T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

KOLOREKTAL ADENOKARSİNOMLARDA T LENFOSİT, B LENFOSİT VE NK HÜCRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Orhan Yavuz DEMİRCİ

KAYSERİ – 2014

T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

KOLOREKTAL ADENOKARSİNOMLARDA T LENFOSİT, B LENFOSİT VE NK HÜCRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TTU–2013–4759 nolu proje ile desteklenmiştir.

Dr. Orhan Yavuz DEMİRCİ

Danışman

Prof. Dr. Erdoğan M. SÖZÜER

KAYSERİ – 2014

TEŞEKKÜR

Kendisinin bilimsel yaklaşımına her zaman hayranlık duyduğum, bilimsel bakış açısını hayat felsefem haline getirmeye çalıştığım üstümdeki fedakarlığını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim çok kıymetli hocam Prof. Dr. Erdoğan Sözüer'e en kalbi şükranlarımı sunarım.

Cerrahi eğitimim boyunca, sadece üniversitenin insan için bir öğretim kurumu olmadığını aynı zamanda kutsal bir eğitim merkezi olduğunu öğreten,mesleki tecrübeyi kazanmamda tekniker olmamam için her koşulda etik kuralları ve bilimselliği önde tutmamı bana öğreten, bilgilerini ve tecrübelerini benden hiç bir zaman esirgemeyen, bugüne gelmemde büyük hakları ve fedakarlıkları olan saygı değer hocalarım Prof. Dr. Zeki Yılmaz, Prof. Dr. Engin Ok, Prof. Dr. Alper Akcan, Doç. Dr. Hızır Akyıldız , Yrd. Doç. Dr. Muhammed Akyüz, Yrd. Doç. Dr. Ertan Emek, Yrd. Doç. Dr. Bahadır Öz'e en kalbi duygularımla teşekkür ederim.

Tez çalışmamda yardımcı olan Doç. Dr. Yavuz Köker hocamla birlikte Berkay Saraymen'e çalışmaktan her zaman onur duyduğum fedakar asistan arkadaşlarıma, servis, amaliyathane hemşire ve personeline teşekkür ederim.

Hayatımın başlangıcından itibaren desteklerini esirgemeyen sevgili anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

Son cümlelerimi canımdan çok sevdiğim sevgili eşim Selda Yavuz Demirci ve kızım Ada Demirci için yazmak istiyorum.Zorlu asistanlık sürecinde hertürlü sıkıntıya rağmen desteğini esirgemeyen sevgili eşime,doğduğu günden beri her zaman yanında olamadığım hastaneye gitme baba yanımda kal diyen canım kızıma,büyük özverileriden dolayı teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
TABLO ve RESİM LİSTESİ ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vi**
ÖZET ..... **vii**
ABSTRACT ..... **viii**
KISALTMALAR ..... **ix**
1. GİRİŞ ve AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Kolorektal Karsinomlar 3
2.1.1. Epidemiyoloji 3
2.1.2. Etiyoloji 4
2.1.2.1. Genetik Faktörler 4
2.1.2.2. Adenomlar 6
2.1.2.3. Diyete Bağlı Faktörler 7
2.1.2.4. Obezite 8
2.1.2.5. Sigara Kullanımı 8
2.1.2.6. Divertikülosiz 8
2.1.2.7. İdiyopatik İnflamatuar Barsak Hastalıkları 8
2.1.2.8. Radyasyon Maruziyeti 9
2.1.2.9. Şistozomiyozis 9
2.1.2.10. Diğer Faktörler 9
2.1.3. Kolorektal Karsinogenez 9
2.1.4. Lokalizasyon 10
2.1.5.Klinik Özellikler 11
2.1.6. Erken Tanı ve Klinik Tarama Yöntemleri 11
2.1.7. Makroskopik Özellikler 13
2.2. Kolorektal Karsinomların Histolojik Tipleri 14
2.2.1. Adenokarsinom 14
2.2.2. Müsinöz Karsinom 15

2.2.3. Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom 15
2.2.4. Bazaloid (kloakojenik) Karsinom 16
2.2.5. Berrak Hücreli Karsinom 16
2.2.6. Hepatoid Adenokarsinom 16
2.2.6.1. Medüller Adenokarsinom 16
2.2.6.2. Anaplastik Karsinom 17
2.2.6.3. Kolorektal Tümörde Skuamöz Differansiasyon 17
2.2.6.4. Kolorektal Tümörde Trofoblastik Differansiasyon 17
2.2.6.5. Kolorektal Nöroendokrin Tümörler 17
2.7. Kolorektal Karsinomlarda Histolojik Derecelendirme 18
2.8. Kolorektal Karsinomların Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Özellikleri 20
2.9. Kolorektal Karsinomda Tümör İnvazyonu ve Metastaz 21
2.10. Kolorektal Karsinomda Evreleme 23
2.11. Kolorektal Karsinomda Prognozu Etkileyen Faktörler 26
2.11.1. Kolorektal Karsinomlarda Tedavi 29
2.11.2. Akım Sitometri (Flow Cytometry) ve Lenfositler 29
2.11.3. Lenfositler 30
2.11.3.1. T Hücreler 31
2.11.3.2. B Hücreler 31
2.11.3.3. Doğal Öldürücü Hücreler 32
2.11.3.4. Monositler 32
3. GEREÇ ve YÖNTEM 33
3.1. Proje Başvurusu ve Etik Kurul Onayı 33
3.2. Hastalar 33
3.3. Kan Örneklemesi 34
3.4. Akım Sitometri 34
3.4.1. Akım Sitometri İşlemi 34
3.4.2. Akım Sitometri Cihazının Ana Kısımları 34
3.4.3. Akım Sitometride İncelenebilen Materyaller 35
3.4.5. Akım Sitometri'nin Hematoloji'de Kullanımı 35
3.5. Akım Sitometri ile Kandaki Mononükleer Hücre Dağılımının Tespiti ve Alt Grup Analizleri 36
3.6. Kan Mononükleer Hücrelerinin Ayrıştırılması 37

3.7. Mononükleer Hücreler ve Alt Gruplarının Akım Sitometri İle İmmunofenotiplendirilmesi 38
3.8. İstatistiksel Analiz 39
4. BULGULAR 40
5. TARTIŞMA 46
6. SONUÇLAR 51
7. KAYNAKLAR 53

TABLO ve RESİM LİSTESİ

Tablo 2.1. Kolorektal karsinomda evreleme. 24
Tablo 2.2. Kolorektal karsinomda evre gruplandırması. 24
Tablo 2.3. Lenfosit Yüzey Antijenleri 30
Tablo 4.1. Grupların yaş değerleri; ve cinsiyet dağılımları. 40
Tablo 4.2. İki grubun periferik venöz kandaki lenfosit, nötrofil ve monosit yüzdelerine ait karşılaştırmalar. 40
Tablo 4.3. İki grubun periferik venöz kandaki lenfosit alt tipi yüzdelerine ait karşılaştırmalar. 43
Tablo 4.4. KK grubunda İMV'den alınan ile kontrol grubunda periferik venöz kandaki lenfosit, nötrofil ve monosit yüzdelerine ait karşılaştırmalar. 44
Tablo 4.5. KK grubunda İMV'den alınan ile kontrol grubunda periferik venöz kandaki lenfosit alt tipi sayılarına ait karşılaştırmalar. 45

Resim 2.1. İyi diferansiye adenokarsinom (H&E, x400). 18
Resim 2.2. Orta derecede diferansiye adenokarsinom (H&E, x100). 19
Resim 2.3. Kötü diferansiye adenokarsinom (H&E, x100). 19
Resim 2.4. Müsinöz adenokarsinom (H&E, x40). 20

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. TNM evreleme sisteminin şematik gösterimi. 25
Şekil 3.1. Mononükleer hücre dağılımı ve alt grupların analizi. 36
Şekil 3.2. Eritrositlerden Uzaklaştırılmış olan periferik kan lökositlerinin görünümü. 37
Şekil 4.1. İki grubun periferik venöz kandaki lenfosit, nötrofil ve monosit yüzdelerine ait çubuk grafiği. 41
Şekil 4.2. İki grubun periferik venöz kandaki lenfosit alt tipi yüzdelerine ait çubuk grafiği. 42
Şekil 4.3. KK grubunda İMV'den alınan ve kontrol grubunda periferik venöz kandaki lenfosit, nötrofil ve monosit yüzdelerine ait çubuk grafiği. 43
Şekil 4.4. KK grubunda İMV'den alınan ve kontrol grubunda periferik venöz kandaki lenfosit alt tipi yüzdelerine ait çubuk grafiği. 44

KOLOREKTAL ADENOKARSİNOMLARDA T LENFOSİT, B LENFOSİT VE NK HÜCRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Giriş: Konak immün yanıtı, kolorektal kanserin tümör progresyonunda önemlidir. Önceki çalışmalar, genellikle, patolojik piyeslerdeki immün yanıta odaklanmıştır. Bu çalışmanın amacı, kolorektal kanser hastalarındaki venöz kandan elde edilen lenfosit alt tiplerinin yüzdelerini değerlendirmek ve kontrol grubu ile bu parametreler açısından karşılaştırmaktır.

Hastalar ve Yöntem: Bu çalışmaya, yirmi primer opere edilebilir kolorektal kanseri hastası ve 20 kontrol (elektif kolesistektomi) dahil edildi. Tüm hastalar, peroperatif dönemde tedavi uygulanmayan hastalardı. Venöz kan örnekleri, cerrahi prosedürün başında, kanser hastalarının inferior mezenterik ve antekübital venlerinin her ikisinden ve kolesistektomi hastalarının sadece antekübital veninden alındı. Mononükleer hücreler ayrıldı ve farklı lökosit popülasyonlarının yüzdeleri akım sitometrisi ile belirlendi. İstatistiksel analiz, SPSS 11.5 yazılımı ile yapıldı ve istatistiksel anlamlılık $p<0.005$ olarak kabul edildi.

Bulgular: Kolorektal karsinom hastalarında; tümör drene eden sistemdeki monosit ($p=0.013$), sitotoksik T hücresi ($p=0.003$), doğal öldürücü (NK) hücre ($p=0.026$) yüzdeleri ve $CD4^+/CD8^+$ oranı ($p<0.001$) periferal vendekinden anlamlı düzeyde düşük olduğunu gözledik. Gruplar arasında; periferik venden alınan kandaki monosit, nötrofil, T lenfosit, yardımcı ve sitotoksik T hücresi, B lenfosit yüzdeleri açısından anlamlı fark yoktu (tüm karşılaştırmalar için $p>0.050$). Kolorektal kanser hastalarında, periferik venden elde edilen kandaki NK hücre yüzdesi kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0.001$).

Sonuç: Sonuçlarımız, immün yanıt hücre yüzdelerinin tümör mikroçevresinde kullanılması nedeniyle tümör venöz drenaj sisteminde azaldığını düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: Kolorektal karsinom, lenfositler, akım sitometri, hücresel immünite.

T LYMPHOCYTE, B LYMPHOCYTE AND NATURAL KILLER CELLS ASSESSMENT IN COLORECTAL ADENOCARCINOMAS

ABSTRACT

Introduction: The host immune response is important in the tumour progression in colorectal cancer. Previous studies usually focused on immune response in pathological specimens The aim of the study was to evaluate the percentage of the lymphocyte subtypes obtained form venous blood in patients with colorectal cancer and to compare with controls in terms of these parameters.

Patients and Methods: Twenty patients with primary operable colorectal cancer and 20 controls (elective cholecystectomy) enrolled in the study. All cancer patients were, preoperatively, treatment-naive. At the beginning of the surgical procedure, venous blood samples were collected from both inferior mesenteric and antecubital veins of the cancer patients and only from antecubital vein of the cholecystectomy patients. Mononuclear cells were separated, and percentages of different leukocyte populations were determined by flow cytometry. Statistical analysis was carried out by SPSS 11.5 statistical software and statistical significance was determined as $p < 0.05$.

Results: We observed significantly lower percentages of monocyte ($p=0.013$), cytotoxic T cells ($p=0.003$), natural killer (NK) cells ($p=0.026$) and $CD4^+/CD8^+$ ratio ($p<0.001$) from tumor draining venous system compared to those from periferal vein in colorectal cancer patients. There is no difference between the groups in terms of percentage of monocyte, neutrophil, T lymphocyte, helper and cytotoxic T cell, B lymphocyte obtained from the peripheric vein (for all comparison $p>0.050$). In patients with colorectal cancer, percentage of NK cells obtained from peripheric vein was significantly lower compared to the controls ($p<0.001$).

Conclusion: Our results suggested that the percentages of the immune response cells in tumor venous drainage system are lowered, because they are utilized by tumor microenviroment.

Key words: Colorectal carcinoma, lymphocytes, flow cytometry, cellular immunity.

KISALTMALAR

TIL	:	Tümör infiltratif lenfositler
NK	:	Doğal öldürücü (natural killer)
HNPCC	:	Herediter nonpolipozis kolon kanseri sendromları
APK	:	Ailesel polipozis koli
TERT	:	Telomerik reverse transkriptaz
CEA	:	Karsinoembriyojenik antijen
TAG	:	Tümör bağlantılı glikoprotein
UICC	:	Union for International Cancer Control
AJCC	:	American Joint Commission on Cancer
LGL	:	Large Granular Lymphocyte
THR	:	T hücre reseptörü
BHR	:	B Hücre Reseptörü
İMV	:	İnterior Mezenterik Ven
SPSS	:	Statistical Packages for the Social Science
KK	:	Kolorektal Karsinom
Ort	:	Ortalama
SS	:	Standart sapma
Medy	:	Medyan
Min	:	Minimum
Maks	:	Maksimum

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Cerrahi ve onkolojik tedavilerdeki gelişmelere karşın, küratif amaçlı olarak cerrahi rezeksiyon uygulanan hastaların sadece yarısında sağ kalım süresi 5 yıla ulaşmaktadır (1). Bu nedenle, kolorektal karsinom hastalarında tedavi planını belirlemek ve prognozu/riskleri yorumlayabilmek önemlidir (2).

Günümüzde, insan kanserlerinin sonuçlarının önemli bir belirleyicisinin konak immün yanıtı olduğu bilinmektedir (3). Kolorektal tümörlerde inflamatuar hücre infiltrasyonunun sağ kalım üzerine patolojik evreden bağımsız olarak olumlu etkide bulunduğu gösterilmiştir (4-7). Kolorektal kanser hastalarında risk tabakalandırmasına katkı sağlaması beklenmesine karşın, geçerli bir lokal inflamatuar yanıt ölçümü halen klinik uygulamaya girmemiştir (8).

Tümör infiltratif lenfositler (TIL), kanserin prognozunu etkilemektedir (9-13). Kolorektal tümörü olan hastalarda tüm ve hastalıksız sağ kalım, hastalığın evresi TIL varlığı ile ilişkili bulunmuştur (14).

$CD4^+$ T hücreleri (T helper), etkin antitümör immün yanıtın oluşumu için gereklidir. Çünkü, $CD4^+$ T hücreleri, sitotoksik $CD8^+$ T hücrelerine yardımda rol oynar (15). $CD8^+$ T lenfositler, kolorektal kanserlerin prognozunda önemli bir role sahiptir (16, 17). Metastatik kolorektal karsinom hastalarının değerlendirildiği bir çalışmada, kolorektal karsinom grubundaki hastaların periferik kanında B lenfosit ($CD19^+$) hücre sayısının kontrollerden daha düşük olduğu saptanmıştır (18). Doğal öldürücü (natural killer=NK; $CD16^+/CD56^+$) hücreler, kolon karsinomunda immün yanıtı güçlendirmektedir (19).

Bu çalışmanın amacı, kolorektal kanserli hastaların venöz kanındaki beyaz kürelerin immünofenotiplendirmesini yapmak ve kontrol grubunun periferik kanındaki ile karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Karsinomlar

2.1.1. Epidemiyoloji

Kolorektal karsinomlar, gelişmiş ülkelerde üçüncü sıklıkta görülen kanser tipi olup bütün kanserlerin yaklaşık % 9'unu oluşturur (20-22). Kolorektal karsinom, Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'daki kanser ölümlerinin ikinci en sık nedenidir (1).

Kolorektal karsinomlar için her yıl tahmin edilen yeni olgu sayısı 150.000'dir. Yaşam boyu kolorektal karsinom gelişme riski yaklaşık % 6'dır ve bu oran erkeklerde kadınlardan daha yüksektir (23). Ortalama görülme yaşı 62'dir (24). Gelişme riski 40 yaşından sonra erkek ve kadınlar için artmaktadır (23).

Kolorektal kanser 1990 yılında dünya çapındaki ölümlerin 472.000'inden sorumludur ve kanserden ölümlerin en sık dördüncü nedenidir (20).

Kolorektal kanser; en sık Batı Avrupa, Kuzey Amerika,Yeni Zelanda, Avustralya gibi endüstriyel ülkelerde görülür. Ayrıca, ülke içinde de görülme sıklığı açısından bölgelere göre farklılıklar vardır. Örneğin Amerika Birleşik Devletlerinde, sanayinin geliştiği kuzeydoğuda sıklık en yüksek iken, kırsal güneydoğuda en düşüktür. Japonya, Polonya gibi düşük riskli bölgelerden Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya gibi yüksek riskli bölgelere göç edenlerde kolon kanseri sıklığı hızlı bir artış göstermektedir. Kolorektal kanser, sanayileşme ile ilişkili görünmektedir (20, 25).

Amerika Birleşik Devletleri gibi yüksek riskli ülkelerde beyaz ve siyah ırk oranları benzer olmakla beraber Afrika kökenliler, İspanyol ve Hint kökenlilerde hızla artmaktadır (20, 22).

2.1.2. Etiyoloji

Kolorektal karsinomlar genellikle displazik adenomatöz poliplerden gelişmektedir (26). Sağ kolon yerleşimli olanlar; kolorektal kanserlerin büyük bir kısmını oluşturmakta ve düşük riskli toplumlarda, yüksek riskli toplumlardan daha sık görülmektedir. Neoplastik gelişimde çevresel ve genetik etkiler değişik noktalarda faaliyet gösterirler. İyi tanımlanmış birkaç kolon kanseri sendromu, genetik eğilimin kolon kanseri patogenezinde önemli rol oynadığını göstermiştir (20).

2.1.2.1. Genetik Faktörler

Herediter nonpolipozis kolon kanseri sendromları (HNPCC)

Ailesel kolon kanseri sendromlarının prototipidir. Otozomal dominanttır (20, 23, 24). Her yıl tanı konan kolorektal karsinomlarının % 10'undan sorumludur (23). HNPCC iki sendromdan (Lynch family I ve Lynch family II) oluşur (20, 23).

Lynch I sendromu; otozomal dominant kalıtıma sahip, erken başlangıçlı, başlıca sağ tarafı tutan, sıklıkla kolonun birden çok bölümünde yerleşik kolon kanserini gösterir (20, 23).

Lynch II sendromu; Lynch I sendromuna benzer ve ek olarak endometriyum, meme, over, mide kanserleri gibi kolon dışı kanserlere eğilim gözlenir (20, 23).

HNPCC için tanımlanmış Amsterdam kriterleri aşağıdadır:

- Kolorektal kanser en az üç aile üyesinde olmalıdır.

- Üç aile üyesinden birinin, diğer ikisinin birinci derece akrabası olması gerekmektedir.

- Birbirini takip eden en az iki kuşak etkilenmiş olmalıdır.

-Etkilenen aile üyelerinden en az birinde 50 yaşından önce kolorektal karsinom gelişmelidir.

- Karsinom tanısı patolojik olarak doğrulanmalıdır (20, 23).

HNPCC, ailesel polipozis koli sendromundan beş kat sık görülmektedir. Lynch II sendromlu hastaların birinci derece akrabalarında kolon karsinomu insidansı yedi kat artmıştır. HNPCC, sporadik kanserli hastalardakinden daha genç yaşta ortaya çıkar ve ortalama yaş erkeklerde 39 yıl ve kadınlarda 37'dir (20).

Muir- Torre sendromu

Otozomal dominant bir sendromdur. Lynch II sendromuna benzemektedir. Kolon kanseri erken yaşta gelişir. Sağ taraf kolon kanseri daha sıktır ve sporadik kolon kanserinden daha iyi prognoza sahiptir. Bu hastalarda birden fazla deri lezyonu ve iç organ kanserleri gelişir (20).

Ailesel polipozis koli (FAP)

Otozomal dominant kalıtım gösterir (24). APC tümör supressör geninde mutasyon vardır (25). Sorumlu APC geni 5q21'de lokalizedir. Genellikle hayatın ikinci on yılında görülür. Radyolojik ve makroskopik olarak barsakda normal mukozanın çok hafif kabarıklıklarından büyük kitlelere kadar değişen polipler gözlenebilir (24).

Hastada saptanan birkaç polip FAP varlığını göstermez. En az 100 polip olmalıdır. Tedavi edilmeden bırakılırsa hemen daima kalın barsakda bir veya daha fazla karsinom gelişecektir. Çoğu karsinom hayatın üçüncü on yılında başlayacağından, en geç 20- 25 yaşlarında profilaktik kolektomi yapılmalıdır (24).

Gardner sendromu

Otozomal dominant geçişlidir. Kalın barsakda adenomatöz poliplerle birlikte kafatası ve mandibulada birden fazla osteomlar, deride birden fazla keratinöz kistler, özellikle fibromatozis olmak üzere yumuşak doku neoplazilerinin görüldüğü ailesel bir durumdur. Kolon karsinomu gelişim potansiyeli ailesel polipozis kadar yüksektir (24, 27).

Turcot sendromu

Otozomal dominant kalıtım gösterir. Kolorektal adenomatöz poliplerle birlikte genellikle glioblastom tipi beyin tümörleri vardır (24, 27).

Peutz-Jeghers sendromu

Otozomal dominat bir sendrom olup LKB1 gen mutasyonu nedeniyle oluşmaktadır. Ağır derecede atipi gösteren adenomatöz poliplerin bazılarından kolorektal kanser gelişebilir. Bu sendromda pankreas, meme, akciğer, over ve uterus kanseri gelişme riski artmıştır (24, 27).

Cowden sendromu

Mukokutanöz lezyonlar (fasial trişilemmoma, akral keratoz ve oral mukozal papillom), kolorektal polipler ve değişik bölgelerde artmış malignite riski ile karakterize otozomal dominant bir hastalıktır. 10. kromozomda lokalize PTEN geninde mutasyon saptanmıştır (24, 27).

2.1.2.2. Adenomlar

Benign glandüler neoplaziler olup kolon kanseri gelişiminin habercisi olabilirler. Tek veya birden fazla sayıda görülebilir. Birden fazla olduklarında genetik bir sendrom ile ilişkili olabilecekleri akılda tutulmalıdır (20). Adenomlar, erkeklerde kadınlardan daha sık oluşur. Adenom insidansı, 60- 70 yaşlarında pik yapar. Sol kolon adenomları genç hastalarda sık görülürken, sağ kolonda lokalize olanlar 65 yaş üstünde daha sıktır (20).

Makroskopik olarak; pediküllü (saplı), sesil (sapsız) ve yassı (deprese) olmak üzere üç sınıfa ayrılır. Adenomlar yapılarına göre; tubüler, villöz veya tubülovillöz olarak ayrılır. Tubüler adenom % 75'den yüksek oranda tubüler yapı, villöz adenom % 50'den yüksek oranda villöz yapı, tubülovillöz adenom ise % 25- 50 oranında villöz yapı içerir. En sık tubüler adenom görülürken, en düşük sıklıkta villöz adenom görülür (20, 25, 27).

Adenomlarda malignite riski; boyut, histolojik yapı ve epitel displazisinin derecesine bağlıdır. Tanısal olarak düşük ve yüksek dereceli displazi, karsinoma insitu, intramukozal karsinom ve invaziv karsinomun saptanması önemlidir (20, 27, 28).

Düşük dereceli displazide çok katlı displastik ve silindirik epitel hücreleri vardır. Çekirdek iğsi veya ovaldir. Çok katlı çekirdekler epitel yüksekliğinin ¾'ünü geçmezler. Yüksek dereceli displazide epitel yüzeyine kadar gelmiş nükleuslar ve nükleositoplazmik oranı artmış hücreler vardır. Hücreler silindirikten yuvarlağa dönerler. Polarite kaybı ve pleomorfizm gözlenir (20, 27):

İntraepitelyal karsinomada (karsinoma insitu), malign hücreler bazal membranla sınırlanmıştır. İntramukozal karsinomda, neoplastik hücrelerin bazal membrandan lamina propriaya geçişi söz konusudur. İnvaziv karsinomda ise, muskularis mukozadan submukozal bölgeye geçiş vardır (20, 27).

Yüksek dereceli displaziler metastaz yapmazlar. Klinik olarak benign lezyonlardır. Kolon mukozasında lenfatik kanalların olmadığı kabul edilmektedir. Nadiren lamina propria bazalinde izlenirler. Bundan dolayı intramukozal karsinomun malign potansiyelinin olmadığı veya çok düşük olduğu kabul edilmektedir (27).

Kronik ve aktif inflamatuar hastalıkta oluşan reaktif değişiklikleri displaziden ayırmak bazen zordur (20, 24, 29). Reaktif inflamatuar durumda, açık renkli kromatin yapısı ve sitoplazmik müsin azlığı saptanmaktadır. Ayrıca, yüzeyde maturasyon görülür. Sitoplazmanın yoğun eozinofilik olması, reaktif veya rejeneratif epitelyal hücreler için karakteristiktir ve glandüler yapı da korunmuştur. Aktif inflamasyonun bu bulguları displazide görülmez. Displazilerde de inflamasyon gelişebileceğinden şüpheli inflamasyon, agresif medikal tedavi ile azaltılmalı ve tekrar biyopsisi önerilmelidir. Displazi tedaviden etkilenmeyecek ve tanı karmaşası giderilecektir (29).

2.1.2.3. Diyete Bağlı Faktörler

Yüksek yağ oranlı diyet programına sahip bireylerde kolon kanseri riski artmıştır. Hayvansal protein içeren kırmızı et tüketimi kolon kanserinde bağımsız bir risk faktörüdür (20, 23-25). Düşük oranlı yağ içeren balık, kümes hayvanları gibi ürünlerin tüketimi önerilmektedir (30).

Lifli, yeşil yapraklı sebzeler ve meyveler antioksidan vitamin kaynağı olup kanser oluşumunu engellemektedir (20, 24). C vitamini, tokoferol ve selenyum barsak epitelini kuvvetli mutajen olan fekapentanlardan ve diğer karsinojenik (oksidatif) hasardan korur. C vitamini, nitritlerin nitrozamine ve nitratlara dönüşümüne engel olan bir antioksidandır. E ve C vitaminleri, polipektomi sonrası rektal adenom tekrar sayısını azaltırlar. Sarımsak; kolon kanseri riskini, detoksifiye enzim içermesi, tümör çoğalmasına engel olması veya antibakteriyel aktivitesi nedeniyle güçlü olarak tersine çevirir (20).

Alkol alımı, anormal DNA metilasyonundan dolayı kolon kanseri ve adenom gelişme riskini arttırır (20, 30). Yeşil çay ve kahve, kolon kanseri gelişimine karşı koruyucu olabilir. Özellikle günde sekiz fincandan fazla kahve içilmesinin faydalı olacağı ileri sürülmektedir (20).

2.1.2.4. Obezite

Özellikle abdominal yağlanma ve artmış vücut kitle indeksi, kolon kanseri riskini ve kanserden ölümleri arttırmaktadır (20, 30). Fazla kilolu ve fiziksel olarak inaktif erkeklerde kolon kanseri gelişimi riski yüksektir (20, 26).

2.1.2.5. Sigara Kullanımı

Tütün kullanımı rektal kanser ve adenom insidansını önemli ölçüde arttırmaktadır. İlk kullanım yaşının erken olması ve yıllık paket sayısı kanser riskini artırır (20, 25).

2.1.2.6. Divertikülosiz

Divertiküler hastalığı olanlarda sol kolon neoplazilerinde artmış bir insidans vardır. Batı toplumlarında divertikül ve adenom birlikteliği beklenirken, Asya toplumlarında az sıklıkta görüldüğü bildirilmiştir (20).

2.1.2.7. İdiyopatik İnflamatuar Barsak Hastalıkları

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı bulunan hastalarda kolorektal kanser gelişme riski artış göstermektedir.Ülseratif kolitde 4,4 kat, Crohn hastalığında ise 3 kat artmış risk

vardır (20, 25). Kanser gelişimi hastalığın süresi ve tutulan bölgenin genişliği ile de ilgilidir (20, 24, 25).

2.1.2.8. Radyasyon Maruziyeti

Kolorektal kanserlerin çok az bir kısmında radyasyon etyolojik bir rol oynar. Serviks, uterus veya prostat karsinomlarının tedavisi için radyoterapi alan hastalarda rektal kanserin daha sık geliştiği bildirilmiştir (20).

2.1.2.9. Şistozomiyozis

Schistosoma japonicum ile enfekte Çinli hastalarda kolorektal neoplazi insidansının arttığı gösterilmiştir (20).

2.1.2.10. Diğer Faktörler

Üreterosigmoidostomi uygulanan hastalarda kolon kanseri insidansı 500 kat artar. Peptik ülser için cerrahi tedavi geçiren hastalarda kolorektal kanser gelişme riski artmıştır. Pernisiyöz anemi, diabetes mellitus, çöliak hastalığı, AIDS hastalarında kolorektal adenokarsinom riski artabilir (20).

2.1.3. Kolorektal Karsinogenez

Kolorektal karsinomların % 60-80'inde APC (Adenomatous Polyposis Coli) geninin kaybı vardır. APC, normal hücrelerde β-kateninin azalmasına sebep olan hücre içi bir protein kompleksinin parçasıdır. β-katenin, farklılaşmış hücrelerde hücre iskeletinin aktin flamanlarına E-kadherin epitelyal adezyon molekülünü bağlar. Azalma, hücre içi β-kateninin miktarını düzenler ve sabit halde tutar. İnsan neoplazilerinde APC fonksiyon mutasyonlarının kaybı ile bir patolojik inhibisyon ortaya çıkar. Sonuçta hücre içi β-katenin birikir ve çekirdeğe translokasyon oluşur. Nükleer β-katenin TCF4 gibi diğer nükleer faktörlere bağlanır ve transkripsiyonel aktivasyon için çok etkili bir kompleks oluşur. TCF4/β-katenin transkripsiyonel aktivitesinin hedefindeki ilk genlerden birisi siklin D1'dir. siklin D1, E2F'den retinoblastom gen ürününün ayrılmasını katalizleyen bir kinazı aktif hale getirir. Sonuçta hücre siklüsünün G1-S geçişi için aktive genlerden oluşan nükleer kompleksi meydana gelir ve proliferasyon

oluşamaz. Bu bilgiler eşliğinde β-kateninin kolorektal kanser proliferasyonu için bir faktör ve bir onkogen olduğu varsayılmıştır (31).

K-RAS geni kolon kanseri ve adenomlarda en sık gözlenen aktive onkogendir. Bu gen hücre içi sinyal transdüksiyonunda rol oynar ve 1 cm den küçük adenomların % 10'undan daha azında, 1 cm den büyük adenomların yaklaşık % 50'sinde, karsinomların yaklaşık % 50'sinde mutasyona uğramış haldedir (27). SMAD2 ve SMAD4 18q21'de bulunurlar ve TGF-B sinyali içerirler. SMAD42 'ün yokluğu gastrointestinal tümör oluşumunu arttırmaktadır (27).

Kolon kanserlerinin % 70-80'inde 17p kromozomunda kayıp bulunmuştur. Bu kromozomal delesyon p53 genini etkiler. p53 geni hücre siklüsünün düzenlenmesinde kritik rol oynar (27).

Telomeraz, kromozom sabitleşmesinde rol oynar. Katalitik bir alt unite gibi davranan telomerik reverse transkriptaz (TERT) ile bir ribonükleoprotein komplesi yapısındadır. Telomeraz aktivitesi telomere sabitlenmesini sağlar ve hücrelerin ölümsüzlüğü için gereklidir. Çoğu adenomda telomeraz aktivitesi yokken kolorektal karsinomu da içeren kanserlerin büyük çoğunluğunda telomeraz aktivitesi artmıştır (27).

HNPCC sendromunda ve sporadik vakaların % 10-15'inde DNA yanlış yapım tamir geninde genetik lezyon vardır (27).

2.1.4. Lokalizasyon

Karsinomların % 50'si rektosigmoid bölgededir. Ancak bu özellik azalıyor gibi görünmekte ve giderek proksimalde saptanan karsinomların sıklığı giderek artmaktadır (24, 25). Düşük riskli ülkelerde kolorektal karsinom çekum ve çıkan kolonda, sol kolondan daha sık oluşurken; yüksek riskli ülkelerdekolorektal karsinmun rektosigmoid bölgede görülme sıklığı daha yüksektir (20, 23).

Sağ kolon karsinomları, özellikle kadınlarda yaş ile beraber artmaktadır. Sağ kolon kanserleri, kolon malignitelerinin % 33-63.4'ünü oluşturur. 70 yaştan sonra erkek ve kadınlarda proksimal kolon kanserleri daha sıktır (20). Birden fazla odak saptanan karsinom olgularının oranı % 3-6'dır (24).

2.1.5.Klinik Özellikler

Klinik, tümörün sağ veya sol kolon yerleşimine ve lezyonun erken veya ilerlemiş olup olmamasına göre değişir. Başlangıç semptomları genellikle belirsizdir ve özgül değildir. Kilo kaybı ve iştahsızlık sıklıkla oluşur. Ayrıca, sağ kolonda karsinom varlığında feçes yumuşaktır. Bundan dolayı sağ kolon kanserleri, melena ve obstrüksiyon oluşturmaz; sıklıkla klinik olarak sessiz kalır. Diğer taraftan rektosigmoid kanserler intestinal lümeni tıkar veya kanamaya neden olurlar. Yaşlı hastalar (>80 yaş) gençlere göre erken dönem hastalığa sahiptir (20, 26).

Kolorektal karsinomlu hastaların % 22-58'inde barsak alışkanlıklarında değişiklik söz konusudur. Bu, özellikle sol kolon yerleşimli karsinomlarda belirgindir. Değişiklikler; ishal, tenesmus ve kabızlık şeklinde olabilir .

Rektal kanama, hastaların yaklaşık % 50'sinde başlangıç semptomudur. Kanama gözle görülmeyebilir ve sadece demir eksikliği anemisi ile fark edilebilir. Daha düşük sıklıkta belirgin hematokezya gelişebilir. Rektal kanama, sol kolon lezyonlarının % 70'inde ve sağ kolon tümörlerinin % 25'inde gözlenir. Özellikle yaşlı kişilerde malignite dışlanmadan rektal fissür ve hemoroid düşünülmemelidir (20).

Hastaların yaklaşık % 50'sinde abdominal ağrı yakınması olabilir. Abdominal ağrı, özellikle tümör serozayı invaze ettiğinde ortaya çıkar. İlioçekal valvdeki karsinomların % 25'i apendiks lümenini tıkayarak apendisite sebep olabilir (20, 24).

Anemi, sıklıkla sağ kolon kanserlerinde oluşur. Hastaların % 20'sinde kolon iskemisi görülmektedir. İskemik alan tümörün proksimalinde yerleşiktir (20).

Tümör barsak duvarını invaze ettiğinde kolon-kolon fistülü meydana gelebilir. Nadiren sigmoid kolon kanseri akut barsak tıkanıklığı veya peritonit ile beraber akut perforasyona sebep olabilir (20).

2.1.6. Erken Tanı ve Klinik Tarama Yöntemleri

Son yapılan çalışmalarda, uygun tarama ve tedavi ile kolorektal karsinom ve bu maligniteden ölüm sayılarının azaldığı gösterilmiştir. Adenomatöz poliplerin bulunması ve çıkarılması kolorektal adenokarsinom gelişimini önleyebilir. Erken evre kanserlerin

tanı ve tedavisi kolorektal kanser mortalitesini azaltmaktadır. Polip ve erken evre kanserler genellikle asemptomatiktir (20, 23, 24).

Elli yaşından sonra çoğu birey kolorektal kanser açısından orta düzey risk taşıdığından, malignite ve polip açısından düzenli olarak taranmalıdır. Tavsiye edilen tarama yöntemleri şunlardır:

1. Yılda bir defa gaitada gizli kan testi

2. Her 5 yılda bir fleksibl sigmoidoskopi

3. Yılda bir gaitada gizli kan testi ve her 5 yılda bir fleksibl sigmoidoskopi.

4. Her 5-10 yılda bir çift kontrastlı baryum enema.

5. Her 10 yılda bir kolonoskopi (32).

Gaitada gizli kan testi özgül olmayıp birçok küçük boyutlu kanser ve prekanseröz lezyonu saptamada yetersizdir. Bazı uzmanlar, yılda bir bu teste 5 yılda bir fleksible sigmoidoskopinin eşlik etmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Fleksible sigmoidoskopi ile bulunan adenomatöz polip sonucu kolonoskopi ile tüm barsağın muayenesini gerektirir (32).

Çift kontrastlı baryumlu grafiler; 1 cm’den küçük poliplerin % 50-80'inin, 1 cm’den büyük poliplerin % 70-90'ının ve evre I ve II adenokarsinomların % 50-80'inin saptanmasına olanak sağlamaktadır (32).

Birinci derece akrabalarında kolorektal kanser veya adenomatöz polip öyküsü olanlarda tarama, 40 yaşında veya akrabanın tanı aldığı yaştan 10 yıl önce başlamalıdır ve kolonoskopi ile tüm kolonun değerlendirilmesi gerekmektedir (32).

HNPCC’de tarama 21 yaşında başlamalıdır. Bir veya üç yılda bir kolonoskopi, genetik danışma ve genetik testlerin uygulanması uygundur. FAP’da tarama pübertede başlamalı; her bir-iki yılda bir fleksible sigmoidoskopi veya kolonoskopi, genetik danışma , genetik test yapılması uygundur (32).

İnflamatuar barsak hastalıklarında özellikle ülseratif kolitte kolorektal kanser riski artmıştır (20, 25, 33). Crohn hastalığında da risk artmaktadır. Ülseratif kolitte tarama; pankolit tanısından 7-8 yıl sonra, sol taraf kolitin tanısından 12-15 yıl sonra başlamalıdır. Tarama, her bir- iki yılda bir diplazi için kolonoskopi ile biyopsi alınmalıdır (32).

2.1.7. Makroskopik Özellikler

Küçük boyutlu karsinomlar; 1- 2 cm çapında, genellikle kırmızı renkli, granüler, düğme benzeri ve mukozadan kabarık lezyonlardır. Sıklıkla keskin sınırlı ve makroskopik olarak adenomlara benzeyen lezyonlardır (20).

Çoğu kolorektal karsinom makroskopik olarak polipoid veya ülseroinfiltrandır (20, 24). Kolorektal karsinomlar makroskopik olarak polipoid, mantarımsı (egzofitik), ülsere, diffüz-infiltratif olabilir (23, 24, 34). Polipoid tipte, yüzeyde ülser olabilir ve genellikle nodüler, lobüler, papiller, sıklıkla adenom kalıntılı bir biçimde görülürler (20). Ülseroinfiltratif tipte ise santralde ülser vardır. Bu tipin bir varyantı olan flat veya deprese tipte polipoid tipten daha fazla lenfovasküler invazyon eğilimi vardır (24).

Tümörlerin yaklaşık üçte ikisi ülseredir. Kolon duvarını derin olarak tutar. Diffüz infiltre tip karsinomlar normal mukozadan hafifçe kabarık olup sıklıkla nodüler kitle oluşturmaksızın barsak segmentini çepeçevre sararlar (20). Mantarsı kanserler sıklıkla çekum ve çıkan kolonda görülürler. Lümene doğru büyüme eğilimindedirler; nadiren tıkanıklığa sebep olurlar (20, 24, 25) ve anemi ile sonuçlanan kan kaybına kadar semptom vermezler (24, 34).

Transvers ve inen kolon adenokarsinomları genellikle infiltre ve ülseratiftir. Lümeni daraltan tümörlerdir (20, 24, 25). Tümörün proksimalinde barsak lümeni genişlemiştir. Tümör barsak duvarını kalınlaştırır (20).

Tümör barsak duvarına tamamen yayılıp komşu ince barsak, başka kalınbarsak segmenti veya mideyi tutabilir. Barsak duvarındaki perforasyon sonucu peritonit oluşabilir (20, 24, 27).

Müsinöz tümörlerin kesiti jelatinöz, parlak görünümlüdür ve mukus barsak tabakalarını ayırabilir. Midede sık görülen lateral yüzeyel yayılım kolorektal karsinomlarda çok nadirdir (24).

Makroskopik incelemede tümörün barsak duvarına sınırlı olup olmadığı, kolon etrafı dokulara yayılıp yayılmadığı, venlere makroskopik invazyon varlığı ve kalan kolonda polip veya başka karsinom varlığı belirtilmelidir (24).

2.2. Kolorektal Karsinomların Histolojik Tipleri

2.2.1. Adenokarsinom

Kalın barsak tümörlerinin % 95'i klasik adenokarsinomdur (20, 24). Bunlar değişik derecede müsin salgılayan iyi, orta veya düşük dereceli adenokarsinomdur (24).

Tümör hücreleri, silindirik ve goblet hücre kombinasyonu ile nadir endokrin hücreler ve "paneth" hücrelerinden oluşur. Karsinom, özellikle tümörün kenarlarında olmak üzere inflamatuar ve desmoplazik reaksiyona neden olur. İnflamatuar hücrelerin çoğu T-lenfositlerdir, fakat B- lenfositler, plazma hücreleri, histitositler ve S-100 pozitif dendritik hücreler de bulunabilir. Nadiren bol eozinofil görülür ve tümör stromasında metaplazik kemik oluşumu görülebilir (24).

Tümör kenarında rezidüel polip odağı bulunabilir. Tümör etrafındaki salgı bezlerinde hiperplastik değişiklikler daha sıktır. Bu hiperplastik değişiklikler, normal mukozadan daha yüksek oranda goblet hücresi içeren daha uzun, daha kıvrımlı salgı bezleri şeklindedir. Bu değişiklik transisyonel mukoza olarak da tanımlanır. Bu mukoza normal mukozadan histokimyasal olarak farklıdır (20, 24).

Adenokarsinomlar, infiltratif veya etraf dokuyu iten (ekspansif) tarzda gelişim gösterirler. Ekspansif gelişimde tümör salgı bezleri nodüler küme oluştururken, infiltratif gelişimde tümör hücreleri veya küçük salgı bezi yapıları duvar boyunca yayılmışlardır. Ekspansif karsinomlar makroskopik olarak genellikle polipoid veya mantarsı görünümde ve infiltratif karsinomlar genellikle ülseratif veya diffüz infiltratif görünümdedir (20).

2.2.2. Müsinöz Karsinom

Kolorektal karsinomların % 10-15'ini ve rektal kanserlerin % 33'ünü oluşturur (20, 24). WHO'ya göre müsinöz karsinom tanımlaması için tümörün % 50'den fazlasının müsin içermesi gereklidir (24, 25, 35). Müsinöz karsinom en sık rektumda (% 61.5) ve sigmoid kolonda (% 15.3) gözlenir (20). Bazı olgularda hücre içi ve hücre dışı müsin karışık halde bulunur. Hücre içi müsin oluşumu taşlı yüzük yapısına sebep olur (20, 24). Bu tümörler MUC2 proteini içeren müsin salgılarlar. Müsin, periyodik asid- Schiff (PAS), müsikarmin ve asidik anilin ile mavi boyanır. Klasik adenokarsinomlar gibi adenomlardan kaynaklanırlar (20, 24). Müsinöz karsinom; villöz adenomlarla % 31, ülseratif kolitle % 7, kolitle % 8, önceden uygulanan pelvik radyasyonla % 5 birliktedir (24, 36).

Müsinöz karsinomlar, klasik karsinomlardan farklı klinik ve patolojik özellik taşır. Bu tümörler sıklıkla genç ve HNPCC hastaları etkiler. Hayatının ilk üç dekatında kolorektal kanserli hastaların % 83-79'unda baskın olarak müsinöz adenokarsinom görülür (24). Başvuru zamanında, karsinom genellikle ileri evrededir. Klasik adenokarsinomdan daha kötü prognoza sahiptir (20, 24).

2.2.3. Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom

Genellikle genç hastalarda görülmektedir. Kolorektal kanserin nadir bir tipidir (20, 24). Kolorektal kanserlarin yaklaşık % 1.1'ini oluşturur. Taşlı yüzük hücreli karsinomu olan hastalarda, tanı anında hastalık klasik adenokarsinoma göre daha yaygındır. Neoplastik hücrelerle yaygın intramural infiltrasyon inflamatuar bir tabloyu düşündürür. Diffüz ve sirküler barsak duvarı infiltrasyonu sonucu intestinal segmentte kalınlaşma ve katılaşma oluşur. Buna, kolonik linitis plastika denir. İleri dönemde intestinal duvarda daralma, yaygın lenf nodu metastazı ve periton yüzeyine yayılım görülür (20). Metastazlar; karaciğerden çok lenf nodları, peritoneal yüzey ve overlerde yerleşiktir (24, 37). Mikroskobik incelemede müsinin çoğunun veya hepsinin hücre içinde olduğu gözlenir (24). Tanı konması için tümör hücrelerinin % 50'den fazlasının intrasitoplazmik müsin içermesi gereklidir (20, 25). Hücre içi müsinden dolayı nükleusun itilmesi ile (eksantrik yerleşim) taşlı yüzük yapısı oluşur (20, 24, 25, 38, 39). Taşlı yüzük hücreli karsinomun biyolojik davranışı müsinöz karsinomdan agresiftir (35, 39, 40). Ülseratif kolitli

hastalarda uzun dönemde müsinöz karsinom ve taşlı yüzük hücreli karsinom gelişme riski normal populasyona göre daha yüksektir (35). Primer taşlı yüzük hücreli karsinom tanısı konmadan önce kitlennin mide veya meme kanserinin kolorektuma metastazı olup olmadığı araştırılmalıdır. İmmünhistokimyasal olarak; keratin7 (CK7) -, keratin20 (CK20) +, kalınbarsak primer tümörü lehine değerlendirilmekte; CK7 +, CK20 – metastazı düşündürmektedir (24).

2.2.4. Bazaloid (kloakojenik) Karsinom

Kolorektal bölgede çok nadir görülmektedir (20, 24). Ekzofitik veya ülsere kitle yaparlar. Bazoloid tümörler, paratiroid hormon veya adrenokortikotropik hormon üretebilirler (20).

2.2.5. Berrak Hücreli Karsinom

Adenokarsinomun minör bir formudur. Glikojen birikimi sitoplazmanın berrak görünmesine neden olur (24). Böbreğin berrak hücreli adenokarsinomuna benzemektedir. Tümör hücreleri glikojen üretirler, fakat müsin üretmezler. CEA güçlü bir şekilde eksprese olur. Bu ekspresyon, metastatik renal karsinom ayrımında önemlidir (36).

2.2.6. Hepatoid Adenokarsinom

Daha yaygın olan gastrik eşdeğerine benzemektedir (24). Hepatoselüler karsinomdan ayırt edilmesi mümkün değildir. Glandüler bileşende müsin üretimi vardır (36).

2.2.6.1. Medüller Adenokarsinom

Genellikle kadınlarda görülmektedir. Çekum ve sağ kolon yerleşimlidir (24). Nadir bir tümördür. Tümör hücreleri malign hücre adaları oluşturur. Hücreler veziküler nükleuslu, belirgin nükleoluslu, bol ve pembe sitoplazmalıdır. Tümör adaları çevresinde ve intraepitelyal olarak lenfositler görülür (25). Nöroendokrin belirteçler negatiftir. Davranışı, histolojik görünümü kadar agresif değildir (24).

2.2.6.2. Anaplastik Karsinom

İğsi/dev hücreli ve sarkomatoid karsinom olarak adlandırılmaktadır. Diğer karsinomlardan ayırt edilmelidir. Görünümü diğer organlardaki anaplastik karsinom görünümüne çok benzemektedir. Bu karsinom tipinin davranışı çok agresiftir (24).

2.2.6.3. Kolorektal Tümörde Skuamöz Differansiasyon

Çekumda daha sıktır ancak, kalın barsağın diğer bölgelerinde de görülebilir. Çoğu kez skuamöz bileşen glandüler elemanlar ile beraberdir (adenoskuamöz karsinom). Nadiren tamamıyla skuamöz yapıya sahiptir (skuamöz karsinom) (24). Kronik ülseratif kolitli hastalarda risk artmıştır. Skuamöz hücreli karsinomlar, Crohn hastalığı ve uzun dönemli rektal fistüllerde de gelişebilir (20).

2.2.6.4. Kolorektal Tümörde Trofoblastik Differansiasyon

Kolorektal adenokarsinomda fokal olarak görülebilir. Tümör hücrelerinde hCG immünhistokimyasal olarak gösterilebilir. Nadiren, tümörün tamamı koryokarsinom görünümdedir (24).

2.2.6.5. Kolorektal Nöroendokrin Tümörler

1. İyi diferansiye endokrin tümör:

Fonksiyonel olmayıp çapı 2 cm veya daha küçüktür. Mukoza ve submukozaya sınırlı olup anjiyoinvazyon göstermez.

2. Malignite potansiyeli belirsiz nöroendokrin tümör:

Mukoza ve submukozaya sınırlıdır. Çapı 2 cm'den büyük olur ve anjiiyoinvazivdir.

3. İyi diferansiye nöroendokrin karsinom:

Muskularis propriya veya daha derin invazyon yapan veya metastazı olan tümörlerdir.

4. Az diferansiye nöroendokrin karsinom (41)

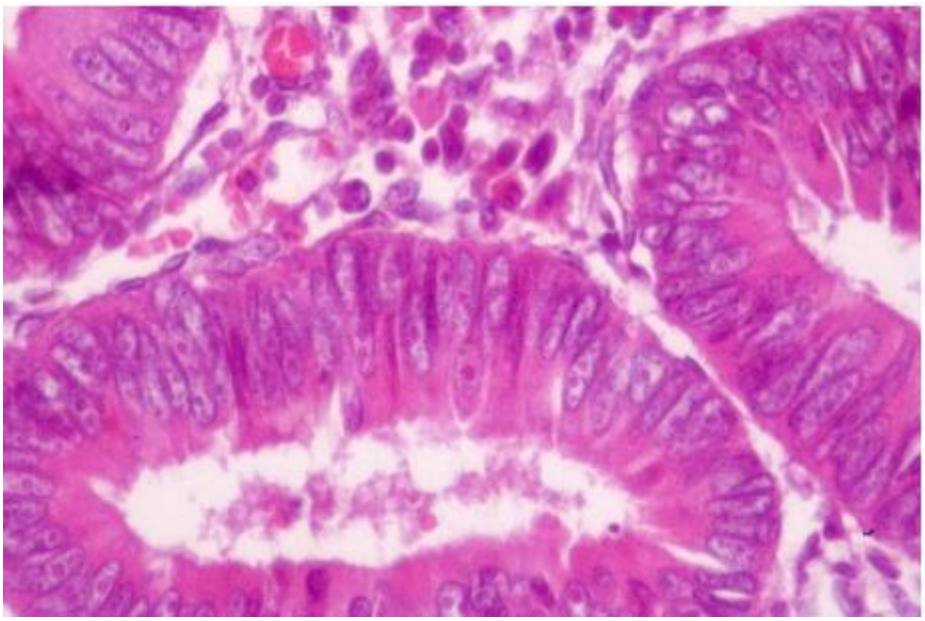
5. Karsinoid form:

En sık olarak rektumda görülür. Rektumda sıklıkla ön veya lateral duvarda bulunur. Pratikte karsinoid sendrom ile birliktelik bildirilmemiştir. Makroskopik olarak nöroendokrin tümörler yassı, hafif çökük plak veya polipoid lezyon şeklindedir. Formol fiksasyonu sonucunda sarı renkte görünürler. Mikroskopik olarak aynı şekilli hücreler kurdela şeklinde stromayı invaze ederler. Bu tümörler argirofil içerirken genellikle argentaffin içermezler. İmmunhistokimyasal olarak nöron spesifik enolaz, kromogranin, sinaptofizin ve çeşitli peptid hormonlarla boyanır. Rektal karsinoid tümörler; CEA, hCG ve prostatik asit fosfataz immünreaktivitesi gösterir.Rektal karsinoid iki cm'den küçük ve mukoza veya submukozaya sınırlı ise lokal çıkarımla çok iyi tedavi edilir (24).

2.7. Kolorektal Karsinomlarda Histolojik Derecelendirme

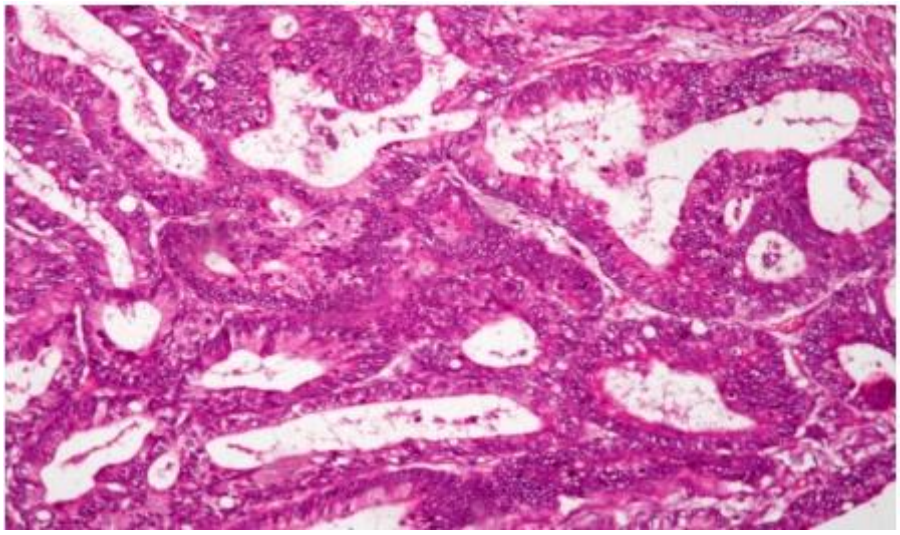
Adenokarsinomlar, bez yapıların varlığı temel alınarak derecelendirilir (20, 24, 25, 35, 42). Histolojik derece prognostik değer olarak da kullanılır (20). Kötü diferansiye olanlarda en azından bazı bez yapıları ve müsin üretimi izlenmelidir. Karsinomlar karışık diferansiasyon yapılanması gösterdiğinde derecelendirme en az diferansiye bileşene göre yapılmalıdır (20, 23).

İyi diferansiye tümörler (Grade I): Tümörün % 75'inden fazlası bez benzeri yapı içerir (20, 23) (**Resim 2.1**).



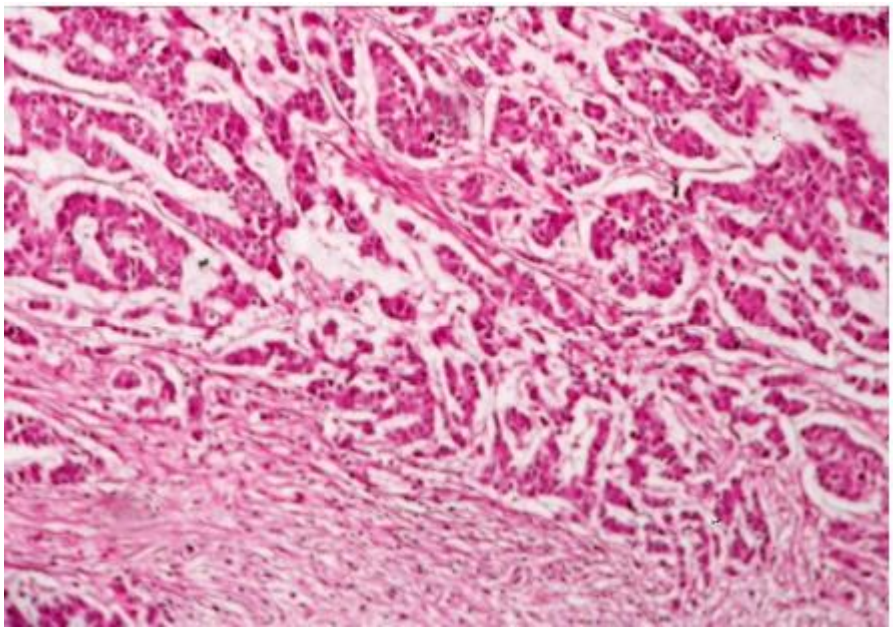
Resim 2.1. İyi diferansiye adenokarsinom (H&E, x400).

Orta derece diferansiye (Grade II): Tümörde bez benzeri yapı % 25-75 oranındadır (20, 23) (**Resim 2.2**).



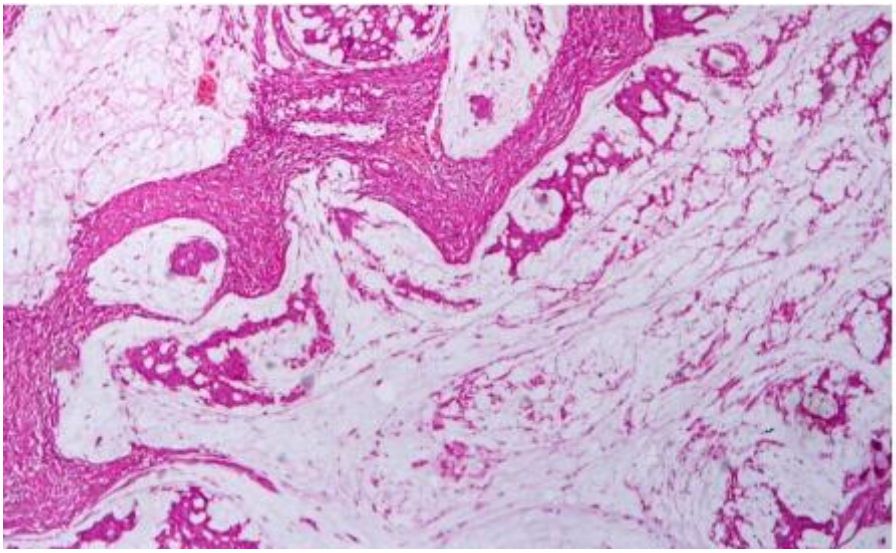
Resim 2.2. Orta derecede diferansiye adenokarsinom (H&E, x100).

Kötü diferansiye tümörler (Grade III): Bez benzeri yapı % 25'den azdır (20, 23) (**Resim 2.3**).



Resim 2.3. Kötü diferansiye adenokarsinom (H&E, x100).

Müsinöz adenokarsinomlar ve taşlı yüzük hücreli karsinomlar genellikle grade III' tür (25) (**Resim 2.4**).



Resim 2.4. Müsinöz adenokarsinom (H&E, x40).

2.8. Kolorektal Karsinomların Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Özellikleri

Histokimyasal olarak kolorektal karsinomların büyük çoğunluğu müsin pozitif boyanır. İmmünhistokimyasal olarak kalın barsağın adenokarsinomu MUC1 ve MUC3 eksprese eder (24).

Kolorektal adenokarsinomlar keratin pozitif boyanırlar. CK20 pozitif, CK7 negatiftir. Bu özellikler akciğer, over gibi organların adenokarsinomlarının ayırıcı tanısında önemlidir. Kötü diferansiye karsinomlarda anormal boyanma paterni görülebilir (24).

CEA (karsinoembriyojenik antijen) immünreaktivitesi kuraldır. Serum düzeyi ile immünhistolojik reaktivite arasında iyi uyum varken, evre ve diferansiasyon derecesi arasında uyum yoktur (24). Operasyon öncesi ölçülen serum CEA ve CA242 değerlerinin yüksekliği kötü prognozu gösterir (43).

İntestinal epitel hücrelerinin diferansiasyon ve proliferasyonunda rol oynayan CDX2, immünhistokimyasal olarak kolorektal karsinomların büyük çoğunluğunda mevcuttur (24).

Tümör bağlantılı glikoprotein (TAG-72), monoklonal antikor olarak tanınır, invaziv kolorektal karsinomların tamamında bulunur. Ayrıca normal mukoza, hiperplastik polip ve adenomatöz poliplerde de saptanır (20, 24).

Tümör ile ilişkili antijenlerden büyük dış antijen (LEA), tümör dokusunda ve kolorektal karsinomlu olguların serumunda saptanır (24).

Kolon karsinomları kan grubu izoantijenlerini kaybetmiştir ve HLA B ve C ekspresyonu özellikle kötü diferansiye karsinomlarda görülür (24).

Villin hücre iskeleti proteinidir. Mikrovillüslerin fırçamsı kenarlarının aksiyal mikroflaman bantlarıyla birlikte bulunur. Kolorektal karsinomlar diferansiasyona bağlı olmaksızın villin eksprese eder (24). Serum villin düzeyi, klinik seyir ve kolorektal kanserin tekrarının izleminde özellikle yararlıdır. Villin düzeyi, cerrahi sonrasında azalır. Tam kür döneminde düşük düzeyde kalır. Hastalığın rekürrensinde, özellikle karaciğer metastazlı olgularda serum düzeyi önemli ölçüde artar (44).

Kalretinin, kolorektal karsinomların çok küçük bir bölümünde eksprese edilmektedir. Mezotelyoma ile ayırıcı tanıda bu immün belirleyici akla gelmelidir (24). Kalretinin ekspresyonu ile tümör diferansiasyonu arasında bir ilişki vardır. Çoğu az diferansiye kolorektal adenokarsinomda kalretinin eksprese edilirken, iyi diferansiye tümörlerde sınırlı pozitiftir. Ekspresyonun derecesi, bölgesel lenf nodu metastazı ve diğer organ metastazı sayısındaki artış ile orantılıdır (44).

Kolorektal karsinomların büyük bölümü, özellikle müsinöz ve kötü diferansiye tümörler, hCG (human koryonik gonodotropin) pozitif boyanır (24).

PLAP (plasental alkalin fosfataz) bütün kolorektal karsinomların % 10'unda bulunur (24, 45). Tümör hücrelerinde genellikle östrojen ve progesteron reseptörleri yoktur (24).

2.9. Kolorektal Karsinomda Tümör İnvazyonu ve Metastaz

Kolonik adenokarsinomlar yavaş büyüyen tümörlerdir. Karsinomun 6 cm'ye ulaşması için tahmini süre 6- 8 yıldır. İnvazyon ve metastaz birden fazla adımda gerçekleşir. Bu adımların çoğu iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Bunlardan birisi tümör içerisinde yeni kan damarlarının (anjiyogenezis) oluşmasıdır. Artmış vaskülarizasyon tümör hücrelerini

başka alanlara taşır. İnvazyon ve metastazda tümör hücreleri diğer hücrelere ve/veya matriks proteinlerine tutunur ve bu sırada adhezyon molekülleri kilit rol oynar. Metastatik hücreler diğer alana ulaşıp kolonize olduğunda büyüme faktörleri ile büyümeye başlar (20). Kolorektal adenokarsinomlar; perinöral, lenfatik, venöz invazyon, direk ekstansiyon ile bitişik dokulara, ekilme ile periton ve serozal membranlara, implantasyon ile cerrahi yaralara ve anastomoz alanlarına yayılırlar (20, 24, 27).

Tümör geliştiğinde birkaç yönde büyümeye devam eder. Bu büyüme, lümene ve kolon duvarına doğrudur. Kasa penetrasyon, bitişik organ ve dokulara direk yayılım ile sonuçlanır (20).

Tümör yanlara doğru lenfatiklerle yayılabilir. Lenfatik invazyon sıklığı, tümörün evresi ve derecesi ile ilişkilidir. Lenfatik invazyon rektosigmoid yerleşimli olanlardan daha çok kolonun diğer alanlarına yerleşenlerde gözlenir. Kolon kanserleri sıklıkla bölgesel lenf nodlarına metastaz yapar. Düşük dereceli tümörler lenf nodlarına % 30, yüksek dereceli tümörler ise % 81 oranında metastaz yapar (20).

Venöz invazyon üç histolojik özellik taşır.:

- Tümör hücreleri ven duvarından ayrıdır (46).

- Tümör hücreleri ven lümenini doldurmuştur. Merkezinde rekanalizasyon olabilir (27).

- Tümör lümende vasküler kalınlaşma, duvar ve etraf dokuda inflamatuar reaksiyon ile büyür (20).

Kolorektal karsinom en sık bölgesel lenf nodlarına, karaciğere ve akciğere metastaz yapar (24). Metastaz; tümör boyutu, lokalizasyonu ve bölgesel lenf nodu tutulumu ile ilişkilidir (20, 24, 27).

2.10. Kolorektal Karsinomda Evreleme

Kolorektal karsinom için çok sayıda evre şeması geliştirilmiştir. Bu şemalar genellikle, barsak duvarına invazyon derinliği ve lenf nodu tutulumu olup olmaması dikkate alınarak oluşturulmuştur (20, 24).

Dukes (20, 24), bir önceki Lockhart and Mummery sınıflandırmasını modifiye ederek 1932'de kendi adıyla anılan bir evreleme sistemi geliştirmiştir. Buna göre:

-Dukes evre B'de; tümör muskularis propriadan serozaya invaze olmuştur.

-Dukec evre C'de; tümör bölgesel lenf nodlarına metastaz yapmıştır (20, 24).

Bir diğer evreleme sistemi ise Astler- Coller sınıflandırmasıdır. Buna göre :

-Evre A: Tümör mukozaya sınırlıdır.

-Evre B1: Tümör muskularis propriayı invaze etmiş fakat muskularis proprianın tamamını tutmamıştır.

-Evre B2: Tümör muskularis proprianın tamamını invaze etmiştir.

-Evre C1: Evre B1'in özellikleri ve lenf nodu tutulumu vardır.

-Evre C2: Evre B2'nin özellikleri ve lenf nodu tutulumu vardır.

-Evre D: Yaygın metastaz vardır (47).

TNM sistemi 1954'te geliştirilmiştir. Bu sistem UICC (Union for International Cancer Control) ve AJCC (American Joint Commission on Cancer) tarafından uyarlanmıştır (**Tablo 2.1**, **Tablo 2.2** ve **Şekil 2.1**) (20, 24, 47).

Tablo 2.1. Kolorektal karsinomda evreleme.

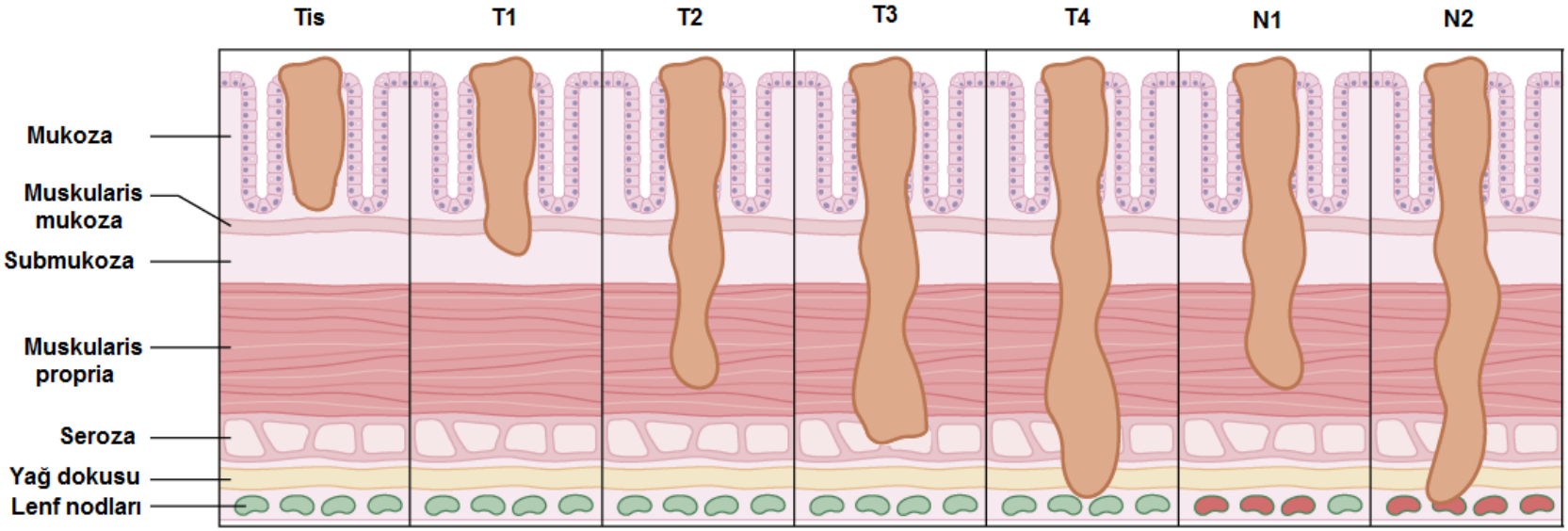
TÜMÖR	
TX	Primer tümörün olmaması
T0	Primer tümör için hiçbir delil yoktur
Tis	Karsinoma insitu (intraepitelyal ve intramural)
T1	Tümör submukozayı invaze eder
T2	Tümör muskularis propriayı invaze eder
T3	Tümör muskularis propriadan geçerek subserozaya veya periton ile kaplı olmayan perikolik veya perirektal dokuya invazedir
T4	Tümör diğer organları veya yapıları invaze eder veya visseral peritonu perfore eder
LENF NODU	
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi
N0	Bölgesel lenf nodlarında metastaz yoktur
N1	Perikolik veya perirektal 1- 3 adet lenf nodu tutulumu
N2	Perikolik veya perirektal ≥4 lenf nodu tutulumu
METASTAZ	
MX	Uzak metastaz varlığı değerlendirilememiştir
M0	Uzak metastaz yoktur
M1	Uzak metastaz vardır

Primer tümör (T)
Bölgesel lenf nodları (N)
Metastaz (M)

Tablo 2.2. Kolorektal karsinomda evre gruplandırması.

	Tümör	**Lenf Nodu**	**Metastaz**	**Dukes Evrelemesi**
Evre 0	Tis	N0	M0	---
Evre 1	T1 T2	N0	M0	A ---
Evre 2	T3 T4	N0	M0	B ---
Evre 3	Herhangi bir T Herhangi bir T	N1 N2	M0	C ---
Evre 4	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1	---

Şekil 2.1. TNM evreleme sisteminin şematik gösterimi.



2.11. Kolorektal Karsinomda Prognozu Etkileyen Faktörler

Kolorektal karsinom prognozunu çok sayıda faktör etkilemektedir.

En önemli prognostik faktör tümörün evresidir (20, 24, 48). Barsak duvarına invazyon derecesi, lenf nodu metastazı varlığı, uzak metastaz varlığı ile belirlenen tümör evresi prognozu olumsuz etkilemektedir (20, 23, 24, 27, 48).

Kolorektal karsinomun histolojik derecesi ve tipi de prognozu etkilemektedir. Az diferansiye adenokarsinom olgularının % 50'sinden fazlasında lenf nodu metastazı görülürken, iyi-orta diferansiye tümörlerde daha az lenf nodu metastazı görülür Tümörün derecesi barsak duvarı yayılımı ile de pozitif ilişki göstermektedir. Ayrıca, müsinöz karsinom, küçük hücreli karsinom ve taşlı yüzük hücreli karsinom klasik adenokarsinomdan çok daha kötü prognozludur (20, 24, 37-39).

Prognoz ile tümör yerleşimi arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; inen, sigmoid kolon ve rektumdan kaynaklanan tümörlerin çoğunda geç dönemde tekrarlama olduğu gözlenmiştir (20, 24). Sol kolon karsinomu daha iyi prognozlu iken sigmoid ve rektum yerleşimli karsinomların daha kötü prognozlu olduğunu çal ışmalar göstermiştir (20, 24, 49).

Tümör boyutu ile prognoz arasında ilişki vardır. Nodal metastaz ile boyut arasında çok zayıf bağlantı vardır. Tümör kalınlığı, lenf nodu ve karaciğer metastazı kötü prognozla ilişkilidir (24).

Polipoid ve egzofitik kanserlerle karşılaştırıldığında ülsere tip karsinomlar daha kötü prognozludur. Duvar invazyonu, egzofitik tümörlerde ülsere olanlardan daha az sıklıktadır. Yassı karsinomlar, polipoid kanserlere göre daha derine invazyon yaparlar ve bu karsinomlarda lenfatik invazyon gözlenir (20, 24).

Cerrahi sınırlarda tümör varlığı prognoz açısından çok önemlidir (20, 24). Rektal tümörler genellikle, makroskopik olarak normal dokuya benzediğinden, dar cerrahi sınır (low anterior resection) ile çıkarılır. Fakat lokal rekürrens olasılığı yüksektir (20).

Rektal kanserde barsak duvarı boyunca yayılım (radyal sınır) prognostik belirleyicidir. Gerçekte bu sınır, prognozu belirlemede lateral sınırdan daha değerlidir (20, 24).

Lenfatik invazyonun artışı ile kısa sağ kalım süresi ilişkilidir. Lenfatik invazyonun artışı ile tümör evresi ve derecesi artar. Ayrıca, lenfatik invazyon lokal rekürrens ile de ilişkilidir. Lenfatik invazyon sağ kalım açısından bağımsız prognostik bir faktördür (20, 24).

Kolon karsinomunda; kolon duvarı dışında kalın duvarlı venlere invazyon olduğunda prognoz intramural invazyona göre daha kötüdür. Duvar dışı venlerde tümör varlığı ile metastatik hastalıktan ölüm arasında güçlü bir ilişki vardır (20, 24).

Perinöral invazyon görülme sıklığı evre III kolorektal karsinomda artmaktadır ve perinöral invazyonu olan evre III kolorektal karsinom hastalarındaki lokal rekürrens sıklığı perinöral invazyon olmayan evre III hastalardan daha sıktır (20, 24).

Lenf nodu tutulumu ile prognoz arasında ilişki vardır. Tümör lenf nodlarına yayıldığında beş yıllık sağ kalım oranı keskin bir biçimde düşmektedir (24). Tutulan lenf nodu sayısı fazla ise prognoz kötüdür (20, 24, 49). Altıdan fazla lenf nodu tutulumunda beş yıldan uzun sağ kalım % 10'dan azdır (24).

Kolonda tam tıkanmaya neden olan kolon karsinomlarında, aynı evredeki tam tıkanmaya neden olmayan karsinomlara göre beş yıllık sağ kalım oranı daha düşüktür (20, 24). Tümörün barsak duvarına yaygın invazyonu sonucunda perforasyon geliştiğinde de prognoz kötüdür (20, 24). İtici karakterde tümör yayılımı olan hastalardaprognoz, infiltratif yayılımı olan hastalardan daha iyidir (20, 24, 50).

Tümör çevresinde belirgin lenfositik infiltrasyon varlığı ve immünolojik reaksiyon sonucu oluşan reaktif lenf nodları sağ kalım süresi üzerine olumlu etki yapmaktadır (20, 24).

Kemik iliğine metastaz kolorektal karsinomun yayıldığının habercisidir. Kemik iliği aspirasyonunda kanser hücrelerinin varlığı hastalıksız (disease free) dönemi kısaltmaktadır (20). Bölgesel peritoneal tutulum, intraperitoneal rekürrens veya hastalığın ilerlemesi ile güçlü ilişki göstermektedir (20).

Tümör yayılımı, tümör içinde ve içine doğru yeni kan damarları gelişmesi açısından önemlidir. Yeni gelişen damarlar (anjiyogenezis), zayıf bazal membrana sahiptir. Tümör hücreleri, bu damarlara kolayca penetre olurlar. Tümör alanındaki vasküler yoğunluk; klinik sonucun tahminine yardımcı olur. Tümör agresifliği, lenfatik veya venöz invazyon bağımsız prognostik belirleyicidir (24).

S fazındaki hücrelerin yüksek proliferasyon aktivitesi kötü prognozla bağımsız olarak ilişkili bir faktördür (20, 24). Mikroasiner gelişme kötü prognoz ile ilişkilidir (24).

Gençler, özellikle çocuklar ile çok yaşlılarda prognoz kötüdür (20, 24). Genç hastalarda yüksek dereceli tümör oranı % 53 civarında iken; yaşlılarda bu oran % 20'dir. Çok yaşlı hastalarda ise sıklıkla acil yaklaşımlar uygulandığından yüksek mortalite görülür. Kırk yaş altındaki hastalar, yaşlı hastalardan daha iyi prognozla sahiptir (20). Prognoz kadınlarda erkeklere göre daha iyidir (24).

CEA, hepatik metastazın taramasında çok duyarlı bir biyolojik parametredir. CEA düzeyi >5.0 ng/ml, kötü prognozla ilişkilidir.Tümörün evresinden bağımsızdır (24). Hastalığın izleminde (rekürrens vb.) önemli bir belirleyicidir (51) Ayrıca serum CA19-9, CA 242, CA 72-4 ve ß hCG yüksekliği kötü prognoza işaret eder. (52) Serum villin seviyesi klinik seyir ve kolorektal karsinom rekürrensinin izleminde ve karaciğer metastazında yararlıdır (53).

Müsin-ilişkili antijenlerden MUC1 ve sialyl-Lewis immünreaktif tümörlerde prognoz kötüdür. MUC1 bağımsız prognostik faktördür (24). HLA-DR ve HLA-A ekspresyonu gösteren kolorektal tümörlerin daha iyi prognozlu olduğu gösterilmiştir (24). 18q kromozomunun allelik kaybı, güçlü negatif prognostik bir faktördür (24, 54). TGF-ß1 gen mutasyonu ve mikrosatellit instabilitesi ile kötü prognoz göstergesidir (24).

K-ras mutasyonlu hastalarda hastalık rekürrens sıklığının arttığı görülmüştür. K-ras mutasyonu taşlı yüzük hücreli karsinomda da saptanmıştır (24, 39, 55). p53 aşırı ekspresyonu, sağ kalımın tahmininde bağımsız prognostik bir belirleyicidir (24). p53 ve bcl-2 ekspresyonu faydalı prognostik bilgi sağlayabilir (56, 57). c-myc onkogeni, tümör diferansiasyonu ile ilişkilidir (24). E-cadherin ekspresyonunun kolorektal karsinomun prognozunu tahmin etmede yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (58, 59). Kalretinin ekspresyonu ile tümör diferansiasyonu arasında ilişki vardır. Kalretinin'in ekspresyon

derecesi arttıkça, lenf nodu metastazı sayısı ve diğer organ metastazı sayısı da artmaktadır (44).

2.11.1. Kolorektal Karsinomlarda Tedavi

Kolorektal karsinomun standart tedavisi cerrahidir (20, 23, 24, 27, 35, 42, 55, 60). Operasyonun tipi tümör bölgesine bağlıdır. Çıkan kolon ve çekum karsinomlarında ileokolektomi tercih edilirken, peritonla kaplı olmayan bölgede klasik abdominoperineal rezeksiyon tercih edilir. Abdominoperineal rezeksiyon yerine, özenle seçilmiş olgularda sfinkter koruyucu yaklaşımlar uygulanmaktadır. Kalın barsağın diğer bölgelerindeki karsinomlar ise anteriör rezeksiyon ile tedavi edilir. Operasyon, tutulumu şüpheli lenf nodlarının çıkarımı ile genişletilebilir. İşlem esnasında tümör hücrelerinin ekilmesi ile anostomoz hattında tümör rekürrensi gelişebilir (20, 24).

Kolorektal karsinom için cerrahi çıkarım ile tedavi oranı % 92, operasyon sırasında ölüm oranı ise % 2'dir. Cerrahi sonrası ilk yıl endoskopik izlem çok önemlidir (24).

Rektumdaki tümör küçük, yüzeyel ve iyi diferansiye olduğunda ve/veya hasta abdominoperineal rezeksiyon için kötü bir aday ise fulgürasyon (hareketli bir elektrotla, etkisi ayarlanan elektrik akımıyla dokuların yakılma işlemi), endoskopik transrektal rezeksiyon ve tam kalınlıkta lokal eksizyon alternatif tedavi yöntemleridir. Lokal rezeksiyona adjuvan kemoterapi eklenebilir (20, 24). Kolon rezeksiyonlu lenf nodu pozitif hastalarda hayatta kalımı düzelten, 5-fluorouracil (5-FU) ve levamizol adjuvan tedavisi uygulanmaktadır (20).

Tek, bazen birden fazla, karaciğer ve diğer organlara uzak metastazda, hastalar cerrahi çıkarımdan fayda görmüşlerdir. (24, 61)

2.11.2. Akım Sitometri (Flow Cytometry) ve Lenfositler

İmmunfenotipleme 1970'li yıllarda monoklonal antikor teknolojilerinin geliştirilmesi sonrasında, tıbbın bir çok alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. İmmünfenotipleme; floresan boyalarla görünür hale gelen hücre yüzeyi ve hücre içi belirteçlerin saptanması yöntemidir. Özgül antikorlarla saptanmak istenen antijenik yapıların varlığı ya da yokluğu saptanmaktadır. İmmunfenotipleme; tanı, prognoz öngörüsü ve takip aşamalarında klinisyene yararlı bilgiler sağlayan ve yönlendirici olan bir yöntemdir.

1970'li yıllarda monoklonal antikor ve floresan boya teknolojilerindeki gelişmeler daha önce DNA ve partikül analizi için kullanılan akım sitometri sistemlerinin immünfenotipleme için kullanılmasına yol açmıştır. Özel lenfosit tiplerinin saptanmasında kullanılan yüzey antijenleri Tablo 2.3'te sunulmuştur.

Tablo 2.3. Lenfosit Yüzey Antijenleri

T hücreleri
Pan T hücre: CD3, CD2, CD7, CD5 T hücre alt grubu: CD4 (T yardımcı), CD8 (T sitotoksik/supressör) İşlevsel Yüzey Belirteçleri: CD28, CD38, CD45RA, CD45RO, CD62L Aktivasyon Belirteçleri: CD25, CD40L, CD69, CD71, HLA-DR
B hücreleri
Pan B hücre: CD19, CD20, yüzey immünoglobulinler B hücre alt grubu: CD5, CD21 İşlevsel Yüzey Belirteçleri: CD27, CD40 Aktivasyon Belirteçleri: CD23, CD25
NK (Naturel killer=Doğal öldürücü hücreler)
Pan NK hücresi: CD16, CD56 NK alt grubu: CD2, CD8, CD57

2.11.3. Lenfositler

İmmün sistemin temel hücre gruplarından olan lenfositler kandaki çekirdekli hücrelerin ortalama % 25'ini oluştururlar. Yaşa göre farklı oranlarda saptanmaktadırlar. Boyutça küçük lenfositler 7-10 µm çapında çekirdekleri daha koyu renkle boyanan hücreler iken daha büyük boyutlu, LGL (Large Granular Lymphocyte) olanlar 10-12 µm çapında, sitoplazmaları daha geniş ve granüllü hücrelerdir (62).

Çevre kanında dolaşan lenfosit alt gruplarını kabaca T, B ve NK (Doğal öldürücü) hücreler olarak sınıflandırabiliriz. Kanda dolaşan lenfositlerin ortalama % 80'ini T hücre, % 10'unu B hücre geri kalan % 10'unu ise NK hücreler oluşturmaktadır. Bu oranlar hücrelerin alındığı dokuya göre değişebilmektedir, timusta hücrelerin nerede ise % 90'ı T hücre iken dalak ve lenf nodunda % 30-40 oranında T hücre görülmekte, B hücreler daha baskın oranda (% 60-70) izlenmektedir (62).

2.11.3.1. T Hücreler

T hücreler, kemik iliğinde oluşan prekürsör hücrelerin timusta farklılaşması, olgunlaşması sonrasında çevre kanına çıkarlar. T hücreler immün yanıttaki rollerinin yanı sıra CD4 veya CD8 taşıma özelliklerine göre alt gruplara ayrılırlar. CD4 taşıyan T helper hücrelerin antikor salınımına yardım ederek immün yanıtta rol aldıkları, CD8 taşıyan hücrelerin ise sitotoksik T lenfositler oldukları düşünülse de son yıllarda yapılan araştırmalara göre durum daha karmaşık görünmektedir. Günümüzde daha çok THR (T hücre reseptörü) ile etkileşimlerine göre ayırım yapılması uygun görülmektedir. $CD4^+$ T lenfositler MHK Sınıf II aracılığı ile antijen tanırken, $CD8^+$ hücreler MHK Sınıf I aracılığı ile antijen tanımaktadırlar. T lenfositler salgıladıkları sitokin profili ile de uyumlu olarak Th0, Th1, Th2, Th17 gibi alt gruplara da ayrılmaktadırlar. Dolaşımdaki T hücrelerin yaklaşık % 95'i THR alfa/beta pozitiftir, CD4 ya da CD8 pozitifliği taşımayan < % 5 oranındaki T lenfositler ise THR gamma/delta pozitiftirler. NKT hücreleri olarak adlandırılan bir alt grup ise CD4 ya da CD8 ile birlikte tek bir V (variable) alfa zinciri (Vα24) taşırlar, antijenik yapıları MHK üzerinden değil dendritik hücreler üzerinde var olan CD1a üzerinden tanırlar. Erişkin kanında % 1-4 oranında saptanabilen T reg hücreler ise bir diğer alt gruptur. Treg hücrelerin immün yanıt düzenlenmesinde etkin rol aldıkları, otoimmünite olgularında azalırken kanserde arttıkları, GVHD (Graft versus Host Disease) oluşmasında da rolleri olduğu bildirilmektedir (63, 64).

2.11.3.2. B Hücreler

B hücreler, 7-10 μm çapında lenfositlerdir. Diğer belirteçler yanında yüzey immunoglobulin, özellikle IgM ve IgD taşırlar, düşük oranda IgG ve IgA taşıyabilmektedirler. B hücrelerden gelişen plazma hücreleri (10-15 μm) normalde dolaşımda bulunmazlar, bölünme yetileri yoktur, immunglobulin üretme görevlerini yerine getirirler. CD19, CD20 pozitifliklerinin yanı sıra CD40, CD79, HLA-DR, FcγRII reseptörleri (CD32) ve kompleman reseptörleri CD21, CD35 taşırlar. T hücrelerdeki THR benzeri BHR (B Hücre Reseptörü) kompleksini B hücrelerde CD19, CD21 ve CD81 oluştururlar (63, 64).

2.11.3.3. Doğal Öldürücü Hücreler

NK (Doğal Öldürücü) hücreler, doğal bağışıklık sisteminin parçasıdırlar ve diğer lenfositlere göre daha granüllü hücrelerdir. Etkileri sitotoksik T lenfositlere benzerdir, ancak reseptörleri farklıdır ve somatik rekombinasyon genleri ile kodlanmazlar. Sadece NKT hücreleri adı verilen düşük oranlı bir NK hücre grubu somatik rekombinasyonla kodlanan alfa/beta reseptörlerini taşır. NK hücreleri yüzeylerinde CD16, $CD16^{+}56^{+}$, CD49b, CD56, CD57, CD314, CD335, CD336, CD337 taşırlar. Sitotoksik etkilerini granzyme ve perforin salımı ile gösterirler. Son yıllarda kabul gören sınıflandırmalara göre ise, T lenfositler alfa/beta ve gamma/delta T lenfositler olarak iki ana gruba ayrılmakta NKT hücreleri ayrı bir alt grup olarak incelenmektedirler (63, 64).

2.11.3.4. Monositler

Mononükleer fagositler kemik iliğinden kaynaklanır ve immun yanıtta vazgeçilmez rol oynar. Bu hücre tipi başlangıçta periferal kanda monositler olarak ortaya çıkar. Dokuya yerleştiğinde mononükleer fagositler *makrofajlar* veya *histisoyitler* olarak adlandırılır. Monosit ve makrofajların ana görevi fagositozdur. Fagositozdan sonra antijeni işler ve antijeni lenfositlere sunarlar ve immun cevabı düzenleyen çeşitli sitokinler üretirler (63, 64).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Proje Başvurusu ve Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, 2013/24 sayılı proje kapsamında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültes Yerel Etik Kurulu'ndan 03.06.2013 tarihinde 2013/109 sayı numarası ile yazılı onay alınarak TTU–2013–4759 proje kodu ile Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklendi.

3.2. Hastalar

Bu çalışmaya, yaşları 55-82 yıl arasında değişen (9 kadın, 11 erkek), operabl kolorektal tümörü olan 20 kolorektal kanser hastası ve kontrol grubu olarak kolesistektomi uygulanan yaşları 48-73 yıl arasında değişen (12 kadın, 8 erkek) 20 hasta dahil edildi.

Kontrol grubunun dahil edilme kriterleri

- CRP yüksekliği ile giden kollajen doku hastalıklarının olmaması
- Bilgisayarlı Tomografi veya endoskopik görüntülemede tümör tanısı olmaması
- İmmünolojik nedenli dermatolojik hastalıkların olmaması
- İmmün sistemi etkileyecek herhangi bir hastalığın olmaması
- Çalışmaya katılmayı kabul etmek.

Kolorektal adenokarsinom grubunun (KK) dahil edilme kriterleri

- Primer kolorektal adenokarsinom tanısı konmuş olmak
- Çalışmaya katılmayı kabul etmiş olmak
- Kanser nedeniyle kemoterapi ve/veya radyoterapi uygulanmamış olmak.

3.3. Kan Örneklemesi

Kan örneklemesi, kolorekatal karsinom hastalarında karına girildikten hemen sonra yapıldı. İMV'nin yaklaşık 1 cm'lik segmenti üzerindeki periton ve yağ dokusu temizlendikten sonra 20 gauge intravenöz kanül damara retrograd olarak ilerletildi. Yirmi ml kan alındıktan sonra, kanül çıkartıldı ve ponksiyon bölgesi 6/0 polipropilen sütür ile kapatıldı veya 5 dakika boyunca kompresyon uygulanarak kanama kontrol edildi. İMV ile eş zamanlı olarak preiferal (antekübital) venden de kan alındı.

3.4. Akım Sitometri

Akım sitometri; bilgisayar teknolojisi, florokrom kimyası, monoklonal antikor, optik ve lazer teknolojisini birleştirerek; hücrelerin veya biyolojik partiküllerin bir çok fiziksel ve fonksiyonel özelliklerini, hücresel seviyede araştırma imkanı sağlayan bir araçtır.

3.4.1. Akım Sitometri İşlemi

Akım öncesi faz: Hücre hazırlanması, protokol seçimi, hücrelerin floresan antikorlarla boyanması işlemlerini kapsayan süreçtir.

Akım fazı: Boyanmış hücrelerin akım sitometri cihazı içerisinde hedeflenen özelliklerinin ölçülmesidir.

Analiz fazı: Akım sitometriden elde edilen verilerin değerlendirilmesidir.

Akım sitometri ile, süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Böylece hücre ya da partikülün; büyüklük, granülarite, immünfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi edinilebilir.

3.4.2. Akım Sitometri Cihazının Ana Kısımları

Akım sitometri dört temel birimden oluşur. Bunlar; akım sistemi, lazer sistemi, optik sistem ve elektronik sistemdir.

Florokrom; belirli bir dalga boyundaki ışını absorbe eden ve daha büyük dalga boyunda ışın saçan maddelere denir.

Enerjinin emilimi ile ışık şeklinde dışarıya verilişi arasında geçen süre 10^{-8} -10^{-4} saniye olursa olaya floresans denir; 10^{-4} saniyeden daha uzunsa fosforesans denir.

Aynı dalga boyundaki lazer ışığını absorbe eden farklı florokromlar, birbirinden farklı dalga boylarında ışın saçarlar. Absorbe edilen lazer ışığının dalga boylarına "absorpsiyon spektrumu" florokrom tarafından saçılan ışınların dalga boylarına ise "emisyon spektrumu" denir.

FSC-SSC Ekranı

Akım sitometride analiz yapabilmek için FSC-SSC ekranında lenfosit, monosit ve granülositlerin olduğu bir görüntünün elde edilmesi gerekir.

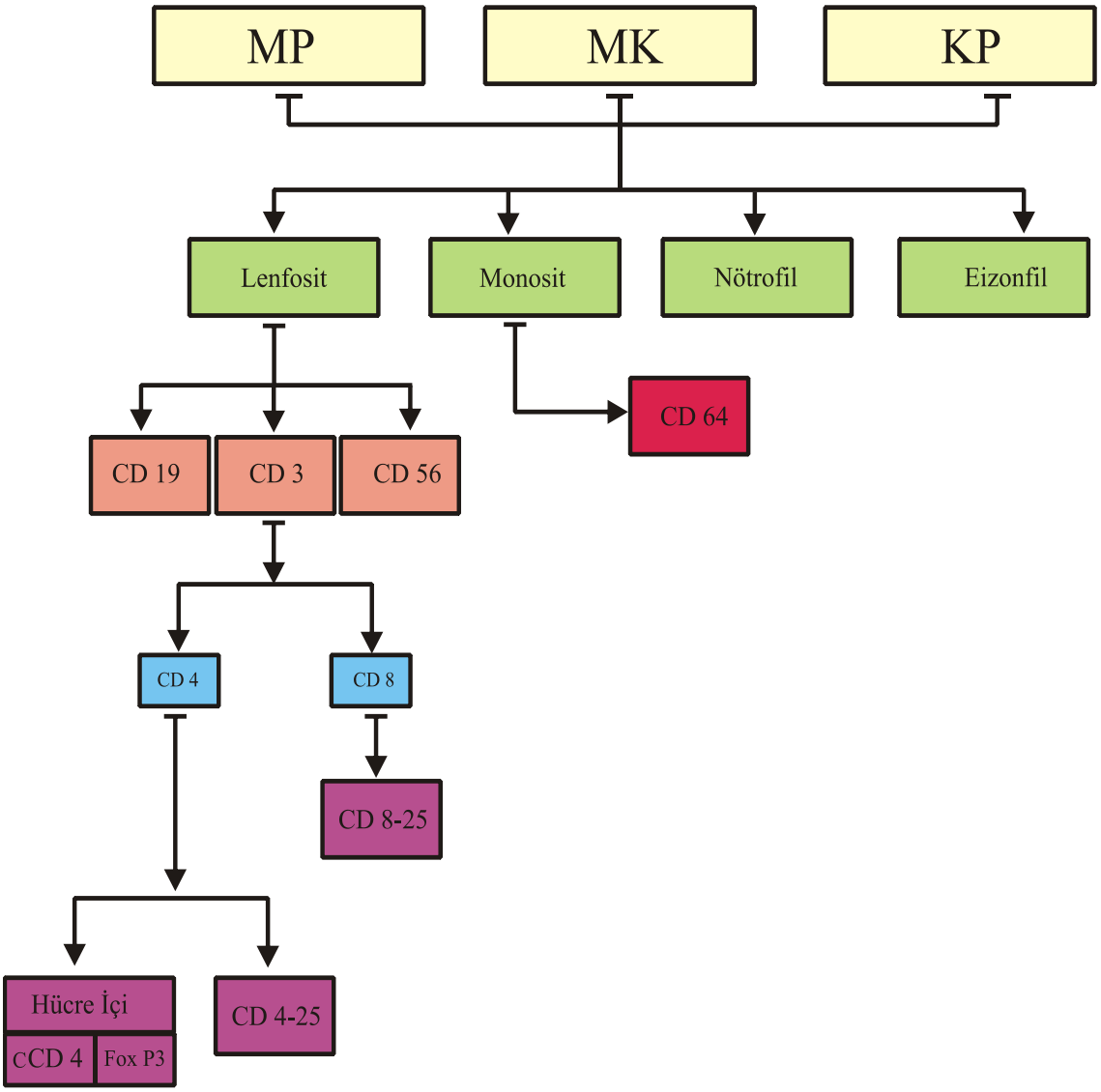
3.4.3. Akım Sitometride İncelenebilen Materyaller

Periferek kan örneği, kemik iliği aspirasyon ve biyopsi materyali, ince iğne aspirasyon materyalleri, tüm vücut sıvılarındaki hücreler akım sitometride incelenebilir.

3.4.5. Akım Sitometri'nin Hematoloji'de Kullanımı

Akım sitometri hematolojide en sık lökosit fenotiplemesinde kullanılır. Bunun dışında konjenital veya kazanılmış immün yetersizlik tanısı (en sık AIDS), HIV pozitifliğinde prognoz değerlendirilmesi, immün yetersiz hastalarda immünite ya da kemoterapi monitörizasyonu, kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda yeni immün durumun takibi, tümör hücre fenotiplemesi, lösemi ve lenfoma tanı ve sınıflaması, hücre içi antijenlerin (myeloperoksidaz miktarı) tayini, DNA analizi (anöploidi tayini, hücre siklusu kinetiğinin belirlenmesi, apoptozis), nötrofil fonksiyon analizleri (O_2 'nin oluşumunun tayini ile, granülamatoz hastalık tayini), retikülosit sayımı, transplant hastalarında Cross-Match gibi çeşitli kullanım alanları mevcuttur.

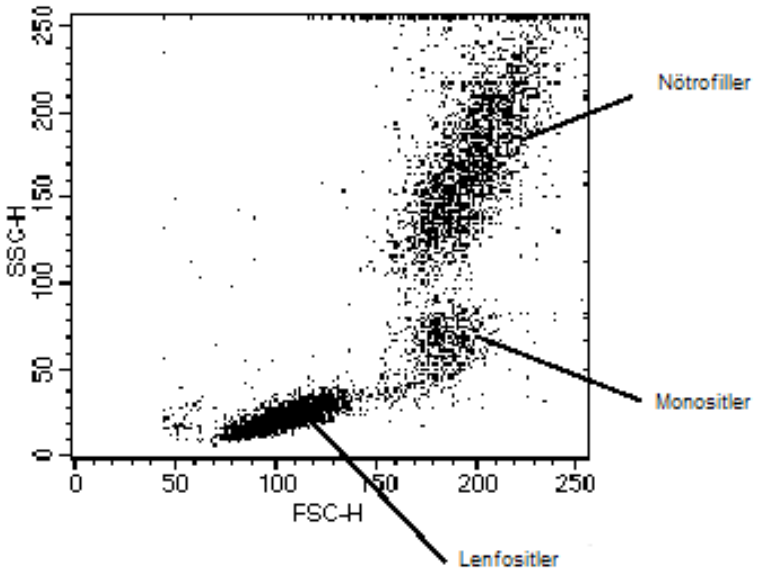
3.5. Akım Sitometri ile Kandaki Mononükleer Hücre Dağılımının Tespiti ve Alt Grup Analizleri



Şekil 3.1. Mononükleer hücre dağılımı ve alt grupların analizi.

Ia.) Akım Sitometri ile İMV'den Alınan ve Periferik Kandaki Mononükleer Hücre Dağılımının Belirlenmesi

Lenfosit, monosit, nötrofil ve eozinofil ayrımı akım sitometri SSC/FSC kapılaması ile tespit edildi. Lazer ışını hücrenin büyüklüğü, granülaritesi, internal kompleksitesine bağlı olarak kırılıma uğrar. İleri ışık saçılımı FSC ile ölçülür, büyüklükle doğru orantılıdır. Yan ışık saçılımı SSC ile ölçülür, hücre granülaritesi ile doğru orantılıdır.



Şekil 3.2. Eritrositlerden Uzaklaştırılmış olan periferik kan lökositlerinin görünümü

I b .) Akım Sitometri İle Lenfosit Alt Gruplarının Belirlenmesi

Lenfositleri oluşturan T, B, NK hücre dağılımını ortaya koymak için **CD3/CD16+56/CD45/CD19** kiti kullanıldı. T hücreleri belirlemek için **CD3,** B hücreleri belirlemek için **CD19,** NK hücreleri belirlemek için **CD56** yüzey antjenlerine özgü antikorlar kullanıldı.

I c.) Akım Sitometri İle T Hücre Alt Gruplarının Belirlenmesi

CD3 (+) lenfositlerdeki **CD4/CD8** oranını bulmak için **CD3/CD8/CD45/CD4** kiti kullanıldı.

3.6. Kan Mononükleer Hücrelerinin Ayrıştırılması

İMV ve aynı hastanın eş zamanlı periferal (antekubital) veninden alınan numuneler ve kontrol grubu periferik (antekubital) veninden alınan numuneler cerrahi operasyon devam ederken lökositlerin ayrıştırılması için ivedilikle labaratuara ulaştırıldı ve aynı gün çalışıldı.

Çalışmada kullanılan araç-gereçler; 12x75 mm test tüpü (Falcon™ polistiren test tüpleri, BD), yarı otomatik pipetler, vorteks cihazı, santrifüj cihazı (Nuve NF 800 model, **FACSCalibur/FACS Canto II** (BD, Bioscience) model akım sitometri cihazı.

Kullanılan kitler ve kimyasal maddeler: CD3/CD16+56/CD45/CD19 kiti (BD Bioscience), CD3/CD8/CD45/CD4 kiti (BD Bioscience), CD4 kiti (BD Bioscience), BD FACS Lysing Solüsyonu 10X Konsantre , BD Permeabilizasyon Solüsyonu 10X konsantre, BD hücre yıkama solüsyonu (BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company 2350 Qume Drive San Jose CA.

3.7. Mononükleer Hücreler ve Alt Gruplarının Akım Sitometri İle İmmunofenotiplendirilmesi

Aynı hastadan alınan periferal, İMV ve kontrol grubundan alınan periferal kan örneklerinin immünfenotipleri karşılaştırıldı. Mononükleer hücreler $1x10^6$ h/ml olarak ayarlandı. Ayrıştırılan lökositlerin fenotipi akım sitometri yöntemi ile belirlendi. Buna göre T hücresi **CD3** , NK hücresi **CD3- CD56+** veya **CD3+ CD56+**, CD4+ T hücreleri **CD3+ CD4+ CD8-** ve CD8 T hücreleri **CD3+ CD8+ CD4-**, B hücreleri **CD19+ CD3-** ve **CD14-**, monosit /makrofaj öncü hücreleri ise **CD14+ CD3- CD19-**, **CD64+** ile ifade edildi. İmmünfenotip tanımlama fluorokrom etkili monoklonal antikorlarla (FITC CD3, PE CD16+56, PerCP CD45, APC CD19, FITC CD3, PE CD8, PerCP CD45, APC CD4, FITC CD14, PE CD64, PE CD25, PE CD34, PE FoxP3 FITC cyCD4) yapıldı. Daha önceden istenen monoklonal antikorlarla birleştirilen her numune boyandı. Hücresel fenotipler 4 renk kullanılarak BD FACSCalibur akım sitometri ile ortaya çıkarıldı (BD Biosciences,CA). Öncelikle 6 adet 5 mL'lik Falcon tüpe ilgili kitlerden 10'ar µL eklendi. Antikorlar üzerine 100 µL numune ilave edildi. Bir diğer 5mL'lik Falcon tüpüne ise sadece 100 µL numune ilave edildi. Bu tüp kontrol amaçlı kullanıldı. Antijen-antikor kompleksi oluşturmak ve hücreleri floresan işaretli antikorlarla işaretlemek için vorteksleme yapıldı ve karanlıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Akım sitometri ile sağlıklı bir analiz yapabilmek için lenfosit, monosit ve granulositlerin hücre ortamında bulunması gerekir. Bu yüzden eritrositler parçalanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Bunu gerçekleştirebilmek için her bir Falcon tüpündeki karışıma 1.5 mL BD hücre lizis solüsyonu ilave edildi ve hızlı bir şekilde vortekslendikten sonra 8 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 8 dakikalık inkübasyondan çıkarılan her bir tüp 1500 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. Altta kalan pelete 2 mL BD hücre yıkama solüsyonu ilave edildi ve tüpler ikinci defa 1500 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. Altta kalan pelet hızlı bir şekilde vortekslendi ve 500 µL BD hücre

yıkama solüsyonu ilave edildi. Daha sonra mononükleer hücreler akım sitometri ile 50.000 hücre sayılarak analiz gerçekleştirildi.Veriler Cellquest programı kullanılarak yorumlandı. Grafikler bir aparat yardımıyla BD FACS Canto II cihazına aktarıldı. Analiz ve yorumlama işlemleri bu cihazda da kontrol edildi. Ayrıca FoxP3 parametresini analiz edebilmek için hücre içi boyama prosedürü uygulandı.

Beş mL'lik Falcon tüpe 100 µL numune eklendi. 2mL BD FACS Lysing solüsyonu eklenerek hızlı bir şekilde vortekslendi ve karanlıkta 8 dakika inkübasyona bırakıldı. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Altta kalan pelete 500 µL BD Permeabilizasyon solüsyonu (10X konsantre) eklendi ve hızlı bir şekilde vortekslenerek 8 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüpe 2ml hücre yıkama solüsyonu ilave edildi ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. Altta kalan pelet hızlı bir şekilde vortekslendi ve 20 µL CD4, 20 µL FoxP3 kitleri eklendi. Vortekslendi. Karanlıkta 30 dakika inkünbasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüpe 2 mL hücre yıkama solüsyonu eklendi ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Altta kalan pelet vortekslendi. Son olarak 2-3 damla hücre yıkama solüsyonu ilave edildi. Cihazdan 20000 CD4+ hücre geçirildi. Bu hücrelerden FoxP3 + karakterli olanları seçildi ve analiz edildi.

3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen tüm veriler bilgisayarda Windows işletim sisteminde, "Statistical Packages for the Social Science" (SPSS) 11.5 istatistik programı kullanılarak analiz edildi.

Tanımlayıcı istatistiksel analizler yapıldıktan sonra (frekans, yüzde dağılımı, ortalama±standart sapma, medyan [minimum-maksimum]), değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilks Testi ile değerlendirildi. Olgu ve kontrol gruplarına ait sürekli değişken parametrelerinin karşılaştırılması, Mann Whitney U Testi kullanılarak yapıldı. Aynı grubun farklı venlerden elde edilen değerleri karşılaştırılırken Wilcoxon Signed Rank Test kullanıldı. Kategorik değişkenlerle ilgili karşılaştırmalarda Yates' Ki-kare Testi kullanıldı.

$p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Grupların yaş değerleri; ve cinsiyet dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark yoktu (**Tablo 4.1**).

Tablo 4.1. Grupların yaş değerleri; ve cinsiyet dağılımları.

		GRUPLAR				p
		KK (n=20)		Kontrol (n=20)		
Yaş (yıl)		64.50 (55-82)		61 (48-73)		0.086*
		n	% n	n	% n	
Cinsiyet	Kadın	9	45	12	60	0.527**
	Erkek	11	55	8	40	

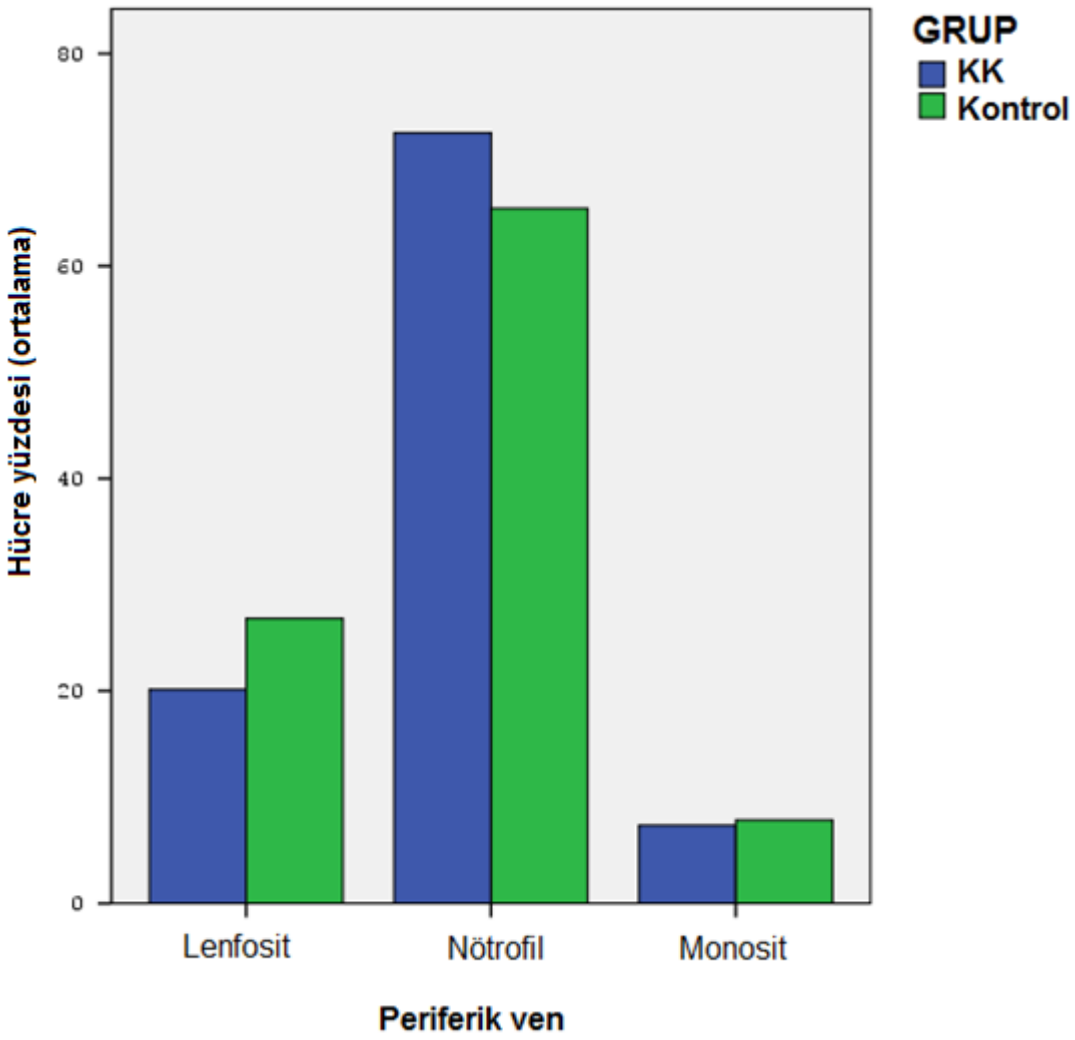
* Mann-Whitney U test (Tablodaki değerler medyan [minimum-maksimum] olarak ifade edilmiştir.)
**Yates' ki kare test

İki grubun periferik venöz kandaki lenfosit, nötrofil ve monosit yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark yoktu (tüm karşılaştırmalar için p>0.050) (**Tablo 4.2** ve **Şekil 4.1**).

Tablo 4.2. İki grubun periferik venöz kandaki lenfosit, nötrofil ve monosit yüzdelerine ait karşılaştırmalar.

	GRUPLAR										
	KK (n=20)					Kontrol (n=20)					
Periferik ven	**Ort**	**SS**	**Medy**	**Min**	**Maks**	**Ort**	**SS**	**Medy**	**Min**	**Maks**	**p**
Lenfosit-P	20.14	9.93	22.75	4	34	26.83	6.59	25	15	45	0.076
Nötrofil-P	72.53	11.70	70	53	91	65.43	7.46	65.50	45	77	0.081
Monosit-P	7.34	3.38	6.25	3.50	16	7.85	2.36	8	4	11	0.231

Mann-Whitney U test
Kontrol grubunun değerlendirmesi periferik venden alınan kanda yapılmıştır.



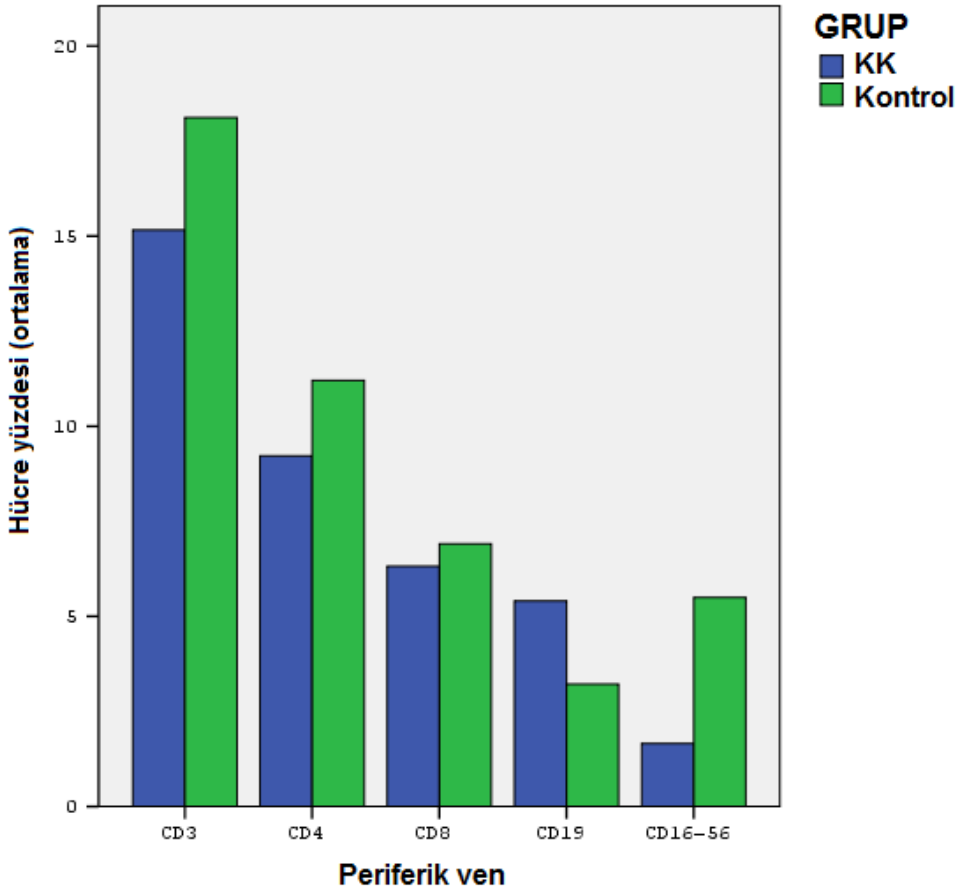
Şekil 4.1. İki grubun periferik venöz kandaki lenfosit, nötrofil ve monosit yüzdelerine ait çubuk grafiği.

İki grubun periferik venöz kandaki $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ ve $CD19^+$ lenfosit yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark yoktu (tüm karşılaştırmalar için $p>0.050$). KK grubun periferik venöz kandaki $CD16^+$-56^+ lenfositlerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0.001$) (**Tablo 4.3** ve **Şekil 4.2**).

Tablo 4.3. İki grubun periferik venöz kandaki lenfosit alt tipi yüzdelerine ait karşılaştırmalar.

Periferik Ven	GRUPLAR										p
	KK (n=20)					Kontrol (n=20)					
	Ort	**SS**	**Medy**	**Min**	**Maks**	**Ort**	**SS**	**Medy**	**Min**	**Maks**	
$CD3^+$-P	15.16	8.41	15.90	2.70	28.60	18.12	5.72	17.25	9	32	0.369
$CD4^+$-P	9.22	5.37	9.65	0.80	19.10	11.21	3.38	11.37	5	19.10	0.174
$CD8^+$-P	6.32	4.02	5.60	1.40	13.40	6.91	2.98	6.05	3.80	16	0.461
$CD19^+$-P	5.40	10.28	2.75	0.50	43	3.22	1.32	3	1	6	0.242
$CD16\text{-}56^+$-P	1.66	2.17	0.75	0.10	8.10	5.50	2.32	5.25	2.30	11	**<0.001**

Mann-Whitney U test
Kontrol grubunun değerlendirmesi periferik venden alınan kanda yapılmıştır.



Şekil 4.2. İki grubun periferik venöz kandaki lenfosit alt tipi yüzdelerine ait çubuk grafiği.

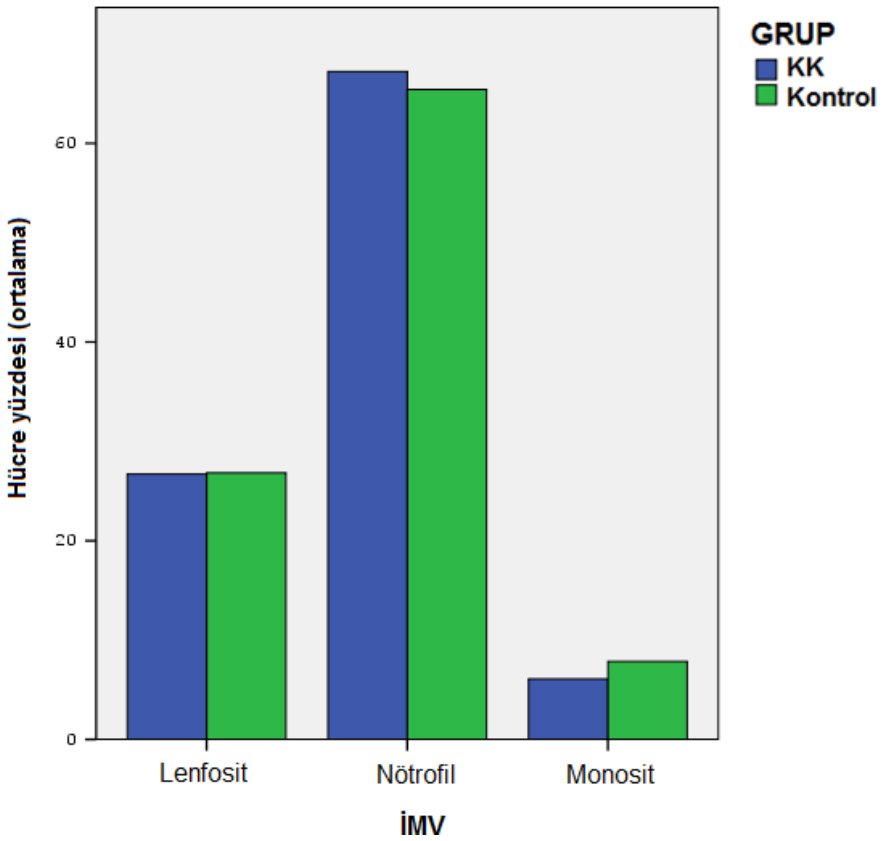
KK grubunda İMV'den alınan kandaki lenfosit ve nötrofil yüzdeleri ile kontrol grubunda periferik venden alınan kandaki lenfosit ve nötrofil yüzdeleri arasında

istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark yoktu (iki karşılaştırma için p>0.050). KK grubunda İMV'den alınan kandaki monosit yüzdesi, kontrol grubundaki (periferik venöz kan) yüzdeden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (p=0.005) (**Tablo 4.4** ve **Şekil 4.3**).

Tablo 4.4. KK grubunda İMV'den alınan ile kontrol grubunda periferik venöz kandaki lenfosit, nötrofil ve monosit yüzdelerine ait karşılaştırmalar.

	GRUPLAR										
	KK (n=20)					Kontrol (n=20)					
İMV	Ort	SS	Medy	Min	Maks	Ort	SS	Medy	Min	Maks	p
Lenfosit-İMV	26.70	13.73	26.50	6	51	26.83	6.59	25	15	45	0.925
Nötrofil-İMV	67.22	14.96	65.50	44	90	65.43	7.46	65.50	45	77	0.862
Monosit-İMV	6.08	3.69	5	2.50	16	7.85	2.36	8	4	11	0.005

Mann-Whitney U test
Kontrol grubunun değerlendirmesi periferik venden alınan kanda yapılmıştır.



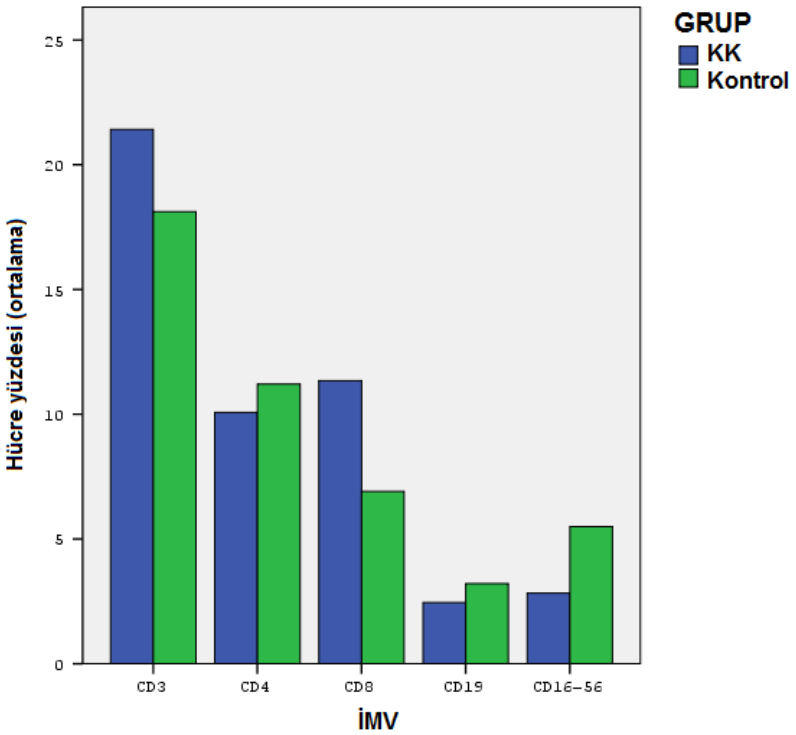
Şekil 4.3. KK grubunda İMV'den alınan ve kontrol grubunda periferik venöz kandaki lenfosit, nötrofil ve monosit yüzdelerine ait çubuk grafiği.

KK grubunda İMV'den alınan kandaki $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ ve $CD19^+$ lenfosit yüzdeleri kontrol grubunda periferik venden alınan kandaki $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ ve $CD19^+$ lenfosit yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark yoktu (tüm karşılaştırmalar için p>0.050). KK grubun İMV'den alınan kandaki $CD16\text{-}56^+$ lenfositlerin yüzdeleri kontrol grubundan (periferik venöz kan) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (p=0.001) (**Tablo 4.3** ve **Şekil 4.4**).

Tablo 4.5. KK grubunda İMV'den alınan ile kontrol grubunda periferik venöz kandaki lenfosit alt tipi sayılarına ait karşılaştırmalar.

	GRUPLAR										
	KK (n=20)					Kontrol (n=20)					
İMV	Ort	SS	Medy	Min	Maks	Ort	SS	Medy	Min	Maks	p
$CD3^+$-İMV	21.42	12.69	20.05	3.70	46.20	18.12	5.72	17.25	9	32	0.478
$CD4^+$-İMV	10.07	6.87	8.35	0.60	27.10	11.21	3.38	11.37	5	19.10	0.174
$CD8^+$-İMV	11.35	7.53	11.40	2.20	30.80	6.91	2.98	6.05	3.80	16	0.052
$CD19^+$-İMV	2.46	2.23	1.60	0.30	7.20	3.22	1.32	3	1	6	0.068
$CD16\text{-}56^+$-İMV	2.83	3.20	1.70	0	12.20	5.50	2.32	5.25	2.30	11	**0.001**

Mann-Whitney U test
Kontrol grubunun değerlendirmesi periferik venden alınan kanda yapılmıştır.



Şekil 4.4. KK grubunda İMV'den alınan ve kontrol grubunda periferik venöz kandaki lenfosit alt tipi yüzdelerine ait çubuk grafiği.

İki grubun periferik venden alınan kandaki hücre sayılarına göre $CD4^+/CD8^+$ oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark yoktu (p=0.355). KK grubunda İMV venden alınan kandaki hücre sayılarına göre $CD4^+/CD8^+$ oranı, kontrol grubunun periferik veninden alınandan saptanan orandan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (p<0.001). KK grubunda İMV venden alınan kandaki hücre sayılarına göre $CD4^+/CD8^+$ oranı, periferik veninden alınandan saptanan orandan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (p<0.001;*Wilcoxon Signed Rank Test*).

KK grubunda İMV'den alınan kandaki lenfosit ve nötrofil yüzdeleri ile periferik venden alınan kandaki lenfosit ve nötrofil yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (sırasıyla p=0.052 ve p=0.198; *Wilcoxon Signed Rank Test*). KK grubunda İMV'den alınan kandaki monosit yüzdesi periferik venden alınan kandaki monosit yüzdesinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (p=0.013; *Wilcoxon Signed Rank Test*).

KK grubunda İMV'den alınan kandaki $CD4^+$ ve $CD19^+$ hücre yüzdeleri ile periferik venden alınan kandaki $CD4^+$ ve $CD19^+$ hücre yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (sırasıyla p=0.641 ve p=0.147; *Wilcoxon Signed Rank Test*). KK grubunda İMV'den alınan kandaki $CD3^+$ (p=0.030), $CD8^+$ (p=0.003) ve $CD16^+$-56^+ (p=0.026) hücre yüzdeleri periferik venden alınan kandaki yüzdelerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (*Wilcoxon Signed Rank Test*).

5. TARTIŞMA

KK grubun periferik venöz kandaki monosit, NK yüzdesi kontrol grubundan düşüktü. KK grubun İMV'den alınan kandaki NK yüzdeleri kontrol grubundan (periferik venöz kan) düşüktü.

KK grubunda İMV venden alınan kandaki hücre sayılarına göre $CD4^+/CD8^+$ oranı, kontrol grubunun periferik veninden alınandan saptanan orandan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü. KK grubunda İMV venden alınan kandaki hücre sayılarına göre $CD4^+/CD8^+$ oranı, periferik veninden alınandan saptanan orandan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü.

KK grubunda İMV'den alınan kandaki monosit, lenfosit, sitotoksik T hücre ve NK hücre yüzdeleri periferik venden alınan kandaki yüzdelerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü.

Adaptif immün sistemin solid tümörlere konak yanıtında anahtar bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Çeşitli kanserler için kronik inflamatuar durumların bir risk faktörü olduğu (67) ve immünsüpresif durumlarda kanser insidansının arttığı (68) gösterilmiştir. Solid tümörler immün sistemin çok sayıdaki bileşeniyle sıklıkla infiltre olur (69, 70). Yüksek sayıda tümör infiltre eden T lenfositlerin (TIL) kolorektal kanserdeki iyi prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (5, 9, 71, 72). Bu gözlemler bir meta analizde birleştirilmiştir (73). Yüksek TIL düzeyleri diğer tümörlerde de iti prognozla ilişkilidir. Bu durum bir ilke olarak adaptif immünitenin koruyucu etkisi olduğunu ve genel olarak TIL'ların kanser biyolojisinde önemli olduğunu göstermektedir (74). Kolorektal kanserlerde TIL'ın etkisi ile ilgili ilk raporlar 25 yıl önce yayınlanmış olmasına karşın

(9, 71). Primer kanserlerde TIL rutin uygulamalar üzerine çok az etkisi olmuştur. T lenfositler farklılaşan ve tamamlayıcı işlevleri olan çeşitli olgun alt tiplere farklılaşırlar. TIL hücrelerin yüzey moleküllerinin analiziyle karakterize edilebilir. Hücre yüzey molekülleri 'CD' (cluster determinant) ile standart bir şekilde adlandırılır. CD3 T lanfositlerin tamamında bulunmaktadır. CD8 sitotoksik T hücrelerini ayırt ettirirken CD4 yardımcı T lenfositler üzerinde bulunmaktadır. Galon ve arkadaşları kolorektal tümörlerdeki CD3 pozitif hücrelerin yüksek sayısının belirgin biçimde daha iyi prognozla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (5). Ayrıca bu hastalarda relaps oranı daha düşük hastalıksız ve tüm sağ kalım TIL hücresi daha nadir olan hastalara göre daha uzun bulunmuştur (5). CD3 sayısı TNM evrelemesinden bağımsızdır. Tüm evrelerdeki hastalarda düşük TIL sayısı daha kötü klinik sonuçlarda anlamlı düzeyde ilişkili bulunmuştur (5).

Bu çalışma da daha yüksek sayıdaki CD8 pozitif sitotoksik TIL'ın CD3 pozitif TIL sayısında olduğu gibi benzer prognostik yararları olduğu bildirilmiştir (5). Tüm çekirdekli hücrelerde proteinler sentez ve yıkım yoluyla küçük peptidlere fragmante olurlar. Sitoplazmadaki bu proteinler majör histokompatibilite kompleks (MHC) 1 ve 2 ile ilişkilidir ve bu peptidler hücre yüzeyine, ekstrasellüler çevreye sunulmak üzere transporte edilir. Dolaşımdaki T lenfositler bu peptidleri örnekler ve bu etkileşimin bir sonucu olarak hücrenin dahil olacağı süreç belirlenir. T hücreleri MHC1 hattındaki peptidleri fark ederse özgül T hücre reseptörleri yoluyla T hücreleri aktive olur, hücreler sitotoksik veya öldürme işlevleri kazanır ve hedef hücreyi elimine eder. T hücreleri yeniden dolaşıma katılır ve antijenle bir sonra ki karşılaşmada daha hızlı yanıt gelişir. Tersine T hücresi herhangi bir MHC taksim peptid bileşiğin kompleksine bağlanmazsa T hücresi sessiz kalır. Böylece konağın anormal hücreleri tanıması devam eder (örneğin, viral enfeksiyonları (69) ve karsinojenik süreçlerde değişen hücreleri) (70).

T hücre reseptörü antijen etkileşimi bazı T hücrelerinin bellek hücresi olmasına neden olacak piçim de T hücre farklılaşmasını tetikler. CD45RO yüzey molekülünün varlığı antijene maruziyeti takiben bellek T hücresi (bellek hücresi) nin aktive olduğunu gösterir (75). Tümörde bulunan yüksek sayıda ki $CD45RO^{+}$ T hücreleri iyi prognozla ilişkilidir (76). Bu durum bu hücrelerin fonksiyonel olarak aktif olduğunu göstermektedir. Yakın zaman da yayınlanan bir çalışmadaki olgu serisinde işlenmiş

kontrollerle karşılaştırıldığında normal bağırsak kozasındaki sitotoksik $CD8^+$ hücre oranının kolerektal kanserlerden daha düşük olduğu gösterilmiştir (75). Bu T hücreleri kolerektal kanser hücrelerindeki antijeni fark edebilmektedirler. $CD45RO^+$ hücre sayısının farklı moleküler genotipler (KRAS veya BRAF mutasyonları) ve DNA mikrosatellit instabilitesi durumlarında bağımsız bir prognostik belirteç olduğu düşünülmektedir (77). MSI'nın varlığı DNA yanlış eşleşme tamir fonksiyonunun yokluğunu göstermektedir ve ilginç bir biçimde MSI artmış TIL ile ilişkilidir ve bir iyi prognoz göstergesidir (78). Böylece yanlış eşleşme tamirinin yokluğu adaptif T hücre yanıtını provoke eden tümör ilişkili antijenlerin gelişimiyle sonuçlanır (78). Bu durum fare tümör sisteminde kanıtlanmıştır (79). Mutasyonlardan kaynaklanan insan epitoplarının moleküler örnekleri (80, 81) bildirilmiş ve $CD8^+$ sitotoksik T lenfositlere immunojenik olduğu gösterilmiştir (82). MSI kanserlerinin %82'sinde özel bir mutasyon saptanmıştır ve mutasyonun oluşturduğu yeni peptid $CD8^+$ T hücreleri tarafından algılanabilir (83).

Adaptif immün yanıtın rolüyle ilgili diğer kanıtlar T yardımcı hücre popülasyonunu $CD4^+$ alt tipiyle ilişkili bir çalışmadan elde edilmiştir. Bu çalışmada T yardımcı lenfosit topluluğunun sonraki immün reaksiyonları sitokin sekresyonu yoluyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir. T yardımcı sınıf 1 (TH1) hücreler aracılığı immünitenin güçlü bir stimülatörüdür (84). Ayrıca T yardımcı hücreleri interferon gama gibi sitokinlerin üretimi oluyla sitotoksik T lenfositleride yüklemektedir (85). TH1 ilişkili genlerin mRNA'larının yüksek düzeylerinin düşük relaps oranlarını ve hastalıksız sağ kalım süresi üzerine uzatıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (5, 84). Tersine TH2 fenotipi doğal bağışıklığı ve humoral immüteyi güçlendirmekte, antijen sunan hücreleri baskılamakta ve anti tümör immünite açısından TH1'den daha düşük düzeyde etkin olduğu düşünülmektedir. Dördüncü T hücre alt tipi ($CD4^+CD25^+$ regulatuar T hücreleri) TH1 statipi statostik T lenfositlerin aktivasyonunu baskılamaktadır (86). Bu hücrelerin over (87), pankreas (88), hepatosellüler (89) karsinomada kötü prognozla ilişkili olduğu tersine kolorektal kanserlerde (76, 90) pozitif bir prognostik belirteç olduğu bildirilmiştir. Tümör dokusunda immün ımf intitratın de tümör evresinin negatif ilişki gösterdiği ve bu ilişkinin zamanla eğrildiği ileri sürülmüştür. Kanserin ilerlemesi için tümör hücrelerinin konakçı immün sistemini işgal etmesi gerekmektedir (91). Bir çalışmada başlangıç döneminde immün saldırının kanser hücrelerini nasıl immünite

ettiği ve fakat bu seçici baskının tümör hücrelerinin sağ kalanını engellemediği gözlenmiştir. Bir eşitlik döneminden sonra (92) immün sistemin etkinliği azalmakta ve tümörün immün sistemden kaçınmasının kolaylaşması beklenmektedir. Bu durumda hastalarda istenmeyen sonuçlar ortaya çıkar (93). Yukarıda söz edilen durumla ilişkili olarak daha ileri tümör evrelerinde $CD3^+$ (94) ve $CD8^+$ (6) hücrelerinin düşük sayıları saptanır. Bu durum, azalmış hastalıksız sağ kalım süresi ve artmış relaps oranlarıyla ilişkilidir (95). Ancak, günümüze kadar saptanmış olan en önemli bulgu, TNM evresinden bağımsız olarak düşük TIL sayısı ile kolorektal kanser rekürrensi arasındaki güçlü ilişkidir (5). Çeşitli kanserlerde de solid tümörlerde TIL değerlendirmesinin yararlı olacağına dair kanıtlar elde edilmiştir (96). Yüksek sayıda $CD8^+$ ve $CD45RO^+$ TIL sayıları; ekstramural venöz, lenfatik ve perinöral invazyonun olmaması ile de ilişkilendirilmektedir (7). Ek olarak, erken dönem metastatik invazyonun histopatolojik bulgularının olmaması, kolorektal malignansilerde uzun süreli sağ kalım ile ilişki göstermektedir (7).

Kolorektal kanserlerde klinikte rutin olarak kullanılmak üzere çeşitli skorlama sistemleri önerilmiştir. Rektal kanserlerde TIL üzerine yapılmış ilk çalışmada, TIL değerlendirmesi prognostik sınıflama amacıyla kullanılması denenmiştir (9). Klintrup ve Shia tarafından önerilen skorlama sistemleri rutin kullanıma girmemiştir (97, 98). Diğer bir çalışmada, tümördeki immün infiltrat değerlendirilmesine dayanarak basit bir skor geliştirmeye çalışılmıştır (72). Bu çalışmada, evre I ve II kolorektal karsinomda, tümör dokusunun merkezinden ve invaziv sınırından alınan örneklerde $CD8^+$ ve $CD45RO^+$ TIL nicel olarak değerlendirilmiştir. Bu dört değerlendirme sonucundan, aynı sonuç için elde edilen medyan değerinden yüksek olanlara "1" ve düşük olanlara "0" değeri verilmiştir. Yüksek infiltrasyon değeri maksimum "4" ve düşük infiltrasyon değeri minimum "0" olarak değerlendirilmiştir (7, 72).

TIL, medyan değerinden başka, kuartiller (94) ve sürekli diziler (99) kullanılarak da değerlendirilmiştir. Ancak, bu gereçler yaygın kabul görmemiştir. Yardımcı/sitotoksik (CD4/CD8) gibi hücre sayısı oranlarının değerlendirildiği daha karmaşık analizler de yapılmış olmakla birlikte, bu indeksin $CD8^+$ ve $CD45RO^+$ daha etkin prognoz göstergesi olup olmadığı açık değildir (100). Ancak, $CD4^+/CD8^+$ hücre oranının düşü olması ile daha iyi prognoz arasında ilişki olduğunu gösteren kanıtlar vardır (101).

Bir çalışmada, kolorektal tümörlerin invaziv sınırındaki inflmasyonun ve tümör mikroçevresindeki tüm alanlardaki inflamatuar hücrelerin önemli bir prognostik belirteç olabileceği ileri sürülmüştür (102). Richards ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışmada, gerçekten de, yoğun T hücresi infiltratının koordine bir adaptif immün yanıtın göstergesi olduğu ve kolorektal kanser için uygulanan küratif rezeksiyona alınan hastaların sonuçlarının yordanmasında en önemli faktörlerden biri olduğu belirlenmiştir (103). Sözü edilen son çalışmada, infiltre T-hücre sayısının kanser evresi ile negatif ilişki gösterdiği, itici büyüme örüntüsü ve düşük venöz invazyon düzeyi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (103). $CD3^+$ ve $CD8^+$ hücre sayısının, sağ kalımın güçlü bir yorumlayıcısı olduğu saptanmıştır (103).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, kolorektal karsinom hastalarında (n=62) kemoterapi uygulamasını takiben periferik kandaki $CD4^+$ ve $CD8^+$ lenfosit yüzdelerinin arttığı ve $CD19^+$ lenfosit yüzdelerinin azaldığı saptanmıştır. Araştırmacılar, hümoral immünitenin kemoterapi ile zayıfladığı sonucuna ulaşmışlardır (104). Metastatik kolorektal karsinom hastalarının değerlendirildiği bir çalışmada, kolorektal karsinom grubundaki hastaların periferik kanında $CD19^+$ hücre sayısının kontrollerden daha düşük olduğu saptanmıştır (18).

CD16 ve CD56, NK hücreleri tarafında eksprese edilmektedir ve NK'nın hedef hücreye bağlanması için önemlidir (105-107). NK'nin, kolon karsinomunda immün yanıtları güçlendirdiği bilinmektedir (19). NK hücrelerinin tümör mikroçevresine göçü, tümör gelişiminin inhibisyonu ve sağ kalım süresinde uzama ile ilişkilendirilmektedir (108, 109). Bir çalışmada, periferik venden alınan kandaki $CD16^+/56^+$ hücre sayısının metastatik kolorektal kanser tanısı ile izlenen hastaların tüm sağ kalım için bağımsız bir faktör olduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir (110).

Yüksek miktarda $CD3^+$ ve $CD8^+$ hücre infiltrasyonu saptanan kolorektal tümörlerde mikrosatellit instabilitesi gözlenmektedir (67, 68).

6. SONUÇLAR

1. İki grubun periferik venöz kandaki lenfosit, nötrofil, monosit, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ ve $CD19^+$ lenfosit yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark yoktu. KK grubun periferik venöz kandaki $CD16\text{-}56^+$ lenfositlerin yüzdesi kontrol grubundan düşüktü.
2. KK grubunda İMV'den alınan kandaki lenfosit ve nötrofil yüzdeleri ile kontrol grubunda periferik venden alınan kandaki lenfosit ve nötrofil yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark yoktu. KK grubunda İMV'den alınan kandaki monosit yüzdesi, kontrol grubundaki (periferik venöz kan) yüzdeden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü.
3. KK grubunda İMV'den alınan kandaki $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ ve $CD19^+$ lenfosit yüzdeleri kontrol grubunda periferik venden alınan kandaki $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ ve $CD19^+$ lenfosit yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark yoktu.. KK grubun İMV'den alınan kandaki $CD16\text{-}56^+$ lenfositlerin yüzdeleri kontrol grubundan (periferik venöz kan) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü.
4. İki grubun periferik venden alınan kandaki hücre sayılarına göre $CD4^+/CD8^+$ oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark yoktu. KK grubunda İMV venden alınan kandaki hücre sayılarına göre $CD4^+/CD8^+$ oranı, kontrol grubunun periferik veninden alınandan saptanan orandan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü. KK grubunda İMV venden alınan kandaki hücre sayılarına göre $CD4^+/CD8^+$ oranı, periferik veninden alınandan saptanan orandan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü.

5. KK grubunda İMV'den alınan kandaki lenfosit ve nötrofil yüzdeleri ile periferik venden alınan kandaki lenfosit ve nötrofil yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. KK grubunda İMV'den alınan kandaki monosit yüzdesi periferik venden alınan kandaki monosit yüzdesinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü.
6. KK grubunda İMV'den alınan kandaki $CD4^+$ ve $CD19^+$ hücre yüzdeleri ile periferik venden alınan kandaki $CD4^+$ ve $CD19^+$ hücre yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. KK grubunda İMV'den alınan kandaki $CD3^+$, $CD8^+$ ve $CD16^+$-56^+ hücre yüzdeleri periferik venden alınan kandaki yüzdelerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü.

7. KAYNAKLAR

1. Aaltomaa, S, Lipponen, P, Eskelinen, M, Kosma, VM, Marin, S, Alhava, E, Syrjanen, K (1992) Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. Eur J Cancer. 28A: 859-64.
2. Abbas, AK (2007) Cells and Tissues of the Adaptive System, Cellular and Molecular Immunology Int. Edition 6th ed.
3. Antony, PA, Piccirillo, CA, Akpinarli, A, Finkelstein, SE, Speiss, PJ, Surman, DR, Palmer, DC, Chan, CC, Klebanoff, CA, Overwijk, WW, Rosenberg, SA, Restifo, NP (2005) CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. J Immunol. 174: 2591-601.
4. Ballinger, AB, Anggiansah, C (2007) Colorectal cancer. BMJ. 335: 715-8.
5. Bhat, R, Rommelaere, J (2013) NK-cell-dependent killing of colon carcinoma cells is mediated by natural cytotoxicity receptors (NCRs) and stimulated by parvovirus infection of target cells. BMC Cancer. 13: 367.
6. Bindea, G, Mlecnik, B, Fridman, WH, Galon, J (2011) The prognostic impact of anti-cancer immune response: a novel classification of cancer patients. Semin Immunopathol. 33: 335-40.
7. Bittorf, B, Merkel, S, Matzel, KE, Wein, A, Dimmler, A, Hohenberger, W (2004) Primary signet-ring cell carcinoma of the colorectum. Langenbecks Arch Surg. 389: 178-83.
8. Carpelan-Holmstrom, M, Haglund, C, Lundin, J, Jarvinen, H, Roberts, P (1996) Pre-operative serum levels of CA 242 and CEA predict outcome in colorectal cancer. Eur J Cancer. 32A: 1156-61.
9. Cerottini, JP, Caplin, S, Pampallona, S, Givel, JC (1999) Prognostic factors in colorectal cancer. Oncol Rep. 6: 409-14.

10. Chew, A, Salama, P, Robbshaw, A, Klopcic, B, Zeps, N, Platell, C, Lawrance, IC SPARC, FOXP3, CD8 and CD45 correlation with disease recurrence and long-term disease-free survival in colorectal cancer. PLoS One. 6: e22047.
11. Cho, Y, Miyamoto, M, Kato, K, Fukunaga, A, Shichinohe, T, Kawarada, Y, Hida, Y, Oshikiri, T, Kurokawa, T, Suzuoki, M, Nakakubo, Y, Hiraoka, K, Murakami, S, Shinohara, T, Itoh, T, Okushiba, S, Kondo, S, Katoh, H (2003) CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res. 63: 1555-9.
12. Christine, A, lacobuzio-Donahue, D, Elizabeth, M. (2012) Epithelial neoplasms of the colorectum, in Gastrointestinal and Liver Pathology: a volume in the series of foundations in diagnostic pathology, GOLDBLUM, J. R., Editor, Elsevier Saunders.
13. Cianchi, F, Messerini, L, Palomba, A, Boddi, V, Perigli, G, Pucciani, F, Bechi, P, Cortesini, C (1997) Character of the invasive margin in colorectal cancer: does it improve prognostic information of Dukes staging? Dis Colon Rectum. 40: 1170-5; discussion 1175-6.
14. Clemente, CG, Mihm, MC, Jr., Bufalino, R, Zurrida, S, Collini, P, Cascinelli, N (1996) Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. Cancer. 77: 1303-10.
15. Coca, S, Perez-Piqueras, J, Martinez, D, Colmenarejo, A, Saez, MA, Vallejo, C, Martos, JA, Moreno, M (1997) The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. Cancer. 79: 2320-8.
16. Compton, CC, Fielding, LP, Burgart, LJ, Conley, B, Cooper, HS, Hamilton, SR, Hammond, ME, Henson, DE, Hutter, RV, Nagle, RB, Nielsen, ML, Sargent, DJ, Taylor, CR, Welton, M, Willett, C (2000) Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med. 124: 979-94.
17. Coussens, LM, Werb, Z (2002) Inflammation and cancer. Nature. 420: 860-7.
18. Curiel, TJ, Coukos, G, Zou, L, Alvarez, X, Cheng, P, Mottram, P, Evdemon-Hogan, M, Conejo-Garcia, JR, Zhang, L, Burow, M, Zhu, Y, Wei, S, Kryczek, I, Daniel, B, Gordon, A, Myers, L, Lackner, A, Disis, ML, Knutson, KL, Chen, L, Zou, W (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med. 10: 942-9.

19. Deschoolmeester, V, Baay, M, Lardon, F, Pauwels, P, Peeters, M Immune Cells in Colorectal Cancer: Prognostic Relevance and Role of MSI. Cancer Microenviron. 4: 377-92.

20. Diederichsen, AC, Hjelmborg, J, Christensen, PB, Zeuthen, J, Fenger, C (2003) Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. Cancer Immunol Immunother. 52: 423-8.

21. Disis, ML, Bernhard, H, Jaffee, EM (2009) Use of tumour-responsive T cells as cancer treatment. Lancet. 373: 673-83.

22. Dorudi, S, Hanby, AM, Poulsom, R, Northover, J, Hart, IR (1995) Level of expression of E-cadherin mRNA in colorectal cancer correlates with clinical outcome. Br J Cancer. 71: 614-6.

23. Dudouet, B, Jacob, L, Beuzeboc, P, Magdelenat, H, Robine, S, Chapuis, Y, Christoforov, B, Cremer, GA, Pouillard, P, Bonnichon, P, et al. (1990) Presence of villin, a tissue-specific cytoskeletal protein, in sera of patients and an initial clinical evaluation of its value for the diagnosis and follow-up of colorectal cancers. Cancer Res. 50: 438-43.

24. Eche, N, Pichon, MF, Quillien, V, Gory-Delabaere, G, Riedinger, JM, Basuyau, JP, Daver, A, Buecher, B, Conroy, T, Dieu, L, Bidart, JM, Deneux, L (2001) [Standards, options and recommendations for tumor markers in colorectal cancer]. Bull Cancer. 88: 1177-206.

25. El-Bahrawy, MA, Poulsom, R, Jeffery, R, Talbot, I, Alison, MR (2001) The expression of E-cadherin and catenins in sporadic colorectal carcinoma. Hum Pathol. 32: 1216-24.

26. Fearon, ER, Cho, KR, Nigro, JM, Kern, SE, Simons, JW, Ruppert, JM, Hamilton, SR, Preisinger, AC, Thomas, G, Kinzler, KW, et al. (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science. 247: 49-56.

27. Fenoglio-Preiser, CM, Noffsinger, AE, Stemmermann, GN, Lantz, PE, Listrom, MB, Rilke, FO. (1999) Carcinomas and Other Epithelial and Neuroendocrine Tumors of The Large Intestine, in Gastrointestinal Pathology: An Atlas and Text, Lippincott-Raven: Philadelphia. p.: 909-1068.

28. Ferlay, J, Shin, HR, Bray, F, Forman, D, Mathers, C, Parkin, DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 127: 2893-917.
29. Figen, D, Kolorektal karsinomda sınıflama ve prognostik faktörler, in Türk Patoloji Derneği Mezuniyet sonrası Eğitim Toplantısı Gastrointestinal Sistem Patolojisi Günleri. 2005. p. 47- 56.
30. Finn, OJ (2008) Cancer immunology. N Engl J Med. 358: 2704-15.
31. Fu, J, Xu, D, Liu, Z, Shi, M, Zhao, P, Fu, B, Zhang, Z, Yang, H, Zhang, H, Zhou, C, Yao, J, Jin, L, Wang, H, Yang, Y, Fu, YX, Wang, FS (2007) Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. Gastroenterology. 132: 2328-39.
32. Galon, J, Costes, A, Sanchez-Cabo, F, Kirilovsky, A, Mlecnik, B, Lagorce-Pages, C, Tosolini, M, Camus, M, Berger, A, Wind, P, Zinzindohoue, F, Bruneval, P, Cugnenc, PH, Trajanoski, Z, Fridman, WH, Pages, F (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science. 313: 1960-4.
33. Galon, J, Pages, F, Marincola, FM, Thurin, M, Trinchieri, G, Fox, BA, Gajewski, TF, Ascierto, PA (2012) The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. J Transl Med. 10: 1.
34. Garbe, Y, Maletzki, C, Linnebacher, M An MSI tumor specific frameshift mutation in a coding microsatellite of MSH3 encodes for HLA-A0201-restricted CD8+ cytotoxic T cell epitopes. PLoS One. 6: e26517.
35. Gooden, MJ, de Bock, GH, Leffers, N, Daemen, T, Nijman, HW The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. Br J Cancer. 105: 93-103.
36. Gooden, MJ, de Bock, GH, Leffers, N, Daemen, T, Nijman, HW (2011) The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. Br J Cancer. 105: 93-103.
37. Gotzos, V, Wintergerst, ES, Musy, JP, Spichtin, HP, Genton, CY (1999) Selective distribution of calretinin in adenocarcinomas of the human colon and adjacent tissues. Am J Surg Pathol. 23: 701-11.

38. Gülen, D, Duodenal ve intestinal endokrin tümörlerde tanı ve prognostik özellikler in Türk Patoloji Derneği Meslek İçi Eğitim Toplantıları I. Endokrin patolojisi günleri. 2006: İstanbul. p. 60- 65.

39. Haber, MH, Gattuso, P, Spitz, DJ, David, O. (2002) Differential diagnosis in surgical pathology, in Gastrointestinal System: W.B. Saunders Company. p.: 105-202.

40. Hague, A, Moorghen, M, Hicks, D, Chapman, M, Paraskeva, C (1994) BCL-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. Oncogene. 9: 3367-70.

41. Hanahan, D, Weinberg, RA Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 144: 646-74.

42. Hiraoka, K, Miyamoto, M, Cho, Y, Suzuoki, M, Oshikiri, T, Nakakubo, Y, Itoh, T, Ohbuchi, T, Kondo, S, Katoh, H (2006) Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. Br J Cancer. 94: 275-80.

43. Hiraoka, N, Onozato, K, Kosuge, T, Hirohashi, S (2006) Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. Clin Cancer Res. 12: 5423-34.

44. Imamura, H, Sano, K, Harihara, Y, Noie, T, Hasegawa, K, Minagawa, M, Takayama, T, Makuuchi, M (2003) Complete remission of disease for 5 years following initial and repeat resection of the liver for the removal of 22 metastases of colorectal origin. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 10: 321-4.

45. Jass, JR (1986) Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. J Clin Pathol. 39: 585-9.

46. Kerr, SE, Thomas, CB, Thibodeau, SN, Ferber, MJ, Halling, KC (2013) APC germline mutations in individuals being evaluated for familial adenomatous polyposis: a review of the Mayo Clinic experience with 1591 consecutive tests. J Mol Diagn. 15: 31-43.

47. Klintrup, K, Makinen, JM, Kauppila, S, Vare, PO, Melkko, J, Tuominen, H, Tuppurainen, K, Makela, J, Karttunen, TJ, Makinen, MJ (2005) Inflammation and prognosis in colorectal cancer. Eur J Cancer. 41: 2645-54.

48. Koch, M, Beckhove, P, Op den Winkel, J, Autenrieth, D, Wagner, P, Nummer, D, Specht, S, Antolovic, D, Galindo, L, Schmitz-Winnenthal, FH, Schirrmacher,

V, Buchler, MW, Weitz, J (2006) Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ. Ann Surg. 244: 986-92; discussion 992-3.

49. Koebel, CM, Vermi, W, Swann, JB, Zerafa, N, Rodig, SJ, Old, LJ, Smyth, MJ, Schreiber, RD (2007) Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. Nature. 450: 903-7.

50. Kumar, V, Abbas, AK, Fausto, N. (2005) The Gastrointestinal Tract, in Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease, Elsevier Saunders Company: Philadelphia. p.: 857- 869.

51. Laghi, L, Bianchi, P, Miranda, E, Balladore, E, Pacetti, V, Grizzi, F, Allavena, P, Torri, V, Repici, A, Santoro, A, Mantovani, A, Roncalli, M, Malesci, A (2009) CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. Lancet Oncol. 10: 877-84.

52. Lebedeva, IV, Su, ZZ, Emdad, L, Kolomeyer, A, Sarkar, D, Kitada, S, Waxman, S, Reed, JC, Fisher, PB (2007) Targeting inhibition of K-ras enhances Ad.mda-7-induced growth suppression and apoptosis in mutant K-ras colorectal cancer cells. Oncogene. 26: 733-44.

53. Lee, M, Sup Han, W, Kyoung Kim, O, Hee Sung, S, Sun Cho, M, Lee, SN, Koo, H (2006) Prognostic value of p16INK4a and p14ARF gene hypermethylation in human colon cancer. Pathol Res Pract. 202: 415-24.

54. Linnebacher, M, Wienck, A, Boeck, I, Klar, E Identification of an MSI-H tumor-specific cytotoxic T cell epitope generated by the (-1) frame of U79260(FTO). J Biomed Biotechnol. 2010: 841451.

55. Lisa, Y, Pre-cancerous lesions of the colon, problems in the diagnosis of dysplasia., in 21st European Congress of Pathology. 2007: Istanbul. p. 346-348.

56. Louhimo, J, Carpelan-Holmstrom, M, Alfthan, H, Stenman, UH, Jarvinen, HJ, Haglund, C (2002) Serum HCG beta, CA 72-4 and CEA are independent prognostic factors in colorectal cancer. Int J Cancer. 101: 545-8.

57. Matsushita, H, Vesely, MD, Koboldt, DC, Rickert, CG, Uppaluri, R, Magrini, VJ, Arthur, CD, White, JM, Chen, YS, Shea, LK, Hundal, J, Wendl, MC, Demeter, R, Wylie, T, Allison, JP, Smyth, MJ, Old, LJ, Mardis, ER, Schreiber,

RD Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. Nature. 482: 400-4.

58. Melichar, B, Touskova, M, Vesely, P (2002) Effect of irinotecan on the phenotype of peripheral blood leukocyte populations in patients with metastatic colorectal cancer. Hepatogastroenterology. 49: 967-70.

59. Menon, AG, Janssen-van Rhijn, CM, Morreau, H, Putter, H, Tollenaar, RA, van de Velde, CJ, Fleuren, GJ, Kuppen, PJ (2004) Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. Lab Invest. 84: 493-501.

60. Mills, SE, Carter, D, Reuter, V, Greenson, JK, Stoler, MH, Oberman, HA, Intestinal neoplasms, in Stenberg's Diagnostic Surgical Pathology. 2004: Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 1543- 1601.

61. Mills, SE, Carter, D, Reuter, V, Greenson, JK, Stoler, MH, Oberman, HA. (2004) Intestinal neoplasms, in Stenberg's Diagnostic Surgical Pathology, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p.: 1543- 1601.

62. Mittag, A, Lenz, D, Gerstner, AO, Sack, U, Steinbrecher, M, Koksch, M, Raffael, A, Bocsi, J, Tarnok, A (2005) Polychromatic (eight-color) slide-based cytometry for the phenotyping of leukocyte, NK, and NKT subsets. Cytometry A. 65: 103-15.

63. Mlecnik, B, Bindea, G, Pages, F, Galon, J (2011) Tumor immunosurveillance in human cancers. Cancer Metastasis Rev. 30: 5-12.

64. Mlecnik, B, Tosolini, M, Kirilovsky, A, Berger, A, Bindea, G, Meatchi, T, Bruneval, P, Trajanoski, Z, Fridman, WH, Pages, F, Galon, J (2011) Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. J Clin Oncol. 29: 610-8.

65. Naito, Y, Saito, K, Shiiba, K, Ohuchi, A, Saigenji, K, Nagura, H, Ohtani, H (1998) CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. Cancer Res. 58: 3491-4.

66. Nosho, K, Baba, Y, Tanaka, N, Shima, K, Hayashi, M, Meyerhardt, JA, Giovannucci, E, Dranoff, G, Fuchs, CS, Ogino, S Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. J Pathol. 222: 350-66.

67. Nosho, K, Baba, Y, Tanaka, N, Shima, K, Hayashi, M, Meyerhardt, JA, Giovannucci, E, Dranoff, G, Fuchs, CS, Ogino, S (2010) Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. J Pathol. 222: 350-66.

68. O'Brien, MJ, Winawer, SJ, Zauber, AG, Gottlieb, LS, Sternberg, SS, Diaz, B, Dickersin, GR, Ewing, S, Geller, S, Kasimian, D, et al. (1990) The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. Gastroenterology. 98: 371-9.

69. Ooi, BS, Ho, YH, Eu, KW, Seow Choen, F (2001) Primary colorectal signet-ring cell carcinoma in Singapore. ANZ J Surg. 71: 703-706.

70. Pages, F, Berger, A, Camus, M, Sanchez-Cabo, F, Costes, A, Molidor, R, Mlecnik, B, Kirilovsky, A, Nilsson, M, Damotte, D, Meatchi, T, Bruneval, P, Cugnenc, PH, Trajanoski, Z, Fridman, WH, Galon, J (2005) Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. N Engl J Med. 353: 2654-66.

71. Pages, F, Galon, J, Dieu-Nosjean, MC, Tartour, E, Sautes-Fridman, C, Fridman, WH (2010) Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. Oncogene. 29: 1093-102.

72. Pages, F, Kirilovsky, A, Mlecnik, B, Asslaber, M, Tosolini, M, Bindea, G, Lagorce, C, Wind, P, Marliot, F, Bruneval, P, Zatloukal, K, Trajanoski, Z, Berger, A, Fridman, WH, Galon, J (2009) In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. J Clin Oncol. 27: 5944-51.

73. Ravetch, JV, Perussia, B (1989) Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. J Exp Med. 170: 481-97.

74. Rich, RR. (2008) The human immune response, in Clinical Immunology, Principles and Practice, RICH, R. R., FLEISHER, T. A., SHEARER, W. T., SCHROEDER, H. W., FREW, A. J., WEYAND, C. M., Editors, Mosby Elsevier: ABD. p.: 3-17.

75. Richards, CH, Leitch, EF, Horgan, PG, Anderson, JH, McKee, RF, McMillan, DC (2010) The relationship between patient physiology, the systemic

inflammatory response and survival in patients undergoing curative resection of colorectal cancer. Br J Cancer. 103: 1356-61.

76. Richards, CH, Roxburgh, CS, Powell, AG, Foulis, AK, Horgan, PG, McMillan, DC (2013) The clinical utility of the local inflammatory response in colorectal cancer. Eur J Cancer. 50: 309-19.

77. Ripberger, E, Linnebacher, M, Schwitalle, Y, Gebert, J, von Knebel Doeberitz, M (2003) Identification of an HLA-A0201-restricted CTL epitope generated by a tumor-specific frameshift mutation in a coding microsatellite of the OGT gene. J Clin Immunol. 23: 415-23.

78. Roithmaier, S, Haydon, AM, Loi, S, Esmore, D, Griffiths, A, Bergin, P, Williams, TJ, Schwarz, MA (2007) Incidence of malignancies in heart and/or lung transplant recipients: a single-institution experience. J Heart Lung Transplant. 26: 845-9.

79. Ropponen, KM, Eskelinen, MJ, Lipponen, PK, Alhava, E, Kosma, VM (1997) Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. J Pathol. 182: 318-24.

80. Rosai, J. (2004) Gastrointestinal tract, in Rosai and Ackerman’s Surgical Pathology. p.: 776-855.

81. Roxburgh, CS, McMillan, DC (2012) The role of the in situ local inflammatory response in predicting recurrence and survival in patients with primary operable colorectal cancer. Cancer Treat Rev. 38: 451-66.

82. Salama, P, Phillips, M, Grieu, F, Morris, M, Zeps, N, Joseph, D, Platell, C, Iacopetta, B (2009) Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. J Clin Oncol. 27: 186-92.

83. Sangfelt, O, Erickson, S, Castro, J, Heiden, T, Gustafsson, A, Einhorn, S, Grander, D (1999) Molecular mechanisms underlying interferon-alpha-induced G0/G1 arrest: CKI-mediated regulation of G1 Cdk-complexes and activation of pocket proteins. Oncogene. 18: 2798-810.

84. Sasaki, S, Masaki, T, Umetani, N, Futakawa, N, Ando, H, Muto, T (1998) Characteristics in primary signet-ring cell carcinoma of the colorectum, from clinicopathological observations. Jpn J Clin Oncol. 28: 202-206.

85. Schreiber, RD, Old, LJ, Smyth, MJ Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science. 331: 1565-70.

86. Schwitalle, Y, Linnebacher, M, Ripberger, E, Gebert, J, von Knebel Doeberitz, M (2004) Immunogenic peptides generated by frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. Cancer Immun. 4: 14.

87. Sconocchia, G, Zlobec, I, Lugli, A, Calabrese, D, Iezzi, G, Karamitopoulou, E, Patsouris, ES, Peros, G, Horcic, M, Tornillo, L, Zuber, M, Droeser, R, Muraro, MG, Mengus, C, Oertli, D, Ferrone, S, Terracciano, L, Spagnoli, GC (2011) Tumor infiltration by FcgammaRIII (CD16)+ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma. Int J Cancer. 128: 2663-72.

88. Shia, J, Guillem, JG, Moore, HG, Tickoo, SK, Qin, J, Ruo, L, Suriawinata, A, Paty, PB, Minsky, BD, Weiser, MR, Temple, LK, Wong, WD, Klimstra, DS (2004) Patterns of morphologic alteration in residual rectal carcinoma following preoperative chemoradiation and their association with long-term outcome. Am J Surg Pathol. 28: 215-23.

89. Silverberg, SG, De Lellis, RA, Frable, WJ, Li, VA, Wick, MR. (2006) Neoplastic diseases of the small and large intestines, in Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology, Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia. p.: 1419- 1464.

90. Strohle, A, Maike, W, Hahn, A (2007) [Nutrition and colorectal cancer]. Med Monatsschr Pharm. 30: 25-32.

91. Svennevig, JL, Lunde, OC, Holter, J, Bjorgsvik, D (1984) Lymphoid infiltration and prognosis in colorectal carcinoma. Br J Cancer. 49: 375-7.

92. Svensson, H, Olofsson, V, Lundin, S, Yakkala, C, Bjorck, S, Borjesson, L, Gustavsson, B, Quiding-Jarbrink, M Accumulation of CCR4(+)CTLA-4 FOXP3(+)CD25(hi) regulatory T cells in colon adenocarcinomas correlate to reduced activation of conventional T cells. PLoS One. 7: e30695.

93. Swann, JB, Smyth, MJ (2007) Immune surveillance of tumors. J Clin Invest. 117: 1137-46.

94. Szabo, SJ, Sullivan, BM, Peng, SL, Glimcher, LH (2003) Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. Annu Rev Immunol. 21: 713-58.

95. T.C. Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu. 1995, T.C. Sağlık Bakanlığı: Ankara.

96. Tada, T, Watanabe, T, Kazama, S, Kanazawa, T, Hata, K, Komuro, Y, Nagawa, H (2003) Reduced p16 expression correlates with lymphatic invasion in colorectal cancers. Hepatogastroenterology. 50: 1756-60.

97. Thomas, ER, Ira, JK (1999) Colorectal cancer: Risk factors and recommendations for early detection. American Family Physician, 1-12.

98. Thomas, K, Molecular pathology and morphogenesis of colorectal cancer, in Türk Patoloji Derneği Mezuniyet Sonrası Eğitim Toplantısı Gastrointestinal Sistem Patolojisi Günleri. 2005: İstanbul. p. 38- 46.

99. Tong, LL, Gao, P, Wang, ZN, Song, YX, Xu, YY, Sun, Z, Xing, CZ, Xu, HM (2012) Is the seventh edition of the UICC/AJCC TNM staging system reasonable for patients with tumor deposits in colorectal cancer? Ann Surg. 255: 208-13.

100. Tosolini, M, Kirilovsky, A, Mlecnik, B, Fredriksen, T, Mauger, S, Bindea, G, Berger, A, Bruneval, P, Fridman, WH, Pages, F, Galon, J Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. Cancer Res. 71: 1263-71.

101. Türk İmmünoloji Derneği. (2010) Akan Hücre Ölçer Alt Grubu Kılavuz Bilgiler-1, Lenfosit İmmün Fenotiplendirmesi için Kılavuz Bilgiler. p.: 1-18.

102. Vesely, P, Touskova, M, Melichar, B (2005) Phenotype of peripheral blood leukocytes and survival of patients with metastatic colorectal cancer. Int J Biol Markers. 20: 126-33.

103. Vogel, C, Kirtil, T, Oellig, F, Stolte, M (2008) Lymph node preparation in resected colorectal carcinoma specimens employing the acetone clearing method. Pathol Res Pract. 204: 11-5.

104. Watanabe, H, Tokuyama, H, Ohta, H, Satomura, Y, Okai, T, Ooi, A, Mai, M, Sawabu, N (1990) Expression of placental alkaline phosphatase in gastric and colorectal cancers. An immunohistochemical study using the prepared monoclonal antibody. Cancer. 66: 2575-82.

105. Watson, NF, Madjd, Z, Scrimegour, D, Spendlove, I, Ellis, IO, Scholefield, JH, Durrant, LG (2005) Evidence that the p53 negative / Bcl-2 positive phenotype is an independent indicator of good prognosis in colorectal cancer: a tissue microarray study of 460 patients. World J Surg Oncol. 3: 47.

106. Wiencke, JK, Zheng, S, Lafuente, A, Lafuente, MJ, Grudzen, C, Wrensch, MR, Miike, R, Ballesta, A, Trias, M (1999) Aberrant methylation of p16INK4a in anatomic and gender-specific subtypes of sporadic colorectal cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 8: 501-6.

107. Wistuba, II, Behrens, C, Albores-Saavedra, J, Delgado, R, Lopez, F, Gazdar, AF (2003) Distinct K-ras mutation pattern characterizes signet ring cell colorectal carcinoma. Clin Cancer Res. 9: 3615-9.

108. WMA, Declaration Of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, in 59th WMA General Assembly, ASSOCIATION, W. M., Editor. October 2008: Seoul.

109. Zhang, GQ, Zhao, H, Wen, XY, Li, JY, Wu, LL, Jiao, SC (2013) [Changes of lymphocyte subsets before and after chemotherapy in colorectal carcinoma patients]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 35: 155-60.

110. Zhang, K, Lu, Q, Zhang, Q, Hu, X (2004) Regulation of activities of NK cells and CD4 expression in T cells by human HNP-1, -2, and -3. Biochem Biophys Res Commun. 323: 437-44.

T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Orhan Yavuz DEMİRCİ'ye ait "**KOLOREKTAL ADENOKARSİNOMLARDA T LENFOSİT, B LENFOSİT VE NK HÜCRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**" başlıklı tez çalışması jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 24/04/2014

Başkan PROF.DR. ERDOĞAN SÖZÜER İmza

Üye PROF.DR. ENGİN OK İmza

Üye DOÇ.DR. HAZİR AKYILDIZ İmza

Üye ..... İmza

Üye ..... İmza