

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**KOLOREKTAL KANSERLERDE POSTOPERATİF İZLEMDE
NÜKS/METASTAZ GELİŞİMİNE ETKİYEN CERRAHİ,
HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOGENETİK (KILLER
İMMÜNOGLOBULİN LIKE RESEPTÖR VE LİGAND
TİPLENDİRİLMESİ) ÖZELLİKLERİN TANIMLANMASI**

Dr. Kemal BEKSAÇ

**UZMANLIK TEZİ
OLARAK HAZIRLANMIŞTIR**

ANKARA

2014

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**KOLOREKTAL KANSERLERDE POSTOPERATİF İZLEMDE
NÜKS/METASTAZ GELİŞİMİNE ETKİYEN CERRAHİ,
HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOGENETİK (KILLER
İMMÜNOGLOBULİN LIKE RESEPTÖR VE LİGAND
TİPLENDİRİLMESİ) ÖZELLİKLERİN TANIMLANMASI**

Dr. Kemal BEKSAÇ

**UZMANLIK TEZİ
OLARAK HAZIRLANMIŞTIR**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. M. Bülent TIRNAKSIZ**

ANKARA

2014

TEŞEKKÜR

Uygun dokuların seçiminde ve temininde yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Aytekin Akyol'a,

Ankara Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'nda dokulardan DNA elde edilmesi, KIR ve KIR ligandlarının tayininde yardımcı olan Prof. Dr. Meral Beksaç ve ekibindeki Yrd. Doç. Dr. Klara Dalva, Biyologlar Rıdvan Anlıaçık ve Ezgi Çakmak Anlıaçık'a,

İstatistikleri gerçekleştiren Prof. Dr. Ergun Karaağaoğlu'na
teşekkürleri borç bilirim.

ÖZET

Beksaç, K., Kolorektal kanserlerde postoperatif izlemde nüks/metastaz gelişimine etkiyen cerrahi, histopatolojik ve immünogenetik (Killer İmmünoglobulin Like Reseptör ve ligand tiplendirilmesi) özelliklerin tanımlanması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2013. Antitümöral immün yanıtı belirleyen Killer Immunoglobulin Like Receptor (KIR) genleri ile onların ligandları olan HLA Class I moleküllerini incelemek amacıyla 2005-2008 yılları arasında kolorektal tümör tanısı ile kolon rezeksiyonu uygulanan 87 olgu araştırmaya alındı. Ortanca 5 yıl takip süresinde rekürrens gösteren 29 olgu ile nüks etmeyen 58 olgunun klinik ve KIR-ligand özellikleri karşılaştırıldı. Yaş, cinsiyet, klinik evre, tümör lokalizasyonu, adjuvan tedavi ve rekürrens lokalizasyonu açısından gruplar arasında bir fark olmadığı gözlemlendi. Rekürrens göstermeyen olgularda inhibitör KIR'lerden 2DL1 anlamlı olarak azalırken aktivatör özelliğe sahip 2DS2 ve 2DS3'ün anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. Böylece inhibisyonun azalması ve aktivasyonun güçlenmesi ile antitümöral immün yanıtın arttığı düşünüldü. KIR ligandları incelendiğinde rekürrens göstermeyenlerde A-Bw4 ligandın daha nadir olduğu saptandı. KIR ve KIR ligand birlikteliğine bakıldığında rekürrens göstermeyenlerde ortak liganda(grup C1) sahip 2DL2 (inhibitör) ve 2DS2'nin (aktivatör) sıklıkla birlikte bulunduğu saptandı. Rekürrens göstermeyen olgularda inhibitör yöndeki 2DL1-C2 ve 2DL3-C1'in beraber görülme sıklığında azalma gözlenirken aktivasyon yönündeki 2DS2-C1 ve inhibitör yöndeki 2DL2-C1 beraber görülme sıklığında artış saptandı. Rekürrensin erken veya geç gelişmesini etkileyecek bir bulgu saptanmadı. 2DS2 her ne kadar rekürrens gösteren hastalarda daha az görülse de, 2DS2'ye rağmen rekürrens geliştiği takdirde uzak metastazın lokal rekürrensten daha sık olduğu saptandı. Bulgularımız, literatürde ilk kez kolorektal kanserlerde rekürrensin uygun ligandlarının varlığında aktive edici KIR'ların varlığı ve baskılayıcı KIR'ların azalması ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolon Kanseri, Rektum Kanseri, Tümör İmmünolojisi, Killer İmmünoglobulin Like Reseptör, NK Hücreleri

ABSTRACT

Beksaç, K., Surgical, Histopathologic and Immungenetic (Killer Immunoglobulin Like Receptor and Ligand Typing) Properties of Colorectal Cancers Which Affect Recurrence and Metastasis in Postoperative Period. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in General Surgery, Ankara, 2013. To analyze the frequency of Killer Immunoglobulin Like Receptor (KIR) gene and their ligands (HLA Class I), 87 patients diagnosed with colorectal cancer and operated between 2005 and 2008 were enrolled into this study. 29 patients progressing within a median of five year follow-up period were compared with 58 cases that did not. Age, gender, clinical stage, tumor location, adjuvant therapy and recurrence location were similar between the groups. Among the cases without recurrence 2DL1, which is an inhibitory KIR, is observed significantly less frequent while activatory KIRs, 2DS2 and 2DS3, significantly more frequent. Therefore, a decrease in inhibition and an increase in activation, may lead to an antitumor immune response. Among the KIR ligands only A-Bw4 is observed significantly less frequently among non-recurrent patients. When KIR and KIR ligand association is examined, two KIR's who share the same ligand (group C1), 2DL2 (inhibitor) and 2DS2 (activator), frequently coexisted. Similarly inhibitory KIR-ligand combinations 2DL1-C2 and 2DL3-C1 are seen less frequently in the non-recurrent group while the activatory combination 2DS2-C1 and inhibitory combination 2DL2-C1 are shown to be more frequent in the non-recurrent group. Even though 2DS2 is seen less frequently in recurrent group, if recurrence occurs despite 2DS2, distant metastasis is more frequent than local recurrence. Our findings show for the first time in literature that in colorectal cancers, recurrence is association with the presence of activating KIR's and absence of inhibitory KIR's in the setting of their appropriate ligands.

Keywords: Colon Cancer, Rectum Cancer, Tumor Immunology, Killer Immunoglobulin Like Receptor, NK Cells

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
TABLolar	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	1
1.2. Hipotez	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kolorektal Kanserler	2
2.1.1. Epidemiyolojisi, Prognoz ve Sınıflandırma	2
2.1.2. Cerrahi Tedavi, Kür ve Nüks/Metastaz	3
2.2. Antitümöral İmmün Yanıt	4
2.2.1. T Lenfosit Aracılı Antitümöral Yanıt	4
2.2.2. Kolorektal Kanserde Tümör İmmünolojisi	6
2.2.3. Doğal İmmünite, Killer İmmünoglobulin Like Reseptörler ve NK Hücre Aracılı Antitümöral Yanıt	7
3. HASTALAR VE OLGULAR	18
3.1. Yöntem	18
3.1.1. Olgular	18
3.1.2. Patolojik Dokuların Elde Edilmesi	19
3.1.3. DNA İzolasyonu	19
3.1.4. Killer İmmünoglobulin Like Reseptör Genotipleme	19
3.1.5. Killer İmmünoglobulin Like Reseptör Ligand Genotipleme	20
3.2. İstatistiksel Değerlendirme	23
4. BULGULAR	24
5. TARTIŞMA	33

6. SONUÇLAR**37****KAYNAKLAR****38**

SİMGELER VE KISALTMALAR

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CD	Cluster of differentiation
CIN	Servikal intraepitelyel neoplazi
DH	Dendritik Hücreler
DNA	Deoxyribonucleic acid
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPV	İnsan Papilloma Virüs
HÜTF	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
KIR	Killer İmmünoglobulin Like Receptor
MHC	Major Histocompatibility Complex
MICA	MHC Class I-related Chain A
MR	Manyetik Rezonans
NK	Natural Killer
PCR	Polimerase Chain Reaction
siRNA	Small interfering RNA
TH	T Helper
UICC	Union for International Cancer Control

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. İmmün sistem hücreleri ile tümör mikroçevresi arası etkileşim.	6
2.2. Sitokinler aracılığı ile gelişen tümör gelişimini kolaylaştıran ve engelleyen doğal ve kazanılmış immünite	6
2.3. KIR geninin haplotipik dağılımı: üst sıra Haplotip A (neredeyse tamamen inhibitör KIR geni içeren haplotip), alt sıra Haplotip B (daha çok aktivatör gen içeren haplotip).	10
2.4. İnhibitör Killer İmmünoglobulin Benzeri Reseptör ve ligandları.	10
2.5. Aktivatör Killer İmmünoglobulin Benzeri Reseptörler ve ligandları.	11
2.6. NK hücrelerin sitotoksik aktivitesinin nasıl değişmiş kendi hücreleri ile sınırlandırıldığını gösteren model. a) HLA ifadesi taşıyan hücreler, NK hücrelerde inhibitör reseptör varlığında sitotoksik immün yanıtı engeller. Aktivatör reseptörlerin etkisi inhibitör reseptörlerin etkisine göre daha zayıf olduğu için etkisizdir. b) Virusla enfekte hücrelerde HLA ifadesinin azalması sonucunda inhibitör reseptörlerin ligandı eksildiği için aktivatör reseptörlerin etkisi hücre ölümü ile sonuçlanır.	13
4.1. Grup 1 için rekürrens zamanı.	24
4.2. Grup 2 için takip zamanı dağılımı.	25
4.3. Grup 1’de rekürrens/metastaz gelişme zamanı.	25

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. İnsan NK hücre reseptör ve ligand spesifisitesi.	14
3.1. PCR-SSO ile amplifiye edilen KIR genlerinin bant genişliği.	20
3.2. PCR-SSO ile elde edilen ampikon ve karşı geldiği KIR ligandı olan aleller.	21
4.1. Olguların klinik özellikleri.	26
4.2. Olguların klinik evreleri.	26
4.3. Olgulardaki tümör lokalizasyonu.	26
4.4. KIR gentotiplerinin hasta gruplarına göre dağılımı.	27
4.5. KIR ligand gruplarının hasta gruplarına göre dağılımı.	27
4.6. Hasta gruplarında KIR ligand grubu ile KIR genotip birlikteliğinin karşılaştırılması.	28
4.7. Hasta gruplarında KIR ve KIR ligand birlikteliğinin karşılaştırılması.	28
4.8. C1 ligandını gören inhibitör ve aktivatör KIR'ların hasta gruplarına göre birlikte değerlendirilmesi.	29
4.9. C1 (+) olgularda 2DL2 ve 2 DS2'nin karşılaştırılması.	29
4.10. C2 ligandını gören inhibitör ve aktivatör KIR'ların hasta gruplarına göre birlikte değerlendirilmesi.	30
4.11. Bw4 ligandını gören inhibitör ve aktivatör KIR'ların hasta gruplarına göre birlikte değerlendirilmesi.	30
4.12. KIR ligand gruplarından C1 ve C2'nin homozigot veya heterozigotluğunun hasta gruplarında karşılaştırılması.	30
4.13. KIR ligandı olan Bw4'ün alt tiplerinin hasta gruplarında karşılaştırılması.	31
4.14. Aynı bireyde C1 ve C2 ligandlarına bağlanan inhibitör KIR'ların hasta gruplarına göre birlikte değerlendirilmesi.	31
4.15. Rekürrens gelişen hastalarda diğerlerine göre istatistiksel olarak anlamlılık gösteren parametrelerin nüks gelişme zamanına etkisi.	32
4.16. İstatistiksel olarak anlamlı olan parametrelerin lokal anastomoz hattında rekürrens ve uzak metastaz arası fark yönünden araştırılması sonuçları.	32

1. GİRİŞ

1.1. Amaç

Kolorektal kanser en sık görülen ve en çok ölüme sebep olan üçüncü kanserdir. Erken tanı ve tedavi ile kür mümkündür. Hastalık uzak organ metastazı ile seyretse bile uygun cerrahi tedavi ile kür yine de mümkündür. Ancak lokal rekürrens olduğu zaman uygun cerrahi tedaviyi gerçekleştirmek güçleşmektedir. Bu sebeple hastalığın izleminde rekürrens ve metastaza erken tanı koymak çok önemlidir. İnsan vücudunun tümöre karşı mücadelesinde immün sisteminin rolü önemlidir. Tümör biyolojisi aydınlanmaya başladıkça kanser tedavisinde immünmodulator tedavi yaklaşımları gündeme gelmektedir. Tümöre karşı immün yanıtta hem hücresel hem de doğal immün sistem rol oynamaktadır. Doğal immün yanıt Natural Killer (NK) hücreleri aracılığı ile ortaya çıkar. NK hücreleri, bu etkilerini üzerlerinde bulunan **Killer Immunoglobulin-like Reseptörler (KIR)** ve ilgili ligandları olan HLA Class I molekülleri üzerinden göstermektedirler. KIR reseptörleri aktivatör veya inhibitör yönde etki gösterebilmektedirler. Aktivatör KIR varlığı durumunda tümöre karşı kuvvetli bir immün yanıt, inhibitör KIR varlığı durumunda ise immün yanıtın zayıf olması beklenir.

Bu araştırmanın amacı kolorektal kanser nedeniyle ameliyat olan olguların dokularından DNA elde ederek NK hücrelerinin üzerindeki KIR reseptörlerinin ve ilgili HLA ligandlarının tiplendirilmesi ve aralarındaki ilişkinin araştırılmasıdır. Bu sayede kolorektal kanserlerin rekürrensine sebep olan nedenler aydınlatılarak daha iyi bir postoperatif izlem ve olası rekürrens/metastaz durumlarının önceden tahmini hedeflenmektedir.

1.2. Hipotez

Hipotezimiz inhibitör KIR'lara sahip bireylerde rekürrensin daha sık görüleceği, aktivatör KIR'lara sahip bireylerde de rekürrensin daha az görüleceğidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanserler

2.1.1. Epidemiyolojisi, Prognoz ve Sınıflandırma

Kolorektal adenokanserler erkeklerde ve kadınlarda en sık görülen ve en çok ölüme sebep olan üçüncü kanserlerdir. Genel popülasyonda bir insanın ömrü boyunca kolorektal kansere yakalanma olasılığı erkeklerde %5,1; kadınlarda %4,7'dir (1). Kanser gelişme riski yaşla beraber artar ve aile öyküsü olanlarda daha fazladır (2). Son 30 yılda 5 yıllık sağ kalımda belirgin artış görülmüştür.

Kolorektal kanserler herediter, sporadik veya ailesel formlarda görülebilir. Herediter formu aile öyküsü ve erken yaşta başlangıç ve başka spesifik tümörlerin birlikteliği ile karakterizedir (3). Sporadik kolorektal kanserler genellikle 6. dekattan sonra görülür ve kolonda izole lezyon şeklinde kendini gösterir. Kolorektal kanserlerin en sık görülen formu sporadik formudur. Herediter ve sporadik formu benzer patogenezi ile gelişim gösterir (4).

Adenokarsinom patogenezi kolonun tamamı boyunca aynı olsa da, rektum tanı ve tedavi modalitelerinin farklı olması sebebiyle kolonun geri kalan kısmından ayrılır. Rektum kemik pelvis tarafından sınırlandırılır. Rektumun anüse yakınlığı ultrasonografik değerlendirme imkanı verir ve duvar tutulum miktarını ve lenf nodu tutulumunu değerlendirmeye imkanı tanır. Ayrıca rektumun immobil olması Magnetik Rezonans (MR) görüntülemenin duyarlılığını artırır. Rektumun anal sfinktere, mesaneye, otonomik sinirlere yakınlığı da cerrahi tedavisini değiştirir.

Kolorektal kanserlerde tedavi prensipleri uygun cerrahi sınırlarla tümörün çıkartılması, bölgesel lenfadenektomi yapılması, gastrointestinal traktın devamlılığının sağlanmasıdır. Rezeksiyon genişliği tümörün lokalizasyonu, kan ve lenfatik dolaşımı, komşu organ invazyonunun olup olmadığına bağlıdır.

Kolorektal kanserlerin evrelendirilmesinde en sık kullanılan sınıflandırma American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından geliştirilen ve International Union Against Cancer (UICC) tarafından da onaylanan TNM sınıflandırılmasıdır. Bu sınıflandırmada preoperatif klinik bilgi, ameliyat sırasında ve ameliyat sonrası patolojik inceleme de elde edilen bilgi ile birleştirilir. İlk 1987'de geliştirilen bu

sınıflandırma yıllar içinde modifiye edilmiştir ve en son 2010 yılında çıkan yedinci versiyonu kullanılmaktadır.

Klinik evreleme (cTNM) hastanın hikayesine, fizik muayene bulgularına, endoskopi ve radyolojik görüntüleme sonucuna göre yapılır ve preoperatif adjuvan tedaviyi belirler. Patolojik evreleme (pTNM) rezeksiyon sonucu spesimenin patolojik incelemesine göre yapılır. Prognozunu gösterir ve adjuvan tedaviyi belirler. Neoadjuvan kemoradyoterapi alınan hastaların modifiye patolojik evresi vardır (ypTNM). Bazal membran ve lamina propria sınırlı kanser hücrelerinin metastaz riski olmadığı kabul edilir ve karsinoma in situ olarak kabul edilir (pTis).

Uygun rezeksiyon uygulanan evre I hastaların 5 yıllık sağkalım oranı %93,2'dir. Bu oran evre IIa'da %84,7; IIb'de %72,2; evre IIIa'da %83,4; IIIb'de %44,3'tür. Evre IIIc ve IV hastaların prognozu kötüdür ve 5 yıllık sağ kalım oranı %8,1'dir (5).

2.1.2. Cerrahi Tedavi, Kür ve Nüks/Metastaz

Hastanın genel sağlık durumu bir engel teşkil etmediği sürece ve yaygın tümör disseminasyonu olmadığı sürece bütün kolorektal kanserler ameliyat gerektirir. Ayrıca kanser riski taşıyan bütün prekürsör patolojiler de eğer cerrahi olmadan tedavi edilemiyorsa ameliyat endikasyonudur. Cerrahi tedavinin temel hedefi tümörden kür sağlamak, hastalıksız hayatta kalımı uzatmaktır.

Çıkarılacak kolon segmentinin uzunluğu ilgili segmentin arteriyel dolaşımına ve buna paralel olan lenfatik drenajına bağlıdır. Anastomoz hattında rekürrensi minimuma indirmek için primer tümörün iki tarafında da 5-10 cm mesafe bırakmak gerekir (6). Bu mesafe yapılan lenfadenektomi mesafesine göre değişir. Malabsorpsiyon sendromunu önlemek için az miktarda ileum da rezeke edilmelidir (7).

Rektum kanserlerinde çıkarılacak barsak segmentini etkileyen faktör ise uygun vasküler ligasyon ve mesenterik rezeksiyon sonrası geride kalan kan akımıdır. Primer tümörün proksimalinde 5 cm, distalinde 2 cm bıraktıktan sonra daha fazla rezeksiyon yapmanın faydası gösterilememiştir. Buradaki temel prensip temiz cerrahi sınırlar elde etmek ve R0 rezeksiyon yapabilmektir (8).

Yine de bütün modern tedavi seçeneklerine rağmen lokal rekürrens önemli bir sorundur ve bu oran yaklaşık %30'tur (9, 10). Bu hastaların da yalnızca yaklaşık

%20'si küratif rezeksiyon için uygundur (11). Lokal rekürens gelişen olguların büyük  o unlu unda rekürens ilk 3 yıl içinde gerçekleşmektedir (12). Lokal rekürens gelişen ve küratif cerrahi uygulanabilen olgularda 5 yıllık sağkalım yaklaşık %60'tır ve bazı serilerde %80'e kadar yükselebilmektedir (13-15).

Lokal rekürens gösteren olgularda tedavisiz ortalama hayatta kalma yaklaşık 8 aydır. Sadece kemoterapi ve radyoterapi verilen hastalarda 5 yıllık sağkalım %5'in altındadır (16). Bu sebepten dolayı reküren kolon kanserlerinde k r için en iyi seçenek cerrahidir. Onkolojik prensipler gereği tedavinin hedefi R0 rezeksiyon sağlamaktır. Ancak reküren kolon kanserlerinde R1 ve R2 rezeksiyon oranları %60'lara kadar varmaktadır. R1 ve R2 rezeksiyon yapılan hastalarda 5 yıllık sağkalımın daha düşük olduğu gösterilmiştir (17, 18).

Uzak metastaz ise daha büyük bir sorun teşkil etmektedir. Yeni tanı alan kolorektal kanserlerin yaklaşık %25'inde senkron karaciğer metastazı vardır (19). Son yıllarda kolorektal karaciğer metastazlarının tedavisinin başarı oranlarında ciddi bir artış söz konusudur. 5 yıllık sağkalım oranlarının %30'lardan %60'lara çıktığı gözlenmiştir (20). Bu grupta en iyi sonuç soliter karaciğer metastazlarıdır ve 5 yıllık sağ kalım oranları yaklaşık %70'tir (21). Modern kemoterapiye daha iyi yanıt alınmaya ba lanması ve cerrahi alanındaki gelişmelerle birleşince karaciğer rezeksiyonları tecrübeli merkezlerde güvenilir bir prosedür haline gelmiştir. Ameliyat edilebilir olgularda tedavinin en önemli basamağı cerrahidir.

2.2. Antitümöral İmmün Yanıt

2.2.1. T Lenfosit Aracılı Antitümöral Yanıt

Anti tümöral immün yanıtın oluşmasında rol oynayan hücresel immünite ve doğal immünite birbirini tamamlayıcı unsurlardır. Her ikisinde de İnsan Lökosit Antijenleri (HLA)  nemli rol oynar. HLA kodlayan genler Majör Histokompatibilite Kompleks'sinin (MHC) içerisinde yer alırlar. HLA moleküllerinin görevi patojenlerden elde edilen peptid parçalarını ba layarak (hücre yüzeyinde) T hücrelerinin tanınmasını sağlamaktır. Bunu takip eden olaylar çoğunlukla patojen için ölümcüldür. Virüsle enfekte hücreler  ld r l r, intraselüler veziküllerde yaşayan bakterileri öldürmek için makrofajlar aktive edilir ve ekstraselüler patojenleri ortadan kaldırmak veya nötralize etmek için antikör üreten B hücreleri aktive edilir. Böylece

MHC molekülleri tarafından tanınmayacak şekilde mutasyona uğramış patojenler çoğalma avantajına kavuşurlar. MHC'nin iki farklı özelliği patojenlerin immün yanıtıtan korunmasını zorlaştırır. Birincisi, MHC poligeniktir, kapsamında çok sayıda farklı MHC Class I ve MHC Class II genleri bulunur. Bunun sonucunda her birey çok farklı sayıda peptid bağlama özelliğine sahip MHC moleküllerine sahip olur. İkincisi MHC yüksek derecede polimorfiktir, her genin bir popülasyonda çok sayıda varyantı bulunmaktadır. MHC genleri gerçekte en polimorfik gen yapısıdır(22).

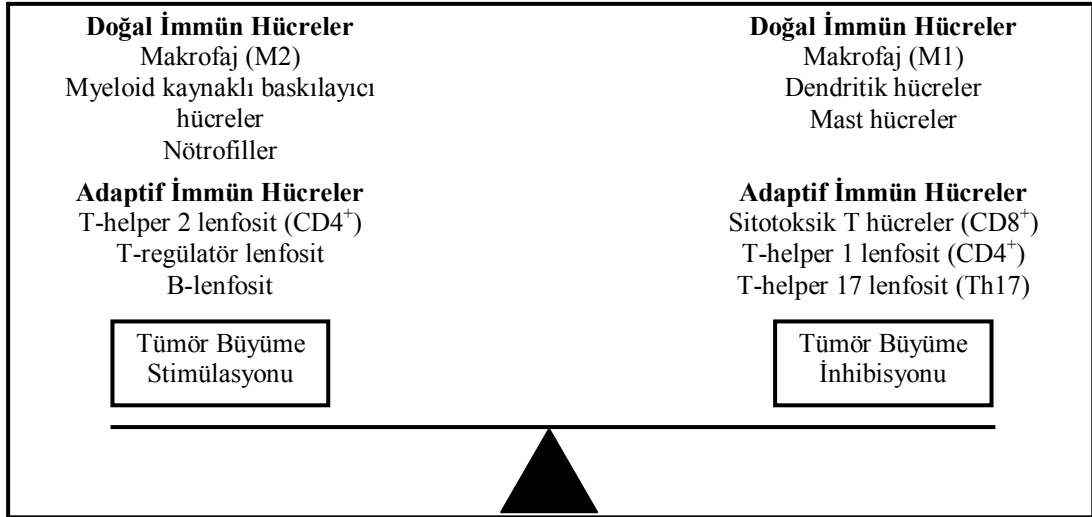
MHC 6. kromozomda yerleşmiş olup 200'den fazla geni bünyesinde barındırır. MHC'nin bünyesinde insan lökosit antijeni (HLA genleri) bulunur. Bunlar içinde en bilinenleri HLA Class I (HLA-A, -B ve -C) ve Class II'dir (HLA-DR, -DP ve -DQ). Bütün Class I ve II MHC molekülleri T hücrelerine peptid sunabilirler. Tüm MHC evrim sırasında antijeni işlemek ve sunmak doğrultusunda seleksiyona uğramıştır. Viral enfeksiyonların erken döneminde doğal immün yanıt sonucunda salgılanan interferonlar hücrelerin viral proteinleri işleyip ortaya çıkan peptidleri hücre yüzeyinde ifadesini arttırır. Bu da adaptif immün yanıtın oluşmasına yol açar. MHC içinde Class III bölgesi de bulunmaktadır. Bunlar arasında kompleman komponentleri ve sitokin (Örneğin: TNF alfa) genleri bulunur.

Bazı MHC genleri (MIC gen ailesi) klasik MHC Class I genlerinden farklı bir kontrol altındadır. Örneğin ısı şoku gibi hücrel stres durumlarında ifadeleri artar ve protein ürünleri oluştururlar. Bunun sonucunda interferonların salgılanmadığı durumlarda doğal immünitenin oluşmasında rol oynarlar. MIC A ve B molekülleri NK hücreleri, Gama-Delta T hücreleri ve bazı CD8 T hücreleri üzerindeki reseptörler tarafından tanınarak MIC ifade edilen hedefler elimine edilir. Bu reseptörlerden biri NKG2D olup NK hücrelerinin aktivatör üyelerindendir. Diğer bir reseptör olan DAP 10 ise hücre membran ileti sisteminde rol oynayarak hücre aktivasyonunu sağlar. MHC genlerinden olan HLA-G NK hücrelerinin membranında bulunan inhibitör reseptör olan ILT-2 tarafından tanınarak NK hücre aracılıklı hücre ölümünü engeller.

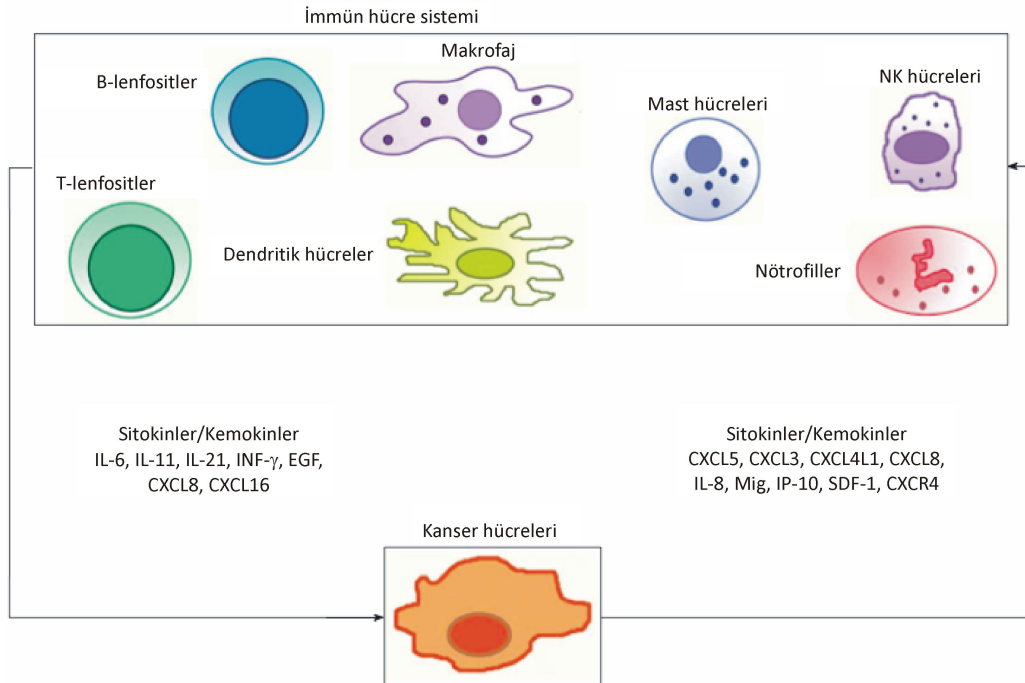
T hücresi tarafından antijenin tanınabilmesi için antijen sunan hücre ile efektör hücre arasında MHC molekül köprüsü şarttır. Bu buluş 1996 Nobel tıp ödülünü getirmiştir. Virüs ile enfekte olan bir hücreyi ancak aynı MHC genlerine sahip olan sitotoksik T lenfosit öldürebilir. Bunun tersi olarak ta hücreler bir araya geldiklerinde MHC'si aynı olan hücreler birbirlerine karşı reaksiyon göstermezler

(self tolerans). MHC farklı olduğu takdirde ise kendinden olmayanı tanıyarak allojenik bir immün yanıt ortaya çıkar (rejeksiyon).

2.2.2. Kolorektal Kanserde Tümör İmmünolojisi



Şekil 2.1. İmmün sistem hücreleri ile tümör mikroçevresi arasındaki etkileşim.



Şekil 2.2. Sitokinler aracılığı ile gelişen tümör gelişimini kolaylaştıran ve engelleyen doğal ve kazanılmış immünite sitokinler aracılığı ile gelişir (23).

Kolorektal kanserlerde immün mekanizmaların rolünü gösteren araştırmaların çoğu tümörü infiltre eden hücrelerin tipleri ve tümör hücre membranında HLA Class I ifade analizlerini kapsamaktadır. Kolorektal adenokarsinomların çoğunluğunda MHC Class I ifadesi zayıftır, bu da onları NK hücre aracılıklı hücre ölümüne duyarlı hale getirir. Genel olarak bu tümörler önemli miktarda inflamatuvar hücre inflamasyonu gösterirler. Bu inflamatuvar hücrelerin çoğunluğu tümör stromasında yer alır ve tümör hücreleri ile direkt temasa sahip değildirler. Sandel (24) 88 kolorektal olgusunda tümör içindeki CD4, CD8 ve CD56 pozitif lenfositleri araştırmışlar ve intraepitelyal CD8 (76 hücre/mm²), CD 4 lenfosit (19 hücre/mm²) ve CD 56 lenfosit (7 hücre/mm²) infiltrasyonu göstermişlerdir. Olguların %72'sinde kısmi veya total HLA Class I ifadesinde kayıp saptanarak bu kaybın CD8 lenfosit infiltrasyonu ile pozitif korelasyon gösterilmiştir. NK hücrelerinin bu infiltrasyonda oldukça zayıf rol oynamasının mekanizması bu araştırmada gösterilememiştir. Oysa başka tümörlerde NK hücreleri tarafından infiltrasyonun olumlu etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmalarda CD57 antikoru kullanılmış olması sonuçların farklılığını açıklayabilir. Yine benzer araştırmalar, kolorektal tümörlerde HLA Class I MHC kaybının yaşam avantajı sağladığını göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar daha önce MHC Class I kaybına sahip primer tümörlü olguların uzak metastaza daha az yol açtıklarını da göstermişlerdir. Bu yazarlar MHC Class I kaybı ile NK hücre aracılıklı immünitinin ortaya çıkışının metastatik hücre yayılımını engellediğini ileri sürmüşlerdir.

Son yıllarda inflamasyonun başta mide, karaciğer ve kolorektal tümörlerin gelişimini başlattığı doğrultusunda çok sayıda kanıt ortaya çıkmıştır. İnflamatuvar barsak hastalıklarının temelinde barsak mikrobiotasının rolü, ardından oluşan inflamatuvar ortamda gelişen genetik ve epigenetik değişikliklerin tümörleşmeyi kolaylaştırdığı bilinmektedir(25).

2.2.3. Doğal İmmünite, Killer İmmünoglobulin Like Reseptörler ve NK Hücre Aracılı Antitümöral Yanıt

İmmün yanıtın oluşmasında önemli rol oynayan doğal öldürücü hücreler (NK) kemik iliği kaynaklı lenfositler olup virüslerle enfekte veya malign transformasyon gösteren hücrelere karşı doğal immün yanıtın oluşmasında rol

oyunlar. Bu etkilerini taşıdıkları KIR'lar ve buna karşılık gelen ligandlar aracılığı ile gerçekleştirirler. Bu etkiler hem baskılayıcı hem de hızlandırıcı yönde gelişebilir.

Hızlandırıcı etkiler vücuttan atılması gereken yabancı veya patolojik hücreler için gerekliyen inhibitör etkiler kendine karşı toleransın oluşması veya otoimmüniteden korunmak için gereklidir. KIR gen ailesi de HLA genleri kadar olmasa da oldukça polimorfik bir yapı taşımaktadırlar. KIR genleri 19. kromozom üzerinde (19q13.4) bulunmaktadır. KIR alellerinin oluşturduğu haplotipler doğadaki mevcut polimorfik özellikte patojen ve antijenlere karşı kazanılmış ve özellikle doğal immün yanıtın düzenlenmesinde önemli rol üstlenirler. NK hücrelerindeki KIR'ların ligandları sitotoksik T lenfositleri üzerindeki HLA Class I molekülleridir. T lenfosit yanıtının oluşmasında TCR ve HLA Class I köprüsünün yanı sıra KIR-HLA Class I bağlantısının da kurulması gereklidir. NK hücrelerinin, üzerinde HLA ligandı taşımayan hedef hücrelerle karşılaşması durumunda inhibitör NK hücrelerin uyarılma eşiği azalır, eğer hedef hücreler hızlandırıcı NK KIR ligandlarına sahipse bu etki daha da belirginleşir ve hücre ölümüne giden olaylar başlatılır. İnsan NK hücreleri yüzeylerindeki CD 56 ifade şiddetine göre iki gruba ayrılmaktadır: CD56 parlak olanlar çevre kanında daha az bir oranda ancak lenfoid dokularda daha hakim olan bir kısmını oluşturur. Bunlar HLA-E ile bağlanan inhibitör reseptör CD94:NKG2A'ya sahip olmakla birlikte diğer tipik HLA Class I ligandlarına bağlanan KIR'ları taşımaz. Belki de bu nedenle kuvvetli sitokin üreticileri olup sitotoksik kapasiteleri çok zayıftır. Buna karşılık CD 56 zayıf ifade eden NK hücreleri inflamatuvar dokulara göç eden ve kuvvetli sitotoksik etkiye sahip hücrelerdir.

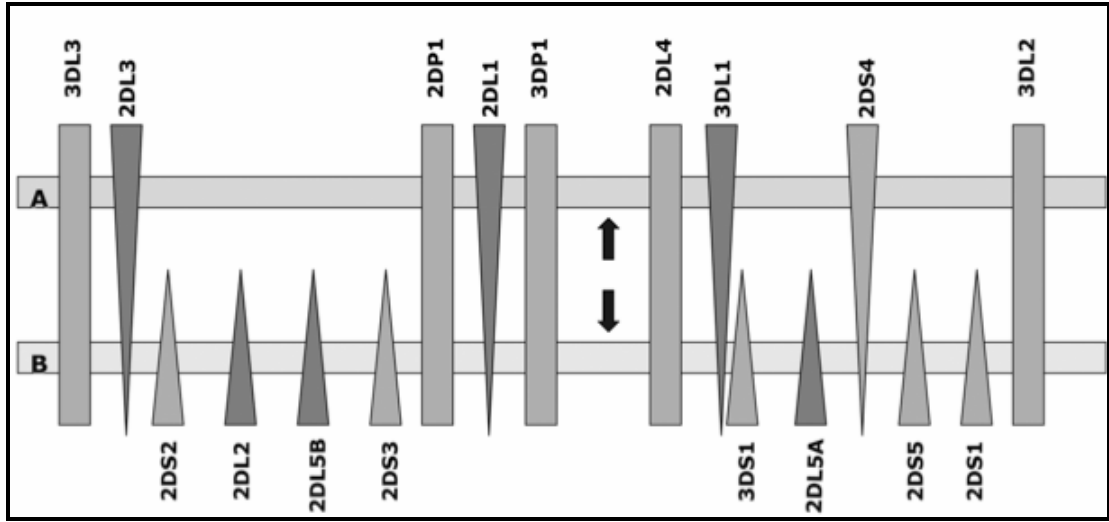
NK hücre yanıtının oluşması için gerekli olan HLA molekülü ile bağlanmayı bloke eden anti-KIR antikorumun (IPH2101) NK hücre işlevlerini arttırdığının gösterilmesi yeni tedavi seçeneklerini ortaya çıkarmıştır (26). Bu alanda klinik araştırmalar halen devam etmektedir.

Doğal immün yanıtın kazanılmış immün yanıtı doğru oluşan basamakları özetleyecek olursak: çevre dokulardaki antijen henüz olgunlaşmamış dendritik hücreler tarafından yakalanır. Dolaşımdaki NK hücreleri uyarılarak sitokin salgılaması, ardından dendritik hücrelerin olgunlaşması, TNF salgılanması ve sonuçta NK hücre aracılıklı hücre ölümü izler. Dendritik hücreler (DH) immün

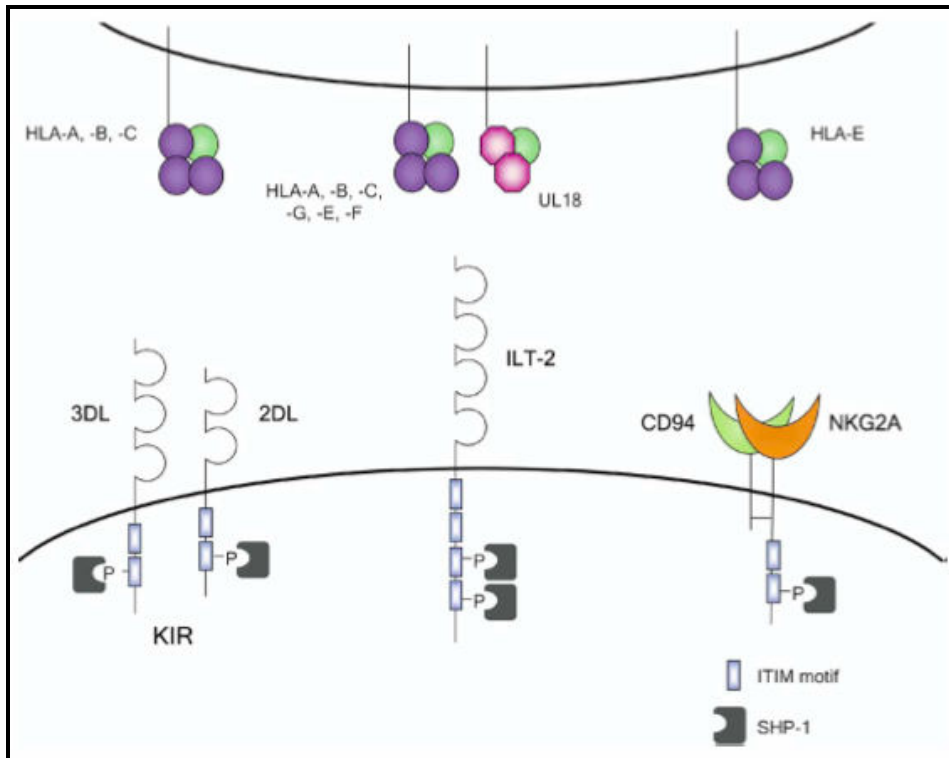
yanıtın ortaya çıkacağı lenfoid dokulara taşınırlar ve burada CD 56 zayıf ifade eden NK hücreleri tarafından HLA Class I ifadesi düşük olan olgunlaşmamış olan DH'leri imha edilirken antijenle uyarılmış ve dolayısıyla HLA ifadesi artmış olan olgunlaşmış DH'ler korunur. Olgunlaşmış DH'ler, CD 56 kuvvetli ifade eden NK hücrelerini uyararak INF-gamma ve GM-CSF aracılıklı T helper yapımına ve TH1 polarizasyonuna yol açar. Böylece DH yaşamı ve farklılaşması sağlanır. Bu arada salgılanan başka sitokinler de NK hücrelerinin olgunlaşmasına yol açar.

NK Hücre Reseptörleri

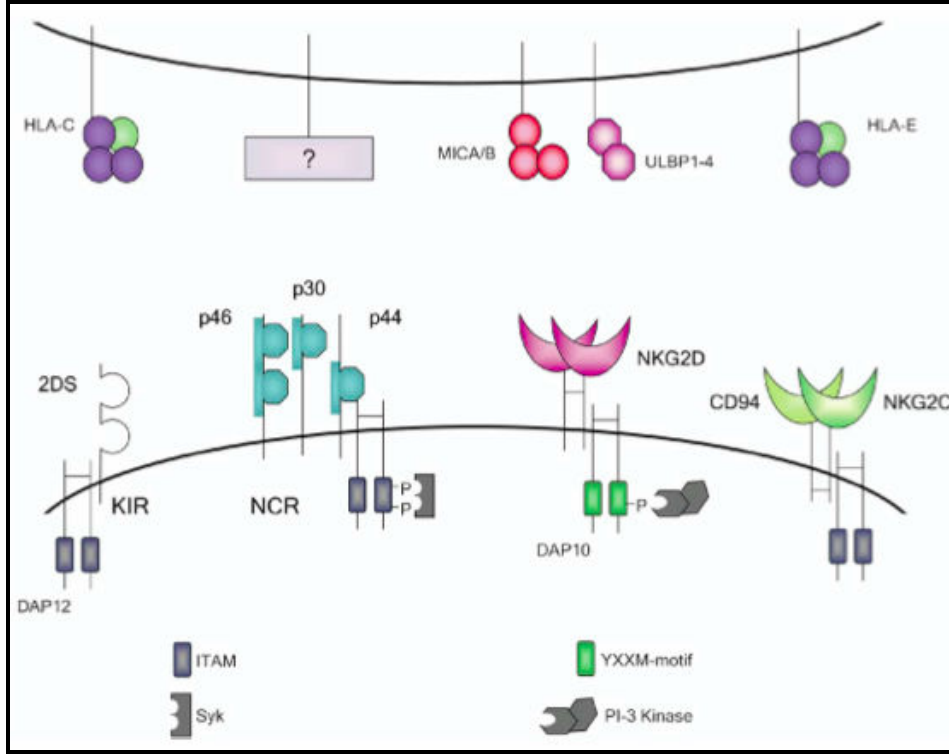
Yukarıda tanımlanan inhibitör ve aktivatör etkiler NK hücre yüzeyindeki zıt etkili KIR'lar arası oluşan denge yönünde sonuçlanır. Hedef hücrelerin üzerinde KIR ligandı olan HLA Class I moleküllerinin bulunmaması “kendinin kaybı” olarak algılanıp bu hücrelerin yok edilmesine kadar giden olaylar zincirini başlatmaktadır. Burada söz konusu olan KIR'ların hedef hücrede tanıdığı bir HLA ligandı durumunda inhibitör KIR'ların göndereceği sinyallerin oluşturulamamasıdır. Viral enfeksiyon veya malign transformasyonda otolog hücrelerin HLA ifadelerinde kayıp veya değişme, NK hücre sitotoksosite baskılanmasının ortadan kalkmasına yol açabilmektedir. Bu hipotezi doğrulayan birçok veri bulunmakla beraber HLA ifadesi NK sitotoksitesine karşı koruyucu tek faktör olmadığını gösteren başka veriler de bulunmaktadır: örneğin NK hücreleri HLA ifadesine rağmen hedef hücreler bir aktivatör reseptör olan NGK2D ligandına sahipse yine de uyarılabilmektedirler. Bu nedenle bu yeni bir hipotez olan “uyarılmış kendini tanıma hipotezi”ne yol açmıştır. NGK2D dışında da “doğal sitotoksosite reseptörleri” olarak adlandırılan ve inhibitör reseptörlerin etkilerini ters yöne çeviren yapılar da tanımlanmıştır, bunların ligandları henüz tam olarak bilinmediğinden normal koşullarda inhibitör-aktivatör reseptörler arası dengenin nasıl oluştuğu henüz açıklığa kavuşmamıştır. İnhibitör etkilerin daha dominant olduğu ve bunların yokluğunda aktivatör KIR'ların etkisinin ortaya çıkabildiği doğrultusunda bulgular mevcuttur(27). Yüzeyinde normal düzeyde HLA molekülü taşıyan hücreler, NK hücrelerdeki inhibitör KIR'ların etkisi ile kendisi olarak tanınarak sitotoksiteden korunurlar. Aynı NK hücresinde aktivatör KIR'lar bulunsan bile baskın olan inhibitör özelliklerdir. Ancak KIR'ların etkisini gösterebilmeleri için uygun HLA ligandına da sahip olmaları gerektiği unutulmamalıdır.



Şekil 2.3. KIR geninin haplotipik dağılımı: üst sıra Haplotip A (neredeyse tamamen inhibitör KIR geni içeren haplotip), alt sıra Haplotip B (daha çok aktivatör gen içeren haplotip) (28).



Şekil 2.4. İnhibitör Killer İmmünoglobulin Benzeri Reseptör ve ligandları (29).



Şekil 2.5. Aktivatör Killer İmmünoglobulin Benzeri Reseptörler ve ligandları (29).

İnhibitör NK Hücre Reseptörleri

İnhibitör özelliğe sahip olan reseptörler sadece inhibitör KIR'lar olamayıp ayrıca 12. kromozom üzerinde bulunan NK hücre gen kompleksinde yer alan C tip lektin reseptörleridir. Bu ikinci grup reseptörler CD94 ve NGK2A heterodimeridir ve ligandı HLA-E dir.

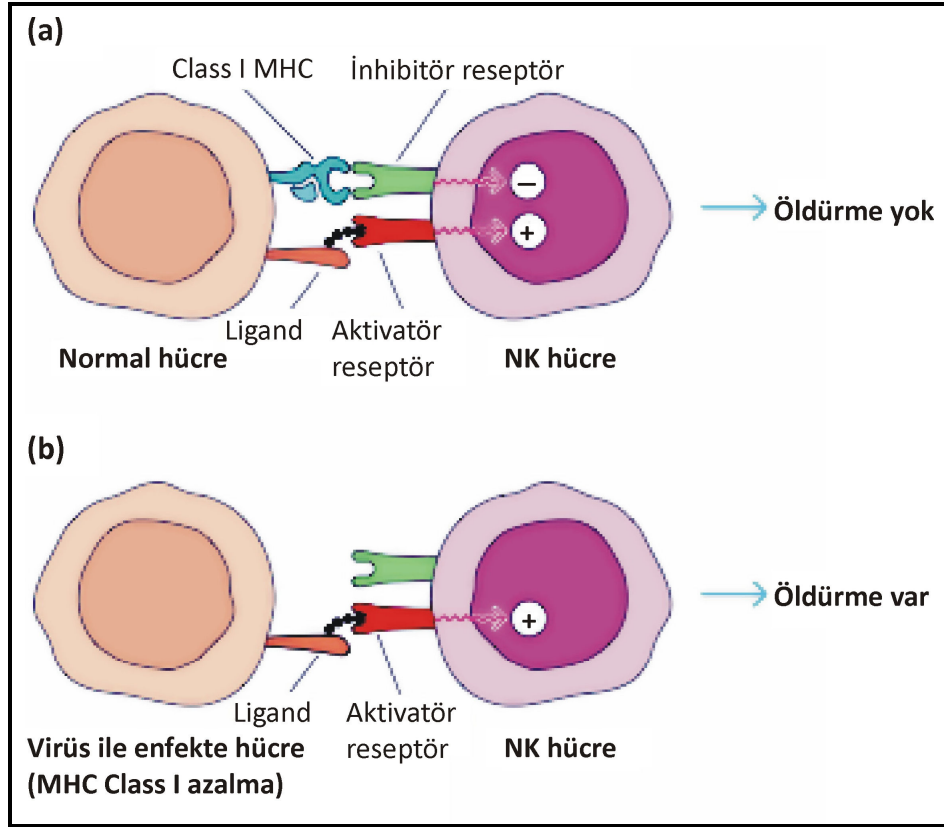
İnhibitör Killer İmmünoglobulin Like Reseptörler

Şekil 2.4'te özetlendiği üzere inhibitör KIR'ların isimlerinde ortak olan DL kısaltması uzun bir zincirden oluşmalarından kaynaklanmaktadır. Oysa aktivatör KIR'lar kısa zincire sahip olup DS'yi ortak olarak taşırlar ve bu zıt etkilerini transmembran ve sitoplazmik kısımlarındaki farklılıkları ile oluştururlar. İnhibitör KIR ligandları arasında HLA-C önemli bir yer tutmaktadır. HLA-C yapılarının alfa1 helix 77 ve 80. sıradaki aminoasit dizilimlerine göre iki grubu tanımlanmıştır: Grup 1C (77 ser/80 asn) ve Grup 2C (77 asn/80 lys). Grup 1C'de HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8, -Cw12, -Cw13, -Cw14, -Cw16 yer alırken Grup 2C'de HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6, -Cw15, -Cw17, -Cw18 bulunmaktadır. İnhibitör KIR'lardan 2DL2 ve

2DL3 HLA-C Grup 1 ile bağlanma gösterirken 2DL1 HLA-Grup 2 ile 3DL1 ise HLA-Bw4'ü ligand olarak görür. Toplumda inhibitör KIR'lar sıklıkla gözlenmektedir. Bazı derlemelerde beyaz ırkta %92-95 olarak bildirilen 2DL1 ve 3DL1 sıklıkları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesinde 170 olgu üzerinde yapılan bir araştırmada %81 ve 78 olarak bulunmuştur. KIR polimorfizminin toplumlar arası farklılık gösterdiği bilinen bir gerçektir. Bu nedenle akraba dışı nakillerde KIR alel uygunluğunun sağlanma olasılığı %0,24 olarak tahmin edilmektedir.

Aktivatör NK Hücre Reseptörleri

Bu grupta yer alan reseptörler, aktivatör KIR'lara ilaveten yine C tip lektin reseptörlerinden olan NGK2D, NGK2C ve NCR (doğal sitotoksitesite reseptörleri)'lerdir. Burada da CD94 bu kez NGK2C ile heterodimer oluşturmaktadır ve ligandı HL-E'dir. Ancak HLA-E ye afinitesi NGK2A'dan daha zayıftır. NGK2D'nin ligandı ise MHK içinde yer alan MICA/B'dir. NCR'ların ligandı bilinmemektedir. Birçok hematolojik malign hastalıkta aktivatör KIR aracılıklı NK sitotoksitesinin tümör hücrelerince nasıl baskılandığı veya korunduğuna dair yayınlar bulunmaktadır.



Şekil 2.6. NK hücrelerin sitotoksik aktivitesinin nasıl değişmiş kendi hücreleri ile sınırlandırıldığını gösteren model. **a)** HLA ifadesi taşıyan hücreler, NK hücrelerde inhibitör reseptör varlığında sitotoksik immün yanıtı engeller. Aktivatör reseptörlerin etkisi inhibitör reseptörlerin etkisine göre daha zayıf olduğu için etkisizdir. **b)** Virusla enfekte hücrelerde HLA ifadesinin azalması sonucunda inhibitör reseptörlerin ligandı eksildiği için aktivatör reseptörlerin etkisi hücre ölümü ile sonuçlanır (27).

Aktivatör Killer İmmünoglobulin Like Reseptörler

Bu grupta yer alan reseptörler DS ortak kısaltmasını taşırlar. Tablo 2.1’de görüldüğü üzere bu grup moleküller oldukça geniş bir yelpazeye aittir. Bir kısmının ligandı henüz bilinmezken KIR2DS1 ve KIR2DS4 Grup 1C ve 2 C ile bağlanırlar.

Tablo 2.1. İnsan NK hücre reseptör ve ligand spesifisitesi (28).

2DL1 ve 2DS1	2DL2/3 ve 2DS2	3DL1/3DS1	3DL2	2DL4	2DS4
HLA-C2 grup	HLA-C1 grup	HLA-Bw4	HLA-A	HLA-G	HLA-C
C*02	C*01	B*08	A*03		HLA-C*04
C*04	C*03	B*13	A*11		
C*05	C*07	B*27			
C*06	C*08	B*44			
		B*51			
		B*52			
		B*53			
		B*57			
		B*58			

Kolorektal Kanserlerde Killer İmmünoglobulin Like Reseptörlerin Rolü

Middleton ve ark. (30) laringeal, mesane ve kolorektal tümörlü olguları NK hücre reseptörleri olan KIR genlerini araştırmış ve normal kontrollerle karşılaştırmışlardır. Tümör hücresinin T lenfosit aracılıklı adaptif immün sistemden kaçmasını sağlamak için HLA ifadesini azaltması tümör lehine bir koruma mekanizmasıdır. HLA’da allel, lokus, haplotip ve hatta HLA ifadesi kaybı oluşabilir. Oysa HLA molekülleri immün yanıtı kontrol eden doğal immünitinin esas unsuru olan NK hücre reseptörleri için ligandır. İnhibitör veya aktivatör KIR’ların ligandı olan HLA moleküllerinden birinin kaybı, oluşacak olan immün yanıtı etkileyecektir. Genellikle inhibitör KIR reseptörleri, aktivatörlerinden daha baskındırlar. Ancak inhibitör bir reseptörün ligandının kaybı bu baskılamayı ortadan kaldırır. Böylece, adaptif immüniteden kaçmak için HLA Class I ifadesini azaltan tümör hücresi kendisini NK hücresinin saldırısına açar. Middleton ve ark. bu çalışmada HLA ifadesinin kaybını immünohistokimyasal ve mikrosatellit analizleri ile araştırmışlardır. Bu araştırmada kolorektal kanserlerde %25 oranında HLA ifadesi korunurken %42’sinde bir haplotip kaybı, %33’ünde de diğer değişiklikler gözlenmiştir. KIR ligandları içinde en önemlisi olan HLA-C’nin buradaki durumu incelendiğinde, haplotip kaybı gösteren kolorektal kanserlerde grup C1 ve grup C2’nin homozigotlukları %59,5 heterozigotlukları ise %40,5 bulunmuştur.

Bu araştırmada KIR genlerinin görülme sıklıkları kontrollerden farklı bulunamamıştır. İstatistiki olarak anlamlı KIR'ların A haplotipi ile ilişkili 4 gen (KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DS4 ve KIR3DL1) mesane tümörlerinde kontrollere göre daha sık bulunmuştur.

Middleton ve ark. araştırmasında HLA'da haplotipik kayıp olan kolorektal tümörlerde C1 veya C2'nin homozigotluğunun daha sık görülmesi CD8 lenfositlere antijenik peptid sunumunda azalmaya karşılık inhibitör KIR'ları tanıyan C epitoplarının korunması anlamına gelir. Bu durumda tümör hücresi hem adaptif immüniteden hem de KIR aracılıklı NK hücresi üzerinden doğal immüniteden korunur. Haplotipik düzeyde HLA kaybı irreversibl bir genomik hasar olup interferon tedavisi gibi yaklaşımlarla geri döndürülemez.

Aynı araştırma grubunun(31) 2010'da yayınlanan çalışmasında bu kez böbrek kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri ve kolon kanserinden oluşan 456 olgun 255 sağlıklı bireyle karşılaştırılmıştır. Kolon kanseri dışındaki tümörlerde inhibitör KIR'lar, normal bireylerden daha farklı sıklıkta gözlenmiştir. Böbrek tümöründe 2DL2 ve 2DL3'te azalma ile birlikte 3DL1 ve ligandı Bw4'te artma gözlenirken; küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde 2DL1 ve ligandı Grup C2'de artma gözlenmiş. Küçük hücreli akciğer kanserinde ise 3DL1 ve ligandı Bw4' n alttiplerinden Ile80'de artma, Thr80'de azalma saptanmış. Araştırmacılar sonuç olarak inhibitör KIR'larda aktivite artışını kolon kanseri dışındaki diğer tümörlerde g sterebilmişler.

Diğer Tümörler ve Killer İmmünoglobulin Like Reseptörler

Birçok tümörde olduğu gibi melanomlarda da KIR reseptörlerinin frekanslarında normal popülasyona göre bir farklılık gösterilememiştir. Ancak bir araştırmada grup C1 varlığında ligand (KIR2DL2 ve veya KIR2DL3) artışı veya tersi olarak C2 grup homozigotluğu varlığında ligand azalması (KIR2DL2 ve KIR2 DL3) gösterilmiştir (32).

Servikal İntreapitelyel Neoplazi (CIN) ile KIR genleri arası ilişki araştırılmış, C2 grubu ve HLA-Bw4 (KIR3DL1 ligandı) ve w4' n hastalık riskini azalttığı gösterilmiştir. İlaveten KIR3DS1 varlığında C2 veya Bw4' n kaybı hastalığa yatkınlık, buna karşılık KIR3DS1'in yokluğunda grup C2 ve veya Cw4' n varlığının hastalıktan koruduğu ileri sürülmüştür. Buradaki mekanizma İnsan Papilloma

Virüsüne (HPV) karşı aşırı bir immün yanıtın (aktivatör reseptörler) serviksteki patogeneze katkıda bulunmasıdır. Bu araştırmalarda tümör hücreleri üzerindeki NK reseptörleri sayısal olarak incelenmediği için spekülatif yorumlar söz konusudur (33).

Wisniewskia ve ark. (34) 269 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olgusunda grup C1 ve C2 homozigotlarının kontrollerden daha sık görüldüğü ($p=0,021$), KIR2DL2 ve KIR2DS2 gen pozitif ve C1 ligand homozigot olguların diğerlerine oranla tedaviye 6 kat daha fazla cevap verdiği ($p=0,034$) ve daha uzun yaşadığı (23 aya karşılık 10 ay, $p=0,0094$) gösterilmiştir. Bu araştırmada söz konusu olan KIR2DL2 bir inhibitör reseptör olup grup C1 epitopunu tanır. Grup C1, C2 heterozigotluğu durumunda inhibitör NK hücreleri için daha geniş bir ligand repertuarı bulunduğu için immün yanıtın baskılanması olasılığı yüksektir. Buna karşılık C1C1 ve C2C2 homozigotluğunda inhibitör KIR'lar olan KIR2DL2 ve/veya KIR2DL3 karşılık gelen ligand repertuarı azaldığı için immün yanıtın susturulması daha zayıf bir olasılıktır. KIR2DL2 + KIR2DS2 + C1C1 genotipinin bir başka avantajı da aktivatör bir gen olan KIR2DS2'nin C1 üzerinden immün yanıtı oluşturmalarıdır. Beyaz ırkın hemen tamamı KIR2DL1 için pozitifdir. Bu KIR'ın ligandı olan C2 epitopu varlığında NK hücreleri güçlü bir biçimde inhibe edilirler. Bu da KIR2DS2/C1 etkisini ortadan kaldırır. Ancak olguların C1C1 homozigot olması durumunda bu inhibisyon görülmeyeceğinden NK hücre aracılıklı tümörosidal yanıt gerçekleşecektir.

Inoue ve ark. (35) meme kanseri hücrelerinde HER2 ifadesi ile MHC Class I ifadesini birlikte araştırarak aralarındaki ters orantıyı göstermiştir. 70 olguda immünohistokimyasal analiz sonucunda HER2 ifadesi yüksek olan tümörlerde küçük interferan siRNA'ların MHC Class I ifadesini etkilediğini göstermişlerdir. İlaveten bir protein kinaz inhibitörü olan pD98059 molekülünün doza bağımlı olarak MHC Class I ifadesini artırabildiğini göstermişlerdir. Bu araştırma HER2'yi yüksek oranda ifade eden tümörlerin immün yanıtın nasıl kaçtığını açıklamaktadır.

Lopez-Vaquez ve ark. (36) kronik hepatit-C enfeksiyonu olan olgularda aktivatör bir KIR olan KIR3DS1 ile ligand olarak HLA-w4-I 80 epitopu varlığının hepatoselüler kanser açısından koruyucu olduğu gösterilmiştir. Bu ilişkinin mekanizması tam olarak anlaşılmamakla beraber HCV ile enfekte karaciğer hücreleri

KIR3DS1 ligandı taşımaları durumunda KIR3DS1 pozitif NK hücreleri tarafından tanınarak öldürülebilirler. Benzer bir durum Hodgkin Lenfoma için de gösterilmiştir (37). İlaveten KIR3DS1 ve KIR2DS1 in yoklukları Larinks ve üst solunum yollarında gözlenen papillomatozis'e yol açan HPV enfeksiyonu yatkınlığı ile ilişkilendirilmiştir (38).

3. HASTALAR VE OLGULAR

3.1. Yöntem

3.1.1. Olgular

HÜTF girişimsel olmayan etik kurul onamı (13 Mart 2013 tarihli, GO13/94 sayılı karar) alındıktan sonra olgu belirlemesine başlandı.

Araştırmaya kabul kriterleri:

- 2006-2008 yıllarında kolorektal kanser tanısı ile HÜTF Genel Cerrahi Anabilim Dalında cerrahi tedavi görmesi
- Cerrahi sınırın negatif olması
- 18 yaş ve üzerinde olması
- Cerrahi tedavi sonrası hastalığı tekrarlayan veya uzak metastazı olması (Grup 1)
- Cerrahi tedavi sonrası takibi HÜTF’de yapılan ve takibi sürecinde hastalığı tekrarlamaması (Grup 2)

Araştırma dışlama kriterleri:

- 18 yaşının altında olması
- İlk cerrahisi dış merkezde gerçekleştirilmiş olması
- Tanı anında uzak organ metastazı olması
- Altta yatan bağışıklığı baskılayan bir hastalığı bulunması
- Neoadjuvan kemoterapi uygulanmış olması
- İmmüsupresif ilaç kullanması

Araştırmaya kabul edilme kriterlerini karşılayan 110 olgu belirlendi. Grup 1’den 5, Grup 2’den 13 olgu yeterli tümör ve lenfoid doku elde edilememesi nedeniyle çalışma dışı bırakıldı. Grup 2’den 5 olgu temin edilen kitler tükendiği için çalışılmadı. Tüm olgularda tümör dokusunda KIR ligand, lenfoid dokulardan ise KIR genotiplenmesi gerçekleştirilmeye çalışıldı. Ancak 9 örnekte yeterli tümör dokusu olmadığı için HLA KIR ligand, bu olgularda lenf nodu örneğinde çalışıldı. Böylece rekürrense etki edebilecek KIR reseptör ve ligand analizi Grup 1’den 29, Grup 2’den 58 olmak üzere toplam 87 olgu üzerinde gerçekleştirilmiş oldu.

3.1.2. Patolojik Dokuların Elde Edilmesi

Kabul edilme kriterlerini karşılayan olguların formalin ile fikse edilmiş ameliyat rezeksiyon doku spesimenlerinden ayrılan tümör dokusu ile lenf nodu bölgelerinden alınan milimetrik boyuttaki parçalar Eppendorf tüplere alınarak daha sonraki moleküler analizler için Ankara Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Doku Tiplendirme Laboratuvarına ulaştırıldı.

3.1.3. DNA İzolasyonu

Formalin ile fikse dokulardan yüksek saflıkta DNA izolasyonu için geliştirilmiş QIAamp DNA FFPE izolasyon kiti (Quiagen, Venlo, Hollanda) kullanılarak ve kitin prospektüsünde tanımlanan yöntemle sadık alınarak MinElute spin kolon kullanılarak kesit bloklarından ortalama 200 mikrogram DNA izole edildi. Örneklerin DNA kalitesi ve miktarı kontrol edildi. Tüm dokulardan yeterli kalite ve miktarda DNA elde edilmesi mümkün oldu. Tümör dokusu ve lenfoid dokulardan DNA elde edilmesi aynı protokol ile gerçekleştirildi.

3.1.4. Killer İmmünoglobulin Like Reseptör Genotiplemesi

Elde edilen lenfoid doku DNA örneklerinden 30 ng/L konsantrasyona ayarlanarak 12'şer testlik CE sertifikalı Ollerup SSP (Stockholm, İsveç) KIR Genotyping kiti (katalog no 104.101-12) kullanılarak kuyucuklara dağıtılmış olan KIR spesifik primerlerle PCR'a alındı. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jele aktarıldı ve elektroforeze tabi tutuldu. İşlem sonucunda elde edilen KIR spesifik ampikon bantları UV ışığı altında görüntülenerek fotoğraflandı. Elde edilen bantlardan KIR Genotip analizi DNA marker bantları referans alınarak Tablo 3.1'de yer alan molekül boyutlarına göre gerçekleştirildi. Sonuçların doğruluğu negatif kontrol ve körlemesine aynı örneklerin tümör ve lenfoid dokusundan doğrulama analizi kullanılarak test edildi.

Tablo 3.1. PCR-SSO ile amplifiye edilen KIR genlerinin bant genişliği.

Primer Mix	PCR ürününün boyutu	Kontrol bandının boyutu	KIR geni	Amplifiye KIR alelleri
1	145 bp	800 bp	2DL1	001-025
2	150 bp	1070 bp	2DL2	0010101-010
3	100 bp, 520 bp	1070 bp	2DL3	0010101-017
4	200 bp	1070 bp	2DL4	00101-022
5	155 bp	1070 bp	2DL5A, 2DL5B	0010101-00105, 0050101-005010104, 01201-01202, 014-015 0020101-004, 00601-011, 01301-1303, 016
6	1650 bp	430 bp	2DL5A	0010101-00105, 0050101-005010104, 01201-01202, 014-015
7	1650 bp	515 bp	2DL5B	0020101-004, 00601-011, 01301-1303, 016
8	100 bp	1070 bp	2DS1	001-008
9	205 bp	1070 bp	2DS2	0010101-008
10	130 bp	1070 bp	2DS3	00101-005
11	215 bp	1070 bp	2DS4	0010101-00104, 01101-01102, 014, 015
12	200 bp	1070 bp	2DS4	0030101-0030104, 0040101-0040102, 0060101-0060102, 007-010, 012, 013
13	110 bp	1070 bp	2DS5	001-011
14	135 bp	1070 bp	3DL1	0010101-002, 00401-00403, 0050101-009, 01501-044, 051-054, 056, 057, 059-068, 072-073
15	200 bp	1070 bp	3DL2	0010101-062
16	115 bp	1070 bp	3DL3	00101-036, 041-055
17	160 bp	1070 bp	3DS1	010-014, 045-049N, 050, 055, 058
18	165 bp	1070 bp	2DP1	00101-010
19	125 bp	1070 bp	3DP1	001-010
20	234 bp	1070 bp	3DP1	0030101-0030402, 004-010
21	145 bp	1070 bp	2DS1	001
22	95 bp	1070 bp	2DS1	0020101-008
23	210 bp	1070 bp	3DL1	00401-00403, 019, 021, 036, 037, 039, 056, 072
24	-	-	-	Negatif kontrol

3.1.5. Killer İmmüoglobulin Like Reseptör Ligand Genotiplemesi

Kolorektal kanser olgularının tümör dokusundan elde edilen DNA, CE sertifikalı Olerup KIR HLA Ligand SSP (104.201-12) kiti kullanılarak KIR Ligand genotiplemesi gerçekleştirildi. PCR KIR genotiplemesinde tanımlandığı üzere gerçekleştirildi. Yine benzer şekilde sonlandırılarak elde edilen ampliconlar agaroz jele aktararak elektroforez sonrası UV ışık altında görüntülendi ve Tablo 3.2’de yer alan amplicon büyüklüklerine göre analiz gerçekleştirildi. Bu yöntem ile HLA-C C1 (80. pozisyon Asparagin) ve C2 (80. pozisyon lizin), HLA-Bw4 80. pozisyon izolösün ve treonin, HLA-A Bw4, HLA-Bw4 77. pozisyon Asparagin ile 80. pozisyon treonin ortak özelliklerine sahip KIR ligand analizleri mümkün oldu.

Tablo 3.2. PCR-SSO ile elde edilen amplicon ve karşı geldiği KIR ligandı olan aleller.

Primer Mix	PCR ürününün boyutu	Kontrol bandının boyutu	KIR HLA ligand nükleotid sekans motifi	Amplifiye HLA alelleri
1	340 bp	800 bp	HLA-C ^{Asn80}	C*01:02:01-01:13, 01:15-01:46, 01:48-01:58, 01:60, 01:62-01:73, 02:12, 02:27:01-02:27:02, 03:02:01-03:03:14, 03:03:15, 03:03:16-03:04:16, 03:04:18-03:06, 03:08-03:09, 03:10, 03:11:01-03:14, 03:16-03:28, 03:29, 03:30-03:44, 03:46-03:114, 03:116:01-03:129, 03:131-03:133, 03:135-03:139, 03:141-03:162, 04:11, 04:29, 04:36, 04:55, 06:11, 07:01:01-07:06, 07:08, 07:10-07:33N, 07:35-07:48, 07:50-07:75, 07:77-07:114, 07:116-07:209, 07:211-07:222, 07:224-07:237, 07:239-07:246, 07:248-07:263, 08:01:01-08:09, 08:11-08:64, 12:02:01-12:03:22, 12:06-12:08, 12:10:01-12:20, 12:22-12:26, 12:28-12:32, 12:34-12:40, 12:42Q-12:53, 12:55-12:59, 12:61-12:71, 12:72, 12:73-12:82, 14:02:01-14:03, 14:05-14:11, 14:13-14:43, 15:07, 15:21, 15:25, 15:43, 16:01:01-16:01:10, 16:04:01, 16:06-16:08, 16:10-16:11, 16:13-16:18, 16:20-16:24, 16:26-16:36, 16:37, 16:38-16:45, 16:49-16:52
2	340 bp	800 bp	HLA-C ^{Lys80}	C*01:14, 01:59, 02:02:01-02:02:03, 02:02:05-02:02:11, 02:02:13-02:11, 02:13-02:26:03, 02:28-02:40, 02:42-02:63, 03:07, 03:15, 03:45, 03:130, 03:140, 03:163, 04:01:01-04:01:28, 04:01:30-04:01:41, 04:03-04:10, 04:12-04:20, 04:23-04:28, 04:30-04:35, 04:37-04:54, 04:56-04:127, 05:01:01-05:01:21, 05:03-05:81, 06:02:01-06:02:01:02, 06:02:03-06:02:11, 06:02:13-06:10, 06:12-06:51, 06:53-06:87, 07:07, 07:09, 07:49, 07:76, 07:210, 07:238, 07:247, 08:10, 12:04:01-12:05, 12:09, 12:21, 12:33, 12:41, 12:54, 12:60, 14:04, 14:12, 15:02:01-15:06:03, 15:08-15:13, 15:15-15:19, 15:22-15:24, 15:26-15:42, 15:44-15:61, 16:02:01-16:02:09, 16:09, 16:12, 16:19, 16:25, 16:46-16:48, 17:01:01-17:13, 18:01-18:05

Tablo 3.2. (devam) PCR-SSO ile elde edilen amplikon ve karşı geldiği KIR ligandı olan aleller.

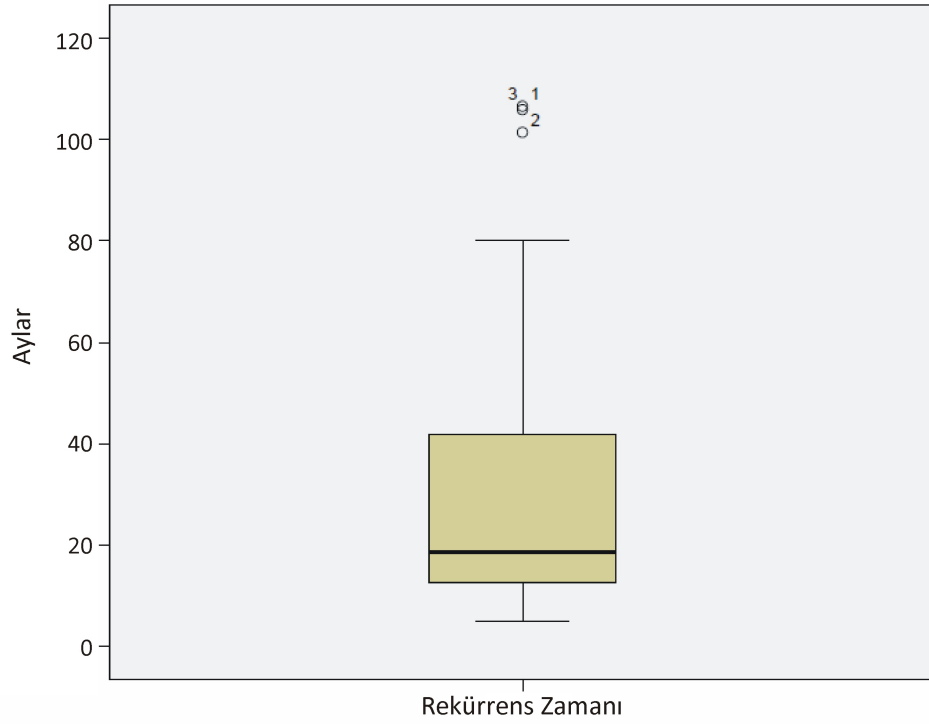
Primer Mix	PCR ürününün boyutu	Kontrol bandının boyutu	KIR HLA ligand nükleotid sekans motifi	Amplifiye HLA alelleri
3	350 bp	800 bp	HLA-B ^{Bw4+Thr80}	B*07:149, 08:02, 13:01:01-13:04, 13:06-13:08Q, 13:10-13:23, 13:25-13:38, 13:40-13:58, 15:36, 15:89, 15:115, 18:09, 27:01, 37:10, 38:02:01-38:04, 38:08, 38:15, 38:18, 38:23, 38:29, 38:35, 40:47, 40:96, 40:110, 40:157, 40:201, 44:02:01:01-44:02:18, 44:02:20-44:05:02, 44:05:04, 44:07-44:08, 44:10, 44:12-44:17, 44:19N-44:24, 44:26-44:45, 44:47-44:49, 44:51-44:74, 44:76-44:89, 44:91-44:94, 44:96-44:128, 44:130, 44:132-44:151, 44:153-44:155, 47:04, 49:02, 51:54, 51:78:01-51:78:02, 52:20, 53:09, 53:11-53:13, 56:07
4	350 bp	1070 bp	HLA-B ^{Bw4+Ile80}	B*07:36, 07:38, 07:81, 08:03, 08:52, 08:78, 15:13:01-15:13:02, 15:16:01-15:17:02, 15:23-15:24, 15:67, 15:87, 15:95, 15:157, 15:162, 15:168, 15:177, 15:196, 15:208, 15:216, 15:222, 15:230, 15:254, 18:67, 27:02:01-27:02:02, 27:30, 27:53, 27:57, 27:62, 27:65N, 27:75, 27:77, 27:83, 37:34, 38:01:01-38:01:07, 38:05-38:07, 38:09-38:14, 38:16, 38:19-38:22, 38:24-38:28, 38:30-38:34N, 38:36-38:40, 40:13, 40:19, 40:109, 40:117, 44:06, 44:18, 44:25, 44:50, 44:95, 48:18, 49:01:01-49:01:03, 49:03-49:22, 51:01:01-51:24:04, 51:26-51:46, 51:48-51:53, 51:55-51:77, 51:79-51:137, 52:01:01:01-52:19, 52:21-52:30, 53:01:01-53:02, 53:04-53:08:02, 53:10, 53:14-53:28, 54:12, 56:21, 57:01:01-57:11, 57:13-57:58, 58:01:01-58:02, 58:04-58:16, 58:18-58:37, 59:01:01:01-59:05
5	370 bp	1070 bp	HLA-A ^{Bw4+}	A*01:95, 02:81, 02:87, 02:112, 02:124, 02:129, 02:136, 23:01:01-23:54, 24:02:01:01-24:03:02, 24:05-24:11N, 24:13:01-24:15, 24:17-24:18, 24:20-24:27, 24:29-24:43, 24:45N-24:64, 24:66-24:88, 24:90N-24:99, 24:101-24:108, 24:110-24:128, 24:130-24:209, 25:01:01-25:20, 29:13, 31:07-31:08, 31:10, 32:01:01-32:46, 68:36
6	350 bp	1070 bp	HLA-B ^{Bw4+Asp77, Thr80}	B*07:27, 15:43, 18:54, 27:03-27:07:02, 27:09-27:11, 27:13-27:17, 27:19-27:21, 27:23-27:25, 27:27-27:29, 27:31-27:32, 27:34-27:39, 27:41, 27:43, 27:45-27:48, 27:50-27:52, 27:54-27:56, 27:58-27:61, 27:63-27:64N, 27:66N-27:74, 27:76, 27:78-27:82, 27:84-27:88, 27:90-27:92, 37:01:01, 37:01:03-37:04:02, 37:06-37:09, 37:12-37:13, 37:15-37:33N, 38:17, 40:188, 47:01:01:01-47:01:02, 47:05-47:08, 53:03

3.2. İstatistiksel Değerlendirme

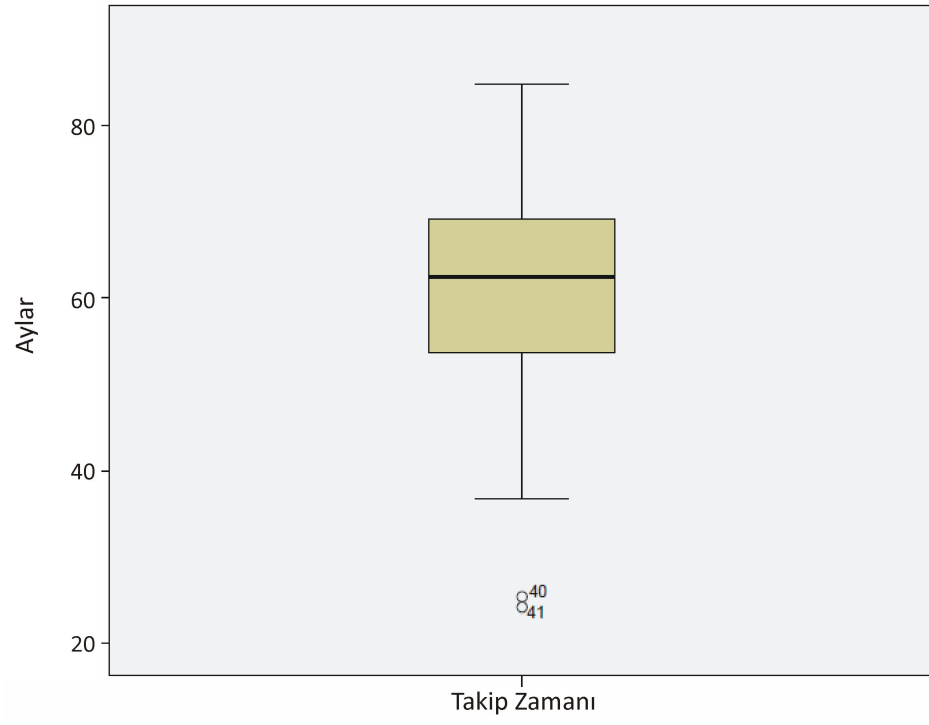
SPSS programı kullanılarak, kategorik değişkenler için Pearson Chi-Square ve Fisher's Exact test kullanıldı. Sürekli değişkenler için t-testi kullanıldı. Hastaların rekürrens olup olmayacağını belirlemede önemli olan değişkenleri saptamak amacıyla lojistik regresyon yöntemi kullanıldı.

4. BULGULAR

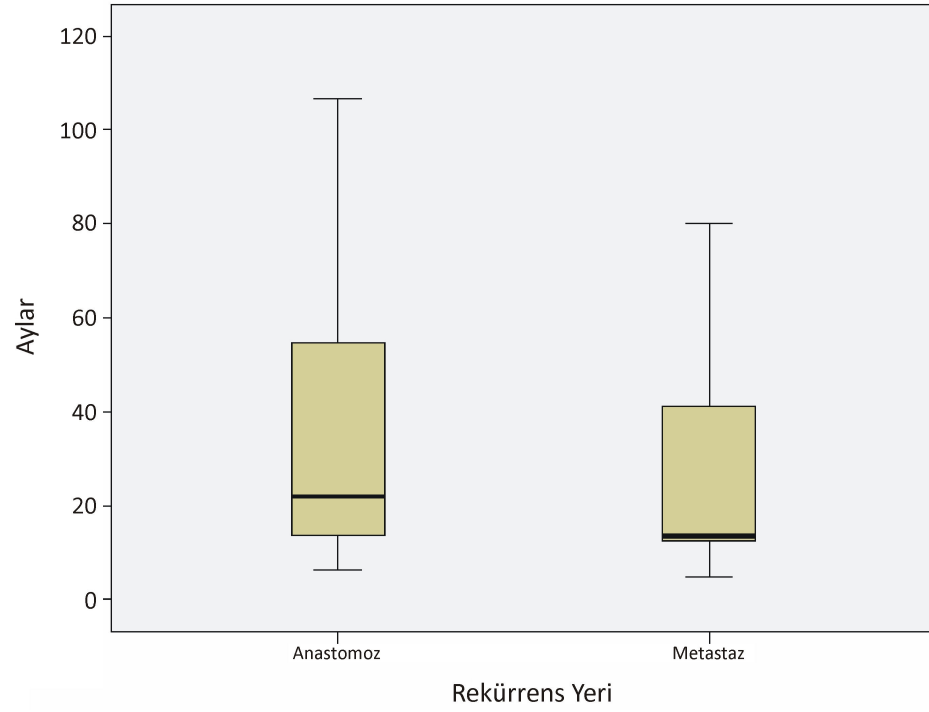
Rekürrens gösteren olgularda ortalama $32,5 \pm 30,5$ (4,9-106,6) ayda nüks/metastaz geliştiği görülmüştür (Şekil 4.1). Diğer grubun takip süresi ortanca $60,2 \pm 12,5$ (24,2-84,7) aydır (Şekil 4.2). Rekürrens gösteren 29 olgudan 16'sında (%55,1) rekürrens anastomoz hattında, 13'ünde (%44,9) ise uzak organ metastazı şeklindedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.1. Grup 1 için rekürrens zamanı.



Şekil 4.2. Grup 2 için takip zamanı dağılımı.



Şekil 4.3. Grup 1’de rekürrens/metastaz gelişme zamanı.

Olgular klinik özellikler açısından karşılaştırıldığında Tablo 4.1’de görüleceği üzere yaş, cinsiyet dağılımı ve cerrahi sonrası adjuvan tedavi alıp alma açısından istatistiksel anlamlı fark yoktur. Tablo 4.2 ve 4.3’de görüleceği üzere iki grup arası evrelerinde ($p=0,106$) ve tümör lokalizasyonunda ($p=0,319$) istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

Tablo 4.1. Olguların klinik özellikleri.

	Rekürrens/metastaz gösteren olgular (n: 29)	Rekürrens/metastaz göstermeyen olgular (n: 58)	P değeri
Yaş	59,5 ± 13,3	58,6 ± 12,3	0,744
Cinsiyet: Erkek/Kadın	14/15	32/26	0,544
Adjuvan tedavi: Var/Yok	23/6 (%79,3/%20,7)	37/21 (%63,8/%36,2)	0,140

Tablo 4.2. Olguların klinik evreleri.

	Rekürrens/metastaz gösteren olgular (n: 29)	Rekürrens/metastaz göstermeyen olgular (n: 58)
Evre 1	5 (%17,2)	11 (%19)
Evre 2	6 (%20,7)	24 (%41,4)
Evre 3	18 (%62,1)	23 (%39,7)

Tablo 4.3. Olgulardaki tümör lokalizasyonu.

	Rekürrens/metastaz gösteren olgular (n: 29)	Rekürrens/metastaz göstermeyen olgular (n: 58)
Sağ Kolon	3 (%10,3)	11 (%19)
Sol Kolon	6 (%20,7)	7 (%12,1)
Sigmoid Kolon	11 (%37,9)	15 (%25,9)
Rektum	9 (%31)	25 (%43,1)

KIR genotiplerinin hasta grupları arasında görülme sıklığı açısından karşılaştırıldığında 2DL4, 3DL2 ve 3DL3’ün tüm olgularda mevcut olduğu görülmüştür. Rekürrens göstermeyen olgularda 2DL1’in anlamlı olarak azaldığı [29 (%100)’a karşılık 48 (%82,7), $p=0,017$]; 2DL2 [18 (%62)’a karşılık 50 (%86,2), $p=0,01$], 2DS2 [12 (%41,4)’a karşılık 42 (%72,4), $p=0,005$] ve 2DS3’ün [7

(%24,1)'a karşılık 27 (%46,5), $p=0,043$] anlamlı olarak arttığı saptandı. Buna karşılık diğer KIR'lar ve KIR haplotiplerinin hasta grupları arasında görülme sıklıklarının benzer olduğu görüldü(Tablo 4.4).

Tablo 4.4. KIR gentotiplerinin hasta gruplarına göre dağılımı.

KIR	Grup 1 (Rekürrens gösteren) n=29	Grup 2 (Rekürrens göstermeyen) n=58	P
2DL1	29 (%100)	48 (%82,7)	0,017
2DL2	18 (%62)	50 (%86,2)	0,01
2DL3	16 (%55,2)	23 (%39,7)	0,17
2DL4	29 (%100)	58 (%100)	-
2DL5A/B	18 (%62)	35 (%60,3)	0,877
3DL1	28 (%96,6)	56 (%96,5)	1,0
3DL2	29 (%100)	58 (%100)	-
3DL3	29 (%100)	58 (%100)	-
2DS1	14 (%48,3)	26 (%44,8)	0,761
2DS2	12 (%41,4)	42 (%72,4)	0,005
2DS3	7 (%24,1)	27 (%46,5)	0,043
2DS4 normal	7 (%24,1)	16 (%27,5)	0,758
2DS4 truncated	22 (%75,9)	47 (%81)	0,574
2DS5	15 (%51,7)	23 (%39,6)	0,285
3DS1	14 (%48,3)	21 (%36,2)	0,279
Haplotip A/B	7/22 (%24,1/%75,9)	9/49 (%15,5/%84,5)	0,328

KIR ligand gruplarından grup C2 ve grup C1 her iki grupta da yüksek sıklıkta (%89,7-%96,6) görülmesi C1/C2 heterozigotluğunun baskın özellik olduğu ve her iki grupta da benzer sıklıkta rastlandığı gösterilmiştir. Diğer KIR ligandlarından Bw4'te de benzer durum gözlenirken, A-Bw4 ligand grubunun rekürrens göstermeyenlerde belirgin olarak azaldığı [24 (%82,6)'a karşılık 34 (%58,6), $p=0,024$] gözlenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. KIR ligand gruplarının hasta gruplarına göre dağılımı.

Ligand	Grup 1 (Rekürrens gösteren) n=29	Grup 2 (Rekürrens göstermeyen) n=58	P
C2	28 (%96,6)	52 (%89,7)	0,252
C1	27 (%93,1)	53 (%91,4)	0,571
Bw4	28 (%96,6)	55 (%94,8)	0,593
A-Bw4	24 (%82,6)	34 (%58,6)	0,024

Aynı olguda KIR ve KIR ligandının beraber görülme durumlarına bakıldı (Tablo 4.6). 2DL1-C2 ve 2DL3-C1 birlikteliklerinde beklendiği üzere inhibitör yönde etki gösterip rekürrens artmıştır. Ancak 2DL2-C1 birlikteliğinde beklentinin aksine rekürrens azaldığı görülmüştür ($p=0,025$). 2DS2-C1 birlikteliğinde aktivatör etki ön planda olup rekürrens azalmıştır ($p=0,013$).

Tablo 4.6. Hasta gruplarında KIR ligand grubu ile KIR genotip birlikteliğinin karşılaştırılması.

	Grup 1 (Rekürrens gösteren) n=29	Grup 2 (Rekürrens göstermeyen) n=58	P
2DL1-C2	28 (%96,6)	43 (%74,1)	0,011
2DL2-C1	17 (%58,6)	47 (%81)	0,025
2DL3-C1	15 (%51,7)	19 (%32,8)	0,087
3DL1-Bw4	27 (%93,1)	53 (%91,4)	0,78
2DS1-C2	13 (%44,8)	24 (%41,4)	0,759
2DS2-C1	12 (%41,4)	40 (%69)	0,013
3DS1-Bw4	13 (%44,8)	19 (%32,8)	0,193

İnhibitör bir KIR ve ilgili ligandının beraber bulunması durumunda immün yanıtın baskılanması doğrultusunda bir etki oluşturacağı hipotezi Tablo 4.6'da değerlendirilmiştir. Grup C2 ve inhibitörü 2DL1'in beraber olduğu durumlar rekürrens gösteren grupta daha fazla olmakla beraber bu değer istatistiksel olarak sınırda bir anlam taşımaktadır ($p=0,087$). Grup C1 ve yanında inhibitör KIR'ları 2DL2 ve 2DL3'ten en az birinin bulunduğu durumlar ise yine rekürrens gösteren grupta daha fazladır ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,021$). Benzer durum Bw4 için geçerli değildir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Hasta gruplarında KIR ve KIR ligand birlikteliğinin karşılaştırılması.

	Grup 1 (Rekürrens gösteren) n=29	Grup 2 (Rekürrens göstermeyen) n=58	P
Ligand C2/ İnhibitör KIR (+) olanlar	15 (%51,7)	23 (%39,7)	0,087
Ligand C1/ İnhibitör KIR (+) olanlar	15 (%51,7)	13 (%22,4)	0,021
Ligand Bw4/ İnhibitör KIR (+) olanlar	15 (%51,7)	35 (%60,3)	0,306

Grup C1 ve bağlandığı KIR'ların kendi aralarındaki etkileşimi incelemek amacıyla Tablo 4.8'de beraber görülme olasılıklarının frekansları verilmiştir. 2DL2 varken ve 2DL3 yokken (2DL2 +, 2DL3 - durumlar) 2DS2'nin eklenmesinin rekürrensi azaltıcı (%50'ye karşı %8,6) etkisi gözlenmiştir. 2DL2 ve 2DS2'nin birlikte var olması [52/80 (%65)] ve yok olması [16/80 (%20)] bu iki KIR'ın sıklıkla beraber bulunduğunu göstermektedir. Rekürrens gözlenmeyen grupta hem 2DL2 hem de 2DS2 varken (2DL2 +, 2DS2 + durumlar), 2DL3'ün gözlenmemesi rekürrensi azaltmaktadır (%50'ye karşı %18,9). 2DL2 ve 2DS2 yokken 2DL3 baskın olduğu için rekürrens artmıştır (%32,1'e karşı %10,3).

Tablo 4.8. C1 ligandını gören inhibitör ve aktivatör KIR'ların hasta gruplarına göre birlikte değerlendirilmesi.

	Grup 1 (Rekürrens gösteren) n=29	Grup 2 (Rekürrens göstermeyen) n=58
2DL2 +, 2DL3 -, 2DS2 +, C1 +	8 (%27,6)	29 (%50)
2DL2 +, 2DL3 -, 2DS2 -, C1 +	4 (%13,8)	5 (%8,6)
2DL2 -, 2DL3 +, 2DS2 -, C1 +	9 (%32,1)	6 (%10,3)
2DL2 +, 2DL3 +, 2DS2 +, C1 +	4 (%13,8)	11 (%18,9)
2DL2 -, 2DL3 +, 2DS2 -, C1 -	1 (%3,6)	2 (%3,4)
2DL2 +, 2DL3 -, 2DS2 -, C1 -	1 (%3,6)	1 (%1,7)
2DL2 +, 2DL3 +, 2DS2 -, C1 +	1 (%3,6)	2 (%3,4)
2DL2+, 2DL3 +, 2DS2 +, C1 -	-	2 (%3,4)

2DL2 ve 2DS2'nin ikili etkileşimini incelemek amacıyla C1 grubunun bulunmadığı olgular çıkartılarak analiz yapılmıştır. Tablo 4.7'de görüldüğü üzere 2DS2 bulunan olguların hepsinde 2DL2'nin de birlikte bulunduğu görülmektedir. 2DL2 ve 2DS2 beraber bulunduğu olgularda rekürrens azalmaktadır (%75,5'e karşı %44,4. P=0,006).

Tablo 4.9. C1 (+) olgularda 2DL2 ve 2 DS2'nin karşılaştırılması.

C1 (+) olgularda	Grup 1 (Rekürrens gösteren) n=27	Grup 2 (Rekürrens göstermeyen) n=53
2DL2 +, 2DS2 +	12 (%44,4)	40 (%75,5)
2DL2 +, 2DS2 -	5 (%18,5)	7 (%13,2)
2DL2 -, 2DS2 +	-	-
2DL2 -, 2DS2 -	10 (%37)	6 (%11,3)

Tablo 4.8'deki analiz ligand grup C2 ve Bw4 için de yapılmış olup (Tablo 4.10 ve 4.11), anlamlı bir bulgu saptanmamıştır.

Tablo 4.10. C2 ligandını gören inhibitör ve aktivatör KIR'ların hasta gruplarına göre birlikte değerlendirilmesi.

	Grup 1 (Rekürrens gösteren) n=29	Grup 2 (Rekürrens göstermeyen) n=58
2DL1 +, 2DS1 -, C2 +	15 (%51,7)	23 (%39,6)
2DL1 +, 2DS1 +, C2 +	13 (%44,8)	20 (%34,5)
2DL1 +, 2DS1 +, C2 -	1 (%3,4)	2 (%3,4)
2DL1 -, 2DS1 -, C2 +	-	5 (%8,6)
2DL1 +, 2DS1 -, C2 -	-	3 (%5,2)
2DL1 -, 2DS1 +, C2 +	-	4 (%6,9)
2DL1 -, 2DS1 -, C2 -	-	1 (%1,7)

Tablo 4.11. Bw4 ligandını gören inhibitör ve aktivatör KIR'ların hasta gruplarına göre birlikte değerlendirilmesi.

	Grup 1 (Rekürrens gösteren) n=29	Grup 2 (Rekürrens göstermeyen) n=58
3DL1 +, 3DS1 -, Bw4 +	15 (%51,7)	34 (%58,6)
3DL1 +, 3DS1 +, Bw4 +	13 (%44,8)	19 (%32,8)
3DL1 +, 3DS1 +, Bw4 -	1 (%3,4)	2 (%3,4)
3DL1 -, 3DS1 -, Bw4 +	-	2 (%3,4)
3DL1 +, 3DS1 -, Bw4 -	-	1 (%1,7)

KIR ligand gruplarından C1'in homozigot görülme sıklığı rekürrens göstermeyenlerde diğer hasta grubuna göre anlamlılığı belirgin olmayan (%10,3'e karşılık %3,4; p=0,09) bir fark gözlenmiştir. C2 homozigotluğu her iki hasta grubunda da benzerdir (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. KIR ligand gruplarından C1 ve C2'nin homozigot veya heterozigotluğunun hasta gruplarında karşılaştırılması.

	Grup 1 (Rekürrens gösteren) n=29	Grup 2 (Rekürrens göstermeyen) n=58	P
C1 Homozigot	1/29 (%3,4)	6/58 (%10,3)	0,09
C2 Homozigot	2/29 (%6,8)	5/58 (%8,6)	0,36
C1/C2 Heterozigot	26/29 (%89,8)	47/58 (%81,1)	0,53

KIR ligand gruplarından Bw4'ün aminoasit dizilimlerine göre oluşturulan alt gruplarının hasta grupları arasında görülme sıklıkları araştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. KIR ligandı olan Bw4'ün alt tiplerinin hasta gruplarında karşılaştırılması.

	Grup 1 (Rekürrens gösteren) n=29	Grup 2 (Rekürrens göstermeyen) n=58
Bw4 Thr80	4 (%13,8)	8 (%13,8)
Bw4 Ile80	9 (%31)	25 (%43,1)
Bw4 (Asp 77 + Thr80)	0	2 (%3,4)
Bw4 Thr80 + Ile80	5 (%17,2)	7 (%12,1)
Bw4 Thr 80 + (Asp 77 + Thr80)	2 (%6,9)	3 (%5,2)
Bw4 Ile80 + (Asp 77 + Thr80)	7 (%3,4)	6 (%10,3)
Bw4 Thr80 + Ile80 + (Asp77 + Thr80)	1 (%3,4)	4 (%6,9)

Aynı kişide hem C1 hem de C2 ligandı birlikte olma durumunda ortaya çıkacak KIR etkisini görebilmek için Tablo 4.14 oluşturulmuştur. Hem rekürrens gösteren hem de göstermeyen olgularda inhibitör KIR'ların ligandları ile birlikte bulunma durumu en sık gözlenen özelliktir. Rekürrens göstermeyen olgularda diğer gruba göre en az bir KIR ligand (C1 veya C2) veya ona bağlanan inhibitör KIR'ın kaybı (%31,1'e karşılık %6,9, p=0,016) daha sık saptanmıştır.

Tablo 4.14. Aynı bireyde C1 ve C2 ligandlarına bağlanan inhibitör KIR'ların hasta gruplarına göre birlikte değerlendirilmesi.

	Grup 1 (Rekürrens gösteren) n=29	Grup 2 (Rekürrens göstermeyen) n=58
C2-2DL1(+) / C1-2DL2 veya 2DL3 (+)	27 (% 93,1)	40 (%68,9)
C2-2DL1(+) / C1-2DL2 veya 2DL3 (-)	2 (%6,9)	5 (%8,6)
C2-2DL1(-) / C1-2DL2 veya 2DL3 (+)	-	12 (%20,6)
C2-2DL1(-) / C1-2DL2 veya 2DL3 (-)	-	1 (%1,7)

Bu aktivasyon yönündeki özelliklerin varlığının rekürrens ortaya çıkış süresini etkileyip etkilemediğine araştırmak için 24 ay eşik değeri belirlenerek Tablo 4.15'teki analiz gerçekleştirilmiştir. Bu olgulardan 18'i erken rekürrens, 11'i geç rekürrens olarak tanımlandı. Daha önce istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren

parametreler bu analizde karşılaştırıldığında rekürrensin ortaya çıkış süresine istatistiksel olarak anlamlı bir etki saptanamadı.

Tablo 4.15. Rekürrens gelişen hastalarda diğerlerine göre istatistiksel olarak anlamlılık gösteren parametrelerin nüks gelişme zamanına etkisi.

	Rekürrens erken (<24 ay) n=18	Rekürrens geç (>24 ay) n=11	P
2DL1	18 (%100)	11 (%100)	1,0
2DL2	11 (%61,1)	7 (%63,6)	0,892
2DS2	7 (%38,9)	5 (%45,5)	0,728
2DS3	3 (%16,7)	4 (%36,4)	0,223
A-Bw4	15 (%83,3)	9 (%81,8)	0,644
C1 / İnhibitör KIR (+)	9 (%50)	6 (%54,5)	0,812
C2 / İnhibitör KIR (+)	8 (%44,4)	7 (%63,6)	0,316
2DL1-C2	18 (%100)	10 (%90,9)	0,379
2DL2-C1	10 (%55,6)	7 (%63,6)	0,668
2DL3-C1	9 (%50)	6 (%54,5)	0,812
2DS2-C1	7 (%38,9)	5 (%45,5)	0,728

İstatistiksel olarak anlamlı olan parametrelerin anastomoz hattında mı yoksa uzak metastaz olarak mı rekürrens gösterdiğini araştırmak için yapılan analiz sonucunda 2DS2'nin hem kendi başına hem de C1 ile beraber olduğunda uzak metastaz görülme olasılığının lokal rekürrensten daha fazla olduğu görüldü (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. İstatistiksel olarak anlamlı olan parametrelerin lokal anastomoz hattında rekürrens ve uzak metastaz arası fark yönünden araştırılması sonuçları.

	Rekürrens anastomoz hattında (n=16)	Uzak metastaz (n=13)	P
2DL1	16 (%100)	13 (%100)	1,0
2DL2	9 (%56,3)	9 (%69,2)	0,474
2DS2	4 (%25)	8 (%61,5)	0,047
2DS3	5 (%31,3)	2 (%15,4)	0,292
A-Bw4	14 (%87,5)	10 (%76,9)	0,396
C1/ İnhibitör KIR (+)	10 (%62,5)	6 (%37,5)	0,198
C2/ İnhibitör KIR (+)	5 (%39,7)	8 (%61,3)	0,588
2DL1-C2	15 (%93,8)	13 (%100)	0,552
2DL2-C1	8 (%50)	9 (%69,2)	0,296
2DL3-C1	7 (%43,8)	8 (%61,5)	0,34
2DS2-C1	4 (%25)	8 (%61,5)	0,047

5. TARTIŞMA

Rekürrens göstermeyen grup rekürrens gösterenle karşılaştırıldığında yaş, cinsiyet, klinik evre, tümör lokalizasyonu, adjuvan tedavi alması yönünden fark saptanmamıştır. Bu da KIR genotip ve ligandlarının etkisini araştırmak için uygun bir hasta gruplaması oluştuğunu göstermektedir.

Tümöre karşı immün yanıtta, tümör hücre yüzeyindeki HLA Class I ifadesinin kaybı tümör hücrelerini sitotoksik lenfosit aracılıklı hücrel immüniteden korumak için önemli bir savunma mekanizmasıdır. Sandel ve ark. (24) 88 olguluk hasta serisinde immünohistokimyasal olarak incelediklerinde HLA Class I ifadesinin olguların %72'sinde kısmen veya tamamen kaybedildiğini göstermişlerdir. Middleton ve ark. (30) ise 109 kolorektal kanser olgusunda yine immünohistokimyasal olarak tümör dokusunda olguların %42'sinde haplotip düzeyinde bir kayıp, %25'inde alelik veya tüm lokus düzeyinde kayıp saptamışlardır. Daha önce başka araştırmacılar tarafından da gösterilmiş olan tümör hücrelerinde HLA ifade kaybı bizim araştırmamızda sadece genotipik analiz kullanıldığı için araştırılamamıştır. Ancak, çalışmamızda gen ifadesi düzeyinde hem C1 hem de C2 ligandının saptanması HLA Class I'in haplotipik veya lokus düzeyinde kaybı olmadığı doğrultusunda bir bulgudur. Tümör hücre yüzeyinde KIR ligandının moleküler düzeyde ifadesi ancak immünohistokimyasal yöntem ile gösterilebileceği için ileride çalışmanın devamı olarak bu analizlerin yapılması sonuçların yorumuna açıklık getirecektir.

Kolorektal kanserlerde diğer tümörlerde olduğu gibi HLA Class I moleküllerinin varlığı hem hücrel hem de doğal immünite için gereklidir. Ancak hücrel immünite için koşul olan Class I moleküllerinin kaybı tümör hücrelerinin HLA dışı KIR ligandları aracılığıyla doğal immünitenin sitotoksik yanıtına açık hale getirir. Zira inhibitör KIR'lar aracılığı ile bireyin kendi dokularına karşı immün yanıt oluşturmamasını önleyen, otoimmüniteden koruyan, doğal immün sistemin koruyucu etkilerinden yoksun kalmıştır.

Bu araştırmada hedeflenen inhibitör KIR'ların rekürren olgularda daha sık gözleneceği ve aktivatör KIR'ların rekürren olmayan olgularda daha sık olacağı

hipotezinin kanıtlanmasıdır. Nitekim araştırmamızda hipotezi destekleyen ve antitezi ortadan kaldıran çok sayıda anlamlı bulguya ulaşılmıştır.

Aktivatör KIR'lerden olan 2DS2 ve 2DS3'ün rekürrens göstermeyen grupta olması bu KIR'ların tümör cevabının iyi olduğunu göstermektedir. İnhibitör KIR'lara baktığımızda 2DL1 rekürrens gösteren hastaların tamamında mevcuttur ve bu KIR'ların rekürrens göstermeyen grupta daha az görülmesi bu KIR'ların tümör gelişimine katkısı olduğunu düşündürmektedir. Buna karşılık inhibitör bir KIR olan 2DL2'nin beklenenin aksine rekürrens göstermeyen grupta daha fazla gözlenmiştir. Grup C1'i ligand olarak gören bu KIR, yine C1 aracılıklı olan aktivatör KIR 2DS2 ile birlikte hareket etmesi rekürrens göstermeyen grupta sık görülmesine yol açmaktadır. Grup C1 ve 2DS2 bulunan tüm olguların aynı zamanda 2DL2'nin bulunması 2DL2'nin bağımsız bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Aynı liganda bağlanan bir başka inhibitör olan 2DL3, birlikte hareket eden 2DS2 ve 2DL2'nin yokluğunda baskın rol oynamaktadır.

KIR ligandlarına baktığımız zaman A-Bw4 rekürrens gösteren grupta daha fazladır ve tümör gelişimine katkısı olduğunu düşündürmektedir. Bunun olası sebebi A-Bw4'ün ligandı olan 3DL2'nin herkeste bulunmasıdır. Diğer KIR ligandları iki grupta karşılaştırdığımızda kendi başlarına anlamlı bir fark göstermemiştir. Ancak bu ligandları kendilerine bağlanan KIR'lar ile beraber değerlendirdiğimizde; C1 ligandının kendine bağlanan 2DL2, 2DL3 ve 2DS2 KIR'ları istatistiksel olarak anlamlı fark yarattığı gözükmemektedir. C2 ise kendi inhibitör KIR'ı olan 2DL1 ile beraber anlamlı bir fark yaratmıştır.

NK hücre aracılıklı etkinin inhibitör veya aktivatör yönde olmasını belirleyen tüm mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak ileri sürülen literatür bilgisi inhibitör KIR'ların daha güçlü oldukları ve bunların yokluğunda aktivatör KIR'ların etkilerini gösterebildikleridir(27). Bu durumda antitümöral yanıtı oluşturan etkileri göstermek için inhibitör KIR yokluğunda aktivatör KIR bulunması beklenir. Bizim araştırmamızda da KIR ligandlarından C1, C2 ve Bw4'e bağlanan inhibitör KIR'lar incelendiğinde rekürrens gösteren olgularda sadece C1 için anlamlı düzeyde sıklık artışı gösterilmiştir. C1'e bağlanan inhibitör KIR bulunması durumu rekürrens gösterenlerde %51,7'ye karşılık % 22,4 (p=0,021) olarak bulunmuştur. Her ne kadar

istatistiki olarak anlamlı olmasa da C2'ye bağlanan inhibitör KIR varlığı durumu rekürrens gösterenlerde göstermeyenlere karşı %51,7'ye karşı %39,7 bulunmuştur.

Tekrarlayan olgular incelendiğinde 2DS2-C1 birlikteliği rekürren olgularda genel olarak daha seyrek gözlenirken anastomoz hattından ziyade rekürrens yerine uzak metastaza yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir. NK hücrelerinin etkilerinin radyasyon sonrası arttığı bilgisi dikkate alındığında olguların tedavi amacıyla radyoterapi almış olması lokal rekürrensi engellemek açısından NK hücre etkilerini kolaylaştırıcı bir faktör olabilir(22). Daha önce Sandel ve ark. tarafından tümör dokusu içerisinde Farklı CD56 ifadesine sahip NK hücrelerinin gösterildiği ve bunların antitümöral yanıtı katkıları bildirilmiştir (25). Cerrahi rezeksiyon ile lenfatik dokunun eksizyonu sonucunda lokal immün yanıtın nasıl bir modifikasyona yol açtığı cevabı araştırılması gereken bir soruya yol açmaktadır. İlaveten kolorektal kanserlerde HLA Class I kaybının ise uzak metastazları azalttığı bildirilmiştir (25).

Bizim araştırmamıza benzeyen tek çalışma Middleton ve ark. (30) tarafından gerçekleştirilmiş olup kolorektal kanserlerde hasta takip süresindeki davranışları dikkate almaksızın KIR genotipleri ve KIR ligandları incelenmiş. KIR ligandlarından HLA C'nin olguların %51'inde C1 ve C2 heterozigotluğu gözlenmiştir. Bizim araştırmamızda ise bu araştırmadan farklı olarak olguların %84'ünde C1 ve C2 heterozigotluğu gösterilmiştir. Bireyde hem C1 hem C2'nin birlikte bulunması, KIR aracılıklı NK etkilerinin ortaya çıkması için olasılıkları arttırmakta ancak; aktivatör veya inhibitör yönünde bir tercih belirleyici olmamaktadır. Middleton ve ark. 2006 ve 2010 yıllarında yayınlanan çalışmalarında normal popülasyon ile karşılaştırıldığında KIR genotiplerinin frekansında bir farklılık göstermemişlerdir. Bu araştırmacılar mesane, böbrek ve akciğer tümörlerinde inhibitör KIR'ların normal kontrollerden farklı olabildiği yönünde bulgular elde etmişlerdir.

Araştırmamız cerrahi tedaviyi takiben rekürrensin oluşmasında KIR genotiplerinin ve ligandlarının etkisini araştıran ilk çalışmadır. Hatta diğer solid tümörlerde araştırmamıza benzer bir kurgulama yapılarak KIR'ların etkisi henüz araştırılmamıştır. Aktivatör KIR'lardan olan 2DS2 ve 2DS3'ün rekürrens göstermeyen olgularda ilk gruba göre görülme sıklığının artmış olması ve 2DS2'nin ligandı olan C1 ile birlikteliğinin yine bu grupta artmış olması; buna karşılık inhibitör KIR'lardan olan 2DL1'in ve yine inhibitör bir KIR olan 3DL2'nin ligandını

gösteren A-Bw4 sıklığının azalması bu grupta aktivatör KIR'ların etki gösterdiğini, inhibitör KIR'ların ise etkisinin zayıfladığını düşündüren kuvvetli kanıtlardır. Her iki hasta grubunda da inhibitör KIR'lardan 2DL4, 3DL2 ve 3DL3'ün olguların tümünde bulunması bu KIR'ların antitümöral yanıtta belirleyici rolü olmadığını düşündürmektedir.

Rekürrens göstermeyen olgularda aktivatör KIR'ların artarak inhibitörlerden en az birinin anlamlı düzeyde azalması rekürrensin ortaya çıkış süresini ve ortaya çıktığı lokalizasyonu etkileyip etkilemediğini göstermek amacıyla 24 ay eşik değeri öncesi ve sonrası nüks gösteren olgularda sıklıkları karşılaştırıldı. Ancak aralarında anlamlı bir fark gösterilemedi.

Sonuç olarak araştırmamızda rekürrensin ortaya çıkmasını azaltabilecek aktivatör KIR'ların varlığını destekleyen bulgular NK hücre aracılıklı doğal immünitenin ancak bir bölümünü göstermektedir. NKG grubu KIR'ların araştırmamızda inceleyemediğimiz HLA-E gibi diğer ligandlar üzerinden de antitümöral etki göstermesi olasılıkları mevcuttur. İlaveten Kolorektal tümör dokusunda HLA Class I'in gen ifadesi korunurken hücre yüzeyinde ifadesinde kayıp olup olmadığını inceleyebilmiş değiliz. Tüm bu eksiklerimize rağmen aktivatör KIR'lar olan 2DS2 ve 2DS3'ün ligandları ile birlikte artarken inhibitör KIR 2DL1'in ligandı ile birlikte azalması klinik uygulamada bu özelliği taşımayan hastaların takibinde daha dikkatli izlem yapılmasını, metastatik hastalık oluşturma potansiyellerini dikkate alarak cerrahi uygulanabilir aşamada iken rekürrensin saptanması şansının kaçırılmamasını sağlayabilir.

6. SONUÇLAR

KIR'lar tek başına değerlendirildiğinde beklendiği üzere 2DL1 rekürren grupta, 2DS2 ve 2DS3 rekürrens göstermeyen grupta daha sık görülmüştür. 2DL2 beklenenin aksine rekürrens göstermeyen grupta daha siktir. Bunun sebebi ise grup C1'i ortak ligand gören aktivatör 2DS2'nin her zaman 2DL2 ile beraber görülmesi ve beraber bulunduklarında aktivatör yönde etki göstermeleridir. Bu durum KIR ve ligand birlikteliğinde de tekrar görülmektedir: 2DL1-C2 ve 2DL3-C1 birliktelikleri rekürrens gösterenlerde daha fazla, 2DS2-C1 ve 2DL2-C1 birlikteliği de rekürrens göstermeyenlerde daha fazladır. Ligandlar tek başlarına değerlendirildiklerinde ABw4 rekürren grupta daha sık görülmektedir. 2DS2 her ne kadar rekürrens göstermeyen grupta fazla olsa da, 2DS2 varlığında rekürrens geliştiğinde uzak metastaz gelişme riski lokal rekürrensten daha fazladır.

KAYNAKLAR

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer Journal for Clinicians* 2013;63(1):11-30.
2. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 1994;331(25):1669-74.
3. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 2003;348(10):919-32.
4. Ivanovich JL, Read TE, Ciske DJ, Kodner IJ, Whelan AJ. A practical approach to familial and hereditary colorectal cancer. *The American Journal of Medicine* 1999;107(1):68-77.
5. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *Journal of the National Cancer Institute* 2004;96(19):1420-5.
6. Devereux DF, Deckers PJ. Contributions of pathologic margins and Dukes' stage to local recurrence in colorectal carcinoma. *American Journal of Surgery* 1985;149(3):323-6.
7. Bruch HP, Schwandner O, Schiedeck TH, Roblick UJ. Actual standards and controversies on operative technique and lymph-node dissection in colorectal cancer. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie*. 1999;384(2):167-75.
8. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2000;124(7):979-94.
9. Wanebo HJ, Koness RJ, Vezeridis MP, Cohen SI, Wroblewski DE. Pelvic resection of recurrent rectal cancer. *Annals of Surgery* 1994;220(4):586-95; discussion 95-7.

10. Pacelli F, Tortorelli AP, Rosa F, Bossola M, Sanchez AM, Papa V, et al. Locally recurrent rectal cancer: prognostic factors and long-term outcomes of multimodal therapy. *Annals of Surgical Oncology* 2010;17(1):152-62.
11. Sagar PM, Pemberton JH. Surgical management of locally recurrent rectal cancer. *The British Journal of Surgery* 1996;83(3):293-304.
12. Bakx R, Visser O, Josso J, Meijer S, Slors JF, van Lanschot JJ. Management of recurrent rectal cancer: a population based study in greater Amsterdam. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2008;14(39):6018-23.
13. Bouchard P, Efron J. Management of recurrent rectal cancer. *Annals of Surgical Oncology* 2010;17(5):1343-56.
14. Jimenez RE, Shoup M, Cohen AM, Paty PB, Guillem J, Wong WD. Contemporary outcomes of total pelvic exenteration in the treatment of colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum* 2003;46(12):1619-25.
15. Heriot AG, Byrne CM, Lee P, Dobbs B, Tilney H, Solomon MJ, et al. Extended radical resection: the choice for locally recurrent rectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum* 2008;51(3):284-91.
16. Rhomberg W, Eiter H, Hergan K, Schneider B. Inoperable recurrent rectal cancer: results of a prospective trial with radiation therapy and razoxane. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 1994;30(2):419-25.
17. Hahnloser D, Nelson H, Gunderson LL, Hassan I, Haddock MG, O'Connell MJ, et al. Curative potential of multimodality therapy for locally recurrent rectal cancer. *Annals of Surgery* 2003;237(4):502-8.
18. Bedrosian I, Giacco G, Pederson L, Rodriguez-Bigas MA, Feig B, Hunt KK, et al. Outcome after curative resection for locally recurrent rectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum* 2006;49(2):175-82.
19. Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A. Hepatic metastases from colorectal carcinoma: impact of surgical resection on the natural history. *The British Journal of Surgery* 1990;77(11):1241-6.

20. Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF, Sumetchotimetha W, Rangsin R, Schulick RD, et al. Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Annals of Surgery* 2002;235(6):759-66.
21. Aloia TA, Vauthey JN, Loyer EM, Ribero D, Pawlik TM, Wei SH, et al. Solitary colorectal liver metastasis: resection determines outcome. *Archives of Surgery* 2006;141(5):460-6; discussion 6-7.
22. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012. x, 545 p. p.
23. Grizzi F, Bianchi P, Malesci A, Laghi L. Prognostic value of innate and adaptive immunity in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2013;19(2):174-84.
24. Sandel MH, Speetjens FM, Menon AG, Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, et al. Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Molecular Immunology* 2005;42(4):541-6.
25. Arthur JC, Jobin C. The complex interplay between inflammation, the microbiota and colorectal cancer. *Gut Microbes* 2013;4(3):253-8.
26. Romagne F, Andre P, Spee P, Zahn S, Anfossi N, Gauthier L, et al. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood* 2009;114(13):2667-77.
27. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP, Kuby J. *Kuby Immunology*. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2013. xxvii, 692, 109 p. p.
28. Dorak MT. Role of natural killer cells and killer immunoglobulin-like receptor polymorphisms: association of HLA and KIRs. *Methods in Molecular Medicine* 2007;134:123-44.
29. Hsu KC, Dupont B. Natural killer cell receptors: regulating innate immune responses to hematologic malignancy. *Seminars in Hematology* 2005;42(2):91-103.

30. Middleton D, Vilchez JR, Cabrera T, Meenagh A, Williams F, Halfpenny I, et al. Analysis of KIR gene frequencies in HLA class I characterised bladder, colorectal and laryngeal tumours. *Tissue Antigens* 2007;69(3):220-6.
31. Al Omar S, Middleton D, Marshall E, Porter D, Xinarianos G, Raji O, et al. Associations between genes for killer immunoglobulin-like receptors and their ligands in patients with solid tumors. *Human Immunology* 2010;71(10):976-81.
32. Naumova E, Mihaylova A, Stoitchkov K, Ivanova M, Quin L, Toneva M. Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients: prevalence of inhibitory over activating signals. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 2005;54(2):172-8.
33. Carrington M, Wang S, Martin MP, Gao X, Schiffman M, Cheng J, et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *The Journal of Experimental Medicine* 2005;201(7):1069-75.
34. Wisniewski A, Jankowska R, Passowicz-Muszyńska E, Wisniewska E, Majorczyk E, Nowak I, et al. KIR2DL2/S2 and HLA-C C1C1 genotype is associated with better response to treatment and prolonged survival of patients with non-small cell lung cancer in a Polish Caucasian population. *Human Immunology* 2012;73(9):927-31.
35. Inoue M, Mimura K, Izawa S, Shiraishi K, Inoue A, Shiba S, et al. Expression of MHC Class I on breast cancer cells correlates inversely with HER2 expression. *Oncoimmunology* 2012;1(7):1104-10.
36. Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Perez R, Rodriguez M, Fdez-Morera JL, et al. Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *The Journal of Infectious Diseases* 2005;192(1):162-5.
37. Besson C, Roetyneck S, Williams F, Orsi L, Amiel C, Lependeven C, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin's lymphoma in a familial study. *PloS One* 2007;2(5):e406.

38. Bonagura VR, Du Z, Ashouri E, Luo L, Hatam LJ, DeVoti JA, et al. Activating killer cell immunoglobulin-like receptors 3DS1 and 2DS1 protect against developing the severe form of recurrent respiratory papillomatosis. *Human Immunology* 2010;71(2):212-9.