

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**KOLON ADENOKARSİNOMLARINDA
LENFANJİOGENEZ VE PROGNOZU
BELİRLEMEDEKİ ROLÜ**

GÜRAY AKTÜRK

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2015

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**KOLON ADENOKARSİNOMLARINDA
LENFANJİOGENEZ VE PROGNOZU
BELİRLEMEDEKİ ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

GÜRAY AKTÜRK

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Özgül SAĞOL

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık tezimin hazırlanmasındaki danışmanlığı ve katkıları nedeniyle Prof. Dr. Özgül Sağol'a öncelikle olmak üzere, klinik verileri ve hasta listesini oluşturmadaki katkıları için Dokuz Eylül Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Selman Sökmen, Prof. Dr. Cem Terzi ve Doç. Dr. Aras Emre Canda'ya, tezimde elde edilen verilerin istatistiksel analizinin yapılmasındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Hülya Ellidokuz'a ve ayrıca tıpta uzmanlık eğitimim boyunca sağladıkları katkılar nedeniyle Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığı, öğretim üyeleri, tıpta uzmanlık öğrencileri ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Dr. Güray Aktürk

İzmir, 2015

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	III
RESİM LİSTESİ	III
KISALTMALAR	IV
ÖZET	VI
ABSTRACT	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1 Genel Bilgiler	1
1.1.1 Kolorektal Karsinom Tanımı ve Genel Özellikleri.....	1
1.1.2 Epidemiyoloji	1
1.1.3 Risk Faktörleri	2
1.1.4 Hastalığın Doğal Süreci	3
1.1.5 Patogenez	4
1.1.6 Patolojik Özellikler	9
1.1.7 Tedavi	16
1.1.8 Prognostik Faktörler	18
1.2 Lenfanjiyogenez.....	26
1.2.1 Tümör lenfangiogenезisi ve klinik ilişkisi.....	27
1.2.2 Tümör lenfanjiogenезisinin mekanizmaları.....	29
1.2.3 Lenfanjiogenезisin moleküler mediatörleri.....	30
2. MATERYAL VE METOD	33
2.1 Hasta Seçimi ve Klinikopatolojik Parametreler	33
2.2 Histopatolojik Değerlendirme ve İmmunhistokimya	33
2.3 İstatistiksel analiz.....	35
3. SONUÇLAR	35
3.1 Klinik bulgular	35
3.2 Patolojik bulgular.....	36
3.3 Lenf damarı morfometrik ölçümlerine ait bulgular.....	37
3.4 Olguların klinikopatolojik özellikleri ve sağkalım ile ilişkisi	37
3.5 Olguların klinikopatolojik özellikler ve nodal metastaz ile ilişkisi.....	42
3.6 Olguların klinikopatolojik özellikleri ve lenf damarı ölçüm parametreleri ile ilişkisi.....	44
4. TARTIŞMA	45
5. SONUÇLAR	50
6. KAYNAKLAR.....	51

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Kolorektal Karsinomların Histolojik Sınıflaması

Tablo 2: Görüntü analizi programı (3D Hitech- Histoquant) ile hesaplanan parametreler

Tablo 3: Olguların klinikopatolojik özellikleri ve sağkalım ile ilişkisi

Tablo 4: Olguların lenf damarı ölçüm parametreleri ile sağkalım ilişkisi

Tablo 5: Multivariate lojistik regresyon sağkalım modeli

Tablo 6: Olguların klinikopatolojik özellikleri ve nodal metastaz ile ilişkisi

Tablo 7: Olguların lenf damarı ölçüm parametreleri ile nodal metastaz ilişkisi

Tablo 8: Klinikopatolojik parametreleri ile lenf damar yoğunluğu parametreleri ilişkisi

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Doku dizini blokları

Resim 2: D2-40 pozitif intratümöral lenfatik damarlar ve görüntü analizi

KISALTMALAR

KRK: Kolorektal karsinom

USG: Ultrasonografi

BT: Bilgisayarlı tomografi

MR: Manyetik rezonans

SEER: Surveillance, Epidemiology and End Results

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

NSAİİ: Nonsteroid antiinflamatuvar ilaç

SSA/P: Sesil serrated adenom/polip

CAMF: CpG adası metilatör fenotipi

KIN: Kromozomal instabilite

MSI: Mikrosatellit instabilite

MMT: Mismatch tamir

FAP: Familial adenomatöz polipozis

GSK3beta: Glikojen sentetaz 3-beta

CAP: College of American Pathologists

TME: Total mezorektal eksizyon

AJCC: American Joint Committee of Cancer

HNPk: Herediter nonpolipozis koli

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

VI: Venöz invazyon

LVI: Lenfovasküler invazyon

LI: Lenfatik invazyon

PNI: Perinöral invazyon

TT: Tümör tomurcuklanması

STD: Serbest tümör depoziti

IPL: İntra/peritümöral lenfosit

H&E: Hematoksilen&eoizin

BBA: Büyük büyütme alanı

DEP: Dolaşan endotelyal progenitörler

DEH: Dolaşan endotelyal hücreler

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VEGFR: Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

PDGF: Platelat derived büyüme faktörü

Ang: Angiopoetin

HGF: Hepatosit büyüme faktörü

IGF: İnsulin benzeri büyüme faktörü

DBB: Doku dizini bloğu

LDD: Lenfatik damar dansitesi

ÖZET

KOLON ADENOKARSİNOMLARINDA LENFANJİOGENEZ VE PROGNOZU BELİRLEMEDEKİ ROLÜ

Dr. Güray AKTÜRK

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD

g.akturk@gmail.com

Amaç: Kolorektal kanserler (KRK) tedavi ve araştırma alanında çok sayıda gelişmeye rağmen dünyada kanser ölümlerinin en başta gelen nedenlerinden biri olmayı sürdürmektedir. Bu tümörler sıklıkla lenf nodlarına lenfatikler yoluyla yayılırlar ve sonuç olarak meydana gelen nodal metastaz mortalitenin en başta gelen nedenleri arasında yer alır. Nodal metastaza ve sağkalıma etkisi literatürde yaygın şekilde araştırılan intratümöral lenfatiklerin hematoxilen&eozen boyalı kesitlerde değerlendirilmesi güçtür ancak son on yılda lenfatik endotel hücrelerine spesifik belirteçlerin keşfedilmesiyle birlikte lenfanjiogenezin önemini araştırılan çalışmalar da hızla artmıştır. KRK'larda lenfanjiogenezin çeşitli tiplerinin prognozla ilişkili olduğuna dair literatürde çelişkili çok sayıda veri bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı KRK'larda intratümöral lenfanjiogenez görüntü analizi yöntemi ile kantifiye ederek, sağkalım ve diğer klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmaya cerrahi olarak tedavi edilmiş ve bir kısmı adjuvan tedavi almış 304 KRK olgusu dahil edilmiştir. İntratümöral lenfanjiogenez, doku dizini bloklarından elde edilen kesitlere D2-40 antikoru uygulanarak morfometrik olarak değerlendirilmiştir. Lenfatik damarlanma; seçilen damarların toplam sayısı (NO), seçilen damarların toplam alanı (MA), birim alanda saptanan damarların sayısı (fNO) ve birim alanda saptanan damarların alanı (fMA) parametreleri ile görüntü analizi programında kantifiye edilmiştir. Elde edilen ölçüm değerlerinin sağkalım ve diğer klinikopatolojik değişkenlerle ilişkisi istatistiksel olarak araştırılmıştır. İstatistiksel olarak tek değişkenli analizlerde Ki-Kare Testi, bağımsız örneklem T testi, Pearson ve Kendall's korelasyon analizi kullanılmıştır. Çok değişkenli analizde ise Binary Lojistik Regresyon modeli oluşturulmuştur. Klinik veri yaşam analizinde Kaplan Meier Testi modeli ile değerlendirme yapılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ kabul edilmiştir.

Bulgular: Hastalarımızda düşük sağkalım ile nüks(p=0.000), uzak metastaz(p=0.000), adjuvan tedavi alınması(p=0.005), ileri yaş(p<0.001), yüksek pT(p=0.019) ve pN evresi(p=0.015), venöz invazyon(p=0.002), perinöral invazyon(p=0.012), serbest tümör depoziti bulunuşu (p=0.036) ve radial cerrahi sınır pozitifliği(p=0.007) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur. Yüksek MA(p=0.009), fMA(p=0.034), NO(p=0.023), fNO(p=0.013) değerleri ile artmış sağkalım arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir. Sağkalım bağımlı değişkeni temel alınarak yapılan çok değişkenli logistic regresyon analizinde, adjuvan tedavi uygulanması (p=0.000), nüks (p=0.000), pT evresi (p=0.026) ve venöz invazyon (p=0.038) varlığı en güçlü anlamlı parametreler olarak ortaya çıkmaktadır. Lenf damarı ölçüm değerleri ise bu analizde anlamlı bulunmamıştır. Nüks varlığı(p=0.000), uzak metastaz varlığı(p=0.000), ileri pT evresi(p=0.000), derecenin yüksekliği (p=0.015), lenfatik invazyon (p=0.000), perinöral invazyon(p=0.000), venöz invazyon(p=0.000), serbest tümör depoziti varlığı(p=0.000) ve radial cerrahi sınır pozitifliği(p=0.001) ile nodal metastaz varlığı arasında anlamlı ilişki vardır. Lenf damar ölçüm parametrelerinin tümünün yüksek değerleri ile düşük nüks ve uzak metastaz sıklığı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Düşük (pT1+pT2) evre olgularda yüksek evreliler (pT3+pT4) ile karşılaştırıldığında yüksek fNO değerleri saptanmıştır (p=0.049). Lenf damar ölçüm parametreleri, nodal metastaz ve pN evresi ile anlamlı ilişki göstermemektedir.

Sonuç: Bu çalışmada elde edilen sonuçlar KRK'larda artmış intratümöral lenfanjiyogenezisin artmış sağkalımla ilişkili olduğunu göstermektedir. Bunun yanısıra MA, fMA, NO ve fNO değerleri yüksek olan vakalarda nüksün ve uzak metastazın da daha az sıklıkta görüldüğü de tespit edilmiştir. Benzer şekilde fNO değerinin yüksekliği düşük pT evresi ile ilişkili bulunmuştur. Bununla birlikte hiçbir lenf damar ölçüm değeri, nodal metastaz ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki göstermemektedir. Bu bulgular KRK'larda intratümöral lenfanjiyogenezin nodal metastazı belirlemede etkin olmadığı ancak iyi prognozla ilişkili olduğunu göstermektedir.

ABSTRACT

LYMPHANGIOGENESIS AND ITS PROGNOSTIC VALUE IN COLON ADENOCARCINOMAS

Dr. Guray AKTURK

Dokuz Eylul University School of Medicine Department of Pathology

g.akturk@gmail.com

Aim: Colorectal cancers (CRC) continue to be one of the leading cause of cancer related deaths worldwide despite there are many advances in the treatment and research. These tumors disseminate to the lymph nodes frequently through lymphatic vessels and the nodal metastasis occurring as a result is one of the leading cause of mortality. It's very difficult to evaluate the intratumoral lymphatic vessels on the H&E stained slides, however studies on lymphangiogenesis were increased rapidly in number after the discovery of markers which are specific to the lymphatic endotelial cells. There are many conflicting studies about the impact of intratumoral lymphangiogenesis on prognosis in CRC. The aim of this study is; to quantify intratumoral lymphangiogenesis automatically through image analysis software, and to determine the relationship with survival and other clinicopathological factors in CRC.

Material and Methods: 304 CRC patients who were treated with surgery, were included in this study and some of these patients had also received adjuvant therapy after surgery. Intratumoral lymphangiogenesis was evaluated from slides , prepared from tissue microarray paraffin blocks and stained with D2-40 antibody. Intratumoral lymphatic vasculature was quantified in image analyse software as total number of selected vessels (NO), total area of selected vessels (MA), number frequency of vessels in a unit area (fNO), and area frequency of vessels in a unit are (fMA). The relationship of lymphatic vessel measurement values with survival and other clinicopathological variables analyzed statistically. Chi-Square analyse, independent samples T test, Pearson and Kendall's correlation analyse were applied for univariate analysis. Binary lojistik regresion model was designed for multivariate analysis. Kaplan Meier test model was used for the survival analysis. Statistical significance in this study was set at $P \leq 0.05$.

Results: There was statistically significant relationship between recurrence($p=0.000$), distant metastasis($p=0.000$), adjuvant therapy use ($p=0.005$), higher pT($p=0.019$) and pN stage($p=0.015$), venous invasion($p=0.002$), perineural invasion($p=0.012$), tumor deposits ($p=0.036$) and radial margin positivity($p=0.007$) with low survival. Higher MA($p=0.009$), fMA($p=0.034$), NO($p=0.023$), fNO($p=0.013$) values were significantly associated with better survival. Adjuvant therapy($p=0.000$), recurrence($p=0.000$), pT stage($p=0.026$) and venous invasion($p=0.038$) were the most powerful prognostic variables in binary logistic regression model which was designed based on the survival status. Lymphatic vessel measurement values were not statistically significant in this binary logistic regression model. When considering nodal positivity, there was statistically significant relationship between presence of recurrence($p=0.000$), distant metastasis($p=0.000$), lymphatic invasion($p=0.000$), perineural invasion($p=0.000$), venous invasion($p=0.000$), tumor deposits($p=0.000$), higher pT stage($p=0.000$), higher grade($p=0.015$) and radial margin positivity($p=0.001$) with presence of nodal metastasis. Statistical significance was found between higher lymphatic vessel measurement values with lower frequency of recurrence and distant metastasis. Lower pT stage (pT1+pT2) and higher fNO values were positively correlated ($p=0.049$). However we couldn't find any statistically significant relationship between lymphatic vessel measurement values with nodal metastasis and pN stage.

Conclusion: The results obtained from this study indicates that intratumoral lymphangiogenesis is related with increased survival. We also found that recurrence and distant metastasis are less often seen in patients with higher MA, fMA, NO and fNO values. Similarly higher fNO values were correlated significantly with lower pT stage . However none of the lymphatic vessel measurement values were associated with nodal metastasis. All of these findings indicate that intratumoral lymphangiogenesis has no value in predicting nodal positivity however it is associated significantly with better survival in many ways.

1. GİRİŞ

1.1 Genel Bilgiler

1.1.1 Kolorektal Karsinom Tanımı ve Genel Özellikleri

Kolorektumdan köken alan malign epitelyal tümördür. Kolon ve rektum tümörleri için “karsinom” teriminin kullanımı muskularis mukozadan submukozaya invazyon olmasını gerektirir. Kolorektal karsinomların (KRK) yaklaşık %85' i tipik adenokarsinomdur; kalan grubu ise farklı histolojik tipler oluşturur [1].

Erken evre KRK'lara genellikle başka bir sebeple yapılmış kolonoskopi veya görüntüleme sırasında tanı konur ve genellikle semptom ve/veya diğer laboratuvar bulgular gözlenmez. İlerlemiş tümörler, dışkılama alışkanlıklarında değişiklik, konstiptasyon, abdominal distansiyon, hematokezya veya tenesmusu içeren klinik bulgularla ortaya çıkarlar. Bahsedilen bu bulgular baskın olarak sol taraf tümörleri için önem taşır. Sağ taraf tümörleri ise genellikle bitkinlik, kilo kaybı ve anemi gibi spesifik olmayan sistemik bulgularla ortaya çıkarlar. Hastaların sadece %40'ı tanı anında lokalize hastalığa sahiptir ve yaklaşık %20 hastada uzak metastaz bulunur[2]. Standart tanısal yaklaşım endoskopi ve biyopsidir. Bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans (MR) invazyon derinliğini, bölgesel yayılımı ve uzak metastazı değerlendirmek için kullanılır. Rektal MR rektal kanserlerin lokal yayılımını değerlendirmek için altın standarttır. Transrektal Ultrasonografi (USG) ise erken lezyonlarda rektal MR'a alternatif bir yöntemdir.

Çeşitli tarama önerileri American Gastroenterological Association, American Medical Association ve American Cancer Society tarafından oluşturulmuştur. Standart rehberler, kişisel veya ailesel kolorektal adenom veya karsinom hikâyesi olan bireylere göre modifiye edilmiştir[3]. Tarama klinik olarak efektif ve etkin maliyetlidir, fakat kullanımı henüz düşük seviyededir. Tarama kolonoskopisi poliplerin çıkarılması açısından önem taşır ve polipektominin KRK'u önlediği artık iyi bilinmektedir. KRK ölümlerinin tahminen %90'ı , KRK'un erken tanısı, polip yönetimi ve taramayı geliştirmeyi hedefleyen stratejiler, diyet değişikliği ve egzersizlerin artırılmasını kapsayan hayat tarzı değişikliğinin sağlanması ile engellenebilir[3].

1.1.2 Epidemiyoloji

Tüm kanserlerin %9.2'sini oluşturan ve her yıl yeni bir milyon vakanın görüldüğü KRK'lar, erkeklerde en sık 4. (sırasıyla akciğer, prostat ve midenin ardından) ve kadınlarda

en sık 3. tümördür (sırasıyla meme ve serviksin ardından)[3-5]. Yüksek riskli bölgeler (Avusturalya, Yeni Zelanda, Avrupa, Amerika ve Japonya gibi refah seviyesi yüksek bölgeler) ile düşük riskli bölgeler (Afrika, Hindistan ve güneydoğu Asya gibi gelişmekte olan ülkeler) arasında insidans bakımından 25 kata varan belirgin bir fark bulunmaktadır[4]. Özellikle diyet, alkol alımı ve fiziksel aktiviteyi içeren çevresel etkenlerinin olası rolünün bu farkın ortaya çıkmasındaki rolü çok sayıda çalışma ile desteklenmektedir.

Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) 2012 yılında yaklaşık 103170 yeni kolon kanser olgusu ve 40290 yeni rektal kanser olgusu ortaya çıkmıştır[5]. Genel olarak bakıldığında KRK, kansere bağlı ölümlerin ikinci en önemli sebebidir ve bu konuda akciğer kanserinin hemen arkasından gelmektedir[3]. Sigara içmeyenler arasında ise kanserden ölümlerin en sık sebebidir[3]. KRK gelişimi açısından ömür boyu risk yaklaşık %5 civarlarındadır[3,6]. ABD Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Programı istatistikleri kolon karsinomu için 100.000'de 30.45 ve rektal karsinom için 100.000'de 12.16'lık bir insidansı ortaya çıkarmıştır[3]. KRK erkeklerde önemli oranda daha sıktır (kombine insidans erkekteki 54.0/100.000'e karşı kadında 40.2/100.000); bu farklılık rektal kanser için kolon kanserine kıyasla daha belirgindir ve erkeklerdeki artmış insidans sadece 50 yaşından sonra belirgin olarak gözlenmektedir[2,3]. Erkeklerdeki yüksek insidansa rağmen, kadınlar daha uzun yaşamaktadır[2]. Bu nedenle toplam vaka sayısı ve kansere bağlı ölümlerin sayısı erkekler ve kadınlar arasında benzerdir. 1987'den beri ABD'de kolon kanseri insidansı yavaşça düşmektedir[7]. İnsidans yaş ile artmaktadır ve vakaların yaklaşık %9'u 50 yaş öncesi ortaya çıkmakta iken yaklaşık %1'i 35 yaş öncesi ortaya çıkmaktadır[2,3].

1.1.3 Risk Faktörleri

KRK riski hem endojen hem de ekzojen faktörlerden etkilenir. Genetik yatkınlık ve uzun süreli inflamatuvar bağırsak hastalığının bulunması en fazla direkt etkiye sahip risk faktörleridir. Yaş KRK için en güçlü risk faktörüdür. KRK baskın olarak orta-ileri/ileri yaşa sahip bireylerin hastalığıdır[2]. Erkeklerdeki artmış riskin hormonal durumdaki farklılıklarla ilişkili olduğu da düşünülmektedir[8].

Diğer risk faktörleri geniş çapta yaşam tarzı ile ilişkilidir [9]. En önemli yaşam tarzı ilişkili faktörler; obezite, fiziksel aktivite azlığı, kırmızı et, işlenmiş et ve alkol tüketimidir. Bu modifiye edilebilir risk faktörleri arasında en çok çalışılan ve üzerinde durulan faktör diyetdir. Batı tipi diyetin artmış riskle ilişkili olup olmadığına dair çok az şüphe bulunmasına karşın, bu diyetin hangi komponentlerinin bu konuda en önemli olduğunu belirlemek çok zordur. Yüksek kalori içeren, etten zengin ve özellikle hayvan yağından zengin beslenmenin birçok

çalışmada artmış riskle ilişkili olduğu gösterilmiştir[10,11]. Bu etki için en olası mekanizmalar heterosiklik aminler, yüksek düzeyde fekal safra asit üretiminin stimülasyonu, reaktif oksijen türevlerinin artmış üretimi ve artmış insülin düzeyleridir[12]. Bunların yanısıra sebze ve lifli yiyecek tüketiminin riski azaltan faktörler olduğu bilinmektedir. [13,14]. Riski düşüren faktörlerin bu etkisinin, antikarsinojenler, antioksidanlar, folat, detoksifiye enzimlerin indüksiyonu, luminal karsinojenlerin bağlanması, volatil yağ asitleri üreten fiber fermentasyonu veya epitelle temas süresinin daha hızlı transit sebebiyle azalması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir[13]. Çalışmalar bol miktarda folat alımının KRK açısından düşük riskle ilişkili olduğunu göstermektedir[15]. Buna karşın, alkol alımı KRK için artmış risk ile ilişkilidir[16].

KRK riski ve nonsteroid antiinflamatuar ilaç (NSAİİ) kullanımı arasında ters orantılı bir ilişki bulunmaktadır[17]. Sigara kullanımı ise, sigarayla güçlü ilişki gösteren kanserler kadar olmasa da KRK için artmış riskle ilişkilidir[18]. Sedanter yaşam tarzı, uzun süreli inflammatuar bağırsak hastalıkları, pelvik radyasyon ve üreterosigmoidostomi de KRK riskini artırır.

Son yıllarda proksimal kanserlerde epidemiyolojik risk faktörlerindeki değişikliklerle ilişkili olabilecek bir artış bildirilmektedir. Ayrıca sağ ve sol lokalizasyonlu KRK'lar arasındaki moleküler biyolojik farklılıklar, birbirinden farklı epidemiyolojik ilişkileri desteklemektedir [19].

Genetik polipozis sendromları tüm kolorektal kanserlerin %0,5'inden azını oluşturmaktadır. Herediter kolorektal karsinomun nonpolipozis formları KRK oluşumuna diğer herediter durumlara göre daha sık katkı yapar.

1.1.4 Hastalığın Doğal Süreci

KRK'un total sağkalım oranları 1, 5 ve 10 yıl için sırasıyla %83, %64 ve %58'dir. Çoğu solid tümör gibi bu tümörlerde de sağkalım bölgesel hastalık ve uzak metastaz varlığı ile ilişkilidir. Lokalize hastalıkta sağkalım oranı %90, bölgesel metastazda sağkalım oranı %69 ve uzak metastazda sağkalım oranı %12'dir. Bununla birlikte ancak %39 olguya lokalize hastalık tanısı verilebilmektedir.

KRK'larda patolojik evreleme bağırsak duvarına ve çevre yapılara invazyon derinliği, bölgesel lenf nodlarına yayılım ve uzak metastazı temel alır[20]. Progresyonla birlikte, tümörler peritona penetre olabilir ve intraabdominal yayılım veya diğer abdominal ve pelvik yapılara invazyon ile sonuçlanabilir. Lenfatikler veya kan damarları yoluyla yayılım hastalığın gelişimi sırasında herhangi bir zamanda ortaya çıkabilir. Ayrıca kanser, portal ven

dallarını invaze edebilir , karaciğer metastazına yol açabilir ya da vena kava yoluyla akciğer, kemik iliği ve diğer uzak metastazlara yol açabilir.

1.1.5 Patogenez:

1.1.5.1 Adenomdan karsinoma progresyon:

KRK'lar genellikle konvansiyonel adenomlar, sesil serrated adenomlar/polipler ya da traditional serrated adenomlardan gelişirler[21,22]. KRK'ların yaklaşık %10-30'unda rezidüel adenom tespit edilebilir; kalanlarda ise adenom muhtemelen büyüyen kanser tarafından yok edilmiştir. Prekürsör lezyonun histolojik tipi ile bu prekürsörden gelişmiş KRK'un patogenezi arasında belirgin bir ilişki mevcuttur. Bu bize kolorektumda neoplastik progresyon ile ilişkili iki geniş yolak olduğunu göstermektedir; konvansiyonel adenom yolağı ve serrated adenom/polip yolağı (SSA/P).

Konvansiyonel adenom yolağı tüm KRK'ların yaklaşık %70-80'ini oluşturur ve sağ kolona kıyasla sol kolon ve rektumda çok daha sık görülür. Konvansiyonel adenomlar tipik olarak yaklaşık 15 yılda kansere dönüşürler. ABD popülasyonunda konvansiyonel adenomların prevalansı 50 yaş itibariyle yaklaşık %25 ve 70 yaş itibariyle %50'dir. Bu poliplerin progresyonunun risk faktörleri kesin olarak bilinmemekle birlikte, bir çalışma 1 cm'lik konvansiyonel adenomda 10 yıllık %10-15 progresyon riski olduğunu bildirmektedir[23]. Konvansiyonel adenomların endoskopik olarak çıkarılması, bu hastalarda KRK insidansını düşürür.

Serrated adenom yolağı hakkında son 10 yılda bilgiler artmıştır ve bu yolağın tüm KRK'ların %20-30'unu oluşturduğu düşünülmektedir[24]. Özellikle sağ kolonda olmak üzere; serrated adenom yolağından gelişen çoğu KRK SSA/P'ten gelişmektedir. KRK tipik olarak bu polipler içindeki displazi odaklarının gelişimi ile ortaya çıkmaktadır. Tarihsel olarak bakıldığında, konvansiyonel endoskopik tarama programları çoğunlukla sağ taraflı KRK'ları azaltmada daha az efektif olmuşlardır çünkü daha önceden çoğuna hiperplastik polip tanısı verilen serrated poliplerden progresyon riski geçmişte bilinmemektedir. Bu poliplerin progresyon riski tam anlamıyla karakterize edilemese de malign potansiyelleri olan bu poliplerin endoskopik olarak tümüyle çıkarılması gerekmektedir. Endoskopik izlem programları konusunda bu konuda tartışmalar devam etmektedir çünkü serrated poliplerin tanınması, endoskopik olarak tam çıkarılabilmesi zordur ve bu lezyonların altında yatan genetik instabiliteler küçük poliplerde bile KRK gelişimiyle sonuçlanabilir. Traditional serrated adenomlar da KRK geliştirebilir; bununla birlikte bu lezyonlar daha az sıklıkta

görülür ve progresyon riski daha düşüktür. Özellikle sol kolonda olan konvansiyonel hiperplastik polipler bile nadiren kansere progrese olabilir.

Aberran kript foküsleri kolorektal neoplazilerin en erken evrelerini temsil eder ve makroskopik olarak belirgin adenomatöz polipler gelişmeden önce de bulunurlar[25]. Aberran kript foküsü diseksiyon mikroskobu altında metilen mavisi boyanmış ve soyulmuş mukozal tabakaların incelenmesi ile tanınabilen mikroskopik lezyonlardır. Bunlar kript boyutunda artış gösteren, serrasyon ve yarık benzeri görüntü veren döşeyici epitel hücrelerinin sayısında artışı ile karakterize lokalize kript birikimleridir. Aberran kript foküsünün histolojik kesitlerinde normal epitel veya daha tipik olarak serrated poliplerde görülen ve nadiren gerçek displazi özellikleri gösteren hiperplastik epitel izlenebilir. Aberran kript foküsü endoskopik olarak da görüntülenebilir, ancak bu metodların teknik zorlukları rutin klinik yöntemler arasına girmesine engel olmaktadır.

Herhangi bir rezidüel adenom kanıtı bulunmayan çok küçük (<1cm) karsinomların bildirilmesi bazı kanserlerin de novo da gelişebildiği ihtimalini ortaya koymaktadır[26]. Bu kanserler tüm KRK'ların %5'inden azını temsil etmektedir. Bazı çalışmalar bu lezyonların genellikle adenom zemininde gelişmiş karsinomlardan daha yüksek dereceli olduğunu ve lenfatik veya kan damarı invazyonu riskinin daha yüksek olduğunu öne sürmektedir[26]. Bununla birlikte diğer çalışmalar bu hipotezi desteklememektedir. Hornick ve arkadaşları displastik komponent içermeyen küçük karsinomların minimal displastik komponent içeren küçük karsinomlar ve konvansiyonel büyük karsinomlar ile benzer klinik ve moleküler karakteristik taşıdığını bildirmiştir[27]. Ayrıca bu lezyonların bazılarının yüksek dereceli genetik değişiklikleri (anöploidi, TP53 mutasyonları gibi) erken kazanıp küçük adenomlardan kansere hızla progresyonu temsil etme ihtimali de mevcuttur[26].

1.1.5.2 Kolorektal Kanser Progresyonunun Genetik Modeli

İnsan kanserleri onkojenleri aktive eden ya da tümör süpresör genleri inaktive eden çeşitli genetik değişikliklerin birikimi ile karakterizedir. Genetik değişikliklerin bu birikimi adenomdan karsinoma progresyonda kritik öneme sahiptir ve muhtemelen neoplazinin morfolojik özelliklerini göstermeyen aberran kript foküsü veya diğer prekürsör hücrelerde başlar[28]. Çoğu KRK'da tipik olan genetik değişikliklerin birikimi için tümör hücreleri, normal kript epitel hücrelerine kıyasla daha yüksek oranda mutasyon ve epigenetik değişiklik kazanmalıdırlar. Mutasyonların artmış kazanımı ve toleransı KRK gelişiminin temelidir ve genom instabilitesi olarak adlandırılır. Genomun devamlılığını sağlamada görevli genlere

genomun bakıcıları denir. Kolorektal neoplazi gelişimi için önemli olan genom instabilitesinin en az iki genel formu bulunmaktadır: Kromozomal instabilite (KIN) ve mikrosatellit instabilite (MSI)[29]. KRK gelişimi için üçüncü majör yolak ise epigenetik gen susturulmasıdır (CpG adası metilatör fenotipi veya CAMF)[29].

1.1.5.3 Kromozomal instabilite:

KIN kromozomal materyalin sürekli olarak artmış oranda kazanımı ve kayıpları ile karakterizedir ve KRK'ların %70-80'inde bulunmaktadır. Kromozom sayısında anomali oluşması anöploidi ile sonuçlanır. KRK'lar kromozom sayı anomalisine ek olarak, kromozom kollarındaki anomaliler ve kromozomal fokal kazanım/kayıpları içeren somatik kopya sayısı anomalilerini de içerirler. Çoğu çalışma mitotik iğciklerin bir araya toplanmasının ve ayrılmasının düzenlenmesi ile ilişkili genlere odaklanmasına karşın, insan kanserlerinde anöploidinin genetik temeli net olarak henüz anlaşılamamıştır. KIN konvansiyonel adenom-karsinom progresyon yolağının altında yatan temel genetik aberasyondur ve bu yüzden sol taraflı kolorektal neoplazilerin baskın instabilite formunu oluşturur[30].

1.1.5.4 Mikrosatellit instabilite:

Mikrosatellit instabilite (MSI) tekrarlayan DNA sekanslarının boyutlarında yaygın değişikliklerle karakterizedir. Kolorektal karsinomların yaklaşık %10-15'inde bulunur[31]. MSI, defektif DNA mismatch tamiri (MMT) nedeniyle oluşur. MSI tekrarlayan DNA sekanslarının boyut değişikliklerine ek olarak kodlayıcı sekanslarda mutasyonlar ile sonuçlanır (somatik hipermutasyon). Genelde MSI'li KRK'lar kromozom sayı anomalilerine veya KIN'li kanserlerde tipik olan fokal subkromozomal kazanım veya kayıplara sahip değildirler. MSI'li çoğu KRK'da altta yatan MMT fonksiyon defekti MLH1 genindeki promotor bölgenin epigenetik CpG adası hipermetilasyonu sebebiyle oluşur. Bu defekt serrated neoplastik adenom yolağından oluşan çoğu KRK'un karakteristik özelliğidir ve bu kanserlerin çoğu yüksek sıklıkta CAMF'ne sahiptir[32]. MSI ayrıca lynch sendromu kanserlerinin progresyonunun altında yatan mekanizmadır. Lynch sendromunda MSI konvansiyonel adenomlarda gelişir ve hızla kansere progresyona neden olur.

1.1.5.5 CpG Adası Metilatör Fenotipi (CAMF):

CAMF, genlerin promotor bölgelerinde CpG dinükleotidlerinin yaygın hipermetilasyon kazanımıdır[33]. Epigenetik değişiklik sayıldığı için (çünkü DNA sekansını

değiştirmez); TP16, CDH1 ve MLH1 gibi tümör supresör genlerinin inaktivasyonunda temel mekanizmayı oluşturur. Çoğu KRK'da meydana gelen sınırlı metilasyon susturulmasına tezat teşkil eden aynı kanserde meydana gelen yaygın CpG ada metilasyonu yüksek frekanslı CAMF (CAMF-H) olarak bilinmektedir[31]. CAMF-H serrated yolaktan meydana gelen KRK'ların karakteristik özelliğidir ve MLH1 hipermetilasyon susturulmasının bulunduğu KRK'ların yaklaşık %20-30'unda bulunmaktadır. CAMF-H fenotipinin altında yatan genetik temel net olarak anlaşılamamıştır fakat genetik faktörlerin ve çevresel maruziyetlerin (sigara içini, östrojen çekilmesi gibi) serrated yolak karsinomlarının gelişimi ile ilişkili olabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Genetik ve epidemiyolojik faktörlerin sağ kolonun serrated poliplerinde MLH1, MGMT ve ilişkili diğer önemli genlerde anormal metilasyon olaylarına katkıda bulunduğu da düşünülmektedir. Tahminen bu olaylar displaziden adenokarsinoma progresyona yol açmaktadır. Bunlar sonucu oluşan karsinomlar bazı yazarlar tarafından serrated adenokarsinom olarak adlandırılır ve bu karsinomlarda moleküler fenotiplemede genelde MSI-H veya CAMF-H veya her ikisi birden bulunur[34].

1.1.5.6 Progresyon yolaklarının tarama ve önleme ile ilişkisi:

Tarama kolonoskopisi sol taraf KRK'larının önlenmesinde sağ tarafa göre daha etkilidir ve bu farkın sağ kolondaki serrated adenom-karsinom progresyonuna kıyasla sol kolondaki konvansiyonel adenom-karsinom progresyon yolağının baskınlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Sağ taraf kolon kanserlerini sol taraf kanserleri ile aynı derecede önlemede taramanın başarısızlığının sebebi SSA/P'lerin endoskopik tanınmalarındaki zorluktan ve moleküler patogenetik karakteristiklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir[21,35]. Serrated poliplerin tam eksizyonu çok daha zordur ve bu direkt olarak kolonoskopik tarama başarısızlığına yol açmaktadır. Serrated polipler ayrıca daha küçük lezyonlarda hızlı progresyona gitme konusunda daha yüksek riske sahiptir. Bunun nedeni ise DNA MMT yetersizliği ve MSI kazanımıdır.

1.1.5.7 Kolorektal kanserin moleküler yolak sınıflaması:

Büyük oranda KIN'in (KIN- vs KIN+; diploid vs anöploid), MMT durumunun (mikrosatellit stabil vs MSI), metilasyon yolağının durumunun (CAMF+ vs CAMF-) varlığı ve yokluğunu temel alan KRK'ların moleküler-patolojik bir sınıflaması ortaya atılmıştır [30,36,37]. Anöploid ve MMT-defisit yolaklarının klinik ilişkileri açıklanılmışsa da, metilatör yolağın klinikopatolojik ilişkileri henüz iyi tanımlanmamıştır.

1.1.5.8 WNT Sinyal Anormallikleri:

APC ilk olarak familial adenomatöz polipozisli (FAP) bireylerde mutasyona uğramış genlerde tanımlanmıştır[38]. Bu sendromda etkilenmiş bireyler fonksiyonel olarak inaktif bir adet APC kopyasını sonraki nesle kalıtlarlar. Tümörögenizde ise; tümör supresor gen inaktivasyonu için ortaya atılmış Knudsen paradigmasını tam olarak karşılayan, APC geninin ikinci allelik kopyası da ayrıca inaktive olur[39]. Erken neoplastik gelişimde ve hatta displastik aberran kript foküsünde bile görülebilen APC mutasyonları sporadik KRK'ların %70-80'inde görülür[38]. Erken adenomların gelişiminde APC inaktivasyonunun kesin olarak gerekliliği, bunların kolorektal neoplazilerde bekçi gen olarak kabul edilmelerine sebep olmuştur[40].

APC, embriyonik gelişim ve intestinal yenilenme için kritik öneme sahip evrimsel olarak korunmuş sinyalizasyon kaskadı olan Wingless (WNT) yolağında önemli bir komponenttir[38]. APC mutasyonları beta-katenine bağlanmayı ortadan kaldırır, böylece beta-kateninin glikojen sentetaz kinaz 3-beta (GSK3beta) fosforilasyonunu engeller ve nükleusta birikmesine yol açar. Burada beta-katenin; cyclin-D ve myc gibi diğer hedeflerin transkripsiyon sayılarını artırır[38]. APC ayrıca hücre iskeleti ile ilişkilidir. APC'nin tümörögenizdeki rolü henüz tam anlamıyla anlaşılamamasına karşın, hücre-hücre adezyonu, migrasyon, kromozomal ayrılma (genom stabilitesi) ve apoptozla direkt ilişkili olduğu bulunmuştur[38].

Kolorektal tümörögenizde WNT sinyalizasyon anomalilerinin öneminin başka bir kanıtı, APC mutasyonlarının olmadığı bazı tümörlerde beta-kateninin genindeki (CTNNB1) mutasyonların varlığıdır[28]. İnaktive edici APC mutasyonlarının aksine, CTNNB1 mutasyonları fosforilasyonla ilişkili aminoasit rezidülerini hedefler ve WNT sinyalinin onkojenik aktivasyonu ile sonuçlanır[28]. Son olarak wild-type APC'li KRK'larda AXIN1, AXIN2 ve TCF4'ü içeren diğer WNT sinyalizasyon üyelerinin mutasyonlarına nadir olarak rastlanmaktadır[28].

1.1.5.9 Diğer Genetik Değişiklikler:

KRAS aktive edici mutasyonları KRK'ların yaklaşık %40'ında bulunur ve çoğu solid tümörde ilk genetik değişikliklerden biri olarak bulunmaktadır. KRAS mutasyonları tipik olarak erken dönemde aberran kript foküsleri veya küçük adenomlarda meydana gelir ve gen aktivasyonu ile sonuçlanır. KRAS mutasyonları anti-EGFR tedavisine cevabın temel

belirleyicisidir. TP53 geninin mutasyonu ve inaktivasyonu, karsinomların yaklaşık %50-70'inde sıklıkla yüksek dereceli displazi gelişimi noktasında meydana gelir[41]. TP53 bir tümör süpresör gendir ve DNA hasar cevabı ile hücre siklus arrest yolağında önemlidir.

1.1.5.10 Kolorektal kanserin moleküler profilleri:

Son beş yıldaki teknolojik gelişmeler insan kanserlerinin ayrıntılı analizi için majör adımların atılmasına olanak sağlamıştır. Çok sayıda çalışma tek bir profillemeye teknolojisinin sonuçlarına odaklanırken, bu yaklaşımların potansiyel faydaları her bir tümöre çoklu metodolojiler uygulandığı zaman en etkileyici hale gelmektedir. The Cancer Genome Atlas ekzon sekanslama, DNA kopya sayısı, promoter metilasyonu ve mRNA ve miRNA ekspresyonunu, ayrıca KRK'un ayrıntılı profilini ortaya çıkarabilen tüm gen sekanslamayı da içeren çoklu platformları birbirine entegre etmiştir[42]. Bu profiller KRK'da bulunan ve önemli oranda mutasyona uğrayabilen 24 genin (APC, TP53, SMAD4, PIK3CA, KRAS, ARID1A, SOX9 ve FAM123B gibi) tespit edilmesiyle birlikte, genom instabilite sınıflarına kanserleri gruplayan moleküler aberasyonları anlamamıza katkıda bulunmuştur. Ek olarak ERBB2 ve IGF2 amplifikasyonları gibi potansiyel ilaç-hedefli amplifikasyonlar küçük bir vaka grubunda tespit edilebilmektedir. Bu durum bu hastalara kişiselleştirilmiş yeni tedavi yaklaşımlarının gelişme olasılığını arttırmaktadır. Bu ve diğer çalışmalar biyomarkerlar ve kişiselleştirilmiş tedavilerdeki önemli gelişmelerin önümüzdeki 5-10 yılda başarılabileceğini göstermektedir[43].

1.1.6 Patolojik Özellikler:

1.1.6.1 Makroskopik özellikler ve spesimen işlemleri

KRK rezeksiyon spesmenlerinin patolojik muayene için ele alınması, değerlendirilmesi ve işleme alınmasındaki prensipler net bir biçimde tanımlanmıştır[44] ve College of American Pathologists (CAP) protokolünün bir parçasıdır. Makroskopik muayenenin ana prensipleri hem kolon hem de rektal rezeksiyon spesmenleri için benzerdir, fakat anahtar farklılıklar özellikle total mezorektal eksizyon (TME) yapılan rektal spesmenlerle uğraşırken iyi gözlemlenmelidir.

Geniş rezeksiyon spesmenlerinde multipl kolon ve rektum subsegmentleri varsa lenf nodları American Joint Committee of Cancer (AJCC) Cancer evreleme kitapçığında (7. basım) belirtildiği gibi bölgesel veya bölgesel olmayan olarak belirtilmelidir. Bölgesel olmayan lenf nodlarına metastaz durumunda evre M1 olarak belirtilmelidir[20].

Kolon karsinomları için tümörün proksimal ve distal cerrahi sınırlardan uzaklığı materyal taze iken belirtilmelidir. Tüm kolon kanser rezeksiyonları radial rezeksiyon sınırına sahiptir; kolonun peritonla tamamiyle örtülmediği alanlarda (bazı çekal tümörler, tüm çıkan ve inen kolon tümörleri gibi) radial rezeksiyon sınırı histolojik inceleme için mürekkep ile işaretlenmesi gereken posterior açıklık alanıdır. Kolonun diğer segmentlerinde (transvers ve sigmoid kolon gibi) radial sınır mezokolik veya mezenterik sınır tarafından temsil edilmektedir. Radial sınıra ek olarak tümörün serozal yüzeye uzandığı alanlar da mutlaka belirlenmelidir. Şüpheli alanlar, serozanın pürüzlü, granüler veya hipervasküler görüldüğü alanlardır; bu gibi alanlar histolojik inceleme için tümüyle örneklenmelidir. Tüm lenf nodları bulunmalıdır; bu bağırsak duvarına bitişik yağ dokunun çıkarılarak, inspeksiyon ve palpasyon ile lenf nodlarının tespit edilmesi en iyi yaklaşımdır. Bağırsak duvarına yapışık kalmış yağ dokuyu incelemek önemlidir çünkü bu alanlar küçük ve potansiyel pozitif lenf nodlarının sıklıkla bulunduğu yerlerdir.

Kolon ve rektum kanserlerini birbirinden ayırmak problemli olabilir; sol kolon nonperitonealize kısmındaki tümörler rektal orijinli olarak dikkate alınırlar ve anal vergeden itibaren ilk 15 cm'deki tümörlerin tamamı da ayrıca rektal olarak kabul edilir. Tam lokalizasyonun belirlenemediği daha proksimaldeki tümörler rektosigmoid olarak isimlendirilir. Peritonun barsağı tam olarak sarmadığı ilk nokta gerçek rektosigmoid bileşke olarak dikkate alınır; tenya koli rektum bileşkesinde son bulur.

KRK'ların makroskopik görünümü 4 genel tipte sınıflandırılabilir:

1. Hacimli, ekzofitik ve polipoid tümörler: Bunlar en sık çekumda görülür ve nadiren obstrüksiyona neden olurlar ve genellikle klinik prezentasyon öncesi büyük boyutlara ulaşırlar.
2. İnfiltratif ve ülser tümörler: Bu kanserler düzensiz kenarlarla büyürler ve genellikle bağırsak duvarının derin tabakalarına uzanan ülser alan içerirler.
3. Halkasal ve daraltıcı tümörler: Bu tümörler baryum çalışmalarında karakteristik elma yeniği görünümü verirler.
4. Diffüz tümörler: Midenin linitis plastika'sına analogdurlar ve kolon mukozasında diffüz düzleşme ve duvarda kalınlaşma gösterirler.

Bu dört patern arasında çok fazla örtüşme bulunur ve makroskopik yapılanmanın tümörün histolojik alttüründen bağımsız olarak prognostik bir belirleyici olduğuna dair bir kanıt yoktur. Tüm bu tümör tiplerinde kesit yüzü genellikle homojendir, ancak nekroz ve müsinoz alanlar bulunabilir. Tümörün proksimalindeki bağırsakta dilatasyon (obstrüksiyona

sekonder) bulunabilir ve tümör serozaya yakın uzanıyorsa serozal yüzde değişiklikler bulunabilir.

1.1.6.2 Malignite kriterleri ve biyopsi tanısı:

Kolonda lamina propria ve muskularis mukozaya sınırlı invazyon gösteren tümörler neredeyse hiçbir zaman lenf nodu metastazı yapmazlar. Bu tümörler intramukozal karsinom olarak da adlandırılırlar[20]. Bu tümörlerin metastaz yapmamaları, çoğunlukla kolorektal mukozada lenfatiklerin yokluğuna bağlanır. Bu yüzden kolorektal tümörler sadece muskularis mukozadan submukozaya invazyon olduğu zaman ancak malign olarak kabul edilirler (evre T1). Bu durum KRK'larda pratikte uygulanıyor olsa da, submukozaya invazyon göstermeyen neoplazilerde uygun terminoloji açısından tartışma yaratmıştır. AJCC sınıflamasında, mukozaya sınırlı invazyon kanser kayıtlarında bu şüpheli terminolojinin çoğalmasından dolayı (submukoza invazyonu göstermeyen lamina propria invazyonu ya da intramukozal adenokarsinom) hala evre Tis olarak sınıflandırılmaktadır[20]. Bu yaklaşımla birlikte yüksek dereceli displazi de hala Tis olarak sınıflandırılmaktadır.

Sesil veya flat lezyonlardan alınan biyopsi spesmenleri genellikle yüzeyseldir, kötü oryentedir ve ülser olabilirler. Tek tek infiltre olan hücrelerin varlığı veya küçük belirgin irregüler glandların varlığı invazyon tanısına vardırabilmesine karşın, daha iyi diferansiye bazı kanserler bu büyüme paternini göstermeyebilir. İnvazyonun kesin patolojik özellikleri yokluğunda, invazyon tanısı genellikle invaziv adenokarsinomlarda bulunan desmoplazinin tespit edilmesine bağlıdır. Malignite ilişkili desmoplazi ile ülser bir adenomda meydana gelen stromal reaksiyonun ayırdedilmesi çok zor olabilir. Ülser adenomun stroması genelde daha sellüler olur ve bol mikrodamarlanma, inflamatuvar hücreler ve şişkin fibroblastlar içerir. Muskularis mukoza gözlenebilirse, invazyonun bu tabakayı penetre edip etmediği tespit edilebilir, fakat çoğu biyopsi fragmanlarında muskularis mukozayı açık şekilde tespit etmek zordur. Bu vakalarda desmoplazinin varlığı tümörün submukozaya penetre olduğunun ve tümörün en azından T1 olduğunun yardımcı bir belirleyicisidir. Desmoplazi nadiren sadece lamina propria invazyonu ile ilişkili olabilir. Bu kanserler için, eğer tümör polip içinde ise cerrahi rezeksiyonun polipektomiye tercih edilmesi durumu eksizyonun tam olarak yapıp yapılmadığı ve lenf nodu metastazı açısından yüksek risk faktörlerinin bulunup bulunmadığına göre değişir.

1.1.6.3 Histolojik Subtiplerin Sınıflaması

Çoğu KRK adenokarsinomdur; ancak çok sayıda farklı morfolojili histolojik tür de bulunmaktadır. Histolojik kompleksite adenokarsinom-dışı histolojik paternlerin küçük komponentler halinde varlığı ile ilişkili olabilir. Müsinöz adenokarsinomlarda olduğu gibi KRK'un çeşitli subtiplerini tanımlamak için kullanılan kriterler vardır. KRK vakalarında eğer ikinci bir diferansiyasyon alanı varsa ve bu patern spesifik tanısal kriteri karşılamıyorsa, patoloji raporunda tüm histolojik komponentlerin varlığı ve yüzdesinin belirtilmesi önerilir (örneğin %10 ekstrasellüler müsinöz komponent içeren düşük dereceli adenokarsinom gibi).

Çoğu adenokarsinom iyi-orta diferansiye veya düşük derecelidir. İyi diferansiye tümörlerde epitelyal hücreler genelde yüksek ve kolumnardır ve diferansiyasyon derecesi düştükçe küboidal veya poligonal hale gelmeye başlarlar. Mitotik figürler genelde çok sayıdadır. Glanduler lumina koyulaşmış eozinofilik mukus yanısıra genelde kirli nekroz adı verilen nükleer ve sellüler debris ile doludur. Primeri bilinmeyen metastatik bir tümörde kirli nekroz görüldüğü zaman, bu özellik bazen kolorektal bir primeri işaret etmek için kullanılabilir. Tümörün infiltratif kenarı bez rüptürü ve daha sık küçük, irregüler ve genelde infiltratif görünümlü bezler ile ilişkili olmasına karşın, genelde tümörün yüzeyel ve derin kısımları arasında çok az farklılık olma eğilimi mevcuttur. Bazı tümörler özellikle yüzeyde baskın papiller komponent içerebilir. Desmoplazipankreas ve bilier sistem kanserlerinde olduğu gibi belirgin olabilir. Malign glandlarda paneth hücreleri, nöroendokrin hücreler, skuamöz hücreler, melanositler ve trofoblastlar da bulunabilir. Diğer hücre tiplerinin bulunmasının prognostik bir önemi yoktur.

Tablo 1: Kolorektal Karsinomların Histolojik Sınıflaması

Histolojik Tip	Sıklık
<i>Bilinen Dünya Sağlık Örgütü Tipleri*</i>	
Adenokarsinom	%75-80
Müsinöz (kolloid) adenokarsinom	%8-10
Serrated adenokarsinom	%10
Taşlı yüzük hücreli karsinom	%2
Medüller Karsinom	%1
Adenoskuamöz hücreli karsinom	<%1
Skuamöz hücreli karsinom	<%1
Küçük hücreli karsinom	<%1

Andiferansiye karsinom	<%1
Mikst karsinoid – adenokarsinom	<%1
<i>Diğerleri</i>	
Koryokarsinom	<%1
Şeffaf hücreli karsinom	<%1
Mikroglanduler goblet hücreli karsinom	<%1
Melanin üretimi olan karsinomlar	<%1
İğsi hücreli karsinom	<%1

* Bosman FT, Jaffe ES, Lakhani SR, Ohgaki H, eds. *World Health Organization Classification of Tumours*. 4th ed. Lyon, France: IARC; 2009.

1.1.6.4 DNA Mismatch Tamir Defisiti içeren karsinomlar

DNA MMT yolaklarının inaktivasyonu KRK'ların %10-15'inin patogeneğinde önemli bir rol oynar. Bu vakaların bir kısmı MMT genlerinin birinde veya daha fazlasında herediter değişiklikler sonucu oluşsa da (herediter nonpolipozis koli [HNPK] ve lynch sendromu), yaklaşık %80'i sporadiktir ve primer olarak promoter hipermetilasyonu ve MLH1 transkripsiyonunun susturulması sonucu oluşur. Karakteristik MSI-H genetik değişikliğine ek olarak bu kanserler patologlar açısından birtakım önemli spesifik ve klinik ilişkilere sahiptir[31].

MLH1 metilasyon susturulması içeren sporadik MMT-defisitli MSI-H KRK'lar belirgin oranda kadın cinsiyet baskınlığı ve yaş prevalansında yükseklik gösterirler[45]. Ayrıca özellikle 70 yaş üstü kadınlarda sıklırlar. Sporadik MLH1-defisiti olan MSI-H KRK'ların yaklaşık %90'ı sağ kolonda yerleşir ve bunlar 70 yaş üstü kadınlarda tüm sağ taraflı kanserlerin yaklaşık yarısını oluştururlar[46]. Prekürsör lezyonlar sporadik vakalarda genelde SSA/P niteliği gösterirken, herediter vakalarda konvansiyonel adenokarsinom niteliği gösterir (HNPK gibi). MSI-H KRK'larda bir takım spesifik patolojik ilişkiler tanımlanmıştır ve bunların çoğu DNA MMT defisitinden kaynaklanan HNPK kanserlerine benzerdir. MSI-H kanserleri multipl olmaya, polipoid veya ekzofitik büyüme paterni göstermeye, itici sınırlara ve belirgin makroskopik düzeyde nekroz içermeye eğilimlidir. Dahası MSI-H tümörlerinin mikroglanduler diferansiyasyon yanısıra müsinöz ve taşlı yüzük hücreli özellikler göstermesi daha olasıdır. Tümörün %50'den azı bu özellikleri gösteriyor olsa bile bu histolojik özellikler ile DNA MMT defisiti arası ilişki bulunma olasılığı yüksektir. Bu yüzden MSI-H kanser tanısı için kullanılan bu histolojik özelliklerin sensitivitesi ve spesifitesi kullanılan spesifik

kriterlere göre değişiklik gösterir. İlişkili histolojik varyantlardan (müsinöz, taşlı yüzük hücreli, mikroglanduler veya andiferansiye) herhangi birinin varlığı veya belirgin tümör infiltrate eden lenfosit cevabının varlığı olası MSI-H kanserleri tespit etmek açısından sensitif bir eşik sağlar[47].

Hastanın lenfoid cevabının karakteri MSI-H ve mikrosatellit stabil kanserler arasında ciddi bir fark gösterir. Tümör infiltrate eden lenfositlerin varlığı özellikle farklı diferansiasyon gösteren bir tümörle (klasik meduller subtip olabilir de olmayabilir de) birlikte olduğunda MSI-H kanseri yüksek derecede predikte eder. Bir çalışmada 10 BBA'da en azından 5 adet tümör infiltrate eden lenfosit varlığının MSI-H KRK tespit edilmesinde %93 sensitivite ve %62 spesifite gösterdiği tespit edilmiştir[48]. Herhangi bir kolon karsinomunda MSI-H varlığını göstermede yüksek derecede spesifiteye ulaşmak için bir takım kompleks algoritmalar önerilmiştir. Bununla birlikte bir çalışmada patologun görüşünün en iyi prediktif faktör olduğu (daha önce tarif edilen özelliklerin total olarak değerlendirilmesi ve patologun bilinen MSI-H kanserler ile ilgili önceki tecrübeleri) gösterilmiştir[49]. Genel olarak sporadik MSI-H kanserler, MSI-H HNPk ilişkili KRK'lar ile kıyaslandığında daha sık heterojen, az diferansiye, müsinöz, proksimal yerleşimlidir ve daha önce de belirtildiği gibi belirgin tümör infiltrate eden lenfosit reaksiyonu ile ilişkilidir[50].

Klinik olarak, MSI-H KRK'lu hastalar prezentasyon anında genellikle ileri T evresinde olurlar, fakat bölgesel lenf nodu metastazı göstermeye daha az eğilimli olurlar. Aslında çoğu T4, N0, M0 KRK'lar DNA MMT enzim defisiti gösterirler. Evre ve diğer standart prognostik parametreler için kontrol edildiği zaman, çoğu çalışmada mikrosatellit stabil KRK'lara kıyasla genel sağkalım açısından MSI-H KRK'ların daha iyi prognozlu olduğu gösterilmiştir[51].

1.1.6.5 Tümör derecelendirilmesi

KRK 'da tümör derecelendirmesi primer olarak tümörü oluşturan bez yapılarından oluşan alanların, solid veya lumina içermeyen nestler veya kordlar oluşturan tümör alanına oranını temel alır. Düşük ve yüksek dereceli ki kademeli sistem kullanımı DSÖ ve AJCC tarafından önerilmektedir[1,20]. İyi ve orta derecede diferansiye karsinomların benzer biyolojik davranışları bilinmektedir. İkili sisteme göre kolorektal karsinomlar düşük dereceli (iyi veya orta derecede diferansiye; >%50 bez oluşumu) ve yüksek dereceli (az diferansiye; <%50 bez oluşumu) olarak sınıflandırılırlar. Endoskopik biopsilerdeki derecelendirme genellikle rezeksiyondaki tümörün derecesini yansıtmayabilir.

KRK'ları derecelendirme sadece tipik adenokarsinomlar için uygulanır. Tanım olarak taşlı yüzük hücreli karsinomlar ve küçük hücreli karsinomlar yüksek derecelidir. Bazıları tüm müsinöz karsinomları yüksek dereceli olarak dikkate almaktadır; ancak müsinöz kanserleri bez oluşumları temel alınarak derecelendirmek pratikte tartışmalı bir konudur. Hiç bez oluşumu içermeyen tümörler andiferansiye olarak sınıflandırılır, ancak çoğu vaka az diferansiye adenokarsinomları temsil etmektedir. Medüller karsinomlar az veya andiferansiye olarak sınıflandırılmamalıdır, çünkü bu tümörler diğer tümörlerden daha iyi genel sağkalıma sahiptirler[52]. Genelde derecelendirme için karsinomun invazyon yapan kenarı değerlendirilmemelidir. Tümörün invazyon yapan kenarında yerleşen küçük hücre kümeleri ve kordlarının bulunması kötü prognozun bağımsız bir belirteçidir (bkz: tümör tomurcuklanması)

1.1.6.6 İmmunohistokimya

KRK spesmenlerinin rutin incelemesi genellikle immunohistokimyasal çalışma gerektirmez. Bu çalışmalar genelde belli histolojik türleri ayırt etmek için (örn: küçük hücreli karsinom) veya primer/metastatik tümör ayrımı yapmak için kullanılırlar. Aşağıdaki belirleyiciler KRK'ların incelenmesinde yardımcı olabilirler.

1. Keratinler: KRK tümör hücreleri düşük molekül ağırlıklı keratinleri eksprese ederler. Çoğu tümör (%80-100) CK20 ile pozitif ve %15 kadarı ise CK7 pozitifdir[53]. KRK'ların büyük çoğunluğu CK20 pozitif, CK7 negatiftir. MSI-H adenokarsinomlar CK20 ile sıklıkla azalmış ekspresyon gösterirler.
2. Villin: Villin %90'dan fazla kolorektal adenokarsinomda fırçamsı kenara vurgu yapacak şekilde diffüz sitoplazmik ekspresyon gösteren mikrofilament ilişkili aktine bağlanan bir proteindir. Ayrıca intestinal diferansiyasyon gösteren gastrointestinal dışı tümörlerde de pozitifdir (örneğin; akciğer, mesane)
3. CDX2: CDX2'nin nükleer transkripsiyonu kolorektal adenokarsinomların %90'ından fazlasında eksprese edilir[54]. Çoğunlukla CDX2 ve CK20 için negatif ve CK7 pozitif olan medüller karsinom ve medüller dışı DNA MMT eksikliği içeren karsinomlar istisnadır. Ekspresyonu diferansiyasyonla ilişkilidir ve yüksek dereceli tümörlerin yaklaşık %50'sinde pozitifdir. Tümör evresi ile CDX2 ekspresyonu arasında da ayrıca ters orantılı bir ilişki göz çarpmaktadır. CDX2 özellikle intestinal tip diferansiyasyon gösterenler başta olmak üzere %10-30 oranında diğer gastrontestinal malignitelerde de eksprese edilebilmektedir.

4. Müsinler: MUC2 çoğu kolorektal kasinomda eksprese edilmektedir. MUC1 ekspresyonu görülebilir, fakat MUC5AC ekspresyonu çok nadirdir[53].

1.1.7 Tedavi

1.1.7.1 Cerrahi Tedavi

KRK'lu hastalar genelde tümörün evresine bağlı olarak kemoterapi ile birlikte veya kemoterapi olmadan primer tümörün cerrahi rezeksiyonu ile tedavi edilirler. Cerrahi rezeksiyon; cerrahiye engel medikal bir durum yoksa veya tümör lokal olarak anrezektabl değilse hemen her hastaya uygulanır. Tıkayıcı olmayan tümörü olan hastalarda segmental kolektomi ve bölgesel lenf düğümlerinin en-blok rezeksiyonu uygulanır. Obstrüktif tümörü olan hastalara benzer tek evreli prosedür uygulanır; diversiyon ile birlikte rezeksiyon veya rezeksiyonu takiben diversiyon ve stent uygulanır. Gönderilen bir spesmenden lenf nodlarının N evre değerlendirmesi için en az 12 lenf nodu diseke edilmiş olması gerekmektedir. Hastanın durumu belirlenen kriterlere uyuyor ise laparoskopik kolektomi uygulanabilir. Muskularis proprianın dışına uzanan rektal kanserler (evre T3) sıklıkla rezeksiyon öncesi neoadjuvan kemoradyoterapi ile tedavi edilirler[55].

Akciğer ve karaciğer metastazlarının cerrahi rezeksiyonu aşağıdaki kriterlere uyuyorsa yapılabilir: 1. Primer tümör tedavi için çıkarılmış veya çıkarılacak olmalı 2. Metastatik hastalığın tam rezeksiyonu yapılabilir olmalı ve 3. Organ fonksiyonunun devamı korunabilir olmalıdır. Ablasyon tedavileri ve tekrar rezeksiyon seçilmiş hastalara uygulanabilir. Daha önce anrezektabl olan hastalığın rezektabl hastalığa dönüşüp dönüşmediği ile ilgili tekrar değerlendirme kemoterapi başladıktan sonra her iki ayda bir yapılmalıdır.

1.1.7.2 Kemoterapi

Dört dekat boyunca KRK kemoterapisinde floropirimidinler (intravenöz 5-fluorouracil [5-FU] ve ek olarak lökovorin folinik asit veya oral kapesitabin) ana tedavi seçeneğidir[56]. Son 5 yılda yeni iki sitotoksik ajanın -bir topoizomeras inhibitörü olan CPT-11/irinotekan ve üçüncü nesil platinum bileşiği olan oksaliplatin - ileri hastalığa fayda sağladığı gösterilmiştir. Bu kemoterapötik ajanlar tipik olarak 5-FU ile kombine olarak (örneğin FOLFOX protokolü Folinic asit + 5-FU + Oxaliplatin içerir) adjuvan ve ileri hastalık durumlarında çeşitli tedavi protokollerinde yaygın olarak kullanılmaktadır; bunlar artmış cevap oranları ve daha uzun progresyonsuz sağkalımı sağlarlar[57].

1.1.7.3 Hedefe Yönelik Tedavi

Dirençli metastatik hastalığı olan hastalarda farklı terapötik ajanların eklenmesi etkinliği arttırmaktadır. Cetuximab ve panitumumab neoplazi progresyonunda önemli olduğu gösterilmiş apoptotik yollar yanı sıra, hücre büyüme ve progresyonunda aşağı akış yollarını inhibe eden anti-EGFR antikorlarıdır. Her ikisi de KRAS mutasyonları taşımayan ileri KRK'lu hastalarda yüksek derecede etkilidir[58,59]. KRAS mutasyon analizi bu yüzden anti-EGFR tedavisi başlamadan önce metastatik veya primer tümörde yapılmalıdır[55,60]. Regorafenib KRAS mutant tümörleri de içeren diğer tedavilere dirençli metastatik hastalık durumunda efektif olan küçük moleküllü multikinaz inhibitörüdür[61]. Bevacizumab solubl proteini inhibe eden ve tümörlerde antianjiojenik etki gösteren anti-VEGF antikorudur. Aflibercept diğer tedavi modalitelerinden fayda görmeyen metastatik KRK'lu son zamanlarda geliştirilmiş başka bir VEGF inhibitörüdür[58]. Bu hedefe yönelik tedavi ajanlarının kanıtlanmış yararları şu an için tek başına veya bahsedilen diğer ajanlarla kombine olarak kullanıldığı zaman sadece metastatik hastalığa sınırlıdır.

1.1.7.4 Evre ve Patolojik Faktörlerin Tedavideki Rolü

Evre I hastalık (T1/T2 N0 M0) tek başına cerrahi ile tedavi edilir ve bu hastalara genellikle kemoterapi önerilmez. Evre I malign polipler farklı bir tedavi alt-grubunu temsil eder; çoğu vakada lokal eksizyon (polipektomi) küratif tedavi olarak uygulanır çünkü bunların lenf nodu metastazı riski düşüktür. Bununla birlikte kabul edilebilir oranda lenf nodu metastazını öngören ve bu yüzden segmental rezeksiyon gereken durumlar: az diferansiyasyon ve lenfatik/venöz invazyondur. Rezeksiyon sınırının 1 mm veya daha yakınında karsinom varlığı polipektomi bölgesinde rezidüel hastalığın prediktif göstergesidir. Proktektomi yüksek morbidite ile ilişkili olduğu için rektal polipler yüksek dereceli bulgulara sahip olsa bile; ultrason veya MR ile bölgesel lenf nodlarında tümör tutulumu gözlenmiyor ise tek başına polipektomi ile tedavi edilebilir[62].

Evre II hastalıkta adjuvan tedavinin kullanımı değişkendir[60]. Kemoterapi genelde, özellikle MMT-defisitine sahip olmayan tümörlerde olmak üzere bazı hastalarda uygulanmasına karşın, düşük riskli evre II hastalıkta önerilmez. Adjuvan tedavi tipik olarak az diferansiyasyonun varlığı (MSI-H'in dışlanması sonrası); lenfatik veya vasküler invazyon; bağırsak tıkanıklığı; 12'den az lenf nodu incelenmesi; perinöral invazyon; lokalize perforasyon; yakın, belirsiz ya da pozitif cerrahi sınırlar; veya T4 hastalık durumlarında tanımlanan yüksek riskli evre II hastalığı olan hastalarda önerilmektedir.

Evre III hastalıkta, adjuvan kemoterapi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu durumda 5-FU'in tek başında kullanımı 5 yıllık takip sonrası %5-6 net sağkalım avantajı sağlamaktadır. Adjuvan tedavide floroprimidine oksiplatin eklendiği zaman hastalıksız sağkalımın iyileştiği birçok çalışma tarafından gösterilmiştir[57]. Bu ilaç kombinasyonu şu an tolere edebilenlerde ve yeni kanser denemelerine katılmayan hastalarda standart tercih olarak yer almaktadır. Kontrollü klinik çalışmalarda adjuvan tedaviye anti-EGFR veya anti-VEGF ajanlarının eklenmesinin kanıtlanmış bir yararı bulunmamıştır[57].

İleri hastalıkta (evre IV, duke evre D, uzak metastaz) kemoterapi eklenmesinin yararı kesin olarak kanıtlanmıştır[56,58,59]. Şu an KRAS mutasyon durumuna göre çoğu hastaya 5-FU, oksiplatin ve anti-EGFR ajanı (cetuximab veya panitumumab) ya da anti-VEGF (bevacizumab) kombinasyonu önerilmektedir.

1.1.8 Prognostik Faktörler

Kabul edilmiş prognostik belirteçlerin gelişimi ve değerlendirilmesi için AJCC tarafından sağlanan rehberler bu belirteçlerin hem klinik olarak faydalı ve tedavide kullanışlı olmasının gerekliliğini bildirmektedir[20]. Prognostik faktörler 3 önemli kategoriye ayrılabilir: Kategori I, literatürdeki prognostik çalışmalarla iyi desteklenmiş faktörler; kategori II, biyolojik ve klinik olarak iyi çalışılmış ancak klinik faydası henüz tam belirlenememiş faktörler; kategori III, yeterince çalışılmamış faktörler; kategori IV, yeterince çalışılmış fakat faydalı bulunmamış faktörler.

CAP 1999 konsensus bildirisi KRK'lara spesifik olarak patolojik TNM evresi, ektramural venöz invazyon ve preop CEA seviyesini en önemli kategori I faktörleri olarak ortaya atmıştır[63]. Bunlar tedavi kararlarında en yaygın kullanılan faktörler olmayı sürdürmektedir. Rektal karsinomlara uygun önemli yeni eklemeler mezorektal prosedürün kalitesi ve nonperitonealize radial rezeksiyon sınırının durumunun belirlenmesidir. Birçok diğer faktör literatürde iyi bir şekilde desteklenmektedir ve patologlar tarafından raporlanmalıdır, ancak bunların tümünün klinik pratikte direkt anlamı bulunmamaktadır.

1.1.8.1 Patolojik Evreleme

Tümör yayılımının anatomik yaygınlığı (patolojik tümör evresi) KRK'lu hastalarda prognostik belirteçtir. Duke sisteminin[64] yerini alan TNM sistemi dünyada en yaygın kullanılan sistemdir.

1.1.8.2 Tümör İnvazyonunun Derinliği ve Peritoneal Tutulum

KRK hastalarının prognozu invazyon derinliği ile doğru orantılıdır ve TNM evreleme sisteminde T sınıflaması ile tanımlanmaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi KRK'da TNM evrelemesi muskularis mukozayı aşmayan lamina propria invazyonu için kullanılan intramukozal karsinom ve yüksek dereceli displazinin her ikisi için de kullanılan Tis'i içermektedir. Submukozaya invaze tümörler evre T1 adenokarsinom olarak ifade edilirler. Muskularis propriayı invaze eden tümörler evre T2, ve muskularis propriayı aşmış subserozal adipöz dokuya veya nonperitonealize perikolik veya perirektal yağ dokuya invaze olanlar evre T3 olarak sınıflandırılır. Muskularis propria aşan tümör yayılımı prognozu güçlü bir şekilde etkilemektedir.

Tümörler muskularis propria dışına invaze olduğunda, visceral peritona penetre olabilir (pT4a) veya komşu yapılara yapışabilir ve invaze olabilirler (pT4b). Tümörler kolonun fibrovasküler pedikülü içinden ilerleyip peritoneal tutulum yapmadan rezeksiyon sınırına ulaşabilirler. Visceral periton penetrasyonu (seroza tutulumu) peritoneal karsinomatozis açısından önemli bir risk faktörüdür ve KRK'lu hastalarda önemli bir kötü prognostik faktördür. Peritoneal tutulum evre II hastalıkta adjuvan tedavi için belirleyici olarak kabul edilmektedir ve kolon karsinomlarında pozitif veya negatif olarak kesinlikle raporlanmalıdır. Bununla birlikte periton invazyonu durumunun değerlendirmesi güç olabilir ve peritoneal invazyonu yakalama şansını arttıracak uygun histolojik kesitlerin alınmasını gerektirmektedir. Kesitler özellikle irregüler, kabalaşmış ve belirgin vaskülerite gösteren seroza alanlarını hedefleyerek tümörün serozaya en yakın olduğu alanları gösterecek şekilde alınmalıdır. Peritoneal penetrasyon tanısı için tümör, inflamasyon, mezotelyal hiperplazi, erozyon, ve ülserasyon varlığı durumlarında serozal yüzde bulunmalıdır. Peritoneal elastik laminayı göstermek için elastik boyaların kullanımı potansiyel bir tanısal yardımcı olarak araştırılmıştır[65].

1.1.8.3 Lenf Nodu Tutulumu

KRK rezeksiyon spesmenlerinde bölgesel lenf nodlarının durumu hem prognostik olarak hem de tedavi için kullanılan önemli bir parametredir. AJCC kanser evreleme kitapçığının yedinci baskısı, neoadjuvan tedavi almayan kolon ve rektal kanser spesmenlerinin en az 10-14 lenf nodu içermesinin önemli olduğunu bildirmektedir[20]. Bu rezeksiyon spesmenlerinin kalitesini değerlendirmede yaygın kullanılan bir belirleyici haline gelse de rezeksiyon spesmenlerinde bulunan lenf nodu sayısının bir üst sınırının da

bulunmadığı açıktır. KKK hastalarından lenf nodu sayısı daha çok olanların daha az olanlardan daha iyi prognoz gösterdiğine dair kanıt da bulunmaktadır[66]. Bunun olası nedeni lenf nodlarının tümör yayılımını bloke etme olasılığıdır. Tutulan lenf nodlarının total lenf nodu sayısına oranı, sadece tutulan lenf nodu sayısına kıyasla daha iyi bir prognostik gösterge olarak ortaya çıkmıştır[67,68].

Perikolik yağ dokusu içindeki, rezidüel lenf nodu içermeyen tümör depositlerinin değerlendirmesi ve sınıflandırması problemlidir ve AJCC kanser evreleme kitapçığının çeşitli baskılarında farklı tanımlanmıştır. Yedinci baskı ile birlikte bu tümör depositlerinin tanımlaması; perikolik veya perirektal yağ dokusunda rezidüel lenf nodu dokusu kanıtı olmayan, tümörün invaziv ucunda bulunmayan ve tümörün bölgesel lenf nodu drenajı içinde bulunan düzensiz, belirgin depositler şeklindedir. Tümör depositlerinin varlığı kötü prognozla ilişkili olduğu için, bunların varlığı N kategorisinde N1c olarak kaydedilir ve raporda kaç deposit görüldüğü belirtilmelidir. N1c kategorizasyonu ancak herhangi bir lenf nodu metastazı görülmediği durumlarda kullanılabilir.

Bazı çalışmalarda, primer tümörden uzaktaki lenf nodu metastazının daha kötü gidişle ilişkili olduğu gösterilmiştir. TNM sınıflaması için, eksternal iliak ve common iliak lenf nodlarına metastaz her zaman M1 olarak sınıflanır. Bölgesel lenf nodlarının tanımlaması primer tümörün lokalizasyonuna göre değişmektedir[20].

Mikrometastaz, lenf nodu içinde, 0.2mm'den daha büyük, 2 mm'ye eşit veya daha küçük boyuttaki tümör depositi olarak tanımlanmaktadır. İzole tümör hücreleri, yine lenf nodu içinde, 0.2 mm veya daha küçük boyuttaki küçük kümeler halindeki veya tek tek tümör hücreleri olarak tanımlanmaktadır; bunlar N0 olarak sınıflandırılmaktadır. Mikrometastazların ve izole tümör hücrelerinin prognostik önemi kanıtlanmamış olsa da, bu formdaki nodal yayılımın evre II (nod negatif) hastalıkta tümör rekürrensi için önem arz etmektedir ve mikrometastatik hastalığın kötü prognozla korele olabileceği konusunda artan düzeyde kanıtlar bulunmaktadır[69].

1.1.8.4 Histolojik Derece

Prognostik bir faktör olarak histolojik derecenin önemi çok değişkenli analizli çalışmalarda sürekli olarak ortaya çıkan bağımsız istatistik önem ile desteklenmektedir[63]. Prognoz açısından iyi ve orta derecede diferansiye tümörler arasındaki fark, iyi/ orta diferansiye tümörler ile az diferansiye tümörler arasındaki fark kadar açık değildir. Bu yüzden geleneksel üç dereceli sistemi; düşük dereceli tümörlerin en az %50 bez yapısı oluşturduğu,

yüksek dereceli tümörlerin %50'den az bez yapısı oluşturduğu iki dereceli sisteme dönüştürmek önerilmiştir [63]. Düşük dereceli tümörler iyi ve orta derecede diferansiye tümörleri, yüksek dereceli tümörler ise az diferansiye tümörleri temsil etmektedir.

1.1.8.5 Histolojik Subtip

Çoğu seri histolojik alttipi sağkalım için prediktif olarak bulmuştur. Müsinöz ve taşlı yüzük morfolojisi gösteren karsinomlar ve andiferansiye karsinomlar kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. Bununla birlikte bu bulgular primer olarak KRK'un moleküler temelindeki anlayışımızın artması nedeniyle şu an tartışmalıdır. Özellikle DNA MMT eksikliği gösteren kanserlerin karakteristik genetik değişiklikler gösterdiği şu an bilinmektedir ve bunların belirgin oranda daha iyi total sağkalımla ilişkili oldukları bilinmektedir. Paradoksik olarak müsinöz, taşlı yüzük hücreli ve andiferansiye kanserler MMT eksikliği gösteren kanserlerde daha sık görülmektedir[51]. MSI-H ile ilişkili olmayan hem müsinöz hem de taşlı yüzük hücreli adenokarsinomlar ise daha agresif seyretmektedir.

1.1.8.6 Proksimal ve Distal Rezeksiyon Sınırları

Pozitif rezeksiyon sınırlarının varlığı hastada rezidüel tümörün varlığına işaret eder. Bu durum mikroskopik rezidüel tümörün R1, makroskopik rezidüel tümörün R2 olarak sınıflandığı, rezidüel tümör olmamasını R0 olarak sınıflandığı rezidüel tümör sınıflama sistemini doğurmuştur.

1.1.8.7 Radial Rezeksiyon Sınırı ve Total Mezorektal Eksizyon

Son yıllarda rektal karsinomun radial (çevresel) cerrahi sınırının düzgün patolojik dokümantasyonuna yoğun ilgi gösterilmiştir ancak radial sınırın doğru değerlendirilmesi kolon karsinomlarında da önemlidir. Daha önce tarif edildiği gibi tüm kolon kanser rezeksiyonları radial rezeksiyon sınırına sahiptir ve anatomik lokasyona bağlı olarak posterior açıklık alanı veya mezokolon veya mezenterdeki vasküler bağlar olarak temsil edilmektedir. Sağ kolon kanser rezeksiyonlarında radial sınır vakaların %10'unda pozitifdir ve bu sınırları değerlendirme hatası (yanlış negatiflik) bu hastaların bir kısmındaki tümör rekürrensini açıklayabilir.

KRK'da çevresel radial sınırın öneminin farkındalığı hastalığın yönetimini ve rektal kanser spesmenlerinin patolojik değerlendirmesini değiştirmiştir. 1986'da Quirke ve

arkadaşları ilk defa lateral yayılımın önemini ve rektal kanser rekürrensini predikte etmede radial cerrahi sınır tutulumun rolünü tanımlamışlardır[70].

Tümör invazyonunun en derin noktasının radial sınıra olan uzaklığının lokal ve uzak rekürrens için belirleyici olduğu da gösterilmiştir[71].

1.1.8.8 Endotelium Döşeli Boşlukların İnvazyonu

Tümörün lenfatiklere ve kalın duvarlı venlere invazyonu dikkatle aranmalıdır ve varlığı veya yokluğu raporlanmalıdır. Venöz invazyon (VI) düz kas rimi tarafından sarılı veya eritrositler içeren endotel döşeli boşluk içinde iyi sınırlı tümör kitlesi bulunması olarak tanımlanır. Ekstramural VI (muskularis proprianın ötesindeki geniş venlerin invazyonu) hastalık rekürrensi ve sağkalım açısından bağımsız bir prognostik belirleyicidir. İntramural VI çok az sayıda çalışmada prognostik öneme sahip olarak gösterilmiştir[72].

Ekstramural venöz invazyon varlığı için iki histopatolojik önemli bulgudan biri: kalın duvarlı bir artere komşu tespit edilebilir bir ven olmadan iyi sınırlı tümör nodülü varlığıdır; diğeri ise sıklıkla bir artere komşu perikolik yağ doku içinde düzgün sınırlı tümör protrüzyonu varlığıdır (protrüde dil bulgusu). Bu ipuçları bulunduğu zaman elastik boya rezidüel venin adventisyasındaki elastik fiberleri göstermek için uygulanabilir. Bir çalışmada H&E kesitlerinde şüpheli olan vakaların %76'sında elastik boya VI varlığını konfirme etmiştir[73]. Çeşitli çalışmalar standart H&E kesitlere kıyasla VI'u tespit etmek için elastik boyaların önemli oranda daha iyi olduğunu göstermiştir.

Ne yazık ki, CAP protokolünün son şeklinde VI, lenfovasküler (küçük damar) invazyon veya LVI'dan ayrılmamıştır[74]. Uzak metastaz gelişimi için güçlü prediktif değeri nedeniyle patologlar VI'u LVI veya küçük damar invazyonundan ayrı olarak rapor etmelidir. İngiltere RCPATH'in son dataseti tüm rezeksiyon spesmenlerinin en az %25'inde ekstramural VI'un tespit edilmesi gerektiğini ve bunun patologların kendi rapor oranlarını karşılaştırmak açısından denetim standardı oluşturması gerektiğini yazmaktadır[75].

Lenfatikleri küçük ince duvarlı postkapiller venüllerden ayırdetmek her zaman mümkün değildir; bu nedenle LVI gibi müphem bir terminoloji ortaya çıkar. Lenfatik invazyon özellikle nod-negatif hastalarda bağımsız prognostik öneme sahip olarak ortaya çıkmaktadır.

1.1.8.9 Konak İmmun Cevabı

KRK'a yanıt olarak çok sayıda tipte inflamatuvar ve immün reaksiyonlar meydana gelir. İnflamatuvar reaksiyonlar intestinal bakteriel bariyerin kaybı ile ilişkili olduğu düşünülen ve

interlökin 23'e sekonder tümör büyümesinin promoteri olduğu öne sürülen nötrofilik infiltrasyonu içerir[76]. Çok daha geniş çapta çalışılmış olan lenfoid immun reaksiyonlar ise tümör infiltre eden lenfositleri, peritümöral lenfositleri, peritümöral lenfoid agregatları ve reaktif lenf nodlarını içerir[77]. Genelde herhangi bir tipte yoğun inflamatuvar yanıtın varlığı iyi prognoz ile ilişkilidir. Tarihsel olarak peritümöral lenfositik cevabın düzeyini derecellemek için kullanılabilecek kriterlerin geliştirilmesine yoğun ilgi gösterilmiştir. Graham ve Appelman Crohn-benzeri lenfoid reaksiyon ismi verilen peritümöral lenfoid reaksiyonu değerlendirmek için en sık kullanılan kriterleri geliştirmiştir[78]. Onlar bu reaksiyonu 3 dereceye ayırmışlardır: 1. Yok; 2. Hafif veya nadiren bulunan lenfoid agregatlar ve dağınık lenfositler; 3. Belirgin, bazılarının germinal merkezi olan bol miktarda lenfoid agregat ve belirgin peritümöral lenfosit bandı. Buradan hareketle crohn-benzeri lenfoid reaksiyon çeşitli çalışmalarda bağımsız prognostik öneme sahip olarak bulunmuştur[79].

Tümör infiltre eden lenfositler DNA MMT yetersizliği içeren KRK'larla ilişkili olmaları nedeniyle dikkati çekmiştir. Bu tip immun cevap malign tümör hücrelerinin arasına karışan lenfositlerin varlığı ile karakterizedir. Bu infiltratın miktarının belirlenmesinde çeşitli dereceleme sistemleri önerilmiştir; bunlardan biri bu reaksiyonu yok, hafif veya belirgin (Crohn-benzeri lenfoid reaksiyon için kullanılan dereceleme sistemi ile benzer) olarak kategorize etmektedir. Diğer çalışmalar da lenfositleri kantifiye etmiştir ve DNA MMT yetersizliği için prediktif olabilecek kesim noktaları geliştirmeye çalışmıştır[46].

Son 5 yılda KRK'a karşı gelişen immun yanıtın rolü konusunda yapılan araştırmalarda tümör infiltre eden lenfositlerin varlığı, iyi prognozun bağımsız bir belirleyicisi olarak gösterilmiştir. MMT-yetersizliği olan kanserlerde görülen tümör infiltre eden lenfositik cevabın doğrudan iyi prognozdan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bazı çalışmalar bu immun cevabı, doğrudan bu kanserlerdeki çerçeve kayması peptidlerinin varlığıyla ilişkilendirmektedir [80]. Diğer çalışmalar daha güçlü bir dereceleme sistemi sağlama çabası ile immun cevabın tüm yönlerini hesaba katarak (tümör infiltre eden lenfositler, peritümöral lenfositler ve intratumoral stromal lenfositler) derecelendirme sistemleri öne sürmektedirler [81]. Son olarak birçok çalışma T lenfosit subgruplarını kantifiye etmeyi denemiştir. Bu araştırmaların hepsinin ortak teması immun cevap ile prognoz arasındaki açık korelasyondur. Bazı yazarlar immun reaksiyonun derecelendirilmesinin, TNM evrelemesinden daha kuvvetli prognostik veri sağladığını öne sürmüşlerdir[82].

1.1.8.10 Tümörün İnvaziv Kenarı

Tümörün invaziv sınırının özelliğinin prognozu belirlediği gösterilmiştir. İnfitre edici tümörler invaziv kenarda düzensiz yapı gösterirler. Bu tümörler muskularis propriayı diseke ederek ilerler ve perimuskuler adipöz dokuyu küçük bez yapıları veya irregüler hücre kümeleri şeklinde diseke ederler. Ekspansif ya da itici tümörler düzgün sınır içerirler. [83]. Bu kriterler ile birlikte infiltrate edici sınırın varlığı bağımsız bir kötü prognostik faktör olarak ortaya çıkmıştır. Ayrıca baskın olarak itici veya ekspansif olan tümörler MSI-H fenotipi ile ilişkili bulunmuştur[46].

1.1.8.11 Tümör Tomurcuklanması

Tümör tomurcuklanması invaziv yüzde tümöral glandlardan ayrılan ve komşu desmoplastik stromaya göç ettiği gözlenen neoplastik epitelin (5 hücre veya daha az) küçük agregatlar veya ince kordlar halinde bulunmasıdır[84]. Tümör tomurcuklanması malign hücrelerin dediferansiyasyonunu ve migrasyonunu temsil edebilir ve agresif biyolojik davranış ile ilişkili bulunmuştur. Ultrastrüktürel çalışmalar tomurcuklanan tümör hücrelerinde desmozomların ve bazal membranların yokluğunu ve dalgalı sitoplazmik membran protrüzyonlarını (psödopod) göstermiştir. Çeşitli çalışmalar tümör tomurcuklanmasının genetik aberrasyonlarla birlikte olduğunu göstermiştir, çok değişkenli analizlerde bağımsız prognostik olduğunu ortaya koymuşlardır[84].

Günümüzde tümör tomurcuklanması varlığının skorlaması için çeşitli öneriler vardır; bunlar beş büyük büyütme alanında tomurcukların skorlanması (yüksek dereceli tomurcuklanma; 5 BBA'ında en az bir tomurcuk), veya 10 BBA'ında tomurcukların skorlanması (yüksek dereceli tomurcuklanma; 10 BBA'ında 10 veya daha çok tomurcuk)[85]. Çeşitli araştırmacılar tümör tomurcuklanmasının tespit edilmesinde immunhistokimyasal boyaları (EpCAM, keratinler) yardımcı olarak görmektedirler.

1.1.8.12 Karaciğer metastazları

KRK'lu hastaların yaklaşık %15 ila %25'inde klinik prezentasyon anında karaciğer metastazları vardır. Tedavisiz karaciğer metastazları tespit edildikten sonraki median sağkalım süresi yaklaşık 9 aydır. Seçilmiş hastalarda karaciğer metastazlarının rezeksiyonu prognozu iyileştirmektedir (5 yıllık sağkalım %35-40). Bununla birlikte karaciğer metastazlı hastaların sadece %10-15'i cerrahi için aday olarak dikkate alınmaktadır.

1.1.8.13 Moleküler Genetik Belirteçler

KRK'da bazı moleküler ve genetik değişikliklerin prognostik oldukları bildirilmektedir. Bununla birlikte çok değişkenli analizlerde ,bu değişikliklerin prognostik ilişkisinin bağımsız olup olmadığını belirleyebilecek yeterli veri yoktur.

Genomik ve proteomik profillemeye teknolojilerinin gelişimi ile birlikte belirteçlerin sayısı önemli oranda artma eğilimindedir ve sonuç olarak Oncotype Dx Colon Cancer Assay (Genomic Health, Redwood City, CA) ve Coloprint (Agendia, Amsterdam, Holland) ortaya çıkmıştır[86].

En yaygın olarak çalışılan moleküler değişikliklerden MSI (ve MMT fonksiyon kaybının diğer ölçümleri, özellikle immunhistokimyasal analizler) en büyük potansiyel faydaya sahiptir. Birçok çalışma MMT yetersizliğinin, iyi prognoz ile ilişkili olduğunu ve diğer standart değişkenlerden bağımsız olduğunu bulmuştur[51]. Evre 2 hastalıkta , klinik yönetim kılavuzları MMT durumu ile diğer klinik ve patolojik faktörleri, iyi klinik gidişe sahip ve adjuvan kemoterapiye ihtiyaç duymayan hasta subgrubunu ayırd etmek için kullanmayı önermektedir [55,60].

Geri kalan belirleyiciler arasında kromozom 18q kaybı prognozla en kuvvetli ilişkiye sahiptir. Çoğu çalışmada, 18q LOH veya DCC kaybının, diğer standart değişkenlerden bağımsız olarak kötü prognoz için prediktif olduğu bulunmuştur [87]. Prognoz ile bağımsız olarak ilişkili olabilecek diğer özellikler; DNA ploidi (ve S-faz fraksiyonu), TP53 mutasyonu veya 17p LOH (TP53'ün yerleştiği 17p kromozomal bölgesinin kaybı), ve CDKN1B (p27) ekspresyonunu içermektedir. TP53 immunoekspresyonu çalışmaları tartışmalı olsa da, TP53 mutasyon çalışmaları daha kötü gidişle ilişkili bulunmuştur[54]. Kötü prognoz ayrıca azalmış CDKN1B ile de ilişkili bulunmuştur. KRAS mutasyonlarıyla ilgili sonuçlar değişkendir fakat son çalışmaların ortak fikri KRAS mutasyonlarının tümör rekürrensi ve ölümle ilişkili olduğudur [88].

Son yıllarda çok sayıda genomik ve gen ekspresyon belirleyicilerini kullanan prognostik tetkiklerin gelişiminde artış bulunmaktadır. Genomic Health firmasının Oncotype DX Colon Cancer Assay'i evre II ve III KRK prognozu için belirleyici olarak bildirilmiştir [89]. Agendia'nın Coloprint'i patolojik faktörler ve MMT durumu ile kombine kullanılmaktadır ve yüksek risk faktörleri (T4 durumu) olmayan ve MMT yeterli evre II KRK'ların yaklaşık %70'inde prognostik belirleyicidir.[90]. Şu an bu ticari multigen analizlerinin evre II ve evre III KRK'larda MMT durumu açısından önemli bir gelişme sunup sunmadığı ise belirsizdir.

1.2 Lenfanjiyogenez

Lenfatik sistem su, elektrolitler ve plazma proteinlerini intestisyumdan dolaşıma geri döndürür ve bu nedenle doku homeostazisinin devamlılığında ana role sahiptir. Ayrıca patojenler için bir filtre görevi görür, immun sistem hücrelerini taşır ve bağırsaklardan yağ absorpsiyonunda ana yollardan birini temsil eder. Lenfatik kapillerler perisitler ile döşeli olmayan ve devamlılık göstermeyen bazal membrana sahip, tek sıra endotel içeren, çok ince kör uçlu damar yapılarıdır.

KRK’u da içeren çoğu kanserin patogeneğinde lenfatik sistemin ilişkisi iyi bilinmesine karşın[91], lenfatik damar büyümesi ve gelişimini tanımlayan çalışmalar 20. yüzyılın sonlarından önce ortaya çıkmamıştır. Bunun ana sebebi lenfatik endotelyal belirleyicilerin bu dönemde olmayışı ve bu nedenle lenfatiklerin detaylı analizinin güçleşmesidir. Vasküler endotelyal faktör reseptör-3 (VEGFR-3), podoplanin (D2-40), LYVE-1 ve prox-1 gibi lenfatik endotelyal hücrelere az veya çok spesifik moleküler belirteçlerin keşfi lenfanjiogenezin normal veya patolojik durumlarda nasıl meydana geldiğini daha iyi anlamamızı sağlamıştır[92-94].

Normal yetişkin dokularında VEGFR-3 temel olarak lenfoendotelyal hücreler tarafından eksprese edilmektedir ve tanımlanmış ilk lenfanjiogenik büyüme faktörüdür. Temel olarak VEGF-C ve VEGF-D olmak üzere, VEGF ligand ailesi üyeleri tarafından aktive edilir ve lenfoendotelyal büyüme, hücre yaşamı ve migrasyona aracılık eder [95]. Bununla birlikte tümöral ve doku iyileşmesi sırasında izlenen vasküler yapılar yanısıra normal dokulardaki kan damarları tarafından da eksprese edilebilir[96].

Glomerüler podositlerin bir membran glikoproteini olan podoplanin, daha spesifik lenfoendotelyal belirteçlerden biridir[97]. Temel olarak, küçük lenfatiklerce eksprese edilmesine karşın, düz kas hücrelerine sahip daha geniş damarlarda eksprese edilmez. Podoplaninin hedeflenmiş delesyonu, lenfatik damar paterni ve fonksiyonunda defektlere neden olur[98]. Bu, podoplaninin lenfatik gelişimde fonksiyonel bir rolü olduğuna işaret eder. Podoplaninin ekspresyonu lenfatik endoteline %100 spesifik değildir. Osteoblastlar, böbrek podositleri ve akciğer tip 1 alveolar hücreleri de bu mukoproteini eksprese edebilir[99].

CD44 glikoproteininin bir homoloğu olan LYVE-1, hyaluronan için lenf-spesifik bir reseptördür[100]. Hepatik sinüzoidal hücreleri tarafından da eksprese edilmesine karşın en değerli ve en yaygın kullanılan lenfoendotelyal belirleyicilerden biri olarak sayılmaktadır.

İlk lenfatik keselerin ,kardinal venlerdeki endotelial hücrelerin bir subgrubundan dallanarak ve tomurcuklanarak oluştuğu düşünülen lenfatik sistem, vasküler sistemden daha sonra gelişmektedir. Bu işlem neredeyse her zaman lenfatik endotelial hücreler tarafından eksprese edilen homeobox transkripsiyon faktörü Prox-1'e bağımlıdır[101]. Prox-1 null sıçanda, lenfatik damarların gelişimi başarısızdır ve bunlar midgestasyon aşamasında ölürler [102]. İlginç olarak normal mukoza ile kıyaslandığında, prox-1 ekspresyonu KRK'da önemli oranda artmıştır, fakat yakın zamanda tümör lenfangiogenezi ile kesin bir bağlantı gösterilememiştir[103]. Ayrıca, forkhead transkripsiyon faktörü FOXC2 lenfatik gelişimin kontrolü ile ilişkili olarak gösterilmiştir. Özellikle lenfatik kapakların endotelial hücreleri yüksek düzeyde FOXC2 ekspresyonu gösterirler ve bunun yıkılması lenfatik kapakların eksikliğine ve dezorganize paternine yol açar[104]. Eph reseptör tirozin kinazları ve bunların ligandları ephrinler de lenfanjiogenik gelişimde rol oynamaktadır. EphrinB2'nin delesyonu lenfatik damarlar ve kapakların maturasyonunda bozukluklara yol açmaktadır[105].

İlk lenfatik keselerden başlayarak yeni dallanan endotelial hücreler sindirim sistemini de içeren çeşitli organlara girer ve lenfatik kapiller ve damarlarını oluştururlar. Normal kolon ve rektumda lenfatik damarlar az sayıda kriptin bazal alanına ulaşan yükselen dallar ve submukozanın derinliklerine ulaşan dik dallar olarak muskularis mukozanın altında longitudinal olarak yerleşir.

Büyüme faktörlerinin (VEGF-C ve angiopoietin-1) artmış ekspresyonu sonucu lenfatik damarlanmanın selektif hiperplazisi hayvan modellerinde gösterilmiştir[106], fakat şu an normal lenfatik damarlar ve tümör tarafından indükleniş lenfatik damarlar arasındaki fonksiyonel ve yapısal farklılıklar konusunda ilgili çok az şey bilinmektedir.

1.2.1 Tümör lenfangiogenezi ve klinik ilişkisi

KRK'un en önemli prognostik faktörü tanı anındaki tümör evresidir ve tedavide en etkili faktördür. Bağırsak duvarına sınırlı kanserlerle kıyaslandığında, lenf nodu tutulumu olan kanserler önemli oranda daha kötü prognoza sahiptir. Lenf nodu metastazı ile birlikte 5 yıllık sağkalım anlamlı oranda düşer. Bu durum KRK'larda nodal metastazın güçlü prognostik etkisini gösterir. Bağırsak duvarına sınırlı tümörler, (TNM evre I ve II) kür oranlarının %90 civarlarında olduğu cerrahi rezeksiyon ile tedavi edilir. Hastaların sadece bir subgrubu ortalamadan daha yüksek bir tümör rekürrens riski gösterebileceği için, evre II kolon kanserli hastalarda adjuvan tedavinin potansiyel değeri daha tartışmalıdır[107]. Evre II rektal kanserler için, özellikle lokal ileri tümörlerde (T3 tümörler) ek kemoradyoterapi göz önüne alınabilir. Lenf nodu metastazları ile ilişkili evre III kanserlerde sadece cerrahi ile 5 yıllık sağkalım

%40'dır ancak uygun adjuvan tedavi ile %60'ın üzerine çıkarılabilir[56]. Karaciğer gibi diğer organ metastazları gündeme geldiğinde (evre 4), 5 yıllık sağkalım %10'a kadar düşer. Rezekte edilebilir karaciğer metastazları için 5 yıllık sağkalım %40'ın üzerine çıkarılabilir, ancak rezeksiyon mümkün değilse, sağkalım 2 yıl için sıfıra yaklaşır[108].

Hayvan çalışmalarında ve diğer çalışmalarda artmış lenfanjiogenezis ve metastatik yayılım arasında ilişki olduğu öne sürülmüştür[109-112]. Örneğin baş ve boyun kanserlerinde, melanomda ve meme kanserinde artmış intratümoral ve peritümöral lenfatik damar yoğunluğu metastatik yayılım ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur[111-113]. Peritümöral veya intratümöral lenfanjiogenezisin, tümör yakınındaki veya içindeki lenfatik vasküler alanı artırarak tümör hücreleri ile lenfatikler arasındaki teması arttırdığı öne sürülmektedir. Bu durum sırasıyla tümör hücrelerinin lenfatik ağı girişini kolaylaştırmakta ve sonuçta metastazı provoke edebilmektedir. İntratümöral tümör lenfanjiogenezisinin immun sistemi aktive ederek, metastazı zorlaştırdığına yönelik hipotezler de bulunmaktadır.

İnatümöral lenfatik damarların metastatik hastalıkta önemli bir özellik olan lenfatik yollu metastaza hangi oranda katkıda bulunduğu tartışmalıdır[114,115]. İntratümöral lenfatik damarlar genellikle dar ve kollabe görünümündedir. Bunun muhtemel nedeni artmış interstisyel sıvı basıncı ve lümeni daraltan tümör hücreleridir. Bu intratümöral damarların drene etme kapasitesi olup olmadığı tam olarak netliğe kavuşmasa da bazı dokularda bu konuda yapılan mekanistik çalışmalar mevcuttur[115]. Hayvan modellerinde VEGF-C overekspresyonu ettiği bildirilen ve lenfanjiografi ile de ölçülen intratümöral lenfatik damarların fonksiyonel olmayabileceği bildirilmiştir ve bu durum bu damarların lenf nodlarına tümör yayılımı konusundaki rollerine şüphe getirmektedir[116,117]. KRK'da intratümöral lenfatik damarlar nadirdir ve sadece dar ve kollapse lenfatik damarlar şeklinde gözlemlenebilir[118,119]. Çoğu lenfatik damarlar invazyon sınırının kenarında peritümöral olarak yerleşir ve bu damarlar muhtemelen ekspansiyon olan tümör kitlesi tarafından komprese edilen daha önceden varolan damarları temsil etmektedir. Bu damarlar olasılıkla VEGF-C stimülasyonu yoluyla tümör hücrelerinin lümenine girişinin sağlandığı damarların dallanma ve dilatasyon işlemi yoluyla genişleyen tümör kitlesi tarafından komprese olmuş daha önceden var olan damarlardır[120,121]. Bu nedenle KRK'da da gözlenebilen tümör kenarındaki fonksiyonel lenfatikler lenfanjiogenik tümör yayılımı için muhtemelen yeterli olabilir[116].

Normal dokulara kıyasla bazı çalışmalar KRK'da hücre proliferasyonunda ve lenfatik damar yoğunluğunda bir artış göstermişlerdir[118]. Son çalışmalar lenfatik damar yoğunluğu ile klinik gidiş, lenfovasküler invazyon, invazyon derinliği ve bölgesel lenf nodlarına ve karaciğer metastaz arasında pozitif korelasyonu göstermişlerdir[122,123]. Dahası erken evre

karsinomlar ile adenomlar ve karsinoma in situ'lar karşılaştırılarak artmış peritümöral lenfatik damar yoğunluğu ve lenfatik damar boyutlarının lenf nodu metastazı ile iyi korele olduğu gösterilmiştir[124,125]. Hepsi bir araya getirildiğinde bu çalışmalar KRK'da lenfanjiogenezisin meydana geldiğini ve aslında tümör gelişiminde erken evrelerde tetiklendiğini düşündürmektedir.

1.2.2 Tümör lenfanjiogenezisinin mekanizmaları

Günümüzde tümör lenfanjiogenezisinin daha önceden var olan lenfatik damarların bölünmesi ile mi yoksa diğer mekanizmalarla mı meydana geldiği kesin olarak anlaşılamamıştır. Lenfatik damar formasyonunun bir mekanizması kanda dolaşan endotelial progenitörlerin (DEP) önceden var olan lenfatikler ile birleşmesi olabilir. DEP'ler kemik iliği kaynaklı dolaşan endotelial hücrelerin (DEH) bir subpopülasyonudur. Bunlar progenitör benzeri fenotip eksprese ederler ve kanseri de içeren patolojik durumlarda dolaşımda bol miktarda bulunurlar[126,127]. DEP'ler kendilerini kan damarları içine katabilirler ve böylece tümör anjiogenezisine katkıda bulunabilirler[128]. DEP'ler, CD34 ve VEGFR-2 ekspresyonu sayesinde izole edilmişlerdir ve ilk defa tanımlanmışlardır .CD133 kök hücre belirleyicisi ekspresyonları ile matür DEH'lerden ayrılırlar[129]. CD34 pozitif hücrelerin bir alt grubu VEGFR-3 ve CD133'ü birlikte eksprese etmektedir[130] ve dolaşımdan göç edip genişleyen tümör ilişkili damarlara entegre olan lenfatik endotelial progenitörlerin bir altpopülasyonunu temsil ediyor olabilirler.

Bir çalışmada alıcı kökenli DEP'lerin, transplant rejeksiyonu olan ve yüksek oranda lenfatik proliferasyon gösteren renal nakilli bireylerin renal dokularında lenfanjiogenezise katkıda bulundukları gösterilmiştir[131]. Bununla birlikte aynı çalışma daha önceden kemik iliği nakli olmuş, KRK'ı da içeren 2 karsinom olgusunda donör kaynaklı DEP'lerin katılımı bulunmayan peritümöral lenfanjiogenezis gösterilmiştir. Bu bildirilerden herhangi bir sonuç çıkarılamasa da yakın zamanlı bir çalışma, fare xenograft modelinde tümör lenfanjiogenezisinin daha önceden var olan lokal lenfatik damarların, DEP'lerin katkısı olmadan dallanması ile oluşabildiğini göstermiştir[132].

Tümör lenfanjiogenezisine alternatif bir katkı ise diğer hücre tiplerinin lenfatik endotelial hücrelere transdiferansiyasyonudur. Örneğin makrofajlar lenfanjiogeneziste ikili rol oynayabilirler[133]: Bir fare kornea modelinde, makrofajlar lenfatik endotelial hücrelere transdiferansiye olabilmışler ve dallanan lenfatik damarlara katılabilmışlerdir. Hücreler ayrıca bol miktarda lenfanjiogenik büyüme faktörleri üretmeye de programlanmışlardır ve böylece lenfanjiogenezisi stimüle edebilmişlerdir[134]. Tümör ilişkili lenfanjiogenezisin diğer bir

hipotetik kaynağı tümör hücrelerinin lenfatik endotelyal hücrelerine dediferansiye olması ve genişleyen lenfatik ağa entegre olmalarıdır. Geleneksel olarak, tümör ilişkili vasküler ve lenfatik endotelin konak stromasından kaynaklandığı veya kemik iliğinde üretilen dolaşan progenitörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle bu hücreler genetik olarak tümör hücrelerinden farklı olarak düşünüldüğünde , daha az ilaç direnci geliştirme olasılığı olan bir terapötik hedefi temsil ettiği düşünülebilir. Bununla birlikte B hücreli lenfomalarda yapılan bir çalışmada tümör damarlanmasının kısmen de olsa tümör hücresi kökenli olabileceğini gösteren, tümör ilişkili vasküler endotelyal hücrelerin tümör hücreleri ile ortak kromozomal defektleri taşıdığını ortaya çıkarmıştır[135]. Günümüzde tümör hücrelerinin lenfatik endotelyal hücrelere diferansiye olup olmadığı ve büyüyen tümör ilişkili lenfatik ağa katılıp katılmadığı bilinmemektedir.

1.2.3 Lenfanjiogenezisin moleküler mediatörleri

Hem klinik hem de deneysel çalışmalar VEGF-C'yi lenfanjiogenezisin ana regülatörü olarak belirlemiştir ve çeşitli çalışmalar VEGF-C seviyesi ile lenf nodu metastazı arasında pozitif korelasyonu göstermiştir[109,136].

Hayvan tümör modellerinde VEGF-C'nin artmış ekspresyonu intratümöral ve peritümöral lenfatik oluşumunu belirgin olarak artırmakta ve lenf nodu metastazını provake etmektedir[137]. Ayrıca bölgesel lenf nodlarından distal lenf nodlarına ve organlara metastaza da ön ayak olabileceği düşünülmektedir. Lenfatiklerdeki etkisi, temel olarak lenfatik endotelyal hücrelerinde yaygın olarak eksprese edilen VEGFR-3 yoluyla gerçekleştirilir. Ayrıca lenfatik hücrelerinde bulunan ancak daha az afiniteli olan VEGFR-2'ye bağlanıp aktive edebilir. VEGF-D de bu reseptörlere bağlanıp lenfanjiogenezisi kolaylaştırabilir. Bu nedenle in vivo ve in vitro olarak lenfatik endotelyal hücrelerin migrasyonunu, sağkalımını ve proliferasyonunu stimule eden ligand-reseptör bağlanmasının olduğu VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 yolakları lenfanjiogenezisi çalıştıran en iyi tanımlanmış sinyalizasyon sistemleridir[95,110]. VEGF-C ve VEGF-D kompleks proteolitik ayrılmalara giden ve sonra işlemin çeşitli aşamalarında farklı afiniteler gösteren prekürsör proteinler olarak sentezlenmektedir. Bazı yayınlar KKR'lerde VEGF-C ve VEGF-D artmış ekspresyonu ile lenf nodu metastazı arasında pozitif korelasyon göstermesine karşın[136], diğer çalışmalar bunu desteklememektedir[138]. Bununla birlikte güçlü deneysel çalışmalar temel alındığında VEGF-C ve VEGF-D ekspresyonu ile lenf nodu metastazı arasında pozitif korelasyon görülmektedir[139] ve KKR'da hastalığın gidişine hem VEGF-C hem de VEGF-D'nin katkısının olduğu görülmektedir.

Bazı çalışmalarda VEGF-A ekspresyon düzeylerinin de KRK'da lenf nodu metastazı ile önemli oranda korele olduğu gösterilmiştir[122]. Lenfanjiogenik özellikler gösterdiği lenfatik endotel hücrelerinde de eksprese edilen ve daha çok tümör anjiogenezindeki rolü nedeniyle iyi bilinen bu büyüme faktörü VEGFR-2'ye bağlanır ve aktive eder. VEGF-A , VEGF-C ve VEGF-D için bilinen kaynak olan inflamatuvar hücrelere etkili potent bir kemoatraktandır. Bu nedenle VEGF-A lenfanjiogenezisi VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 sinyalizasyon yollarının aktivasyonundan bağımsız olarak stimüle edebilir.

Deneyisel hayvan modellerinde temel fibroblastik büyüme faktörünün (FGF-2 olarak da bilinir) hem anjiogenez[140] hem de lenfanjiogenez[141] stimüle ettiği gösterilmiştir. Dahası klinik materyalde FGF-2 ekspresyonu ile tümör derecesi, evresi, lenf nodu metastazı ve lenfovasküler invazyon arasında pozitif korelasyon tanımlanmıştır[142]. FGF-2'nin lenfanjiogenik etkisi VEGFR-3'e karşı geliştirilmiş nötralize edici antikorların FGF-2-stimule lenfanjiogenez baskılaması nedeniyle muhtemelen indirekt olarak VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 yolağı yoluyla gerçekleşmektedir. VEGFR-3 bağımlı etkisinin altında yatan mekanizma, FGF-2'nin VEGF-A'ya benzer şekilde VEGF-C ve VEGF-D salınımı yapan inflamatuvar hücreleri çekmesi olabilir. Yakın zamanda KRK'da FGF-2 ekspresyonunun tümör progresyonuyla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur[143] ancak KRK'larda FGF-2 ile lenfanjiogenez arasındaki ilişkiyi konu alan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

En potent üyesi PDGF-B olan PDGF ailesi üyeleri de ayrıca lenfanjiogenik özellikler sergilemektedir ve bunu PDGFR-alfa ve PDGFR-beta (tirozin kinaz reseptörleri) yoluyla gerçekleştirmektedir. VEGF-C/VEGF-D/VEGF-3 yolağının bloke edilmesinin, PDGF tarafından indüklenmiş lenfanjiogenez etkilememesi sebebiyle, VEGFR-3'den bağımsız etki gösterdiği görülmektedir[144]. Bununla birlikte KRK'larda PDGF ekspresyonunun lenfatik damar yoğunluğu, prognostik parametreler ve lenf nodu metastazları ile ne derecede bağlantılı olduğu araştırılmalıdır.

Angiopoetin 1 ve 2 (Ang-1 ve Ang-2) yetişkin dokularında olduğu gibi, embriyogenez sırasında kan ve lenfatik vasküler yapılarının oluşumu , stabilizasyonu ve maturasyonu ile ilişkilidir. Bunların reseptörü olan Tie-2 hem kan, hem de lenfatik endotel hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilir. Ang-1'in deneyisel hayvan modellerinde lenfatik damar tomurcuklanması, hiperplazisi ve büyümesini desteklediği gösterilmiştir[106]. Ang-2'in lenfanjiogenez direkt olarak indüklediği henüz gösterilememiştir ve muhtemelen lenfatik maturasyon faktörü olarak fonksiyon görmektedir.

Bazı deneyisel çalışmalar hepatosit büyüme faktörünü (HGF) lenfanjiogenik faktör olarak bildirmektedir[145,146]. VEGF-C/VEGF-D/VEGF-3 yolları yoluyla çalışan HGF

tarafından indüklenen lenfanjiogenezis, bu tür lenfanjiogenezisin VEGFR-3 reseptörü solüsyonu ile bloke edilebilmesi ile gösterilebilmiştir. Artmış HGF serum düzeyleri KRK hastalarında da tespit edilmiştir[147]. Diğer insan tümörlerinde de HGF ekspresyon düzeyleri ile lenf nodu metastazları arasında korelasyon görülmektedir[148], ancak KRK'da HGF ekspresyonu ile lenfanjiogenezis ve lenf nodu metastazı arasında direkt korelasyon olup olmadığı araştırılmamıştır.

Normal kolon mukozası ile kıyaslandığında, KRK da IGF-1 ve IGF-2 düzeylerinde 10 ila 50 kat artış gösterilmiştir[149]. Her iki büyüme faktörü de in vitro ve in vivo olarak insan ve fare lenfatik endotelial hücrelerinde proliferasyonu ve migrasyonu stimüle etmektedir ve bu etki lenfatik endotelde bulunun IGF reseptörleri tarafından direkt olarak yönetilir[150].

Lenfatik endotelial proliferasyon, migrasyon ve sağkalıma öncülük eden intrasellüler sinyalizasyon yolları henüz tam olarak anlaşılamamıştır, fakat çeşitli ortak yollar bununla ilişkili gözükmemektedir. Örneğin VEGFR-3'ün VEGF-C veya VEGF-D tarafından indüklenen stimülasyonu ERK 1/2 ve PI3K/Akt yollarının aktivasyonuna yol açabilir[95]. Daha spesifik olarak bu aktivasyonun VEGFR-3'ün sitoplazmik domain'indeki 1,230/1,231 no'lu tirozin rezidülerinin fosforilasyonu ve daha sonra GRB2'nin reseptöre bağlanmasından sonra oluştuğu gösterilmiştir[151]. GRB2'nin reseptöre bağlanması önemli oranda fosforile PI3K ve Akt düzeylerini düşürmektedir. Bu durum bu proteinin VEGFR-3 tarafından yönlendirilen proliferasyon, migrasyon ve sağkalımda kilit rol oynayabileceğini desteklemektedir. Lenfoendotelial hücrelerde bulunan diğer büyüme faktör reseptörlerinin de ayrıca ERK1/2 ve Akt'yi ligand bağlanması üzerinden aktive edebileceği düşünülmektedir. Bu durum tedavi açısından kullanılabilecek ortak intrasellüler sinyalizasyon yolları olduğuna işaret etmektedir.

Özetle, hem VEGF-C hem de VEGF-D KRK'da upregüle edilmektedir ve bu yolla VEGF-C/VEGF-D/VEGF-3 yolağı üzerinden tümör lenfanjiogenezini yönlendirmektedirler. VEGF-A gibi diğer büyüme faktörleri ise düzenleyici etkilere sahip olabilir. Ayrıca IGF'ler, HGF, PDGF'ler ve angiopoetinlerin KRK'larda lenfanjiogenezise ne oranda katkıda bulunduğu da araştırılmalıdır. Ayrıca EGF ve TGF gibi diğer büyüme faktörleri KRK'la ilişkili olarak bilinmektedir ve varsayılan lenfanjiogenik özellikleri açısından araştırılmalıdırlar.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Hasta Seçimi ve Klinikopatolojik Parametreler

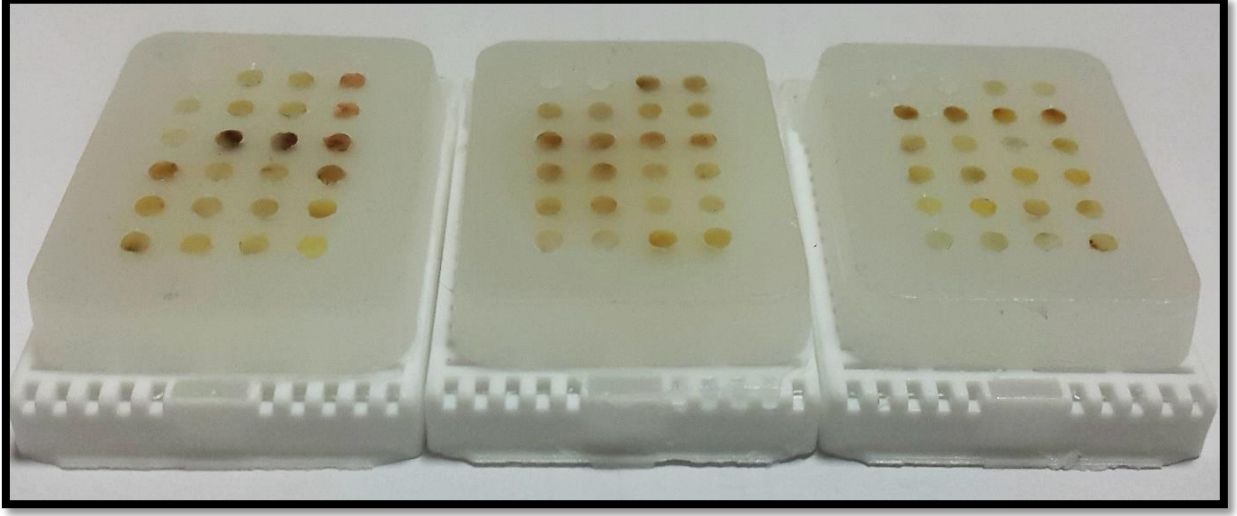
Bu çalışmaya 2005-2011 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde tanı almış ve tedavi edilmiş 304 adet kolon adenokarsinomu olgusu dahil edilmiştir. Tüm olgular radikal rezeksiyon ve endikasyon dahilinde adjuvan kemoterapi ile tedavi edilmiştir. Olgulara ait demografik özellikler, tümörün lokalizasyonu, operasyon tipi, tümör çapı, tümör alt türü ve derecesi, patolojik tümör ve lenf nodu evreleri (sırasıyla pT ve pN), diseke edilen toplam lenf düğümü sayısı, tutulum olan lenf düğümü sayısı, lenfatik, venöz ve perinöral invazyon varlığı, serbest tümör depoziti ve tümör tomurcuklanması bulunuşu, desmoplazi ve intra/peritümöral lenfosit infiltrasyonu derecesi, tubuler ve radial sınır durumu, nüks, uzak metastaz ve sağkalım durumu hastaların kayıtlarından ve patoloji raporlarından elde edilmiştir. Tümör evreleri Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve AJCC 2010'a göre güncel hale getirilmiştir. Hastalığa-bağlı veya hastalık-dışı ölüm sebepleri ve son kontrol tarihleri de kayıt altına alınmıştır.

Bu tez çalışması Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından, 19.02.2015 tarih ve 2015/05-08 karar numarası ile onaylanmıştır.

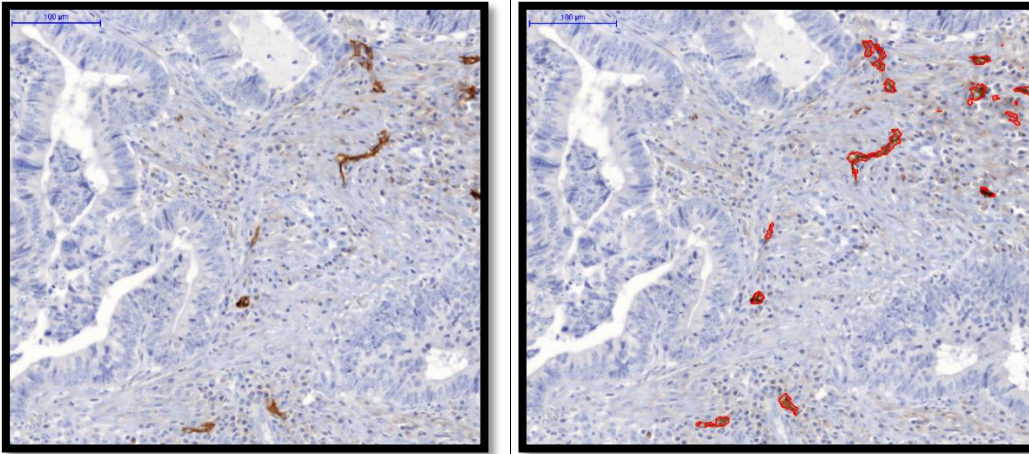
2.2 Histopatolojik Değerlendirme ve İmmunhistokimya

Çalışmaya alınan 304 olguya ait hematoksilen eozin ile boyalı kesitler patoloji aşivinden çıkartılmış ve tekrar incelenmiştir. Her olguda, tümörün en derin invazyon yaptığı bölgelerden intratümöral vasküler yapıların en yoğun seçilebildiği, temsil edici alanlar belirlenmiş ve preparat üzerine işaretlenmiştir. İmmunhistokimyasal (IHK) boyama için, seçilen preparatlara ait parafin bloklarından, preparatlar üzerindeki işaretlenmiş alanlara uyan bölgeler 2 mm çapında doku korları halinde çıkarılarak doku dizini bloklarına (DDB) gömülmüştür. DDB'ları manuel olarak, Tissue MicroArray (TMA) Builder Kit (Histopathology, Ltd, Hungary) ile hazırlanmıştır. Her DDB'unda 24 adet kor bulunmakla birlikte, 2 kor DDB'na oryantasyon açısından boş bırakılmıştır. Daha sonra DDB'ndan lizinli lamlara 4 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Hazırlanan kesitlere, Anti-D2-40 (İnvitrogen, Monoclonal Mouse [clone D2-40], dilüsyon 1:50) antikoru, intratümöral lenf damarlarını işaretlemek amacıyla uygulanmıştır. Lenf damarı endotel hücrelerinde izlenen

sitoplazmik boyanma pozitif boyanma olarak kabul edilmiştir. İHK'sal boyama, Ventana Benchmark XT otomatik boyama cihazında standart prosedür kullanılarak uygulanmıştır.



Resim 1: Doku dizini blokları



Resim 2: D2-40 pozitif intratümöral lenfatik damarlar ve görüntü analizi

Anti-D2-40 antikoru ile boyanan DDB kesitleri, Mirax Midi (3DHistech) preparat tarama sistemi kullanılarak 20X büyütmede taranmıştır. Her bir dokuda depolanan sanal görüntüler üzerinde intratümöral lenf damarlarının anti-D2-40 antikoru ile en yoğun boyanma gösterdiği alanlar değerlendirme için işaretlenmiştir. İşaretlenen alanlardaki lenf damarlarının miktarının ölçümü için, HistoQuant (3D Histech) görüntü analizi programında, anti-D2-40 antikoru ile boyanma rengi ve yoğunluğunu temel alan bir konfigürasyon dosyası oluşturulmuştur. Konfigürasyon dosyasındaki bu ayarlar temel alınarak, daha önceden işaretli alanlarda lenf damarları ile ilgili ölçümler 3D Histech HistoQuant görüntü analizi

programında gerçekleştirilmiştir. Sonuçta Resim 2’ de izlendiği gibi boyanan lenfatik damarlar görüntü analiz programı tarafından otomatik olarak seçilmiş ve birim alana düşen objelerin yüzey alanı ve sayısına ilişkin ölçümleri yapılmıştır. Ölçümlerle ilgili parametreler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Görüntü analizi programı (3D Hitech- Histoquant) ile hesaplanan parametreler

Veri	Formül Açıklama
FA	mm2 olarak seçilmiş alan
MA	Seçilen objelerin mm ² olarak toplam yüzey alanı
NO	Saptanan obje sayısı
fNO	mm ² ’de saptanan objelerin sayısı (NO/FA)
fMA	mm ² ’de saptanan objelerin toplam yüzey alanı (MA/FA)

2.3 İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler Statistical Packace Fort the Social Sciences (SPSS) 15.0 programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Görüntü analiz programı ile elde edilen, lenf damarlarının sayısal verilerinin, tek değişkenli ve çok değişkenli olarak klinikopatolojik prognostik parametreler ile ilişkisi yanısıra, tüm klinikopatolojik değişkenlerin sağkalım verileri ile ilişkisi de incelenmiştir. Tek değişkenli analizlerde Ki-Kare Testi, bağımsız örneklem T testi, Pearson ve Kendall’s korelasyon analizleri kullanılmıştır. Çok değişkenli analizde ise binary lojistik regresyon modeli oluşturulmuştur. Klinik veri yaşam analizinde Kaplan Meier Testi modeli ile değerlendirme yapılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ kabul edilmiştir.

3. SONUÇLAR

3.1 Klinik bulgular

Çalışmaya dahil ettiğimiz 304 olgumuz, 2005-2011 yılları arasında bölümümüzde kolon adenokarsinomu tanısı almış ve olguların tamamına hastanemizde radikal kolon rezeksiyonu uygulanmıştır. Radikal rezeksiyona ek olarak, 240 olgu (%79) adjuvan tedavi almış, 64 olgu (%21) ise adjuvan tedavisiz kontrol edilmiştir. Çalışmadaki olguların yaş ortalaması 65.49 (min:24, max:89) olup, 186’sı erkek (%61.2) ve 118’i (%38.8) kadındır. Olguların ortalama takip süresi 56.96 ay’dır. Takip süresi sonunda, 180 olgunun sağ (%59.2),

124 olgunun (%40.8) ölmüş olduğu tespit edilmiştir. Sağ olguların, 152'si (%50.3) hastalıksız, 28'i (%9.2) hastalıklı olarak sağ iken; ölmüş olan olguların 98'i (%32.2) hastalığa bağlı, 14'ü (%4.6) ise hastalık-dışı sebeplerle ölmüşlerdir. Ayrıca 11 olgu (%3.6) hemen operasyon sonrasında ölmüştür. Takip süresi içinde 206 olguda (%67.8) nüks gelişmiş olup, 98 olguda (%32.2) nüks saptanmamıştır. Bununla birlikte 213 olguda (%70.1) takipler sırasında ve/veya tanı anında uzak metastaz tespit edilirken, 91 vakada (%29.9) metastaz izlenmemiştir.

3.2 Patolojik bulgular

Olguların tümü, 2010 Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasına göre, adenokarsinom tanısı almış olgular olup diğer adenokarsinom alttürleri çalışma dışı bırakılmışlardır. 282 olgu (%92.7) düşük dereceli, 22 olgu (%7.3) ise yüksek dereceli olarak sınıflandırılmıştır. Olgularda ortalama tümör çapı 22.07 ± 24.82 'dir. Hiçbir olguda proksimal ve distal cerrahi sınır pozitifliği saptanmamış olup, 65 vakada (%21.4) radial sınır pozitifliği saptanmıştır. Patolojik T evrelerine (AJCC 2010) bakıldığında 2 olgu (%0.7) pT1, 33 olgu (%10.9) pT2, 147 olgu (%48.8) pT3, 103 olgu pT4a, 19 olgu ise pT4b olarak değerlendirilmiştir. Lenf nodu tutulum evrelerine (AJCC 2010) bakıldığında ise; 145 olguda (%47.7) lenf düğümü metastazı saptanmamış olup N0 olarak değerlendirilmiştir. N1a, N1b, N1c, N2a, N2b olarak belirlenen olgu sayıları ise, sırasıyla 36 (%11.8), 43 (%14.1), 16 (%5.3), 30 (%9.9) ve 34'dür (%11.2). Olguların 32'sinde (%31.4) perikolik yağ dokusu içinde serbest tümör depoziti tespit edilirken, 202 olguya ait veri bulunmamaktadır. Tümör tomurcuklanması bulunan olgu sayısı 145 (%64.4) olup, 79 olguya ait veri bulunmamaktadır. İntra/peritümöral lenfosit infiltrasyonu 46 olguda (%15.7) görülmemiştir. Bununla birlikte 218 vakada (%74.4) hafif-orta, 29 olguda (%9.9) ise belirgin olarak değerlendirilmiştir. Onbir olguda bu konuda veri yoktur.

Olgularımızda tümör desmoplazisi hafif, orta ve şiddetli olarak sınıflandırılmıştır. Desmoplazi düzeyi hafif, orta ve şiddetli olan olguların sayısı sırasıyla 73 (%26.2), 124 (%44.4) ve (%29.4) olarak tespit edilmiştir. Yirmibeş olguda bu konuda veri bulunmamaktadır.

Lenf damarı invazyonu, venöz invazyon ve perinöral invazyon sırasıyla 131 (%43.1), 64 (%21.1) ve 62 (%20.4) olguda pozitifdir. Sırasıyla 173 (%56.9), 240 (%78.9) ve 242 (%79.6) olguda ise lenfatik venöz ve perinöral invazyon gözlenmemiştir.

3.3 Lenf damarı morfometrik ölçümlerine ait bulgular

Dokularımızda , görüntü analizi programında lenf damarı miktarı ölçümü için manuel olarak seçilen alanların (FA) ortalaması $1.84 \pm 1.38 \text{ mm}^2$ dir. Seçilen alan içinde görüntü analizi programı tarafından tespit edilen objelerin yüzey alan (mm^2) (MA) ortalaması $0.004 \pm 0.010 \text{ mm}^2$ olarak bulunmuştur. Tespit edilen objelerin sayısının ortalaması (NO) ise 274.55 ± 659.65 olarak bulunmuştur. Görüntü analizi programında, tespit edilen objelerin sayısının,değerlendirme için seçilen alana oranı (NO/FA [fNO]) ve hesaplanan obje yüzey alanının değerlendirme için seçilen alana oranı (MA/FA [fMA]) iki ayrı parametre olarak değerlendirilmiştir. fMA değeri ortalaması 0.002 ± 0.003 olup, fNO değeri ise 115.27 ± 176.85 olarak bulunmuştur.

3.4 Olguların klinikopatolojik özellikleri ve sağkalım ile ilişkisi

Klinikopatolojik değişkenlerin ve lenf damarı ölçüm değerlerinin sağkalım ile ilişkisi sırasıyla tablo 3 ve tablo 4’de özetlenmiştir. Klinik veriler incelendiğinde ileri yaştaki hastalarda ölüm daha sık görülmektedir ($p < 0.001$). Ayrıca nüksü ($p = 0.000$) ve uzak metastazı ($p = 0.000$) olan hastaların ve adjuvan tedavi alan ($p = 0.005$) hastaların daha kısa yaşadıkları tespit edilmiştir. Bununla birlikte tümör lokalizasyonu ve cinsiyet ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur.

Ki kare testi ile pT, pN, venöz invazyon, perinöral invazyon, serbest tümör depoziti varlığı ve radial cerrahi sınır pozitifliği ile sağkalım arasındaki ilişki araştırılmıştır. pT evresi ($p = 0.019$) ve pN evresi ($p = 0.015$) yüksek olan olgularda ölüm daha sık görülmektedir. Bağımsız örneklem T testinde ise tutulan lenf nodu sayısı arttıkça sağkalımın anlamlı olarak düştüğü ($p = 0.004$), ayıklanan lenf nodu sayısı arttıkça sağkalımın iyileştiği ($p = 0.031$) izlenmektedir. Ayrıca perinöral invazyon ($p = 0.012$), serbest tümör depoziti varlığı ($p = 0.036$) ve radial cerrahi sınır ($p = 0.007$) pozitifliği vakaların sağkalımını anlamlı oranda düşürmektedir. Bununla birlikte, tümör derecesi, lenfatik invazyon varlığı, tümör tomurcuklanması, intra/peritümöral lenfosit sayısı ve desmoplazi derecesi ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Lenf damarı ölçüm parametrelerinin sağkalım ile ilişkisi incelendiğinde ise, MA ($p = 0.009$), fMA ($p = 0.034$), NO ($p = 0.023$) ve fNO ($p = 0.013$) değerleri yüksek olan hastaların sağkalımının daha uzun olduğu saptanmıştır.

Yapılan tek değişkenli analizlerde sağkalım ile arasında anlamlı ilişki bulunan değişkenlerin , çok değişkenli lojistik regresyon analizinde tekrar değerlendirilmesi ile ;

adjuvan tedavi (p=0.000), nüks varlığı (p=0.000), pT evresi (p=0.026) ve venöz invazyon (p=0.038) bağımsız prognostik parametreler olarak karşımıza çıkmaktadır (Tablo 5).

Kaplan Meier sağkalım analizinde olguların ortalama genel sağkalım süresi 80.722±2.665 ay olup, kanser spesifik sağkalım ortalaması 84.870±2.657 aydır (Şekil 1). Lenf damar ölçüm değerleri ROC analizinde incelendiğinde uygun bir eşik değeri tespit edilememiştir. Bu nedenle lenf damar ölçüm değerleri, median değerleri temel alınarak dikotomize edilmiştir [152]. Kaplan Meier sağkalım analizinde, median değerleri dikkate alınan lenf damar ölçümleri ile yapılan genel sağkalım ve kanser-spesifik sağkalım eğrileri şekil 2-5’de gösterilmiştir.

Tablo 3: Olguların klinikopatolojik özellikleri ve sağkalım ile ilişkisi

		Tüm olgular	Sağ	Ex	p
Yaş		65.49±11.93	61.92±11.60	70.68±10.45	<0.001
Cins	Erkek	186 (%61.2)	105 (%58.3)	81 (%65.3)	0.219
	Kadın	118 (%38.8)	75 (%41.7)	43 (%34.7)	
Tm yeri	Çekum	48 (%15.8)	27 (%15)	21 (%16.9)	0.643
	Sağ kolon	44 (%14.5)	29 (%16.1)	15 (%12.1)	
	Hepatik fx	29 (%9.5)	15 (%8.3)	14 (%11.3)	
	Transvers	8 (%2.6)	6 (%3.3)	2 (%1.6)	
	Splenik fx	24 (%7.9)	12 (%6.7)	12 (%9.7)	
	İnen kolon	25 (%8.2)	13 (%7.2)	12 (%9.7)	
	Sigmoid	126 (%41.4)	78 (%43.3)	48 (%38.7)	
Tm çapı		22.07±24.82	22.14±25.6	21.97±23.79	0.925
Derece	Düşük	282 (%92.7)	170 (%94.4)	112 (%90.3)	0.173
	Yüksek	22 (%7.3)	10 (%5.6)	12 (%9.7)	
pT	pT1	2 (%0.7)	2 (%1.1)	0 (%0)	0.019
	pT2	33 (%10.9)	21 (%11.7)	12 (%9.7)	
	pT3	147 (%48.4)	98 (%54.4)	49 (%39.5)	
	pT4a	103 (%33.9)	48 (%26.7)	55 (%44.4)	
	pT4b	19 (%6.3)	11 (%6.1)	8 (%6.5)	
pN	pN0	145 (%47.7)	100 (%55.6)	45 (%36.3)	0.015
	pN1a	36 (%11.8)	22 (%12.2)	14 (%11.3)	

	pN1b	43 (%14.1)	21 (%11.7)	22 (%17.7)	
	pN1c	16 (%5.3)	9 (%5)	7 (%5.6)	
	pN2a	30 (%9.9)	13 (%7.2)	17 (%13.7)	
	PN2b	34 (%11.2)	15 (%15)	19 (%15.3)	
M	Yok	213(%70.1)	160 (%88.9)	53(%42.7)	0.000
	Var	91 (%29.9)	20 (%20)	71 (%57.3)	
Nüks	Yok	206 (%67.8)	160 (%88.9)	46 (%37.1)	0.000
	Var	98 (%32.2)	20 (%11.1)	78 (%62.9)	
LI	Yok	173 (%56.9)	108 (%60)	65 (%52.4)	0.190
	Var	131 (%43.1)	72 (%40)	59 (%47.6)	
VI	Yok	240 (%78.9)	153 (%85)	87 (%70.2)	0.002
	Var	64 (%21.1)	27 (%15)	37 (%29.8)	
PNI	Yok	242 (%79.6)	152 (%84.4)	90 (%72.6)	0.012
	Var	62 (%20.4)	28 (%15.6)	34 (%27.4)	
TT	Yok	80 (%26.3)	54 (%38.6)	26 (%30.6)	0.225
	Var	145 (%47.7)	86 (%61.5)	59 (%69.4)	
STD	Yok	70 (%23)	50 (%75.8)	20 (%55.6)	0.036
	Var	32 (%10.5)	16 (%24.2)	16(%44.4)	
IPL	Yok	46 (%15.1)	27 (%15.3)	19 (%16.4)	0.379
	Hafif-orta	218 (%71.7)	129 (%72.9)	89 (%76.7)	
	Belirgin	29 (%9.5)	21 (%11.9)	8 (%6.9)	
Desmoplazi	Hafif	73 (%24)	49 (%28.8)	24 (%22)	0.426
	Orta	124 (%40.8)	74 (%43.5)	50 (%45.9)	
	Şiddetli	82 (%27)	47 (%27.6)	35 (%32.1)	
Tubuler CS	Negatif	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	yok
	Pozitif	304 (%100)	180 (%100)	124 (%100)	
Radial CS	Negatif	0 (%0)	151 (%83.9)	88 (%71)	0.007
	Pozitif	304 (%100)	29 (%16.1)	36 (%29)	
Adjuvan T	Yok	64 (%21.1)	28 (%15.6)	36 (%29)	0.005
	Var	240 (%79)	151 (%84.4)	86 (%71)	

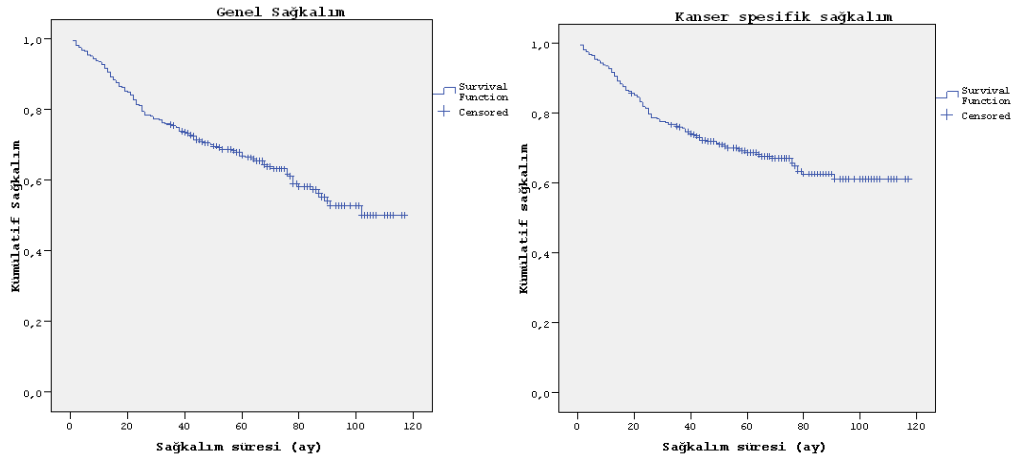
*LI: Lenfatik invazyon; VI: Venöz invazyon; PNI: Perinöral invazyon; STD: Serbest tümör depoziti;
TT: Tümör tomurcuklanması; IPL: İntra/peritümöral lenfosit derecesi

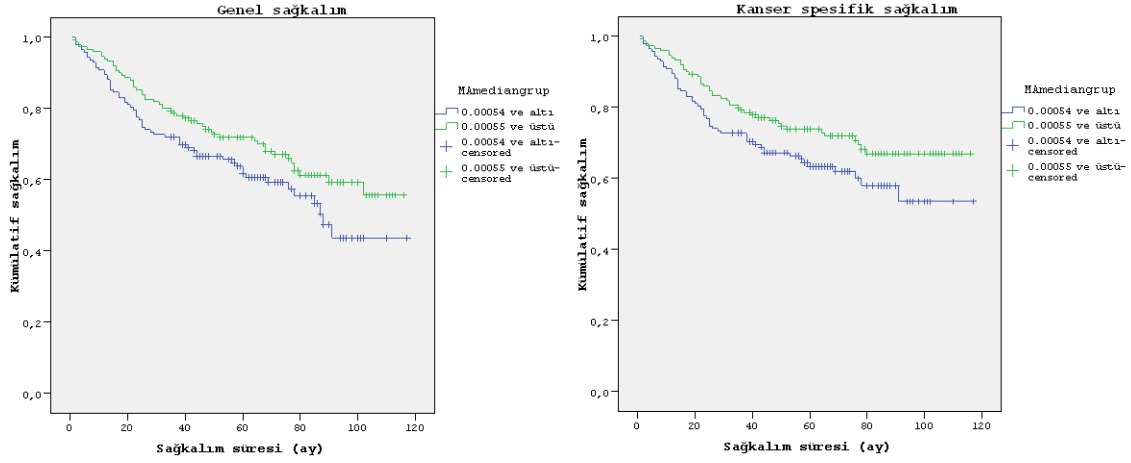
Tablo 4: Olguların lenf damarı ölçüm parametreleri ile sağkalım ilişkisi

	Tüm olgular	Sağ	Ex	p
MA	0.004±0.010	0.005±0.123	0.003±0.005	0.009
fMA	0.002±0.003	0.002±0.003	0.001±0.002	0.034
NO	274.55±659.65	338.43±786.76	181.82±395.55	0.023
fNO	115.27±176.85	134.68±199.95	87.10±132.33	0.013

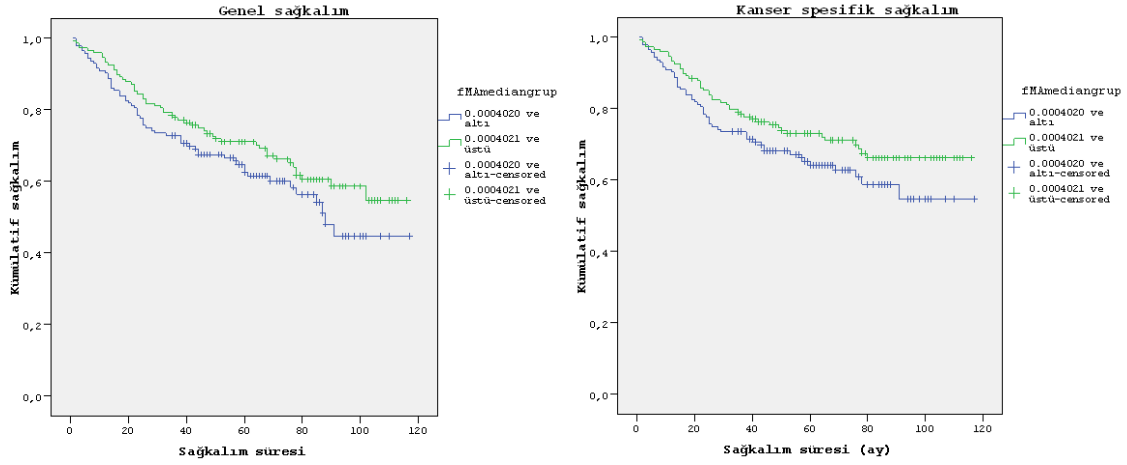
Tablo 5: Çok değişkenli lojistik regresyon sağkalım modeli

	P değeri	Odds ratio	%95 güven aralığı
Adjuvan tedavi	0.000	20.777	4.320-99.925
Nüks	0.000	15.494	4.488-53.491
pT	0.026	14.417	1.367-152.064
Venöz invazyon	0.038	4.304	1.081-17.137

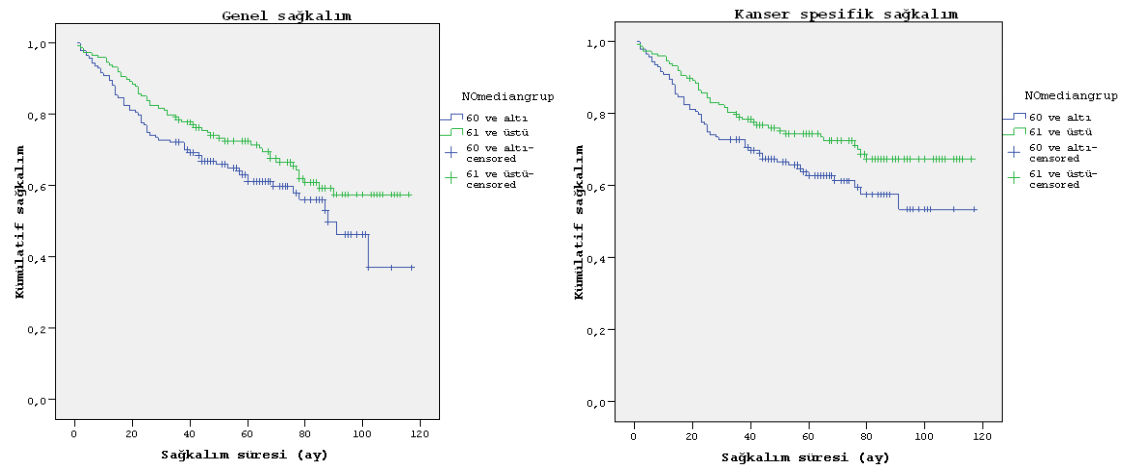
**Şekil 1:** Kaplan Meier genel sağkalım ve kanser spesifik sağkalım analizi



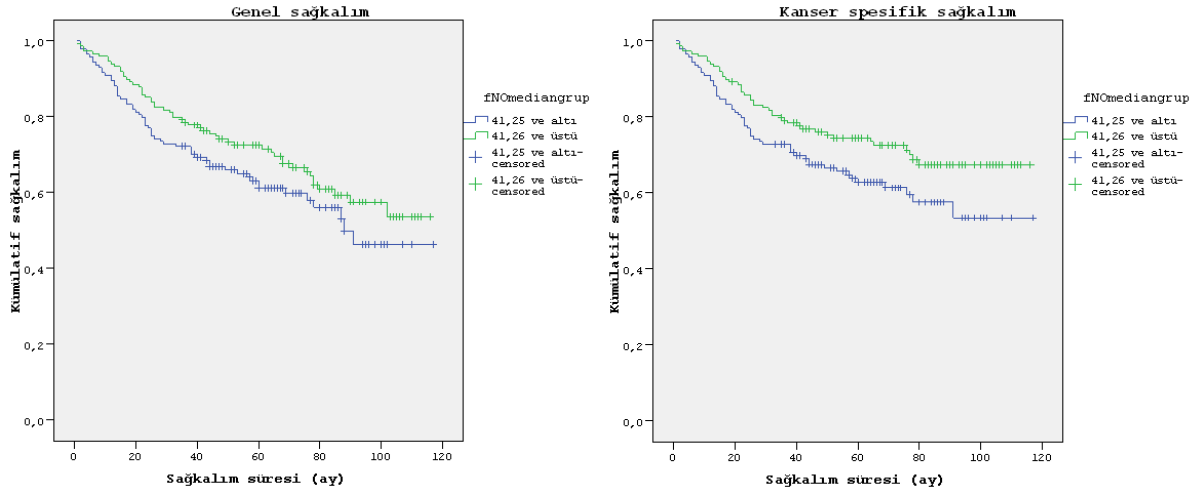
Şekil 2: Kaplan Meier MA median değerine göre sağkalım analizi



Şekil 3: Kaplan Meier fMA median değerine göre sağkalım analizi



Şekil 4: Kaplan Meier NO median değerine göre sağkalım analizi



Şekil 5: Kaplan Meier fNO median değerine göre sağkalım analizi

3.5 Olguların klinikopatolojik özellikler ve nodal metastaz ile ilişkisi

Tablo 6 ve 7’de klinikopatolojik parametreler, lenf nodu metastazı durumu ve lenf damarı ölçüm parametreleri arasındaki ilişki özetlenmiştir. Lenf nodu metastazı olanlarda nüks ($p=0.000$) ve uzak metastaz ($p=0.000$) riski yükselmektedir. Ayrıca lenf damarı invazyonu ($p=0.000$), venöz invazyon ($p=0.000$), perinöral invazyon ($p=0.000$) ve serbest tümör depoziti ($p=0.000$) varlığında da lenf nodu metastazı riski yükselmektedir. pT evresi ($p=0.000$), pN evresi ($p=0.000$) ve tümör derecesi ($p=0.015$) yükseldikçe lenf nodu metastazı anlamlı oranda artmaktadır. Yaş, cinsiyet, tümör çapı, tümör tomurcuklanması varlığı, intra/peritümöral lenfosit infiltrasyonu ile lenf nodu metastazı durumu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç bulunmamıştır. Ayrıca lenf damarı miktarına yönelik ölçüm parametrelerinden hiçbiri nodal metastaz durumu ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki göstermemiştir. Yapılan testlerde nodal metastaz ile arasında anlamlı ilişki bulunan değişkenler çok değişkenli lojistik regresyon analizinde değerlendirildiğinde, uzak metastaz varlığı, nodal metastaz varlığı ile ilişkili en güçlü parametre olarak karşımıza çıkmaktadır ($p=0.009$).

Tablo 6: Nodal metastaz açısından istatistiksel farklılık gösteren klinikopatolojik parametreler

		Tüm olgular	Nodal met-	Nodal met+	P
Derece	Düşük	282 (%92.7)	140 (%96.6)	142 (%89.3)	0.015
	Yüksek	22 (%7.3)	5 (%3.4)	17 (%10.7)	
pT	pT1	2 (%0.7)	2 (%1.4)	0 (%0)	0.000
	pT2	33 (%10.9)	24 (%16.6)	9 (%5.7)	
	pT3	147 (%48.4)	77 (%53.1)	70 (%44)	
	pT4a	103 (%33.9)	34 (%23.4)	69 (%43.4)	
	pT4b	19 (%6.3)	8 (%5.5)	11 (%6.9)	
Uzak metastaz	Yok	213(%70.1)	128 (%88.3)	85 (%53.5)	0.000
	Var	91 (%29.9)	17 (%11.7)	74 (%46.5)	
Nüks	Yok	206 (%67.8)	122 (%84.1)	84 (%52.8)	0.000
	Var	98 (%32.2)	23 (%15.9)	75 (%47.2)	
LI	Yok	173 (%56.9)	106 (%73.1)	67 (%42.1)	0.000
	Var	131 (%43.1)	39 (%26.9)	92 (%57.9)	
VI	Yok	240 (%78.9)	131 (%90.3)	109 (%68.6)	0.000
	Var	64 (%21.1)	14 (%9.7)	50 (%31.4)	
PNI	Yok	242 (%79.6)	130 (%89.7)	112 (%70.4)	0.000
	Var	62 (%20.4)	15 (%10.3)	47 (%29.6)	
STD	Yok	70 (%23)	50 (%100)	20 (%38.5)	0.000
	Var	32 (%10.5)	0 (%0)	32 (%61.5)	
Radial cerrahi sınır	Negatif	0 (%0)	126 (%86.9)	113 (%71.1)	0.001
	Pozitif	304 (%100)	19 (%13.1)	46 (%28.9)	
Adjuvan tedavi	Yok	64 (%21.1)	47 (%32.4)	17 (%10.7)	0.000
	Var	240 (%79)	98 (%67.6)	142 (%89.3)	

*LI: Lenfatik invazyon; VI: Venöz invazyon; PNI: Perinöral invazyon; STD: Serbest tümör depoziti;
 TT: Tümör tomurcuklanması; İPL: İntra/peritümöral lenfosit derecesi

Tablo 7: Olguların lenf damarı ölçüm parametreleri ile nodal metastaz ilişkisi

	Tüm olgular	Nodal met-	Nodal met+	p
MA	0.004±0.01	0.0039±0.0066	0.0048±0.0126	0.438
fMA	0.002±0.003	0.002±0.003	0.0015±0.0027	0.092
NO	274.55±659.65	240.41±404.03	305.68±826.83	0.390
fNO	115.27±176.85	131.68±194.50	100.30±158.20	0.126

3.6 Olguların klinikopatolojik özellikleri ve lenf damarı ölçüm parametreleri ile ilişkisi

Klinikopatolojik değişkenlerin lenf damarı ölçüm parametreleri ile ilişkisi tablo 8’de özetlenmiştir. Pearson korelasyon analizinde tümör en büyük çapı ile MA ($p=0.000$, $r=0.233$), fMA ($p=0.011$, $r=0.146$), NO ($p=0.000$, $r=0.219$) ve fNO ($p=0.045$, $r=0.115$) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır. Tümör çapı büyük olan tümörlerde lenf damar ölçüm parametrelerinin tümü anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. pT evreleri arasında, lenf damar ölçüm değerleri açısından fark görülmemekle birlikte; düşük (pT1+pT2) ve yüksek (pT3+pT4) evreler arasında yapılan karşılaştırmada, lenf damar ölçüm parametrelerinden fNO değerinin bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiği saptanmıştır. ($p=0.049$). Bu sonuca göre fNO değeri pT1+pT2 grubunda daha yüksek, pT3+pT4 grubunda daha düşük olarak göze çarpmaktadır. Tümör tomurcuklanması içeren ve içermeyen gruplar arasında fMA ($p=0.013$) ve fNO ($p=0.030$) değerleri istatistiksel olarak farklıdır. Tümör tomurcuklanması olmayan vakalarda bu iki değerin ortalaması daha yüksek olarak izlenmektedir. One-way ANOVA analizi ile, orta ve şiddetli desmoplazi içeren tümörler arasında da benzer şekilde fMA (0.020) ve fNO ($p=0.004$) değerleri istatistiksel olarak farklılık göstermektedir. Desmoplazinin belirgin olduğu olguların fMA ve fNO ölçüm değeri ortalamaları desmoplazinin orta olarak ölçüldüğü gruba göre anlamlı oranda daha düşüktür. Nüks eden ve etmeyen olgular arasında MA ($p=0.011$), fMA ($p=0.001$), NO ($p=0.047$) ve fNO ($p=0.001$) değerlerinin tümü istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir. Nüks negatif olan grupta tüm lenf damar ölçüm parametre ortalamaları daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Uzak metastaz için de bulgular nüks ile benzerdir. Metastaz negatif olgularda NO değeri dışında tüm lenf damar ölçüm parametre ortalamaları daha yüksek olarak tespit edilmiştir. fNO değerinde bu iki grupta farklılık izlenmemiştir. Diğer klinikopatolojik parametrelerde (yaş, cins, pN evresi, tümör derecesi, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, serbest tümör depoziti varlığı, intra ve peritümöral lenfosit miktarı ve radial sınır pozitifliği) alt gruplar karşılaştırıldığında lenf damar ölçüm parametreleri açısından istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Tablo 8: Morfometrik lenf damar parametreleri açısından istatistiksel farklılık gösteren klinikopatolojik parametreler

		MA	fMA	NO	fNO
Tm Çapı	r	0.233	0.146	0.219	0.115
	p	0.000*	0.011*	0.000*	0.045*
pT	pT1+pT2	0.006±0.012	0.0028±0.0039	328.88±497.32	171.41±209.09
	pT3+pT4	0.004±0.010	0.0016±0.0028	267.71±677.77	108.20±171.52
p		0.347	0.109	0.611	0.049*
TT	Yok	0.005±0.009	0.003±0.004	268.40±451.58	151.28±227.52
	Var	0.003±0.007	0.001±0.002	205.74±403.22	90.06±136.54
p		0.181	0.013*	0.286	0.030*
Desmoplazi	Hafif	0.006±0.156	0.002±0.003	352.07±1043.05	128.61±193.42
	Orta	0.005±0.009	0.002±0.004	305.19±531.79	143.95±211.88
	Belirgin	0.002±0.005	0.001±0.002	158.35±360.80	61.33±84.79
p		0.114	0.020*	0.158	0.004*
Nüks	Yok	0.005±0.117	0.0022±0.0034	326.33±745.31	137.72±199.69
	Var	0.002±0.005	0.0010±0.0016	165.69±409.39	68.07±100.54
p		0.011*	0.001*	0.047*	0.001*
Uzak metastaz	Yok	0.005±0.012	0.0022±0.0034	321.72±733.89	138.58±197.38
	Var	0.002±0.005	0.0008±0.0013	164.13±422.68	60.72±96.10
p		0.011*	0.000*	0.056	0.000*

*LI: Lenfatik invazyon; VI: Venöz invazyon; PNI: Perinöral invazyon; STD: Serbest tümör depoziti; TT: Tümör tomurcuklanması; IPL: İntra/peritümöral lenfosit derecesi

4. TARTIŞMA

Lenfatiklere spesifik belirteçlerin keşfi ve lenfatik endotelial hücreleri tanıyan antikorların üretilmesi lenfanjiogenez üzerine olan çalışmaları hızlandırmıştır. Daha yüksek spesifiteye sahip ve geniş çapta kullanılan belirteçler LYVE-1, Prox-1, VEGFR3 ve podoplanindir [92]. D2-40 onkofetal antijen M2A'ya karşı geliştirilmiş bir fare monoklonal antikorudur [153]. Bunun daha sonra 38 kDa'luk bir transmembran glikoproteini olan ve çoğu lenfatik endoteli üzerinde yüksek düzeyde eksprese edilen podoplanin için spesifik bir belirteç olduğu keşfedilmiştir. D2-40'ın lenfatik damarların tespit edilmesinde en duyarlı antikor olduğu bilinmektedir ve bu belirtecin ayrıca lenfatik endotele yüksek düzeyde spesifik olduğu

da gösterilmiştir [97,99]. D2-40 bu sebeplerle çalışmamızda lenfatik damarları işaretlemek ve sonuçta görüntü analizi programında lenfatik damar ölçümleri için kullanılmıştır. Bununla birlikte lenfatik endotel hücrelerine ek olarak podoplanin ekspresyonu glomeruler podositlerde, osteoblastlarda ve tip 1 alveolar hücrelerde de tespit edilmiştir. Dahası podoplanin ekspresyonu epiteloïd mezotelyomalar[154], seminomlar[155], papiller tiroïd karsinomları[156] yanısıra olası lenfatik diferansiyasyon gösteren kaposi sarkomu[157] ve anjiosarkomların belli bir subgrubunda[157] da gözlenmektedir. Çalışmamızda D2-40 kolon karsinomu tümör hücrelerinde ekspresyon göstermemiştir. Ancak bazı olgularda stromal D2-40 boyanması gözlenmiştir. Çalışmamızda D2-40 ile boyanmış lenfatik damarlar ince duvarlı, düzensiz şekillidir ve perisit ve/veya muskuler tabaka içermemektedir. Sonuç olarak olağan lenfatik damar görünümünü taşımaktadırlar. Kan damarları ise D2-40 ile negatif boyanma göstermektedir. Kolorektal kanserlerdeki D2-40 pozitif lenfatik damarların diğeri bir lenfatik marker olan LYVE-1 ile de benzer boyanma gösterdiği gösterilmiştir [123]. Çalışmamızda lenf damarı ölçümleri görüntü analizi yöntemi ile tümörün invaziv kenarında intratümöral alanda yapılmıştır.

Kolorektal karsinomlarda lenfanjiyogenez literatürde yaygın bir biçimde araştırılmıştır. Çalışmaların bir kısmında peritümöral lenfatikler, bir kısmında ise intratümöral lenfatikler farklı yöntemlerle kantifiye edilmeye çalışılmıştır[119,122,123,158,159]. Lenfanjiogenezin prognostik öneminin araştırıldığı bu çalışmalarda, sonuçlar özellikle konu intratümöral lenfatik damar dansitesi (LDD) olduğunda çelişkilidir. Pappas ve arkadaşları kolorektal kanserde LDD prognostik önemini, bizim çalışmamızda olduğu gibi görüntü analizi yöntemiyle araştırmışlardır [158]. Çalışmalarında kolorektal kanserlerde LDD ile sağkalım arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki bulamamışlardır. Longatto-Filho ve arkadaşları çalışmalarında kolorektal karsinomlarda peritümöral LDD artışının kötü sağkalım, lokal invazyon ve nodal metastazla ilişkili olduğunu ancak intratümöral LDD ile bu parametreler arasında anlamlı bir ilişki izlenmediğini bildirmişlerdir [119]. Duff ve arkadaşları, çalışmalarında , peritümöral LDD'nin intratümöral LDD'den daha yoğun olduğunu ancak hem intratümöral hem de peritümöral LDD'nin sağkalım ve/veya nodal metastazla ilişkili olmadığını göstermişlerdir [159]. Lin ve arkadaşları da kolorektal karsinomlarda peritümöral LDD'nin, intratümöral LDD'den daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir[123]. Ayrıca hem peritümöral hem de intratümöral LDD'nin lenfovasküler invazyonla ilişkili olduğunu ve yine her iki parametrenin kötü prognoz ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir [123]. Saad ve arkadaşları da KRK'larda

intratümöral LDD'nin invazyon derinliği (pT), hepatik metastazlar ve lenf nodu metastazlarla ilişkili olduğunu göstermiştir[122].

Literatürde kolorektal karsinom dışında tümörlerde de lenfanjiogenez intratümöral ve peritümöral olarak yaygın bir biçimde araştırılmıştır. Mide adenokarsinomlarında yapılan bir çalışmada intratümöral LDD'nin lenf nodu metastazları ile ilişkili olduğu, peritümöral LDD'nin ise nodal metastaz ve sağkalımla istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermediği tespit edilmiştir[160]. Lee ve arkadaşları ise mide kanserlerinde artmış intratümöral LDD'nin çok değişkenli lojistik regresyon analizinde nodal metastaz açısından bağımsız bir belirleyici olduğunu göstermişlerdir[161]. Wang ve arkadaşları ise mide kanserlerinde artmış peritümöral LDD'nin kötü prognostik bir faktör ve nodal metastazla ilişkili olduğunu, ancak intratümöral LDD'nin prognoz üzerine etkisiz olduğunu rapor etmektedirler[162].

Değişik tümörlerde peritümöral LDD, literatürde çoğu çalışmada kötü prognoz ve nodal metastazlarla ilişkili bulunurken bu bulgunun aksine, baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlarında yapılan bir çalışmada intratümöral LDD'nin kötü prognostik olduğu bildirilirken, peritümöral LDD iyi prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur[163].

İnatümöral LDD, peritümöral LDD'ye benzer şekilde literatürde çoğu lokalizasyonda ve çoğu histolojik tür için kötü prognozla ve nodal metastazla ilişkili olarak bulunmasına karşın bunun tersini kanıtlayan örnekler de mevcuttur. Birner ve arkadaşları servikal kanserlerde tek değişkenli analizlerde intratümöral olarak 0.25 mm²'lik alanda 5'den fazla lenfatik damar izlenen vakaların, 0.25 mm²'lik alanda 5'ten az lenfatik damar izlenen vakalardan daha iyi genel sağkalıma sahip olduğunu bulmuştur[164]. Ayrıca bu parametreyi çok değişkenli analizde bağımsız prognostik parametre olarak tespit etmişlerdir. Zaganelli ve arkadaşları da intratümöral LDD'yi servikal kanserlerde çalışmışlar ve intratümöral LDD'nin erken evre kanserlerde (lenf düğümü metastazı olmayan küçük ve erken klinik evreli tümörler) daha yoğun görüldüğünü bulmuşlardır[165]. Ancak intratümöral LDD ile sağkalım arasında ilişki tespit edememişlerdir. Yine endometrial kanserlerde yapılan bir çalışmada yüksek intratümöral LDD ile lokalize hastalık ve daha iyi klinik gidiş arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulmuştur[166]. Goes ve arkadaşları vulvar skuamöz hücreli karsinomlarda intratümöral LDD ile daha iyi genel sağkalım ve daha düşük oranda lenf nodu metastazının ilişkili olduğunu göstermişlerdir [167]. Ayrıca lenfatik metastazların intratümöral lenfatiklerden bağımsız olduğunu ve intratümöral lenfatik damarlanmanın fonksiyonel olmadığından bahseden çalışmalar da mevcuttur[116].

Çalışmamız kolon karsinomlarında intratümöral lenfatik damarları ölçen çeşitli parametrelerin (tablo 2) sayısal değerindeki artışın, artmış sağkalımla ilişkili olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Yüksek lenf damar ölçüm değerleri, artmış sağkalım, düşük pT evresi (sadece fNO), artmış tümör çapı, daha düşük oranda nüks ve daha düşük oranda uzak metastazla ilişkili bulunmuştur. Bu sonuç kolayca açıklanamamaktadır ve çalışmanın orijinal hipotezinde artmış intratümöral lenf damarı sayısının tümör hücrelerinin lenfatik sisteme daha kolay katılacağı; nodal metastazı ve sonuç olarak prognozu ve sağkalımı kötüleştireceği beklenmiştir, ancak sonuçlarımız bu hipotezi desteklememektedir. Benzer bulguyu destekleyen çalışmalarda çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. İnsanda oluşan kanser hücrelerinin yok edilmesinde immun cevabın önemi bilinmektedir ve artmış intratümöral lenfatik LDD'nin kanser hücrelerine karşı artmış bir immun cevabın nedeni ve/veya sonucu olduğu akla gelmektedir. Buradan yola çıkılarak kanser hücrelerine karşı kullanılan immunoterapi örnekleri de mevcuttur[168]. Tümör hücrelerine karşı primer immun cevabın oluşması için ön şart, tümör antijenlerinin, lenfoid organlara kan, lenf veya mobil antijen sunan hücreler tarafından taşınmasıdır. Dendritik hücre ailesi beyin ve kornea hariç tüm organlarda bulunan antijen sunan hücrelerden oluşan benzersiz bir sistemdir. Dendritik hücrelerin en önemli yetenekleri primer antijen sunumu sonrasında primer antijen maruziyeti olan bölgeden lenfoid organların T hücrelerden zengin bölgelerine göç edip antijeni spesifik T hücrelerine sunmaktır. Dendritik hücreler T hücre aktivasyon bölgelerine (dalak ve lenf nodu) bu göçü lenfatikler üzerinden gerçekleştirirler. Dendritik hücrelerin servikal kanserlerde lokal olarak bulunmasının daha iyi sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir[169]. Ayrıca dendritik hücreler çeşitli tümörlerde immun cevabı indükleyen immunoterapi adjuvanı olarak da denenmektedir[170]. Burada kolorektal kanserlerde artmış intratümöral LDD'nin dendritik hücrelerin lenfatik oranlara göçünü kolaylaştırarak kanser hücrelerine karşı artmış T hücre aracılı immun cevabı tetiklediği düşünülebilir. Başka bir olası açıklama ise intratümöral lenfatiklerin nonfonksiyonel olabileceği ihtimalidir. Bu durumda neoplastik hücrelerin yayılımını, drenajı bozma yoluyla engelleyebileceği ve sonuç olarak lenf nodu metastazına bir engel teşkil edebileceği de düşünülebilir. Kolon ve pankreatik kanser dokularında intratümöral lenfatiklerin yapısını araştıran bir çalışma da bu görüşü desteklemektedir[115]. Bu çalışmada kolon ve pankreas tümör dokularında renkli stereoskopik lenfografi ve senkron olarak lenfatiklere immunhistokimya uygulanmıştır. Çalışma sonucunda kolon tümör dokularında çok az sayıda lenfatik dikkati çekmiştir ancak peritümöral lenfatiklerle ilişkili olmayan sayısız sıvı gölcükleri izlendiği ve bu gölcüklerin duvarında immunohistokimyasal olarak lenfatik endotelial markerları eksprese eden hücreler gözlenmediği tespit edilmiştir.

Bunun aksine lenfatik endotelyal belirleyiciler ile pozitif lenfatiklerin çoğunun peritümöral yerleştiği gözlenmiştir. Buradan hareketle nodal metastazla ilişkili esas lenfatik damar grubunun peritümöral yerleştiği, intratümöral yerleşen ve tümör hücreleri tarafından komprese az sayıdaki lenfatik nodal metastazda rolü olmadığı düşünülebilir.

İmmunhistokimya kullanılan çalışmalarda son yıllarda doku dizini bloğu tekniğinin kullanımı hızla artmaktadır. Kolorektal karsinomda LDD'yi araştıran çalışmalarda daha önce doku dizini metodu kullanan çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bununla birlikte Yao ve arkadaşları hepatosellüler karsinomlarda doku dizini metodu ile CD105 ve VEGF ekspresyonunu değerlendirmişlerdir[171]. Bu çalışmada, doku dizini bloğu kesitlerinde sayılan damar sayısı ile klasik kesitlerde sayılan damar sayısı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde korrelasyon göstermektedir. Bir başka çalışmada Chen ve arkadaşları özefageal skuamöz hücreli karsinomlarda anijogenez için tam doku kesitleri ve doku dizini bloklarından hazırlanan kesitleri karşılaştırmıştır ve sonuçları açısından her iki metodun birbiriyle korele olduğunu görmüşlerdir[172]. Bunlar dışında çeşitli organlarda LDD'yi araştıran çeşitli çalışmalarda da bu tekniğin kullanımının örnekleri bulunmaktadır[165-167]. Bizim çalışmamızda da literatürde bildirilen bu paralellik nedeni ile doku dizini kesitlerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Kolon kanserlerinde çok sayıda lenfanjiogenez çalışması bulunmaktadır ve özellikle tümör içi lenfatik damar yoğunluğunun sağkalım, nodal metastaz ve diğer klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi literatürde çelişkili sonuçlarla karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmanın önemi yaptığımız literatür araştırmasına göre , kolon adenokarsinomlarında intratümöral lenf damar yoğunluğunu artmış sağkalım ile ilişkili bulan ilk çalışma olmasıdır.

5. SONUÇLAR

1. Nüks varlığı, uzak metastaz varlığı, adjuvan tedavi almış olma, ileri yaş, ileri pT ve pN evresi, venöz invazyon, perinöral invazyon, serbest tümör depoziti varlığı ve radial cerrahi sınır pozitifliği ile düşük sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur.
2. Lenfatik damarların kantifikasyonuna yönelik görüntü analizi ile hesaplanan tüm parametreler ile artmış sağkalım arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir.
3. Nüks varlığı, uzak metastaz varlığı, ileri pT evresi, yüksek histolojik derece, lenfatik invazyon, perinöral invazyon, venöz invazyon ve serbest tümör depoziti varlığı ile nodal metastaz varlığı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.
4. pT evresi pT1+pT2 ve pT3+pT4 olarak dikotomize edildiğinde düşük evre pT ile yüksek fNO değeri arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.
5. Yüksek MA, fMA, NO, fNO değerleri ile düşük nüks ve uzak metastaz varlığı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.
6. Lenf damar ölçüm parametreleri nodal metastaz ve pN evresi ile anlamlı ilişki göstermemektedir.
7. Sağkalım bağımlı değişkeni temel alınarak yapılan çok değişkenli binary logistic regresyon analizinde adjuvan tedavi, nüks, pT ve venöz invazyon en güçlü parametreler olarak ortaya çıkmıştır. Lenf damar ölçüm değerleri bu analizde anlamlı bulunmamıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Bosman FT, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer. WHO classification of tumours of the digestive system. (4th ed). International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2010.
2. Society AC. Cancer facts and figures. American Cancer Society.: Atlanta, 2012; v.
3. Smith RA, von Eschenbach AC, Wender R, *et al.* American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers. Also: update 2001--testing for early lung cancer detection. *CA: a cancer journal for clinicians* 2001; **51**: 38-75; quiz 77-80.
4. Boyle P, Levin B, ebrary Inc., *et al.* World cancer report 2008. In: World cancer report 2008. IARC Press,: Lyon, 2008; 510 p.
5. National Cancer Institute (U.S.), SEER Program (National Cancer Institute), National Center for Health Statistics (U.S.), *et al.* SEER cancer statistics review. In: NIH publication. U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Institute, National Institutes of Health: Bethesda, Md., 2012; v.
6. Burt RW. Colorectal cancer screening. *Current opinion in gastroenterology* 2010; **26**: 466-470.
7. Garfinkel L, Mushinski M. U.S. cancer incidence, mortality and survival: 1973-1996. *Statistical bulletin* 1999; **80**: 23-32.
8. Allam MF, Lucena RA. Aetiology of sex differences in colorectal cancer. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation* 2001; **10**: 299-300.
9. Colditz GA, Wei EK. Preventability of cancer: the relative contributions of biologic and social and physical environmental determinants of cancer mortality. *Annual review of public health* 2012; **33**: 137-156.
10. Joshu CE, Parmigiani G, Colditz GA, *et al.* Opportunities for the primary prevention of colorectal cancer in the United States. *Cancer prevention research* 2012; **5**: 138-145.
11. Truswell AS. Meat consumption and cancer of the large bowel. *European journal of clinical nutrition* 2002; **56 Suppl 1**: S19-24.
12. Bruce WR, Giacca A, Medline A. Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the*

- American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2000; **9**: 1271-1279.
13. Hill MJ. Vegetables, fruits, fibre and colorectal cancer. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation* 2002; **11**: 1-2.
 14. Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D, *et al.* Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2005; **294**: 2849-2857.
 15. Kim DH, Smith-Warner SA, Spiegelman D, *et al.* Pooled analyses of 13 prospective cohort studies on folate intake and colon cancer. *Cancer causes & control : CCC* 2010; **21**: 1919-1930.
 16. Seitz HK, Matsuzaki S, Yokoyama A, *et al.* Alcohol and cancer. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2001; **25**: 137S-143S.
 17. Chan TA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. *The Lancet Oncology* 2002; **3**: 166-174.
 18. Giovannucci E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2001; **10**: 725-731.
 19. Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *International journal of cancer Journal international du cancer* 2002; **101**: 403-408.
 20. Edge SB, American Joint Committee on Cancer. AJCC cancer staging manual. (7th ed). Springer: New York ; London, 2010.
 21. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, *et al.* Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *The American journal of gastroenterology* 2012; **107**: 1315-1329; quiz 1314, 1330.
 22. Kim EC, Lance P. Colorectal polyps and their relationship to cancer. *Gastroenterology clinics of North America* 1997; **26**: 1-17.
 23. Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, *et al.* Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology* 1987; **93**: 1009-1013.
 24. Bettington M, Walker N, Clouston A, *et al.* The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology* 2013; **62**: 367-386.
 25. Roncucci L, Modica S, Pedroni M, *et al.* Aberrant crypt foci in patients with colorectal cancer. *British journal of cancer* 1998; **77**: 2343-2348.

26. Mueller JD, Bethke B, Stolte M. Colorectal de novo carcinoma: a review of its diagnosis, histopathology, molecular biology, and clinical relevance. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2002; **440**: 453-460.
27. Hornick JL, Farraye FA, Odze RD. Clinicopathologic and immunohistochemical study of small apparently "de novo" colorectal adenocarcinomas. *The American journal of surgical pathology* 2007; **31**: 207-215.
28. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual review of pathology* 2011; **6**: 479-507.
29. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, *et al.* Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2012; **27**: 1423-1431.
30. Kang GH. Four molecular subtypes of colorectal cancer and their precursor lesions. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2011; **135**: 698-703.
31. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012; **18**: 1506-1512.
32. Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Human pathology* 2011; **42**: 1-10.
33. Jubb AM, Bell SM, Quirke P. Methylation and colorectal cancer. *The Journal of pathology* 2001; **195**: 111-134.
34. Makinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology* 2007; **50**: 131-150.
35. Singh H, Nugent Z, Demers AA, *et al.* The reduction in colorectal cancer mortality after colonoscopy varies by site of the cancer. *Gastroenterology* 2010; **139**: 1128-1137.
36. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; **50**: 113-130.
37. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2008; **10**: 13-27.
38. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *European journal of cancer* 2002; **38**: 867-871.
39. Ashley DJ. The two "hit" and multiple "hit" theories of carcinogenesis. *British journal of cancer* 1969; **23**: 313-328.
40. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; **386**: 761, 763.

41. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, *et al.* The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *The British journal of surgery* 2002; **89**: 845-860.
42. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; **487**: 330-337.
43. Carethers JM. Proteomics, genomics, and molecular biology in the personalized treatment of colorectal cancer. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 2012; **16**: 1648-1650.
44. Washington MK, Berlin J, Branton P, *et al.* Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2009; **133**: 1539-1551.
45. Haydon AM, Jass JR. Emerging pathways in colorectal-cancer development. *The Lancet Oncology* 2002; **3**: 83-88.
46. Alexander J, Watanabe T, Wu TT, *et al.* Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *The American journal of pathology* 2001; **158**: 527-535.
47. Greenson JK, Huang SC, Herron C, *et al.* Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. *The American journal of surgical pathology* 2009; **33**: 126-133.
48. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer* 2001; **91**: 2417-2422.
49. Messerini L, Vitelli F, De Vitis LR, *et al.* Microsatellite instability in sporadic mucinous colorectal carcinomas: relationship to clinico-pathological variables. *The Journal of pathology* 1997; **182**: 380-384.
50. Young J, Simms LA, Biden KG, *et al.* Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *The American journal of pathology* 2001; **159**: 2107-2116.
51. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, *et al.* Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2000; **342**: 69-77.
52. Jass JR, O'Brien MJ, Riddell RH, *et al.* Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2007; **450**: 1-13.

53. Lee MJ, Lee HS, Kim WH, *et al.* Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2003; **16**: 403-410.
54. Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, *et al.* The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2004; **17**: 1392-1399.
55. NCCN practice guidelines for treatment of cancer by site: rectal cancer. *National Comprehensive Cancer Network*.
56. Tebbutt NC, Cattell E, Midgley R, *et al.* Systemic treatment of colorectal cancer. *European journal of cancer* 2002; **38**: 1000-1015.
57. Wolpin BM, Meyerhardt JA, Mamon HJ, *et al.* Adjuvant treatment of colorectal cancer. *CA: a cancer journal for clinicians* 2007; **57**: 168-185.
58. Glimelius B, Cavalli-Bjorkman N. Metastatic colorectal cancer: current treatment and future options for improved survival. Medical approach--present status. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2012; **47**: 296-314.
59. Cartwright TH. Treatment decisions after diagnosis of metastatic colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer* 2012; **11**: 155-166.
60. NCCN practice guidelines for treatment of cancer by site: colon cancer. *National Comprehensive Cancer Network*.
61. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, *et al.* Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013; **381**: 303-312.
62. Odze RD, Goldblum JR. Surgical pathology of the GI tract, liver, biliary tract, and pancreas. (2nd ed). Saunders/Elsevier: Philadelphia, PA, 2009.
63. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, *et al.* Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2000; **124**: 979-994.
64. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1932; **35**: 323-332.
65. Kojima M, Nakajima K, Ishii G, *et al.* Peritoneal elastic laminal invasion of colorectal cancer: the diagnostic utility and clinicopathologic relationship. *The American journal of surgical pathology* 2010; **34**: 1351-1360.

66. Moore J, Hyman N, Callas P, *et al.* Staging error does not explain the relationship between the number of lymph nodes in a colon cancer specimen and survival. *Surgery* 2010; **147**: 358-365.
67. Derwinger K, Carlsson G, Gustavsson B. A study of lymph node ratio as a prognostic marker in colon cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 2008; **34**: 771-775.
68. Arslan NC, Sokmen S, Canda AE, *et al.* The prognostic impact of the log odds of positive lymph nodes in colon cancer. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2014; **16**: O386-392.
69. Faerden AE, Sjo OH, Bukholm IRK, *et al.* Lymph Node Micrometastases and Isolated Tumor Cells Influence Survival in Stage I and II Colon Cancer. *Diseases of the Colon & Rectum* 2011; **54**: 200-206.
70. Quirke P, Dixon MF, Durdey P, *et al.* Local Recurrence of Rectal Adenocarcinoma Due to Inadequate Surgical Resection - Histopathological Study of Lateral Tumor Spread and Surgical Excision. *Lancet* 1986; **2**: 996-999.
71. Nagtegaal ID, Marijnen CAA, Kranenbarg EK, *et al.* Circumferential margin involvement is still an important predictor of local recurrence in rectal carcinoma - Not one millimeter but two millimeters is the limit. *American Journal of Surgical Pathology* 2002; **26**: 350-357.
72. Petersen VC, Baxter KJ, Love SB, *et al.* Identification of objective pathological prognostic determinants and models of prognosis in Dukes' B colon cancer. *Gut* 2002; **51**: 65-69.
73. Howlett CJ, Tweedie EJ, Driman DK. Use of an elastic stain to show venous invasion in colorectal carcinoma: a simple technique for detection of an important prognostic factor. *Journal of clinical pathology* 2009; **62**: 1021-1025.
74. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum Based on AJCC/UICC TNM, 7th edition In, 2013.
75. Dataset for colorectal cancer histopathology reports (3rd edition). In. Pathologists RCo, 2014.
76. Grivennikov SI, Wang KP, Mucida D, *et al.* Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* 2012; **491**: 254-+.

77. Tougeron D, Fauquembergue E, Latouche JB. Immune response and colorectal cancer. *Bulletin du cancer* 2013; **100**: 283-294.
78. Graham DM, Appelman HD. Crohn's-like lymphoid reaction and colorectal carcinoma: a potential histologic prognosticator. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 1990; **3**: 332-335.
79. Harrison JC, Dean PJ, Elzeky F, *et al.* Impact of the Crohns-Like Lymphoid Reaction on Staging of Right-Sided Colon-Cancer - Results of Multivariate-Analysis. *Human pathology* 1995; **26**: 31-38.
80. Bauer K, Nelius N, Reuschenbach M, *et al.* T cell responses against microsatellite instability-induced frameshift peptides and influence of regulatory T cells in colorectal cancer. *Cancer Immunol Immun* 2013; **62**: 27-37.
81. Dahlin AM, Henriksson ML, Van Guelpen B, *et al.* Colorectal cancer prognosis depends on T-cell infiltration and molecular characteristics of the tumor. *Modern Pathol* 2011; **24**: 671-682.
82. Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA. Immune classification of colorectal cancer patients: impressive but how complete? *Expert Opin Biol Th* 2013; **13**: 517-526.
83. Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, *et al.* The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology* 2002; **41**: 59-81.
84. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2007; **50**: 151-162.
85. Horcic M, Koelzer VH, Karamitopoulou E, *et al.* Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. *Human pathology* 2013; **44**: 697-705.
86. Bedeir A, Krasinskas AM. Molecular Diagnostics of Colorectal Cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2011; **135**: 578-587.
87. Watanabe T, Wu T, Catalano PJ, *et al.* Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *New Engl J Med* 2001; **344**: 1196-1206.
88. Ren JJ, Li GX, Ge J, *et al.* Is K-ras Gene Mutation a Prognostic Factor for Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diseases of the Colon & Rectum* 2012; **55**: 913-923.
89. Webber EM, Lin JS, Evelyn PW. Oncotype DX tumor gene expression profiling in stage II colon cancer. Application: prognostic, risk prediction. *PLoS currents* 2010; **2**.
90. Tan IB, Tan P. GENETICS An 18-gene signature (ColoPrint (R)) for colon cancer prognosis. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; **8**: 131-133.

91. Stacker SA, Williams SP, Karnezis T, *et al.* Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nature reviews Cancer* 2014; **14**: 159-172.
92. Cueni LN, Detmar M. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *The Journal of investigative dermatology* 2006; **126**: 2167-2177.
93. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, *et al.* Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *The American journal of pathology* 1999; **154**: 385-394.
94. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, *et al.* Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; **92**: 3566-3570.
95. Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, *et al.* Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *The EMBO journal* 2001; **20**: 4762-4773.
96. Kubo H, Fujiwara T, Jussila L, *et al.* Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood* 2000; **96**: 546-553.
97. Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2005; **18**: 1490-1497.
98. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, *et al.* T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *The EMBO journal* 2003; **22**: 3546-3556.
99. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, *et al.* Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nature reviews Cancer* 2002; **2**: 573-583.
100. Banerji S, Ni J, Wang SX, *et al.* LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *The Journal of cell biology* 1999; **144**: 789-801.
101. Petrova TV, Makinen T, Makela TP, *et al.* Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *The EMBO journal* 2002; **21**: 4593-4599.

102. Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999; **98**: 769-778.
103. Parr C, Jiang WG. Quantitative analysis of lymphangiogenic markers in human colorectal cancer. *International journal of oncology* 2003; **23**: 533-539.
104. Tammela T, Petrova TV, Alitalo K. Molecular lymphangiogenesis: new players. *Trends in cell biology* 2005; **15**: 434-441.
105. Makinen T, Adams RH, Bailey J, *et al.* PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. *Genes & development* 2005; **19**: 397-410.
106. Tammela T, Saaristo A, Lohela M, *et al.* Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia. *Blood* 2005; **105**: 4642-4648.
107. Baddi L, Benson A, 3rd. Adjuvant therapy in stage II colon cancer: current approaches. *The oncologist* 2005; **10**: 325-331.
108. Minagawa M, Makuuchi M, Torzilli G, *et al.* Extension of the frontiers of surgical indications in the treatment of liver metastases from colorectal cancer: long-term results. *Annals of surgery* 2000; **231**: 487-499.
109. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, *et al.* Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nature medicine* 2001; **7**: 192-198.
110. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, *et al.* VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nature medicine* 2001; **7**: 186-191.
111. Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, *et al.* Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *The American journal of pathology* 2003; **162**: 1951-1960.
112. Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, *et al.* Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Annals of surgery* 2004; **240**: 306-312.
113. Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, *et al.* Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *The Journal of pathology* 2005; **206**: 170-177.
114. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer metastasis reviews* 2006; **25**: 677-694.
115. Olszewski WL, Stanczyk M, Gewartowska M, *et al.* Lack of functioning intratumoral lymphatics in colon and pancreas cancer tissue. *Lymphatic research and biology* 2012; **10**: 112-117.

116. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, *et al.* Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002; **296**: 1883-1886.
117. Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, *et al.* Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer research* 2000; **60**: 4324-4327.
118. Omachi T, Kawai Y, Mizuno R, *et al.* Immunohistochemical demonstration of proliferating lymphatic vessels in colorectal carcinoma and its clinicopathological significance. *Cancer letters* 2007; **246**: 167-172.
119. Longatto-Filho A, Pinheiro C, Ferreira L, *et al.* Peritumoural, but not intratumoural, lymphatic vessel density and invasion correlate with colorectal carcinoma poor-outcome markers. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2008; **452**: 133-138.
120. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005; **438**: 946-953.
121. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, *et al.* Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997; **276**: 1423-1425.
122. Saad RS, Kordunsky L, Liu YL, *et al.* Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2006; **19**: 1317-1323.
123. Lin M, Ma SP, Lin HZ, *et al.* Intratumoral as well as peritumoral lymphatic vessel invasion correlates with lymph node metastasis and unfavourable outcome in colorectal cancer. *Clinical & experimental metastasis* 2010; **27**: 123-132.
124. Liang P, Hong JW, Ubukata H, *et al.* Increased density and diameter of lymphatic microvessels correlate with lymph node metastasis in early stage invasive colorectal carcinoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2006; **448**: 570-575.
125. Kaneko I, Tanaka S, Oka S, *et al.* Lymphatic vessel density at the site of deepest penetration as a predictor of lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer. *Diseases of the colon and rectum* 2007; **50**: 13-21.
126. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, *et al.* The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nature reviews Cancer* 2006; **6**: 835-845.
127. Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, *et al.* Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thrombosis and haemostasis* 2005; **93**: 228-235.

128. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, *et al.* Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nature medicine* 2005; **11**: 261-262.
129. Rafii S, Lyden D, Benezra R, *et al.* Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nature reviews Cancer* 2002; **2**: 826-835.
130. Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, *et al.* VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood* 2003; **101**: 168-172.
131. Kerjaschki D, Huttary N, Raab I, *et al.* Lymphatic endothelial progenitor cells contribute to de novo lymphangiogenesis in human renal transplants. *Nature medicine* 2006; **12**: 230-234.
132. He Y, Rajantie I, Ilmonen M, *et al.* Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer research* 2004; **64**: 3737-3740.
133. Kerjaschki D. The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis. *The Journal of clinical investigation* 2005; **115**: 2316-2319.
134. Maruyama K, Ii M, Cursiefen C, *et al.* Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *The Journal of clinical investigation* 2005; **115**: 2363-2372.
135. Streubel B, Chott A, Huber D, *et al.* Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *The New England journal of medicine* 2004; **351**: 250-259.
136. Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S, *et al.* Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer science* 2004; **95**: 32-39.
137. Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T, *et al.* VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2002; **98**: 946-951.
138. Hanrahan V, Currie MJ, Gunningham SP, *et al.* The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression. *The Journal of pathology* 2003; **200**: 183-194.
139. Kawakami M, Yanai Y, Hata F, *et al.* Vascular endothelial growth factor C promotes lymph node metastasis in a rectal cancer orthotopic model. *Surgery today* 2005; **35**: 131-138.

140. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, *et al.* Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrine reviews* 1997; **18**: 26-45.
141. Chang LK, Garcia-Cardena G, Farnebo F, *et al.* Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; **101**: 11658-11663.
142. Elagoz S, Egilmez R, Koyuncu A, *et al.* The intratumoral microvessel density and expression of bFGF and nm23-H1 in colorectal cancer. *Pathology oncology research : POR* 2006; **12**: 21-27.
143. Matsuda Y, Ishiwata T, Yamahatsu K, *et al.* Overexpressed fibroblast growth factor receptor 2 in the invasive front of colorectal cancer: a potential therapeutic target in colorectal cancer. *Cancer letters* 2011; **309**: 209-219.
144. Cao R, Bjorndahl MA, Religa P, *et al.* PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer cell* 2004; **6**: 333-345.
145. Cao R, Bjorndahl MA, Gallego MI, *et al.* Hepatocyte growth factor is a lymphangiogenic factor with an indirect mechanism of action. *Blood* 2006; **107**: 3531-3536.
146. Kajiya K, Hirakawa S, Ma B, *et al.* Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *The EMBO journal* 2005; **24**: 2885-2895.
147. Yonesaka K, Satoh T, Ueda S, *et al.* Circulating hepatocyte growth factor is correlated with resistance to cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Anticancer research* 2015; **35**: 1683-1689.
148. Kim CH, Moon SK, Bae JH, *et al.* Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Acta oto-laryngologica* 2006; **126**: 88-94.
149. Freier S, Weiss O, Eran M, *et al.* Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in adenocarcinoma of the colon. *Gut* 1999; **44**: 704-708.
150. Bjorndahl M, Cao R, Nissen LJ, *et al.* Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; **102**: 15593-15598.
151. Salameh A, Galvagni F, Bardelli M, *et al.* Direct recruitment of CRK and GRB2 to VEGFR-3 induces proliferation, migration, and survival of endothelial cells through the activation of ERK, AKT, and JNK pathways. *Blood* 2005; **106**: 3423-3431.

152. Hall FT, Freeman JL, Asa SL, *et al.* Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 2003; **129**: 716-719.
153. Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2002; **82**: 1255-1257.
154. Chu AY, Litzky LA, Pasha TL, *et al.* Utility of D2-40, a novel mesothelial marker, in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2005; **18**: 105-110.
155. Lau SK, Weiss LM, Chu PG. D2-40 immunohistochemistry in the differential diagnosis of seminoma and embryonal carcinoma: a comparative immunohistochemical study with KIT (CD117) and CD30. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2007; **20**: 320-325.
156. Wang SL, Li SH, Chen WT, *et al.* Expression of D2-40 in adjunct diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2007; **115**: 906-910.
157. Kahn HJ, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2002; **15**: 434-440.
158. Pappas A, Lagoudianakis E, Seretis C, *et al.* Role of lymphatic vessel density in colorectal cancer: prognostic significance and clinicopathologic correlations. *Acta gastro-enterologica Belgica* 2015; **78**: 223-227.
159. Duff SE, Jeziorska M, Kumar S, *et al.* Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2007; **9**: 793-800.
160. Donizy P, Rudno-Rudzinska J, Halon A, *et al.* Intratumoral but not peritumoral lymphatic vessel density measured by D2-40 expression predicts poor outcome in gastric cancer--ROC curve analysis to find cut-off point. *Anticancer research* 2014; **34**: 3113-3118.

161. Lee K, Park do J, Choe G, *et al.* Increased intratumoral lymphatic vessel density correlates with lymph node metastasis in early gastric carcinoma. *Annals of surgical oncology* 2010; **17**: 73-80.
162. Wang XL, Fang JP, Tang RY, *et al.* Different significance between intratumoral and peritumoral lymphatic vessel density in gastric cancer: a retrospective study of 123 cases. *BMC cancer* 2010; **10**: 299.
163. Maula SM, Luukkaa M, Grenman R, *et al.* Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer research* 2003; **63**: 1920-1926.
164. Birner P, Schindl M, Obermair A, *et al.* Lymphatic microvessel density as a novel prognostic factor in early-stage invasive cervical cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2001; **95**: 29-33.
165. Zaganelli FL, Carvalho FM, Almeida BG, *et al.* Intratumoral lymphatic vessel density and clinicopathologic features of patients with early-stage cervical cancer after radical hysterectomy. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 2010; **20**: 1225-1231.
166. Kawamura L, Carvalho FM, Alves BG, *et al.* Association between intratumoral lymphatic microvessel density (LMVD) and clinicopathologic features in endometrial cancer: a retrospective cohort study. *World journal of surgical oncology* 2010; **8**: 89.
167. Goes RS, Carvalho JP, Almeida BG, *et al.* Intratumoral lymphatic vessel density in vulvar squamous cell carcinomas: a possible association with favorable prognosis. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 2012; **31**: 8-14.
168. Koido S, Ohkusa T, Homma S, *et al.* Immunotherapy for colorectal cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* 2013; **19**: 8531-8542.
169. Bethwaite PB, Holloway LJ, Thornton A, *et al.* Infiltration by immunocompetent cells in early stage invasive carcinoma of the uterine cervix: a prognostic study. *Pathology* 1996; **28**: 321-327.
170. Hunyadi J, Andras C, Szabo I, *et al.* Autologous dendritic cell based adoptive immunotherapy of patients with colorectal cancer-A phase I-II study. *Pathology oncology research : POR* 2014; **20**: 357-365.
171. Yao Y, Pan Y, Chen J, *et al.* Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of primary hepatocellular carcinomas: analysis using tissue microarrays and comparisons with CD34 and VEGF. *Annals of clinical and laboratory science* 2007; **37**: 39-48.

172. Chen B, Fang WK, Wu ZY, *et al.* The prognostic implications of microvascular density and lymphatic vessel density in esophageal squamous cell carcinoma: Comparative analysis between the traditional whole sections and the tissue microarray. *Acta histochemica* 2014; **116**: 646-653.