(-)	5 (4,6)
MSH2(-)	2 (1,8)
MLH1(-), PMS2(-) ve MSH2(-)	2 (1,8)
PMS2(-) ve MSH2(-)	1 (0,9)
MLH1(-), PMS2(-) ve MSH6(-)	1 (0,9)
MSH2(-), MSH6(-) ve PMS2(-)	1 (0,9)

MSS ve MSI olguların yaşları ve cinsiyet dağılımları arasında anlamlı fark yoktu. MSI tümörler anlamlı olarak MSS tümörlerden boyut olarak daha büyüktü ve MSS tümörlerin aksine çoğu sağ kolon yerleşimli olup bu yerleşim farkı anlamlı saptandı.

Her iki olgu grubunun klinikopatolojik özelliklerinin karşılaştırması tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11: MSS ve MSI grupların klinikopatolojik özellikleri

		MSS	MSI	p
Yaş		Ort. 62,98, $\pm$ SD 11,872	Ort. 61,25, $\pm$ SD 13,728	0,183
Tümör boyutu		Ort. 44,33, $\pm$ SD 18,336	Ort. 57,32 $\pm$ SD 25,363	<0,001
		n (%)	n (%)	
Cinsiyet	Kadın	193 (39,8)	48 (40,5)	0,659
	Erkek	287 (59,8)	65 (57,5)	
Yerleşim	Sağ	110 (23,7)	57 (52,8)	<0,001
	Sol	354 (76,3)	51 (47,2)	

Eşlik eden adenomatöz polip varlığı, tümör perforasyonu, proksimal/distal cerrahi sınırlar ve radyal cerrahi sınır pozitifliği açısından MSI ve MSS

tümörler arasında anlamlı fark yoktu. Tümör boyutu 50 mm kesme değeri alındığında, MSI tümörler anlamlı olarak daha büyük saptandı.

Olgulara ait karşılaştırmalı makroskopik özellikler tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12: MSS ve MSI grupların makroskopik özellikleri

Makroskopik özellikler		MSS n (%)	MSI n (%)	p
Adenomatöz polip	Var	94 (19,6)	20 (17,7)	0,647
	Yok	386 (80,4)	93 (82,3)	
Tümör perforasyonu	Var	33 (6,9)	8 (7,1)	0,943
	Yok	446 (93,1)	105 (92,9)	
Tümör boyutu	< 50 mm	274 (60,4)	40 (38,5)	<0,001
	≥50 mm	180 (39,6)	64 (61,5)	
Proksimal/Distal CS	Pozitif	9 (1,9)	2 (1,8)	1,000
	Negatif	470 (98,1)	111 (98,2)	
Radyal CS	Pozitif	29 (16,6)	4 (28,6)	0,273
	Negatif	146 (83,4)	10 (71,4)	

Her iki grubun çoğunluğunu adenokarsinom, NOS morfolojisindeki tümörler oluşturmaktaydı. Müsinöz adenokarsinom oranı MSI grupta belirgin fazlaydı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı.

Müsinöz morfolojinin, KRK’larda tümördeki oranı ne olursa olsun kendine özgü prognostik özellikler taşıdığını bildiren yayınlar mevcuttur. Bu nedenle olgularımız müsinöz ve non-müsinöz olarak da ayrılarak incelenmiştir. Müsinöz morfolojinin MSI durumu, immün belirteçlerle ilişkisi ve prognostik değeri de araştırılmıştır. MSI grupta adenom benzeri adenokarsinom ve taşlı yüzük hücreli karsinom morfolojisinde tümör izlenmemiştir.

Olgulara ait histopatolojik tiplerin detaylı incelemesi tablo 13’te gösterilmiştir.

Tablo 13: MSS ve MSI grupların histopatolojik subtipleri

Histopatolojik subtip	MSS n (%)	MSI n (%)	p
Adenokarsinom, NOS	424 (88,3)	98 (86,7)	0,011
Müsinöz adenokarsinom	22 (4,6)	13 (11,5)	
Adenom benzeri adenokarsinom	17 (3,5)	0 (0)	
Serrated adenokarsinom	11 (2,3)	1 (0,9)	
Mikropapiller karsinom	1 (0,2)	1 (0,9)	
Taşlı yüzük hücreli karsinom	5 (1)	0 (0)	
Histopatolojik tip	MSS n (%)	MSI n (%)	p
Müsinöz adenokarsinom	22 (4,6)	13 (11,5)	0,005
Non-müsinöz karsinom	458 (95,4)	100 (88,5)	

Her iki grup, tümörlerin histopatolojik özelliklerine göre ayrıntılı olarak incelendi. MSI tümörler, MSS tümörlere göre anlamlı olarak daha az diferansiye saptandı. Müsin varlığının prognoz üzerindeki etkisini değerlendirmek için müsinöz adenokarsinom kriterini karşılamayan fakat ekstrasellüler müsin komponenti olan olgular da fokal müsinöz diferansiasyon gösteren olgular olarak sınıflandırıldı. Fokal müsinöz diferansiasyon varlığında MSI olgularda lenfovasküler invazyon oranı daha düşüktü ve bu istatistiksel anlamlılık gösterdi ($p=0,010$). Müsinöz ve non-müsinöz tümörlere baktığımızda da her iki grupta müsinöz diferansiasyon varlığı ile lenfovasküler invazyon oranı düşüş göstermekteydi, ancak hiçbirisinde sonuç anlamlı değildi (MSI, MSS; sırasıyla $p=0,208$, $p=0,535$). Perinöral invazyon, MSS tümörlerde anlamlı olarak daha sık izlendi. Lenf nodu metastazı MSI olgularda daha az sıklıkla izlenmekle birlikte sınırda anlamlı sonuç elde edildi. Diğer histopatolojik parametreler ile iki grup arasında anlamlı fark görülmedi.

Histopatolojik özelliklerin karşılaştırılması ayrıntılı olarak tablo 14'te gösterilmiştir.

Tablo 14: MSS ve MSI olguların mikroskopik özellikleri

Histopatolojik özellikler		MSS n (%)	MSI n (%)	p
Histolojik derece	İyi	411 (91,9)	81 (73)	<0,001
	Az	36 (8,1)	30 (27)	
Fokal müsinöz diferansi.	Var	97 (21,2)	27 (27)	0,205
	Yok	361 (78,8)	73 (73)	
LVİ	Var	334 (69,6)	78 (69)	0,908
	Yok	146 (30,4)	35 (31)	
Venöz invazyon	Var	55 (11,5)	7 (6,2)	0,1
	Yok	425 (88,5)	106 (93,8)	
PNİ	Var	185 (38,5)	32 (28,3)	0,042
	Yok	295 (61,5)	81 (71,7)	
Tümör depoziti	Var	46 (9,6)	8 (7,1)	0,395
	Yok	431 (90,4)	105 (92,9)	
LN metastazı	Var	202 (42,3)	38 (33,6)	0,093
	Yok	276 (57,7)	75 (66,4)	
Crohn benzeri yanıt	Var	298 (62,1)	77 (68,1)	0,229
	Yok	182 (37,9)	36 (31,9)	
İntratümöral lenfositik yanıt	Yok	88 (18,3)	21 (18,6)	0,370
	Düşük	327 (68,1)	71 (62,8)	
	Yüksek	65 (13,5)	21 (18,6)	
Peritümöral lenfositik yanıt	Yok	2 (0,4)	1 (0,9)	0,369
	Düşük	215 (44,8)	43 (38,1)	
	Yüksek	263 (54,8)	69 (61,1)	
Tümör tomurcuklanması	Düşük	120 (25)	27 (23,9)	0,959
	Orta	135 (28,1)	33 (29,2)	
	Yüksek	225 (46,9)	53 (46,9)	
Az diferansiye kümeler	Düşük	128 (26,7)	27 (23,9)	0,468
	Orta	149 (31)	31 (27,4)	
	Yüksek	203 (42,3)	55 (48,7)	

LVİ: Lenfovasküler invazyon, PNİ: Perinöral invazyon, LN: Lenf nodu

MSS tümörler anlamlı olarak daha erken invazyon seviyelerinde (T1, T2) saptandı. İki grup arasında N evresi açısından anlamlı fark bulunmamaktaydı.

Grupların karşılaştırmalı T ve N evreleri tablo 15'te ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Tablo 15: MSS ve MSI olguların invazyon derinlikleri ve lenf nodu evreleri

	MSS n (%)	MSI n (%)	p
İnvazyon seviyesi (T evresi)			
T1	13 (2,7)	2 (1,8)	0,005
T2	42 (8,8)	2 (1,8)	
T3	257 (53,5)	72 (63,7)	
T4a	150 (31,3)	27 (23,9)	
T4b	18 (3,8)	10 (8,8)	
N evresi			
N0	212 (44,4)	59 (52,2)	0,616
N1a	64 (13,4)	13 (11,5)	
N1b	64 (13,4)	16 (14,2)	
N1c	17 (3,6)	4 (3,5)	
N2a	72 (15,1)	11 (9,7)	
N2b	49 (10,3)	10 (8,8)	

MSS ve MSI olgular temel histopatolojik prognostik parametre olan invazyon derinliği ve lenf nodu metastazı kriter alınarak diğer histopatolojik bulgular açısından karşılaştırıldı.

İnvazyon seviyesi ile tümör diferansiasyonu arasında genel grupta, MSI ve MSS gruplarda anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0,751$, $p=0,292$, $p=0,751$).

İnvazyon seviyesi ve tümör tomurcuklanması arasında, genel grupta ve MSS olgularda anlamlı, MSI olgularda sınırda anlamlı ilişki saptandı. Daha yüksek tümör tomucuklanma oranına sahip tümörler derin invazyon seviyelerine ulaşmaktaydı.

Genel grupta ve MSS olgularda derin invazyon seviyelerinde az diferansiye kümeler anlamlı olarak daha yüksek oranda saptanırken, MSI tümörlerde anlamlı bir ilişki saptanmadı.

İnvazyon seviyesi ve lenf nodu metastazı oranına bakıldığında, tüm gruplarda daha derin invazyon seviyelerinde lenf nodu metastaz oranı artış gösterdi. Genel grupta ve MSS olgularda bu fark anlamlı iken, MSI olgularda anlamlı değildi.

İnvazyon derinliği ile tümör tomurcuklanması, az diferansiye kümeler ve lenf nodu metastazı tablo 16'da detaylı olarak incelenmiştir.

Tablo 16: İnvazyon derinliği ile TT, PDC ve LN metastaz ilişkisi

Grup	İnvazyon derinliği	Tümör tomurcuklanması			p
		Düşük n (%)	Orta n (%)	Yüksek n (%)	
MSS	Erken evre	24 (43,6)	20 (36,4)	11 (20)	<0,001
	İleri evre	96 (22,6)	115 (27,1)	214 (50,4)	
MSI	Erken evre	0 (0)	2 (50)	2 (50)	0,085
	İleri evre	26 (23,9)	30 (27,5)	53 (48,6)	
Genel	Erken evre	25 (42,4)	23 (39)	11 (18,6)	<0,001
	İleri evre	122 (22,8)	145 (27,2)	267 (50)	
		Az diferansiye küme			p
		Düşük n (%)	Orta n (%)	Yüksek n (%)	
MSS	Erken evre	25 (45,5)	19 (34,5)	11 (20)	<0,001
	İleri evre	103 (24,2)	130 (30,6)	192 (45,2)	
MSI	Erken evre	0 (0)	2 (50)	2 (50)	0,414
	İleri evre	27 (24,8)	29 (26,6)	53 (48,6)	
Genel	Erken evre	25 (42,4)	21 (35,6)	13 (22)	0,001
	İleri evre	130 (24,3)	159 (29,8)	245 (45,9)	
		LN metastazı			p
		Yok n (%)		Var n (%)	
MSS	Erken evre	44 (81,5)		10 (18,5)	<0,001
	İleri evre	232 (54,7)		192 (45,3)	
MSI	Erken evre	3 (75)		1 (25)	0,710
	İleri evre	72 (68,1)		37 (33,9)	
Genel	Erken evre	47 (81)		11 (19)	<0,001
	İleri evre	304 (57)		229 (43)	

Erken evre: Tis, T1, T2, İleri evre: T3, T4A, T4B

Diferansiasyon azaldığında her üç grupta anlamlı olarak daha yüksek lenf nodu metastaz oranları izlendi.

Lenf nodu metastazı ve az diferansiye kümeler karşılaştırıldığında tüm gruplarda anlamlı ilişki saptandı ve üç grupta da az diferansiye küme sayısının artışıyla artmış lenf nodu metastazı izlendi.

Tümör tomurcuklanması da tüm gruplarda lenf nodu metastazı ile anlamlı ilişkili bulundu. Yüksek tomurcuklanma seviyelerinde lenf nodu metastaz oranı da yüksek olarak izlendi.

Lenfovasküler invazyon varlığı tüm gruplarda anlamlı olarak lenf nodu metastazı ile ilişkili bulundu. Venöz invazyon varlığında genel grupta ve MSS olgularda lenf nodu metastaz oranları anlamlı olarak artarken, MSI grupta anlamlı olmasa da daha az lenf nodu metastazı bulunmaktaydı.

Peritümöral lenfosit yanıt artışı ile lenf nodu metastaz oranları tüm gruplarda ters orantılı olmasına karşın yalnızca genel grupta sınırda anlamlı sonuç elde edildi. Lenf nodu metastazı ile intratümöral lenfositik yanıt ve Crohn benzeri yanıt arasında üç grupta da anlamlı ilişki saptanmadı.

Non-müsinöz ve müsinöz tümörleri ayırdığımızda müsinöz tümörlerde lenf nodu metastazı oranı her üç grupta yükselmekle birlikte, yalnızca MSS grupta anlamlı, genel grupta sınırda anlamlı ilişki bulunmaktaydı. Her üç grupta da fokal müsinöz diferansiasyon varlığında lenf nodu metastazı oranı artmakla birlikte anlamlı değildi.

Lenf nodu metastazı ile histopatolojik özelliklerin ilişkisi tablo 17’de gösterilmiştir.

Tablo 17: LN metastazı ile histopatolojik özelliklerin ilişkisi

Histopatolojik özellik	Grup	Skor	LN metastazı		p
			Yok n (%)	Var n (%)	
Histolojik diferansiasyon	MSS	İyi	244 (59,5)	166 (40,5)	0,006
		Az	13 (36,1)	23 (63,9)	
	MSI	İyi	59 (72,8)	22 (27,2)	0,051
		Az	16 (53,3)	14 (46,7)	
	Genel	İyi	303 (61,7)	188 (38,3)	0,006
		Az	29 (43,9)	37 (56,1)	
Az diferansiye kümeler	MSS	Düşük	86 (68,3)	40 (31,7)	<0,001
		Orta	97 (65,1)	52 (34,9)	
		Yüksek	93 (45,8)	110 (54,2)	
	MSI	Düşük	24 (88,9)	3 (11,1)	0,013
		Orta	20 (64,5)	11 (35,5)	
		Yüksek	31 (56,4)	24 (43,6)	
	Genel	Düşük	110 (71,9)	43 (28,1)	<0,001
		Orta	117 (65)	63 (35)	
		Yüksek	124 (48,1)	134 (51,9)	
Tümör tomurcuklanması	MSS	Düşük	89 (74,8)	30 (25,2)	<0,001
		Orta	79 (58,5)	56 (41,5)	
		Yüksek	108 (48,2)	116 (51,8)	
	MSI	Düşük	19 (70,4)	8 (29,6)	0,031
		Orta	27 (81,8)	6 (18,2)	
		Yüksek	29 (54,7)	24 (45,3)	
	Genel	Düşük	108 (74)	38 (26)	<0,001
		Orta	106 (63,1)	62 (36,9)	
		Yüksek	137 (49,5)	140 (50,5)	
Lvi	MSS	Var	173 (52)	160 (48)	<0,001
		Yok	103 (71)	42 (29)	
	MSI	Var	46 (59)	32 (41)	0,013
		Yok	29 (82,9)	6 (17,1)	
	Genel	Var	219 (53,3)	192 (46,7)	<0,001
		Yok	132 (73,3)	48 (26,7)	
Venöz invazyon	MSS	Var	22 (40,7)	32 (59,3)	0,007
		Yok	254 (59,9)	170 (40,1)	
	MSI	Var	6 (85,7)	1 (14,3)	0,263
		Yok	69 (65,1)	37 (34,9)	

	Genel	Var	28 (45,9)	33 (54,1)	0,023
		Yok	323 (60,9)	207 (39,1)	
Peritümöral lenfositik yanıt	MSS	Yok	0 (0)	2 (100)	0,162
		Düşük	119 (55,6)	95 (44,4)	
		Yüksek	157 (59,9)	105 (40,1)	
	MSI	Yok	0 (0)	1 (100)	0,350
		Düşük	28 (65,1)	15 (34,9)	
		Yüksek	47 (68,1)	22 (31,9)	
	Genel	Yok	0 (0)	3 (100)	0,061
		Düşük	147 (57,2)	110 (42,8)	
		Yüksek	204 (61,6)	127 (38,4)	
Morfoloji	MSS	Non-müsinöz	268 (58,8)	188 (41,2)	0,038
		Müsinöz	8 (36,4)	14 (63,6)	
	MSI	Non-müsinöz	67 (67)	33 (33)	0,759
		Müsinöz	8 (61,5)	5 (38,5)	
	Genel	Non-müsinöz	335 (60,3)	221 (39,7)	0,089
		Müsinöz	16 (45,7)	19 (54,3)	
Fokal müsinöz dif.	MSS	Var	51 (53,1)	45 (46,9)	0,206
		Yok	217 (60,3)	143 (39,7)	
	MSI	Var	18 (66,7)	9 (33,3)	0,966
		Yok	49 (67,1)	24 (32,9)	
	Genel	Var	69 (56,1)	54 (43,9)	0,286
		Yok	266 (61,4)	167 (38,6)	

3. MSI ve MSS Olguların İmmunohistokimyasal Özellikleri

MSS tümörler ile MSI tümörler, uygulanan dört İHK'sal belirteç açısından karşılaştırıldı. MSS tümörler, MSI tümörlere kıyasla CDX2 ile anlamlı olarak daha fazla oranda boyandı. MSI olgularda BRAF anlamlı olarak daha yüksek oranda ekspresyon gösterdi. SOX2, STAT1 nükleer boyanma, herhangi bir STAT1 boyanması ve STAT1 sitoplazmik-3 boyanması ile gruplar arasında anlamlı fark görülmedi. STAT1 sitoplazmik-1 ve STAT1 sitoplazmik-2 boyanmaları ise MSI grupta anlamlı olarak daha yüksekti.

İmmün belirteçler ile grupların karşılaştırılması tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 18: MSS ve MSI olguların immün belirteçlerle boyanma oranları

İmmün belirteç		MSS n (%)	MSI n (%)	p
CDX2	Negatif	2 (0,4)	7 (6,2)	<0,001
	Zayıf	23 (4,8)	20 (17,7)	
	Güçlü	455 (94,8)	86 (76,1)	
BRAF	Negatif	449 (93,5)	95 (84,1)	<0,001
	+1	21 (4,4)	2 (1,8)	
	+2	8 (1,7)	11 (9,7)	
	+3	2 (0,4)	5 (4,4)	
SOX2	Negatif	456 (95)	105 (92,9)	0,379
	Pozitif	24 (5)	8 (7,1)	
STAT1 Nükleer	Negatif	303 (63,1)	67 (59,3)	0,449
	Pozitif	177 (36,9)	46 (40,7)	
STAT1 Sitoplazmik-1	Negatif	282 (58,8)	68 (60,2)	0,009
	+1	140 (29,2)	21 (18,6)	
	+2, +3	58 (12,1)	24 (21,2)	
STAT1 Sitoplazmik-2	Negatif, +1	422 (87,9)	89 (78,8)	0,011
	+2, +3	58 (12,1)	24 (21,2)	
STAT1 Sitoplazmik-3	Negatif	282 (58,8)	68 (60,2)	0,781
	+1, +2, +3	198 (41,3)	45 (39,8)	
STAT1 (+/-)	Negatif	260 (54,2)	63 (56,3)	0,761
	Pozitif	220 (45,8)	49 (43,8)	

3.1 İmmün belirteçler ile makroskopik özelliklerin ilişkisi

Cinsiyet ile hiçbir immün belirteç arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tümörlerin yerleşim yerleri açısından değerlendirildiğinde; CDX2 sol kolon tümörlerinde, BRAF ise sağ kolon tümörlerinde anlamlı olarak daha fazla eksprese edilmekteydi. SOX2 ile lokalizasyon arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. STAT1’de ise nükleer ya da sitoplazmik herhangi bir komponentteki boyanma sağ kolon lokalizasyonlu tümörlerde anlamlı olarak yüksek bulundu.

Yerleşim ile immün belirteçlerin ilişkisi tablo 19’da detaylı olarak incelenmiştir.

Tablo 19: Yerleşim ile immün belirteçlerin ilişkisi

İHK	Skor	Yerleşim	n (%)	p
CDX2	Negatif	Sol	5 (1,2)	0,001
	Zayıf (+)		20 (4,9)	
	Güçlü (+)		380 (93,8)	
	Negatif	Sağ	4 (2,4)	
	Zayıf (+)		22 (13,2)	
	Güçlü (+)		141 (84,4)	
BRAF	Negatif	Sol	382(94,3)	<0,001
	+1		17 (4,2)	
	+2		6 (1,5)	
	+3		0 (0)	
	Negatif	Sağ	141 (84,4)	
	+1		6 (3,6)	
	+2		13 (7,8)	
	+3		7 (4,2)	
SOX2	Negatif	Sol	385 (95,1)	0,428
	Pozitif		20 (4,9)	
	Negatif	Sağ	156 (93,4)	
	Pozitif		11 (6,6)	
STAT1 Nükleer	Negatif	Sol	274 (67,7)	<0,001
	Pozitif		131 (32,3)	
	Negatif	Sağ	84 (50,3)	
	Pozitif		83 (49,7)	
STAT1 Sitoplazmik-1	Negatif	Sol	255 (63)	0,013
	+1		101 (24,9)	
	+2, +3		49 (12,1)	
	Negatif	Sağ	84 (50,3)	
	+1		51 (30,5)	
	+2, +3		32 (19,2)	
STAT1 Sitoplazmik-2	Negatif ve +1	Sol	356 (87,9)	0,028
	+2, +3		49 (12,1)	
	Negatif ve +1	Sağ	135 (80,8)	
	+2, +3		32 (19,2)	

STAT1 Sitoplazmik-3	Negatif	Sol	255 (63)	0,005
	+1, +2, +3		150 (37)	
	Negatif	Sağ	84 (50,3)	
	+1, +2, +3		83 (49,7)	
STAT1 (+/-)	Negatif	Sol	238 (58,8)	0,002
	Pozitif		167 (41,2)	
	Negatif	Sağ	75 (44,9)	
	Pozitif		92 (55,1)	

Tümör boyutu ile CDX2 ekspresyonu arasında sınırdan anlamlılık gösteren ters korelasyon bulunmaktaydı. BRAF ekspresyonu ise tümör boyutu arttıkça anlamlı olarak artmaktaydı. Diğer immün belirteçler ile tümör boyutu arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Tümör boyut ile immün belirteçlerin ilişkisi tablo 20'de gösterilmiştir.

Tablo 20: Boyut ile immün belirteçlerin ilişkisi

İHK	Skor	Boyut	n (%)	p
CDX2	Negatif	<50 mm	3 (1)	0,099
	Zayıf (+)		17 (5,4)	
	Güçlü (+)		294 (93,6)	
	Negatif	≥50 mm	5 (2)	
	Zayıf (+)		23 (9,4)	
	Güçlü (+)		216 (88,5)	
BRAF	Negatif	<50 mm	294 (93,6)	0,014
	+1		13 (4,1)	
	+2		4 (1,3)	
	+3		3 (1)	
	Negatif	≥50 mm	217 (88,9)	
	+1		8 (3,3)	
	+2		15 (6,1)	
	+3		4 (1,6)	
SOX2	Negatif	<50 mm	300 (95,5)	0,141
	Pozitif		14 (4,5)	
	Negatif	≥50 mm	226 (92,6)	
	Pozitif		18 (7,4)	
STAT1 Nükleer	Negatif	<50 mm	194 (61,8)	0,824
	Pozitif		120 (38,2)	
	Negatif	≥50 mm	153 (62,7)	
	Pozitif		91 (37,3)	
STAT1 Sitoplazmik-1	Negatif	<50 mm	187 (59,6)	0,634
	+1		86 (27,4)	
	+2, +3		41 (13,1)	
	Negatif	≥50 mm	145 (59,4)	
	+1		61 (25)	
	+2, +3		38 (15,6)	
STAT1	Negatif ve +1	<50 mm	273 (86,9)	0,398

Sitoplazmik-2	+2, +3		41 (13,1)	
	Negatif ve +1	≥50 mm	206 (84,4)	
	+2, +3		38 (15,6)	
STAT1 Sitoplazmik-3	Negatif	<50 mm	187 (59,6)	0,976
	+1, +2, +3	<50 mm	127 (40,4)	
	Negatif	≥50 mm	145 (59,4)	
	+1, +2, +3	≥50 mm	99 (40,6)	
STAT1 (+/-)	Negatif	<50 mm	167 (53,2)	0,373
	Pozitif	<50 mm	147 (46,8)	
	Negatif	≥50 mm	139 (57)	
	Pozitif	≥50 mm	105 (43)	

STAT1 sitoplazmik-2 boyanmasında yüksek ekspresyon oranlarıyla materyalde non-neoplastik kolon mukozasındaki adenomatöz polip varlığı arasında anlamlı ters ilişki bulundu (0,041). Diğer belirteçler ile adenomatöz polip varlığı, proksimal/distal ya da radyal cerrahi sınır pozitifliği arasında anlamlı ilişki yoktu ($p>0,05$).

3.2. İmmün belirteçler ile histopatolojik özelliklerin ilişkisi

Tümör hücrelerinde diferansiasyon azaldıkça CDX2’de ekspresyon kaybı da anlamlı olarak azaldı. BRAF da ise tümör diferansiasyonu ile boyanma oranı arasında ters bir ilişki vardı; diferansiasyon arttıkça boyanma oranları anlamlı olarak düşmekteydi. SOX2 iyi diferansiye tümörlerde anlamlı olarak daha az ekprese edildi. STAT1’de de nükleer ya da sitoplazmik herhangi bir komponentteki boyanma diferansiasyon arttıkça anlamlı olarak azalma gösterdi.

Diferansiasyon ile immün belirteçlerin ilişkisi tablo 21’de gösterilmiştir.

Tablo 21: Diferansiasyon ile immün belirteçlerin ilişkisi

İHK	Skor	Diferansiasyon	n (%)	p
CDX2	Negatif	İyi	5 (1)	0,033
	Zayıf (+)		32 (6,5)	
	Güçlü (+)		455 (92,5)	
	Negatif	Az	3 (4,5)	
	Zayıf (+)		7 (10,6)	
	Güçlü (+)		56 (84,8)	
BRAF	Negatif	İyi	457 (92,9)	<0,001
	+1		20 (4,1)	
	+2		11 (2,2)	
	+3		4 (0,8)	
	Negatif	Az	54 (81,8)	
	+1		2 (3)	
	+2		7 (10,6)	
	+3		3 (4,5)	
SOX2	Negatif	İyi	471 (95,7)	0,002
	Pozitif		21 (4,3)	
	Negatif	Az	56 (84,8)	
	Pozitif		10 (15,2)	
STAT1 Nükleer	Negatif	İyi	316 (64,2)	0,001
	Pozitif		176 (35,8)	
	Negatif	Az	28 (42,4)	
	Pozitif		38 (57,6)	
STAT1 Sitoplazmik-1	Negatif	İyi	299 (60,8)	<0,001
	+1		137 (27,8)	
	+2, +3		56 (11,4)	
	Negatif	Az	28 (42,4)	
	+1		13 (19,7)	
	+2, +3		25 (37,9)	
STAT1 Sitoplazmik-2	Negatif ve +1	İyi	436 (88,6)	<0,001
	+2, +3		56 (11,4)	
	Negatif ve +1	Az	41 (62,1)	
	+2, +3		25 (37,9)	
STAT1 Sitoplazmik-3	Negatif	İyi	299 (60,8)	0,004
	+1, +2, +3		193 (39,2)	
	Negatif	Az	28 (42,4)	

	+1, +2, +3		38 (57,6)	
STAT1 (+/-)	Negatif	İyi	216 (43,9)	0,005
	Pozitif		276 (56,1)	
	Negatif	Az	25 (37,9)	
	Pozitif		41 (62,1)	

BRAF ekspresyonu müsinöz adenokarsinomlarda artış gösterme eğiliminde olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Diğer immün belirteçler ile müsinöz morfoloji arasında ilişki saptanmadı.

Müsinöz morfoloji ile immün belirteçlerin ilişkisi tablo 22’de gösterilmiştir.

Fokal müsinöz diferansiasyon varlığı ile de immün belirteçler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 22: Müsinöz morfoloji ile immün belirteçlerin ilişkisi

İHK	Skor	Müsinöz/ non-müsinöz tm	n (%)	p
CDX2	Negatif	Non-müsinöz	8 (1,4)	0,482
	Zayıf (+)		39 (7)	
	Güçlü (+)		511 (91,6)	
	Negatif	Müsinöz	1 (2,9)	
	Zayıf (+)		4 (11,4)	
	Güçlü (+)		30 (85,7)	
BRAF	Negatif	Non-müsinöz	515 (92,3)	0,181
	+1		21 (3,8)	
	+2		16 (2,9)	
	+3		6 (1,1)	
	Negatif	Müsinöz	29 (82,9)	
	+1		2 (5,7)	
	+2		3 (8,6)	
	+3		1 (2,9)	
SOX2	Negatif	Non-müsinöz	528 (94,6)	0,713
	Pozitif		30 (5,4)	
	Negatif	Müsinöz	33 (94,3)	
	Pozitif		2 (5,7)	
STAT1 Nükleer	Negatif	Non-müsinöz	348 (62,4)	0,954
	Pozitif		210 (37,6)	

	Negatif	Müsinöz	22 (62,9)	
	Pozitif		13 (37,1)	
STAT1 Sitoplazmik-1	Negatif	Non-müsinöz	329 (59)	0,758
	+1		153 (27,4)	
	+2, +3		76 (13,6)	
	Negatif	Müsinöz	21 (60)	
	+1		8 (22,9)	
	+2, +3		6 (17,1)	
STAT1 Sitoplazmik-2	Negatif ve +1	Non-müsinöz	482 (86,4)	0,611
	+2, +3		76 (13,6)	
	Negatif ve +1	Müsinöz	29 (82,8)	
	+2, +3		6 (7,2)	
STAT1 Sitoplazmik-3	Negatif	Non-müsinöz	329 (59)	0,903
	+1, +2, +3		229 (41)	
	Negatif	Müsinöz	21 (60)	
	+1, +2, +3		14 (40)	
STAT1 (+/-)	Negatif	Non-müsinöz	303 (54,3)	0,743
	Pozitif		255 (45,7)	
	Negatif	Müsinöz	20 (57,1)	
	Pozitif		15 (42,9)	

LVİ ve venöz invazyon ile hiçbir immün belirteç arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi.

PNİ açısından bakıldığında, CDX2 ekspresyon oranı azaldıkça PNİ oranının anlamlı olarak arttığı saptandı (0,018). Diğer belirteçler ile PNİ arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

İntratümöral lenfosit sayısındaki artış ile STAT-1'de oluşan herhangi bir boyanma ve STAT1-St.-3 boyanması anlamlı olarak artış göstermekteydi (sırasıyla $p= 0,008$, $p=0,002$). STAT-1'in varyasyon boyanmaları ile birlikte incelendiğinde, bu anlamlılığın daha çok sitoplazmik boyanma şiddetindeki artıştan kaynaklandığı görüldü.

Peritümöral lenfosit sayısındaki artış ile CDX2 dışındaki tüm belirteçlerde anlamlı bir ilişki saptandı. Ancak bu anlamlılığı daha iyi yorumlayabilmek için peritümöral lenfositler yok ve düşük / yüksek olacak şekilde iki gruba

ayrıldığında sadece SOX2 pozitifliği ile sınırdan anlamlı, STAT1 sitoplazmik varyasyon boyanmaları ile anlamlı peritümöral lenfosit artışı görüldü.

Peritümöral lenfosit oranı ve immün belirteçlerin ilişkisi tablo 23'te gösterilmiştir.

Crohn benzeri yanıt ile immün belirteçler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 23: Peritümöral lenfosit oranı ile immün belirteçlerin ilişkisi

İHK	Skor	Peritümöral lenfosit oranı	n (%)	p
BRAF	Negatif	Yok ve düşük	241 (92,3)	0,800
	+1		9 (3,4)	
	+2		9 (3,4)	
	+3		2 (0,8)	
	Negatif	Yüksek	303 (91,3)	
	+1		14 (4,2)	
	+2		10 (3)	
	+3		5 (1,5)	
SOX2	Negatif	Yok ve düşük	252 (96,6)	0,063
	Pozitif		9 (3,4)	
	Negatif	Yüksek	309 (93,1)	
	Pozitif		23 (6,9)	
STAT1 Sitoplazmik-1	Negatif	Yok ve düşük	168 (64,4)	0,031
	+1		66 (25,3)	
	+2, +3		27 (10,3)	
	Negatif	Yüksek	182 (54,8)	
	+1		95 (28,6)	
	+2, +3		55 (16,6)	
STAT1 Sitoplazmik-2	Negatif ve +1	Yok ve düşük	234 (89,7)	0,029
	+2, +3		27 (10,3)	
	Negatif ve +1	Yüksek	277 (83,4)	
	+2, +3		55 (16,6)	
STAT1 Sitoplazmik-3	Negatif	Yok ve düşük	168 (64,4)	0,019
	+1, +2, +3		93 (35,6)	
	Negatif	Yüksek	182 (54,8)	
	+1, +2, +3		150 (45,2)	
STAT1 (+/-)	Negatif	Yok ve düşük	152 (58,2)	0,102
	Pozitif		109 (41,8)	
	Negatif	Yüksek	171 (51,5)	
	Pozitif		161 (48,5)	

BRAF ile az diferansiye kümeler arasında anlamlı bir ilişki saptanmasına rağmen BRAF'ın yapılan kombinasyonlarında bu ilişki anlamlandırılmadı ($p>0,05$). Az diferansiye kümeler ile diğer belirteçler arasında anlamlı bir ilişki yoktu.

TT derecesi ile sadece STAT1 nükleer, STAT1-St.-3 ve STAT1 (+/-) boyanması arasında anlamlı bir ilişki olduğu görüldü. STAT1 nükleer, STAT1-St.-3 ve STAT1 (+/-) boyanması TT derecesi arttıkça artmaktaydı.

Tümör tomurcuklanması ile immün belirteçlerin ilişkisi tablo 24'te detaylandırılmıştır.

Tablo 24: Tümör tomurcuklanması ile immün belirteçlerin ilişkisi

İHK	Skor	Tümör tomurcuklanması	n (%)	p
STAT1 Nükleer	Negatif	Düşük ve orta	210 (66,7)	0,022
	Pozitif		105 (33,3)	
	Negatif	Yüksek	160 (42,4)	
	Pozitif		118 (57,6)	
STAT1 Sitoplazmik-3	Negatif	Düşük ve orta	199 (63,2)	0,029
	+1, +2, +3		116 (36,8)	
	Negatif	Yüksek	151 (54,3)	
	+1, +2, +3		127 (45,7)	
STAT1 (+/-)	Negatif	Düşük ve orta	186 (59)	0,017
	Pozitif		129 (41)	
	Negatif	Yüksek	137 (49,3)	
	Pozitif		141 (50,7)	

İmmün belirteçler ile tümör depoziti arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

CDX2 ve STAT1 sitoplazmik-2 boyanması ile LN metastazında sınırda anlamlılık gösteren ters korelasyon saptandı.

İnvazyon seviyesini T1, T2 (Erken evre) ve T3, T4a, T4b (İleri evre) şeklinde iki gruba ayırdığımızda BRAF'ın dörtlü skorlamasıyla yapılan değerlendirmeye invazyon seviyesi arasında anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0,05$). Ancak bu ilişkiyi daha iyi yorumlayabilmek için yapılan varyasyonlarda (negatif / +1,+2,+3; negatif, +1 / +2,+3; negatif, +1, +2 / +3) ise anlamlı bir sonuç elde edilemedi (sırasıyla $p=0,315$, $p=1,00$, $p=0,148$). STAT1-St.-1 ve STAT1-St-2 anlamlı olarak erken invazyon seviyelerinde, STAT1-St-3 ise sınırda anlamlı olarak erken invazyon seviyelerinde daha çok boyandı. Diğer belirteçlerle invazyon seviyesi arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

İnvazyon seviyesi ile immün belirteçlerin ilişkisi tablo 25'te gösterilmiştir.

Tablo 25: İnvazyon seviyesi ile immün belirteçlerin ilişkisi

İHK	Skor	İnvazyon seviyesi	n (%)	p
CDX2	Negatif	Erken evre	(0)	0,469
	Zayıf (+)		3 (5,1)	
	Güçlü (+)		56 (94,9)	
	Negatif	İleri evre	9 (1,7)	
	Zayıf (+)		40 (7,5)	
	Güçlü (+)		485 (90,8)	
BRAF	Negatif	Erken evre	52 (88,1)	0,037
	+1		5 (8,5)	
	+2		0 (0)	
	+3		2 (3,4)	
	Negatif	İleri evre	492 (92,1)	
	+1		18 (3,4)	
	+2		19 (3,6)	
	+3		5 (0,9)	
SOX2	Negatif	Erken evre	57 (96,6)	0,760
	Pozitif		2 (3,4)	
	Negatif	İleri evre	504 (94,4)	
	Pozitif		30 (5,6)	
STAT1 Nükleer	Negatif	Erken evre	34 (57,6)	0,426
	Pozitif		25 (42,4)	
	Negatif	İleri evre	336 (62,9)	
	Pozitif		198 (37,1)	
STAT1 Sitoplazmik-1	Negatif	Erken evre	28 (47,5)	0,007
	+1		15 (25,4)	
	+2, +3		16 (27,1)	
	Negatif	İleri evre	322 (60,3)	
	+1		146 (27,3)	
	+2, +3		66 (12,4)	
STAT1 Sitoplazmik-2	Negatif ve +1	Erken evre	43 (72,9)	0,002
	+2, +3		16 (27,1)	
	Negatif ve +1	İleri evre	468 (87,6)	
	+2, +3		66 (12,4)	

STAT1 Sitoplazmik-3	Negatif	Erken evre	28 (47,5)	0,057
	+1, +2, +3		31 (52,5)	
	Negatif	İleri evre	322 (60,3)	
	+1, +2, +3		212 (39,7)	
STAT1 (+/-)	Negatif	Erken evre	28 (47,5)	0,254
	Pozitif		31 (52,5)	
	Negatif	İleri evre	295 (55,2)	
	Pozitif		239 (44,8)	

4. MSI ve MSS Olguların Prognostik Özellikleri

Klinik izlem ve prognoz verilerine ulaşılabilen 353 hastanın çoğu klinik evre 3 hastasıydı. 58 hastada tanı anında uzak metastaz bulunmakta olup 53 hastada sonradan uzak metastaz oluşmuştu. Takip süresi 0 ile 184 ay arasında değişmekteydi. 283 hasta KT almıştı. 197 hasta son takiplerinde sağ iken, 156 hasta ex olmuştu. Takipli gruptaki 294 hastanın tümörü MSS, 59 hastanın tümörü MSI nitelikteydi.

MSI grupta uzak metastaz sıklığı anlamlı olarak daha düşüktü. Klinik evre ile iki grup arasında anlamlı fark görülmedi.

Her iki grubun uzak metastaz ve klinik evre oranları tablo 26'da ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 26: MSS ve MSI olguların M ve klinik evreleri

	MSS n (%)	MSI n (%)	p
Uzak metastaz			
M0	239 (81,3)	56 (94,9)	0,01
M1	55 (18,7)	3 (5,1)	
Klinik evre			
Erken evre (Evre 1, evre 2)	125 (42,5)	28 (47,5)	0,485
İleri evre (Evre 3, evre 4)	169 (57,5)	31 (52,5)	

Her iki tümör grubunda da tanı anından sonra uzak metastaz oranına bakılınca gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktaydı.

Tanıdan sonra meydana gelen uzak metastaz oranları tablo 27'de verilmiştir.

Tablo 27: MSS ve MSI olguların tanıdan sonra uzak metastaz oranları

	MSS n (%)	MSI n (%)	p
Var	44 (15)	9 (15,3)	0,955
Yok	250 (85)	50 (84,7)	

Genel sağkalım (GS) ve progresyonsuz sağkalım (PS) MSI grupta, MSS gruptan daha yüksek saptanmasına karşın istatistiksel anlamlılık taşıyan bir fark elde edilmedi.

Hastaların sağkalım bilgileri tablo 18’de detaylandırılmıştır.

Tablo 28: Tüm grupların genel ve progresyonsuz sağkalımları

	n (%)	GS (Ort. ay)	p	PS (Ort. ay)	p
Genel	353	94,710	0,113	93,894	0,199
MSS	294 (83)	91,6		91,8	
MSI	59 (17)	104,6		101,2	

4.1 Sağkalım ile klinikopatolojik özelliklerin ilişkisi

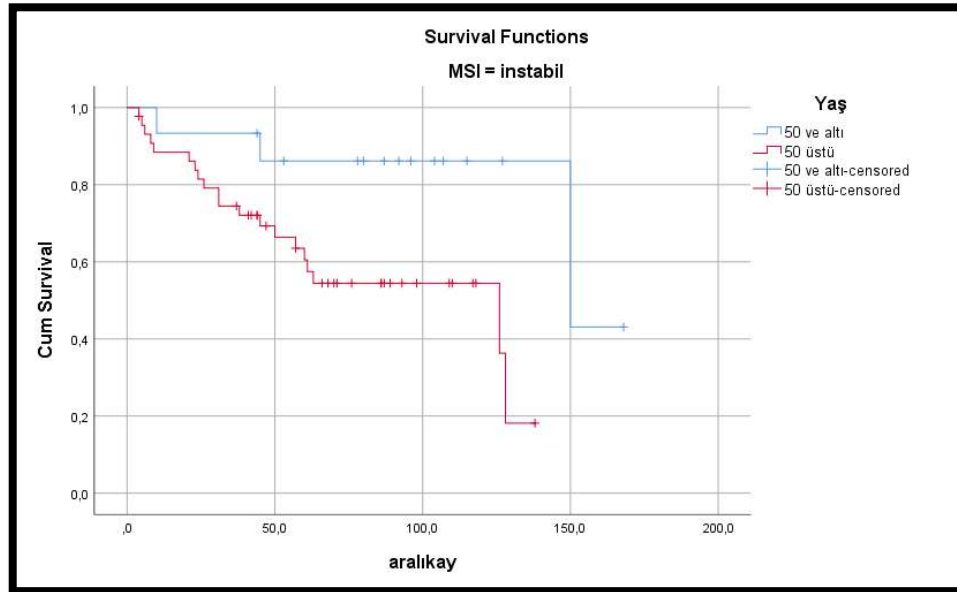
Yaşı 50 kesme değeri olarak ayırdığımızda, genel ve MSI grupta 50 yaş altında GS (Grafik 1) ve PS anlamlı olarak daha yüksekti. MSS grupta 50 yaş altında GS sınırda anlamlı artarken, PS artış gösterse de anlamlı sonuç elde edilmedi.

Her üç grubu ele aldığımızda cinsiyet ve lokalizasyonun (sağ/sol kolon) GS ya da PS’yi anlamlı olarak etkilemediği görüldü.

Olguların klinikopatolojik özelliklerinin sağkalıma etkisi tablo 29’da verilmiştir.

Tablo 29: Klinikopatolojik özelliklerin sağkalıma etkisi

Klinikopatolojik özellikler			n (%)	GS (Ort.ay)	p	PS (Ort.ay)	p
Genel	Yaş	≤50	55 (16)	118,4	0,004	115,2	0,012
		>50	298 (84)	86,6		85,9	
MSI	Yaş	≤50	15 (25)	140,8	0,020	135,4	0,049
		>50	44 (75)	86,3		82,1	
MSS	Yaş	≤50	40 (13,6)	106,5	0,062	105,4	0,116
		>50	254 (86,4)	86,5		85,8	
Genel	Cinsiyet	Kadın	141 (40)	89,6	0,487	88,5	0,562
		Erkek	212 (60)	95,5		94,9	
MSI	Cinsiyet	Kadın	25 (42)	81,1	0,158	78,6	0,262
		Erkek	34 (58)	113,4		108,7	
MSS	Cinsiyet	Kadın	116 (39,5)	88,9	0,924	88,2	0,853
		Erkek	178 (60,5)	90,4		90,6	
Genel	Yerleşim	Sol	242 (71)	90,1	0,819	88,5	0,785
		Sağ	100 (29)	95,7		93,5	
MSI	Yerleşim	Sol	29 (52)	91,9	0,273	81,2	0,241
		Sağ	27 (48)	111,2		108,7	
MSS	Yerleşim	Sol	213 (75)	89,6	0,533	89,1	0,631
		Sağ	73 (25)	89,5		88,5	



Grafik 1: MSI olgularda yaş ile genel sağkalım ilişkisini gösteren Kaplan-Meier eğrisi

4.2 Sağkalım ile makroskopik özelliklerin ilişkisi

Tümör perforasyonu genel grupta ve MSI tümörlerde genel (Grafik 2) ve progresyonsuz sağkalımı anlamlı olarak azaltmaktaydı. MSS tümörlerde ise GS üzerinde sınırdan anlamlılık gösterdi.

Proksimal/distal uç cerrahi sınırlarda tümör devamlılığı genel grupta ve MSS grupta prognozu anlamlı olarak kötü etkilerken, MSI grupta böyle bir olgu olmadığından istatistik yapılamadı. Radyal cerrahi sınırdan tümör devamlılığı genel grupta ve MSS grupta prognozu anlamlı olarak kötü etkilerken, MSI grupta anlamlı fark izlenmedi.

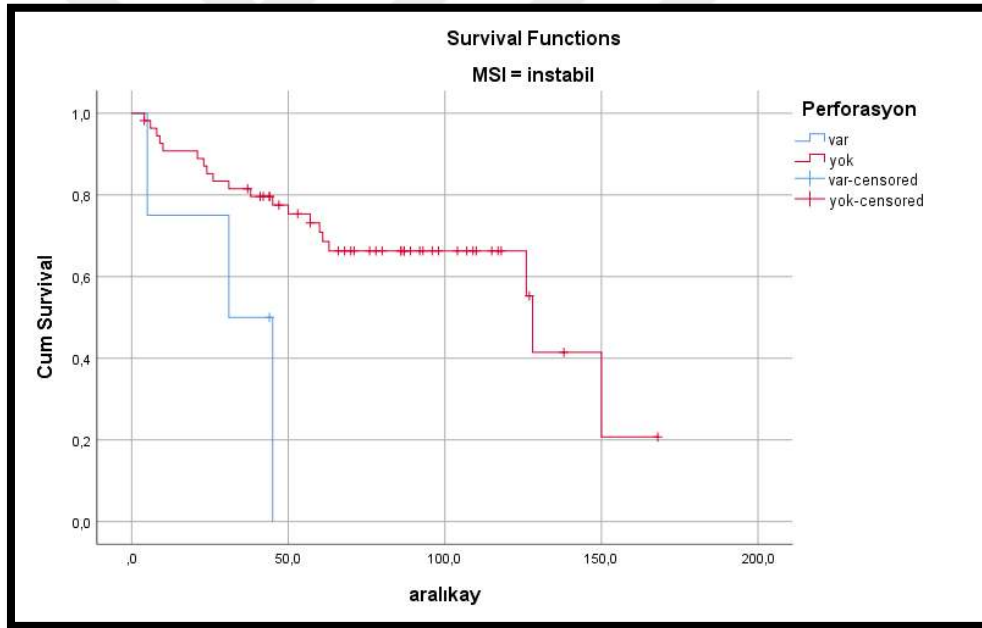
Eşlik eden adenomatöz polip varlığı ya da tümör boyutunun, hiçbir grupta anlamlı prognostik değeri saptanmadı.

Makroskopik özelliklerin prognostik etkileri tablo 30'da verilmiştir.

Tablo 30: Makroskopik özelliklerin sağkalıma etkisi

Makroskopik özellikler		Skor	n (%)	GS (Ort. ay)	P	PS (Ort. ay)	p
Polip	Genel	Var	69 (19,5)	75,9	0,901	73,2	0,889
		Yok	284 (80,5)	94,6		93,6	
	MSI	Var	11 (18,6)	95,6	0,469	95,6	0,364
		Yok	48 (81,4)	102,1		97,6	
	MSS	Var	58 (19,7)	69,3	0,590	66,2	0,534
		Yok	236 (80,3)	92,3		92,4	
Perforasyon	Genel	Var	25 (7,1)	54,4	0,014	50,1	0,016
		Yok	327 (92,9)	96,4		95,7	
	MSI	Var	4 (6,7)	31,5	0,013	18,6	<0,001
		Yok	55 (93,3)	108,6		105,9	
	MSS	Var	21 (5)	56,5	0,086	54,4	0,131
		Yok	272 (95)	92,8		93	
Boyut	Genel	<50 mm	187 (58)	94,1	0,310	94,6	0,215
		≥50 mm	133 (62)	89,4		87,1	
	MSI	<50 mm	20 (39)	110,4	0,637	106,7	0,726
		≥50 mm	31 (61)	94,1		88,5	
	MSS	<50 mm	167 (62)	84,2	0,233	84,1	0,164
		≥50 mm	102 (38)	86,2		84,5	
Prok./ Distal CS	Genel	Pozitif	346 (97,3)	9	<0,001	9	<0,001
		Negatif	6 (1,7)	96,1		95,1	

	MSI	Pozitif	59 (100)	-	-	-	-
		Negatif	0 (0)	104,6		101,2	
	MSS	Pozitif	287 (98)	9	<0,001	9	<0,001
		Negatif	6 (2)	93,3		93,3	
Radyal CS	Genel	Pozitif	19 (17)	56,3	0,002	54,2	0,005
		Negatif	93 (83)	95,7		95,7	
	MSI	Pozitif	2 (28,5)	35,5	0,515	35,5	0,515
		Negatif	5 (71,5)	104,6		104,6	
	MSS	Pozitif	17 (16)	53,4	0,003	51,1	0,007
		Negatif	88 (84)	93,1		93,9	



Grafik 2: MSI olgularda tümör perforasyonu ile genel sağkalım ilişkisini gösteren Kaplan-Meier eğrisi

4.2 Sağkalım ile histopatolojik özelliklerin ilişkisi

Tümörler non-müsinöz ve müsinöz olarak gruplandığında üç grupta da non-müsinöz tümörler daha uzun GS ve PS göstermelerine karşın yalnızca MSS olgularda GS’de anlamlı, PS’de ise sınırlı anlamlı sonuç elde edildi.

Tümör diferansiasyonu arttıkça genel grupta ve MSS olgularda anlamlı olarak sağkalım artmasına karşın, MSI grupta sağkalımda anlamlı değişiklik izlenmedi.

Tümör morfolojisi ve diferansiasyonunun sağkalıma etkisi tablo 31’de ayrıntılı gösterilmiştir.

Tablo 31: Tümör morfolojisi ve diferansiasyonun sağkalıma etkisi

Histopatolojik özellikler			n (%)	GS (Ort. ay)	P	PS (Ort. ay)	p
Morfo- loji	Genel	Non-müsinöz	330 (93)	95,7	0,158	94,9	0,241
		Müsinöz	23 (7)	68,2		66,9	
	MSI	Non-müsinöz	49 (83)	106,1	0,651	101,4	0,872
		Müsinöz	10 (7)	83,3		83,3	
	MSS	Non-müsinöz	281 (95,5)	93,1	0,047	93,3	0,075
		Müsinöz	13 (4,5)	47,7		44,7	
Dif.	Genel	İyi	292 (88)	91,4	0,048	89,1	0,042
		Az	41 (12)	73,8		69,4	
	MSI	İyi	40 (68)	109,6	0,290	98,2	0,268
		Az	19 (32)	91,1		86,4	
	MSS	İyi	252 (92)	88,3	0,003	87,1	0,007
		Az	22 (8)	45,6		41,9	

LVİ, venöz invazyon, PNI, tümör depoziti ve LN metastazı varlığı genel grupta ve MSS tümörlerde anlamlı olarak prognozu kötü etkilemekle birlikte MSI tümörlerde anlamlı bir sonuç bulunmadı.

Peritümöral lenfositik yanıt artışı ile MSS grupta sağkalım anlamlı olarak artarken, genel grupta ve MSI tümörlerde anlamlılık saptanmadı. Peritümöral lenfosit yok + düşük / yüksek olarak iki kategoride incelendiğinde, yüksek peritümöral lenfosit varlığında genel grupta ve MSS olgularda GS anlamlı artış gösterirken (Grafik.3), MSI olgularda anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla

$p < 0,001$, $=p = 0,001$, $p = 0,183$). İntratümöral lenfositik yanıt ve Crohn benzeri yangısal yanıt ile herhangi bir grupta prognostik olarak anlamlı ilişki görülmedi

Tümör tomurcuklanması genel grupta ve MSS tümörlerde sağkalımı anlamlı olarak azaltmakta olup MSI tümörlerde anlamlı değildi.

Az diferansiye kümeler MSS grupta GS'yi anlamlı, PS'yi sınırda anlamlı düşürdü. Diğer gruplarda anlamlı farklılık izlenmedi.

Fokal müsinöz diferansiasyon ile herhangi bir grupta prognostik olarak anlamlı ilişki görülmedi.

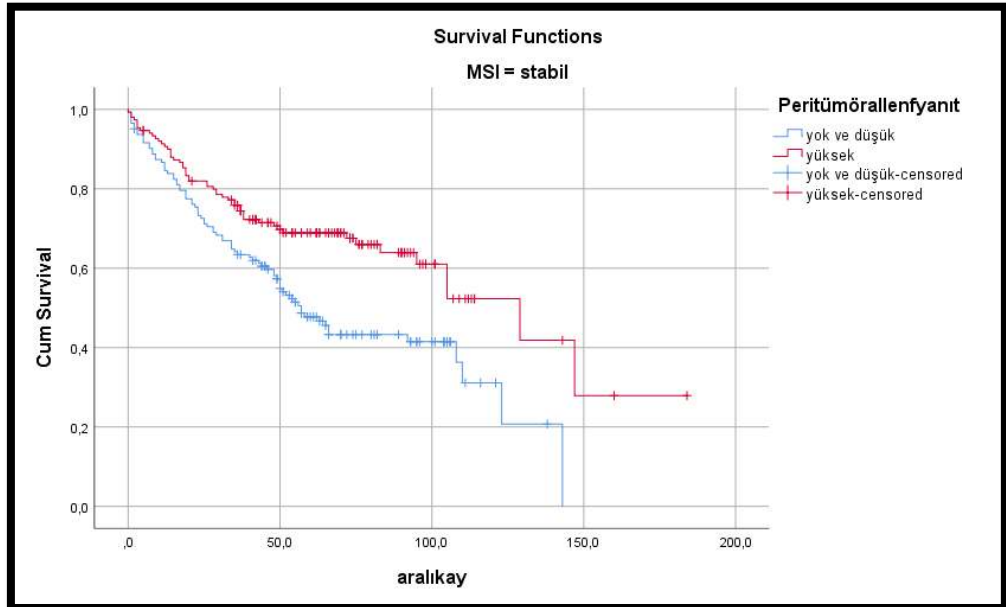
Histopatolojik parametrelerin prognoza etkisi tablo 32'de detaylandırılmıştır.

Tablo 32: Histopatolojik özelliklerin sağkalıma etkisi

Histopatolojik özellikler		Skor	n (%)	GS (Ort.ay)	p	PS (Ort.ay)	p
Fokal müsinöz dif.	Genel	Var	75 (22,7)	87,6	0,735	86,5	0,972
		Yok	255 (77,3)	97,1		96,4	
	MSI	Var	14 (28,5)	96,3	0,957	96,4	0,732
		Yok	35 (71,5)	105,4		96,7	
	MSS	Var	61 (21,7)	80,8	0,686	78,6	0,796
		Yok	220 (78,3)	96,7		97,5	
LVI	Genel	Var	242 (68,5)	82,9	<0,001	79,5	<0,001
		Yok	111 (31,5)	113,2		114,5	
	MSI	Var	42 (71)	101,5	0,534	96,3	0,615
		Yok	17 (29)	102,7		97,6	
	MSS	Var	200 (68)	76,7	<0,001	74,8	<0,001
		Yok	94 (32)	113,9		115,4	
Venöz inv.	Genel	Var	31 (8,7)	49,2	<0,001	45	<0,001
		Yok	322 (91,3)	97,8		97,2	
	MSI	Var	1 (1,6)	31	0,103	31	0,239
		Yok	58 (98,4)	105,9		102,5	
	MSS	Var	30 (10)	49,8	0,001	45,7	0,001
		Yok	264 (90)	94,7		95,2	
PNİ	Genel	Var	146 (41)	69,3	<0,001	65,9	<0,001
		Yok	207 (59)	108,7		108,6	
	MSI	Var	17 (29)	82,4	0,221	81,4	0,411
		Yok	42 (81)	112,6		110,1	

	MSS	Var	129 (44)	69,4	<0,001	65,6	<0,001
		Yok	165 (56)	105,6		106,6	
Tümör depoziti	Genel	Var	31 (8,8)	48,2	0,001	45,7	0,001
		Yok	319 (91,2)	97,5		97,1	
	MSI	Var	4 (6,8)	35,5	0,877	31,3	0,793
		Yok	55 (93,2)	104,9		101,7	
	MSS	Var	27 (9,3)	45,5	0,001	43,2	0,001
		Yok	264 (90,7)	94,9		95,4	
LN met.	Genel	Var	139 (39,6)	65,5	<0,001	62,4	<0,001
		Yok	212 (60,4)	115,4		115,2	
	MSI	Var	21 (35,6)	85,1	0,284	84,5	0,470
		Yok	38 (64,4)	112,7		109,5	
	MSS	Var	118 (40,4)	62,1	<0,001	58,4	<0,001
		Yok	174 (59,6)	116,2		115,3	
Crohn benzeri yanıt	Genel	Var	229 (65)	92,9	0,291	90,8	0,312
		Yok	124 (35)	96,7		95,3	
	MSI	Var	43 (73)	109,8	0,214	105,8	0,280
		Yok	16 (27)	67,7		63,7	
	MSS	Var	186 (63)	85,8	0,606	84,9	0,584
		Yok	108 (37)	95,8		94,7	
İntratm. lenfosit yanıtı	Genel	Yok	91 (25,8)	81,8	0,094	79,6	0,080
		Düşük	235 (66,5)	97		94,9	
		Yüksek	27 (7,7)	88,2		86,5	
	MSI	Yok	15 (25,4)	87,3	0,536	82,6	0,481
		Düşük	36 (61)	103,4		93,1	
		Yüksek	8 (13,6)	95,5		93,7	
	MSS	Yok	76 (25,9)	76,1	0,240	73,1	0,160
		Düşük	199 (67,7)	98,5		98,7	
		Yüksek	19 (6,4)	82,3		80,7	
Peritm. lenfosit yanıtı	Genel	Yok	1 (0,3)	0,000	<0,001	0,000	<0,001
		Düşük	167 (47,3)	75,5		72,6	
		Yüksek	185 (52,4)	110,1		108,4	
	MSI	Yok	0 (0)	-	0,183	-	0,275
		Düşük	25 (42,4)	86,4		82,4	
		Yüksek	34 (57,6)	114,2		106,3	
	MSS	Yok	1 (0,4)	0,000	<0,001	0,000	<0,001
		Düşük	142 (48,2)	72,6		70,01	

		Yüksek	151 (51,4)	107,8		109,4	
TT	Genel	Düşük	115 (32,6)	106,1	0,050	106,1	0,178
		Orta	74 (21)	95		93,3	
		Yüksek	164 (46,4)	84,3		83,2	
	MSI	Düşük	20 (33,9)	91,6	0,562	75,5	0,289
		Orta	13 (22)	95,1		93,2	
		Yüksek	26 (44,1)	110,6		109,5	
	MSS	Düşük	95 (32,3)	109,3	0,008	109,7	0,033
		Orta	61 (20,7)	90,2		90,2	
		Yüksek	138 (47)	78		76,9	
PDC	Genel	Düşük	110 (31,2)	97,4	0,119	94,6	0,271
		Orta	90 (25,5)	91,1		91,8	
		Yüksek	153 (43,3)	92,6		90,1	
	MSI	Düşük	23 (39)	100,6	0,375	86,6	0,406
		Orta	11 (18,6)	75,4		75,3	
		Yüksek	25 (42,4)	114,8		113,1	
	MSS	Düşük	87 (29,6)	96,6	0,024	95,1	0,065
		Orta	79 (26,9)	89,6		92,1	
		Yüksek	128 (43,5)	88,8		86,1	



Grafik 3: MSS olgularda peritümöral lenfosit yanıtı ile genel sağkalım ilişkisini gösteren Kaplan-Meier eğrisi

4.3 Sağkalım ile TNM evresi ve klinik izlem bulgularının ilişkisi

Genel grupta ve MSS olgularda T evresi arttıkça daha düşük GS ve PS izlendi. MSI grupta anlamlı ilişki saptanmadı. Üç grupta da N evresi arttıkça ve tanı anında uzak metastaz varlığında sağkalım anlamlı olarak düştü. Klinik evre arttıkça genel grupta ve MSS tümörlerde GS ve PS anlamlı olarak azaldı. MSI olgularda ise GS’de sınırda anlamlılık saptandı.

Olguların TNM evresi ve klinik evrelerinin sağkalıma etkisi tablo 33’te incelenmiştir.

Tablo 33: TNM evresi ve klinik evrenin sağkalıma etkisi

T evresi		n (%)	GS (Ort.ay)	p	PS (Ort.ay)	p
Genel	T1	8 (2,3)	108,4	<0,001	108,4	<0,001
	T2	16 (4,5)	96,2		88,8	
	T3	183 (51,8)	101,2		100	
	T4a	125 (35,4)	77,1		74,7	
	T4b	21 (5,9)	41,2		38,8	
MSI	T1	1 (1,7)		0,747		0,879
	T2	-				
	T3	33 (55,9)				
	T4a	20 (33,9)				
	T4b	5 (8,5)				
MSS	T1	7 (2,4)	96,1	<0,001	96,1	<0,001
	T2	16 (5,4)	96,2		88,8	
	T3	150 (5,1)	98,5		99,6	
	T4a	105 (35,7)	75,1		72,1	
	T4b	16 (5,4)	28,9		25,7	
N evresi						
Genel	N0	160 (45)	123,509	<0,001	124,839	<0,001
	N1a	49 (14)	82,044		83,239	
	N1b	52 (15)	86,043		81,479	
	N1c	15 (4)	69,514		69,130	
	N2a	46 (13)	63,936		58,036	
	N2b	29 (8)	30,254		28,004	
MSI	N0	27 (46)		0,037		0,060
	N1a	6 (10,2)				
	N1b	11 (18,6)				
	N1c	2 (3,4)				
	N2a	9 (15,2)				
	N2b	4 (6,8)				
MSS	N0	133 (45,5)	124,411	<0,001	124,253	<0,001
	N1a	43 (14,7)	81,353		82,322	

	N1b	41 (14)	85,543		81,800	
	N1c	13 (4,4)	66,143		65,601	
	N2a	37 (12,7)	55,464		47,901	
	N2b	25 (8,6)	28,829		26,189	
M evresi						
Genel	Var	58 (16,5)	24,5	<0,001	22,1	<0,001
	Yok	295 (83,5)	109,9		108,6	
MSI	Var	3 (2)	15	<0,001	15	<0,001
	Yok	56 (98)	109,4		106	
MSS	Var	55 (18,8)	25,1	<0,001	22,5	<0,001
	Yok	239 (81,2)	109,4		108,6	
Klinik Evre						
Genel	Erken	153 (43,4)	131,5	<0,001	133,4	<0,001
	İleri	200 (56,6)	67,2		63,9	
MSI	Erken	28 (47,5)	121,6	0,058	119,3	0,111
	İleri	31 (52,5)	81,4		79,2	
MSS	Erken	125 (42,5)	135,5	<0,001	135,6	<0,001
	İleri	169 (57,5)	64,2		60,8	

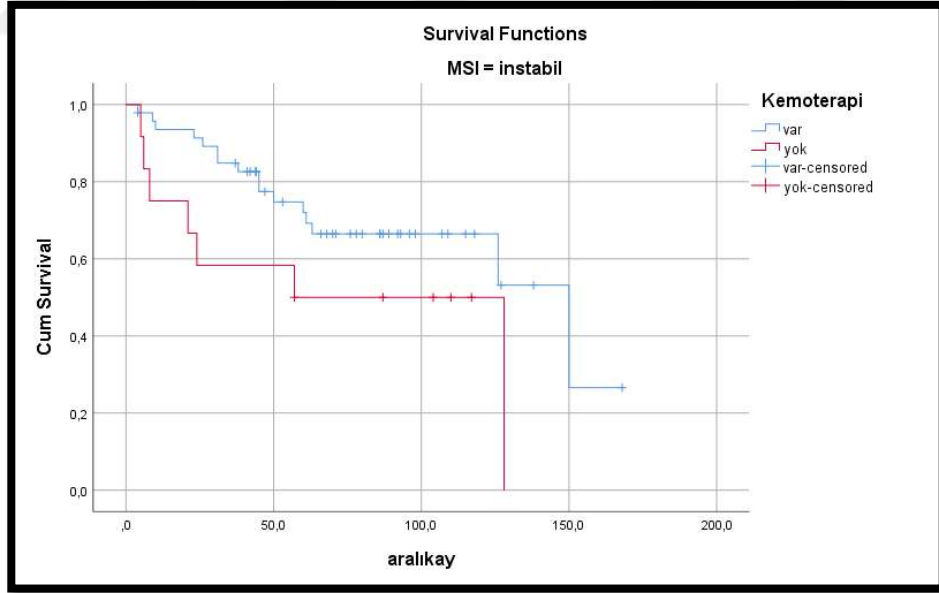
Tanıdan sonra meydana gelen metastazlarda genel grupta ve MSS grupta GS anlamlı olarak azalmaktaydı. MSI grupta PS anlamlı azalırken, GS azalsa da anlamlı ilişki saptanmadı.

Takipli olan 353 olgudan 283'ü KT almıştı. KT genel grupta GS'yi anlamlı, PS'yi sınırda anlamlı arttırmaktaydı. MSI grupta KT GS'yi sınırda anlamlı attırdı (Grafik 4), PS'ı da arttırmakla birlikte anlamlı sonuç elde edilmedi. MSS grupta ise KT ile sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Tanıdan sonra uzak metastaz varlığı ile KT tedavisinin sağkalım üzerindeki etkileri tablo 34'te detaylandırılmıştır.

Tablo 34: Uzak metastaz ve KT'nin sağkalıma etkisi

Tanıdan sonra oluşan uzak metastaz		n (%)	GS (Ort. ay)	p	PS (Ort. ay)	p
Genel	Var	53 (17,7)	59,4	<0,001	30,8	<0,001
	Yok	300 (82,3)	103,7		104,8	
MSI	Var	9 (15,2)	93,4	0,399	55,6	0,013
	Yok	50 (84,8)	110,9		110,9	
MSS	Var	44 (15)	49,6	<0,001	23,7	<0,001
	Yok	250 (85)	100,2		101,8	
Kemoterapi		n (%)	GS (Ort. ay)	p	PS (Ort. ay)	p
Genel	Var	283 (80)	92,7	0,038	90,5	0,090
	Yok	70 (20)	84,4		84,2	
MSI	Var	47 (79,6)	113,7	0,078	111,2	0,173
	Yok	12 (20,4)	74,1		74,1	
MSS	Var	236 (80)	84,8	0,118	83,5	0,195
	Yok	58 (20)	86,6		86,4	



Grafik 4: MSI olgularda KT ile genel sağkalım ilişkisini gösteren Kaplan-Meier eğrisi

Prognostik verileri olan rektum yerleşimli 44 olgu neoadjuvan tedavi alırken 61 olgu almamıştı. Neoadjuvan tedavi alanlar anlamlı olarak daha uzun genel ve progresyonsuz sağkalıma sahip bulundu. Tedavi alan 44 olguda tedavi yanıtının genel ve progresyonsuz sağkalımla anlamlı ilişkisi saptanmadı.

Neoadjuvan tedavinin sağkalıma etkisi tablo 35'te gösterilmiştir.

Tablo 35: Neoadjuvan tedavinin sağkalıma etkisi

Neoadjuvan tedavi	n (%)	GS (Ort.ay)	p	PS (Ort.ay)	p
Var	44 (42)	106,800	0,012	104,674	0,014
Yok	61 (58)	76,553		74,134	
Yanıt skoru	n (%)	GS (Ort.ay)	p	PS (Ort.ay)	p
Skor 1	8 (14,8)	101,750	0,484	100,143	0,576
Skor 2	23 (42,6)	88,605		85,343	
Skor 3	23 (42,6)	105,890		103,846	

4.4 Sağkalım ile immün belirteçlerin ilişkisi

Çalışmada ele alınmış olan immün belirteçlerin uzak metastaz oluşumu ile ilişkilerini incelediğimizde;

STAT1'de herhangi bir pozitiflik saptanması durumunda tanı anında uzak metastaz bulunma olasılığı sınırdan anlamlı olarak daha az saptandı. Diğer belirteçler ile tanı anında uzak metastaz olması ya da tanı sonrasında uzak metastaz bulunması arasında anlamlı ilişki yoktu.

Tanı anında ve sonrasında oluşan uzak metastazlarla immün belirteçlerin ilişkisi tablo 36'da verilmiştir.

Tablo 36: Tanı anında ve sonrasında oluşan uzak metastazlarla immün belirteçlerin ilişkisi						
İHK	Skor	Durum	Tanı anında uzak met. n (%)	p	Sonradan uzak met. n (%)	p
CDX2	Negatif	Var	1 (1,7)	0,410	2 (3,8)	0,241
	Zayıf (+)		5 (8,6)		1 (1,9)	
	Güçlü (+)		52 (89,7)		50 (94,3)	
	Negatif	Yok	5 (1,7)		4 (1,3)	
	Zayıf (+)		13 (4,4)		17 (5,7)	
	Güçlü (+)		277 (93,9)		279 (93)	
BRAF	Negatif	Var	56 (96,6)	0,204	46 (86,8)	0,180
	Artı 1		0 (0)		4 (7,5)	
	Artı 2		1 (1,7)		3 (5,7)	
	Artı 3		1 (1,7)		0 (0)	
	Negatif	Yok	272 (92,2)		282 (94)	
	Artı 1		13 (4,4)		9 (3)	
	Artı 2		9 (3,1)		7 (2,3)	
	Artı 3		1 (0,3)		2 (0,7)	
SOX2	Negatif	Var	56 (96,6)	0,750	48 (90,6)	0,181
	Pozitif		2 (3,4)		5 (9,4)	
	Negatif	Yok	278 (94,2)		286 (95,3)	
	Pozitif		17 (5,8)		14 (4,7)	
STAT1 Nükleer	Negatif	Var	41 (70,7)	0,194	34 (64,2)	0,873
	Pozitif		17 (29,3)		19 (35,8)	
	Negatif	Yok	187 (61,7)		189 (63)	
	Pozitif		113 (38,3)		111 (37)	
STAT1 St.-1	Negatif	Var	39 (67,2)	0,327	35 (66)	0,639
	+1		10 (17,2)		13 (24,5)	
	+2, +3		9 (15,5)		5 (9,4)	
	Negatif	Yok	179 (60,7)		183 (61)	
	+1		78 (26,4)		75 (25)	
	+2, +3		38 (12,9)		42 (14)	
STAT1 St.-2	Negatif ve +1	Var	49 (84,5)	0,589	48 (90,6)	0,367
	+2, +3		9 (15,5)		5 (9,4)	
	Negatif ve +1	Yok	257 (87,1)		258 (86)	
	+2, +3		38 (12,9)		42 (14)	
STAT1 St.-3	Negatif	Var	39 (67,2)	0,347	35 (66)	0,487
	+1, +2, +3		19 (32,8)		18 (34)	
	Negatif	Yok	179 (60,7)		183 (61)	
	+1, +2, +3		116 (39,3)		117 (39)	
STAT1 (+/-)	Negatif	Var	38 (65,5)	0,077	29 (54,7)	0,970
	Pozitif		20 (34,5)		24 (45,3)	
	Negatif	Yok	156 (52,9)		165 (55)	
	Pozitif		144 (47,1)		135 (45)	

STAT1-sitoplazmik 3 boyanması erken evre tümörlerde sınırda anlamlı olarak daha fazlaydı. Diğer belirteçler ile klinik evre arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Neoadjuvan tedavi yanıtı ile immün belirteçler arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Klinik evre ile immün belirteçlerin ilişkisi tablo 37'de gösterilmiştir.

Tablo 37: Klinik evre ile immün belirteçlerin ilişkisi				
İHK	Skor	Klinik evre	n (%)	p
CDX2	Negatif	Erken evre (1,2)	1 (0,7)	0,376
	Zayıf (+)		7 (4,6)	
	Güçlü (+)		145 (94,8)	
	Negatif	İleri evre (3,4)	5 (2,5)	
	Zayıf (+)		11 (5,5)	
	Güçlü (+)		184 (92)	
BRAF	Negatif	Erken evre (1,2)	145 (94,8)	0,195
	+1		6 (3,9)	
	+2		1 (0,7)	
	+3		1 (0,7)	
	Negatif	İleri evre (3,4)	183 (91,5)	
	+1		7 (3,5)	
	+2		9 (4,5)	
	+3		1 (0,5)	
SOX2	Negatif	Erken evre (1,2)	146 (95,4)	0,557
	Pozitif		7 (4,6)	
	Negatif	İleri evre (3,4)	188 (94)	
	Pozitif		12 (6)	
STAT1 Nükleer	Negatif	Erken evre (1,2)	91 (59,5)	0,208
	Pozitif		62 (40,5)	
	Negatif	İleri evre (3,4)	132 (66)	
	Pozitif		68 (34)	
STAT1 St.-1	Negatif	Erken evre (1,2)	86 (56,2)	0,153
	+1		45 (29,4)	
	+2, +3		22 (14,4)	
	Negatif	İleri evre (3,4)	132 (66)	
	+1		43 (21,5)	
	+2, +3		25 (12,5)	

STAT1 St.-2	Negatif ve +1	Erken evre (1,2)	131 (85,6)	0,607
	+2, +3		22 (14,4)	
	Negatif ve +1	İleri evre (3,4)	175 (87,5)	
	+2, +3		25 (12,5)	
STAT1 St.-3	Negatif	Erken evre (1,2)	86 (56,2)	0,061
	+1, +2, +3		67 (43,8)	
	Negatif	İleri evre (3,4)	132 (66)	
	+1, +2, +3		68 (34)	
STAT1 (+/-)	Negatif	Erken evre (1,2)	77 (50,3)	0,126
	Pozitif		76 (49,7)	
	Negatif	İleri evre (3,4)	117 (58,5)	
	Pozitif		83 (41,5)	

Çalışmada ele alınmış olan immün belirteçlerin prognostik etkisini incelediğimizde;

Genel grupta ve MSI grupta CDX2 boyanması ile anlamlı bir veri elde edilmedi. MSS grupta ise CDX2'nin boyanma oranı ve şiddetiyle orantılı olarak genel ve progresyonsuz sağkalımın arttığı saptandı (Grafik 5).

BRAF ile boyanma oranı ve şiddeti arttıkça sağkalım düşme eğiliminde olsa da hiçbir grupta anlamlı farklılık saptanmadı.

SOX2 negatif olgularda üç grupta da sağkalımın yüksek olduğu izlense de anlamlı ilişki saptanmadı.

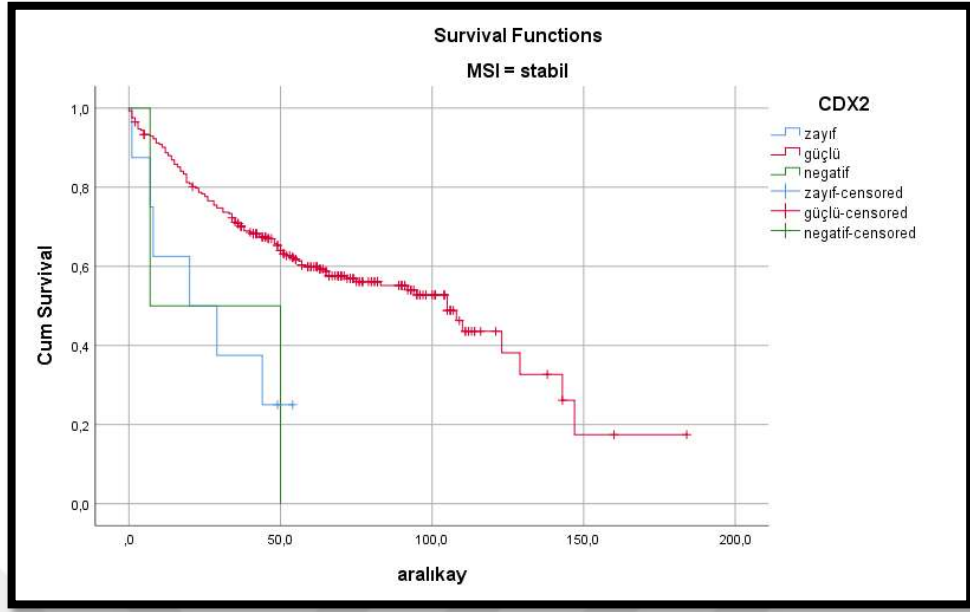
STAT1 nükleer pozitifliği ile genel grupta GS ile anlamlı (Grafik 6), PS ile sınırda anlamlı sağkalım oranları izlendi. MSS grupta da STAT1 nükleer pozitifliği sağkalım ile orantılı olup, sınırda anlamlı bulundu. MSI grupta ise anlamlı bir ilişki saptanmadı. STAT1 sitoplazmik-1 ve sitoplazmik-2 boyanmaları hiçbir grupta sağkalım ile anlamlı bir ilişki göstermedi. STAT1 sitoplazmik-3 ise sadece genel grupta sınırda anlamlı bir ilişki gösterdi. STAT1'de herhangi bir pozitiflik durumunda genel grupta sağkalım anlamlı, MSS grupta sınırda anlamlı olarak artma göstermekteydi. MSI grupta prognostik bir anlamlılık göstermedi.

Olguların immün belirteçlerle boyanma durumunun sağkalıma etkisi tablo 38'de detaylı olarak verilmiştir.

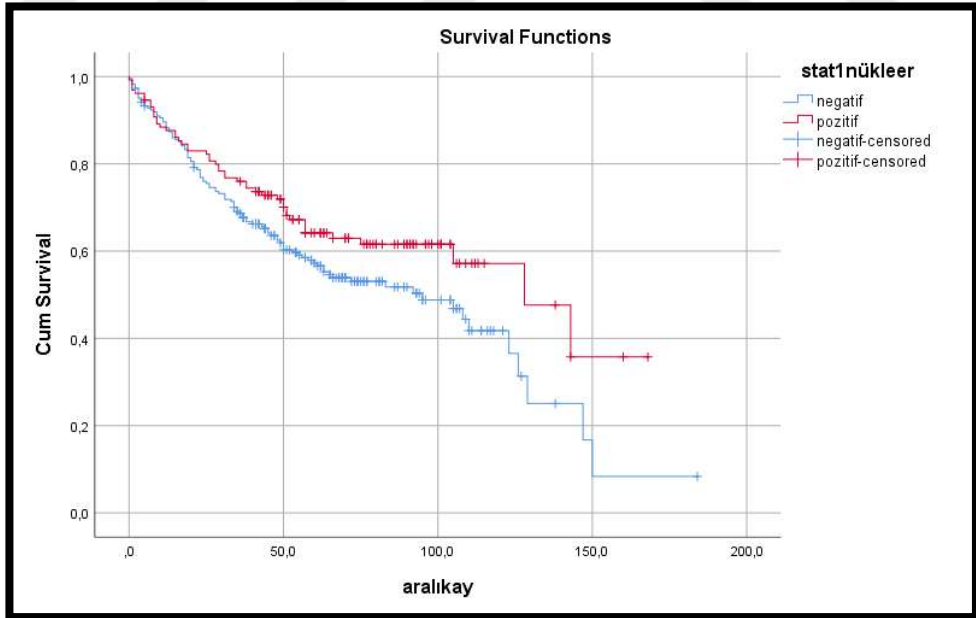
Tablo 38: İmmün belirteçlerin sağkalıma etkisi

İHK	Grup	Skor	n (%)	GS (Ort. ay)	p	PS (Ort. ay)	p
CDX2	Genel	Güçlü (+)	329 (93,2)	94,1	0,152	93,1	0,142
		Zayıf (+)	18 (5)	93,8		92,6	
		Negatif	6 (1,8)	41,2		34,8	
	MSI	Güçlü (+)	45 (76,2)	100,5	0,224	90,3	0,329
		Zayıf (+)	10 (17)	127,5		127,5	
		Negatif	4 (6,8)	52,7		52,7	
	MSS	Güçlü (+)	284 (96,6)	93,4	0,003	93,7	0,002
		Zayıf (+)	8 (2,7)	27,1		24,3	
		Negatif	2 (0,7)	28,5		13	
BRAF	Genel	Negatif	328 (93)	97,9	0,709	99,5	0,417
		+1	13 (3,6)	88,5		78,2	
		+2	10 (2,8)	67,7		63,4	
		+3	2 (0,6)	45		45	
	MSI	Negatif	52 (88,1)	103,2	0,836	101,8	0,840
		+1	1 (1,7)	150		126	
		+2	6 (10,1)	79,6		75,5	
		+3	-	-		-	
	MSS	Negatif	276 (93,9)	95,7	0,427	97,7	0,218
		+1	12 (4)	81,3		74,2	
		+2	4 (1,3)	37		29	
		+3	2 (0,6)	45		45	
SOX2	Genel	Pozitif	19 (5,4)	83,8	0,526	81,2	0,546
		Negatif	334 (94,6)	95,9		95,4	
	MSI	Pozitif	6 (10,2)	72,8	0,790	71,2	0,916
		Negatif	53 (89,8)	105,1		101,3	
	MSS	Pozitif	13 (4,4)	79,8	0,502	75,6	0,424
		Negatif	281 (95,6)	93,2		93,8	
STAT1 Nükleer	Genel	Pozitif	130 (36,9)	105,1	0,049	103,6	0,053
		Negatif	223 (73,1)	86,1		84,6	
	MSI	Pozitif	26 (44)	108,9	0,591	106,5	0,520
		Negatif	33 (56)	99,9		88,1	
	MSS	Pozitif	104 (35,3)	100,9	0,070	100,3	0,087
		Negatif	190 (64,7)	82,1		82,3	
STAT1 St.-1	Genel	Negatif	218 (61,8)	86,1	0,147	85,2	0,175
		+1	88 (25)	103,1		100,1	

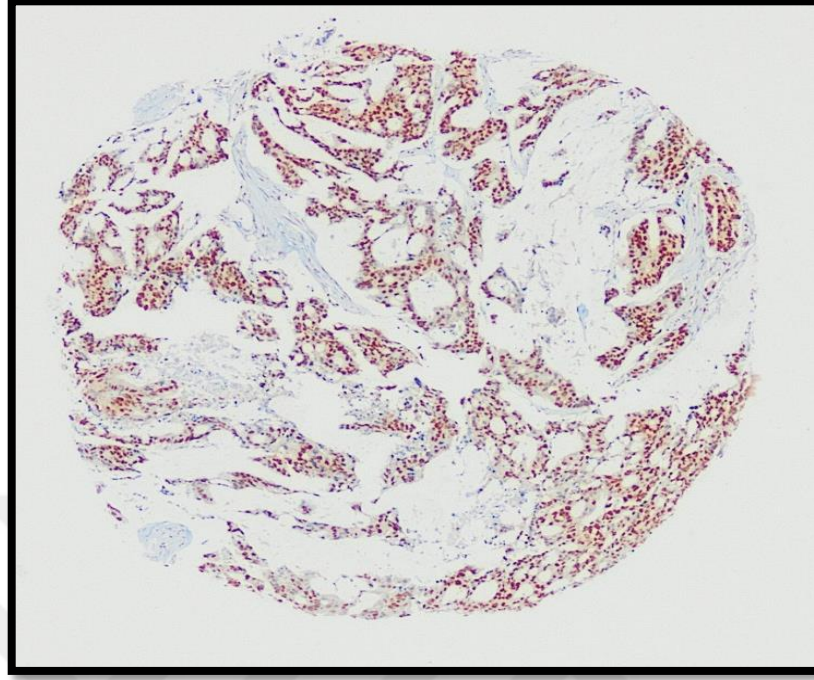
	MSI	+2, +3	47 (13,3)	102,9	0,473	101,4	0,607
		Negatif	34 (57,6)	89,9		84,7	
		+1	11 (18,6)	124,1		104,4	
	MSS	+2, +3	14 (23,7)	117,5	0,263	112,5	0,281
		Negatif	184 (62,6)	83,5		83,7	
		+1	77 (26,2)	100,9		99,5	
		+2, +3	33 (11,2)	74,5	0,586	70,6	0,706
		Negatif	306 (86,7)	92,9		92,1	
		+2, +3	47 (13,3)	102,9		101,4	
STAT1 St.-2	MSI	Negatif	45 (76,2)	99,7	0,680	90,3	0,753
		+2, +3	14 (23,8)	117,5		112,5	
	MSS	Negatif	261 (88,8)	92,1	0,910	92,1	0,996
		+2, +3	33 (11,2)	74,5		70,6	
		Negatif	218 (61,8)	86,1	0,056	85,2	0,075
		+1, +2, +3	135 (38,2)	103,3		100,9	
STAT1 St.-3	MSI	Negatif	34 (57,6)	89,9	0,246	84,7	0,353
		+1, +2, +3	25 (42,4)	120,6		110,3	
	MSS	Negatif	184 (62,6)	83,5	0,131	83,7	0,152
		+1, +2, +3	110 (37,4)	96,9		96,3	
		Pozitif	159 (45)	102,3	0,025	100,1	0,034
		Negatif	194 (55)	85,2		85,1	
STAT1 (+/-)	MSI	Pozitif	29 (49)	113,2	0,311	105,7	0,394
		Negatif	30 (51)	90,3		85,6	
	MSS	Pozitif	130 (44,2)	98,3	0,051	98,1	0,060
		Negatif	164 (56,8)	81,4		81,5	
		Pozitif	159 (45)	102,3	0,025	100,1	0,034
		Negatif	194 (55)	85,2		85,1	



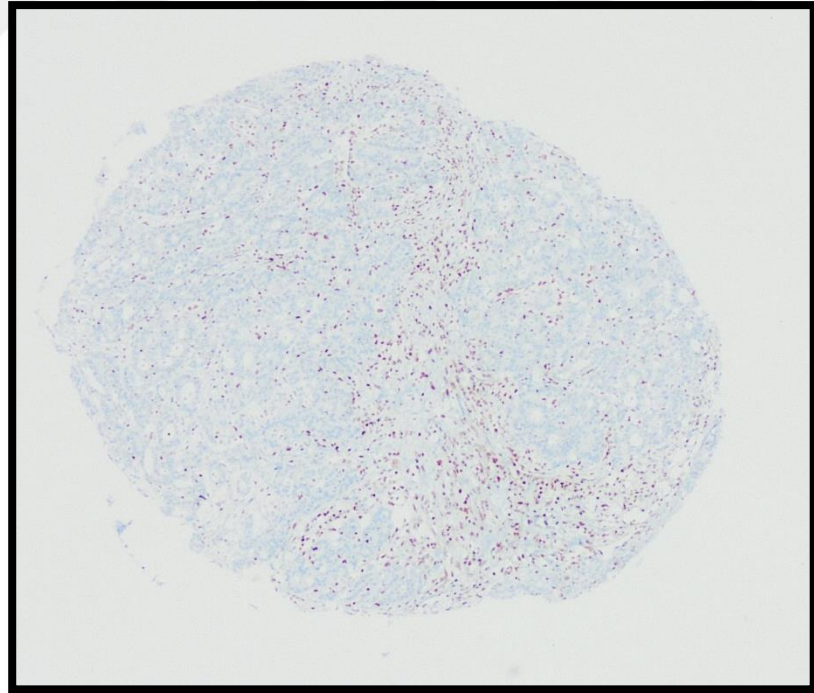
Grafik 5: MSS olgularda CDX2 ekspresyonu ile genel sağkalım ilişkisini gösteren Kaplan-Meier eğrisi



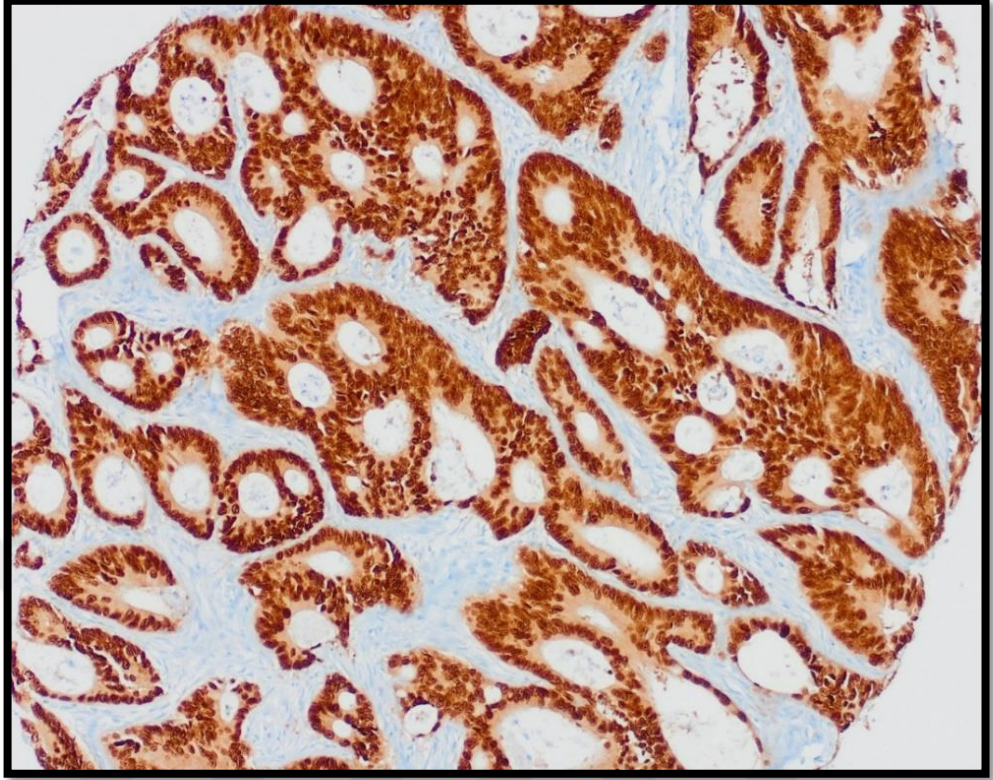
Grafik 6: Genel grupta STAT1 nükleer ekspresyonu ile genel sağkalım ilişkisini gösteren Kaplan-Meier eğrisi



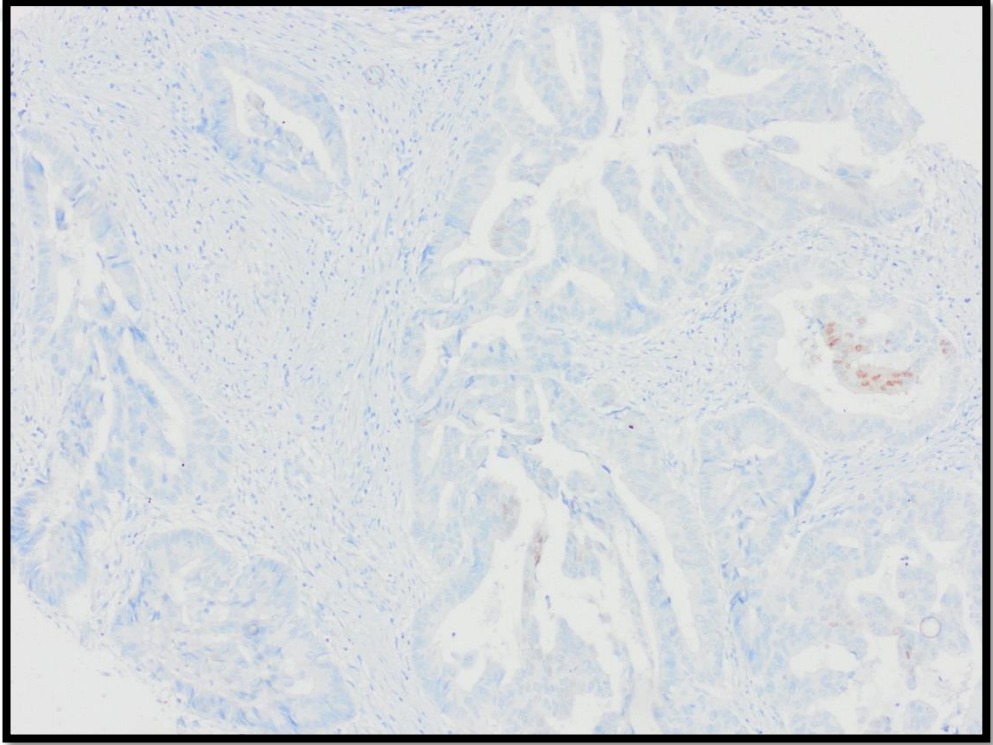
Resim 1. PMS2 pozitif KRK olgusu (x40)



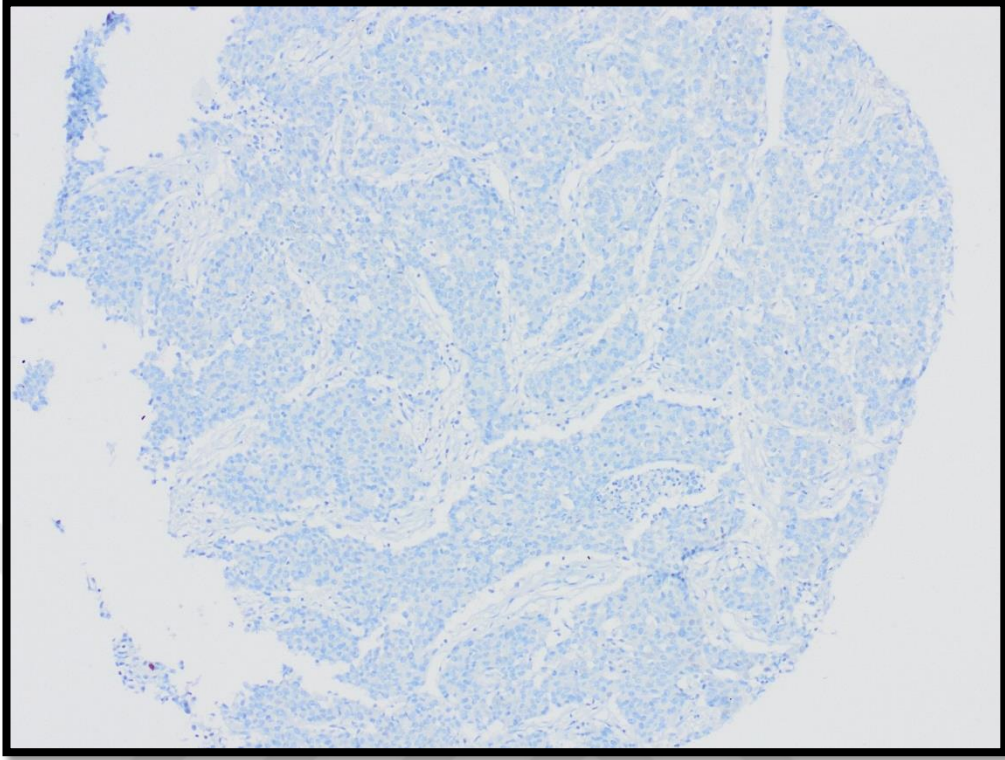
Resim 2. İnternal kontrolü olan MLH1 negatif KRK olgusu (x40)



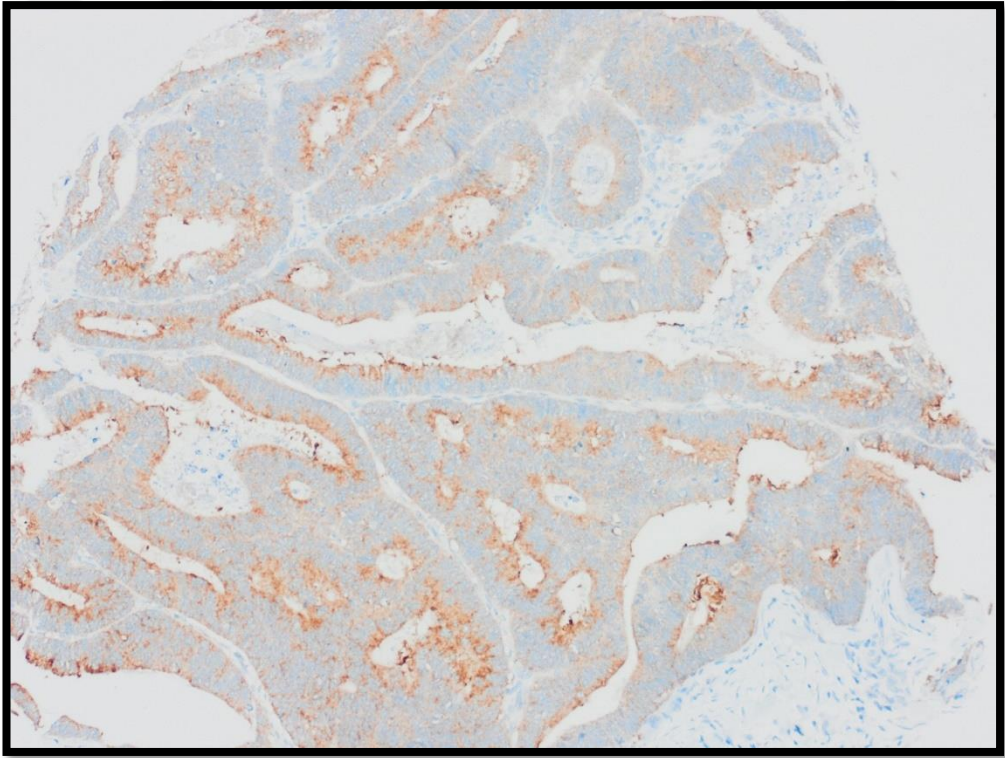
Resim 3. CDX2 güçlü pozitif KRK olgusu (x100)



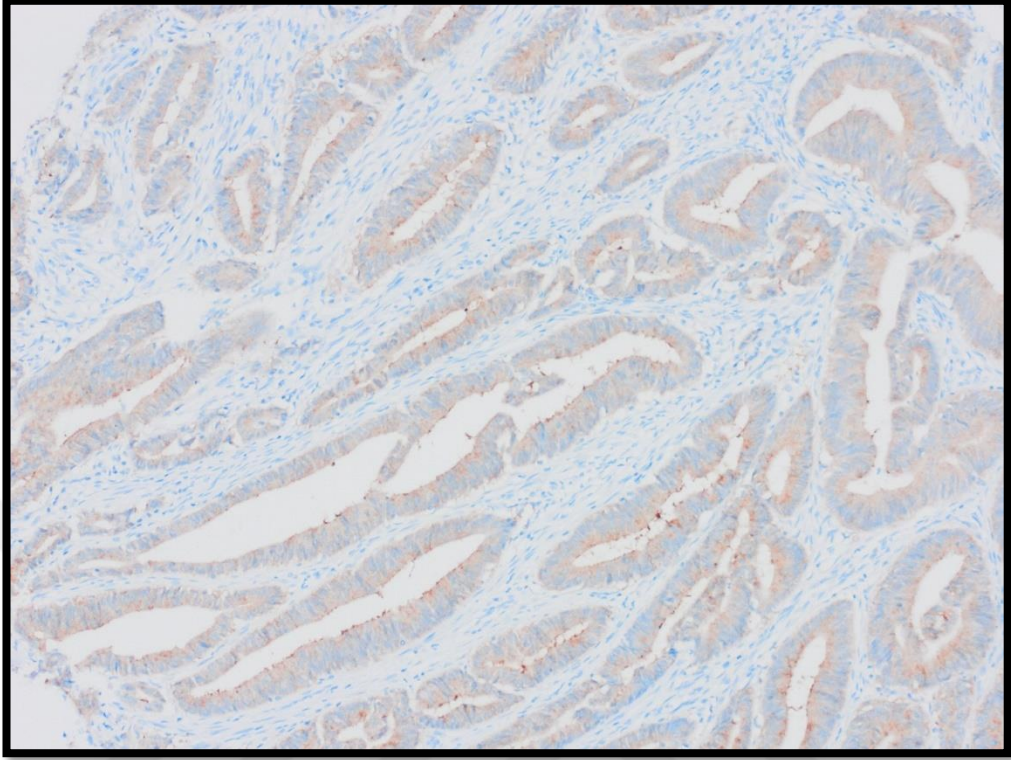
Resim 4. CDX2 zayıf pozitif KRK olgusu (x100)



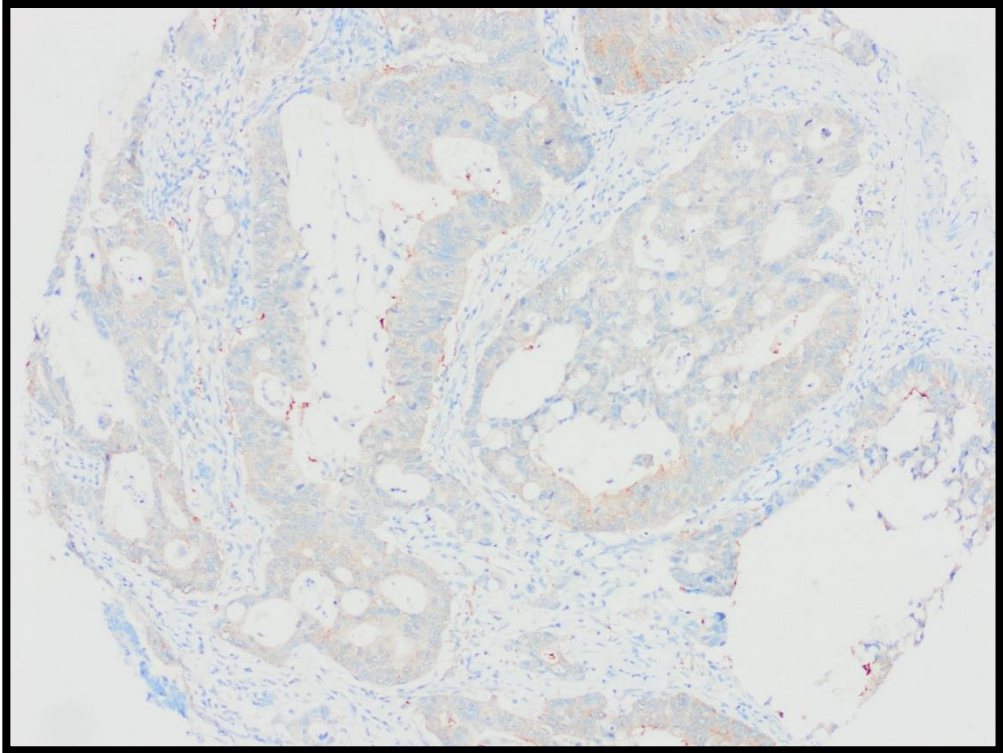
Resim 5. CDX2 negatif KRK olgusu (x100)



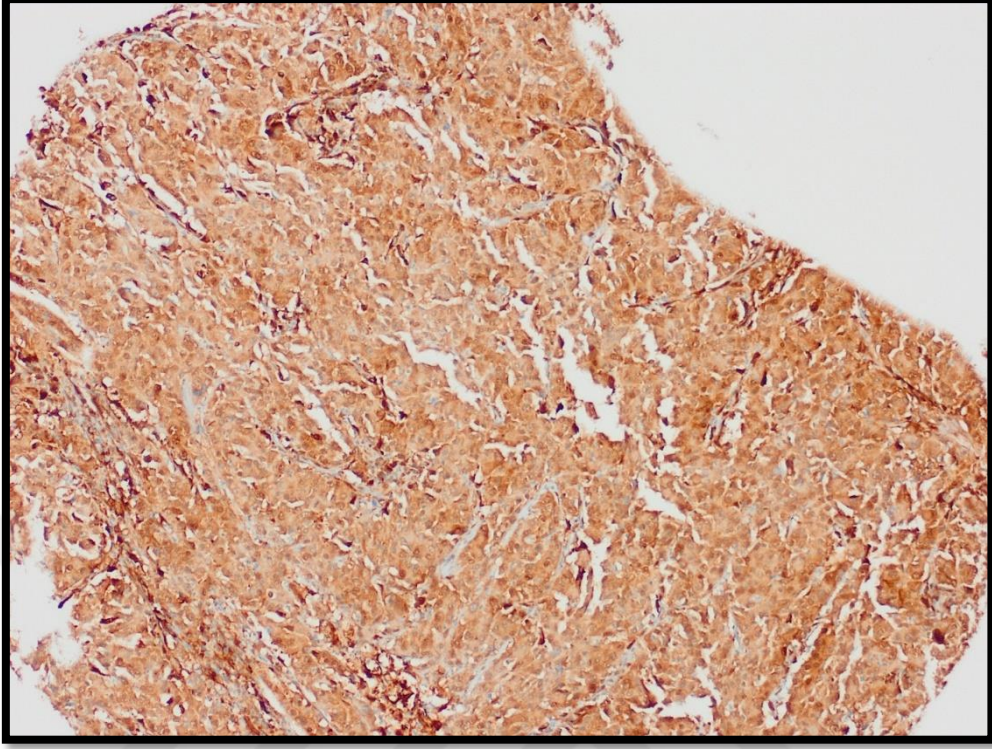
Resim 6. BRAF +3 pozitif KRK olgusu (x100)



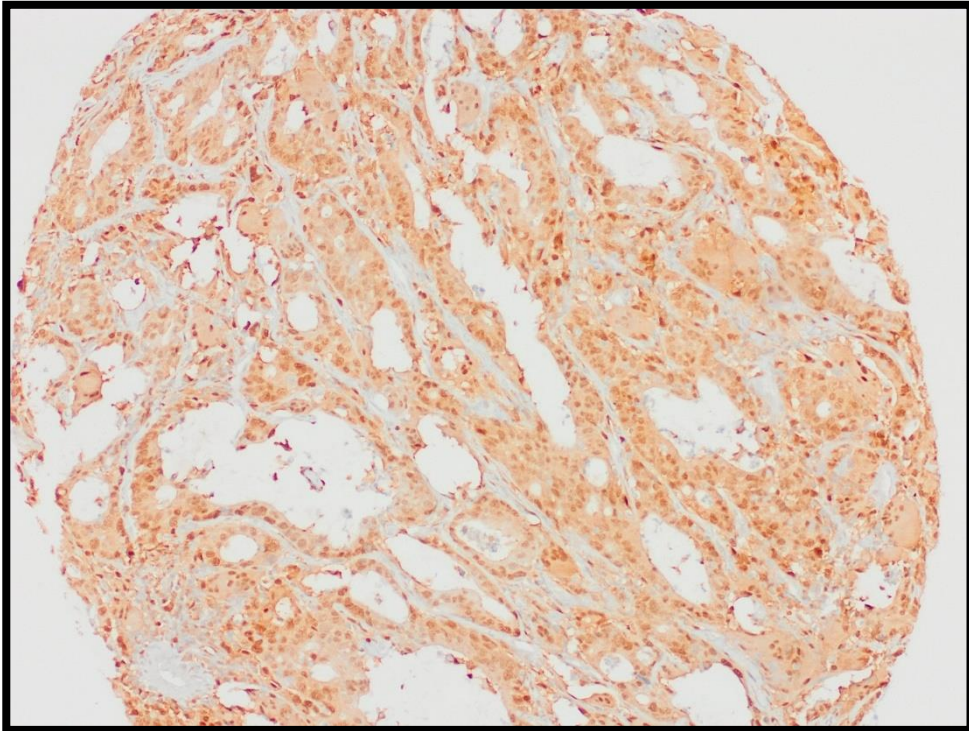
Resim 7. BRAF +2 pozitif KRK olgusu (x100)



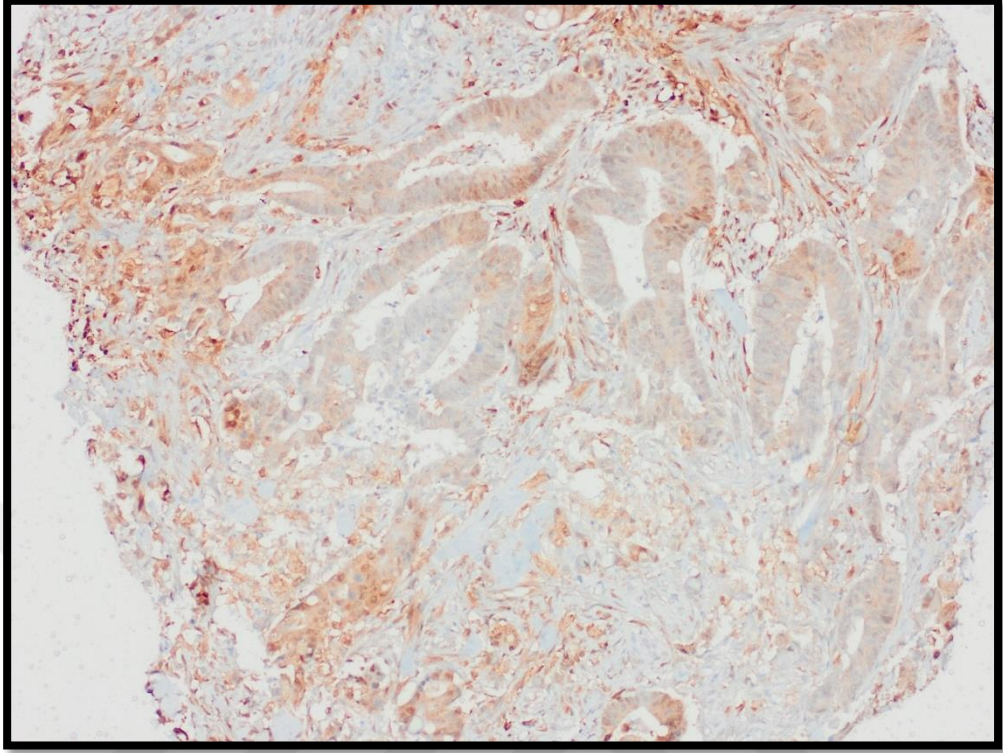
Resim 8. BRAF +1 pozitif KRK olgusu (x100)



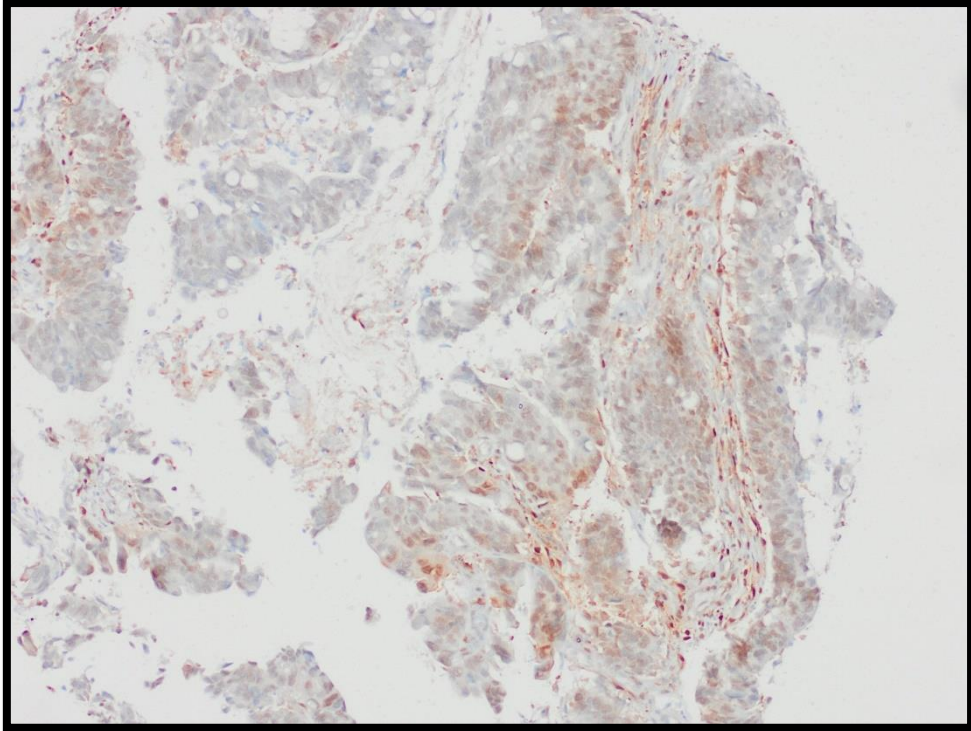
Resim 9. STAT1; nükleer pozitif, sitoplazmik +3 boyanan KRK olgusu



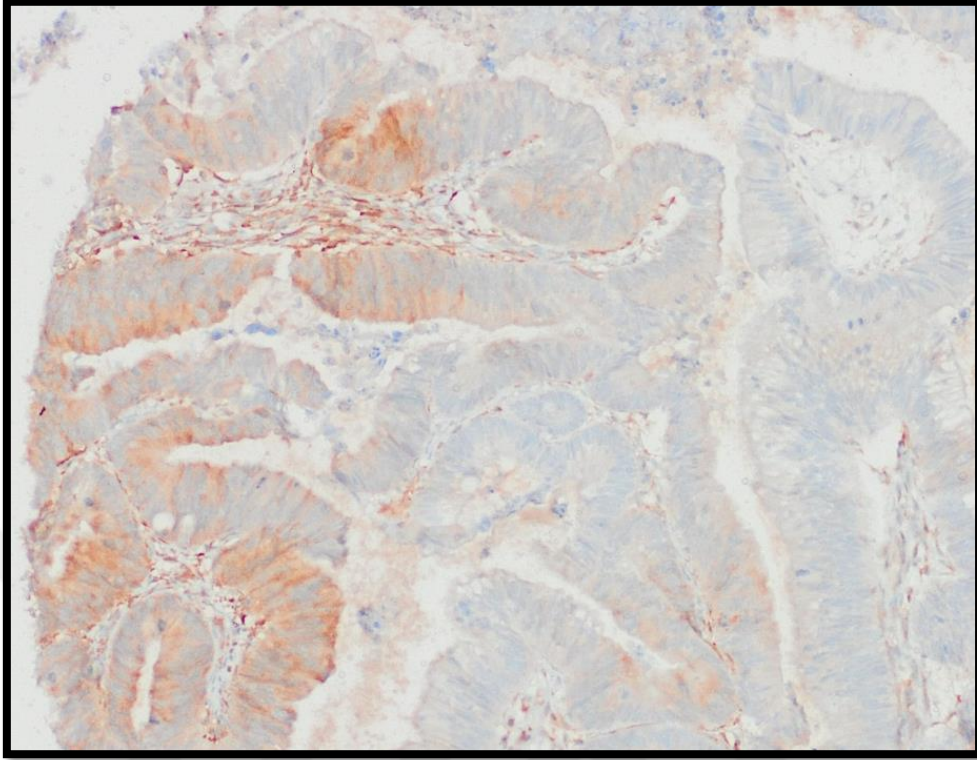
Resim 10. STAT1; nükleer pozitif, sitoplazmik +2 boyanan KRK olgusu (x100)



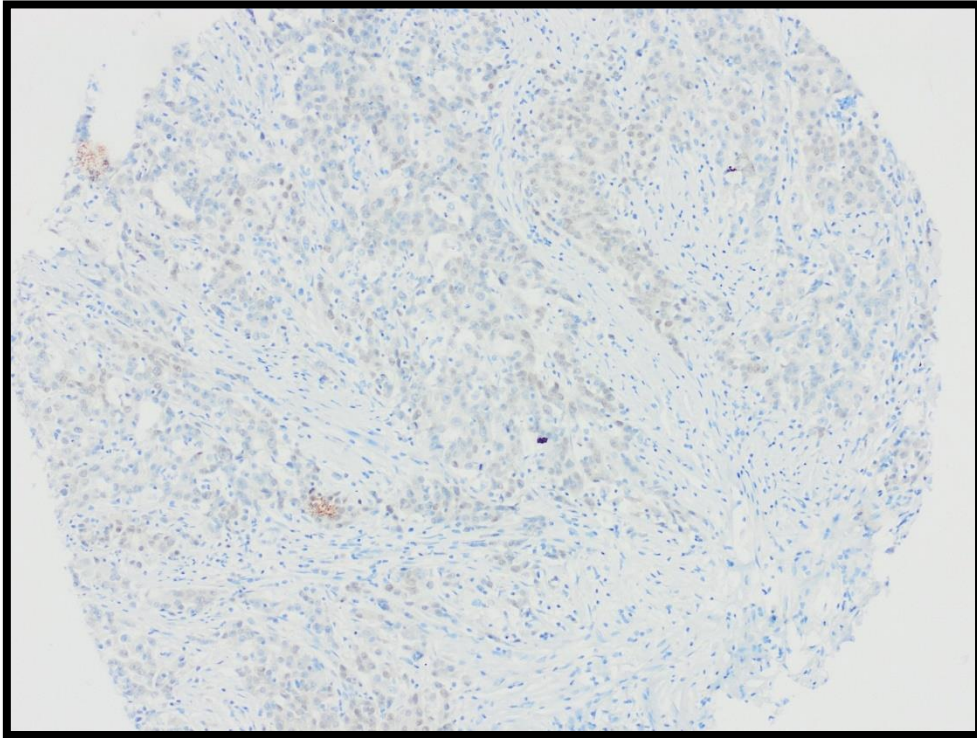
Resim 11. STAT1; nükleer pozitif, sitoplazmik +1 boyanan KRK olgusu (x100)



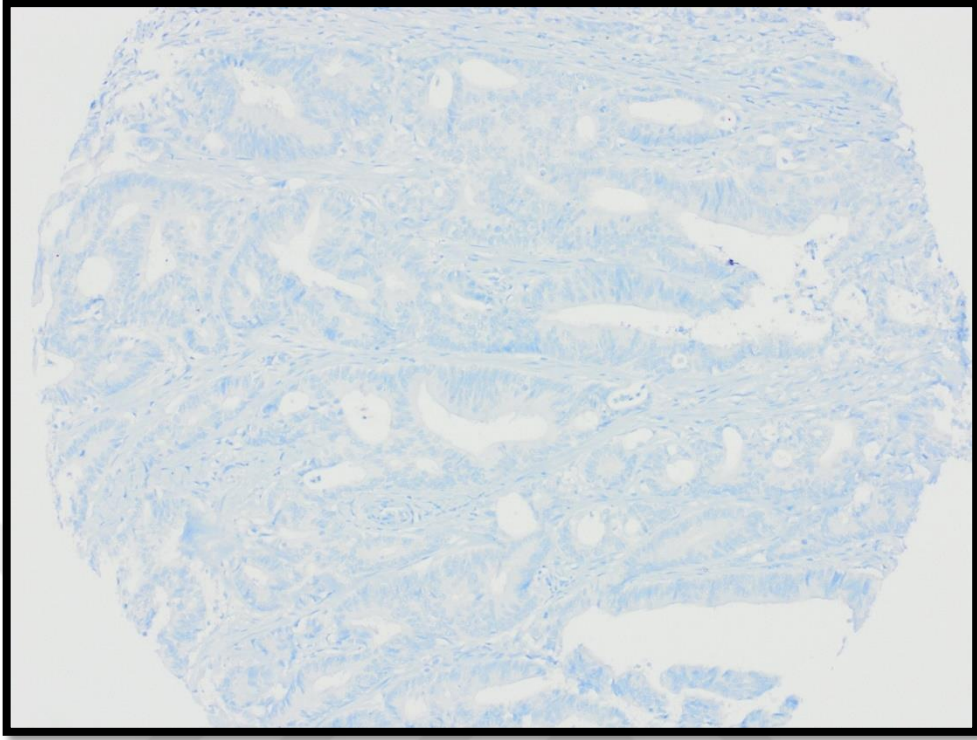
Resim 12. STAT1; nükleer pozitif, sitoplazmik negatif KRK olgusu (x100)



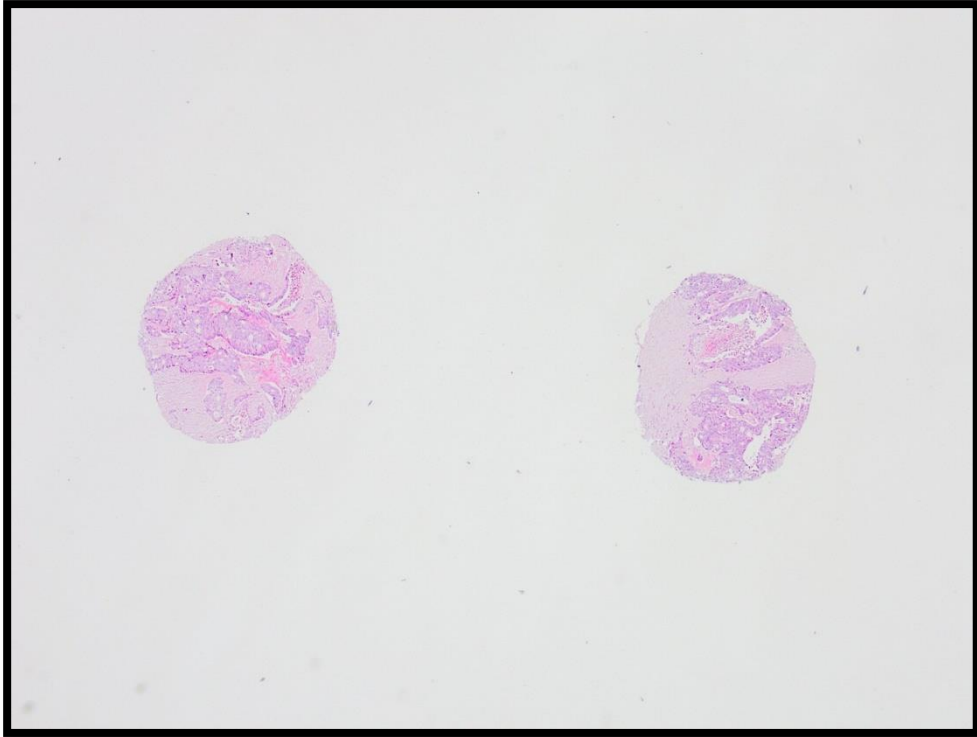
Resim 13. STAT1; nükleer negatif, sitoplazmik +1 boyanan KRK olgusu (x100)



Resim 14. SOX2 pozitif KRK olgusu (x100)



Resim 15. SOX2 negatif KRK olgusu (x100)



**Resim 16. Mikroarray bloğundan elde edilmiş H&E kesitte
ardışık iki KRK olgusu**

V.TARTIŞMA

Kolorektal karsinogenezde mikrosatellit instabilite yolağı, kromozomal instabilite yolağından sonra tanımlanmış ve hakkında çok çalışma yapılmakla birlikte halen daha yeni bulguların elde edildiğı bir çalışma alanıdır. Bu karsinogenez yolakları, klinik yansımaları farklı olan tümörler oluştururlar. MSS yani kromozomal instabil olgular, MSI olgulara göre belirli kemoterapi ajanlarına daha iyi yanıt verirken, immünoterapiye kötü yanıt verirler. MSI olgular ise daha iyi prognozla ilişkili olup farklı klinik ve patolojik özelliklere sahiptir. Bu yolakları daha iyi tanımlamak, farklı klinik sürece sahip bu iki tümör grubunda prognostik olabilecek immün belirteçleri araştırmak, hem tedavi yaklaşımını yönlendirmeye, hem de patogenezi daha iyi anlamlandırmaya yardımcı olacaktır. Bu fikirlerle yola çıkarak çalışmamızda, MSI ve MSS tümörler geniş bir klinikopatolojik ve histopatolojik parametre grubuyla incelenmiş ve karşılaştırılmış, prognostik anlamı olabilecek CDX2, BRAF ve kanserlerde daha yeni yeni çalışılmaya başlanmış SOX2 ve STAT1 protein ekspresyonlarının bu tümörlerde sağkalım ve diğer histopatolojik parametrelerle ilişkisi değerlendirilmiştir.

KRK'lar sıklıkla 65-74 yaşları arasında görülmekte olup, ortalama görülme yaşı 67'dir (232). Çalışmamızda yer alan olguların ortalama yaşı 62,65 olup, literatür ortalama yaşına göre daha düşük bulunmuştur. Ancak Vuik ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada son 25 yıl içerisinde 50 yaş altındaki popülasyonda kolorektal kanser insidansında artış görüldüğü tespit edilmiştir (233). Goldstein ve ark. 55 adet MSI-H olguyu ele aldıkları bir çalışmada olguların yaş ortalamasını 67 olarak saptamışlardır (234). Yapılan diğer çalışmalarda tanı anında hasta yaşı açısından MSI ve MSS olgu grupları arasında fark olmadığı gösterilmiştir (235, 236). Bizim çalışmamızda

da MSI olguların yaş ortalaması 61,25, MSS olguların 62,98 olup aralarında anlamlı fark bulunmamıştır. Mikrosatellit instabil sporadik kolorektal kanser patogenezinin sorumlu DNA metilasyonu yaşla ilişkili bir fenomendir ve bu nedenle MSI sporadik kolorektal kanserler yaşlılarda daha sık izlenir.

Çalışmalar, MLH1 geninde ekspresyon kaybının genç olgular arasında oldukça nadir olduğunu göstermektedir. Bu açıdan Lynch sendromu ile sporadik MSI KRK ayırımında tanı yaşı önemli bir özelliktir (237).

Çalışmamıza dahil olguların Lynch sendromu açısından taranıp taranmadığı konusunda hasta kayıtlardan bilgi edinilememiştir. Ayrıca Lynch sendromu ile ilgili tanı kriterleri ve tarama yöntemleri son yıllarda kesinlik kazandığı için olgularımızın bir grubunun bu açıdan hiç araştırılmamış olması mümkündür. Bu durum genç yaş olgularımızdan birkaçının Lynch sendromu olabileceğini düşündürür ki bu da yaş ortamımızı biraz düşürmüş olabilir. McKay ve ark. ileri yaştan KRK prognozunda olumsuz bir faktör olduğunu bildirmişlerdir (238). Yine bir meta analizde MSI olgularda ileri yaştan kötü klinik gidişe sahip olduğu bildirilmektedir (239). Çalışmamızda MSI grupta genç hastalarda genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. MSS grupta ise gençlerde genel sağkalım süresi sınırda anlamlılık göstermektedir. Yaştan KRK'larda genel olarak sağkalımı kötü etkilediği bilinmesine karşın MSI ve MSS olgularda, ayrı ayrı yaştan prognoza etkisi açısından daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

KRK'lar, çoğunlukla distal kolon ve rektum yerleşimli olmaktadır (66). MSI tümörler ise sağ kolonda daha sık saptanır, bu oran Türkiye'de yapılmış bir çalışmada sağ kolonda %82,1, sol kolonda ise %17,9 olarak bildirilmiştir (240). Kang ve ark. ise çalışmalarında MSI tümörlerin %68 oranında proksimal kolon yerleşimli olduğunu göstermişlerdir (241). Çalışmamızda tüm olguların %68,3'ü sol kolon yerleşimli, MSI tümörlerin %52,8'i sağ kolon, %47,2'si sol kolon; MSS tümörlerin ise %23,7'si sağ kolon, %76,3'ü sol kolon yerleşimli olup, MSI tümörler anlamlı olarak daha sıklıkla sağ kolon yerleşimli bulunmuştur. Yerleşim yeri ile ilgili bulgularımız MSI tümörlerin proksimal yerleşimli olduklarını göstermiş olup, literatür ile uyumlu izlenmiştir. Petrelli ve ark. bir meta-analiz çalışmasında sol kolon yerleşimli KRK hastalarının

daha uzun sağkalıma sahip olduğunu saptamışlardır (242). Bizim çalışmamızda MSI olgularda sağ kolon yerleşimi sağkalımı anlamlı olmasa da arttırmaktaydı. MSS olgularda ise yerleşim ile sağkalım arasında ilişki saptamadık. MSI ve MSS olgularda tümör lokalizasyonunun sağkalıma etkisi konusunda kesinliğe ulaşmak için daha çok verinin incelenmesi gereklidir.

Literatürde MSI'nın, kadın cinsiyet ve sağ kolon yerleşimi gibi klinik parametrelerle ilişkili olduğu bildirilmektedir (243-245). Batur ve ark. 145 olgu üzerinden yaptıkları bir çalışmada MSI saptanan olguların daha sık sağ kolonda yerleşim gösterdiklerini, MSI ve kadın cinsiyet arasında anlamlı ilişki bulunduğunu göstermişlerdir (240). Lin ve ark. da MSI tümörlerin özellikle sağ kolonda yerleşim gösterdiği, ancak MSI ve MSS gruplar arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı fark olmadığını saptamışlardır (246). KRK'da erkek cinsiyet, sağkalımda kötü prognostik etkiye sahiptir (247). White ve ark. KRK'da erkek olmanın kötü klinik gidişle ilişkili olmasını, erkeklerin daha fazla ekzojen ve endojen risk faktörüne maruz kalmasına bağlamaktadırlar (248). Ancak bizim çalışmamızda MSI olguların %40,5'i, MSS olguların ise %39,8'ini kadınlar oluşturmakta olup cinsiyet ile mikrosatellit instabilite durumu açısından anlamlı ilişki saptanmamıştır. Çalışmamızda erkek olgularda hem MSS grupta, hem de MSI grupta anlamlı olmasa da daha uzun sağkalım süreleri gözlemlenmiştir. Bu durumun sosyokültürel sebeplerden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür.

MSI; MMR genlerinin "germline" mutasyonu ile karakterize Lynch sendromuna sahip bireylerin büyük kısmında, sporadik kolorektal kanserlerin ise %15'inde izlenmektedir (249). Ancak literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında, tüm KRK'lar içinde MSI tümörlerin oranı çeşitli değişkenler ve sınırlamalar nedeniyle %9-28 gibi geniş bir aralıkta görülmektedir (250, 251). Çalışmamızda %19,1 olarak saptadığımız MSI oranımız, literatürde bildirilen oranlarla benzerlik göstermektedir.

Liang ve ark. çalışmalarında MSI tümörlerin ortalama çapını 60 mm, MSS tümörlerin ise 45 mm bulmuşlar, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu saptamışlardır (252). MSI tümörlerin çapının daha büyük olduğunu

saptayan diğer yayınlar yanı sıra KRK'larda tümör boyutunun lenf nodu metastazı ve ileri T evre ile ilişkili olduğunu ve sağkalımı olumsuz etkilediğini bildiren yayınlar da bulunmaktadır (253, 254). Çalışmamızda MSI tümörlerin ortalama boyutu 57,32 mm, MSS tümörlerin ise 44,33 mm olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Sonuçlarımız literatürde bildirildiği gibi MSI tümörlerin daha büyük boyutta olduğunu doğrular niteliktedir. Çalışmamızda tüm olguları ele aldığımız genel grupta ve MSI grupta boyut arttıkça sağkalım anlamlı olmasa da düşmekte iken, MSS grupta boyut ile sağkalım arasında ilişki saptanmamıştır. Bu iki tümör grubu arasında tümör boyutunun prognostik etki farkını açıklayabilmek için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Tümör perforasyonu MSS KRK'larda iyi bilinen kötü prognostik faktörlerden biridir. 2015 yılında yalnızca MSI KRK'lar üzerinde yapılan bir çalışmada barsak obstrüksiyonunun kötü prognozla ilişkili bulunduğu saptanmıştır (255). Çalışmamızda MSI olgularımız MSS olgularımızdan daha az olmasına rağmen MSI olgularda tümör perforasyonunun sağkalımı anlamlı, MSS olgularda ise sınırdan anlamlı olarak düşürdüğü saptanmıştır. Bu sonuca dayanarak MSI tümörlerde tümör perforasyonunun prognostik etkisinin MSS tümörlere kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir. MSI tümörler daha derin invazyon yaptıkları ve tümör perforasyonu durumunda karın içine yayılma olasılıklarının daha fazla olması nedeniyle bu sonucun ortaya çıkmış olabileceği düşünülmüştür. Ancak literatürde MSI tümörlerde tümör perforasyonunun prognostik değerini araştıran çok az çalışma bulunduğu için ulaştığımız sonuçların yeni çalışmalarla desteklenmesi gereklidir.

Xiao ve ark. çalışmalarında MSI tümörlerin MSS tümörlere kıyasla daha kötü diferansiye olduğunu göstermişlerdir. Yine bu çalışmalarında MSI kötü diferansiye tümörlerin, MSS kötü diferansiye tümörlere göre daha sık sağ kolon yerleşimli ve daha büyük boyutlu olduğunu, daha az sıklıkta lenf nodu metastazı yaptığını belirtmişlerdir (251). MSI tümörlerin daha kötü diferansiye olduğunu gösteren yayınlar çok sayıda olmakla birlikte az sayıda yayında da kötü diferansiye tümörler ile MSI ilişkisi saptanamamıştır (241, 252, 256). Rosty ve ark. tarafından yapılan çalışmada kötü diferansiasyonun

yalnızca MSS tümörlerde sağkalıma olumsuz yönde etki ettiği görülmüştür. Bu sonucu MSI'nın prognoza olumlu etkisinin, kötü diferansiasyonun olumsuz etkisinden daha güçlü olmasına bağlamışlardır. Bu nedenle kötü diferansiye tümörlerde MSI durumunun göz önünde bulundurulmasının önemini vurgulamışlardır (257). Çalışmamızda MSI gruptaki tümörler %73 oranında iyi, %27 oranında az diferansiye, MSS gruptaki tümörler %91,9 oranında iyi, %8,1 oranında az diferansiye olup, MSI tümörler anlamlı olarak daha az diferansiye izlenmiştir. Tümör diferansiasyonu arttıkça genel grupta ve MSS olgularda anlamlı olarak sağkalım artmasına karşın, MSI grupta sağkalımda anlamlı değişiklik izlenmemiştir. Bulgularımız MSI durumunun prognoz üzerinde diferansiasyondan daha etkili olduğu yönündeki literatür bilgilerini destekler nitelikte görünmektedir.

MSI kolorektal kanserler, az diferansiye olma eğilimi yanı sıra diğer tümörlere göre daha sık müsinöz komponent ve taşlı yüzük hücre komponenti içerirler (258, 259). Benatti ve ark.'nın çalışmasında MSI tümörler ile sağ kolon yerleşimi, ekspansif büyüme, kötü diferansiasyon, müsinöz diferansiasyon, ve erken evre arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (164). Bizim çalışmamızda da MSI tümörlerin %11,5'i, MSS tümörlerin %4,6'sı müsinöz adenokarsinom morfolojisinde olup, MSI tümörler anlamlı olarak daha fazla müsinöz adenokarsinom morfolojisi sergilemekteydiler. Olgularımızda fokal müsinöz diferansiasyon ise MSI tümörlerde bir miktar fazla saptanmakla birlikte iki grup arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Bulgularımız literatür verileriyle uyumlu görünmektedir. MSI tümörlerde müsinöz morfolojinin önemi anlaşıldığı için literatürde KRK'ları müsinöz ve non-müsinöz adenokarsinomlar olarak ayıran ve müsinöz morfolojinin prognostik etkisini araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan Park ve ark.'nın yaptığı 6475 olgudan oluşan çalışmada, müsinöz morfolojinin genç hasta yaşı, büyük tümör boyutu, sağ lokalizasyon ve MSI ile ilişkili olduğu saptanmış ve 5 yıllık genel sağkalımı anlamlı olarak azalttığı görülmüştür (260). Müsinöz morfolojinin etkisini araştırmak için biz de çalışmamızdaki tümörleri non-müsinöz ve müsinöz olarak gruplandırdığımızda, MSI ve MSS grupta non-müsinöz tümörlerin daha uzun GS ve PS gösterdikleri izlenmiş

fakat yalnızca MSS olgularda GS'de anlamlı, PS'de ise sınırdan anlamlı sonuç elde edilmiştir. Bize göre MSI grupta istatistiksel anlamlılık elde edilemeyişinin en önemli nedeni müsinöz adenokarsinom histolojisine sahip MSI olgu sayımızın az olmasıdır. Bulgularımız farklı yayınlarda tartışılmış olan müsinöz morfolojinin olumsuz prognostik özellikleri ile ilgili verileri destekler niteliktedir. Çalışmamızda fokal müsinöz diferansiasyonun ise her iki grupta da sağkalımı bir miktar azaltmakla birlikte, anlamlı olarak değıştirmediği saptanmıştır.

LVİ potansiyel prognostik bir belirleyici olup lenf nodu metastazı ile ilişkili bir parametredir (261). Lim ve ark. 2417 kolorektal kanser olgusunu inceledikleri çalışmalarında %25,2 oranında LVİ saptamışlardır ve LVİ varlığının ileri yaş, ileri T ve N evresi, uzak metastaz varlığı ile ilişkili olduğu sonucuna varmış, 5 yıllık genel ve hastalıksız sağkalım açısından bağımsız kötü bir prognostik faktör olduğunu göstermişlerdir (99). Ancak literatürde PNİ ve LVİ açısından mikrosatellit instabilite durumu tartışmalıdır. MSI gösteren tümörlerin genel olarak PNİ ve LVİ gibi kötü prognostik parametrelerden bağımsız iyi prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bizim çalışmamızda LVİ açısından iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Çalışmamızda LVİ varlığında MSS olgularda genel ve progresyonsuz sağkalım anlamlı olarak azalmakla birlikte MSI olgularda anlamlı fark saptanmamıştır.

PNİ da agresif tümör fenotipi ile ilişkili olup kötü prognoza işaret eder (262). Parc ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 142 olgunun %17'sinde MSI saptanmış, MSI ve MSS gruplar arasında yaş, LVİ, PNİ ve venöz invazyon açısından anlamlı fark olmadığı görülmüştür (245). Ancak Wright ve ark. 458 KRK olgusunu inceledikleri çalışmalarında MSS olgularda LVİ ve PNİ oranının istatistiksel anlamlı olarak daha fazla olduğunu göstermişlerdir (263). Knijn ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise PNİ %18.2 oranında saptanmış olup; artmış lokal rekürrens ve azalmış 5 yıllık sağkalım ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (105). Bizim çalışmamızda perinöral invazyon MSS tümörlerde anlamlı olarak daha sık izlenmiştir ve MSS tümörlerde PNİ oranının artmasıyla genel ve progresyonsuz sağkalımın anlamlı olarak

düştüğü saptanmıştır. Ayrıca PNI varlığında, MSI tümörlerde de sağkalım azalmakla birlikte anlamlı sonuç elde edilmemiştir. Hem LVI hem PNI açısından MSI grupta anlamlı sonuçlara ulaşamamasında, MSI olgu sayımızın nispeten düşük olmasının rol oynadığını düşünüyoruz.

Lokal immün anti-tümör savunma mekanizmaları, tümör mikroçevresinin oluşumu ve organizasyonunda belirleyici konumda olup, bu alandaki yangısal hücrelerin bileşimi ve oranı immün yanıtın kalitesini etkilemektedir (264). Klintrup ve ark. çalışmalarında MSI olguların %72.7'sinde, MSS olguların ise %50'sinde TIL varlığını saptamışlar, yüksek TIL varlığının 5 yıllık sağkalıma olumlu etkisi olduğunu göstermişlerdir (265). 281 kolorektal karsinomu içeren başka bir çalışmada da intratümöral TIL varlığının diferansiasyon, TNM evresi ve MSI ile belirgin şekilde ilişkili olduğu saptanmıştır (266). Tümörün derin invazyon alanında TIL varlığı metastaza karşı ilk savunma mekanizmasıdır. TIL varlığında lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ve metastazın da daha nadir görüldüğü ve hastaliksız sağkalımın daha uzun olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle TIL varlığının KRK progresyonunda önemli olduğu düşünülmektedir. MSI KRK'da TIL varlığının yüksek oranda görülmesi nedeni ile MSI tümörler daha erken evre ve daha iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir (264). KRK'lar üzerinde yapılan çalışmalarda tümörü infiltre eden lenfositler yanı sıra Crohn benzeri yangısal yanıtın da MSI tümörlerde daha sık izlendiği bulunmuştur (267, 268). Ogino ve ark. tümöre karşı gelişen immün yanıtın ileri yaş, proksimal yerleşim, daha az lenf nodu metastazı, yüksek tümör evresi, MSI ve BRAF mutasyonu ile ilişkili olduğunu saptamışlardır (269). Buckowitz ve ark. MSI varlığında Crohn benzeri yangısal yanıtın daha yüksek oranda görüldüğünü ve bu tümörlerin daha nadir olarak uzak metastaz yaptıklarını tespit etmişlerdir (270). İntratümöral ve peritümöral lenfosit KRK'larda sağkalımı arttırdığını bildiren başka yayınlar da bulunmaktadır (271). Çalışmamızda da immün anti-tümör yanıtı olarak intratümöral lenfosit, peritümöral lenfosit, Crohn benzeri lenfositik reaksiyon incelenmiştir. MSI tümörlerde Crohn benzeri yangısal yanıt bir miktar fazla bulunsa da her üç parametreyle MSI arasında anlamlı bir ilişki izlenmemiştir. Ayrıca çalışmamızda peritümöral lenfosit artışı

ile MSS grupta sağkalımın anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. Son olarak, intratümöral lenfositik yanıt ve Crohn benzeri yangısal yanıt ile MSI ya da MSS grupta sağkalım arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Tümöre karşı immün yanıtın varlığı, değerlendirilmesi gereken bir parametre olarak kabul edilmekle birlikte prognoza etkisi tartışmalı sonuçlar içermektedir. Bu konuda lenfositlerin daha spesifik olarak değerlendirilerek, lokalizasyon ve sayım alanını da standardize ederek çalışılması gerektiğini, Crohn benzeri yangısal yanıtın da daha belirgin kriterler eşliğinde değerlendirilmesi gerektiğini düşünüyoruz.

TT, literatürde yüksek tümör derecesi, ileri TNM evresi, lenfovasküler invazyon varlığı gibi agresif klinikopatolojik parametreler ile ilişkili olarak raporlanmaktadır (272-276). Van Wyk ve ark. çalışmalarında KRK'larda, tümör tomurcuklanmasının TNM evresi, serozal tutulum, venöz invazyon ile ilişkili olduğunu ve hem MSS, hem de MSI olgularda kanser spesifik sağkalımı azalttığını belirtmektedirler (277). Literatürde TT'nin MSS tümörlerde daha sık izlendiği bildirilmiştir (274, 276). Graham ve ark. da TT ile MSS tümörler arasında pozitif korelasyon olduğunu saptamış ve TT'nin ileri patolojik evre ve kansere bağlı artmış ölüm oranı ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu göstermişlerdir (112). Ayrıca farklı çalışmalarda TT oranı MSI tümörlerde MSS tümörlerdekine göre anlamlı derecede daha düşük saptanmıştır (278). Bizim çalışmamızda ise MSI ve MSS tümörleri TT açısından karşılaştırdığımızda anlamlı farklılık gösteren bir sonuç elde edilmemiştir. Ancak TT'nin MSS tümörlerde genel ve progresyonsuz sağkalımı anlamlı olarak azaltırken, MSI tümörlerde sağkalım ile anlamlı bir ilişki göstermediği saptanmıştır. Bu bulgulara dayanarak TT'nin MSI ve MSS tümörlerde farklı prognostik etkileri olabileceği düşünülmüştür. Öte yandan literatürde bu konuda çok çalışma bulunmakla birlikte, daha tutarlı, kıyaslanabilir sonuçlar elde edilebilmesi için tümör tomurcuklanma derecesinin değerlendirilmesinde daha standardize edilmiş yöntemler bulunması ve gözlemciler arası uyumsuzluğun azaltılması gerektiğini de vurgulamak isteriz.

KRK derecelendirmesinde kabul gören yöntem bez yapılarının varlığına göre yapılan derecelendirmedir (279). Ancak bu yöntemin objektif

değerlendirmedeki zorluklar ve tedavi açısından yetersiz prognostik değeri sebebiyle her zaman uygun olmayabileceği düşünülmektedir. Ueno ve ark. 2012 yılında, KRK'lar için yeni bir derecelendirme sistemi olarak PDC'leri öne sürmüşler ve bu antitenin tümörün biyolojik davranışını daha iyi yansıtabileceğini iddia etmişlerdir (116). Çalışmalarda PDC'lerin derece dağılımı, dahil edilen olguların evresine bağlı olarak oldukça değişken saptanmıştır (116, 280-285). Çalışmamızda olguların %24,8'inde düşük, %28,3'ünde orta, %46,3'ünde yüksek seviyede PDC saptanmıştır. Bonetti ve ark. çalışmalarında PDC oranının artmasının PNI ve LVI ile LN metastaz oranını arttırdığını, daha kısa GS ve PS ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştür (286). PDC'lerin, KRK olgularında ileri tümör derecesi, ileri T, N, M evreleri, LVI, EMVI ve PNI gibi agresif klinikopatolojik özellikler ile birliktelik gösterdiği bildirilmiştir (282-285, 287, 288). Lee ve ark. ise evre II KRK olgularını inceledikleri çalışmalarında yüksek riski ifade eden parametrelerle PDC'ler arasında ilişkili saptamışlardır (281). Kazama ve ark. PDC'lerden zengin MSI ve MSS olguları karşılaştırmışlar ve PDC derecesinin MSS olgularda prognozu daha kötü etkilediğini saptamışlardır (289). Ancak literatürde MSI KRK'larda yüksek derecede PDC'lerin 5 yıllık hastalıksız sağkalımı olumsuz etkilediğini belirten yayınlar da vardır (282). Çalışmamızda MSI olgularda PDC oranı daha yüksek izlenmekle birlikte iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir. PDC oranı arttıkça MSS olgularda GS'de anlamlı, PS'de sınırda anlamlı azalma saptanmıştır. Literatürde PDC'lerin MSI olgularda yeterince çalışılmadığı ve bu konuda net bir görüş birliği olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte bulgularımız, PDC'leri değerlendirirken MSI durumunu göz ardı etmemek gerektiğini düşündürmektedir.

Perikolik/perirektal yağ dokuda bulunan tümör nodülleri, rezidü lenf noduna ait herhangi bir histolojik bulgu içermiyorsa tümör depoziti (peritümöral depozit veya satellit nodül) olarak adlandırılmaktadır ve bu durumun kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bölgesel lenf nodu metastazı yokluğunda tümör depozitlerinin varlığı N1c olarak kategorize edilmektedir (93). Tümör depozitlerinin varlığı veya sayısı ile İMVİ, EMVİ,

PNİ, LVI ve LN metastazları arasında güçlü korelasyon olduğu gösterilmiştir (290). Zang ve ark. çalışmalarında, KRK'larda, MSI olguların tümör depoziti yoksa daha iyi prognozlu olduğunu, ancak tümör depoziti varsa MSS olgulardan farklı bir prognoz göstermediğini saptamışlardır. MSI durumunun tümör depoziti olmayan KRK olgularının prognozunda bir rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir (291). Bazı çalışmalar, tümör depozitlerinin sayısı ve çapının hastaların sağkalımı ile yüksek oranda ilişkili olduğunu öne sürmektedir (292). Bilindiği gibi hastaların genel ve hastalıksız sağkalım oranları hastalığın evresi ile yakın ilişki içindedir. Lenf nodu metastazına ilişkin kanıtların yokluğunda, tümör depoziti varlığı, olgunun evre III olarak sınıflandırılmasıyla sonuçlanır ve bu da adjuvan tedavi endikasyonunu gündeme getirir. Belt ve ark. 870 KRK hastasını içeren çalışmalarında hastalık nüksü riskinin yüksek olması nedeniyle, boyut ve şekli ne olursa olsun izole tümör depoziti olan ancak lenf nodu metastazı olmayan hastalarda, adjuvan kemoterapi düşünülmesi gerektiğini bildirmişlerdir (293). Harrison ve ark. çekum ve çıkan kolon adenokarsinomlu hastalarda tümör depoziti varlığının sağkalımda bağımsız bir prognostik faktör olduğunu bildirmişlerdir (294). Tümör depoziti insidansı rektumda %4,5 ile %45 arasında, kolonda ise %17,6 ile %25,5 arasında geniş bir skalada değişmektedir (295, 296). Çalışmamızda tüm olgularda tümör depoziti insidansı %9,1 olup MSS tümörlerde %9,6, MSI tümörlerde ise %7,1'i oranında tümör depoziti saptanmıştır ve MSI ve MSS olgular arasında anlamlı fark bulunmamaktadır. Tümör depoziti MSS tümörlerde anlamlı olarak GS ve PS'de azalma ile birliktelik göstermiştir. MSI tümörlerde de prognozu kötü etkilemekle birlikte istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır. Evre III hastalığın adjuvan tedavi gerektirmesi, tümör depozitlerinin önemini vurgulamaktadır.

Literatürde MSS ve MSI gruplar arasında lenf nodu metastazının istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediğini belirten yayınlar bulunmakla birlikte Xiao ve ark. çalışmalarında MSI tümörlerde lenf nodu metastazının anlamlı olarak daha az olduğunu saptamışlardır (240, 241, 251). Xiao ve ark. bu durumu, TIL ve Crohn benzeri yangısal yanıt sonucu

gelişen immün yanıtın lenf nodu metastazını engellemesi ile açıklamışlardır. Aynı çalışmada MSS-kötü diferansiye olgular, MSI-kötü diferansiye olgulara göre daha kötü sağkalım eğrilerine sahiptir. Bu sonucu MSI olgularda lenf nodu metastazının daha az görülmesi ve daha az agresif seyir ile açıklamışlardır (251). Seppala ve ark. çalışmasında MSI olgularda diseke edilen lenf nodu sayısı daha fazla bulunmuş olup bu sonucu MSI tümörlerde artmış lenfositik yanıt nedeniyle lenf nodlarının daha belirgin hale gelmesi ile açıklamışlardır (297). Çalışmamızda lenf nodu metastazı MSI olgularda daha az sıklıkla izlenmekle birlikte sınırda anlamlı bir sonuç elde edilmiştir. Lenf nodu evresi açısından ise iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ancak iki grupta da lenf nodu evresi arttıkça GS ve PS anlamlı olarak düşmüştür. Bulgularımız literatürde görülen lenf nodu metastazı ve ileri N evresinin prognoza kötü etkisini destekler niteliktedir.

Yapılan çalışmalarda MSI tümörlerin daha erken klinik evre, daha ileri patolojik evre, sağ kolon lokalizasyonu ve kötü diferansiasyon ile ilişkili olduğu saptanmıştır (241). MSI tümörlerde histopatolojik bulgulardan bağımsız olarak lokal ve uzak metastaz daha az görüldüğü için evre III ve IV olgu sayısı daha azdır, ancak aynı evrede olan tümörlerde bile MSI saptanan olgular daha iyi prognoz göstermektedir (164, 298). Bizim çalışmamızda MSS tümörler anlamlı olarak daha erken invazyon seviyesinde (T1, T2) olmakla birlikte tanı anında uzak metastaz MSI tümörlerde anlamlı olarak daha azdır. Çalışmamızda iki grupta da tanı anında uzak metastaz varlığında GS ve PS anlamlı olarak düşmektedir. Klinik evre arttıkça MSS tümörlerde GS ve PS anlamlı olarak azalmaktadır. MSI olgularda ise yalnızca GS'de sınırda anlamlı azalma saptanmıştır.

Bilindiği gibi KRK'larda genel kabul gören en önemli histopatolojik prognostik parametreler invazyon derinliği ve lenf nodu metastazıdır. Çalışmamızda da bu parametreler ile diğer histopatolojik özelliklerin ilişkisi ayrıca incelenmiştir. Literatürde tümör invazyon derinliği ile kötü diferansiasyon arasında pozitif ilişkili saptayan yayınlar bulunmakla birlikte çalışmamızda invazyon seviyesi ile tümör diferansiasyonu arasında hiçbir grupta anlamlı ilişki saptanmamıştır (299). İnvazyon seviyesi ve TT arasında

MSS olgularda anlamlı, MSI olgularda sınırda anlamlı ilişki saptanmış olup, daha derin invazyon seviyelerinde daha yüksek TT oranları bulunmuştur. Graham ve ark. da yaptıkları araştırmada yüksek TT oranına sahip tümörlerin daha derin invazyon gösterdiklerini saptamışlardır (112). Çalışmamızda MSS olgularda tomurcuklanmaya benzer şekilde derin invazyon seviyelerinde anlamlı olarak daha yüksek oranda PDC izlenmiştir. MSI tümörlerde ise PDC'lerle anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Jurescu ve ark. da bizim çalışmamıza benzer şekilde tümör tomurcuklanması ve az diferansiye kümeler ile invazyon derinliği arasında pozitif korelasyon bulmuşlardır (300).

LN metastazı oranı ile derin invazyon seviyesi, kötü diferansiasyon, vasküler invazyon, TT ve PDC arasında pozitif korelasyon saptayan yayınlarla uyumlu olarak çalışmamızda her iki grupta daha derin invazyon seviyelerinde daha fazla LN metastaz oranları saptanmıştır (301-303). İstatistiksel olarak MSS olgularda bu fark anlamlı iken, MSI olgularda anlamlılık taşıyan düzeyde değildir. Çalışmamızda kötü diferansiye tümörlerde her iki grupta da anlamlı olarak yüksek LN metastazı gözlenmiştir. Yüksek PDC varlığında ve TT oranlarında iki grupta da LN metastazı oranı anlamlı olarak artış göstermiştir. LVİ varlığında her iki grupta LN metastaz oranları anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Venöz invazyon varlığında MSS olgularda LN metastaz oranları anlamlı daha yüksek bulunurken, MSI grupta anlamlı bir ilişki izlenmemiştir. Peritümöral lenfosit yanıt artışı ile LN metastaz oranları tüm gruplarda ters orantılı olmasına karşın yalnızca tüm olguları içeren genel grupta sınırda anlamlı sonuç elde edilmiştir. LN metastazı ile crohn benzeri yanıt ve intratümöral lenfositik yanıt arasında da hiçbir grupta anlamlı ilişki saptanmamıştır. Histopatolojik parametreler ile ilişkili bulgularımız literatür ile uyumlu görünmekle birlikte immün yanıt ile LN metastazı arasındaki ilişkileri açıklayacak daha fazla araştırmaya gereksinim olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda fokal müsinöz diferansiasyon varlığında her iki grupta da LVİ oranı düşük olup, yalnızca MSI olgularda anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Müsinöz ve non-müsinöz tümörlere bakıldığında da her iki grupta müsinöz

diferansiasyon varlığı ile LVİ oranında düşme görülmektedir, ancak hiçbirinde sonuç anlamlı saptanmamıştır. Müsinöz tümörlerde LN metastazı oranı her iki grupta yükselmekle birlikte, yalnızca MSS grupta anlamlı ilişki bulunmuştur. İki grupta da fokal müsinöz diferansiasyon varlığında ise LN metastazı oranı artmakla birlikte anlamlı saptanmamıştır. Sonuç olarak müsinöz morfoloji ile LN metastaz oranı korele olmakla birlikte bu tümörlerde LVİ tam tersine azalma göstermektedir. Bu nedenle müsinöz morfolojinin lenfovasküler faktör dışında, başka şekillerde LN metastazıyla ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Müsinöz diferansiasyon ile LVİ ve LN metastazı ilişkisi araştırma gerektiren diğer konulardan birisidir.

Sağkalım özellikleri açısından bakıldığında, geniş KRK serilerinde, MSI olgularda lokal ve sistemik nüksün istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az ortaya çıktığı görülmektedir (304). MSI tümörlerin yangısal yanıtı daha fazla uyarmaları nedeniyle tümöre karşı oluşan lenfositik yanıt sonucu tümörün erken evrede sınırlandığı ve uzak metastazın engellediği düşünülmektedir (270). Bizim çalışmamızda sistemik nüks açısından MSI ve MSS gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Ancak çalışmamızda Kaplan-Meier sürvi analiz hesaplamaları sonucunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber MSI olguların GS ve PS oranları MSS olgulara göre yüksek saptanmıştır. Sistemik nükste ve sağkalımda anlamlı fark oluşmama sebebinin MSI olgu sayımızın nispeten azlığı olduğunu düşünüyoruz.

Gastrointestinal kanal maligniteleri için ayırıcı tanıda önemli bir belirteç olan CDX2 intestinal gelişim ve onkogeneze ana düzenleyici transkripsiyon faktörlerinden biri olup ekspresyonu intestinal epitele yüksek oranda spesifiktir (7). CDX2 ekspresyonunun kaybı, kötü diferansiasyon, ileri hastalık evresi, proksimal yerleşim, vasküler invazyon ve mikrosatellit instabilite ile ilişkilendirilmiştir (6, 7). Literatürde yakın zamanda yapılan çalışmalarda, CDX2 ekspresyon kaybının daha kısa GS ve PS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (7, 8). Piero ve ark.'nın çalışmasında boyanma kaybı tümörün genelinde varsa kayıp olarak kabul edilmiş ve 434 CDX2 pozitif tümör ile 32 negatif tümör karşılaştırılmıştır. Bu iki grup arasında 5 yıllık sağkalımda anlamlı fark izlenmiş olup, negatif tümörlerin sağkalım oranı

%45, pozitif tümörlerin %72 olarak saptanmıştır (7). Olsen ve ark.'nın çalışmasında düşük CDX2 ekspresyonu MSI, sağ kolon yerleşimi, kötü diferansiasyon ile ilişkili bulunmuş fakat klinik evre ve rekürrens ile ilişkili bulunmamıştır (305). Neumann ve ark. CDX2 kaybı ile sağkalımın azaldığını, CDX2 ekspresyon kaybının MSI tümörlerde MSS tümörlere kıyasla anlamlı olarak daha fazla oranda olduğunu saptamışlardır (206). Literatürde kötü prognostik faktörlerle CDX2 kaybı ilişkisi değişkenlik göstermektedir. Bu durum CDX2'nin prognoza etkisinin diğer faktörlerden bağımsız olduğunu düşündürmektedir. Literatürde tümör hücrelerinde CDX2'nin iyi ve orta diferansiye tümörlerde daha yoğun boyandığı ve az diferansiye tümörlerde boyanma şiddetinin azaldığı belirtilmektedir (306). Bizim çalışmamızda hiç nükleer boyanma olmaması durumunda negatif, %10'un altında tümör hücresinde nükleer boyanma zayıf pozitif, %10'un üzerinde tümör hücresinde nükleer boyanma ise güçlü pozitif kabul edilmiş olup, CDX2, 9 olguda (%1,5) tamamen negatif, 43 olguda (%7,3) zayıf pozitif, 541 olguda (%91,2) ise güçlü pozitif izlenmiştir. Çalışmamızda MSS tümörler, MSI tümörlere kıyasla CDX2 ile anlamlı olarak daha fazla oranda boyanmıştır. Ayrıca CDX2 kaybı görülen ve zayıf boyanma gösteren olgularımız anlamlı olarak sağ kolon lokalizasyonlu olup, anlamlı olarak daha kötü diferansiasyon göstermektedir. Ancak CDX2'nin prognostik belirteç olarak klinik kullanımı halen tartışmalıdır. Prognoz ilişkisini araştıran bir çalışmada CDX2 ekspresyon kaybı; proksimal yerleşim, infiltratif patern, ileri evre, kötü diferansiasyon, tümör içi lenfosit infiltrasyonu, luminal serrasyon, müsin üretimi, artmış CK7 ekspresyonu, azalmış CK20 ekspresyonu, CIMP, MSI ve BRAF mutasyonu ile ayrıca GS ve PS'de azalma ile ilişkili olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada CDX2 ekspresyon kaybı özellikle evre IV KRK'larda bağımsız prognostik belirteç olarak kabul edilmiştir (307). Daha yakın tarihli bir çalışmada CDX2 kaybının yalnızca MSS grupta sağkalımı olumsuz etkilediği saptanmıştır (308). Çalışmamızda MSS olgularda CDX2 ekspresyon kaybıyla birlikte GS ve PS'nin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. MSI grupta CDX2 boyanması ile sağkalım arasında anlamlı bir veri elde edilememiştir. Çalışmamızda klinik evre, T evresi, sistemik nüks,

LVİ, venöz invazyon, TIL, Crohn benzeri yangısal yanıt, tümör depoziti varlığı, fokal müsinöz diferansiasyon, TT, PDC ile CDX2 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ancak CDX2 ekspresyon kaybı ile LN metastaz oranı sınırdan anlamlı, PNI ise anlamlı olarak artmış bulunmuştur. Sonuç olarak çalışmamızda CDX2 ekspresyon kaybı, MSI varlığıyla önemli ölçüde korele olup, yüksek tümör derecesi, sağ kolon lokalizasyonu ve PNI varlığı ile ilişkilidir, MSS tümörlerde kötü prognoz göstergesi iken, MSI tümörlerde prognoz ile ilişkili bulunmamıştır. Ancak yukarıda ifade edildiği gibi söz konusu çalışmalarda CDX2 ekspresyonunu değerlendirmek için farklı kriterler kullanılmıştır. CDX2 ekspresyon kaybı önümüzdeki süreçte prognostik değerlendirme amacıyla kullanıma girecekse cut off değerinin belirlenmesi ve standardizasyon için çok sayıda çalışma gereklidir.

KRK'larda, MSI olgularda Lynch sendromunu dışlaması, prognoz ve tedaviye yön vermesi nedeniyle BRAF mutasyonu değerlendirilmesi önerilmektedir (246). Literatürde BRAF mutasyonunun, MSI tümörlerin %41-53'ünde, MSS tümörlerin %5'inde bulunduğu bildirilmekte olup, MSI tümörlerde anlamlı olarak yüksek saptanmaktadır (181-183, 246). BRAF mutant kolon tümörleri kadın cinsiyet, ileri yaş, proksimal yerleşim, ileri TNM evresi, kötü diferansiasyon ve müsinöz histoloji ile ilişkilendirilmiştir (11-13). Bununla birlikte BRAF mutasyonunun MSI ve MSS tümörlerde farklı prognostik etkiye sahip olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (14-16). BRAF mutasyonunun MSS tümörlerde kötü prognostik faktör, MSI tümörlerde ise erken evre ile ilişkili olup iyi prognoz göstergesi olduğu ileri sürülmektedir (9). Salem ve ark. MSI varlığını sağ kolonda %22,3, sol kolonda %7,8 oranında, BRAF mutasyonunu sağ kolonda %25, sol kolonda %10,2 oranında saptamış, MSI ve BRAF mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulmuşlardır (309). Seppala ve ark. çalışmalarında BRAF mutasyonu varlığının kötü prognoz ile ilişkilendirilmesine rağmen MSI/BRAF mutant olanların hastalıksız sağkalımının daha uzun olduğunu saptamışlardır. Bu durumu MSI'nın prognoz üzerindeki olumlu etkisi ile açıklamışlardır. MSS tümörlerde ise BRAF mutasyonu gösteren olguların daha kötü prognozlu olduğunu saptamışlar, ve bunu da BRAF

mutasyonunun kötü prognostik etkisi ile açıklamışlardır (297). MSI ve BRAF durumuna göre adjuvan tedavi seçeneğinin gündeme gelmesi önemli bir durumdur. Seppala ve ark. çalışmalarında Evre I-III olan MSI/BRAF mutant olgular için adjuvan tedaviye ihtiyaç olmadığını, fakat MSS/BRAF mutant olgularda Evre I-II olsalar bile artan mortalite riskinden dolayı agresif adjuvan tedavi gerektiğini vurgulamışlardır. Yine başka bir çalışmada metastatik KRK olgularında MSI ve BRAF mutasyonunun sağkalım üzerine olumsuz etkisi olduğu vurgulanmış, genel olarak iyi prognostik etkisi olduğu araştırmalarda gösterilen MSI'nın olumsuz prognoz göstermesini, BRAF mutasyonu ile ilişkisine ve seçilen hastaların metastaz gösteren ileri evre olgulardan oluşmasına bağlamışlardır (310). Lochhead ve ark. MSI ve BRAF mutasyon varlığı ile sağkalımı inceledikleri çalışmalarında 5 yıllık sağkalımı MSS/BRAF mutant olan grupta %46, MSS/BRAF wild tip olan grupta %65, MSI/BRAF mutant olan grupta %73, MSI/BRAF wild tip olan grupta %79 oranında bulmuştur. Bu çalışmada BRAF mutasyon varlığı mortaliteyi artırırken, MSI varlığının azalttığı sonucuna varılmıştır (183). Bu çalışmalarda BRAF mutasyonu immünohistokimyasal ve moleküler yöntem ile çalışılmış olup, immünohistokimyasal yöntem %93 duyarlılık, %96 özgüllük ile moleküler yöntem ile korele bulunmuştur (311). Bizim çalışmamızda da maliyet ve zamandan tasarruf amacı ile BRAF mutasyon analizi için immünohistokimyasal yöntemi kullanılmıştır. Klinik çalışmalarda Evre II ve III MSI tümörlerde 5-FU tedavisinin etkisiz olduğu, hatta kemoterapiye bağlı görülebilecek yan etkiler de ekleneceği için zararı olabileceği ileri sürülmektedir (164). Evre III KRK'larda MSI varlığında lökovorin ve 5-FU tedavisi yerine, oksaliptatin kullanılması hastalıksız sağkalımı arttırmaktadır (165). MSI KRK'larda onkolojik tedaviler immün kontrol inhibitörleri ve immünoterapi yönünde ilerlemektedir. FDA tarafından 2015 yılında anti PD-1 ilacı pembrolizumab tedavisinin metastatik ve dirençli MSI KRK'larda kullanılabileceği bildirilmiştir (168). PD-1/PD-L1 inhibitörleri, monoterapi olarak kullanıldığında tümör boyutunu küçülterek, uzun süreli etki ve daha az toksisite sağlar. MSI varlığında, artan mutasyon ilişkili neoantijenler immün sistemi tümöre karşı uyararak anti-PD-1 yanıtını arttırırlar (169). MSI

tümörlerde TIL varlığı, MSS tümörlere oranla daha yüksektir. Tümör çevresinde oluşan immün çevreye rağmen MSI KRK'larda tümör hücreleri, PD-1 gibi kansere özgü inhibitör kontrol noktaları nedeniyle tamamen elimine edilemezler. Bu aktif mikroçevre immün inhibitör sinyalleri ile dengelenir. Bu nedenle MSI KRK'lar immünoterapi için adaydır. Pembrolizumab tedavisi uygulanan MSI ve MSS KRK olgularında, MSI olanların immün yanıt ve hastalıksız sağkalım süresi daha uzun bulunmuştur (168). KRK'larda PD-L1 ekspresyonu kötü diferansiasyon, MSI varlığı, BRAF mutasyonu ve TIL varlığı ile ilişkilidir (312). PD-1 ekspresyonu gösteren TIL varlığı, MSI KRK'larda iyi prognoz ile ilişkili iken, tümörde PD-L1 ekspresyonu ise kısa sağkalım süresi ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (313). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde MSI varlığı ile BRAF mutasyonu arasında anlamlı ilişki belirlenmiştir. Tüm olgularımızın %8,3'ünde BRAF ekspresyonu saptanırken, MSI olgularımızda %15,9, MSS olgularımızda ise %6,5 oranında BRAF ekspresyonu saptanmıştır. BRAF ekspresyonu, sağ kolon tümörlerinde anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur. Ayrıca BRAF ekspresyon artışı ile birlikte önemli prognostik histopatolojik parametreler olan artmış tümör boyutu ve diferansiasyon kaybı saptanmıştır. Ancak TIL, Crohn benzeri yangısal yanıt, fokal müsinöz diferansiasyon ve kadın cinsiyet ile ilişki saptanmamıştır. BRAF ekspresyonu müsinöz adenokarsinomlarda artış gösterme eğiliminde olsa da anlamlı sonuç elde edilememiş, LVİ, PNI, venöz invazyonla ilişki saptanmamıştır. Çalışmamızda erken T evrelerinde BRAF ekspresyonunun daha fazla olduğu, ileri klinik evrelerde BRAF ekspresyonunun artma eğiliminde olduğu saptanmakla birlikte, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. LN metastazı ile BRAF arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir. MSS grupta BRAF ekspresyonu arttıkça GS ve PS azalmıştır ancak sonuçlar anlamlı değildir. MSI olgularda ise sağkalım ile BRAF ekspresyonu arasında bir ilişki elde edilememiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre KRK'larda MSI varlığı yanı sıra BRAF mutasyonunun da değerlendirilmesi, prognoz ve tedavi yanıtını öngörmede ve etkin tedavi yönetimi seçiminde yardımcı olacaktır. Tedavi algoritmalarının moleküler yollar öncülüğünde düzenlenmesi, tedavi başarısını arttıracığı için

moleküler karsinogenez mekanizmalarının iyi tanımlanması ve tanınması gerekmektedir.

SOX2, kanser hücrelerinin çoğalması, invazyon, göç ve metastazında, tümör hücre ve kök hücre statüsünün devamında, hücre programlama, apoptoz ve kemodirenç gelişimi gibi pek çok karsinogenez aşamasında yer almaktadır (194). Son araştırmalar, küçük bir tümör hücresi alt grubunun, kök hücrelerle ilişkili özelliklere sahip olduğunu ortaya çıkarmış ve bu nedenle bu hücre grubuna kanser kök hücreleri (CSC'ler) denmiştir. Kanser kök hücreleri kendilerini yenileme kapasitesine ve çok yönlü diferansiasyon yeteneğine sahiptir, bu nedenle hem tümör büyümesine hem de yeni tümöral klonların ortaya çıkmasına neden olurlar (314-316). Lundberg ve ark. SOX2 eksprese eden kanser hücrelerinin kanser kök hücresi özellikleri sergilediklerini saptamışlar, ayrıca SOX2 ekspresyonu yüksek olan tümörlerde CDX2 ekspresyonu kaybının olduğunu belirterek SOX2'nin olumsuz klinik etkisine CDX2 ekspresyon kaybının destek olabileceğini öne sürmüşlerdir (317). Miller ve ark. özellikle tümör merkezindeki yüksek SOX2 ekspresyonunun, kansere özgü sağkalımı azaltan bağımsız bir faktör olduğu belirtirken, başka bir çalışmada SOX2 ekspresyonu ile prognoz arasında bir ilişki bulunamıştır (318, 319). Bir çalışmada tüm KRK'ların %11'inde SOX2 ekspresyonu saptanmıştır. Bu çalışmada SOX2 ekspresyonu ile BRAFV600E mutasyonu arasında pozitif ilişkili bulunmuştur. SOX2 ekspresyonunun kısmen BRAF sinyali tarafından düzenlendiği ve KRK'larda metastazla ilişkili olabileceği ve kötü prognozu gösterdiği öne sürülmüştür (20). Zhang ve ark. 2077 olgudan oluşan meta-analizde SOX2 ekspresyonunun KRK'larda lenf nodu metastazı, uzak metastaz, kötü diferansiasyon, ileri evre hastalık ile ilişkili olup, kötü prognostik olduğunu saptamışlardır (19). Zheng ve ark.'nın çalışmasında, SOX2 ekspresyonunu kötü klinik gidiş ve çoklu ilaca direnç genlerinin aktivasyonu ile önemli ölçüde korele bulmuştur. Ayrıca SOX2'nin hücre göçü, istila ve koloni oluşumuna yol açan Rho-ROCK sinyalinin aktivasyonuna sebep olduğunu saptamışlardır (21). Liu ve ark. ise SOX2 ekspresyonunun, mTOR yolağının inhibisyonu yoluyla kolorektal kanser hücresi proliferasyonunu baskıladığını

savunmuştur (24). Önceki bir çalışmada SOX'nin KRK'larda hücresi proliferasyonunu indüklediği gösterilmiş, aradaki bu farkın reaksiyon sıcaklığı, süresi ya da kullanılan yöntemlerden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (24). SOX2, hücrede EGFR gibi pek çok sinyal yolağını etkilemekte ya da PI3K/Akt gibi sağkalım yollarından etkilenmektedir. Böylece katkı yaptığı KRK gibi çeşitli kanserlerin prognozunda bir belirteç olabileceği gibi tedavilerinde de moleküler hedef potansiyeli taşımaktadır (194). Çalışmalarda ayrıca SOX2 proteini varlığında T lenfosit yanıtının daha güçlü olduğu ve kök hücre benzeri tedaviyle olguların immünoterapi için aday olabileceği belirtilmektedir (320). Literatürde sınırlı sayıda çalışmada SOX2 pozitifliği ile CD8+ TIL oranında artış birlikteliği gösterilmiştir (321). Çalışmamızda tüm olguların %5,4'ünde, MSS olguların %5'inde, MSI olguların ise %7,1'inde SOX2 ekspresyonu saptanmıştır. SOX2 ekspresyonu gösteren tümörlerimiz anlamlı olarak daha kötü diferansiasyon göstermişlerdir. SOX2 ekspresyon varlığında peritümöral lenfosit oranında sınırdan anlamlı artış görülmüştür. MSS ve MSI olgularda SOX2 ekspresyonu GS ve PS'yi azaltmakla birlikte anlamlı sonuç elde edilmemiştir. SOX2 ekspresyonu ile LN metastazı ve uzak metastaz sıklığı artmış olsa da anlamlı sonuç saptanmamıştır. SOX2 ileri klinik evre ve ileri T evrelerinde daha sık eksprese olmakla birlikte anlamlı sonuç bulunmamıştır. Bu sonuçlara dayanarak çalışmamızda SOX2 ekspresyonunun diğer klinikopatolojik ve histopatolojik parametreler ile arasında anlamlı bir ilişki olmadığı söylenebilir. Ancak verilerimiz literatürde SOX2'nin kötü tümör diferansiasyonu sebebiyle kötü prognostik bir belirteç olduğunu belirten çalışmaları destekler niteliktedir. Ayrıca çalışmamızda yüksek TIL ile ilişkili bulunan SOX2'nin immünoterapi için potansiyel öngörücü ve tedavi adayı olduğu saptanmıştır. SOX2 ekspresyonunun KRK'larda prognoza etkisi ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

STAT1'in kanser biyolojisinde çok sayıda ve çeşitli rolleri vardır. STAT1, IFN ile ilgili hücre içi sinyalleşme için bir ana transkripsiyon faktörüdür (18). Çoğunlukla tümör supresör olsa da bazı kanser türlerinde pro-onkogen olarak görev aldığı bilinmektedir (322). Dolayısıyla STAT1'in kanserler için

prognostik potansiyeli bugüne kadar bildirildiği gibi değişken ve hatta bazen tartışmalı olmuştur. STAT1'in tümör baskılayıcı rolü, olasılıkla bağışıklık sistemindeki işlevi ile ilişkilidir. İmmün sistem hücreleri, STAT1 aktivasyonuna yol açan IFN salgılar ve IFN ile uyarılan STAT1, CD8+ T hücrelerini aktive eden kemokinleri aktive edebilir (323). Ayrıca, bir transkripsiyon faktörü olarak STAT1, hücre döngüsü ile ilgili ve apoptoz ile ilgili genlerin ve ölüm reseptörü genlerinin ve bunların ligandlarının transkripsiyonunu indükler (324). STAT1, hepatoselüler karsinom ve KRK'larda ölüm reseptörü Fas'ın ve bunların ligandı FasL'nin ekspresyonunu indükler (325, 326). Ek olarak, STAT1'in anjiyogenezi inhibe ettiği bildirilmektedir (327). STAT1 ekspresyonunun iyi prognozla korelasyonu, KRK'lar için farklı çalışmalarda gösterilmiştir (328-331). Benzer şekilde özofagus kanseri, pankreas kanseri, hepatoselüler karsinom ve yumuşak doku sarkomları dahil olmak üzere birçok kanser için de iyi prognoz göstergesi olduğu rapor edilmiştir (332-335). Meme kanserlerinde ise STAT1 ekspresyonu için hem iyi hem kötü prognoz ile ilişkili korelasyonlar bildirilmiştir (336-338). Gordziel ve ark. 414 olguluk çalışmalarında STAT1'in KRK'larda GS'yi arttırdığını öne sürmüşlerdir (330). Shang ve ark.'nın yaptığı çalışmada KRK'lerde STAT1 ve buna bağımlı T lenfosit aktivasyonu engellendiğinde immünoterapi cevabının olmadığını, bu nedenle immün kontrol noktası blokaj tedavisinin faydalı olduğunu saptamışlardır (341). Tanaka ve ark. ise STAT1'in prognostik etkilerini inceledikleri çalışmalarında olguların %9'unun yüksek düzeyde STAT1 sitoplazmik ekspresyonu sergilerken, çoğunluğunun düşük düzeylerde sitoplazmik ekspresyon gösterdiğini ve olguların %15'inde de STAT1'in pozitif nükleer ekspresyon gösterdiğini saptamışlardır. Ayrıca STAT1'in MSI olgularda belirgin olarak daha fazla ekprese edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmalarında STAT1 ekspresyonunun, kötü tümör farklılaşması, sağ taraf yerleşimi ve MSI ile pozitif ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Sitoplazmik veya nükleer STAT1 ekspresyonunun seviyesi ile LVİ veya PNI arasında ilişki saptamamışlardır. Bu çalışmada erken evre KRK'larda STAT1'in yüksek sitoplazmik ekspresyonunun, hem GS hem de PS sürelerini olumsuz etkilediğini

saptamış olup bu nedenle, STAT1 ekspresyonunun, erken evrelerde neoadjuvan tedavi açısından potansiyel bir risk belirleyici prognostik faktör olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. STAT1 nükleer ifadesini ise sağkalımla ilişkili bulmamışlardır (18).

Biz de çalışmamızda STAT1 immün belirteci görece yeni ve tartışmalı bir belirteç olduğundan ve değerlendirmesinde ortak bir fikir birliği henüz oluşmadığından farklı boyanma paternlerini gözönüne alarak değerlendirdik. Çalışmamızda STAT1 sitoplazmik-1 ve STAT1 sitoplazmik-2 boyanmaları MSI grupta, MSS gruba göre anlamlı olarak daha yüksek izlenirken, STAT1 nükleer boyanması, herhangi bir lokalizasyondaki STAT1 pozitifliği ve STAT1 sitoplazmik-3 boyanması ile iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır. STAT1'in nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu, ya da herhangi bir lokalizasyondaki pozitifliği kötü diferansiasyon ve sağ taraf yerleşimi ile ilişkili bulunmuştur. STAT1'de herhangi bir pozitiflik durumunda tanı anında uzak metastaz saptanma olasılığı, STAT1 sitoplazmik-2 pozitifliğinde ise LN metastazı olasılığı sınırda anlamlı olarak daha az saptanmıştır. STAT1-St.-1 ve STAT1-St-2 anlamlı olarak, STAT1-St-3 ise sınırda anlamlı olarak erken invazyon seviyelerinde yüksek saptanmışlardır. Çalışmamızda ayrıca STAT1 nükleer, STAT1-St.-3 ve STAT1 (+/-) pozitifliğinin yüksek TT ile ilişkili olduğu görülmüştür. Daha önceki çalışmalarda saptanmamış olan bu bulgunun STAT1'in bazı çalışmalardaki kötü prognostik etkisine açıklık getiren bir özellik olduğunu düşünüyoruz. Elde ettiğimiz verilerle KRK'ların prognozunu öngörmede TT ve STAT1 ilişkisinin gelecekteki prognostik çalışmalarda incelenmeye değer bir konu olduğu sonucuna vardık.

Özellikle MSI KRK'larda STAT1 ekspresyonu ile PD-L1 veya PD-1 ekspresyonu arasında bir korelasyon olup olmadığını inceleyen çalışmalar STAT1 ve PD-L1'in ve PD-1'in mRNA seviyeleri arasında, önemli bir pozitif korelasyon ortaya çıkarmıştır (18, 342, 343). Bizim çalışmamızda da STAT-1'de sitoplazmik ağırlıklı olmak üzere boyanma oranlarının intratümöral lenfosit sayısındaki artış ile korele olduğu saptanmıştır. Aynı durum peritümöral lenfosit oranı için de geçerlidir. Bu sonuçlar STAT1'in

immünoterapi tedavisi seçiminde bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca çalışmamızda ayrı ayrı değerlendirdiğimiz STAT1'in sitoplazmik ve nükleer ekspresyonları farklı anlamlar da taşımaktadır: Nükleer pozitifliğin özellikle yüksek sağkalım, kötü diferansiasyon ve sağ kolon yerleşimi ile ilişkili olduğu, sitoplazmik boyanmanın ise MSI, kötü diferansiasyon, artmış TIL ve erken invazyon seviyeleri ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bu nedenle STAT1'in hücresel komponentlerdeki ekspresyon farkının vurgulanması gerektiği sonucuna varılmıştır. Herhangi bir komponentteki STAT1 pozitifliği, izlem grubundaki KRK'larda GS ile anlamlı, PS ile sınırda anlamlı olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak STAT1'in MSI, yüksek TIL oranları, erken invazyon seviyesi ve azalmış metastaz oranları gibi iyi prognostik faktörler yanı sıra TT ve diferansiasyon kaybı gibi kötü prognostik faktörlerle ilişkili olduğu görülmektedir. Ancak literatürde STAT1'in ekspresyon farklılıklarının gözönüne alındığı ve belirlenmiş olan standart kurallarla yapılmış çalışmalar çok azdır. Çalışmamızda da saptandığı gibi STAT1'in nükleer ve sitoplazmik ekspresyonlarının farklı mekanizmalarla farklı sonuçlara yol açması yüksek bir olasılıktır. Ayrıca literatürde bildirildiği gibi STAT1, farklı tümörlerde farklı etkiler oluşturuyor gibi görünmektedir. STAT1'in kanser gelişiminde çok sayıda rol oynadığı su götürmez bir gerçek olmakla birlikte, bu karmaşık ilişkinin aydınlatılabilmesi için çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, KRK'larda bugüne kadar yapılmış olan çalışmalar ile birlikte değerlendirildiğinde; MSI varlığının, tümörlerin davranışını, klinik seyrini, tedaviyi, prognozu ve hasta sağkalımını öngörmeye büyük önem taşıdığı görülmektedir. Bu nedenle günümüzde KRK'larda MSI'nin saptanması zorunluluk haline gelmiştir. MSI saptanmasında kullanılabilecek yöntemler tezin daha önceki kısımlarında tanımlanmıştır. Chen ve ark. çalışmalarında MSI'ı saptamak için kullanılan İHK ve PCR yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada hata payının çok düşük olması sebebiyle İHK olarak MMR protein kaybı yoksa PCR incelemesine gerek olmadığını savunmuşlardır (344). Amira ve ark. PCR yönteminin aynı hastadan tümörlü ve normal doku örneği gerektirmesi ve

bazı fiksatiflere uyumsuz olması nedeniyle, DNA sekanslama yönteminin ise daha uzun zaman gerektirmesi ve maliyetli olması nedeniyle İHK incelemenin tercih edilebileceğini ifade etmişlerdir (162). Biz de hem bu sebeplerden hem de daha ucuz ve daha kolay uygulanabilir olması açısından çalışmamızda İHK yöntemi uyguladık.

MSI'ın İHK olarak saptanmasında kullanılan MMR proteinleri hücrede heterodimer kompleksler halinde bulunmaktadır. MLH1 PMS2 ile ve MSH2 MSH6 ile birlikte işlev görür. İlgili gendeki mutasyon sonucu MLH1'de ekspresyon kaybı olursa PMS2'de, MSH2'de ekspresyon kaybı olursa MSH6'da da ekspresyon kaybı beklenir, ancak tersi zorunlu değildir. Literatürde İHK yöntemle MMR proteinlerinde ekspresyon kaybını inceleyen çalışmaların büyük bölümünde MSI KKR'larda en sık MLH1 ve PMS2'nin birlikte kaybı görülmektedir. Sıklık olarak ikinci sırada MSH2 ve MSH6'nın birlikte kaybı, ardından tek başına MSH6 ve tek başına PMS2 kaybı gelmektedir. Dört antikorun da ekspresyon kaybı %1,4 oranında görülmektedir (345). Bizim çalışmamızda da en az bir protein ile ekspresyon kaybı gösteren gruptaki 113 olgunun 168'inde (%60) MLH1 ve PMS2 birlikte kaybı, en sık patern olarak tespit edilmiştir. Diğer olgulara baktığımızda ikinci sırada 12 olgu (%10,6) ile MSH2 ile MSH6'nın birlikte kaybı, ardından 9 olgu (%7,7) ile tek başına PMS2 kaybı ve 4 olgu (%3,6) ile tek başına MSH6 kaybı görülmüş olup patern analizimiz literatür ile uyumludur. Çalışmamızda dört antikorun da negatif olduğu 8 olgu (%7,2) mevcuttur. En sık görülen paternler bunlar olsa da nadir olarak, beklenmedik şekilde anormal ekspresyon kaybı paterni gözlenen çalışmalar da mevcuttur (345-347). MSI KKR'larda hangi proteinde ekspresyon kaybı olduğu klinik önem taşımaktadır. MLH1 ve PMS2 kaybı, hem sporadik hem Lynch sendromlu hastalarda görülmekte iken, izole PMS2 kaybı, MSH2 ve MSH6 kayıpları daha sıklıkla Lynch sendromunda karşımıza çıkar. MLH1 ve/veya MLH1 ve PMS2 kaybında metilasyon analizine başvurulurken, diğer paternlerde direkt germline mutasyon analizi istenir. Ayrıca anormal, sıradışı patern olarak kabul edilen olguların da farklı prognostik özelliklere sahip olabileceği düşünülmektedir (348). Çalışmamızda da nadir anormal paternler saptanmış

olup, bu grupların da kendi aralarında değerlendirildikleri çalışmalar hız kazanmalıdır.

Son olarak çalışmamızda kullanmayı tercih ettiğimiz doku mikroarray yöntemini ele alırsak öncelikle birçok avantajı olduğunu belirtmek gerekir. Çok sayıda doku örneğini az sayıda preparat üzerinde, daha kısa zamanda, daha ekonomik olarak değerlendirmeyi sağlar. Böylelikle araştırılacak olan yeni bir belirleyici, çok fazla miktarda doku örneğinde, aynı anda, tek bir uygulamada, hızlı bir şekilde çalışılabilir. Pahalı antikorların küçük dokularda kullanılması ve tek bir preparatta uygulanabilmesi maliyeti düşürür. Ayrıca bu yöntem, nadir görülen ve kısıtlı olan doku örneklerinden en üst düzeyde yararlanabilmeyi sağlar. Doku örneklerinde dış etken çeşitliliğini ortadan kaldırılıp doku örneklerinin aynı koşullarda boyanmasına olanak verdiğinden daha güvenilir veriler sağlar. Orijinal doku örneğinin (kor biopsinin alındığı parafin blok) korunmasını sağlar (230, 231, 349, 350). Ancak her inceleme yönteminde olduğu gibi bu yöntemde de dezavantajlar bulunmaktadır. En önemli kısıtlılık doku örneklerinin küçük boyutlarda olmasıdır. Bu nedenle heterojen tümörlerdeki fokal değişiklikler değerlendirilemez. Bunu engellemek amacıyla her olgudan en az 1 mm genişliğinde 2 kor almak ya da 0.6 mm genişliğinde 3 kor örnek almak önerilmektedir. Doku kısıtlılığını gidermede kullanılacak diğer bir yöntem ise çalışmaya dahil edilen olgu sayısını artırmaktır. Yine de hedeflenen alan, dokuda küçük odaklar halindeyse (örneğin tümöre eşlik eden lenfoid hücreler, tümör stroması, lenf nodunda metastatik tümör odağı gibi) kor biopsinin alımı sırasında bu odaklara denk gelmeme riski vardır. Birçok dokunun tek bir preparat üzerinde olması uygulama sürecindeki herhangi bir hatadan tüm dokuların etkilenmesi anlamına gelir. Dökülme, katlanma, karşılaşılan diğer problemlerdir (229-231, 349, 350).

Çalışmamızın içerdiği olgu sayısı kadar incelenen immün belirteçlerin de çok sayıda olması nedeniyle, araştırma yöntemi olarak DMA yöntemi tercih edilmiştir. Bu süreçte, çalışmada kullanılacak olan doku mikroarray bloğunun hazırlanması sırasında parafin sorunlarından kaynaklanan blok kırılması ve bloğu elde etmek için tek bir düzenek bulunması nedeniyle çok sayıda işlem

tekrarı gerekmiştir. Tümör heterojenitesi gözetilerek tüm olgulardan iki ya da üç kor örnek alınmıştır. Bir mikroarray bloğuna 36 adet doku gömülmesine rağmen, kesit işlemi sırasında bu dokular farklı seviyede kaldığı için tek bir preparatta 36 adet doku nadiren görülmüştür. Bu yüzden eksik kalan olgularda işlem tekrarı gerekmiştir. Ayrıca kesit sırasında bazı tümör dokularının daha sert, bazılarının daha yumuşak olması nedeniyle kesitlerde katlanma sorunu yaşanmıştır. Yaklaşık 22 yıllık olgu grubuyla çalışıldığı için bazı bloklar kesit almaya uygun olmadığından bu bloklar çözülüp doku tekrar bloklandıktan sonra doku mikroarray çalışılmıştır. Tümör hücrelerinin sınırlı alanlarda izlendiği olgularda (neoadjuvan tedavi görmüş, müsinöz morfolojide, bazı T1 olgularda) tümör alanına denk gelebilmek için birkaç defa geriye dönüp örnekleme yapılmıştır. İmmün çalışmalar sırasında meydana gelen aksaklıklarda preparattaki olguların hiçbirini değerlendirilememiş olup, tümör miktarının az olduğu örneklerde doku kaybı riski yaşanmıştır. Sonuç olarak DMA, birçok olguyu aynı anda, pek çok immün belirteçle, zaman kazandırarak ekonomik olarak çalışma avantajı sağlamakla birlikte kendine özgü uygulama zorlukları olan, özenli ve titiz çalışma gerektiren bir yöntemdir.

VI.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda MSI ve MSS tümörler çeşitli klinikopatolojik ve histopatolojik parametrelerle ve immün belirteçle karşılaştırılmış, bu parametrelerin ve immün belirteçlerin prognoza etkisi ve immün belirteçlerin diğer parametrelerle ilişkisi araştırılmıştır.

MSI olgularımızın oranı %19,1 olup, MSI; Sağ kolon yerleşimi, artmış tümör boyutu, kötü diferansiasyon, müsinöz morfoloji, ileri invazyon seviyeleri, azalmış uzak metastaz sıklığı ile ilişkili bulunmuş, bu olgularda BRAF ve STAT1 sitoplazmik pozitifliği anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır. MSS olgular ise artmış perinöral invazyon ve lenf nodu metastazı ile yüksek CDX2 ekspresyonu ile ilişkili görülmüştür. İki olgu grubunda yaş ve cinsiyet dağılımı, eşlik eden adenomatöz polip varlığı, tümör perforasyonu, cerrahi sınır pozitifliği, fokal müsinöz diferansiasyon, LVİ, venöz invazyon, tümör depoziti, Crohn benzeri yanıt, TIL, TT, PDC, N evresi, SOX2 ve nükleer STAT1 ekspresyonu arasında anlamlı fark izlenmemiştir.

Çalışmamızda tümör perforasyonunun MSI olgularda, prognozu daha olumsuz etkilediği saptanmıştır. MSI tümörler daha derin invazyon yaptıkları ve tümör perforasyonu durumunda karın içine yayılma olasılıklarının daha fazla olması nedeniyle bu sonucun ortaya çıkmış olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda tümör diferansiasyonunun artmasıyla yalnızca MSS olgularda sağkalım artmıştır. Bulgularımız MSI durumunun prognoz üzerinde diferansiasyondan daha etkili olduğu yönündeki literatür bilgilerini destekler niteliktedir. Müsinöz morfoloji, LVİ ve PNİ yalnızca MSS olgularda kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Bize göre MSI grupta istatistiksel anlamlılık elde edilemeyişinin en önemli nedeni bu grup hasta sayımızın nispeten

düşük olmasıdır. Çalışmamızda anti tümör immün yanıtının göstergelerinden yalnızca peritümöral lenfosit artışında ve MSS grupta, sağkalımın arttığı saptanmıştır. Tümöre karşı immün yanıtın prognoza etkisi tartışmalı sonuçlar içermekte olup bu konuda lenfositlerin daha spesifik olarak, lokalizasyon ve sayım alanının standardize edilerek, Crohn benzeri yangısal yanıtın da daha belirgin kriterler eşliğinde değerlendirilmesi gerektiğini düşünüyoruz. Çalışmamızda yüksek TT'nin ve PDC'nin MSS tümörlerde sağkalımı azalttığı, MSI tümörlerde sağkalım üzerinde etkisi olmadığı saptanmış, bu bulgulara dayanarak bu antitelerin MSI ve MSS tümörlerde farklı prognostik etkileri olabileceği ve bunları değerlendirirken MSI durumunun göz ardı edilmemesi gerektiği düşünülmüştür. Tümör depoziti MSS tümörlerde sağkalımda azalma ile birliktelik göstermiştir. Bu bulgumuz tümör depozitlerinin evreyi değiştirebilmesi sebebiyle KRK'larda dikkatle incelenmesi gereken prognostik bir antite olduğu şeklindeki literatür bilgisini destekler niteliktedir. MSI olguların sağkalım oranları MSS olgulara göre yüksek saptanmakla birlikte istatistiksel anlamlılık izlenmemiştir. MSI olgu sayımızın nispeten az olmasının bu sonuca yol açtığını düşünüyoruz.

Çalışmamızda KRK'larda en önemli histopatolojik prognostik parametrelerden olan invazyon derinliği ve lenf nodu metastazı ile diğer histopatolojik özelliklerin ilişkisi incelenmiştir. Her iki grupta da daha derin invazyon seviyelerinde, daha yüksek TT, yalnızca MSS olgularda daha yüksek PDC seviyeleri ve LN metastazı izlenmiştir. Her iki grupta da diferansiasyon kaybı, yüksek TT, PDC oranları ve LVİ artmış LN metastazı ile ilişkili bulunmuştur. Müsinöz morfoloji ile LN metastaz oranı korele olmakla birlikte, bu tümörlerde tam tersi LVİ'nin azalma eğiliminde olduğu görülmüştür. Bu nedenle müsinöz morfolojinin lenfovasküler faktör dışında, başka şekillerde LN metastazıyla ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

CDX2; MSS, sol kolon yerleşimi, azalmış tümör boyutu, iyi diferansiasyon, azalmış PNİ ve LN metastazı ile ilişkili bulunmuştur. MSS grupta CDX2 boyanma oranı ve şiddetiyle orantılı olarak sağkalımın arttığı görülmüştür. Ancak CDX2 ekspresyonunu değerlendirmek için rutin

kullanımda cut off değerin belirlenmesi ve standardizasyon için çok sayıda çalışmanın gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

BRAF; MSI, sağ kolon yerleşimi, artmış tümör boyutu ve kötü diferansiasyon ile ilişkili saptanmıştır. MSS grupta BRAF ekspresyonu artışında prognozun olumsuz etkilendiği izlenmiştir. MSI olgularda Lynch sendromunun dışlanması yanı sıra prognoz ve tedavi yanıtını öngörmeye ve etkin tedavi yönetimi seçiminde yardımcı olacağı için BRAF mutasyonunun KRK'larda araştırılması gerektiği düşünülmüştür.

SOX2 ekspresyonu kötü diferansiasyon ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca pozitifliğinde peritümöral lenfosit oranının artış gösterdiği görülmüştür, bu da SOX2 ekspresyonunun, immünoterapi tedavisinin başarısını öngörmeye rol oynayabileceğini düşündürmüştür. SOX2 pozitifliğinde her iki grupta sağkalımın kötü etkilendiği görülmüştür. Verilerimiz literatürde belirtildiği gibi SOX2'nin kötü prognostik bir belirteç olduğunu desteklemekle birlikte SOX2 ekspresyonunun KRK'larda prognoza etkisi ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini aydınlatmak için daha fazla çalışmaya gereksinim duyulduğu belirlenmiştir.

. STAT1 nükleer pozitifliğinin artmış sağkalım, kötü diferansiasyon ve sağ kolon yerleşimi ile ilişkili olduğu, sitoplazmik boyanmanın MSI, kötü diferansiasyon, artmış TIL ve erken invazyon seviyeleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. STAT1'in hücrede farklı kompartmanlardaki ekspresyonu farklı mekanizmaları harekete geçiriyor gibi görünmektedir. STAT1 ayrıca azalmış uzak metastaz ve azalmış lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur.

Çalışmamızda farklı bir bulgu olarak yüksek TT seviyeleri ile STAT1 korelasyonu saptanmıştır. STAT1'in literatürde prognostik özelliği oldukça tartışmalıdır. Yüksek TT ve kötü diferansiasyonun kötü prognostik özelliğine, artmış TIL ve MSI sıklığı ile azalmış metastaz oranının ise iyi prognostik özelliğine sebep olabileceği düşünülmüş, artmış TIL seviyeleri ile biriktelik gösterdiği için immünoterapi tedavisinin başarısını öngörmeye iyi bir belirteç olabileceği saptanmıştır.

VII.ÖZET

Amaç: MSI KRK'lar MSS tümörlerden farklı klinik ve patolojik özellikler sergilemekle birlikte, olumlu klinik gidiş ile ilişkilendirilmektedir. Bu iki tümör grubu arasındaki histopatolojik ve prognostik belirteç farklılıklarını ortaya koymak, bu antiteleri daha iyi tanımamıza olanak sağlayarak klinik yaklaşımı iyileştirir. Çalışmamızda, anabilim dalımızda tanı alan MSI ve MSS kolon tümörleri klinik ve histopatolojik olarak incelenerek bu tümörler arasındaki ayrımı ortaya koymak, prognostik anlamı olabileceğini düşündüğümüz CDX2, BRAF, SOX2 ve STAT1 ekspresyonlarının histopatolojik parametreler ve prognoza etkilerini saptamak hedeflenmiştir.

Gereç ve yöntemler: 2000-2018 yılları arasında hastanemizde rezeksiyon materyali bulunan 593 kolorektal adenokarsinom olgusu doku mikroarray yöntemi ile incelenmiştir. İmmünohistokimyasal yöntemlerle MSI ve MSS tümörler saptanmıştır. Her iki tümör grubunda histopatolojik ve klinik parametreler incelenmiş, CDX2, BRAF, SOX2 ve STAT1 immün belirteçleri değerlendirilmiş, gruplar arasındaki farklılıklar belirlenmiştir. Ardından bu verilerin prognoz bilgilerine sahip olduğumuz 353 hasta üzerinden sağkalıma etkileri araştırılmıştır.

Bulgular: MSI olguların %19,1'inde saptanmıştır. MSI tümörler, artmış tümör boyutu, diferansiasyon kaybı, sağ kolon yerleşimi ve müsinöz morfoloji ile ilişkili iken, MSS tümörler artmış perinöral invazyon ve uzak metastaz yanı sıra erken invazyon seviyeleri ile ilişkili bulunmuştur. Olgular temel histopatolojik prognostik parametreler olan invazyon derinliği ve lenf nodu metastazı kriter alınarak diğer histopatolojik bulgular eşliğinde karşılaştırılmıştır. MSS olgularda, derin invazyon seviyesi, yüksek TT, PDC

ve lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur. diferansiasyon kaybı, yüksek TT, PDC ve LVİ düzeylerinde iki grupta da lenf nodu metastaz oranları artış göstermiştir. İmmün belirteçler ile elimizdeki bulgular arasındaki ilişkiye baktığımızda, BRAF ekspresyonu; MSI, sağ kolon yerleşimi, artmış tümör boyutu ve kötü diferansiasyon, CDX2 ekspresyonu; MSS, sol kolon yerleşimi, iyi diferansiasyon ve azalmış PNI, SOX2 ekspresyonu; kötü diferansiasyon ve artmış TIL, STAT1 ekspresyonu; MSI, sağ kolon yerleşimi, kötü diferansiasyon, erken invazyon seviyeleri, artmış TIL ve yüksek TT ile ilişkili bulunmuştur. MSI olgularda sağkalım daha yüksek izlenmesine karşın iki grup arasında anlamlı fark elde edilmemiştir. İleri yaş, cerrahi sınır pozitifliği, tümör perforasyonu, müsinöz morfoloji, diferansiasyon kaybı, LVİ, venöz invazyon, PNI, tümör depoziti, LN metastazı, TT, PDC, ileri TNM evresi azalmış sağkalım ile, yüksek peritümöral lenfosit seviyeleri artmış sağkalım ile ilişkili bulunmuştur. MSS grupta yüksek CDX2 ve STAT1 nükleer ekspresyonu artmış sağkalım ile ilişkili bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamızda farklı mekanizmalarla gelişen ve farklı klinik yansımaları olan MSI ve MSS tümörler arasındaki farklılıklar ortaya konmuştur. MSI tümörler daha büyük boyutlu ve kötü diferansiye, daha sık müsinöz morfolojide olmalarına karşın daha iyi prognostik özelliklere sahip bulunmuştur. İleri yaş, cerrahi sınır pozitifliği, tümör perforasyonu, müsinöz morfoloji, diferansiasyon kaybı, LVİ, venöz invazyon, PNI, tümör depoziti, LN metastazı, TT, PDC, ileri TNM evresi kötü prognostik faktör olarak saptanmıştır. CDX2 ekspresyonu MSS olgularda iyi prognozla ilişkili saptanmış ancak prognostik bir belirteç olarak kullanılacaksa ekspresyonunu değerlendirmede standardizasyon sağlanması gerektiği düşünülmüştür. Prognoz ve tedavi yanıtını öngörmeye ve etkin tedavi yönetimi seçiminde yardımcı olacağı için KRK'larda BRAF mutasyonunun araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır. SOX2 ekspresyonu TIL artışı ile ilişkili saptanmış olup, immünoterapi tedavisinin başarısını öngörmeye belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüş ve prognoza etkisi ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini açığa çıkarmak için daha fazla çalışmaya gereksinim duyulduğu saptanmıştır. STAT1'in prognostik bir belirteç olduğunu

saptamakla birlikte, STAT1 ile ilgili immünohistokimyasal çalışmaların artırılması ve değerlendirmenin standardize edilmesi gerektiği düşünölmüş, farklı yolaklarla prognoz üzerinde farklı etkiler ortaya koyduğu saptanmıştır. Ayrıca artmış TİL oranları ile immünoterapi tedavisini yönlendirebileceği bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Mikrosatellit instabil kolorektal karsinom, CDX2, SOX2, BRAF, STAT1



VIII.ABSTRACT

THE PROGNOSTIC IMPORTANCE OF CDX2, SOX2, STAT1 AND BRAF V600E EXPRESSION IN MICROSATELLITE INSTABLE COLORECTAL CARCINOMA CASES

Aim: Although MSI CRCs exhibit different clinical and pathological features from MSS tumors, they are associated with a favorable clinical course. Revealing the histopathological and prognostic marker differences between these two tumor groups improves the clinical approach by enabling us to better recognize these entities. In our study, it was aimed to examine MSI and MSS colon tumors diagnosed in our department clinically and histopathologically, to distinguish between these tumors and to determine the effects of CDX2, BRAF, SOX2 and STAT1 expressions on histopathological parameters and prognosis, which we think may have a prognostic significance.

Material and methods: Between 2000 and 2018, 593 colorectal adenocarcinoma cases with resection material in our hospital were examined by tissue microarray method. MSI and MSS tumors were detected by immunohistochemical methods. Histopathological and clinical parameters were examined in both tumor groups, CDX2, BRAF, SOX2 and STAT1 immune markers were evaluated, and differences between groups were determined. Then, the effects of these data on survival were investigated on 353 patients for whom we have prognostic information.

Results: MSI was detected in 19.1% of the cases. MSI tumors were associated with increased tumor size, loss of differentiation, right colonic location and mucinous morphology, whereas MSS tumors were associated

with increased perineural invasion and distant metastasis as well as early levels of invasion. The cases were compared in the presence of other histopathological findings, based on the main histopathological prognostic parameters, the depth of invasion and lymph node metastasis. In MSS cases, deep invasion level was associated with high TT, PDC, and lymph node metastasis. Lymph node metastasis rates increased in both groups with loss of differentiation, high TT, PDC and LVI levels. When we look at the relationship between immune markers and our findings, BRAF expression was associated with; MSI, right colon localization, increased tumor size and poor differentiation, CDX2 expression was associated with; MSS, left colonic location, good differentiation and decreased PNI; SOX2 expression was associated with poor differentiation and increased TIL, and STAT1 expression was associated with; MSI right colonic location, poor differentiation, early invasion levels, increased TIL, and high TT. Although survival was higher in MSI cases, no significant difference was found between the two groups. Advanced age, surgical margin positivity, tumor perforation, mucinous morphology, loss of differentiation, LVI, venous invasion, PNI, tumor deposit, LN metastasis, TT, PDC, advanced TNM stage were associated with decreased survival, and high peritumoral lymphocyte levels were associated with increased survival. High nuclear expression of CDX2 and STAT1 was associated with increased survival in the MSS group.

Conclusion: In our study, differences between MSI and MSS tumors, which develop with different mechanisms and have different clinical reflections, were revealed. MSI tumors were found to be larger in size and poorly differentiated, with more frequent mucinous morphology, but with better prognostic features. Advanced age, positive surgical margins, tumor perforation, mucinous morphology, loss of differentiation, LVI, venous invasion, PNI, tumor deposit, LN metastasis, TT, PDC, advanced TNM stage were found to be poor prognostic factors. CDX2 expression was found to be associated with good prognosis in MSS cases, but if it is to be used as a prognostic marker, it was thought that standardization should be provided in evaluating its expression. It was concluded that BRAF mutation should be

investigated in CRCs as it will help in predicting prognosis and treatment response and in choosing effective treatment management. SOX2 expression was found to be associated with increased TIL, and it was thought that it could be used as a marker to predict the success of immunotherapy treatment, and it was determined that more studies are needed to reveal its effect on prognosis and its relationship with clinicopathological parameters. Although it was determined that STAT1 is a prognostic marker, it was thought that immunohistochemical studies on STAT1 should be increased and the evaluation should be standardized, and it was found that it had different effects on prognosis with different pathways. It has also been found that it can guide immunotherapy treatment with increased TIL rates.

Key words: Microsatellite instable colorectal carcinoma, CDX2, SOX2, BRAF, STAT1

IX. KAYNAKLAR

1. . <https://gco.iarc.fr/GLOBOCAN2022>.
2. YARAŞ S, AKKIZ H. Kolorektal kanserli hastalarda tümör dokusunda mikrosatellit instabilite taranması ve klinik üzerine etkinliği. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 12(3):469-77.
3. De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De' Angelis N, Leandro G, Di Mario F, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. Acta Biomed. 2018;89(9-s):97-101.
4. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. Arch Toxicol. 2015;89(6):899-921.
5. Neumann J, Heinemann V, Engel J, Kirchner T, Stintzing S. The prognostic impact of CDX2 correlates with the underlying mismatch repair status and BRAF mutational status but not with distant metastasis in colorectal cancer. Virchows Archiv. 2018;473(2):199-207.
6. Olsen J, Espersen ML, Jess P, Kirkeby LT, Troelsen JT. The clinical perspectives of CDX2 expression in colorectal cancer: a qualitative systematic review. Surg Oncol. 2014;23(3):167-76.
7. Dalerba P, Sahoo D, Paik S, Guo X, Yothers G, Song N, et al. CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. N Engl J Med. 2016;374(3):211-22.
8. Hong KD, Lee D, Lee Y, Lee SI, Moon HY. Reduced CDX2 expression predicts poor overall survival in patients with colorectal cancer. Am Surg. 2013;79(4):353-60.
9. Wu M, Kim YS, Ryu HS, Choi SC, Kim KY, Park WC, et al. MSI status is associated with distinct clinicopathological features in BRAF mutation colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. Pathol Res Pract. 2020;216(1):152791.
10. Fang M, Ou J, Hutchinson L, Green MR. The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFK to mediate the CpG Island Methylator phenotype. Mol Cell. 2014;55(6):904-15.
11. Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. Gastroenterology. 2010;138(6):2088-100.
12. Wang J, Shen J, Huang C, Cao M, Shen L. Clinicopathological Significance of BRAF(V600E) Mutation in Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis. J Cancer. 2019;10(10):2332-41.
13. Chen D, Huang JF, Liu K, Zhang LQ, Yang Z, Chuai ZR, et al. BRAFV600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2014;9(3):e90607.

14. Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, Thibodeau SN, Dienstmann R, Guinney J, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology*. 2015;148(1):88-99.
15. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, Burnett-Hartman AN, Weisenberger DJ, Laird PW, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology*. 2015;148(1):77-87.e2.
16. Taieb J, Le Malicot K, Shi Q, Penault-Llorca F, Bouché O, Tabernero J, et al. Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(5).
17. Leon-Cabrera S, Vázquez-Sandoval A, Molina-Guzman E, Delgado-Ramirez Y, Delgado-Buenrostro NL, Callejas BE, et al. Deficiency in STAT1 signaling predisposes gut inflammation and prompts colorectal cancer development. *Cancers*. 2018;10(9):341.
18. Tanaka A, Zhou Y, Ogawa M, Shia J, Klimstra DS, Wang JY, et al. STAT1 as a potential prognosis marker for poor outcomes of early stage colorectal cancer with microsatellite instability. *PLoS One*. 2020;15(4):e0229252.
19. Zhang XH, Wang W, Wang YQ, Zhu L, Ma L. The association of SOX2 with clinical features and prognosis in colorectal cancer: A meta-analysis. *Pathol Res Pract*. 2020;216(1):152769.
20. Lundberg IV, Löfgren Burström A, Edin S, Eklöf V, Öberg Å, Stenling R, et al. SOX2 expression is regulated by BRAF and contributes to poor patient prognosis in colorectal cancer. *PLoS One*. 2014;9(7):e101957.
21. Zheng J, Xu L, Pan Y, Yu S, Wang H, Kennedy D, et al. Sox2 modulates motility and enhances progression of colorectal cancer via the Rho-ROCK signaling pathway. *Oncotarget*. 2017;8(58):98635-45.
22. Han X, Fang X, Lou X, Hua D, Ding W, Foltz G, et al. Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients. *PLoS One*. 2012;7(8):e41335.
23. Neumann J, Bahr F, Horst D, Kriegl L, Engel J, Luque RM, et al. SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer. *BMC Cancer*. 2011;11:518.
24. Liu H, Du L, Wen Z, Yang Y, Li J, Dong Z, et al. Sex determining region Y-box 2 inhibits the proliferation of colorectal adenocarcinoma cells through the mTOR signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2013;32(1):59-66.
25. Douaiher J, Ravipati A, Grams B, Chowdhury S, Alatisse O, Are C. Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. *J Surg Oncol*. 2017;115(5):619-30.
26. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*. 2017;3(4):524-48.
27. Vieira AR, Abar L, Chan DSM, Vingeliene S, Polemiti E, Stevens C, et al. Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Ann Oncol*. 2017;28(8):1788-802.

28. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi FE, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol.* 2015;16(16):1599-600.
29. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med.* 2016;375(8):794-8.
30. Lee PN, Thornton AJ, Hamling JS. Epidemiological evidence on environmental tobacco smoke and cancers other than lung or breast. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016;80:134-63.
31. Kyu HH, Bachman VF, Alexander LT, Mumford JE, Afshin A, Estep K, et al. Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart disease, and ischemic stroke events: systematic review and dose-response meta-analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Bmj.* 2016;354:i3857.
32. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control.* 2013;24(6):1207-22.
33. Green J, Czanner G, Reeves G, Watson J, Wise L, Roddam A, et al. Menopausal hormone therapy and risk of gastrointestinal cancer: nested case-control study within a prospective cohort, and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2012;130(10):2387-96.
34. Dulai PS, Singh S, Marquez E, Khera R, Prokop LJ, Limburg PJ, et al. Chemoprevention of colorectal cancer in individuals with previous colorectal neoplasia: systematic review and network meta-analysis. *Bmj.* 2016;355:i6188.
35. Rombouts AJM, Hugen N, van Beek JJP, Poortmans PMP, de Wilt JHW, Nagtegaal ID. Does pelvic radiation increase rectal cancer incidence? - A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2018;68:136-44.
36. Hadjiliadis D, Khoruts A, Zauber AG, Hempstead SE, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cystic Fibrosis Colorectal Cancer Screening Consensus Recommendations. *Gastroenterology.* 2018;154(3):736-45.e14.
37. Azimuddin K, Khubchandani IT, Stasik JJ, Rosen L, Riether RD. Neoplasia after ureterosigmoidostomy. *Dis Colon Rectum.* 1999;42(12):1632-8.
38. Rokkas T, Pistiolas D, Sechopoulos P, Margantinis G, Koukoulis G. Risk of colorectal neoplasm in patients with acromegaly: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2008;14(22):3484-9.
39. Lauby-Secretan B, Vilahur N, Bianchini F, Guha N, Straif K. The IARC Perspective on Colorectal Cancer Screening. *N Engl J Med.* 2018;378(18):1734-40.
40. Fujiya M, Tanaka K, Dokoshi T, Tominaga M, Ueno N, Inaba Y, et al. Efficacy and adverse events of EMR and endoscopic submucosal dissection for the treatment of colon neoplasms: a meta-analysis of studies comparing EMR and endoscopic submucosal dissection. *Gastrointest Endosc.* 2015;81(3):583-95.
41. Backes Y, Moss A, Reitsma JB, Siersema PD, Moons LM. Narrow Band Imaging, Magnifying Chromoendoscopy, and Gross Morphological

- Features for the Optical Diagnosis of T1 Colorectal Cancer and Deep Submucosal Invasion: A Systematic Review and Meta-Analysis. Am J Gastroenterol. 2017;112(1):54-64.*
42. Zhou Y, Shao W, Lu W. Diagnostic value of endorectal ultrasonography for rectal carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Ther.* 2014;10 Suppl:319-22.
 43. Zhang G, Cai YZ, Xu GH. Diagnostic Accuracy of MRI for Assessment of T Category and Circumferential Resection Margin Involvement in Patients With Rectal Cancer: A Meta-Analysis. *Dis Colon Rectum.* 2016;59(8):789-99.
 44. Lahaye MJ, Engelen SM, Nelemans PJ, Beets GL, van de Velde CJ, van Engelshoven JM, et al. Imaging for predicting the risk factors--the circumferential resection margin and nodal disease--of local recurrence in rectal cancer: a meta-analysis. *Semin Ultrasound CT MR.* 2005;26(4):259-68.
 45. van der Paardt MP, Zagers MB, Beets-Tan RG, Stoker J, Bipat S. Patients who undergo preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer restaged by using diagnostic MR imaging: a systematic review and meta-analysis. *Radiology.* 2013;269(1):101-12.
 46. Maffione AM, Marzola MC, Capirci C, Colletti PM, Rubello D. Value of (18)F-FDG PET for Predicting Response to Neoadjuvant Therapy in Rectal Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *AJR Am J Roentgenol.* 2015;204(6):1261-8.
 47. Campana JP, Pellegrini PA, Rossi GL, Ojea Quintana G, Mentz RE, Vaccaro CA. Right versus left laparoscopic colectomy for colon cancer: does side make any difference? *Int J Colorectal Dis.* 2017;32(6):907-12.
 48. Creasy JM, Sadot E, Koerkamp BG, Chou JF, Gonen M, Kemeny NE, et al. The Impact of Primary Tumor Location on Long-Term Survival in Patients Undergoing Hepatic Resection for Metastatic Colon Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2018;25(2):431-8.
 49. Arnold D, Lueza B, Douillard JY, Peeters M, Lenz HJ, Venook A, et al. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Ann Oncol.* 2017;28(8):1713-29.
 50. Boeckx N, Koukakis R, Op de Beeck K, Rolfo C, Van Camp G, Siena S, et al. Primary tumor sidedness has an impact on prognosis and treatment outcome in metastatic colorectal cancer: results from two randomized first-line panitumumab studies. *Ann Oncol.* 2017;28(8):1862-8.
 51. Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, Cohen HI, Miselevich I, Resnick MB, et al. Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(5):563-70.
 52. J. R. Gastrointestinal tract. Large Bowel. In: Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology*, 10th ed. Philadelphia: Mosby, Vol I; 2011: 731-802.2011.

53. Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, Bussey HJ, Morson BC, Northover JM, et al. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology*. 1986;10(5):437-59.
54. Publication of WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 1: Digestive System Tumours 2019. 2019.
55. Petersen VC, Baxter KJ, Love SB, Shepherd NA. Identification of objective pathological prognostic determinants and models of prognosis in Dukes' B colon cancer. *Gut*. 2002;51(1):65-9.
56. Nagtegaal ID, van de Velde CJ, Marijnen CA, van Krieken JH, Quirke P. Low rectal cancer: a call for a change of approach in abdominoperineal resection. *J Clin Oncol*. 2005;23(36):9257-64.
57. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumours*: John Wiley & Sons; 2017.
58. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The eighth edition AJCC cancer staging manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017;67(2):93-9.
59. Loughrey MB, Webster F, Arends MJ, Brown I, Burgart LJ, Cunningham C, et al. Dataset for pathology reporting of colorectal cancer: recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Annals of surgery*. 2022;275(3):e549.
60. Gouvas N, Agalianos C, Papaparaskeva K, Perrakis A, Hohenberger W, Xynos E. Surgery along the embryological planes for colon cancer: a systematic review of complete mesocolic excision. *International journal of colorectal disease*. 2016;31(9):1577-94.
61. West NP, Morris EJ, Rotimi O, Cairns A, Finan PJ, Quirke P. Pathology grading of colon cancer surgical resection and its association with survival: a retrospective observational study. *The lancet oncology*. 2008;9(9):857-65.
62. Maughan NJ, Morris E, Forman D, Quirke P. The validity of the Royal College of Pathologists' colorectal cancer minimum dataset within a population. *Br J Cancer*. 2007;97(10):1393-8.
63. Pahlman L, Bujko K, Rutkowski A, Michalski W. Altering the therapeutic paradigm towards a distal bowel margin of < 1 cm in patients with low-lying rectal cancer: a systematic review and commentary. *Colorectal Dis*. 2013;15(4):e166-74.
64. Scott N, Jamali A, Verbeke C, Ambrose N, Botterill I, Jayne D. Retroperitoneal margin involvement by adenocarcinoma of the caecum and ascending colon: what does it mean? *Colorectal Disease*. 2008;10(3):289-93.
65. Bateman A, Carr N, Warren B. The retroperitoneal surface in distal caecal and proximal ascending colon carcinoma: the Cinderella surgical margin? *Journal of clinical pathology*. 2005;58(4):426-8.
66. Publication of WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 1: Digestive System Tumours 2019.

67. Hugen N, van Beek JJ, de Wilt JH, Nagtegaal ID. Insight into mucinous colorectal carcinoma: clues from etiology. *Ann Surg Oncol.* 2014;21(9):2963-70.
68. Verhulst J, Ferdinande L, Demetter P, Ceelen W. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol.* 2012;65(5):381-8.
69. Hugen N, Brown G, Glynne-Jones R, de Wilt JH, Nagtegaal ID. Advances in the care of patients with mucinous colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(6):361-9.
70. Kakar S, Aksoy S, Burgart LJ, Smyrk TC. Mucinous carcinoma of the colon: correlation of loss of mismatch repair enzymes with clinicopathologic features and survival. *Mod Pathol.* 2004;17(6):696-700.
71. Andrici J, Farzin M, Sioson L, Clarkson A, Watson N, Toon CW, et al. Mismatch repair deficiency as a prognostic factor in mucinous colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2016;29(3):266-74.
72. Hyngstrom JR, Hu CY, Xing Y, You YN, Feig BW, Skibber JM, et al. Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: analysis from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(9):2814-21.
73. Hugen N, Verhoeven RH, Lemmens VE, van Aart CJ, Elferink MA, Radema SA, et al. Colorectal signet-ring cell carcinoma: benefit from adjuvant chemotherapy but a poor prognostic factor. *Int J Cancer.* 2015;136(2):333-9.
74. Hugen N, van de Velde CJH, de Wilt JHW, Nagtegaal ID. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann Oncol.* 2014;25(3):651-7.
75. Kakar S, Deng G, Smyrk TC, Cun L, Sahai V, Kim YS. Loss of heterozygosity, aberrant methylation, BRAF mutation and KRAS mutation in colorectal signet ring cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2012;25(7):1040-7.
76. Knox RD, Luey N, Sioson L, Kedziora A, Clarkson A, Watson N, et al. Medullary colorectal carcinoma revisited: a clinical and pathological study of 102 cases. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(9):2988-96.
77. Lanza G, Gafà R, Matteuzzi M, Santini A. Medullary-type poorly differentiated adenocarcinoma of the large bowel: a distinct clinicopathologic entity characterized by microsatellite instability and improved survival. *J Clin Oncol.* 1999;17(8):2429-38.
78. Thirunavukarasu P, Sathaiah M, Singla S, Sukumar S, Karunamurthy A, Pragatheeshwar KD, et al. Medullary carcinoma of the large intestine: a population based analysis. *Int J Oncol.* 2010;37(4):901-7.
79. Hinoi T, Tani M, Lucas PC, Caca K, Dunn RL, Macri E, et al. Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol.* 2001;159(6):2239-48.
80. García-Solano J, Pérez-Guillermo M, Conesa-Zamora P, Acosta-Ortega J, Trujillo-Santos J, Cerezuela-Fuentes P, et al. Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. *Hum Pathol.* 2010;41(10):1359-68.

81. Verbeke SL, de Jong D, Bertoni F, Sciot R, Antonescu CR, Szuhai K, et al. Array CGH analysis identifies two distinct subgroups of primary angiosarcoma of bone. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015;54(2):72-81.
82. Lee HJ, Eom DW, Kang GH, Han SH, Cheon GJ, Oh HS, et al. Colorectal micropapillary carcinomas are associated with poor prognosis and enriched in markers of stem cells. *Mod Pathol*. 2013;26(8):1123-31.
83. Haupt B, Ro JY, Schwartz MR, Shen SS. Colorectal adenocarcinoma with micropapillary pattern and its association with lymph node metastasis. *Mod Pathol*. 2007;20(7):729-33.
84. Loy TS, Kaplan PA. Villous adenocarcinoma of the colon and rectum: a clinicopathologic study of 36 cases. *The American journal of surgical pathology*. 2004;28(11):1460-5.
85. Palazzo JP, Edmonston TB, Chaille-Arnold LM, Burkholder S. Invasive papillary adenocarcinoma of the colon. *Human pathology*. 2002;33(3):372-5.
86. Gonzalez RS, Cates JM, Washington MK, Beauchamp RD, Coffey RJ, Shi C. Adenoma-like adenocarcinoma: a subtype of colorectal carcinoma with good prognosis, deceptive appearance on biopsy and frequent KRAS mutation. *Histopathology*. 2016;68(2):183-90.
87. Loy TS, Kaplan PA. Villous adenocarcinoma of the colon and rectum: a clinicopathologic study of 36 cases. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(11):1460-5.
88. Masoomi H, Ziogas A, Lin BS, Barleben A, Mills S, Stamos MJ, et al. Population-based evaluation of adenosquamous carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum*. 2012;55(5):509-14.
89. Cagır B, Nagy MW, Topham A, Rakinic J, Fry RD. Adenosquamous carcinoma of the colon, rectum, and anus: epidemiology, distribution, and survival characteristics. *Dis Colon Rectum*. 1999;42(2):258-63.
90. Choi YY, Jeon YM, Kim YJ. Sarcomatoid carcinoma of colon: extremely poor prognosis. *J Korean Surg Soc*. 2011;80 Suppl 1(Suppl 1):S26-30.
91. Moussaly E, Atallah JP. A Rare Case of Undifferentiated Carcinoma of the Colon with Rhabdoid Features: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Oncol Med*. 2015;2015:531348.
92. Agaimy A, Daum O, Märkl B, Lichtmannegger I, Michal M, Hartmann A. SWI/SNF Complex-deficient Undifferentiated/Rhabdoid Carcinomas of the Gastrointestinal Tract: A Series of 13 Cases Highlighting Mutually Exclusive Loss of SMARCA4 and SMARCA2 and Frequent Co-inactivation of SMARCB1 and SMARCA2. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(4):544-53.
93. Amin MB ES, Greene FL, et al., eds. . *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 20172017.
94. Chandler I, Houlston RS. Interobserver agreement in grading of colorectal cancers-findings from a nationwide web-based survey of histopathologists. *Histopathology*. 2008;52(4):494-9.
95. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Domati F, Tuccari G. Prognostic significance of grading based on the counting of poorly differentiated clusters in colorectal mucinous adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2015;46(11):1722-9.

96. Chandler I, Houlston R. Interobserver agreement in grading of colorectal cancers—findings from a nationwide web-based survey of histopathologists. *Histopathology*. 2008;52(4):494-9.
97. Cho YB, Chun H-K, Yun HR, Kim HC, Yun SH, Lee WY. Histological grade predicts survival time associated with recurrence after resection for colorectal cancer. *Hepato-gastroenterology*. 2009;56(94-95):1335-40.
98. Harris EI, Lewin DN, Wang HL, Lauwers GY, Srivastava A, Shyr Y, et al. Lymphovascular invasion in colorectal cancer: an interobserver variability study. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(12):1816-21.
99. Lim SB, Yu CS, Jang SJ, Kim TW, Kim JH, Kim JC. Prognostic significance of lymphovascular invasion in sporadic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2010;53(4):377-84.
100. Ishii M, Ota M, Saito S, Kinugasa Y, Akamoto S, Ito I. Lymphatic vessel invasion detected by monoclonal antibody D2-40 as a predictor of lymph node metastasis in T1 colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2009;24(9):1069-74.
101. Knijn N, van Exsel UEM, de Noo ME, Nagtegaal ID. The value of intramural vascular invasion in colorectal cancer - a systematic review and meta-analysis. *Histopathology*. 2018;72(5):721-8.
102. Lawrence J, Burgart MWVC, MD*; Dhanpat Jain, MD*. Protocol for the Examination of Excisional Biopsy Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum 2021.
103. Chand M, Siddiqui MR, Swift I, Brown G. Systematic review of prognostic importance of extramural venous invasion in rectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22(4):1721-6.
104. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer*. 2009;115(15):3379-91.
105. Knijn N, Mogk SC, Teerenstra S, Simmer F, Nagtegaal ID. Perineural Invasion is a Strong Prognostic Factor in Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(1):103-12.
106. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol*. 2017;30(9):1299-311.
107. Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. *Oncotarget*. 2010;1(7):651-61.
108. Bosch SL, Teerenstra S, de Wilt JH, Cunningham C, Nagtegaal ID. Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions. *Endoscopy*. 2013;45(10):827-34.
109. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Aida S, Hase K, et al. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(2):385-94.
110. Choi DH, Sohn DK, Chang HJ, Lim SB, Choi HS, Jeong SY. Indications for subsequent surgery after endoscopic resection of submucosally invasive colorectal carcinomas: a prospective cohort study. *Dis Colon Rectum*. 2009;52(3):438-45.

111. Petrelli F, Pezzica E, Cabiddu M, Coinu A, Borgonovo K, Ghilardi M, et al. Tumour Budding and Survival in Stage II Colorectal Cancer: a Systematic Review and Pooled Analysis. *J Gastrointest Cancer*. 2015;46(3):212-8.
112. Graham RP, Vierkant RA, Tillmans LS, Wang AH, Laird PW, Weisenberger DJ, et al. Tumor Budding in Colorectal Carcinoma: Confirmation of Prognostic Significance and Histologic Cutoff in a Population-based Cohort. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(10):1340-6.
113. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer--ready for diagnostic practice? *Hum Pathol*. 2016;47(1):4-19.
114. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Ishiguro M, Kajiwarra Y, Sato T, et al. Histological grading of colorectal cancer: a simple and objective method. *Ann Surg*. 2008;247(5):811-8.
115. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Caruso RA, Tuccari G. Poorly Differentiated Clusters: Clinical Impact in Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2017;16(1):9-15.
116. Ueno H, Kajiwarra Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(2):193-201.
117. Barresi V, Bonetti LR, Bettelli S. KRAS, NRAS, BRAF mutations and high counts of poorly differentiated clusters of neoplastic cells in colorectal cancer: observational analysis of 175 cases. *Pathology*. 2015;47(6):551-6.
118. Arnold D, Seufferlein T. Targeted treatments in colorectal cancer: state of the art and future perspectives. *Gut*. 2010;59(6):838-58.
119. Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, Das P, Rödel C, Kuo L-J, et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *The lancet oncology*. 2010;11(9):835-44.
120. Rödel C, Martus P, Papadoupoulos T, Füzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(34):8688-96.
121. Ryan R, Gibbons D, Hyland JM, Treanor D, White A, Mulcahy HE, et al. Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Histopathology*. 2005;47(2):141-6.
122. Sideris M, Papagrigoriadis S. Molecular biomarkers and classification models in the evaluation of the prognosis of colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2014;34(5):2061-8.
123. O'Brien MJ, Yang S, Huang CS, Shepherd C, Cerda S, Farraye FA. The serrated polyp pathway to colorectal carcinoma. *Diagnostic histopathology*. 2008;14(2):78-93.
124. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
125. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073-87.e3.
126. UZUN E. Rektal Karsinogenez Mekanizmaları.
127. Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*. 1975;36(6):2251-70.

128. Brenner H, Hoffmeister M, Stegmaier C, Brenner G, Altenhofen L, Haug U. Risk of progression of advanced adenomas to colorectal cancer by age and sex: estimates based on 840,149 screening colonoscopies. *Gut*. 2007;56(11):1585-9.
129. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New England Journal of Medicine*. 1988;319(9):525-32.
130. Gordon DJ, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet*. 2012;13(3):189-203.
131. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1079-99.
132. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998;396(6712):643-9.
133. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2059-72.
134. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(14):9433-8.
135. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27(9):1423-31.
136. Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B, Whitehall V. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology*. 2013;62(3):367-86.
137. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 1992;359(6392):235-7.
138. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2002;38(7):867-71.
139. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *Int J Mol Sci*. 2013;14(8):16365-85.
140. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;768:101-10.
141. Pruitt K, Der CJ. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett*. 2001;171(1):1-10.
142. Ren J, Li G, Ge J, Li X, Zhao Y. Is K-ras gene mutation a prognostic factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. 2012;55(8):913-23.
143. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-32.
144. Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G, Jr., et al. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 1996;335(23):1727-32.
145. Lanza G, Matteuzzi M, Gafá R, Orvieto E, Maestri I, Santini A, et al. Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *Int J Cancer*. 1998;79(4):390-5.

146. Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer*. 2005;92(3):434-44.
147. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*. 2002;89(7):845-60.
148. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol*. 2007;13(28):3784-91.
149. de la Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3380-7.
150. Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(10):1269-77.
151. Zaanen A, Meunier K, Sangar F, Fléjou JF, Praz F. Microsatellite instability in colorectal cancer: from molecular oncogenic mechanisms to clinical implications. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011;34(3):155-76.
152. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(5):335-46.
153. Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, Pugliese G, Cascinu S. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev*. 2016;51:19-26.
154. Classics in oncology. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. By Aldred Scott Warthin. 1913. *CA Cancer J Clin*. 1985;35(6):348-59.
155. Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, Allen BA, Uno H, Hornick JL, et al. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2017;35(10):1086-95.
156. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(4):261-8.
157. Marginean EC, Melosky B. Is There a Role for Programmed Death Ligand-1 Testing and Immunotherapy in Colorectal Cancer With Microsatellite Instability? Part I-Colorectal Cancer: Microsatellite Instability, Testing, and Clinical Implications. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(1):17-25.
158. Hendriks YM, de Jong AE, Morreau H, Tops CM, Vasen HF, Wijnen JT, et al. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. *CA Cancer J Clin*. 2006;56(4):213-25.
159. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, Burgart LJ, Smyrk TC, Shimizu D, et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology*. 2007;133(1):48-56.
160. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(22):5248-57.

161. Patil DT, Bronner MP, Portier BP, Fraser CR, Plesec TP, Liu X. A five-marker panel in a multiplex PCR accurately detects microsatellite instability-high colorectal tumors without control DNA. *Diagn Mol Pathol*. 2012;21(3):127-33.
162. Amira AT, Mouna T, Ahlem B, Raoudha A, Majid BH, Amel H, et al. Immunohistochemical expression pattern of MMR protein can specifically identify patients with colorectal cancer microsatellite instability. *Tumour Biol*. 2014;35(7):6283-91.
163. Tuppurainen K, Mäkinen JM, Junttila O, Liakka A, Kyllönen AP, Tuominen H, et al. Morphology and microsatellite instability in sporadic serrated and non-serrated colorectal cancer. *J Pathol*. 2005;207(3):285-94.
164. Benatti P, Gafà R, Barana D, Marino M, Scarselli A, Pedroni M, et al. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res*. 2005;11(23):8332-40.
165. Zaanan A, Cuilliere-Dartigues P, Guilloux A, Parc Y, Louvet C, de Gramont A, et al. Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann Oncol*. 2010;21(4):772-80.
166. Devaud N, Gallinger S. Chemotherapy of MMR-deficient colorectal cancer. *Fam Cancer*. 2013;12(2):301-6.
167. Bellizzi AM, Frankel WL. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol*. 2009;16(6):405-17.
168. Marginean EC, Melosky B. Is There a Role for Programmed Death Ligand-1 Testing and Immunotherapy in Colorectal Cancer With Microsatellite Instability? Part II-The Challenge of Programmed Death Ligand-1 Testing and Its Role in Microsatellite Instability-High Colorectal Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(1):26-34.
169. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509-20.
170. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2006;38(7):787-93.
171. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007;50(1):113-30.
172. Keshet I, Schlesinger Y, Farkash S, Rand E, Hecht M, Segal E, et al. Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. *Nat Genet*. 2006;38(2):149-53.
173. Gruber SB. New developments in Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) and mismatch repair gene testing. *Gastroenterology*. 2006;130(2):577-87.
174. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(15):8681-6.

175. Hazewinkel Y, de Wijkerslooth TR, Stoop EM, Bossuyt PM, Biermann K, van de Vijver MJ, et al. Prevalence of serrated polyps and association with synchronous advanced neoplasia in screening colonoscopy. *Endoscopy*. 2014;46(3):219-24.
176. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, Batts KP, Burke CA, Burt RW, et al. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(9):1315-29; quiz 4, 30.
177. Chan AO, Issa JP, Morris JS, Hamilton SR, Rashid A. Concordant CpG island methylation in hyperplastic polyposis. *Am J Pathol*. 2002;160(2):529-36.
178. Fernando WC, Miranda MS, Worthley DL, Togashi K, Watters DJ, Leggett BA, et al. The CIMP Phenotype in BRAF Mutant Serrated Polyps from a Prospective Colonoscopy Patient Cohort. *Gastroenterol Res Pract*. 2014;2014:374926.
179. Kim EC, Lance P. Colorectal polyps and their relationship to cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 1997;26(1):1-17.
180. Li WQ, Kawakami K, Ruszkiewicz A, Bennett G, Moore J, Iacopetta B. BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol Cancer*. 2006;5:2.
181. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA, et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res*. 2005;65(14):6063-9.
182. Bläker H, Alwers E, Arnold A, Herpel E, Tagscherer KE, Roth W, et al. The Association Between Mutations in BRAF and Colorectal Cancer-Specific Survival Depends on Microsatellite Status and Tumor Stage. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(3):455-62.e6.
183. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, Yamauchi M, Nishihara R, et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(15):1151-6.
184. Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev*. 1995;9(21):2635-45.
185. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 2003;17(1):126-40.
186. Chew JL, Loh YH, Zhang W, Chen X, Tam WL, Yeap LS, et al. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 2005;25(14):6031-46.
187. Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):15-30.
188. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
189. Rizzino A, Wuebben EL. Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1859(6):780-91.

190. Kondoh H, Kamachi Y. SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(3):391-9.
191. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell.* 2014;14(3):275-91.
192. Liu XF, Yang WT, Xu R, Liu JT, Zheng PS. Cervical cancer cells with positive Sox2 expression exhibit the properties of cancer stem cells. *PLoS One.* 2014;9(1):e87092.
193. Vanner RJ, Remke M, Gallo M, Selvadurai HJ, Coutinho F, Lee L, et al. Quiescent sox2(+) cells drive hierarchical growth and relapse in sonic hedgehog subgroup medulloblastoma. *Cancer Cell.* 2014;26(1):33-47.
194. Weina K, Utikal J. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clin Transl Med.* 2014;3:19.
195. Yang YG, Koh YW, Sari IN, Jun N, Lee S, Phi LTH, et al. Interferon-induced transmembrane protein 1-mediated EGFR/SOX2 signaling axis is essential for progression of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2019;144(8):2020-32.
196. Malladi S, Macalinao DG, Jin X, He L, Basnet H, Zou Y, et al. Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT. *Cell.* 2016;165(1):45-60.
197. Boumahdi S, Driessens G, Lapouge G, Rorive S, Nassar D, Le Mercier M, et al. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature.* 2014;511(7508):246-50.
198. Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(3):303-10.
199. Silberg DG, Swain GP, Suh ER, Traber PG. Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology.* 2000;119(4):961-71.
200. Bonhomme C, Duluc I, Martin E, Chawengsaksophak K, Chenard MP, Keding M, et al. The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut.* 2003;52(10):1465-71.
201. Gross I, Duluc I, Benameur T, Calon A, Martin E, Brabletz T, et al. The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells. *Oncogene.* 2008;27(1):107-15.
202. Hryniuk A, Grainger S, Savory JG, Lohnes D. Cdx1 and Cdx2 function as tumor suppressors. *J Biol Chem.* 2014;289(48):33343-54.
203. Tomasello G, Barni S, Turati L, Ghidini M, Pezzica E, Passalacqua R, et al. Association of CDX2 Expression With Survival in Early Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Colorectal Cancer.* 2018;17(2):97-103.
204. Bruun J, Sveen A, Barros R, Eide PW, Eilertsen I, Kolberg M, et al. Prognostic, predictive, and pharmacogenomic assessments of CDX2 refine stratification of colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2018;12(9):1639-55.

205. Zhang BY, Jones JC, Briggler AM, Hubbard JM, Kipp BR, Sargent DJ, et al. Lack of Caudal-Type Homeobox Transcription Factor 2 Expression as a Prognostic Biomarker in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2017;16(2):124-8.
206. Neumann J, Heinemann V, Engel J, Kirchner T, Stintzing S. The prognostic impact of CDX2 correlates with the underlying mismatch repair status and BRAF mutational status but not with distant metastasis in colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2018;473(2):199-207.
207. Shigematsu Y, Inamura K, Yamamoto N, Mise Y, Saiura A, Ishikawa Y, et al. Impact of CDX2 expression status on the survival of patients after curative resection for colorectal cancer liver metastasis. *BMC Cancer*. 2018;18(1):980.
208. Bae JM, Lee TH, Cho NY, Kim TY, Kang GH. Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2015;21(5):1457-67.
209. Hansen TF, Kjær-Frifeldt S, Eriksen AC, Lindebjerg J, Jensen LH, Sørensen FB, et al. Prognostic impact of CDX2 in stage II colon cancer: results from two nationwide cohorts. *Br J Cancer*. 2018;119(11):1367-73.
210. Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu X-Y. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(9):5328-37.
211. Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR. Defective TNF- α -induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science*. 1997;278(5343):1630-2.
212. Chin YE, Kitagawa M, Su W-CS, You Z-H, Iwamoto Y, Fu X-Y. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science*. 1996;272(5262):719-22.
213. Townsend PA, Scarabelli TM, Davidson SM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(7):5811-20.
214. Stephanou A, Brar B, Knight R, Latchman D. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters. *Cell Death & Differentiation*. 2000;7(3):329-30.
215. Hix LM, Karavitis J, Khan MW, Shi YH, Khazaie K, Zhang M. Tumor STAT1 transcription factor activity enhances breast tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *J Biol Chem*. 2013;288(17):11676-88.
216. Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5336-41.
217. Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V, Kuliczowski K, Hetuin D, et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*. 2007;110(1):296-304.
218. Bellucci R, Martin A, Bommarito D, Wang K, Hansen SH, Freeman GJ, et al. Interferon- γ -induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression. *Oncoimmunology*. 2015;4(6):e1008824.

219. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-7.
220. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*. 2001;10(7):657-62.
221. Brown LA, Huntsman D. Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: challenges and solutions. *J Mol Histol*. 2007;38(2):151-7.
222. Atmaca HT, Oğuz K, Canpolat S, Antepioğlu T. Patolojide Doku Mikroarray Teknolojisi: Zaman ve Bütçe Avantajları. *Animal Health Production and Hygiene*.4(1):364-7.
223. Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified...tissue microarray technology. *Mol Pathol*. 2003;56(4):198-204.
224. Ilyas M, Grabsch H, Ellis IO, Womack C, Brown R, Berney D, et al. Guidelines and considerations for conducting experiments using tissue microarrays. *Histopathology*. 2013;62(6):827-39.
225. Singh A, Sau AK. Tissue microarray: a powerful and rapidly evolving tool for high-throughput analysis of clinical specimens. *International Journal of Case Reports and Images (IJCRI)*. 2010;1(1):1-6.
226. Vogel UF. Inexpensive and precise paraffin tissue microarrays constructed with a computer numerical control (CNC) drilling machine. *Histopathology*. 2007;51(1):136-7.
227. Vogel UF, Bueltmann BD. Simple, inexpensive, and precise paraffin tissue microarrays constructed with a conventional microcompound table and a drill grinder. *Am J Clin Pathol*. 2006;126(3):342-8.
228. Lilischkis R, Wasielewski R, Mengel M. Method for production of material blocks with multiple test samples. Google Patents; 2006.
229. Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. *Exp Hematol*. 2002;30(12):1365-72.
230. Skacel M, Skilton B, Pettay JD, Tubbs RR. Tissue microarrays: a powerful tool for high-throughput analysis of clinical specimens: a review of the method with validation data. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002;10(1):1-6.
231. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *Biotechniques*. 2004;36(1):98-105.
232. (SRP) SRP. <https://seer.cancer.gov>. n.d.
233. Vuik FE, Nieuwenburg SA, Bardou M, Lansdorp-Vogelaar I, Dinis-Ribeiro M, Bento MJ, et al. Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut*. 2019;68(10):1820-6.
234. Goldstein J, Tran B, Ensor J, Gibbs P, Wong HL, Wong SF, et al. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann Oncol*. 2014;25(5):1032-8.
235. Jeong S-Y. Microsatellite instability and mutations in DNA mismatch repair genes in sporadic colorectal cancers. *Diseases of the colon & rectum*. 2003;46(8):1069-77.
236. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of

- benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(3):247-57.
237. Jass JR. HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Fam Cancer*. 2004;3(2):93-100.
238. McKay A, Donaleshen J, Helewa RM, Park J, Wirtzfeld D, Hochman D, et al. Does young age influence the prognosis of colorectal cancer: a population-based analysis. *World journal of surgical oncology*. 2014;12(1):1-10.
239. Toh J, Spring K. Microsatellite Instability (MSI) status and prognosis in colorectal cancer: Meta-analysis. *Annals of Oncology*. 2019;30:v220.
240. Batur S, Vuralli Bakkaloglu D, Kepil N, Erdamar S. Microsatellite instability and B-type Raf proto-oncogene mutation in colorectal cancer: Clinicopathological characteristics and effects on survival. *Bosn J Basic Med Sci*. 2016;16(4):254-60.
241. Kang S, Na Y, Joung SY, Lee SI, Oh SC, Min BW. The significance of microsatellite instability in colorectal cancer after controlling for clinicopathological factors. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(9):e0019.
242. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, et al. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2017;3(2):211-9.
243. Lin CC, Lai YL, Lin TC, Chen WS, Jiang JK, Yang SH, et al. Clinicopathologic features and prognostic analysis of MSI-high colon cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2012;27(3):277-86.
244. Vogelaar FJ, Erning FNV, Reimers MS, Linden HV, Pruijt H, Brule A, et al. The Prognostic Value of Microsatellite Instability, KRAS, BRAF and PIK3CA Mutations in Stage II Colon Cancer Patients. *Mol Med*. 2016;21(1):1038-46.
245. Parc Y, Gueroult S, Mourra N, Serfaty L, Fléjou JF, Tiret E, et al. Prognostic significance of microsatellite instability determined by immunohistochemical staining of MSH2 and MLH1 in sporadic T3N0M0 colon cancer. *Gut*. 2004;53(3):371-5.
246. Lin EI, Tseng LH, Gocke CD, Reil S, Le DT, Azad NS, et al. Mutational profiling of colorectal cancers with microsatellite instability. *Oncotarget*. 2015;6(39):42334-44.
247. CRUK. Bowel cancer incidence statistics. 2017.
248. White A, Ironmonger L, Steele RJC, Ormiston-Smith N, Crawford C, Seims A. A review of sex-related differences in colorectal cancer incidence, screening uptake, routes to diagnosis, cancer stage and survival in the UK. *BMC Cancer*. 2018;18(1):906.
249. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2020;158(2):291-302.
250. Alexander J, Watanabe T, Wu TT, Rashid A, Li S, Hamilton SR. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol*. 2001;158(2):527-35.

251. Xiao H, Yoon YS, Hong SM, Roh SA, Cho DH, Yu CS, et al. Poorly differentiated colorectal cancers: correlation of microsatellite instability with clinicopathologic features and survival. *Am J Clin Pathol*. 2013;140(3):341-7.
252. Liang Y, Cai X, Zheng X, Yin H. Analysis of the Clinicopathological Characteristics of Stage I-III Colorectal Cancer Patients Deficient in Mismatch Repair Proteins. *Onco Targets Ther*. 2021;14:2203-12.
253. Yan WY, Hu J, Xie L, Cheng L, Yang M, Li L, et al. Prediction of biological behavior and prognosis of colorectal cancer patients by tumor MSI/MMR in the Chinese population. *Onco Targets Ther*. 2016;9:7415-24.
254. Saha S, Shaik M, Johnston G, Saha SK, Berbiglia L, Hicks M, et al. Tumor size predicts long-term survival in colon cancer: an analysis of the National Cancer Data Base. *The American Journal of Surgery*. 2015;209(3):570-4.
255. Tougeron D, Sickersen G, Mouillet G, Zaanen A, Trouilloud I, Coriat R, et al. Predictors of disease-free survival in colorectal cancer with microsatellite instability: An AGEO multicentre study. *European Journal of Cancer*. 2015;51(8):925-34.
256. van Putten PG, van Lier MG, Hage M, Biermann K, van Rijssel RH, Westenend PJ, et al. Limited diagnostic value of microsatellite instability associated pathology features in colorectal cancer. *Fam Cancer*. 2014;13(3):351-9.
257. Rosty C, Williamson EJ, Clendenning M, Walters RJ, Win AK, Jenkins MA, et al. Should the grading of colorectal adenocarcinoma include microsatellite instability status? *Hum Pathol*. 2014;45(10):2077-84.
258. Halling KC, French AJ, McDonnell SK, Burgart LJ, Schaid DJ, Peterson BJ, et al. Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(15):1295-303.
259. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol*. 1994;145(1):148-56.
260. Park JS, Huh JW, Park YA, Cho YB, Yun SH, Kim HC, et al. Prognostic comparison between mucinous and nonmucinous adenocarcinoma in colorectal cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(15):e658.
261. Chok KS, Law WL. Prognostic factors affecting survival and recurrence of patients with pT1 and pT2 colorectal cancer. *World J Surg*. 2007;31(7):1485-90.
262. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5131-7.
263. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(11):1393-406.
264. Jakubowska K, Kisielewski W, Kańczuga-Koda L, Koda M, Famulski W. Stromal and intraepithelial tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinoma. *Oncol Lett*. 2017;14(6):6421-32.

265. Klintrup K, Mäkinen JM, Kauppila S, Väre PO, Melkko J, Tuominen H, et al. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2005;41(17):2645-54.
266. Nazemalhosseini-Mojarad E, Mohammadpour S, Torshizi Esafahani A, Gharib E, Larki P, Moradi A, et al. Intratumoral infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in colorectal cancer patients: Independent of oncogenetic features. *J Cell Physiol*. 2019;234(4):4768-77.
267. Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, et al. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut*. 2001;48(6):821-9.
268. Chapusot C, Martin L, Mungra N, Rageot D, Bouvier AM, Bonithon Kopp C, et al. Sporadic colorectal cancers with defective mismatch repair display a number of specific morphological characteristics: relationship between the expression of hMLH1 and hMSH2 proteins and clinicopathological features of 273 adenocarcinomas. *Histopathology*. 2003;43(1):40-7.
269. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, et al. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res*. 2009;15(20):6412-20.
270. Buckowitz A, Knaebel HP, Benner A, Bläker H, Gebert J, Kienle P, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *Br J Cancer*. 2005;92(9):1746-53.
271. Idos GE, Kwok J, Bonthala N, Kysh L, Gruber SB, Qu C. The Prognostic Implications of Tumor Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep*. 2020;10(1):3360.
272. Jang S, Hong M, Shin MK, Kim BC, Shin HS, Yu E, et al. KRAS and PIK3CA mutations in colorectal adenocarcinomas correlate with aggressive histological features and behavior. *Hum Pathol*. 2017;65:21-30.
273. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*. 2002;40(2):127-32.
274. van Wyk HC, Roseweir A, Alexander P, Park JH, Horgan PG, McMillan DC, et al. The Relationship Between Tumor Budding, Tumor Microenvironment, and Survival in Patients with Primary Operable Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2019;26(13):4397-404.
275. Lee VWK, Chan KF. Tumor budding and poorly-differentiated cluster in prognostication in Stage II colon cancer. *Pathol Res Pract*. 2018;214(3):402-7.
276. Zengin M. Tumour budding and tumour stroma ratio are reliable predictors for death and recurrence in elderly stage I colon cancer patients. *Pathology-Research and Practice*. 2019;215(11):152635.
277. van Wyk HC, Park JH, Edwards J, Horgan PG, McMillan DC, Going JJ. The relationship between tumour budding, the tumour microenvironment and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016;115(2):156-63.

278. Jass JR, Barker M, Fraser L, Walsh MD, Whitehall VL, Gabrielli B, et al. APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2003;56(1):69-73.
279. AJCC Cancer Staging Manual. 8th editio. New York: Springer; 2017.2017.
280. Barresi V, Bonetti LR, Bettelli S. KRAS, NRAS, BRAF mutations and high counts of poorly differentiated clusters of neoplastic cells in colorectal cancer: observational analysis of 175 cases. *Pathology*. 2015;47(6):551-6.
281. Lee VWK, Chan KF. Tumor budding and poorly-differentiated cluster in prognostication in stage II colon cancer. *Pathology-Research and Practice*. 2018;214(3):402-7.
282. Ryan É, Khaw YL, Creavin B, Geraghty R, Ryan EJ, Gibbons D, et al. Tumor budding and PDC grade are stage independent predictors of clinical outcome in mismatch repair deficient colorectal cancer. *The American journal of surgical pathology*. 2018;42(1):60-8.
283. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Branca G, Tuccari G. Histologic prognostic markers in stage IIA colorectal cancer: a comparative study. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2016;51(3):314-20.
284. Konishi T, Shimada Y, Lee LH, Cavalcanti MS, Hsu M, Smith JJ, et al. Poorly differentiated clusters predict colon cancer recurrence: an in-depth comparative analysis of invasive-front prognostic markers. *The American journal of surgical pathology*. 2018;42(6):705.
285. Kim JW, Shin MK, Kim BC. Clinicopathologic impacts of poorly differentiated cluster-based grading system in colorectal carcinoma. *Journal of Korean Medical Science*. 2015;30(1):16-23.
286. Reggiani Bonetti L, Barresi V, Bettelli S, Domati F, Palmiere C. Poorly differentiated clusters (PDC) in colorectal cancer: what is and ought to be known. *Diagn Pathol*. 2016;11:31.
287. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *The American journal of surgical pathology*. 2012;36(2):193-201.
288. Ueno H, Konishi T, Ishikawa Y, Shimazaki H, Ueno M, Aosasa S, et al. Prognostic value of poorly differentiated clusters in the primary tumor in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastasis. *Surgery*. 2015;157(5):899-908.
289. Kazama Y, Watanabe T, Kanazawa T, Tanaka J, Tanaka T, Nagawa H. Microsatellite instability in poorly differentiated adenocarcinomas of the colon and rectum: relationship to clinicopathological features. *J Clin Pathol*. 2007;60(6):701-4.
290. Prabhudesai A, Arif S, Finlayson CJ, Kumar D. Impact of microscopic extranodal tumor deposits on the outcome of patients with rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(11):1531-7.
291. Zhang M, Hu W, Hu K, Lin Y, Feng Z, Yun JP, et al. Association of KRAS mutation with tumor deposit status and overall survival of colorectal cancer. *Cancer Causes Control*. 2020;31(7):683-9.
292. Ueno H, Mochizuki H. Clinical significance of extrabowel skipped cancer infiltration in rectal cancer. *Surg Today*. 1997;27(7):617-22.

293. Belt EJ, van Stijn MF, Bril H, de Lange-de Klerk ES, Meijer GA, Meijer S, et al. Lymph node negative colorectal cancers with isolated tumor deposits should be classified and treated as stage III. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(12):3203-11.
294. Harrison JC, Dean PJ, el-Zeky F, Vander Zwaag R. From Dukes through Jass: pathological prognostic indicators in rectal cancer. *Hum Pathol*. 1994;25(5):498-505.
295. Jeong SY, Shin KH, Shin JH, Ku JL, Shin YK, Park SY, et al. Microsatellite instability and mutations in DNA mismatch repair genes in sporadic colorectal cancers. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(8):1069-77.
296. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(3):247-57.
297. Seppälä TT, Böhm JP, Friman M, Lahtinen L, Väyrynen VM, Liipo TK, et al. Combination of microsatellite instability and BRAF mutation status for subtyping colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(12):1966-75.
298. Malesci A, Laghi L, Bianchi P, Delconte G, Randolph A, Torri V, et al. Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(13):3831-9.
299. Wong SK, Jalaludin BB, Henderson CJ, Morgan MJ, Berthelsen AS, Issac MM, et al. Direct tumor invasion in colon cancer: correlation with tumor spread and survival. *Dis Colon Rectum*. 2008;51(9):1331-8.
300. Jurescu A, Văduva A, Tăban S, Gheju A, Olteanu G, Mihai I, et al. Poorly differentiated clusters: prognostic significance in colorectal carcinomas. *Polish Journal of Pathology*. 2020;70(4):235-45.
301. Ueno H, Hase K, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Yoshii S, Kudo SE, et al. Novel risk factors for lymph node metastasis in early invasive colorectal cancer: a multi-institution pathology review. *J Gastroenterol*. 2014;49(9):1314-23.
302. Sakuragi M, Togashi K, Konishi F, Koinuma K, Kawamura Y, Okada M, et al. Predictive factors for lymph node metastasis in T1 stage colorectal carcinomas. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(12):1626-32.
303. Langner C, Harbaum L, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Schlemmer A, et al. Mucinous differentiation in colorectal cancer--indicator of poor prognosis? *Histopathology*. 2012;60(7):1060-72.
304. Kim CG, Ahn JB, Jung M, Beom SH, Kim C, Kim JH, et al. Effects of microsatellite instability on recurrence patterns and outcomes in colorectal cancers. *British journal of cancer*. 2016;115(1):25-33.
305. Olsen J, Eiholm S, Kirkeby L, Espersen MLM, Jess P, Gögenür I, et al. CDX2 downregulation is associated with poor differentiation and MMR deficiency in colon cancer. *Experimental and molecular pathology*. 2016;100(1):59-66.
306. Winn B, Tavares R, Matoso A, Noble L, Fanion J, Waldman SA, et al. Expression of the intestinal biomarkers Guanylyl cyclase C and CDX2 in poorly differentiated colorectal carcinomas. *Human pathology*. 2010;41(1):123-8.

307. Bae JM, Lee TH, Cho N-Y, Kim T-Y, Kang GH. Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2015;21(5):1457.
308. Slik K, Turkki R, Carpén O, Kurki S, Korkeila E, Sundström J, et al. CDX2 Loss With Microsatellite Stable Phenotype Predicts Poor Clinical Outcome in Stage II Colorectal Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2019;43(11):1473-82.
309. Salem ME, Weinberg BA, Xiu J, El-Deiry WS, Hwang JJ, Gatalica Z, et al. Comparative molecular analyses of left-sided colon, right-sided colon, and rectal cancers. *Oncotarget*. 2017;8(49):86356-68.
310. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2011;117(20):4623-32.
311. Dvorak K, Higgins A, Palting J, Cohen M, Brunhoeber P. Immunohistochemistry with Anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Antibody is a Sensitive Method for Detection of the BRAF V600E Mutation in Colon Cancer: Evaluation of 120 Cases with and without KRAS Mutation and Literature Review. *Pathol Oncol Res*. 2019;25(1):349-59.
312. Rosenbaum MW, Bledsoe JR, Morales-Oyarvide V, Huynh TG, Mino-Kenudson M. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. *Mod Pathol*. 2016;29(9):1104-12.
313. Lee LH, Cavalcanti MS, Segal NH, Hechtman JF, Weiser MR, Smith JJ, et al. Patterns and prognostic relevance of PD-1 and PD-L1 expression in colorectal carcinoma. *Mod Pathol*. 2016;29(11):1433-42.
314. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*. 2007;58:267-84.
315. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):717-28.
316. O'Connor ML, Xiang D, Shigdar S, Macdonald J, Li Y, Wang T, et al. Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward. *Cancer Lett*. 2014;344(2):180-7.
317. Lundberg IV, Edin S, Eklöf V, Öberg Å, Palmqvist R, Wikberg ML. SOX2 expression is associated with a cancer stem cell state and down-regulation of CDX2 in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2016;16:471.
318. Miller T, McCoy M, Hemmings C, Bulsara M, Iacopetta B, Platell C. The prognostic value of cancer stem-like cell markers SOX2 and CD133 in stage III colon cancer is modified by expression of the immune-related markers FoxP3, PD-L1 and CD3. *Pathology*. 2017;49(7):721-30.
319. Miller TJ, McCoy MJ, Lee-Pullen TF, Anyaegbu CC, Hemmings C, Bulsara MK, et al. The Prognostic and Predictive Value of SOX2(+) Cell Densities in Patients Treated for Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5).
320. Bhadurihauck A, Li L, Li Q, Wang J, Xiao Z. Transient exposure to proteins SOX2, Oct-4, and NANOG immortalizes exhausted tumor-infiltrating CTLs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016;473(4):1255-60.

321. Lee J, Jung YY, Lee JH, Hong M, Hwang HW, Hong SA, et al. The Prognostic Value of Sex-Determining Region Y-Box 2 and CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Limited-Stage Small-Cell Lung Cancer. *Oncology*. 2021;99(8):528-38.
322. Zhang Y, Liu Z. STAT1 in cancer: friend or foe? *Discov Med*. 2017;24(130):19-29.
323. Au KK, Le Page C, Ren R, Meunier L, Clément I, Tyrishkin K, et al. STAT1-associated intratumoural T(H)1 immunity predicts chemotherapy resistance in high-grade serous ovarian cancer. *J Pathol Clin Res*. 2016;2(4):259-70.
324. Dimco G, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. STAT1 interacts directly with cyclin D1/Cdk4 and mediates cell cycle arrest. *Cell Cycle*. 2010;9(23):4638-49.
325. Shin EC, Ahn JM, Kim CH, Choi Y, Ahn YS, Kim H, et al. IFN-gamma induces cell death in human hepatoma cells through a TRAIL/death receptor-mediated apoptotic pathway. *Int J Cancer*. 2001;93(2):262-8.
326. Xu X, Fu XY, Plate J, Chong AS. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res*. 1998;58(13):2832-7.
327. Zhang Y, Jin G, Zhang J, Mi R, Zhou Y, Fan W, et al. Overexpression of STAT1 suppresses angiogenesis under hypoxia by regulating VEGF-A in human glioma cells. *Biomed Pharmacother*. 2018;104:566-75.
328. Klampfer L. The role of signal transducers and activators of transcription in colon cancer. *Front Biosci*. 2008;13:2888-99.
329. Simpson JA, Al-Attar A, Watson NF, Scholefield JH, Ilyas M, Durrant LG. Intratumoral T cell infiltration, MHC class I and STAT1 as biomarkers of good prognosis in colorectal cancer. *Gut*. 2010;59(7):926-33.
330. Gordziel C, Bratsch J, Moriggl R, Knösel T, Friedrich K. Both STAT1 and STAT3 are favourable prognostic determinants in colorectal carcinoma. *Br J Cancer*. 2013;109(1):138-46.
331. Slattery ML, Lundgreen A, Kadlubar SA, Bondurant KL, Wolff RK. JAK/STAT/SOCS-signaling pathway and colon and rectal cancer. *Mol Carcinog*. 2013;52(2):155-66.
332. Zhang Y, Molavi O, Su M, Lai R. The clinical and biological significance of STAT1 in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2014;14:791.
333. Sun Y, Yang S, Sun N, Chen J. Differential expression of STAT1 and p21 proteins predicts pancreatic cancer progression and prognosis. *Pancreas*. 2014;43(4):619-23.
334. Chen G, Wang H, Xie S, Ma J, Wang G. STAT1 negatively regulates hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Oncol Rep*. 2013;29(6):2303-10.
335. Takahashi A, Nakayama R, Ishibashi N, Doi A, Ichinohe R, Ikuyo Y, et al. Analysis of gene expression profiles of soft tissue sarcoma using a combination of knowledge-based filtering with integration of multiple statistics. *PLoS One*. 2014;9(9):e106801.
336. Widschwendter A, Tonko-Geymayer S, Welte T, Daxenbichler G, Marth C, Doppler W. Prognostic significance of signal transducer and

- activator of transcription 1 activation in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8(10):3065-74.
337. Sheen-Chen SM, Huang CC, Tang RP, Yang CH, Chou FF, Eng HL. Signal transducer and activator of transcription 1 in breast cancer: analysis with tissue microarray. *Anticancer Res.* 2007;27(4b):2481-6.
338. Tymoszek P, Charoentong P, Hackl H, Spilka R, Müller-Holzner E, Trajanoski Z, et al. High STAT1 mRNA levels but not its tyrosine phosphorylation are associated with macrophage infiltration and bad prognosis in breast cancer. *BMC Cancer.* 2014;14:257.
339. Delgado-Ramirez Y, Baltazar-Perez I, Martinez Y, Callejas BE, Medina-Andrade I, Olguín JE, et al. STAT1 Is Required for Decreasing Accumulation of Granulocytic Cells via IL-17 during Initial Steps of Colitis-Associated Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14).
340. Zhang J, Wang F, Liu F, Xu G. Predicting STAT1 as a prognostic marker in patients with solid cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2020;12:1758835920917558.
341. Shang S, Yang YW, Chen F, Yu L, Shen SH, Li K, et al. TRIB3 reduces CD8(+) T cell infiltration and induces immune evasion by repressing the STAT1-CXCL10 axis in colorectal cancer. *Sci Transl Med.* 2022;14(626):eabf0992.
342. Liang YH, Chen KH, Tsai JH, Cheng YM, Lee CC, Kao CH, et al. Proteasome inhibitors restore the STAT1 pathway and enhance the expression of MHC class I on human colon cancer cells. *J Biomed Sci.* 2021;28(1):75.
343. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487(7407):330-7.
344. Chen ML, Chen JY, Hu J, Chen Q, Yu LX, Liu BR, et al. Comparison of microsatellite status detection methods in colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018;11(3):1431-8.
345. Yuan L, Chi Y, Chen W, Chen X, Wei P, Sheng W, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(11):20988-1000.
346. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(35):5783-8.
347. Watson N, Griew F, Morris M, Harvey J, Stewart C, Schofield L, et al. Heterogeneous staining for mismatch repair proteins during population-based prescreening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Mol Diagn.* 2007;9(4):472-8.
348. Jaffrelot M, Farés N, Brunac AC, Laurenty AP, Danjoux M, Grand D, et al. An unusual phenotype occurs in 15% of mismatch repair-deficient tumors and is associated with non-colorectal cancers and genetic syndromes. *Modern Pathology.* 2022;35(3):427-37.
349. Saxena R, Badve S. Tissue microarray—construction and quality assurance. *Education guide/immunohistochemical staining methods.* 2009;5:46.

350. Singh DK, Sakhuja P, Gondal R. Making and using inexpensive manually constructed tissue micro-array: experience of a tertiary care hospital in India. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009;52(3):304-9.

