



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
KAYSERİ ŞEHİR EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANA BİLİM DALI

**GENOMİK İNSTABİLİTEDEN SORUMLU
APOBEC3B EKSPRESYONU VE DNA YANLIŞ
EŞLEŞME TAMİR (MMR) GEN DURUMUNUN
KOLOREKTAL KANSERLERDE SAPTANMASI VE
TÜMÖRÜ İNFİLTRE EDEN LENFOSİT SKORU
ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Merve DOĞAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KAYSERİ-2023



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
KAYSERİ ŞEHİR EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANA BİLİM DALI

**GENOMİK İNSTABİLİTEDEN SORUMLU
APOBEC3B EKSPRESYONU VE DNA YANLIŞ
EŞLEŞME TAMİR (MMR) GEN DURUMUNUN
KOLOREKTAL KANSERLERDE SAPTANMASI VE
TÜMÖRÜ İNFİLTRE EDEN LENFOSİT SKORU
ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Merve DOĞAN

Danışman

Prof. Dr. Hatice KARAMAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KAYSERİ-2023

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yol gösteren, emeklerini esirgemeyen, anlayışı ve desteği ile güç veren, bilgisi ve akademik yaklaşımı ile yolumu aydınlatan, mesleki gelişimim ve bilimsel araştırma konusunda yüreklendiren, hayata bakışı ve hoşgörüsü ile ilham kaynağı olan, asistanı olmaktan onur duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Hatice KARAMAN'a,

Bilgi ve deneyimleri ile her konuda yol gösterici ve destekleyici olan, patolojiyi sevdiren, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, üzerimde büyük hakları olan değerli hocalarım Doç. Dr. Arzu TAŞDEMİR, Doç. Dr. Fatma ŞENEL, Doç. Dr. Ebru AKAY'a,

Öğrenim hayatım boyunca üzerimde emeği olan tüm hocalarıma,

Yardım ve desteklerini esirgemeyen, eğitime önemli katkılar sağlayan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli uzman doktorlarımıza,

Dostluklarını paylaşmaktan büyük keyif aldığım, iyi ki varlar dediğim sevgili asistan arkadaşlarıma,

Büyük bir özveri ve gayretle çalışan Kayseri Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Ailesi'nin tüm üyelerine,

Ayrıca tez çalışmam boyunca emeği geçen Sayın Mecit Gezer ve diğer laboratuvar çalışanlarına,

Hayatımın her döneminde varlıklarıyla yüzümü güldüren ve güç veren sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürler...

Merve DOĞAN

Kayseri 2023

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
TABLolar LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Embriyoloji	3
2.1.1. Embriyolojik Gelişimin Moleküler Düzenlenmesi	3
2.2. Anatomi.....	4
2.3. Histoloji.....	7
2.3. Kolorektal Karsinom.....	9
2.3.1. Epidemiyoloji.....	9
2.3.2. Etiyoloji.....	9
2.3.3. Karsinogenez.....	10
2.3.4. Histopatoloji.....	14
2.3.5. Moleküler Sınıflandırma	16
2.3.6. Kolorektal Karsinomlarda Derece ve Evre	17
2.3.7. Tedavi.....	19
2.4. Tümörü İnfiltr Eten Lenfosit	20
2.5. APOBEC3B (Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 3B).....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3.1. Olgu Grubunun Tanımlanması.....	25
3.2. Klinik Verilerin Toplanması ve Histomorfolojik Değerlendirme.....	25
3.3. Mikrosatellit İnstabilite Değerlendirmesi	28
3.4. APOBEC3B İmmünohistokimyasal Boyaması ve Değerlendirilmesi.....	30
3.4.1. APOBEC3B İmmünohistokimyasal Boyama Basamakları	30
3.5. Tümörü İnfiltr Eten Lenfosit Değerlendirmesi.....	32

3.6. Crohn Benzeri Lenfoid Reaksiyon Değerlendirmesi	35
3.7. İstatistiksel Analiz.....	36
3.8. Etik Kurul Onayı	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Klinikopatolojik Özelliklerin Dağılımı	37
4.2. İmmün Yanıt Parametrelerinin Sağkalıma Etkisi	39
4.3. APOBEC3B Ekspresyonu ve Sağkalım.....	40
4.4. APOBEC3B Ekspresyonunun İmmün Yanıt ile İlişkisi ve Sağkalım	46
4.5. MMR Gen Durumu ve Sağkalım	51
4.6. MMR Gen Durumunun İmmün Yanıt ile İlişkisi.....	55
4.7. APOBEC3B Ekspresyonu ve MMR Gen Durumunun Birlikte İmmün Yanıt Üzerine Etkisi.....	56
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇLAR.....	77
KAYNAKLAR	78

KISALTMALAR

A3B	: APOBEC3B
AJCC	: American Joint Committee on Cancer
APOBEC	: Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme, Catalytic Subunit
BBA	: Büyük Büyütme Alanı
CIMP	: CpG Island Methylator Phenotype
CIN	: Chromosomal Instability
CLR	: Crohn Like Reaction
CMS	: Consensus Molecular Subtypes
DFS	: Disease Free Survival
GİS	: Gastrointestinal Sistem
H&E	: Hematoksilen ve Eozin
HNPCC	: Hereditary Non-Polypsis Colorectal Cancer
ICI	: Immune Checkpoint Inhibitors
im	: invasive margin
İHK	: İmmünohistokimya
KRK	: Kolorektal Karsinom
MLH	: MutL Homoloğu
MMR	: Mismatch Repair
MSH	: MutS Homoloğu
MSI	: Mikrosatellit instabil
MSS	: Mikrosatellit stabil
NOS	: Not Otherwise Specified
OS	: Overall Survival
SBS	: Single Base Substitution
SCNA	: Somatic Copy Number Aberration
tc	: Tumor Center
TIL	: Tumor Infiltrating Lymphocyte
TMB	: Tumor Mutational Burden
TNM	: Tumor, Node, Metastasis

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Kolorektal Kanser Evrelemesi AJCC	18
Tablo 2.	Değerlendirilen histopatolojik parametreler ve değerlendirme kriterleri	27
Tablo 3.	İmmünohistokimyasal MSI paneli	28
Tablo 4.	Çalışmamızda kullanılan immünohistokimyasal APOBEC3B antikoru	31
Tablo 5.	APOBEC3B immünohistokimyasal boyamasını değerlendirirken kullanılan algoritma	32
Tablo 6.	Vakaların klinikopatolojik özellikleri	37
Tablo 7.	Hastalıksız sağkalım süreleri için Cox Regresyon Analizi sonuçları	39
Tablo 8.	Genel sağkalım süreleri için Cox Regresyon Analizi sonuçları	39
Tablo 9.	Gruplara göre APOBEC3B İHK skorunun karşılaştırılması	40
Tablo 10.	Gruplara göre APOBEC3B İHK kategorilerinin dağılımları.....	40
Tablo 11.	APOBEC3B İHK skoru ve klinikopatolojik parametrelerin Lojistik Regresyon Analizi ile incelenmesi.....	41
Tablo 12.	APOBEC3B İHK skorunun hastalıksız sağkalıma etkisi	43
Tablo 13.	APOBEC3B İHK skorunun genel sağkalıma etkisi.....	44
Tablo 14.	A3B kategorileri ve Grade kategorilerine göre hastalıksız sağkalım sürelerinin karşılaştırılması.....	44
Tablo 15.	A3B kategorileri ve Grade kategorilerine göre genel sağkalım sürelerinin karşılaştırılması.....	45
Tablo 16.	A3B skoruna göre TIL değerlerinin karşılaştırılması	47
Tablo 17.	A3B skoru kategorilerine göre CLR varlığının dağılımları	47
Tablo 18.	A3B kategorileri ve TIL-tümör merkezi kategorilerine göre hastalıksız sağkalım sürelerinin karşılaştırılması	47
Tablo 19.	A3B kategorileri ve TIL-tümör merkezi kategorilerine göre genel sağkalım sürelerinin karşılaştırılması	48
Tablo 20.	A3B kategorileri ve TIL-invaziv sınır kategorilerine göre hastalıksız sağkalım sürelerinin karşılaştırılması	49
Tablo 21.	A3B kategorileri ve TIL-invaziv sınır kategorilerine göre genel sağkalım sürelerinin karşılaştırılması	50
Tablo 22.	MMR durumunun ve klinikopatolojik parametrelerin Lojistik Regresyon Analizi ile incelenmesi.....	52

Tablo 23.	Mikrosatellit proteinlerdeki ekspresyon kaybı dağılımı	54
Tablo 24.	MMR durumunun hastalıksız sağkalıma etkisi.....	54
Tablo 25.	MMR durumunun genel sağkalıma etkisi.....	55
Tablo 26.	MMR durumlarına göre TIL değerlerinin karşılaştırılması	56
Tablo 27.	MMR durumuna göre CLR varlığının dağılımları.....	56
Tablo 28.	A3B kategorileri ve MMR durumlarının etkileşimlerinin dağılımları	57
Tablo 29.	A3B ve MMR etkileşimlerinde TIL ve CLR dağılımları	57
Tablo 30.	KRK’da immün yanıt değerlendirilmesi yapılan çalışmaların bir kısmının özeti.....	61
Tablo 31.	Farklı kanser türlerinde A3B ifadesini İHK yöntemi kullanarak araştıran önceki çalışmaların özeti.....	66

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	GİS'in embriyolojik gelişimi	3
Şekil 2.	Kalın bağırsağın anatomik bölümleri.....	4
Şekil 3.	Kolon bölümlerinin periton ile ilişkisi	6
Şekil 4.	Normal kolon histolojisi	7
Şekil 5.	Kolon kript epitelinin şematik diyagramı	8
Şekil 6.	Normal mukoza. A- Çekum; çok sayıda absorbtif hücre ile birkaç goblet hücresi ve kript bazalinde paneth hücreleri. B- Rektum; yoğun goblet hücresi ve absorbtif hücreler.	9
Şekil 7.	Kolorektal karsinom gelişim yolları.....	10
Şekil 8.	MSI tümörlerde neoantijenlere yanıt olarak artmış lenfosit cevabı.....	13
Şekil 9.	Histolojik subtipler: a- Müsinöz adenokarsinom, b- Taşlı yüzük hücreli karsinom, c- Medüller karsinom, d- Serrated adenokarsinom, e- Mikropapiller adenokarsinom, f- Adenom benzeri adenokarsinom, g- Adenoskuamöz karsinom, h- Sarkomatoid komponent içeren karsinom, ı- Andiferansiye karsinom.....	14
Şekil 10.	Konsensus moleküler alt tipleri	16
Şekil 11.	Kolorektal karsinomlarda diferansiyasyon: a- İyi diferansiye, b- Orta diferansiye, c- Az diferansiye	17
Şekil 12.	İmmünoterapinin farklı formları	20
Şekil 13.	1.001 İnsan Kanseri Hücre Hattında Mutasyon İmzaları. Uluslararası Kanseri Genomu Konsorsiyumu (ICGC) ve Tüm Genomun Pan-Kanser Analizi (PCAWG) projesi.....	22
Şekil 14.	a- APOBEC ailesinin 11 üyesini kodlayan genlerin lokalizasyonu, b- sitozin bazının APOBEC aracılı deaminasyonu sonucu urasile dönüşmesi	23
Şekil 15.	Yüksek TMB sonucu artmış neoantijen üretimi ilişkili çevresel ve konağa ait faktörler	24
Şekil 16.	Tümör sınır konfigürasyonu (HE x40). a- İnfiltratif sınır. b- Pushing sınır	26

Şekil 17.	MMR proteinlerinin immünohistokimya yöntemiyle değerlendirilmesi (x100). a- MLH1 ile ekspresyon kaybı yok. b- PMS2 ile ekspresyon kaybı yok. c- MSH2 ile ekspresyon kaybı yok. d- MSH6 ile ekspresyon kaybı yok.....	29
Şekil 18.	APOBEC3B immünohistokimyasal boyanma yoğunlukları (x400). a- Negatif. b-Hafif. c- Orta. d- Şiddetli.....	31
Şekil 19.	TIL-tümör merkezi (HE x200). a- Düşük. b- Orta. c- Yüksek.	33
Şekil 20.	TIL-invaziv sınır (HE x100). a- Düşük. b- Orta. c- Yüksek.....	34
Şekil 21	a,b. Crohn benzeri reaksiyon (HEx40)	35
Şekil 22.	a-Histopatolojik subtip dağılımı, b- Müsinöz diferansiyasyon gösteren ve göstermeyenlerin dağılımı.....	38
Şekil 23.	a,b,c- Olguların evreleme kriterlerine (T, N, M) göre dağılımları, d-Olguların evrelerine (TNM) göre dağılımları.....	38
Şekil 24.	APOBEC3B İHK skorlarına göre hastalıksız sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi).....	43
Şekil 25.	APOBEC3B İHK skorlarına göre genel sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi).....	44
Şekil 26.	A3B ve Grade kategorilerine göre hastalıksız sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi).....	45
Şekil 27.	A3B ve Grade kategorilerine göre genel sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi).....	46
Şekil 28.	A3B ve TIL-tümör merkezi kategorilerine göre hastalıksız sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi).....	48
Şekil 29.	A3B ve TIL-tümör merkezi kategorilerine göre genel sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi)	49
Şekil 30.	A3B ve TIL-invaziv sınır kategorilerine göre hastalıksız sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi).....	50
Şekil 31.	A3B ve TIL-invaziv sınır kategorilerine göre genel sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi)	51
Şekil 32.	MMR durumlarına göre hastalıksız sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi)	54
Şekil 33.	MMR durumlarına göre genel sağkalım süreleri	55

GENOMİK İNSTABİLİTEDEN SORUMLU APOBEC3B EKSPRESYONU VE DNA YANLIŞ EŞLEŞME TAMİR (MMR) GEN DURUMUNUN KOLOREKTAL KANSERLERDE SAPTANMASI VE TÜMÖRÜ İNFİLTRE EDEN LENFOSİT SKORU ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Kolorektal karsinomlarda (KRK), güncel olarak kullanılan TNM evrelemesinin prognozu ön görmekte tek başına yetersiz kaldığı ve klasik tedavilere dirençli hasta grubunda yeni tedavi alternatiflerine ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir. Bu durum göz önünde bulundurularak yapılan araştırmalar, tümörü infiltre eden lenfosit (TIL) cevabına odaklanmıştır. TIL cevabının güçlü bir prognostik belirteç olduğu ve immünoterapinin hücresel temeli olarak görev yaptığı kabul görmeye başlamıştır. Bu nedenle, TIL cevabını etkileyen faktörler merak konusudur. Biriken bilgiler ışığında, yüksek tümör mutasyon yükünün daha fazla neoantijen oluşum potansiyeline sahip olacağı, dolayısıyla yüksek immün yanıtla sonuçlanacağı varsayılmaktadır.

Bu çalışmada, keşfi henüz yeni olan ve genomik instabiliteden sorumlu olduğu düşünülen APOBEC3B ile genomik instabiliteden sorumlu olduğu bilinen en önemli belirteçlerden DNA yanlı eşleşme tamir (MMR) gen durumunu inceledik. Genomik instabilite ilişkili artmış neoantijen üretimine bağlı olarak yüksek lenfosit cevabına neden olma olasılıklarını değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Retrospektif ve random olarak belirlenen neoadjuvan tedavi almamış, 250 adet KRK hastası çalışmaya dahil edilmiştir. İmmünohistokimyasal olarak APOBEC3B ve MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 protein ekspresyonları değerlendirilmiştir. H&E boyalı preparatlarda sadece mononükleer iltihabi hücreler değerlendirmeye alınarak ve tümör merkezi ile invaziv sınırdaki ayrı ayrı olacak şekilde TIL cevabı belirlenmiştir. Ayrıca, peritümöral lenfoid agregatlarla karakterize edilen Crohn benzeri reaksiyon (CLR) varlığı araştırılmıştır.

Bulgular: APOBEC3B ekspresyonu yüksek olan KRK hasta grubunun düşük olanlara göre daha yüksek TIL-tümör merkezi ve TIL-invaziv sınır değerlerine sahip olduğu saptanmıştır (sırasıyla $p < 0,001$ ve $p = 0,015$). Mikrosatellit instabil (MSI) KRK hasta grubunda ise mikrosatellit stabil (MSS) olanlara göre daha yüksek TIL-invaziv sınır değerleri görülmüştür ($p = 0,008$) ve daha fazla CLR varlığı izlenmiştir ($p = 0,001$).

Sonuç: Yüksek APOBEC3B ekspresyonunun ve MSI'nın, TIL yanıtıyla ilişkili biyobelirteçler olabilecekleri, dolayısıyla iyi prognoz ile ilişkilendirilebilecekleri ve hatta daha ileri çalışmalarla desteklenmesi halinde immünoterapiden fayda görebilecek hastaların belirlenmesinde fayda sağlayabilecekleri düşünülmektedir. Ancak, lenfosit cevabını etkileyebilecek tümör ve tümör mikroçevresi etkileşimine ilişkin çözümlenmesi gereken çok fazla faktör bulunduğu akılda tutulmalıdır.

Anahtar Kelimeler: APOBEC3B, Kolorektal karsinom, Mikrosatellit instabilite, Tümörü infiltre eden lenfosit



**DETERMINATION OF APOBEC3B EXPRESSION AND DNA MISMATCH
REPAIR (MMR) GENE STATUS RESPONSIBLE FOR GENOMIC
INSTABILITY IN COLORECTAL CANCERS AND EVALUATION OF THEIR
EFFECTS ON TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTE SCORE**

ABSTRACT

Aim: TNM staging used in colorectal carcinomas (CRC) is thought to be insufficient in predicting the prognosis alone, and new treatment alternatives are needed in the patient group resistant to classical treatments. Studies conducted have drawn attention to the tumor infiltrating lymphocyte (TIL) response. It has been recognized that TIL response is a strong prognostic marker and functions as the cellular-based immunotherapy. Therefore, the factors affecting TIL response have become a matter of curiosity. Based on accumulated information, high tumor mutation load is assumed to have more neoantigen formation potential, resulting in high immune response.

In our study, we examined APOBEC3B, which is thought to be responsible for genomic instability, and the DNA mismatch repair (MMR) gene status, an important marker known to be responsible for genomic instability. We aimed to evaluate the possibilities of causing elevated lymphocyte response due to elevated neoantigen production associated with genomic instability. .

Materials and Methods: 250 CRC patients retrospectively and randomly determined and who had not received neoadjuvant treatment were included in the study. APOBEC3B and MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 protein expressions were evaluated immunohistochemically. In H&E-stained preparations, only mononuclear inflammatory cells were evaluated, and the TIL response was determined separately at the tumor center and invasive border. In addition, the presence of Crohn's-like reaction (CLR) characterized by peritumoral lymphoid aggregates was investigated.

Findings: The CRC patient group with high APOBEC3B expression was found to have higher TIL-tumor center and TIL-invasive border values than those with low expression ($p < 0.001$ and $p = 0.015$, respectively). In the MSI CRC patient group, higher TIL-invasive border values were observed compared to those with MSS ($p = 0.008$), and the presence of more CLR was determined ($p = 0.001$).

Conclusion: High APOBEC3B expression and MSI may be biomarkers associated with TIL response, and therefore may be associated with good prognosis, and may even be useful in identifying patients who may benefit from immunotherapy. However, it should be kept in mind that there are many factors that need to be resolved regarding the interaction of tumor and tumor microenvironment that may affect lymphocyte response.

Key Words: APOBEC3B, Colorectal carcinoma, Microsatellite instability, Tumor infiltrating lymphocyte



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser dünya çapında en sık görülen üçüncü kanser olup etkili tarama tekniklerinin varlığı ve gelişmiş tedavi modalitelerine rağmen kansere bağlı ölümlerde ikinci sıradadır (1). Bu durum sağkalım süresini olumlu yönde etkileyecek yeni tedavi seçeneklerinin araştırılması ihtiyacını doğurmuştur. Bireyin bağışıklık sistemini kanser tedavisinde kullanmayı hedefleyen immünoterapi de bu tedavi seçeneklerinden birisidir. Ancak klinik sonuçlara olumlu etkisine rağmen immünoterapi hastaların yalnızca bir kısmında fayda sağlamaktadır. Bu nedenle immünoterapiye yanıtı etkileyen moleküler mekanizmaları ve faktörleri anlamak önem taşımaktadır (2,3).

Ortaya çıkan kanıtlar neoantijene özgü TIL'in tümör regresyonuna aracılık eden ana efektör hücreler olduğunu göstermektedir. KRK'da TIL yanıtı iyi sonuçlarla ilişkilendirilmiştir ve immünoterapinin hedefidir (4).

Sitidin deaminaz olan APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) ailesi üyeleri kromozomal ve mitokondriyal DNA'da sitozin → timin (C→T) mutasyonları yapma yeteneğine sahiptir. Genom boyu kanser araştırmaları ile APOBEC'lerin sebep olduğu mutasyon imzaları çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak tespit edilmiştir ve hipermutasyona neden olduğu düşünülmektedir (5,6). Yüksek mutasyon yüküne sahip tümör hücreleri hastanın bağışıklık cevabını tetikleyen daha fazla hücre yüzey neoantijeninin sentezlenmesine neden olurlar (7,8).

Gastrointestinal sistem kanserlerinde hipermutasyonun önde gelen nedenlerinden birinin MSI olduğu ve immünoterapiye yanıtı arttırdığı günümüzde kabul görmektedir. Ancak immünoterapiye yanıtın bir belirteci olarak APOBEC3B'e bağlı hipermutasyonun daha fazla araştırılması gerekmektedir.

Son zamanlarda yapılan birkaç çalışma kanserde APOBEC3B'nin neoantijen üretimini etkileyerek lenfosit yanıtını indükleyebileceğini ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) ve baş-boyun, mesane, meme kanserlerinde immünoterapi yanıtına daha iyi bir yanıt olasılığı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (9–11). Ancak KRK'lardaki ekspresyon durumu ve lenfosit yanıtı ile ilgili henüz net bir veri bulunmamaktadır.

Mevcut araştırmalar ve veriler göz önünde bulundurularak KKK'larda APOBEC3B ekspresyonu ve mikrosatellit instabilitenin hipermutasyona bağlı neoantijen oluşumunu arttıracadıını ve sonucunda bu vakalarda tümörü infiltre eden lenfosit skorunun daha yüksek olacağını beklemekteyiz.

APOBEC3B ekspresyonu ve MMR gen durumunun TIL miktarını arttırması durumunda, bu parametrelerin immünoterapiye cevap verecek hastaların belirlenmesinde kullanılabileceği konusunda literatüre katkıda bulunacağımızı düşünüyöruz.

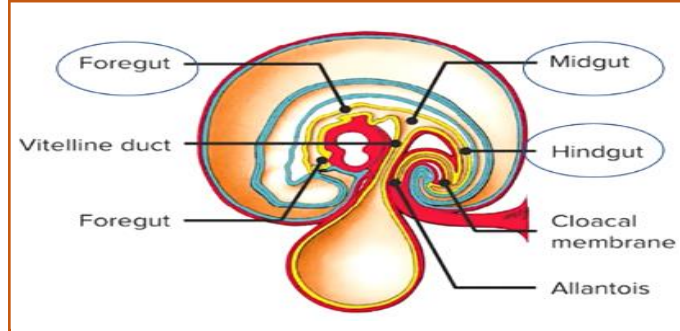


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Embriyoloji

Embriyolojik gelişimin üçüncü haftasında endoderm, mezoderm ve ektoderm adı verilen üç tabakanın olduğu gastrulasyon meydana gelir. Bunu takiben üçüncü ve dördüncü haftalarda embriyonun sefalokaudal ve lateral katlanmasıyla endoderm primitif bağırsak oluşturur. Primitif bağırsaktan başlangıçta ön bağırsak (foregut) ve son bağırsak (hindgut) adı verilen kör tüpler meydana gelir. Primitif bağırsakın yolk salk kesesi ile geçici olarak bağlantı gösteren kısmı ise orta bağırsak (midgut) olarak adlandırılır. Gastrointestinal sistem (GİS) diferansiye olan bu üç bölümden gelişmektedir (Şekil 1). Sağ kolon (çekum, çıkan kolon, transvers kolonun proksimal 2/3'ü ve apendiks) orta bağırsaktan gelişirken, sol kolon (transvers kolonun distal 1/3'ü, inen kolon, sigmoid kolon, rektum) ve anal kanalın proksimal kısmı son bağırsaktan gelişir.

6. haftada çok hızlı büyüyen primitif bağırsak umbilikal kordun içine doğru protrude olur, bu olay fizyolojik herniasyon olarak adlandırılır. Onuncu haftada tekrar abdominal kavite içine döner. Bu esnada Treitz ligamanından itibaren transvers kolonun ortasına kadar olan orta bağırsak superior mezenterik arter etrafında saatin aksi yönünde 270 derecelik rotasyon yapar (12,13).



Şekil 1. GİS'in embriyolojik gelişimi (14)

2.1.1. Embriyolojik Gelişimin Moleküler Düzenlenmesi

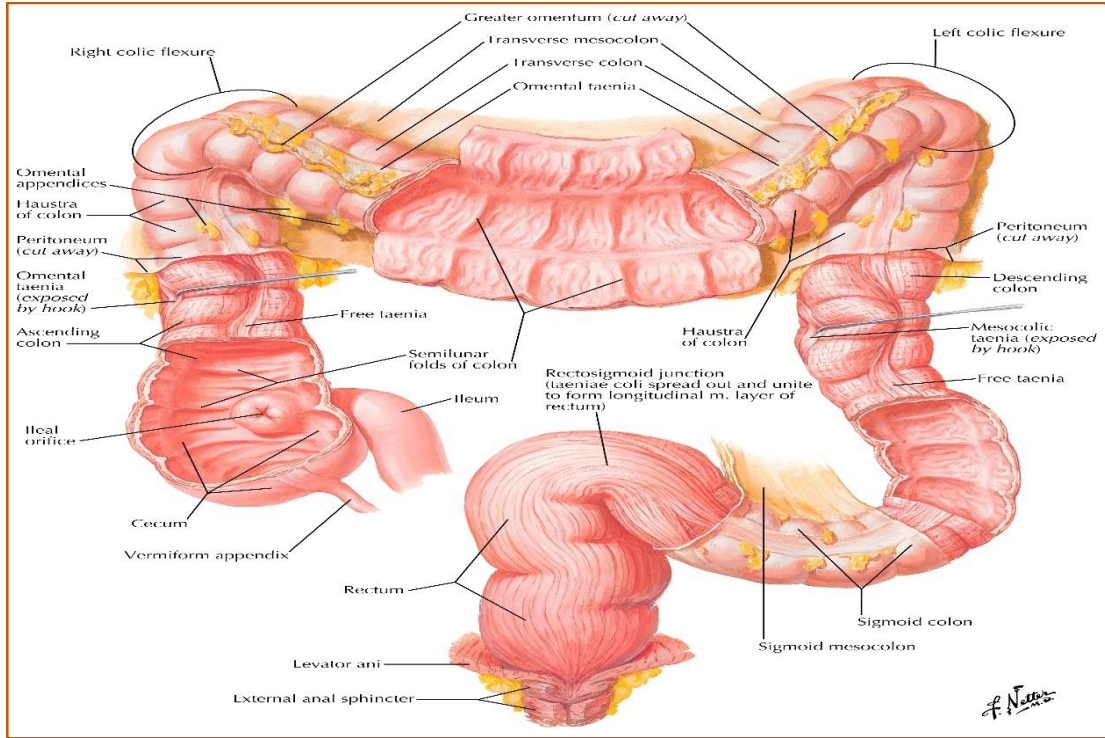
Embriyolojik olarak normal fonksiyonel bağırsak gelişimi kritik moleküler yolların kontrolü altındadır. Bağırsak kanalının embriyogenezinde yer alan başlıca moleküler yollar; kemik morfogenetik proteini (BMP), Notch sinyal yolları, hedgehog (Hh), HOX ve SOX transkripsiyon faktörleri, Wnt/ β -katenin ve TCP sinyal yolları, Eph reseptörleri/ephrin ligandları (Eph-ephrin) sinyal sistemidir (15).

NODAL gen gastrointestinal sistemin farklı noktalarında spesifik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu indükler; rostral kısımda Hhex, FoxA2 ve Sox2 eksprese olurken, kaudal kısımda Cdx2 ve Wnt eksprese olur. Bu durum intestinal epitelin proksimalden distale farklı özelliklere sahip olmasından sorumludur (12).

Moleküler yollardaki sapmalar ve anormal düzenlenmeler sonucunda atrezi, stenoz veya agangliozis gibi birçok bağırsak malformasyonu meydana gelmektedir. Ayrıca güncel çalışmalar bağırsak kök hücrelerinin düzenlenmesi ve homeostazında etkili moleküler yolların KRK patogenezinin embriyolojik temelini oluşturduğunu ileri sürmektedir (15).

2.2. Anatomi

Kalın bağırsak; ileoçekal valvden başlayıp anal kanal ile sonlanan, gastrointestinal sistemin son 1-1.5 m'sini oluşturan lümenli bir organdır. Abdominopelvik boşlukta yerleşim gösterir. Vasküler beslenmeleri ve batin içi yerleşimlerine göre proksimalden distale doğru çekum (kör bağırsak), çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum olarak adlandırılan tanımlayıcı alt gruplara ayrılmıştır. Çıkan kolon ile transvers kolonun birleşim noktasında hepatik fleksura, transvers kolon ile inen kolonun birleşim noktasında splenik fleksura yer alır (Şekil 2).



Şekil 2. Kalın bağırsağın anatomik bölümleri (16)

Çekum; kalın bağırsağın ilk ve en geniş bölümüdür ve kör bir kese şeklinde sağ fossa iliaca'da yer alır. İleoçekal valv ile terminal ileum'a bağlanır ve ileumdan çekuma tek yönlü geçişe olanak verir. Genellikle intraperitonealdir. Ostium ileale'nin yaklaşık 2 cm aşağısında çekum'un posteromedial yüzünde appendiks vermiformis yerleşim gösterir. Uzunluk ve pozisyon yönünden büyük varyasyonlar gösteren appendiks solucan şeklinde bir lenfoid dokudur. Uzunluğu 5-15 cm arasında değişir. Kolonun en geniş bölümü olduğu için çekumda yerleşim gösteren malign lezyonlar nadir olarak obstrüksiyona sebep olurken, sıklıkla kanama ve anemiye bağlı halsizlik ve kilo kaybı semptomları görülür.

Çıkan kolon; yaklaşık 15 cm uzunlukta olup karaciğerin alt yüzüne kadar olan kısımdır. Gevşek bağ doku ile karın duvarına tutunan arka yüzü hariç tamamen peritonla örtülü olup retroperitonealdir.

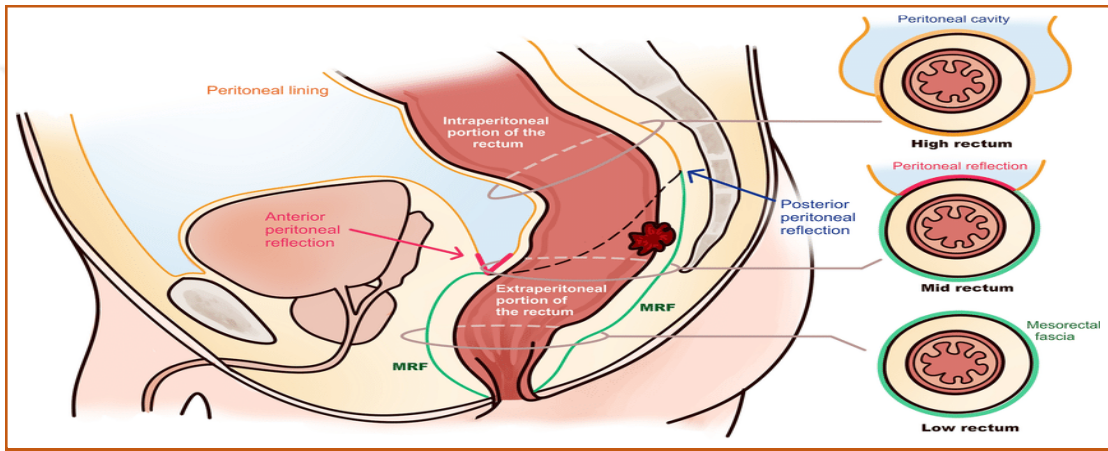
Transvers kolon; kolonun en uzun, en hareketli segmentidir. Ortalama 50 cm uzunluğunda olup hepatik fleksuradan başlar, umblikal ve sol lateral bölgeyi geçerek, yukarı doğru uzanır, sol hipokondriyak bölgede sonlanır. Dalağın, ön alt ucu düzeyinde aşağı ve sola dönerek splenik fleksurayı oluşturur. Pankreas başından splenik fleksuraya kadar tamamen peritonla çevrili olup intraperitonealdir, transvers mezokolon ile karın arka duvarına tutunur.

İnen kolon; ortalama 25 cm uzunluğundadır. Splenik fleksuradan başlayarak sol böbreğin dış kenarı komşuluğundan quadratus lumborum ve psoas majör kası arasında krista iliaka seviyesine kadar inerek pelvis minör girişinde sigmoid kolonla sonlanır. Ön ve yan yüzleri peritonla örtülüdür, arka yüzü ise çıkan kolona benzer şekilde gevşek bağ doku ile karın arka yüzüne tutunur ve retroperitonealdir.

Sigmoid kolon; ortalama 25-40 cm uzunluğunda minör pelvisden başlar, üçüncü sakral vertebra seviyesinde rektumla devam eder. İntraperitonealdir ve hareket imkânı sağlayan sigmoid mezokolon vasıtasıyla pelvis duvarına tutunur. Mezonun sağladığı hareket imkanına ek olarak, kolonun içeriğinin miktarına, uterus, mesane ve rektumun boşluk, doluluk durumlarına göre sigmoid kolonun pozisyonu pelvis ve karın boşluğu arasında değişir.

Rektum; uzunluğu 12 cm'dir. Üçüncü sakral vertebra hizasından başlar ve koksiks'in önünde açıklığı öne bakan kıvrım yaparak fleksura sakralis'i oluşturur.

Diaphragma pelvis'ten geçerek anal kanal ile birleşir. Bu birleşme yerinde arkaya ve aşağıya dönerek fleksura perinealis'i oluşturur. Genişlemiş alt kısmına ampulla rekti denir. Rektumda kolonun bölümlerinden farklı olarak haustralar, apendiks epiploikalar, tenyalar ve mezenter yoktur. Rektumun, üst üçte ikisi peritonla sarılıdır, ancak alt üçte biri retroperitonealdir. Üst üçte birinin ön ve yan yüzleri, orta üçte birinin ise sadece ön yüzü peritonla örtülüdür (Şekil 3). Rektum ön yüzde yer alan periton erkekte mesanenin üzerine geçerek rektum ve mesane arasında excavatio rectovesicalisi; kadınlarda uterusun üzerinde geçerek rektum ve uterus arasında excavatio rectouterinayı meydana getirir (17–19).



Şekil 3. Kolon bölümlerinin periton ile ilişkisi (20)

2.2.1. Kanlanma ve İnervasyon

Vasküler beslenme, venöz drenaj ve inervasyon embriyolojik aks (midgut/hindgut) boyunca iki primer kolon segmentini sağ ve sol olarak belirler.

Sağ kolon kanını; superior mezenterik arterden, parasempatik inervasyonunu; vagus sinirinden, sempatik inervasyonunu; superior mezenterik gangliondan alır.

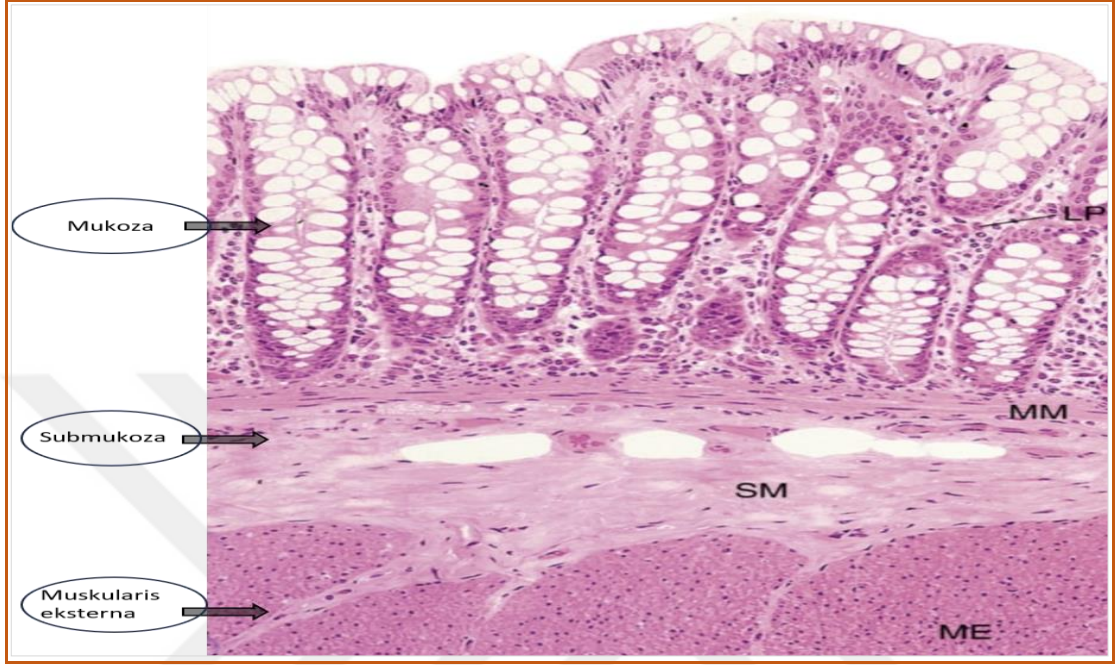
Sol kolon kanını; inferior mezenterik arterden, parasempatik inervasyonunu; S2, S3, S4 sakral sinirlerden ve sempatik inervasyonunu; inferior mezenterik ganglionlardan alır.

Venöz drenaj çoğunlukla portal venledir.

Rektum kanını; orta ve inferior rektal arterlerden, parasempatik innervasyonunu; pelvik splanknik sinirlerden, sempatik inervasyonunu; hipogastrik plexus boyunca lomber spinal segmentler L1, L2 ve L3'den alır (18).

2.3. Histoloji

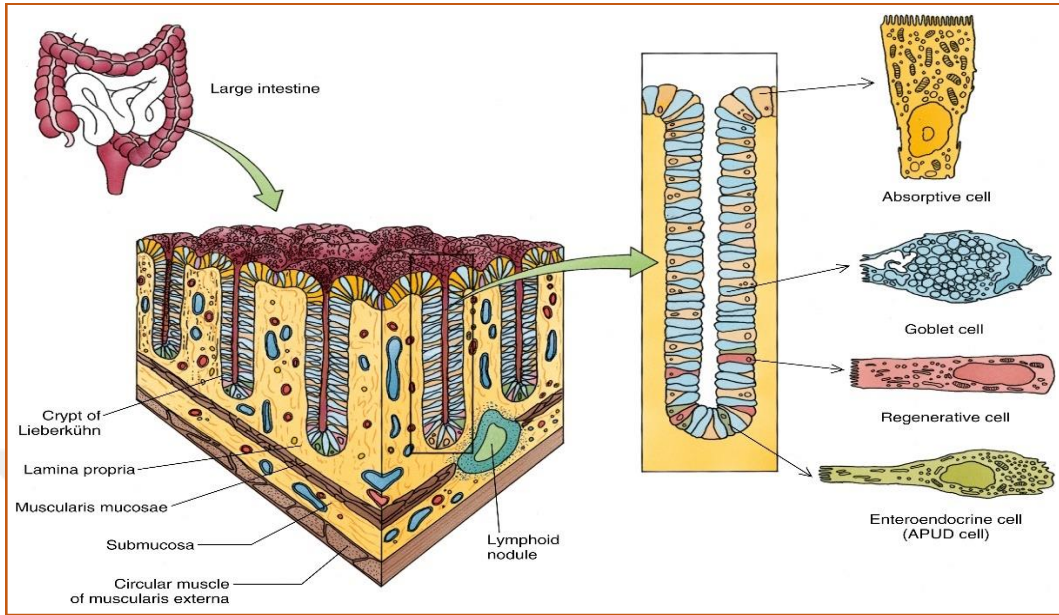
Kolon duvarı histolojik olarak içten dışa doğru mukoza, submukoza, muskularis propria (eksterna) ve seroza'dan oluşan 4 tabakaya sahiptir (Şekil 4).



Şekil 4. Normal kolon histolojisi (21)

Mukoza tabakasının epitel, lamina propria ve muskularis mukoza olmak üzere 3 komponenti vardır. Mukozada sadece yüzeysel plikalar vardır, ancak villus yoktur. Mukoza; yüzeyden muskularis mukozaya doğru uzanan, tübüler yapıda birbirlerine paralel dizilmiş kript yapılarını içerir ve yüzeyi tek katlı alçak kolumnar epitle döşelidir. Bu epitel kript bazaline doğru ilerlerken küboidal epitele dönüşür. Yüzey epiteli, absorptif hücreler ve goblet hücrelerinden oluşmaktadır. Yüzey epiteli arasında lenfositler ve bazen eozinofiller bulunabilir. Kript epiteli, absorptif hücreler ve goblet hücrelerine ek olarak immatür, andiferansiye prekürsör hücreler, endokrin hücreler ve Paneth hücrelerini de içermektedir (Şekil 5). Prekürsör hücreler, diğer hücre tiplerinin öncüsüdür. Paneth hücrelerinin çok sayıda eozinofilik granül içermeleri karakteristiktir ve çekum ile çıkan kolonun başlangıç kısmında bulunmaktadır. Kolonun başka bir kısmında bulunmaları metaplazi lehinedir. Lamina propria; kolajen fibriller, düz kas demetleri, damarlar, sinirler ve bunlar arasında saçılmış halde bulunan birkaç lenfosit (T ve B), plazma hücreleri, histiyositler, mast hücrelerinden oluşmaktadır. Lenfoglandüler kompleksler derin kript epitelinin lenfoid foliküller ile çevrelenmesi ile oluşan yapılar

olup mukozadan submukozaya kadar uzanırlar. Muskularis mukoza, ince düz kas tabakasından oluşur ve mukozayı submukozadan ayırır.



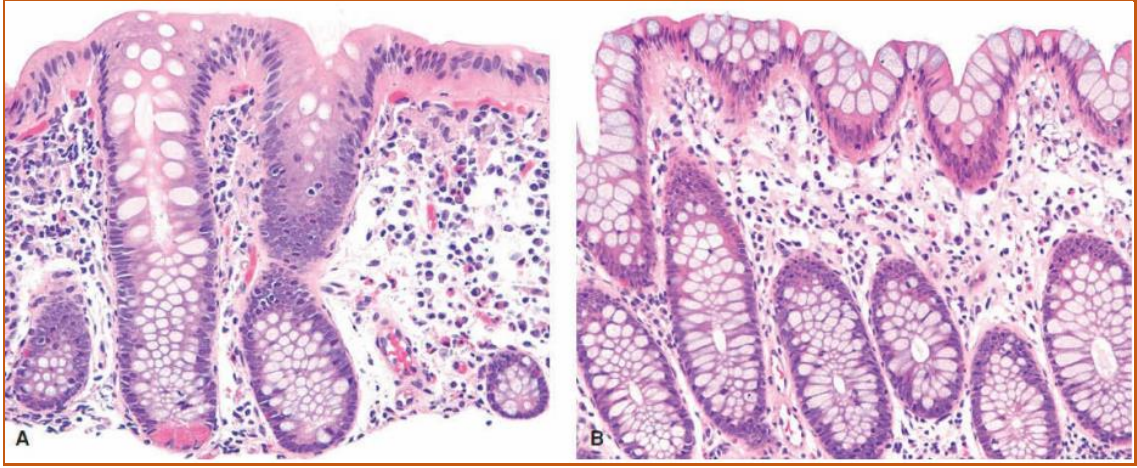
Şekil 5. Kolon kript epitelinin şematik diyagramı (21)

Submukoza, gevşek ödemli, fibrokolajenöz stromadan oluşur ve kan damarlarını, lenfatikleri, sinirleri, Meissner pleksusu adı verilen ganglion hücrelerini barındırır.

Muskularis propria, sirküler iç ve longitudinal dış tabaka ve bunların arasında uzanan Auerbach pleksusundan meydana gelir. Longitudinal lifler dışta kolona paralel uzanır ve toplanarak tenia colileri oluştururlar.

Seroza, fibroadipöz doku ve tek sıralı yassı mezotel hücreleriyle döşeli visceral peritondan meydana gelir; ancak çıkan kolon, inen kolon ve rektumun üçte bir distali retroperitonealdir.

Kolon histolojisi spesifik bölgenin fonksiyonuna göre değişkenlik göstermektedir. Sağ kolonun lamina propriası daha hücrelidir ve bol plazma hücreleri, lenfositler ve eozinofiller içerir. Paneth hücreleri çekum ve sağ kolonda bulunur. Sol kolonda ise goblet hücreleri sayıca artarken absorbtif hücreler azalır (Şekil 6). Cajal hücreleri ise sindirim sistemi içerisinde duvar boyunca değişik lokalizasyonlarda yer alan interstisyel hücrelerdir (22,23).



Şekil 6. Normal mukoza. A- Çekum; çok sayıda absorbtif hücre ile birkaç goblet hücresi ve kript bazalinde paneth hücreleri. B- Rektum; yoğun goblet hücresi ve absorbtif hücreler.

2.3. Kolorektal Karsinom

2.3.1. Epidemiyoloji

Global kanser istatistik verilerine göre bir yılda yeni tanı alan KRK vaka sayısı 1.880.725, KRK'ya bağlı ölüm sayısı 915.880 olup kanser vakalarının ve kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Bu verilere göre KRK en sık görülen üçüncü kanser türü olmasına rağmen kansere bağlı ölümlerde ikinci sıradadır (24,25).

T.C Sağlık Bakanlığı'nın 2018 yılında yayınladığı kanser istatistikleri raporuna göre, ülkemizde de tüm yaş gruplarında en sık görülen kanserler arasında üçüncü sırada KRK'lar yer almaktadır. İnsidansları yaşla birlikte artmaktadır ve yüksek sosyoekonomik düzeye sahip ülkelerde daha sık görülmektedirler (26).

2.3.2. Etiyoloji

KRK gelişimi multifaktöriyel bir süreç olup hem genetik hem çevresel faktörlerinin etkisi bulunmaktadır. Yüksek kalorili ve hayvansal yağdan zengin beslenme olarak bilinen batı tipi diyet, sedanter yaşam tarzı, kırmızı et ve alkol tüketimi, artmış vücut kitle indeksi bilinen değiştirilebilir risk faktörleridir. Tütün kullanımının etkisi tartışmalı olmakla birlikte bazı çalışmalarda risk faktörü olarak bildirilmiştir (27,28).

KRK'ların %50-60'ı sporadik, %30-40'ı aile öyküsü veya polip öyküsü ile ilişkili, %5'i ise kalıtsaldır. Tanımlanmış spesifik gen mutasyonları içeren kalıtsal KRK'lar sıklıkla 50 yaşın altında görülürler. En yaygın olanları Ailesel Adenomatöz Polipozis

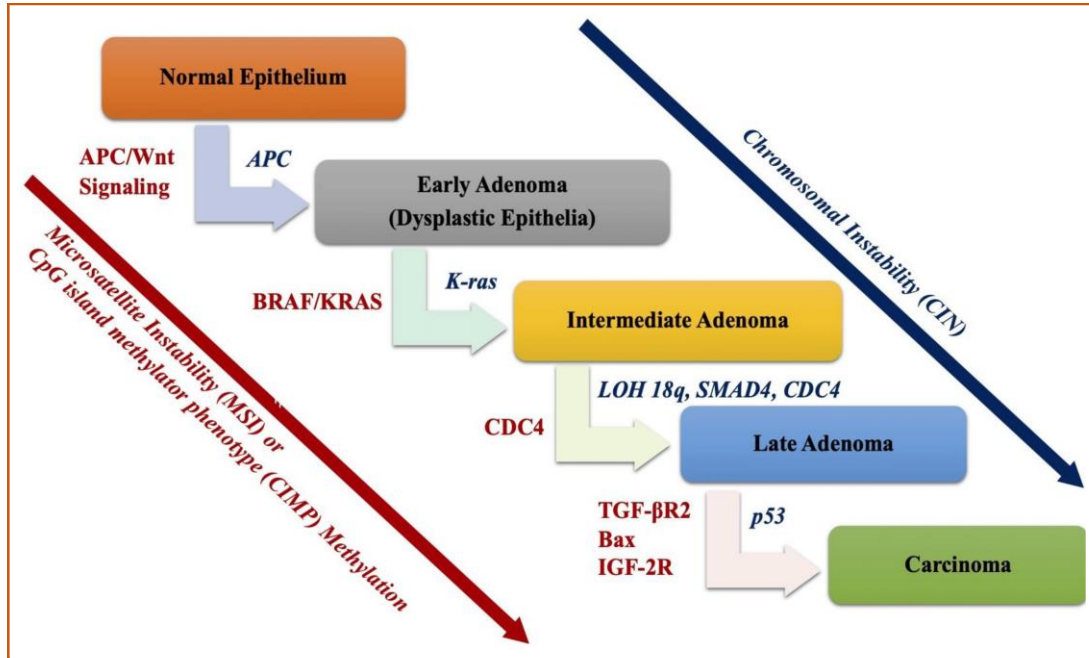
(FAP) ve Lynch Sendromudur (Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Karsinom-HNPCC). İnflamatuar, hamartomatöz veya hiperplastik tipte polipler görülen diğer polipozis sendromlarında da KRK riski artmıştır (29,30).

İnflamatuar barsak hastalıkları (İBH); ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığına (CH) sahip hastalar uzun vadede artmış KRK riskine sahiptirler. Risk artışında en önemli faktör hastalık süresi olmakla birlikte hastalığın yaygınlığı, erken yaşta ortaya çıkması, primer sklerozan kolanjit (PSK) varlığı, inflamasyonun şiddeti de riski artıran faktörlerdendir (31).

Ayrıca pelvik radyoterapi, üreterosigmoidostomi, kistik fibrozis nadir risk faktörlerindendir.

2.3.3. Karsinogenez

KRK gelişiminde birkaç farklı yolak tanımlanmaktadır (Şekil 7); birincisi APC/ β -katenin yolağı, tümör supresör geninin anahtar rol oynadığı kromozomal instabilite (CIN), ikincisi DNA yanlış eşleşme tamir genlerinin inaktivasyonu nedeniyle oluşan MSI ve üçüncüsü ise genomda meydana gelen çok sayıda metilasyon sonucu bazı gen ve gen gruplarında baskılanmaya yol açarak gelişen karsinogenezdir (CpG ada hipermetilasyon fenotipi, CIMP) (32).



Şekil 7. Kolorektal karsinom gelişim yolları (33)

APC/ β -katenin yolağı:

Sporadik kolon tümörlerinin %80'inde görülen klasik adenoma-karsinom sekansı tipik olarak neoplastik sürecin erken dönemlerinde APC tümör baskılayıcı geninde oluşan mutasyonla ilişkilidir. APC, WNT sinyal yolağının bir komponenti olan β -katenin'in negatif düzenleyicisidir. APC fonksiyon kaybı sonucu biriken β -katenin proliferasyonu aktive eder. Bunu hücre çoğalmasını hızlandıran ve apoptozu engelleyen KRAS mutasyonları dahil olmak üzere bir takım ek mutasyonlar izler. Tümör gelişiminin geç aşamalarında TP53 mutasyonu da eklenir. Bu yolağın başlıca özelliği kromozom instabilitesidir (34).

Mikrosatellit instabilite yolağı:

Kısa sıralı tekrarlar (STR; short tandem repeat) olarak da bilinen mikrosatellitler, birden altıya kadar nükleotid dizilerinin tekrarlarından oluşan ve tüm genom boyunca, hem kodlayan hem de kodlanmayan bölgelerde, yaklaşık yarım milyon civarında bulunan DNA dizileridir. Tekrarlayan yapıları nedeniyle DNA replikasyonu sırasında DNA polimeraz enziminin mikrosatellit bölgelerde DNA dizisi üzerinde kayabilir ve buna bağlı replikasyon hataları oluşabilir. Bu replikasyon hatalarının düzeltilmemesi durumunda somatik veya germ hücrelerinde hücre fenotipi değiştirebilen, işlev bozukluğuna veya hastalığa neden olabilen mutasyonlar görülebilir. Bu riske karşı prokaryot ve ökaryotlarda benzer sistem üzerinden işleyen MMR sistemi bulunmaktadır (35,36).

MMR sistemin proteinleri ilk defa prokaryotlarda tanımlanmış ve MutS, MutH, MutL olarak isimlendirilmiştir. Onarım esas olarak yanlış eşleşmiş nükleotidin tanınması, hangi zincirin yeni zincir olduğunun anlaşılması, hatalı bölgenin çıkarılması ve yeniden sentezlenmesi şeklinde dört aşamada gerçekleşir (37).

İnsanda MutS, MutS homoloğu (MSH), MutL ise MutL homoloğu (MLH) olarak adlandırılmaktadır ve 5'i MSH (hMSH2, hMSH3, hMSH4, hMSH5, hMSH6), 4'ü MLH (hMLH1, hMLH3, hPMS1, hPMS2) olmak üzere bilinen 9 homolog vardır. Bunlar MSH2/MSH6 ve PMS2/MLH1 şeklinde heterodimer oluşturarak fonksiyonel çiftler olarak etki ederler. MSH2 major komponenti oluşturur ve MSH6'nın yokluğunda MSH3 ile eşleşmektedir. Diğer heterodimerde de MLH1 major komponenti oluşturur ve PMS2'nin yokluğunda PMS1 ile eşleşmektedir. MLH heterodimerlerinin fonksiyonunun,

yanlış eşleşmeyi tanıyan MSH komplekslerinin yer aldığı DNA tamirinde rol oynayan diğerk proteinlerin olaya katılması olduğu bildirilmektedir (38).

MMR sisteminde defekt olduğuunda ilk yanlış eşleşmeler mikrosatellit dizilerinde olur. Mikrosatellitler genomun genellikle kodlanmayan intron bölgelerinde yer almaktadırlar, bu durumda mutasyonlar sessizdir. Ancak kodlanan genin ekzonunda yer alan mikrosatellit dizileri tamir edilemez ise mutasyonlar meydana gelir ve sonuç olarak MSI gelişir. Mutasyonlar en sık TGFBR2, ACVR2A, TCF4, IGF2R, BAX, MSH6 ve MSH3 gibi mikrosatellit bölgeler içeren genleri etkilemektedir ve bu genlerin bir kısmı, TGFBR2, BAX gibi kontrolsüz hücre çoğalması sonucu tümör gelişiminde önemli role sahiptir (39).

Lynch sendromunda (Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanseri Sendromu; HNPCC) MMR genlerinden birinde germline mutasyon bulunmaktadır. Ancak hastalık oluşması için diğerk allelin de mutasyona uğraması veya heterozigozite kaybı (LOH) gerekir. Sporadik KRK'ların çoğunda CIN yolağı etkilenmişken, %15'inde DNA MMR genlerinde hata saptanmaktadır. HNPCC'nin aksine, MSI özellikleri taşıyan sporadik KRK'larda MMR genlerinde germline mutasyon yerine çoğunlukla MLH1 promoter bölgesinde biallelik metilasyon ve MSH2 genine komşu EPCAM geninde görülen delesyonların MSH2 transkripsiyonunu engellemesi gibi epigenetik değişiklikler ("silencing") saptanmaktadır (37). Ayrıca sporadik MSI tümörlerin BRAF mutasyonu, Lynch sendromlu vakaların yaklaşık %20 'sinin β -katenin mutasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (40).

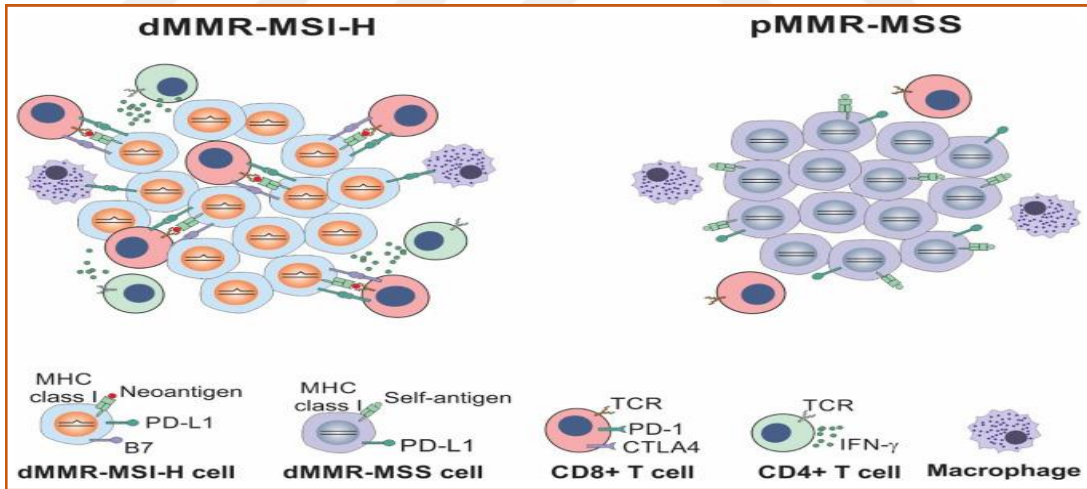
Literatüre bakıldığında MSI durumunu saptamada PCR analizi altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, fragman analizi sonuçları ile uyumluluğu yüksek bulunan immünohistokimya (İHK) yöntemi uygulama kolaylığı ve ulaşılabilirliği açısından birinci sırada önerilmektedir. Ancak belli durumlarda fragman analizi ile doğrulanması gerekmektedir (41).

PCR analiz yöntemi, hedef mikrosatellit bölgelerinin PCR ile çoğaltılarak, elektroforez yöntemiyle uzunluk farklarının kıyaslanmasına dayanır ve bu karşılaştırma her hastanın kendi normal dokusu ile tümör dokusu arasında yapılır. Kolorektal kanserlerde MSI testi için 2 mononükleotid (BAT25, BAT26) ve 3 dinükleotid (D2S123,

D5S346 ve D17S2505) olmak üzere toplam 5 mikrosatellit bölgesi tanımlamıştır (Bethesda paneli) (42).

DNA MMR defektinin immünohistokimya yöntemiyle değerlendirilmesinde ise MLH-1, MSH-2, PMS2 ve MSH6 proteinlerinden herhangi biri ile total ekspresyon kaybının MMR defektif vakaları gösterdiği kabul edilmektedir. Fokal de olsa ikna edici bir nükleer pozitiflik olmasının ise DNA MMR intakt vakaları belirlediği belirtilmektedir (36).

Birçok kanser tipinde, MSI gösterenlerde immün kontrol noktasını hedef alan tedavinin daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Bu durum MSI tümörlerde artmış tümör mutasyon yükü sonucu ortaya çıkan neoantijenlere yanıt olarak artmış lenfositlerle açıklanmaktadır (Şekil 8). Bu aktif immün fenotipe sahip MSI tümörler ayrıca PD1, PD-L1, CTLA4, Lenfosit aktive edici 3 (LAG3) ve interferon- γ (IFN γ) dahil olmak üzere yüksek seviyelerde çoklu immün kontrol noktası moleküllerini ifade ederler. Bu bulgular, MSI tümörlerin hem genomik hem de mikroçevre özelliklerinin immünoterapiye yüksek cevap oranlarına katkıda bulunabileceğini göstermektedir (43-44).



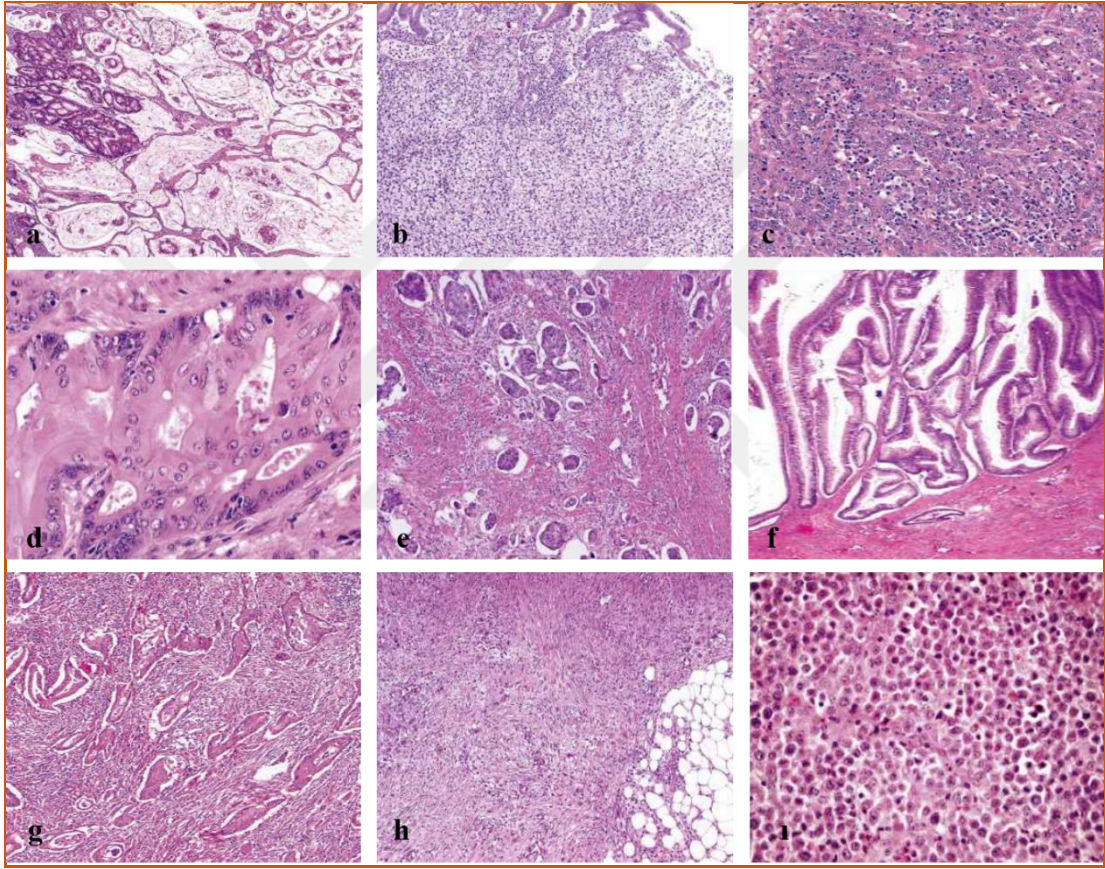
Şekil 8. MSI tümörlerde neoantijenlere yanıt olarak artmış lenfosit cevabı (45)

CpG ada hipermetilasyon fenotipi:

Mikrosatellit instabilitesi olan kolon kanserlerinin bir kısmında, DNA mismatch tamir enzimlerinde mutasyon yoktur. Bu tümörlerde CIMP vardır. MLH1 promotor bölgesi tipik olarak hipermetilasyon gösterir. Ayrıca bu kanserlerde BRAF onkogeninde aktive edici mutasyonlar da sıktır (46).

2.3.4. Histopatoloji

KRK'lar kolon mukoza epitelinden gelişmekte olup %90'ı adenokarsinomlardan oluşmaktadır. Adenokarsinomlar; displastik hücrelerle döşeli gland yapıları oluşturan, muskularis mukozadan submukozaya invazyon gösteren epitelyal tümörlerdir. Çoğu vakanın adenokarsinom, başka türlü adlandırılmayan (NOS) olarak tanı almasına rağmen spesifik klinik ve moleküler özelliklere sahip birkaç histolojik alt tip tanımlanmıştır (Şekil 9).



Şekil 9. Histolojik subtipler: a- Müsinöz adenokarsinom, b- Taşlı yüzük hücreli karsinom, c- Medüller karsinom, d- Serrated adenokarsinom, e- Mikropapiller adenokarsinom, f- Adenom benzeri adenokarsinom, g- Adenoskuamöz karsinom, h- Sarkomatoid komponent içeren karsinom, ı- Andiferansiye karsinom (47)

Müsinöz adenokarsinom; tümörün %50'sinden fazlasını ekstraselüler müsin gölleri oluşturur. Tümörde müsinöz komponent %10-50 aralığında ise müsinöz diferansiyasyon olarak tanımlanır. Bu tümörler daha fazla MSI gösterirler.

Taşlı yüzük hücreli karsinom; tümörün %50'sinden fazlasını, belirgin intrasitoplazmik müsin içererek, nükleusun kenara itildiği görünüme sahip hücreler oluşturur. Çok nadirdirler (<%1) ve genellikle genç hastalarda, diffüz infiltratif paternde görülürler. MSI görülme sıklığı fazla olmakla birlikte bu vakaların Lynch Sendromu ile yakın ilişkisi izlenmiştir.

Medüller karsinom; tabakalar şeklinde büyüme gösteren veziküler nükleuslu, belirgin nükleollü ve geniş eozinofilik sitoplazmalı tümör hücrelerinden oluşur. Tümörü infiltre eden lenfositlerin ve nötrofilik granülositlerin varlığı karakteristiktir. MSI sıklıkla görülür ve çoğunlukla buna BRAF mutasyonu da eşlik etmektedir.

Serrated adenokarsinom; Yapısal olarak glandüler serrasyon gösteren, müsinöz alanların eşlik ettiği, nükleus/sitoplazma oranı düşük tümöral hücrelerden oluşur. Bu tümörlerde MSI, CpG adası metilasyon fenotipi ve BRAF mutasyonunun sık görüldüğü saptanmıştır.

Mikropapiller adenokarsinom; vasküler yapıları taklit eden stromal boşluklarda küçük kümeler halinde tümör hücrelerinin bulunması ile karakterizedir. Bu tümörlerde lenf nodu metastazı, lenfatik invazyon, ektramural vasküler invazyon, perinöral invazyon gibi kötü prognostik faktörler sık görülür.

Adenom benzeri adenokarsinom; İnvaziv alanların %50'sinden fazlası düşük dereceli villöz yapılara sahip adenom benzeri görünümündedir. Bu tümörler biyopsilerde invaziv komponentin tanınmasının zor olmasıyla karakterizedir. KRAS mutasyonu sıktır.

Adenoskuamöz karsinom; hem glandüler hem de skuamöz bileşeni malign özellikte olan bir tümördür.

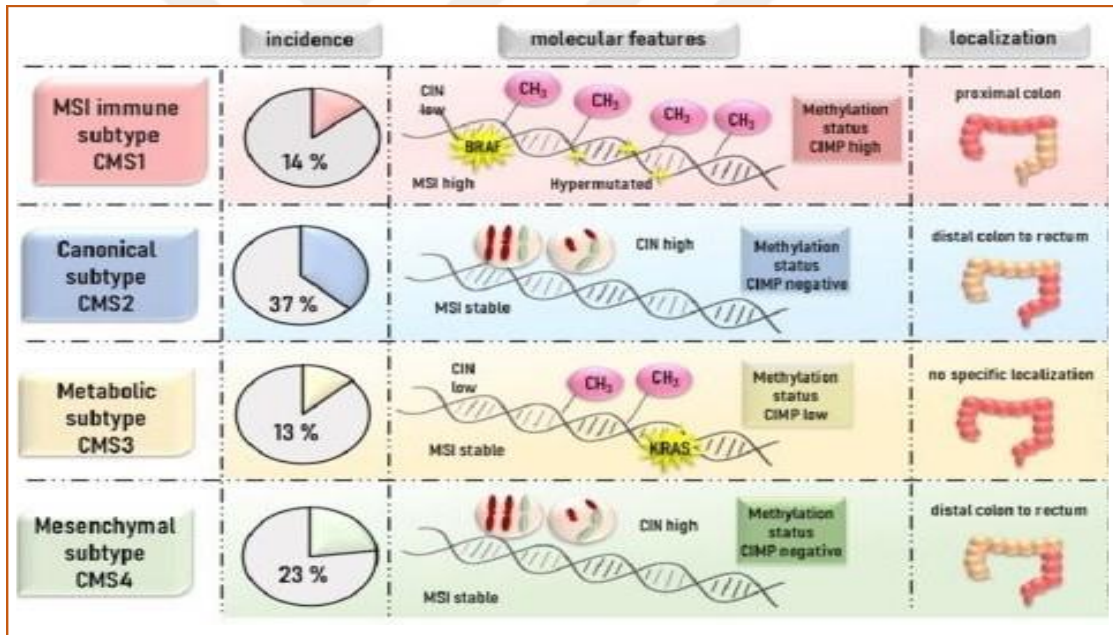
Sarkomatoid komponent içeren karsinom; içsi, rabdoid özellikte sarkomatoid alanlar ve andiferansiye morfoloji gösteren nadir bir tümördür. Sıklıkla miksoid matrikse gömülü diskoheziv tümör hücreleri şeklindedir. Rabdoid hücrelerde, belirgin intrasitoplazmik eozinofilik rabdoid cisimler görülebilir. SMARCB1 (INI1) ve SWI/SNF kromatin yeniden düzenlenme kompleksi alt tiplerinin kaybı karakteristiktir.

Andiferansiye karsinom; değişken histolojik görünümde olup morfolojik, immünohistokimyasal (İHK) veya moleküler olarak herhangi bir diferansiyasyon saptanamayan bir tümördür. Nadiren MSI gösterirler (47–49).

2.3.5. Moleküler Sınıflandırma

KRK farklı klinik sonuçlara ve ilaç yanıtına sahip heterojen bir hastalık grubudur. Tümörlerin biyolojik özelliklerine ve davranışlarına dayanarak daha etkili tedavi planlaması yapabilmek, daha iyi klinik sonuçlar elde edebilmek ve yeni tedavi yöntemleri açısından daha ileri çalışmalara olanak sağlamak için önceki mutasyon merkezli sınıflandırmalar, transkriptom bazlı (gen ifadesine dayalı) bir moleküler alt tiplere doğru kaymıştır.

Gen ifadesine dayalı KRK sınıflandırmasındaki tutarsızlıkları çözmek ve kliniğe yansımalarını doğru bir şekilde belirleyebilmek amacıyla 2015 yılında büyük ölçekli veri paylaşımı ve analizine dayanarak KRK Alt Tip Belirleme Konsorsiyumu (The CRC Subtyping Consortium-CRCSC) oluşturuldu. Bunun sonucunda dört konsensus moleküler alt tip grubu (Consensus Molecular Subtypes -CMS) tanımlandı (Şekil 10).



Şekil 10. Konsensus moleküler alt tipleri (50)

- **CMS 1 (MSI-immün grup, %14):** MSI, CIMP-H ve BRAF mutasyonları ile ilişkili gruptur. CD8+ sitotoksik T hücrelerinden oluşan yaygın bir immün infiltrat ile karakterizedir. Bu gruptaki olgular, hipermutasyona uğramıştır ve somatik kopya sayısı değişikliği (SCNA) düşük prevalansa sahiptirler. Kadınlarda daha sıktır ve genellikle sağ kolon yerleşimlidirler. Histopatolojik dereceleri yüksektir. Relaps sonrası düşük sağkalım ile ilişkilidir.

- **CMS 2 (kanonikal grup, %37):** WNT ve MYC sinyal yollarının aktivasyonu ile karakterize kromozomal instabilite gösteren gruptur. Yüksek somatik kopya sayısı değişiklikleri (SCNA-H) görülür. Genellikle sol kolon yerleşimlidirler ve relaps sonrası sağkalım yüksektir.

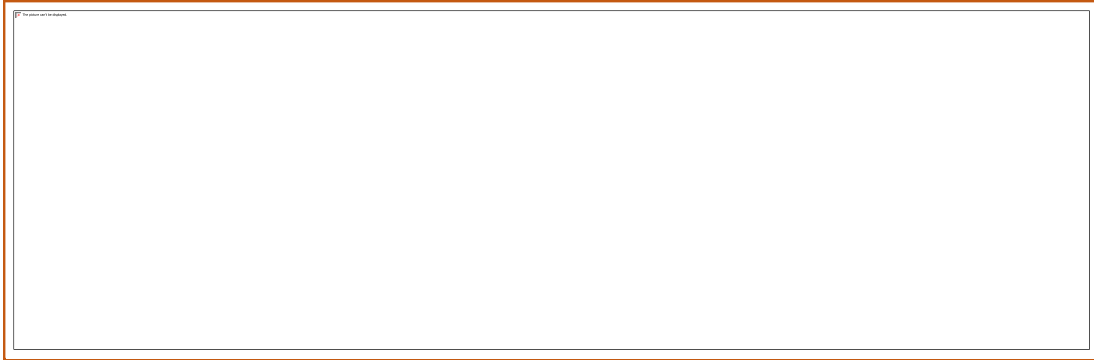
- **CMS 3 (metabolik grup, %13):** Metabolik yolların disregülasyonu ile karakterizedir. KRAS aktivasyon mutasyonları görülür ve buna bağlı olarak belirgin metabolik adaptasyon indüklenir. Bu grup tümörlerde CIMP ve SCNA düşüktür.

- **CMS 4 (mezenkimal grup, %23):** Epitelyal mezenkimal geçişte (EMT) yer alan genlerin belirgin upregülasyonu ile karakterizedir. TGF β aktivasyonu, anjiyogenez ve stromal infiltrasyon belirgindir ve SCNA yüksektir. Genellikle ileri evrede tanı alırlar, sağkalım düşüktür.

KRK tanısı alan olguların geriye kalan % 13'ü ise bu grupların herhangi birinde sınıflandırılmayan mikst özelliklere sahip tümörlerden oluşmaktadırlar (51–53).

2.3.6. Kolorektal Karsinomlarda Derece ve Evre

KRK'larda derecelendirme (gradeleme) tümörün mikroskopik olarak gland oluşturma oranlarına göre düşük dereceli (iyi ve orta derecede diferansiye) ve yüksek dereceli (az diferansiye ve andiferansiye) şeklindedir (Şekil 11). Derecelendirme en az diferansiye alana göre yapılmalıdır (49,54).



Şekil 11. Kolorektal karsinomlarda diferansiyasyon: a- İyi diferansiye, b- Orta diferansiye, c- Az diferansiye (55)

KRK'larda hastanın klinik seyrini öngörmede ve tedavisini planlamada en etkin klinikopatolojik parametrenin TNM (T(tümör), N (nod=lenf nodu), M(metastaz)) evrelemesi olduğu kabul görmektedir. Günümüzde AJCC'nin (American Joint

Committee on Cancer) 2018’de güncellenen 8.baskısındaki TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır (Tablo 1) (49,56).

Tablo 1. Kolorektal Kanseri Evrelemesi AJCC (8. Baskı) (56)

T - Primer Tümör	TX	Primer tümör değerlendirilemedi			
	T0	Primer tümör kanıtı yok			
	Tis	Karsinoma in situ: lamina propria invazyonu			
	T1	Tümör submukozaya invaze			
	T2	Tümör muskularis propriaya invaze			
	T3	Tümör subserozaya ya da peritonsuz perikolik veya perirektal dokulara invaze			
	T4	Tümör direkt olarak diğer organlara ya da yapılara invaze ve/veya visceral peritonu perforasyon etmiş T4a: Tümör visceral peritonu perforasyon etmiş T4b: Tümör direkt olarak diğer organlara ya da yapılara invaze			
N – Bölgesel Lenf Nodları	NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi			
	N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok			
	N1	1-3 adet bölgesel lenf nodu metastazı N1a: 1 adet bölgesel lenf nodu metastazı N1b: 2 ya da 3 adet bölgesel lenf nodu metastazı N1c: Bölgesel lenf nodu metastazı olmadan subseroza ya da peritonsuz perikolik veya perirektal yumuşak dokuda tümör depozitleri			
	N2	4 ya da daha fazla sayıda bölgesel lenf nodu metastazı N2a: 4-6 adet bölgesel lenf nodu metastazı N2b: 7 ya da daha fazla bölgesel lenf nodu metastaz			
	M – Uzak Metastaz	M0	Uzak metastaz yok		
M1		Uzak metastaz M1a: Peritoneal metastaz olmadan tek organa (karaciğer, akciğer, over, bölgesel olmayan lenf nodları) sınırlı metastaz M1b: Birden fazla organa metastaz M1c: Diğer organlarda tutulum olsun veya olmasın periton metastazı			
TNM – Evre		0	Tis	N0	M0
		I	T1, T2	N0	M0
	II	T3, T4	N0	M0	
	IIA	T3	N0	M0	
	IIB	T4a	N0	M0	
	IIC	T4b	N0	M0	
	III	Herhangi T	N1, N2	M0	
	IIIA	T1, T2	N1	M0	
	IIIA	T1	N2a	M0	
	IIIB	T1, T2	N2b	M0	
	IIIB	T2, T3	N2a	M0	
	IIIB	T3, T4a	N1	M0	
	IIIC	T3, T4a	N2b	M0	
	IIIC	T4a	N2a	M0	
	IIIC	T4b	N1, N2	M0	
	IV	Herhangi T	Herhangi N	M1	
	IVA	Herhangi T	Herhangi N	M1a	
	IVB	Herhangi T	Herhangi N	M1b	
	IVC	Herhangi T	Herhangi N	M1c	

2.3.7. Tedavi

KRK tedavisinde ana tedavi yöntemi cerrahidir. Tümörün yerleşim yerine göre cerrahi rezeksiyon tipi değişmekle birlikte genel olarak tümör içeren segmentin ve ilgili tüm lenf nodlarının uygun cerrahi sınır ile çıkarılmasını içerir. Sağlıklı bir değerlendirme için diseke edilen lenf nodu sayısı en az 12 olmalıdır. Seçilmiş olgularda karaciğer ve akciğer metastazektomisinin sağkalıma katkısı mevcuttur (57).

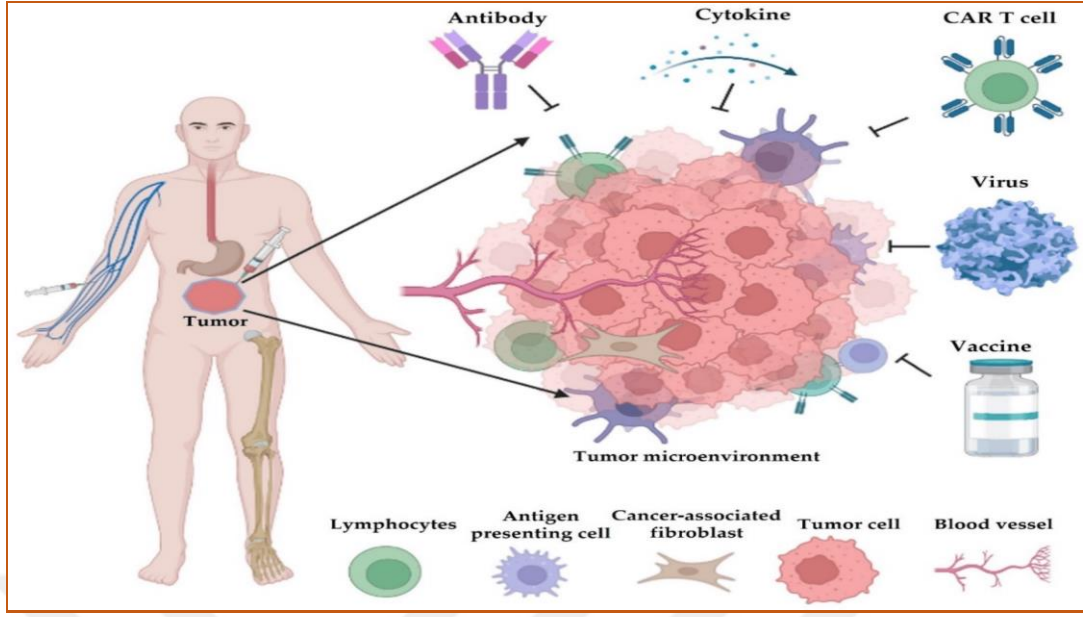
Küratif rezeksiyon geçiren hastalarda mikrometastazları ortadan kaldırmak, böylece hastalığın nüksünü azaltmak için postoperatif adjuvan kemoterapi kullanılmaktadır. Neoadjuvan tedaviler ise genellikle lokal ileri rektum kanserinde tümörü küçülterek cerrahiye kolaylaştırmak ve sfinkteri koruyabilmek için kullanılan yöntemlerdir. Neoadjuvan tedaviler cerrahi öncesi uygulanan kemoterapi ve/veya radyoterapiyi içermektedir (58).

Rezeke edilemeyen metastatik KRK'da primer tedavi konvansiyonel kemoterapi olmakla birlikte RAS mutasyonu durumuna göre bu tedaviye ek olarak anti-EGFR monoklonal antikorları veya anti-VEGF monoklonal antikorları eklenebilmektedir (59).

BRAF mutant KRK'da, BRAF inhibitörleri tek başına kullanımda yeterince etkili bulunmamıştır. Ancak BRAF, MEK ve EGFR inhibitörleri kombinasyonundan oluşan yeni bir tedavi stratejisi bu grup tümörlerde ümit verici sonuçlar vermiştir (60).

Son yıllarda klasik kemoterapötik ilaçlardan biri olan 5-Fulorourasil'e direnç gösteren MSI tümörler için immünoterapinin kullanımı gündeme gelmiştir (61).

İmmünoterapi, kanser ile mücadele etmek için bağışıklığı kullanan bir grup terapötik stratejiden oluşur. Bunlar; temel olarak immün kontrol noktalarının bloke edilmesi, bağışıklık hücrelerinin (T hücreleri, doğal öldürücü/NK hücreleri ve makrofajlar) adaptif transferi, sitokin tedavisi, kanser aşılı ve onkolitik virüslerin kullanımıdır (Şekil 12). Özellikle son yıllarda hızla artan gelişmelere rağmen, immünoterapinin klinik faydası bazı kanserlerin tedavisinde sınırlıdır. Bu nedenle, yanıt verecek hastaların belirlenmesinde biyobelirteçlere ihtiyaç vardır (62). Yüksek tümör mutasyon yükü (TMB), daha fazla neoantijen üretimi ile sonuçlanır ve T hücrelerinin tümörü tanıma şansını artırır. Sonuç olarak, yüksek TMB'nin immünoterapi tedavisine daha iyi klinik yanıt ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (63).



Şekil 12. İmmünoterapinin farklı formları (62)

2.4. Tümörü İnfiltrate Eden Lenfosit

Tümör hücrelerinin konak bağışıklık sistemi tarafından ‘yabancı’ olarak tanınabileceği ve ortadan kaldırılabilmesi fikrini ilk olarak Paul Ehrlich ileri sürmüştür. Bu fikir; immün yanıt ile hastalığın seyri arasında ilişki olduğunu gösteren veriler, immün yetmezliği olanlarda bazı kanserlerin görülme sıklığının artması ve immünoterapinin başarısını gösteren birçok çalışma ile yıllar içerisinde desteklenmiştir. Ancak tümör ile immün yanıt arasındaki etkileşim birçok spesifik faktörden etkilenir ve karmaşıktır. Tümörü infiltrate eden bağışıklık hücre alt grupları, pro-tümör veya anti-tümör aktiviteleri ile oldukça heterojen ve dinamik bir yapıya sahiptirler. Son gelişmelerden; tek hücreli RNA sekanslaması (scRNA-seq) ve kütle spektrometresi gibi tek hücre teknolojileri sayesinde tümöre sızan bağışıklık hücrelerinin işlevsel çeşitliliği hakkında öngörü sağlanabilmektedir (64).

Tümöre karşı immün yanıt; kontrolsüz çoğalma, metabolik stresler ve yetersiz kan dolaşımı sonucu oluşan hipoksi ile başlar. Hipoksiye bağlı olarak gelişen kanser hücrelerinin ölümü ve sonucunda ortama salınan mediyatörler, sinyaller ile doğal bağışıklık uyarılır. Dendritik hücreler ölü hücreleri fagosit ettikten sonra lenf nodlarına göç ederler ve majör doku uygunluk kompleksi-1 (MHC1) molekülleri ile tümör neoantijenlerini CD8+T lenfosit hücrelerine sunarlar. Tümör antijenlerine karşı aktif hale gelen sitotoksik T lenfositler (CTL), yardımcı T lenfositler (Th) ve regülatör T

lenfositlerden (Treg) oluşan T lenfositlerin farklı tipleri antitümöral etkide esas rolü oynarlar (65,66).

Tümör antijenlerinin tanınması sonucu indüklenebilen Th hücrelerinin IFN- γ üretmesi ile aktive olan makrofajlar ve doğal bağışıklıkta rol alan natural killer hücreleri de tümörün yok edilmesine katkıda bulunabilirler (66).

B lenfositler hem hücrel hem humoral immüitedeki çeşitli fonksiyonlarından dolayı protümöral veya antitümöral olmak üzere farklı roller oynayabilirler. Bununla birlikte, muhtemelen B lenfositlerin antijen sunan hücre olarak CTL cevabını arttırmasına bağlı, tümörü infiltre eden B lenfositler birçok tümör tipinde iyi prognozla ilişkilendirilmiştir (64,67).

Nötrofiller, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve proteazları salgılayarak invazyon ve metastazı kolaylaştırarak tümör progresyonuna katkı sağlarlar (68).

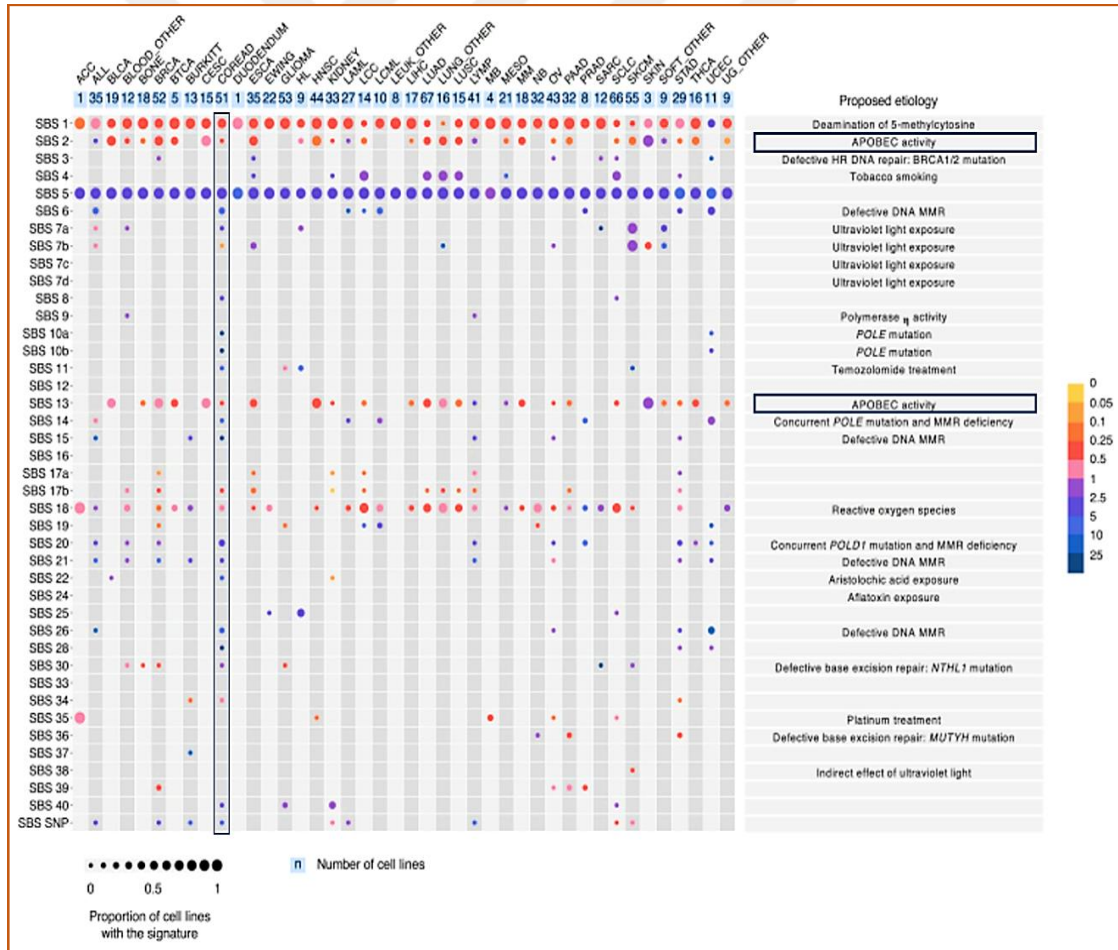
Tümörlere karşı gelişen TIL cevabı, tümör mutasyon yükü (tümör başına somatik mutasyon) ile ilişkili olarak artmış tümör antijenitesine bağlıdır. Bu nedenle yüksek mutasyon yükünün belirgin olduğu melanomlar ve akciğer karsinomlarında TIL cevabı belirgindir (69). Daha yüksek mutasyon yükü, daha fazla neoantijen sunumu ile ilişkili olabilen MSI KRK'lar TIL cevabı ile pozitif korelasyon göstermektedir.

KRK'larda tümör mikroçevresinin komponentlerinden, TIL yanıtının prognoz ile ilişkisi birçok çalışmayla ortaya konmuştur (70). KRK'larda tümör mikroçevresindeki lenfositler; tümörün invazyon sınırında lenfoid agregatların görülmesi şeklinde Crohn benzeri lenfoid reaksiyon (CLR) veya tümör içerisinde ve invazyon sınırında bulunan TIL şeklinde görülebilirler (71).

Bağışıklık hücreleri, immünoterapinin hücrel temellerini oluşturur; bu nedenle tümöre cevap olarak gelişen immün infiltratın anlaşılması immünoterapinin yanıt verme oranlarının iyileştirilmesinde ve immünoterapiye dayalı yeni stratejiler geliştirmede anahtar rol oynar (64).

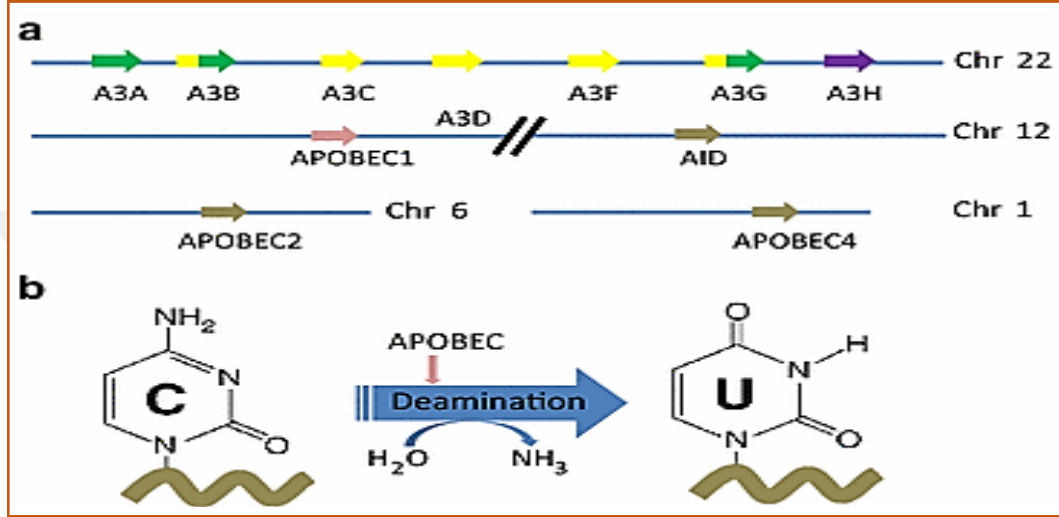
2.5. APOBEC3B (Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 3B)

APOBEC ailesi, birer sitidin deaminaz olup en çok endojen mutasyon kaynaklarından birisidir (72). Kanser Genom Atlası (TCGA) tüm-ekzon sekans verilerini kullanarak yapılan çalışmalarda; APOBEC ile ilişkili, tek baz değişimi (single base substitution; SBS) 2 ve 13 dahil olmak üzere, mutasyonel imzalar birçok kanser türünde yaygın olarak izlenmiştir (Şekil 13). İnsanlardaki APOBEC ailesinin 11 üyesi bulunmaktadır; AID (activation-induced deaminase), APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D (APOBEC3DE), APOBEC3F, APOBEC3G, APOBEC3H ve APOBEC4. Hem fonksiyon hem de dokuya özgü ekspresyon açısından APOBEC proteinlerinin her biri büyük ölçüde değişiklik gösterir (73).



Şekil 13. 1.001 İnsan Kanser Hücre Hattında Mutasyon İmzaları. Uluslararası Kanser Genomu Konsorsiyumu (ICGC) ve Tüm Genomun Pan-Kanser Analizi (PCAWG) projesi (74).

APOBEC ailesi enzimleri hem RNA'ya hem de tek sarmallı (ss) DNA'ya bağlanma yeteneğine sahiptirler ve sitozin bazlarının deaminasyonunu katalizlerler; böylece sitozin (C) bazları urasile (U) dönüşür (Şekil 14). Tamir mekanizmaları genellikle burada hata yaparlar ve urasil bazını kaldırıp yerine guanin (G) veya timin (T), daha az sıklıkla da adenin (A) bazını koyarlar. Sonuç olarak DNA ve RNA'da mutasyona yol açabilirler (75).



Şekil 14. a- APOBEC ailesinin 11 üyesini kodlayan genlerin lokalizasyonu, b- sitozin bazının APOBEC aracılı deaminasyonu sonucu urasile dönüşmesi (76)

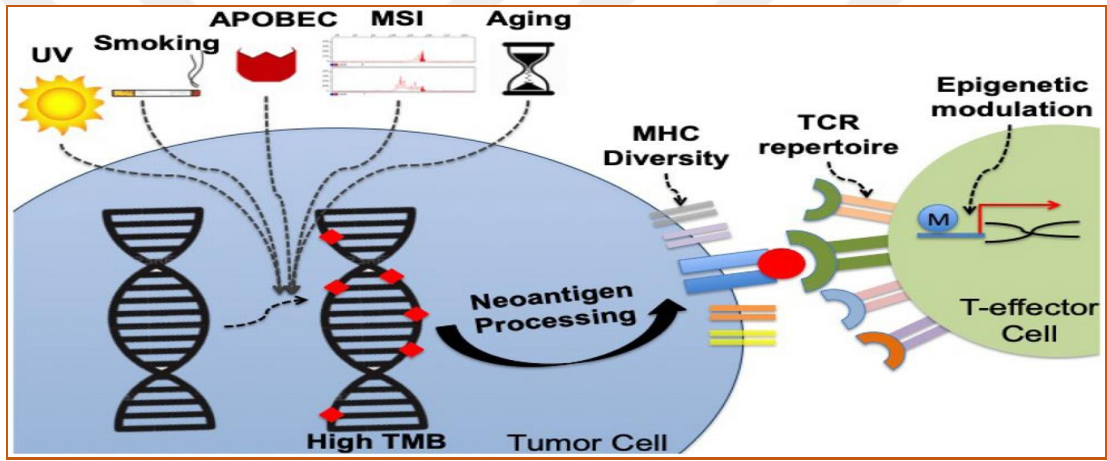
APOBEC enzimleri TpCpW (W: adenin veya timin) motiflerine yüksek spesifite gösterirler; bu nedenle genom boyu etkileri araştırılırken bu motifler kullanılmıştır. Yaşlanmaya bağlı olarak da C→T mutasyonları görülebilir; ancak bu durumda CpG dinükleotid motifleri kullanılır (72).

Geniş çaplı tümör sekans verileri analiz edildiğinde APOBEC'lerin DNA zincir spesifik sitozin mutasyonlarının genomda belirli bölgelerde kümелendiği gözlenmiştir ve bunlara "kataegis" (bir tür lokalize hipermutasyon) adı verilmiştir. Kataegis adı verilen bu fenomen birçok kanser türü için tanımlanmış olup APOBEC kaynaklı mutagenез sonucu olduğuna inanılmaktadır (77).

APOBEC ailesi üyelerinden APOBEC3A (A3A) ve APOBEC3B (A3B) kanser patogeneğinde en sık sorumlu tutulan iki alt gruptur. Bunların dahil olduğu APOBEC3 (A3) ailesinin toplam 7 farklı formu (A3A, A3B, A3C, A3DE, A3F, A3G, A3H) vardır

ve 22. kromozomun uzun kolunda kümelenmişlerdir. Sadece A3B kararlı olarak nükleer lokalizasyon gösterirken, diğerleri hem sitoplazmada hem de hücre çekirdeğinde tespit edilmiştir (76,78). 2002 yılında A3G'nin insan immün yetmezlik virüs (HIV) enfeksiyonunu sınırlayıcı etkisinin keşfi ile bu protein grubu dikkatleri üzerine çekmiştir (79).

A3B mutagenezi kanserlerin yarısından fazlasında izlenmiş olup meme, baş/boyun, akciğer, mesane ve serviks kanserleri bilinen en yüksek A3B ilişkili mutasyon yüküne sahip olanlardır. A3B ilişkili hipermutasyon sonucu tümörlerde heterojenitenin arttığı ve tümör spesifik antijenitenin arttığı görülmüştür. Bu neoantijenlere yanıt sonucu, A3B ilişkili tümörlerde immün upregülasyon dikkati çekmektedir (Şekil 15) (63,80,81).



Şekil 15. Yüksek TMB sonucu artmış neoantijen üretimi ilişkili çevresel ve konağa ait faktörler (63)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Olgu Grubunun Tanımlanması

Çalışmamıza T. C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Kayseri Tıp Fakültesi, Kayseri Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Kliniği'nde 2019-2023 yılları arasında cerrahi rezeksiyon materyalinde KRK tanısı almış, preparatları ve blokları Kayseri Şehir Hastanesi Patoloji Laboratuvar arşivinde bulunan, neoadjuvan tedavi almamış vakalar arasından retrospektif ve random olarak seçilen 250 adet hasta dahil edildi. Endoskopik biyopsi materyalleri, lenfoma ve mezenkimal tümör tanısı olanlar ve neoadjuvan tedavi almış vakalar çalışma dışı bırakıldı.

Ayrıca kontrol grubu olarak herhangi bir tümör infiltrasyonu olmayan, iskemi veya volvulus nedeniyle opere olmuş hastalara ait rezeksiyon materyallerinin preparatlarında yapılan değerlendirme sonucu normal veya normale en yakın histolojik sınırlarda olduğu kabul edilen 50 adet hastaya ait bloklar kullanıldı.

3.2. Klinik Verilerin Toplanması ve Histomorfolojik Değerlendirme

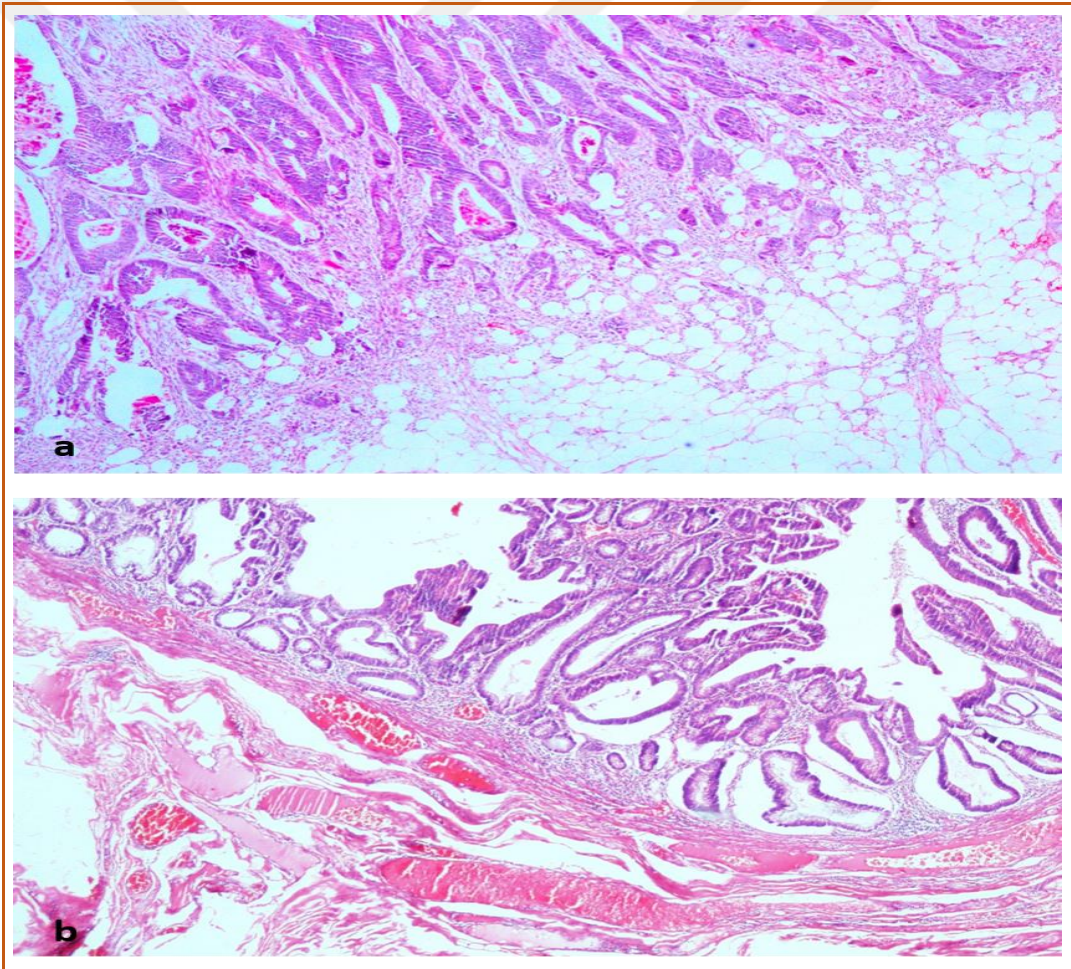
Olgulara ait klinik bilgilere erişimde Hastane Bilgi Yönetim Sistemi (Keydata Bilişim Teknolojileri) ve Tıbbi Onkoloji Kliniği dosya arşivinden yararlanıldı. Cinsiyet, yaş gibi demografik bilgilere; tanı tarihi, nüks durumu ve tarihi, metastaz durumu ve tarihi, ölüm tarihi gibi hastanın prognostik seyri ile ilgili bilgilere ulaşıldı.

%10'luk tamponlu formalin solüsyonu ile fiksasyonu sonrası standart makroskopik örnekleme ve rutin doku takip protokolleri ile hazırlanmış Hematoksilen&Eozin (H&E) boyalı arşiv preparatları ışık mikroskobu ile yeniden incelendi. İncelemeler bir uzman, bir asistandan oluşan iki araştırmacı tarafından yapılmış olup Nikon Eclipse® mikroskobu kullanıldı.

H&E camları güncel WHO (World Health Organization) ve AJCC kriterleri kullanılarak; histopatolojik subtip, müsinöz diferansiyasyon, histolojik diferansiyasyon derecesi (grade), lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, tümör invazyon derinliği (T), rejyonel lenf nodu metastazı (N) açısından değerlendirildi. Elde edilen veriler ile hastaların TNM evreleri belirlendi (49,56).

Ayrıca her vaka için tümör sınır konfigürasyonu değerlendirmesi yapıldı. Histopatolojik slayta çıplak gözle bakıldığında tümör-tümör dışı alan ayırımı

yapılamayan, küçük büyütmede anatomik yapıları diseke ederek ilerleyen ve desmoplastik stromal yanıt olmayan veya hafif olan, keskin sınırlı veya düzensiz şekilli uzamış, gerilmiş görünümde tümör alanları içeren, mezenterik yağ dokuyu infiltrate eden küçük gland ya da düzensiz şekilli tümör hücre grupları bulunduran, perinöral invazyon gösteren, yüksek gradeli tümör tomurcuklanması gösterebilen tümörler infiltratif (Şekil 16-a) olarak kabul edilirken; histopatolojik slayta çıplak gözle bakıldığında tümörün tümör dışı alandan belirgin bir şekilde ayrıldığı, desmoplastik yanıt ile sınırlı görünümde, düşük gradeli tümör tomurcuklanması gösteren tümörler pushing (ekspansil) (Şekil 16-b) olarak kabul edildi (82,83). Histopatolojik özelliklerin değerlendirme kriterleri Tablo 2’de belirtilmiştir.



Şekil 16. Tümör sınır konfigürasyonu (HE x40). a- İnfiltratif sınır. b- Pushing sınır

Tablo 2: Değerlendirilen histopatolojik parametreler ve değerlendirme kriterleri

Histolojik subtip	Adenokarsinom, NOS Diğer subtipler
Müsinöz diferansiyasyon	Var Yok
Derece (Grade)	Düşük Yüksek
Lenfovasküler invazyon	Var Yok
Perinöral invazyon	Var Yok
Tümör sınır konfigürasyonu	Ekspansil (pushing) İnfiltratif
T-Tümör invazyonu	Tis-Lamina propria T1-Submukoza T2-Muskularis propria T3-Subseroza T4a-Viseral periton perforasyonu T4b-Komşu organa/yapılara direkt invazyon
N-Rejyonel lenf nodu metastazı	N0: lenf nodu metastazı yok N1: 1-3 lenf nodu metastazı veya tümör depozitleri N2: 4 veya daha fazla lenf nodu metastazı
M-Uzak organ metastazı	M0: Yok M1: Var
TNM-Evre	Evre 0 Evre 1 Evre 2 Evre 3 Evre 4

Hastalara ait patoloji raporlarından tümör lokalizasyonu ve tümör çapı bilgileri edinildi. Tümör lokalizasyonu; çekum, çıkan kolon ve transvers kolonda ise sağ kolon; inen kolon, sigmoid kolonda ise sol kolon ve rektum yerleşimli olacak şekilde üç gruba ayrıldı (84). Tümör çapı değerlendirilirken 4 cm cut-off olarak kabul edildi (85).

3.3. Mikrosatellit İnstabilite Değerlendirmesi

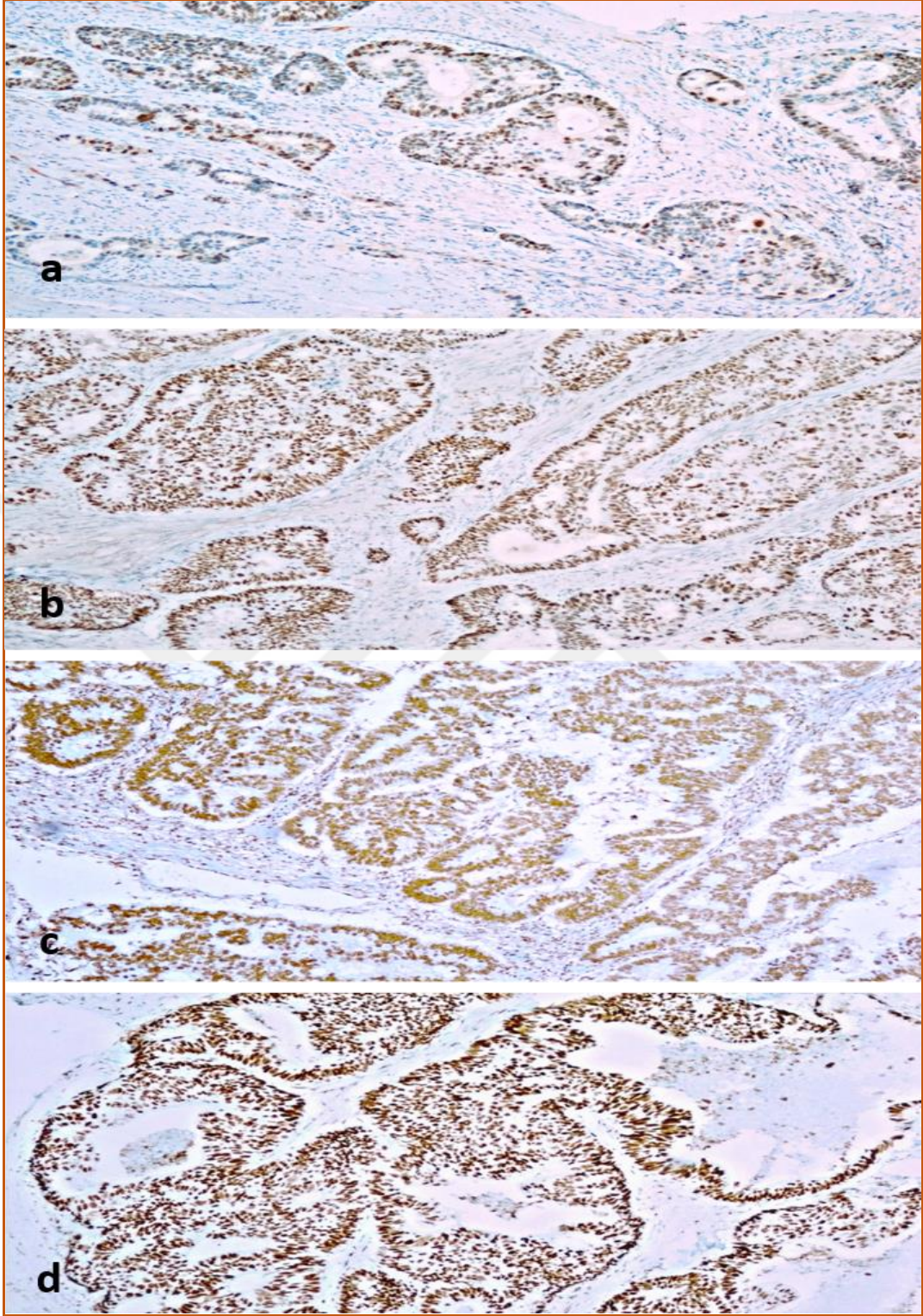
Çalışmaya dahil edilen vakaların tamamında kolorektal rezeksiyonun rutin değerlendirilmesi esnasında MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 protein ekspresyonları immünohistokimya yöntemiyle bakılmıştır. Pozitif internal kontrol olarak çevredeki non-tümöral mukoza ve lenfositler, eksternal kontrol olarak normal kolon dokusu kullanılmıştır. Kullanılan antikorlara ait bilgiler Tablo 3 özetlenmiştir.

Tablo 3. İmmünohistokimyasal MSI paneli

Antikor	Klon	Dilüsyon	Tedarikçi
MLH1 monoklonal antikor*	G168-728	Kullanıma hazır	Dako
PMS2 monoklonal antikor*	EP51	Kullanıma hazır	Dako
MSH2 monoklonal antikor*	FE11	1/100	Vitro, Master Diagnostica
MSH6 monoklonal antikor*	EP49	Kullanıma hazır	BioSB

* Ventana BenchMark Ultra otomatik boyama cihazında çalışılmıştır.

Vakalara ait MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 immünohistokimyasal boyalı arşiv preparatları (Şekil 17-a, b, c, d) ışık mikroskobu ile bir uzman, bir asistandan oluşan iki patolog tarafından yeniden değerlendirildi. Değerlendirme tüm kesit alanı incelenerek, nekroz ve artefaktik alanlar değerlendirme dışında bırakılarak ve özellikle internal kontrol alanlarının boyanmış olmasına dikkat edilerek yapıldı. MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 proteinlerinden herhangi biri ile total ekspresyon kaybı MSI olarak, fokal de olsa ikna edici bir nükleer ekspresyonun olması ise MSS olarak değerlendirildi (49,86).



Şekil 17. MMR proteinlerinin immünohistokimya yöntemiyle değerlendirilmesi (x100).
a- MLH1 ile ekspresyon kaybı yok. b- PMS2 ile ekspresyon kaybı yok. c-
MSH2 ile ekspresyon kaybı yok. d- MSH6 ile ekspresyon kaybı yok.

3.4. APOBEC3B İmmünohistokimyasal Boyaması ve Değerlendirilmesi

H&E boyalı arşiv preparatlarından ‘tümör kayıtlı’ olanlar ışık mikroskobu ile incelenerek APOBEC3B immünohistokimyasal boyaması için kanama ve nekroz alanlarının az olduğu tümör doğasını en iyi yansıtan, farklı tümör paternlerinin de izlendiği bloklar belirlendi.

3.4.1. APOBEC3B İmmünohistokimyasal Boyama Basamakları

1- %10'luk tamponlu formalin solüsyonu ile fiksasyonu sonrası standart makroskopik örnekleme yapılmış parafinize dokulardan hazırlanan 4 µm kalınlıktaki kesitler polilizin kaplı lamlara alındı.

2- Lamlar 60°C sıcaklığa sahip etüvde 30 dakika bekletilerek deparafinize edildi.

3- EDTA tamponu ile 95 °C'de 24 dk orta inkübasyon aralığında antijen geri kazanımı yapıldı.

4- Endojen peroksidaz aktivitesi, 903-4'lük hidrojen peroksidaz ile 11 dakika maruziyet sonucu inhibe edildi.

5- Primer antikor olan APOBEC3B (orb500784) tavşan poliklonal antikor (Tablo 4) ile 1/150 dilüsyonda 90 dakika inkübe edildi.

6- Primer antikor takiben 8 dakika sekonder antikor (Horseradish Peroxidase-Conjugated Anti-Mouse Or -Rabbit IgG) ile işleme tabi tutuldu.

7- 10 dakika 3,3-diaminobenzidin (DAB) kromojeni uygulanarak antijen-antikor bağlaması görünür hale getirildi.

8- Arka plan boyama için 16 dakika Harris Hematoksilen uygulandı.

9- Bluing Reagent solüsyonu 4 dakika boyunca uygulandı.

10- Zıt boyama Hematoksilen ve Mavileştirici Solüsyon ile cihazda tamamlandı.

11- Kesitlerin dehidratasyonu, ksilen ile şeffaflandırılması ve lamel kapatılması aşamaları elde yapılarak immünohistokimyasal boyama sonlandırıldı.

Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm immünohistokimyasal boyama basamakları tam otomatik immünohistokimya boyama cihazında (Ventana BenchMark Ultra, Ventana Medical Systems, Tucson, ABD) gerçekleştirildi.

Boyama için cihaza uygun, biyotinsiz, HRP multimer bazlı, hidrojen peroksit substrat ve 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) kromojeni içeren hazır kit

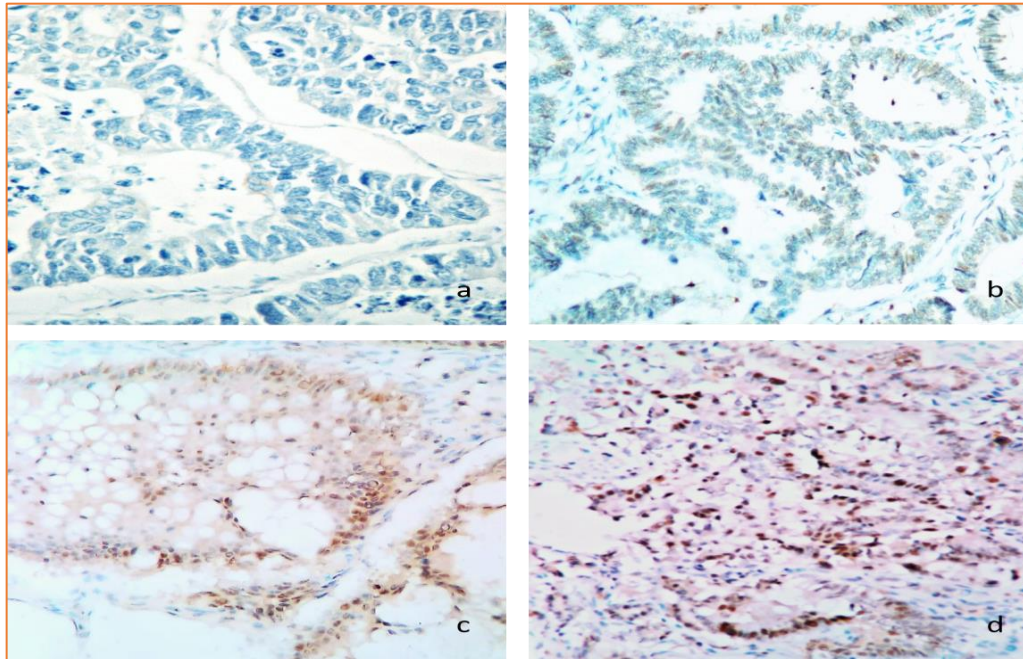
(ultraView™ Universal DAB Detection Kit, Catalog number 760-500, Ventana Medical Systems, Tucson, ABD) kullanıldı.

APOBEC3B orb500784 klonuna ait datasheet’de belirtildiği gibi pozitif kontrol olarak rat dalak ve over dokuları kullanıldı.

Tablo 4. Çalışmamızda kullanılan immünohistokimyasal APOBEC3B antikor

Antikor	Klon	Dilüsyon	Kullanılan kit	Dış kontrol	Tedarikçi
APOBEC3B	orb500784	1/150	Ultraview DAB	Rat-dalak/over	Biorbyt

Çalışma kapsamında APOBEC3B immünohistokimyasal boyaması uygulanan preparatlar biri uzman biri asistan iki patolog tarafından ışık mikroskopu kullanılarak ve vakalara ait diğer verilere ait bilgi sahibi olmadan değerlendirildi. Tümör hücrelerinde nükleer boyanma olması APOBEC3B antikorunun eksprese edildiği yönünde kabul edilirken; tümör hücrelerindeki sitoplazmik boyanma ve lenfositlerdeki boyanma alanları değerlendirme dışında bırakıldı. APOBEC3B immünohistokimyasal skoru tümör hücrelerinin boyanma yoğunluğu (Şekil 18) ve tümör hücrelerindeki boyanma yüzdesinin çarpımına göre belirlendi (Tablo 5) ve her bir vaka için 0-300 arasında değişen değerler elde edildi. İstatistik analiz sonucu median değer 40 olarak belirlendi. Median değer cut-off kabul edilerek APOBEC3B ekspresyonu düşük ve yüksek olmak üzere iki gruba ayrılarak incelendi (87).



Şekil 18. APOBEC3B immünohistokimyasal boyanma yoğunlukları (x400). a- Negatif. b-Hafif. c- Orta. d- Şiddetli.

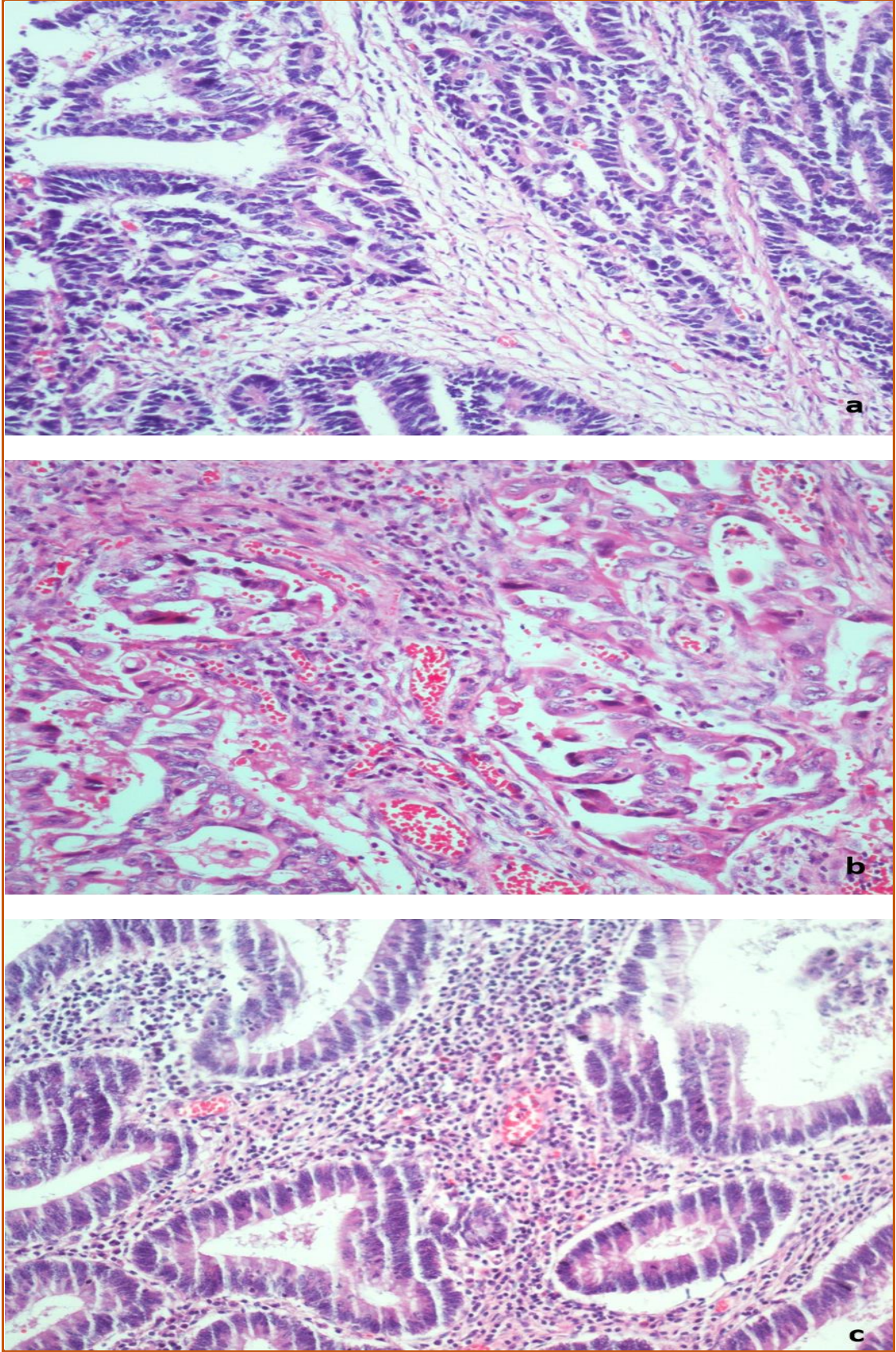
Tablo 5. APOBEC3B immünohistokimyasal boyamasını değerlendirirken kullanılan algoritma

Boyama yoğunluğu	
Negatif	0
Hafif	1
Orta	2
Şiddetli	3
Boyama yüzdesi (%)	
$\text{Nükleer pozitif boyanan tümör hücresi} \times 100 / \text{Toplam tümör hücresi}$	

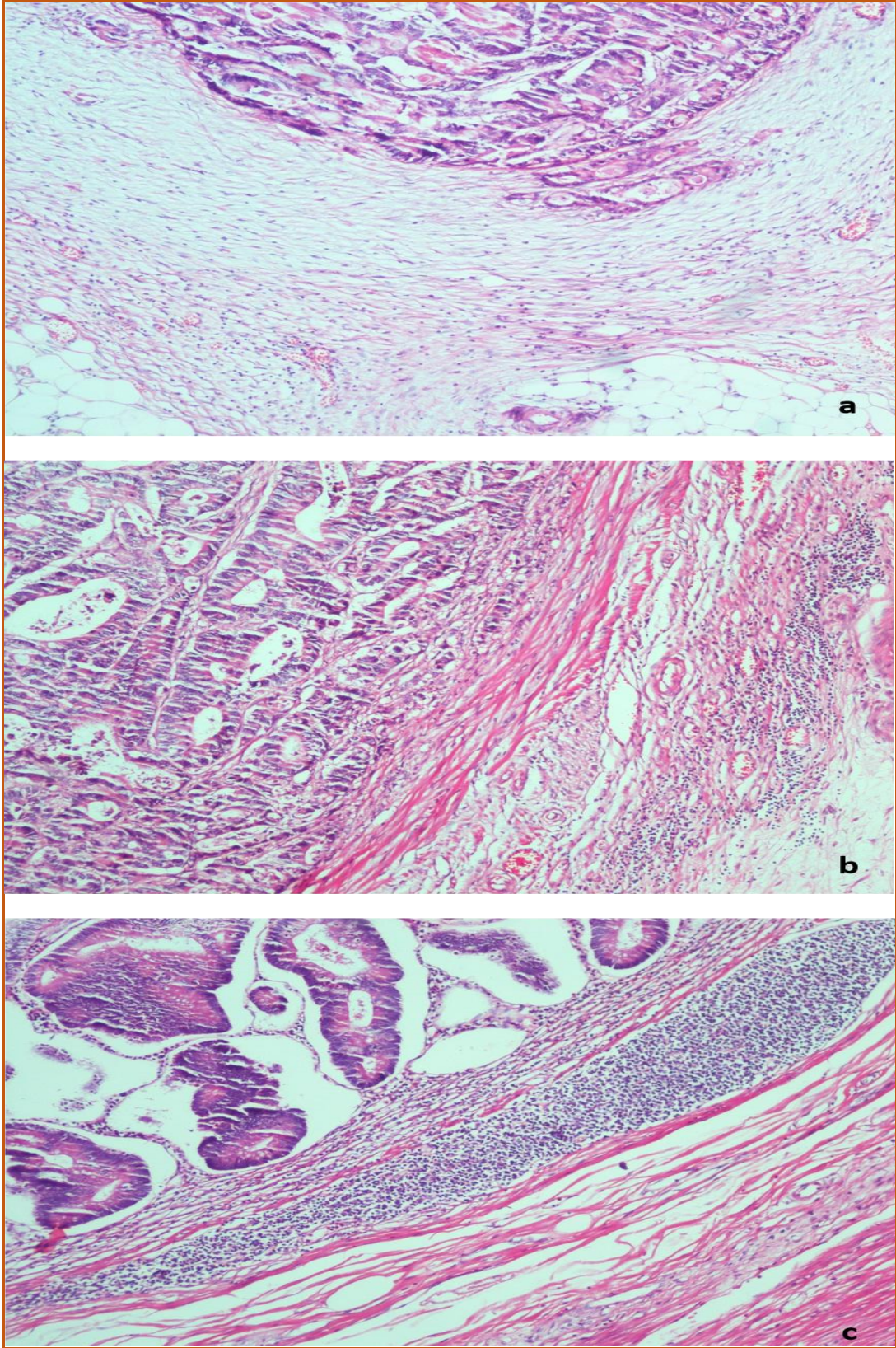
3.5. Tümörü İnfiltrate Eden Lenfosit Değerlendirmesi

TIL değerlendirmesi, H&E boyalı ‘tümör kayıtlı’ arşiv preparatlarından biri uzman biri asistan iki patolog tarafından ışık mikroskobu kullanılarak ve vakalara ait diğer verilere ait bilgi sahibi olmadan gerçekleştirildi. Sadece mononükleer iltihabi hücreler (lenfositler ve plazma hücreleri) değerlendirmeye alındı; polimorfonükleer lökositler, nekroz, ezilme artefaktı ve hyalinizasyon alanları değerlendirme dışı bırakıldı. Ayrıca mitoz veya apoptoz şüphesi uyandıran ve dejenerasyon sebebiyle lenfositten ayırt edilemeyen figürler dahil edilmedi (71,88). TIL değerlendirme alanı olarak tümörün merkezi (‘tumor center’, TC) ve invaziv sınır (‘invasive margin’, IM) olmak üzere iki farklı bölge belirlendi (88–90). TIL-TC, invaziv tümör sınırları içerisindeki stromal alan; TIL-IM ise invaziv tümör adaları ile tümör dışı alan arasındaki 1 mm genişliğe sahip stromal alan olarak kabul edildi (88).

Öncelikle, vakalara ait bütün tümörlü preparatlar küçük büyütme alanında (x40 büyütmede) taranarak TIL’in en yoğun olduğu preparatta en yoğun olduğu bölge değerlendirme için seçildi. Bu bölge tanımlandıktan sonra büyük büyütme alanında (BBA) (x400 büyütmede), ardışık beş alanda TIL yüzdesi (mononükleer hücrelerin işgal ettiği stroma alanı $\times 100$ / toplam stroma alanı) hesaplandı ve bu beş alanın ortalaması alınarak her vaka için ortalama TIL belirlendi (71). Bu değerlendirme hem tümör merkezi (Şekil 19) hem de invaziv sınır (Şekil 20) için ayrı ayrı yapıldı.



Şekil 19. TIL-tümör merkezi (HE x200). a- Düşük. b- Orta. c- Yüksek.

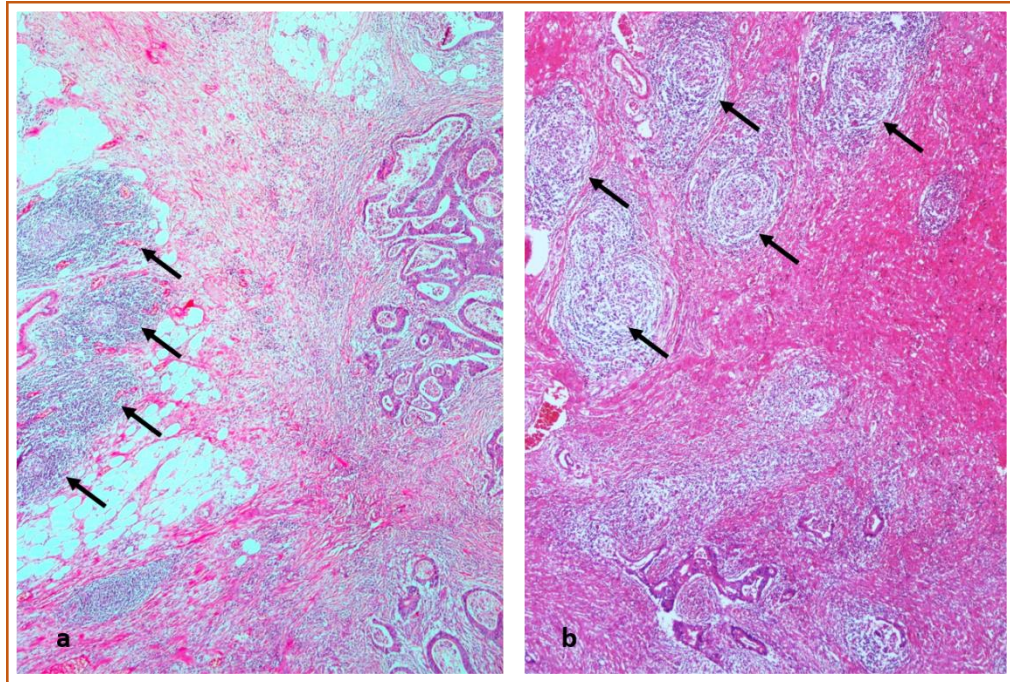


Şekil 20. TIL-invaziv sınır (HE x100). a- Düşük. b- Orta. c- Yüksek.

KRK'da TIL değerlendirilmesiyle ilgili net kriterler tam olarak belirlenmediğinden Uluslararası TIL Çalışma Grubu'nun meme kanserlerinde TIL değerlendirilmesiyle ilgili kriterleri esas alınarak vakaların TIL kategorisi; %0-10 ise düşük, %20-40 ise orta, $\geq$ %50-90 ise yüksek olarak kabul edildi. Lenfositler tipik olarak solid selüler agregatlar oluşturmadıklarından, tek tek lenfositler arasında bir miktar boşluk bulunacağından '%100 stromal TIL' tanımı kullanılmadı (91).

3.6. Crohn Benzeri Lenfoid Reaksiyon Değerlendirmesi

CLR değerlendirmesi, H&E boyalı 'tümör kayıtlı' arşiv preparatlarından biri uzman biri asistan iki patolog tarafından ışık mikroskopu kullanılarak ve vakalara ait diğer verilere ait bilgi sahibi olmadan gerçekleştirildi. İlk olarak Graham and Appelman tarafından tanımlandığı gibi; önceden klinik veya patolojik Crohn Hastalığı kanıtı olmayan KRK'da, bir kısmı germinal merkez içeren, çoğu tümörün invaziv sınırının 1mm veya daha fazla ötesinde olacak şekilde genellikle muskularis propria ve perikolik yağ dokuda lokalize lenfoid agregatlar CLR olarak kabul edildi (Şekil 21). Mukoza tabakası içinde veya muskularis mukozanın hemen altında yerleşim gösteren mukoza ilişkili lenfoid dokular, etrafındaki kapsül benzeri çevresel bağ doku bulunan ve buna dayanarak küçük bir lenf nodunun parçası olduğu düşünülen lenfoid agregatlar, düzensiz şekle sahip non-nodüler görünüme sahip lenfoid agregatlar değerlendirmeye alınmadı (92).



Şekil 21-a,b. Crohn benzeri reaksiyon (HEx40)

Vakalara ait tümörün invazyon sınırlarının temsil edildiği bütün preparatlar küçük büyütmede (x40 büyütmede) tarandı ve her bir kesitte tanımlanan CLR özelliklerine sahip minimum üç lenfoid agregatın bulunması halinde CLR var, geriye kalanlar CLR yok olarak kategorize edildi (71).

3.7. İstatistiksel Analiz

Veriler IBM SPSS V23 programı ile incelendi. Normal dağılıma uygunluk Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov Testi ile incelendi. İkili gruplarda normal dağılıma uymayan verilerin karşılaştırılmasında Mann Whitney U Testi kullanıldı. Kategorik verilerin incelenmesinde Fisher's Exact Testi, Yates Düzeltmesi ve Pearson Ki-Kare Testi kullanıldı ve çoklu karşılaştırmalar Bonferroni Düzeltmesi ile incelendi. A3B skorunun yüksekliğine ve MMI ya etki eden risk faktörlerinin incelenmesinde Binary Lojistik Regresyon Analizi kullanıldı. Ölüme etki eden risk faktörlerinin incelenmesinde Cox Regresyon Analizi kullanıldı. Hastalıksız ve genel sağkalım sürelerinin karşılaştırılmasında Kaplan Meier Analizi kullanıldı. Analiz sonuçları kategorik değişkenler için frekans (yüzde) şeklinde, nicel değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma ve ortanca (minimum – maksimum) şeklinde sunuldu. Önem düzeyi $p<0,05$ olarak alındı.

3.8. Etik Kurul Onayı

Tez konusu 17.01.2023 tarihinde T. C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Kayseri Tıp Fakültesi Dekanlığı tarafından onaylanmıştır (Bkz. EK 1).

Kayseri Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 29. 09. 2022 tarihinde yapılan toplantısında karar no: 709 raporu ile çalışma için etik kurul onayı alınmıştır (Bkz. EK 2).

Tez çalışmasının bütçesi Kayseri Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Döner Sermaye Eğitim Giderleri Bütçesinden/Genel Bütçe Kaynaklarından sağlanmıştır. (TUEK 16.08.2022 tarihli ve 64 nolu kararı) (Bkz. EK 3).

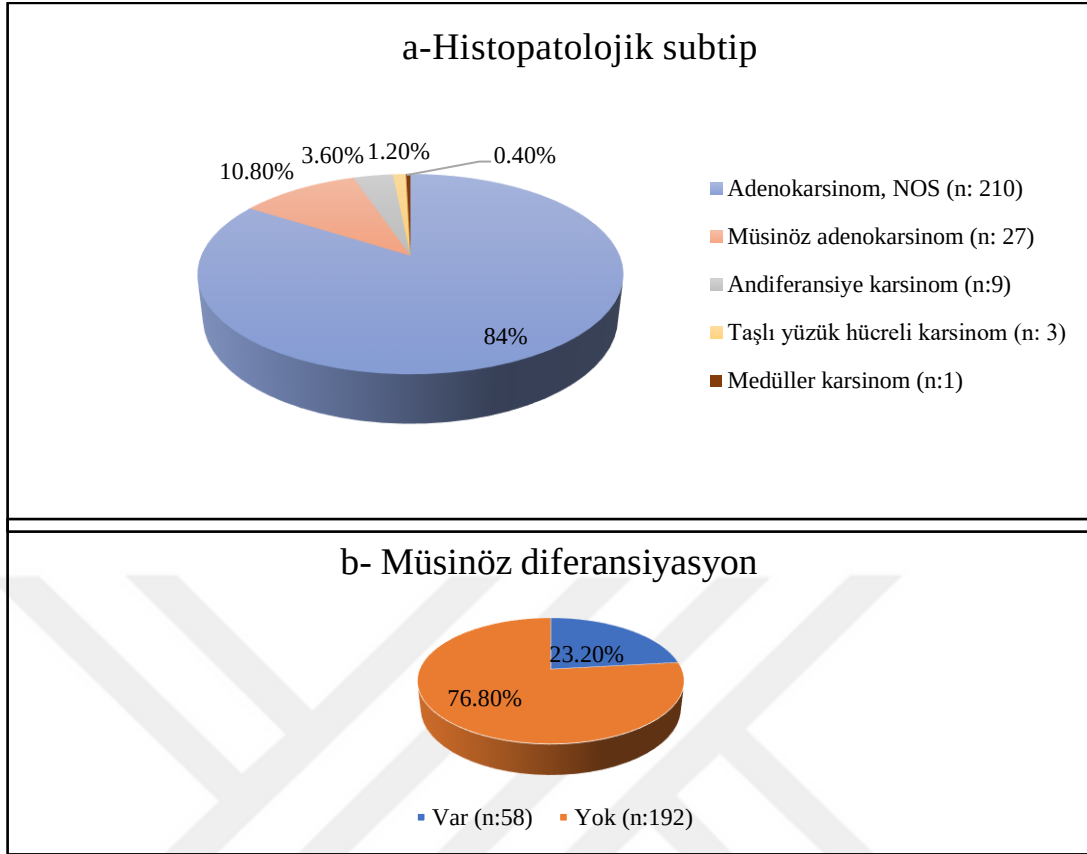
4. BULGULAR

4.1. Klinikopatolojik Özelliklerin Dağılımı

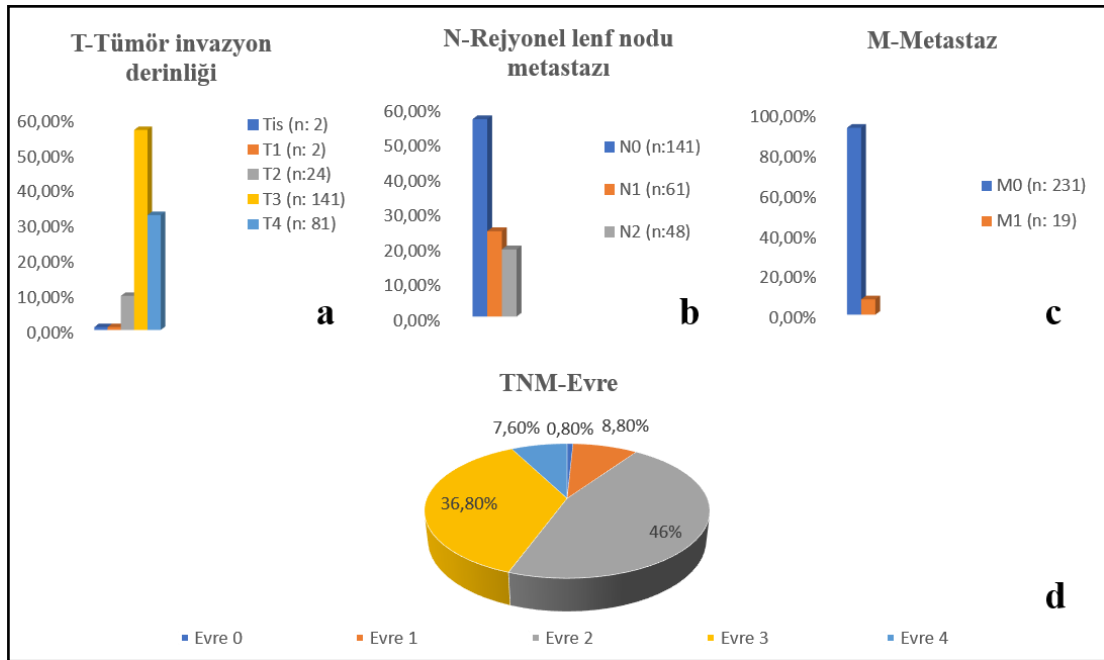
Çalışmaya dahil edilen KRK vakalarının klinikopatolojik özelliklerinin dağılımları sayısal ve yüzde olarak tablo 6, şekil 22 ve şekil 23’de belirtilmiştir.

Tablo 6. Vakaların klinikopatolojik özellikleri

Klinikopatolojik Özellikler	Değerler (%)
Cinsiyet	
Erkek	168 (%67,2)
Kadın	82 (%32,8)
Yaş ortalaması	64,8 (29-90)
Tümör lokalizasyonu	
Rektum	66 (%26,4)
Sağ kolon	68 (%27,2)
Sol kolon	116 (%46,4)
Tümör çapı	
4 cm ve altı	98 (%39,2)
>4 cm	152 (%60,8)
Grade	
Düşük	220 (%88)
Yüksek	30 (%12)
Lenfovasküler invazyon	
Var	148 (%59,2)
Yok	102 (%40,8)
Perinöral invazyon	
Var	122 (%48,8)
Yok	128 (%51,2)
Tümör sınırı	
İnfiltratif	225 (%90)
İtici (pushing)	25 (%10)



Şekil 22. a-Histopatolojik subtip dağılımı, b- Müsinöz diferansiyasyon gösteren ve göstermeyenlerin dağılımı



Şekil 23. a,b,c- Olguların evreleme kriterlerine (T, N, M) göre dağılımlar. d-Olguların evrelerine (TNM) göre dağılımları.

4.2. İmmün Yanıt Parametrelerinin Sağkalıma Etkisi

Model univariate olarak incelendiğinde; TIL % tümör merkezi değerinin artmasının rekürrens riski üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu ve hastalıksız sağkalım süresini uzattığı görülmüştür (HR=0,982; p=0,004). Diğer değişkenler rekürrens üzerinde risk faktörü bulunmamıştır (p>0,050). Model multiple olarak incelendiğinde; TIL % tümör merkezi değerinin artmasının rekürrens riski üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu görülmüştür (HR=0,980; p=0,009). Diğer değişkenler rekürrens üzerinde risk faktörü bulunmamıştır (p>0,050) (Tablo 7).

Model univariate olarak incelendiğinde; TIL % tümör merkezi değerinin artmasının ölüm riski üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu, genel sağkalım süresini uzattığı görülmüştür (HR=0,982; p=0,006). Diğer değişkenler ölüm üzerinde risk faktörü bulunmamıştır (p>0,050). Model multiple olarak incelendiğinde; TIL % tümör merkezi değerinin artmasının ölüm riski üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu görülmüştür (HR=0,981; p=0,011). Diğer değişkenler ölüm üzerinde risk faktörü bulunmamıştır (p>0,050) (Tablo 8).

Tablo 7. Hastalıksız sağkalım süreleri için Cox Regresyon Analizi sonuçları

	Univariate		Multiple	
	HR (%95 CI)	p	HR (%95 CI)	p
TIL %-tümör merkezi	0,982 (0,969 - 0,994)	0,004	0,980 (0,966 - 0,995)	0,009
TIL %-invaziv sınır	0,993 (0,98 - 1,006)	0,307	1,007 (0,992 - 1,023)	0,356
Crohn benzeri reaksiyon				
Var	0,374 (0,135 - 1,034)	0,058	0,426 (0,151 - 1,199)	0,106
Yok		Referans		

Tablo 8. Genel sağkalım süreleri için Cox Regresyon Analizi sonuçları

	Univariate		Multiple	
	HR (%95 CI)	p	HR (%95 CI)	p
TIL %-tümör merkezi	0,982 (0,97 - 0,995)	0,006	0,981 (0,966 - 0,996)	0,011
TIL %-invaziv sınır	0,994 (0,98 - 1,007)	0,352	1,007 (0,992 - 1,023)	0,346
Crohn benzeri reaksiyon				
Var	0,381 (0,138 - 1,052)	0,062	0,432 (0,153 - 1,215)	0,112
Yok		Referans		

4.3. APOBEC3B Ekspresyonu ve Sağkalım

Gruplara göre APOBEC3B İHK skorunun ortanca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,001$). Kontrol grubunda APOBEC3B İHK skorunun ortanca değeri 0 iken Deney grubunda bu değer 40 olarak elde edilmiştir (Tablo 9).

Tablo 9. Gruplara göre APOBEC3B İHK skorunun karşılaştırılması

	Grup		Test İstatistiği	p*
	Kontrol	Deney		
APOBEC3B İHK skoru	29,3 ± 50,29 0 (0 - 240)	65,06 ± 74,52 40 (0 - 270)	8364,5	<0,001

*Mann Whitney U Testi

Gruplara göre APOBEC3B İHK kategorilerinin dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,004$). Kontrol grubunda APOBEC3B İHK düşük olanların oranı %76 iken, deney grubunda bu oran %52,8'dir. Kontrol grubunda APOBEC3B İHK yüksek olanların oranı %24 iken, deney grubunda bu oran %47,2'dir (Tablo 10).

Tablo 10. Gruplara göre APOBEC3B İHK kategorilerinin dağılımları

	Grup		Test İstatistiği	p*
	Kontrol	Deney		
APOBEC3B İHK kategori				
Düşük	38 (76)	132 (52,8)	8,213	0,004
Yüksek	12 (24)	118 (47,2)		

*Yates Düzeltmesi

APOBEC3B İHK skorunun yüksekliğine etki eden risk faktörleri Binary Lojistik Regresyon Analizi ile incelenmiştir ve bağımsız değişkenlerin modele dahil edilmesinde Enter metodu kullanılmıştır. Model univariate olarak incelendiğinde; tümör lokalizasyonu sol kolon olanların A3B İHK skorunun yüksek olma riskinin rektum olanlara göre 1,875 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,047$). Tablo 9'de belirtilen diğer değişkenler A3B İHK skoru üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,050$). Model multiple olarak incelendiğinde; değişkenler A3B İHK skoru üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,050$) (Tablo 11).

Tablo 11. APOBEC3B İHK skoru ve klinikopatolojik parametrelerin Lojistik Regresyon Analizi ile incelenmesi

	APOBEC3B İHK Skoru		Univariate		Multiple	
	Düşük	Yüksek	OR (%95 CI)	P	OR (%95 CI)	P
Cinsiyet						
Erkek	94 (56)	74 (44)		Referans		
Kadın	38 (46,3)	44 (53,7)	1,471 (0,866 - 2,5)	0,154	1,392 (0,801 - 2,421)	0,241
Yaş	64,07 ± 12,55	65,71 ± 12,33	1,011 (0,991 - 1,031)	0,297	1,013 (0,992 - 1,035)	0,223
Tümör lokalizasyonu						
Rektum	42 (63,6)	24 (36,4)		Referans		
Sağ kolon	34 (50)	34 (50)	1,75 (0,877 - 3,493)	0,112	1,7 (0,821 - 3,52)	0,153
Sol kolon	56 (48,3)	60 (51,7)	1,875 (1,009 - 3,485)	0,047	1,802 (0,947 - 3,427)	0,073
Histopatolojik subtip						
Adenokarsinom, NOS	111 (52,9)	99 (47,1)		Referans		
Diğer subtipler	21 (52,5)	19 (47,5)	1,014 (0,515 - 1,997)	0,967	1,207 (0,499 - 2,921)	0,676
Müsinöz diferansiyasyon						
Var	32 (55,2)	26 (44,8)		Referans		
Yok	100 (52,1)	92 (47,9)	1,132 (0,628 - 2,042)	0,680	1,213 (0,577 - 2,546)	0,611
Tümör çapı						
4 cm ve altı	57 (58,2)	41 (41,8)		Referans		
>4 cm	75 (49,3)	77 (50,7)	0,701 (0,42 - 1,169)	0,173	1,387 (0,813 - 2,367)	0,231
Grade						
Düşük	114 (51,8)	106 (48,2)		Referans		
Yüksek	18 (60)	12 (40)	0,717 (0,33 - 1,559)	0,401	0,661 (0,264 - 1,654)	0,376
Lenfovasküler invazyon						
Var	80 (54,1)	68 (45,9)	0,884 (0,533 - 1,465)	0,632	0,865 (0,462 - 1,619)	0,649
Yok	52 (51)	50 (49)		Referans		
Perinöral invazyon						
Var	68 (55,7)	54 (44,3)	0,794 (0,483 - 1,306)	0,364	0,826 (0,458 - 1,49)	0,526
Yok	64 (50)	64 (50)		Referans		
Tümör sınırı						
İnfiltratif	118 (52,4)	107 (47,6)	1,154 (0,502 - 2,652)	0,736	1,115 (0,458 - 2,716)	0,810
Pushing	14 (56)	11 (44)		Referans		

Cox & Snell R²= %4,3, Nagelkerke R²=%5,7

Tablo 11. APOBEC3B İHK skoru ve klinikopatolojik parametrelerin Lojistik Regresyon Analizi ile incelenmesi (devamı)

	APOBEC3B İHK Skoru		Univariate		Multiple	
	Düşük	Yüksek	OR (%95 CI)	P	OR (%95 CI)	P
Primer tümör invazyonu (T)						
Tis	0 (0)	2 (100)	---	---	---	---
T2	12 (50)	12 (50)	---	---	---	---
T1	2 (100)	0 (0)	---	---	---	---
T3	78 (55,3)	63 (44,7)	---	---	---	---
T4a	32 (47,8)	35 (52,2)	---	---	---	---
T4b	8 (57,1)	6 (42,9)	---	---	---	---
N-Rejyonel lenf nodu metastazı						
N0	74 (52,5)	67 (47,5)		Referans		
N1	33 (54,1)	28 (45,9)	0,937 (0,513 - 1,712)	0,833	1,124 (0,555 - 2,278)	0,746
N2	25 (52,1)	23 (47,9)	1,016 (0,527 - 1,958)	0,962	1,374 (0,615 - 3,069)	0,439
Uzak organ metastazı (M)						
M0	122 (52,8)	109 (47,2)		Referans		
M1	10 (52,6)	9 (47,4)	1,007 (0,395 - 2,571)	0,988	0,966 (0,353 - 2,64)	0,946
Evre (TNM)						
Evre 0	0 (0)	2 (100)	---	---	---	---
Evre 1	10 (45,5)	12 (54,5)	---	---	---	---
Evre 2	63 (54,8)	52 (45,2)	---	---	---	---
Evre 3	49 (53,3)	43 (46,7)	---	---	---	---
Evre 4	10 (52,6)	9 (47,4)	---	---	---	---

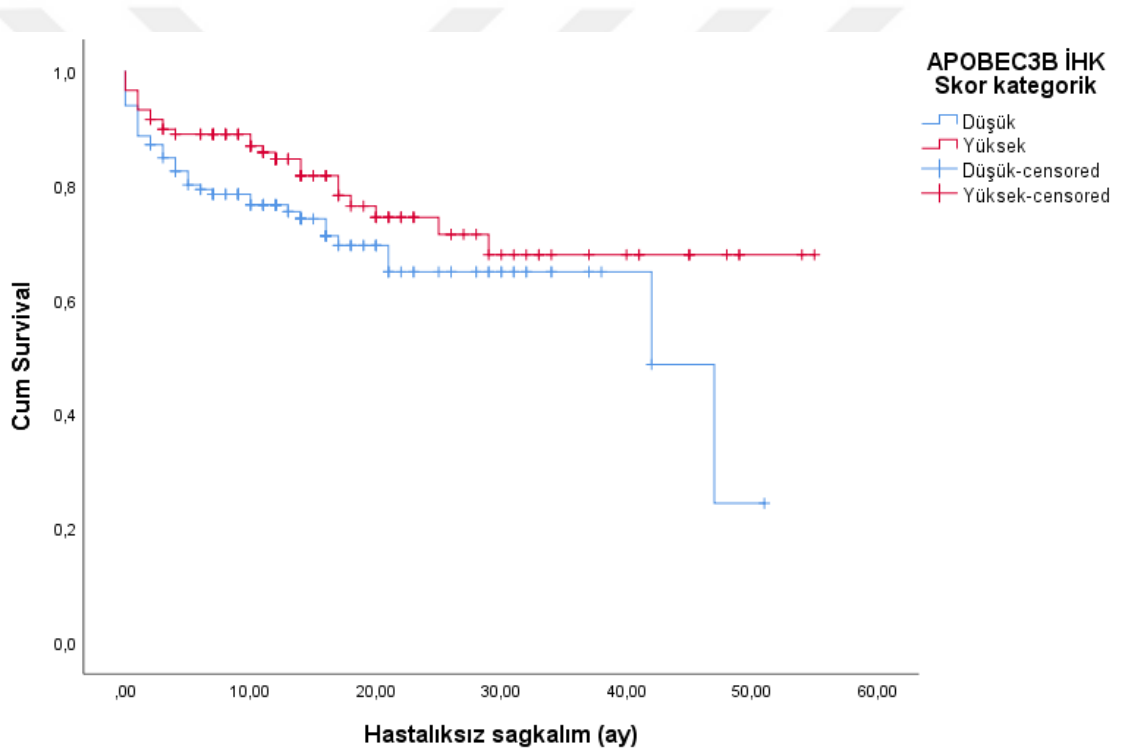
Cox & Snell R²= %4,3, Nagelkerke R²=%5,7

APOBEC3B İHK skorlarına göre hastalıksız sağkalım sürelerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,080$) (Tablo 12 ve Şekil 24).

Tablo 12. APOBEC3B İHK skorunun hastalıksız sağkalıma etkisi

	Mean (%95 CI)	p*
APOBEC3B İHK Skoru		
Düşük	33,357 (28,88 - 37,834)	0,080
Yüksek	41,441 (36,716 - 46,165)	
Overall	38,398 (34,796 - 42)	

*LogRank Test



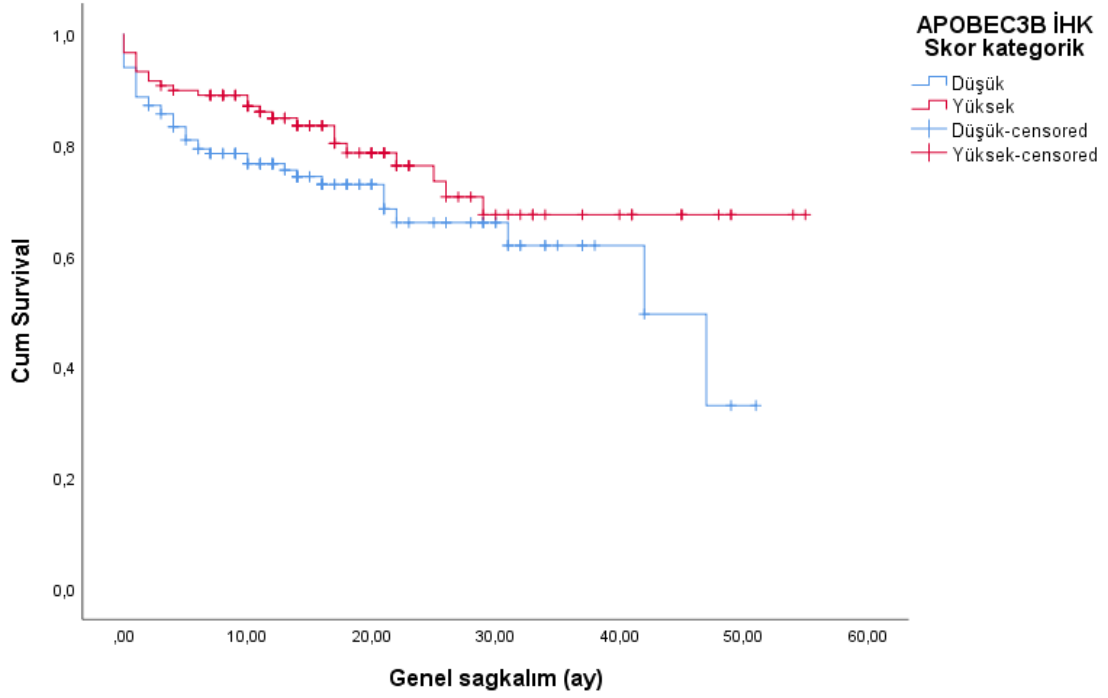
Şekil 24. APOBEC3B İHK skorlarına göre hastalıksız sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi)

APOBEC3B İHK skorlarına göre genel sağkalım sürelerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,076$) (Tablo 13 ve Şekil 25).

Tablo 13. APOBEC3B İHK skorunun genel sağkalıma etkisi

	Mean (%95 CI)	p*
APOBEC3B İHK Skoru		
Düşük	33,745 (29,313 - 38,176)	0,076
Yüksek	41,616 (36,962 - 46,27)	
Overall	38,529 (34,998 - 42,059)	

*LogRank Test

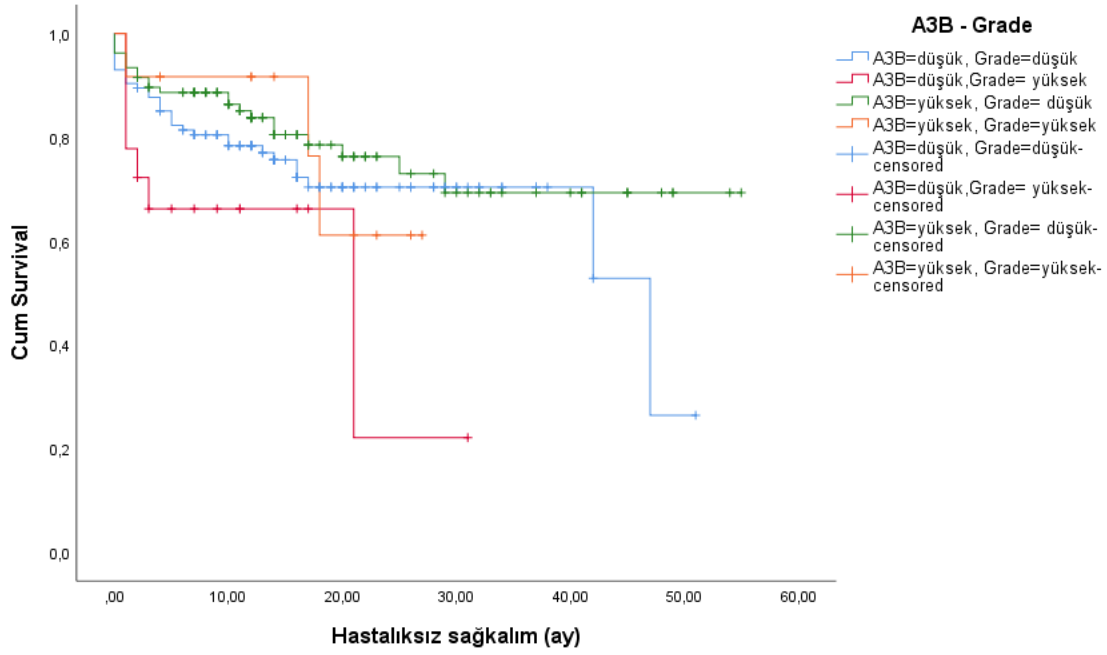
**Şekil 25.** APOBEC3B İHK skorlarına göre genel sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi)

A3B kategorileri ve Grade kategorilerine göre hastalıksız sağkalım süreleri ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,050$) (Tablo 14 ve Şekil 26).

Tablo 14. A3B kategorileri ve Grade kategorilerine göre hastalıksız sağkalım sürelerinin karşılaştırılması

	Mean (%95 CI)	p*
A3B ve Grade		
A3B düşük, Grade düşük	35,149 (30,572 - 39,726)	0,050
A3B düşük, Grade yüksek	16,623 (10,474 - 22,773)	
APOBEC3B yüksek, Grade düşük	41,937 (37,053 - 46,82)	
APOBEC3B yüksek, Grade yüksek	21,931 (17,074 - 26,787)	
Overall	38,398 (34,796 - 42)	

*LogRank Test



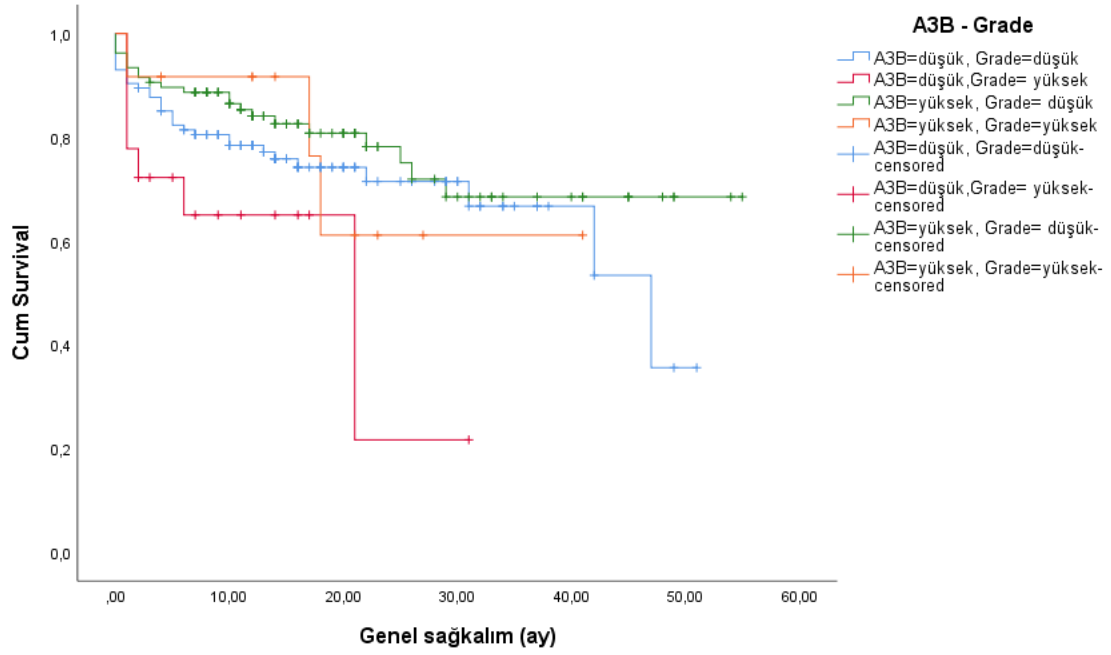
Şekil 26. A3B ve Grade kategorilerine göre hastaliksız sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi)

A3B kategorileri ve Grade kategorilerine göre genel sağkalım süreleri ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0,039$). A3B düşük ve grade düşük olanlarda genel sağkalım süresi ortalama değeri 35,46, A3B düşük ve grade yüksek olanlarda 16,583 A3B yüksek ve grade düşük olanlarda 42,035 ve A3B yüksek grade yüksek olanlarda bu değer 30,486 olarak elde edilmiştir. Burada A3B düşük, grade yüksek olanlarda genel sağkalım süresi A3B düşük, grade düşük olanlardan ve A3B yüksek, grade düşük olanlardan daha kısa olup, istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir (Tablo 15 ve Şekil 27).

Tablo 15. A3B kategorileri ve Grade kategorilerine göre genel sağkalım sürelerinin karşılaştırılması

	Mean (%95 CI)	p*
A3B ve Grade		
A3B düşük, Grade düşük	35,46 ^a (30,894 - 40,025)	0,039
A3B düşük, Grade yüksek	16,583 ^b (10,458 - 22,709)	
A3B yüksek, Grade düşük	42,035 ^a (37,19 - 46,88)	
A3B yüksek, Grade yüksek	30,486 ^{ab} (20,927 - 40,045)	
Overall	38,529 (34,998 - 42,059)	

*LogRank Test; a-b: Aynı harfe sahip kategoriler arasında bir fark yoktur.



Şekil 27. A3B ve Grade kategorilerine göre genel sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi)

4.4. APOBEC3B Ekspresyonunun İmmün Yanıt ile İlişkisi ve Sağkalım

A3B İHK skorlarının kategorilerine göre TIL %-tümör merkezi ortanca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0,001$). A3B skoru düşük olanların ortanca değeri 30 iken yüksek olanlarda bu değer 40 olarak elde edilmiştir. A3B İHK skorlarının kategorilerine göre TIL %-invaziv sınır ortanca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0,015$). A3B skoru düşük olanların ortanca değeri 20 iken yüksek olanlarda bu değer 20 olarak elde edilmiştir. Burada farklılık sıra ortalamalarından kaynaklanmaktadır. A3B skoru düşük olanlarda sıra ortalaması değeri 115,05 iken yüksek olanlarda bu değer 137,19 olarak elde edilmiştir (Tablo 16).

A3B skoru kategorileri ile CLR varlığı arasındaki bağlantı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,364$) (Tablo 17).

Tablo 16. A3B skoruna göre TIL değerlerinin karşılaştırılması

APOBEC3B İHK Skor kategorik						
	Düşük		Yüksek			
	Ortalama ± ss	Ortanca (min-mak)	Ortalama ± ss	Ortanca (min-mak)	Test İst.	p*
TIL %-tümör merkezi	27,58 ± 20,48	30 (1 - 90)	39,03 ± 22,1	40 (1 - 90)	5390,5	<0,001
TIL %-invaziv sınır	22,95 ± 19,72	20 (1 - 90)	28,18 ± 20,72	20 (1 - 90)	6408	0,015

Tablo 17. A3B skoru kategorilerine göre CLR varlığının dağılımları

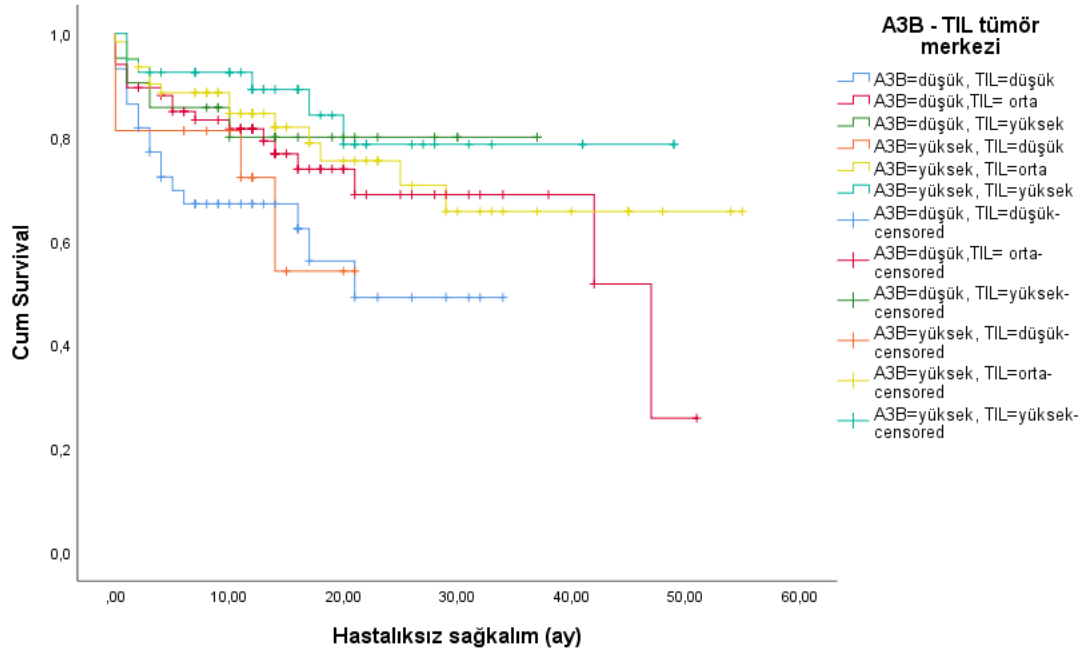
APOBEC3B İHK Skoru			Test İst.	p*
	Düşük	Yüksek		
Crohn benzeri reaksiyon				
Var	14 (10,6)	18 (15,3)	0,826	0,364
Yok	118 (89,4)	100 (84,7)		

A3B ve TIL-tümör merkezi kategorilerine göre hastalıksız sağkalım sürelerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p=0,038). A3B düşük ve TIL düşük olanlarda hastalıksız sağkalım süresi ortalama değeri 20,774, A3B düşük ve TIL orta olanlarda 35,268, A3B düşük ve TIL yüksek olanlarda 30,362, A3B yüksek ve TIL düşük olanlarda 14,896, A3B yüksek ve TIL orta olanlarda 40,91 ve A3B yüksek ve TIL yüksek olanlarda bu değer 40,988 olarak elde edilmiştir. Burada A3B düşük ve TIL düşük olanların hastalıksız sağkalım süresi A3B yüksek, TIL orta ve A3B yüksek, TIL yüksek olanlardan farklılık göstermiştir (Tablo 18 ve Şekil 28).

Tablo 18. A3B kategorileri ve TIL-tümör merkezi kategorilerine göre hastalıksız sağkalım sürelerinin karşılaştırılması

	Mean (%95 CI)	p*
A3B ve TIL tümör merkezi		
A3B düşük, TIL düşük	20,774 ^b (15,989 - 25,558)	0,038
A3B düşük, TIL orta	35,268 ^{ab} (29,527 - 41,009)	
A3B düşük, TIL yüksek	30,362 ^{ab} (24,508 - 36,216)	
A3B yüksek, TIL düşük	14,896 ^{ab} (10,561 - 19,231)	
A3B yüksek, TIL orta	40,91 ^a (34,541 - 47,279)	
A3B yüksek, TIL yüksek	40,988 ^a (35,13 - 46,847)	
Overall	38,398 (34,796 - 42)	

*LogRank Test; a-b: Aynı harfe sahip kategoriler arasında bir fark yoktur.



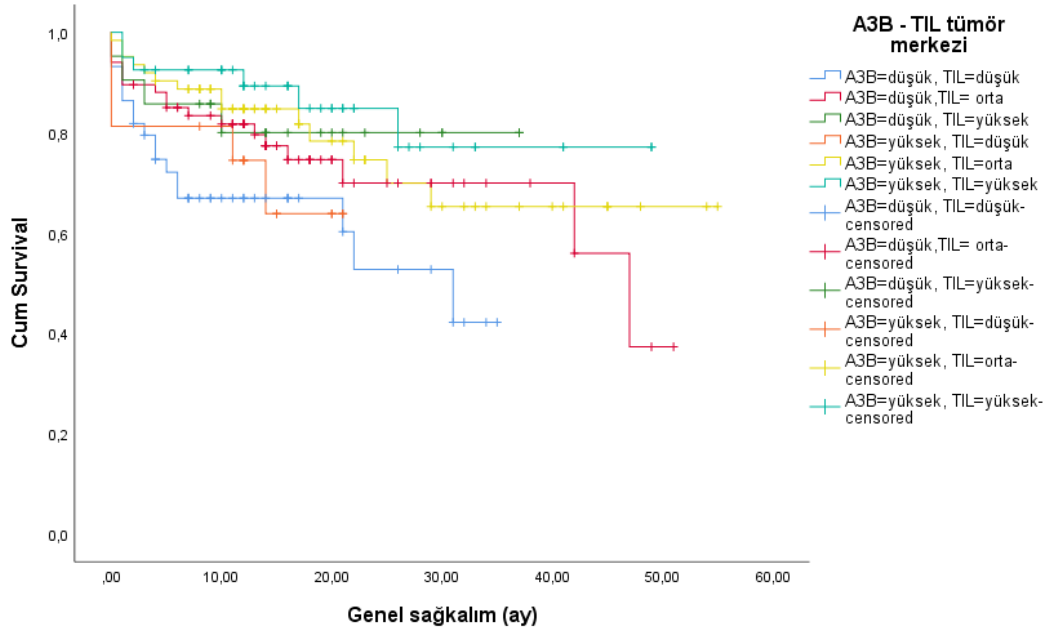
Şekil 28. A3B ve TIL-tümör merkezi kategorilerine göre hastaliksız sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi)

A3B ve TIL-tümör merkezi kategorilerine göre genel sağkalım sürelerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0,047$). A3B düşük ve TIL düşük olanlarda genel sağkalım süresi ortalama değeri 21,951, A3B düşük ve TIL orta olanlarda 36,211, A3B düşük ve TIL yüksek olanlarda 30,362, A3B yüksek ve TIL düşük olanlarda 15,641, A3B yüksek ve TIL orta olanlarda 41,026 ve A3B yüksek ve TIL yüksek olanlarda bu değer 41,042 olarak elde edilmiştir. Burada A3B düşük ve TIL düşük olanların genel sağkalım süresi A3B yüksek, TIL orta ve A3B yüksek, TIL yüksek olanlardan farklılık göstermiştir (Tablo 19 ve Şekil 29).

Tablo 19. A3B kategorileri ve TIL-tümör merkezi kategorilerine göre genel sağkalım sürelerinin karşılaştırılması

	Mean (%95 CI)	p*
A3B ve TIL tümör merkezi		
A3B düşük, TIL düşük	21,951 ^b (17,208 - 26,693)	0,047
A3B düşük, TIL orta	36,211 ^{ab} (30,605 - 41,817)	
A3B düşük, TIL yüksek	30,362 ^{ab} (24,508 - 36,216)	
A3B yüksek, TIL düşük	15,641 ^{ab} (11,555 - 19,726)	
A3B yüksek, TIL orta	41,026 ^a (34,731 - 47,321)	
A3B yüksek, TIL yüksek	41,042 ^a (35,211 - 46,872)	
Overall	38,529 (34,998 - 42,059)	

*LogRank Test; a-b: Aynı harfe sahip kategoriler arasında bir fark yoktur.



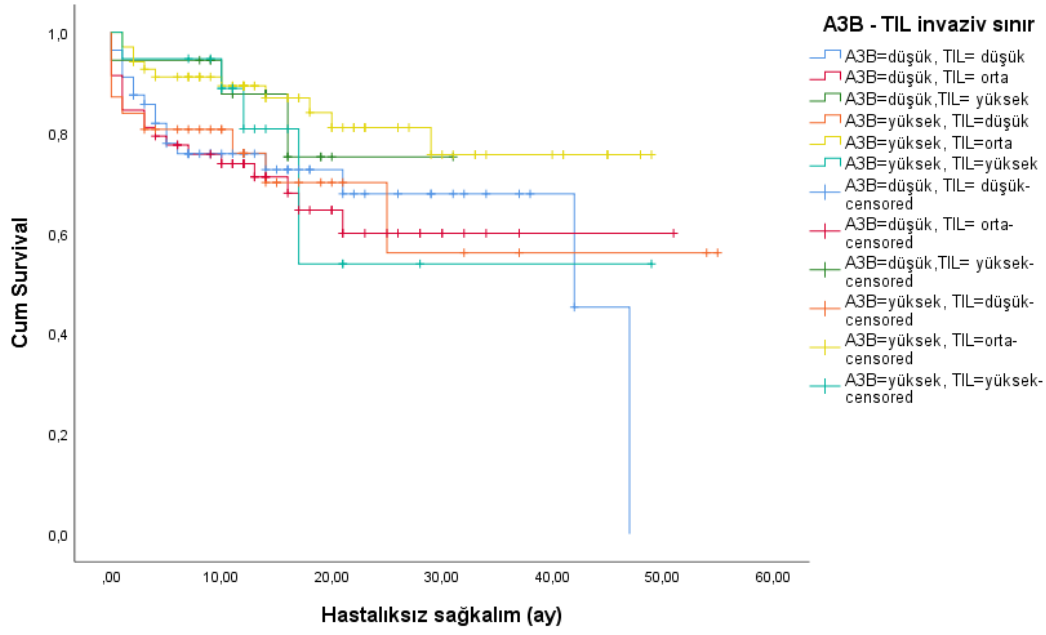
Şekil 29. A3B ve TIL-tümör merkezi kategorilerine göre genel sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi)

A3B kategorileri ve TIL-invaziv sınır kategorilerine göre hastalıksız sağkalım süreleri ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,209$) (Tablo 20 ve Şekil 30).

Tablo 20. A3B kategorileri ve TIL-invaziv sınır kategorilerine göre hastalıksız sağkalım sürelerinin karşılaştırılması

	Mean (%95 CI)	p*
A3B ve TIL invaziv sınır		
A3B düşük, TIL düşük	32,847 (26,979 - 38,715)	0,209
A3B düşük, TIL orta	33,619 (27,226 - 40,011)	
A3B düşük, TIL yüksek	25,982 (20,895 - 31,069)	
A3B yüksek, TIL düşük	35,799 (25,029 - 46,569)	
A3B yüksek, TIL orta	40,446 (35,852 - 45,039)	
A3B yüksek, TIL yüksek	32,565 (21,143 - 43,986)	
Overall	38,398 (34,796 - 42)	

*LogRank Test



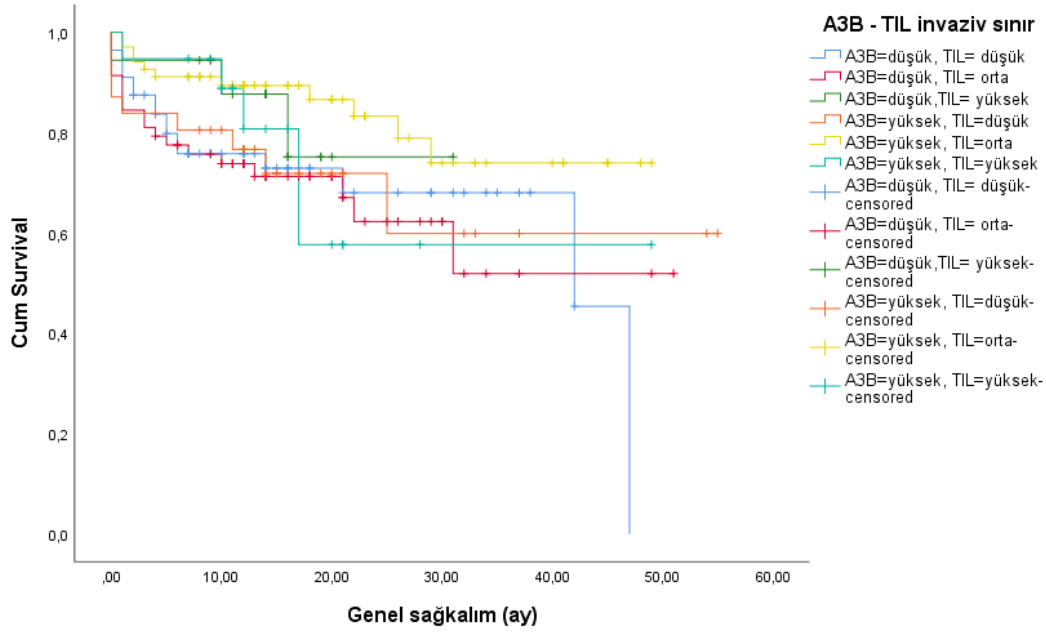
Şekil 30. A3B ve TIL-invaziv sınır kategorilerine göre hastaliksız sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi)

A3B kategorileri ve TIL invaziv sınır kategorilerine göre genel sağkalım süreleri ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,237$) (Tablo 21 ve Şekil 31).

Tablo 21. A3B kategorileri ve TIL-invaziv sınır kategorilerine göre genel sağkalım sürelerinin karşılaştırılması

	Mean (%95 CI)	p*
A3B ve TIL invaziv sınır		
A3B düşük, TIL düşük	32,983 (27,17 - 38,797)	0,237
A3B düşük, TIL orta	32,6 (25,728 - 39,473)	
A3B düşük, TIL yüksek	25,982 (20,895 - 31,069)	
A3B yüksek, TIL düşük	37,271 (27,334 - 47,208)	
A3B yüksek, TIL orta	40,414 (35,835 - 44,992)	
A3B yüksek, TIL yüksek	33,795 (23,12 - 44,469)	
Overall	38,529 (34,998 - 42,059)	

*LogRank Test



Şekil 31. A3B ve TIL-invaziv sınır kategorilerine göre genel sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi)

4.5. MMR Gen Durumu ve Sağkalım

MMR durumunun instabil olmasına etki eden risk faktörleri Binary Lojistik Regresyon Analizi ile incelenmiştir ve bağımsız değişkenlerin modele dahil edilmesinde Enter metodu kullanılmıştır. Model univariate olarak incelendiğinde; Tümör lokalizasyonu sağ kolonda olanların MSI olma riskinin rektumda olanlara göre 9,915 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p=0,032$). Diğer değişkenler MMR durumu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,050$). Model multiple olarak incelendiğinde; değişkenler MMR durumu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,050$) (Tablo 22).

Tablo 22. MMR durumunun ve klinikopatolojik parametrelerin Lojistik Regresyon Analizi ile incelenmesi

MMR durumu			Univariate		Multiple	
	Stabil	İnstabil	OR (%95 CI)	P	OR (%95 CI)	P
Cinsiyet						
Erkek	154 (91,7)	14 (8,3)		Referans		
Kadın	76 (92,7)	6 (7,3)	0,868 (0,321 - 2,349)	0,781	0,789 (0,276 - 2,256)	0,658
Yaş	65,18 ± 11,81	60,95 ± 18,22	0,974 (0,941 - 1,009)	0,147	0,979 (0,944 - 1,016)	0,265
Tümör lokalizasyonu						
Rektum	65 (98,5)	1 (1,5)		Referans		
Sağ kolon	59 (86,8)	9 (13,2)	9,915 (1,219 - 80,633)	0,032	8,055 (0,955 - 67,95)	0,055
Sol kolon	106 (91,4)	10 (8,6)	6,132 (0,767 - 49,02)	0,087	6 (0,731 - 49,262)	0,095
Histopatolojik subtip						
Adenokarsinom, NOS	194 (92,4)	16 (7,6)		Referans		
Diğer subtipler	36 (90)	4 (10)	1,347 (0,426 - 4,263)	0,612	0,831 (0,189 - 3,66)	0,806
Müsinöz diferansiyasyon						
Var	52 (89,7)	6 (10,3)		Referans		
Yok	178 (92,7)	14 (7,3)	0,682 (0,25 - 1,862)	0,455	0,596 (0,173 - 2,059)	0,413
Tümör çapı						
4 cm ve altı	91 (92,9)	7 (7,1)		Referans		
>4 cm	139 (91,4)	13 (8,6)	1,216 (0,467 - 3,163)	0,689	1,048 (0,381 - 2,881)	0,927
Grade						
Düşük	203 (92,3)	17 (7,7)		Referans		
Yüksek	27 (90)	3 (10)	1,327 (0,365 - 4,827)	0,668	1,508 (0,299 - 7,607)	0,619
Lenfovasküler invazyon						
Var	137 (92,6)	11 (7,4)	0,83 (0,331 - 2,081)	0,691	0,774 (0,242 - 2,478)	0,666
Yok	93 (91,2)	9 (8,8)		Referans		
Perinöral invazyon						
Var	114 (93,4)	8 (6,6)	0,678 (0,267 - 1,721)	0,414	0,651 (0,22 - 1,926)	0,438
Yok	116 (90,6)	12 (9,4)		Referans		

Cox & Snell R²= %4,9, Nagelkerke R²=%11,6

Tablo 22. MMR durumunun ve klinikopatolojik parametrelerin Lojistik Regresyon Analizi ile incelenmesi (devamı)

MMR durumu			Univariate		Multiple	
	Stabil	İnstabil	OR (%95 CI)	P	OR (%95 CI)	p
Tümör sınırı						
İnfiltratif Pushing	206 (91,6) 24 (96)	19 (8,4) 1 (4)	2,214 (0,284 - 17,278)	0,448 Referans	2,046 (0,238 - 17,617)	0,515
Primer tümör invazyonu (T)						
Tis	2 (100)	0 (0)	---	---	---	---
T2	19 (79,2)	5 (20,8)	---	---	---	---
T1	2 (100)	0 (0)	---	---	---	---
T3	131 (92,9)	10 (7,1)	---	---	---	---
T4a	66 (98,5)	1 (1,5)	---	---	---	---
T4b	10 (71,4)	4 (28,6)	---	---	---	---
N-Rejyonel lenf nodu metastazı						
N0	130 (92,2)	11 (7,8)		Referans		
N1	54 (88,5)	7 (11,5)	1,532 (0,564 - 4,162)	0,403	1,571 (0,455 - 5,423)	0,475
N2	46 (95,8)	2 (4,2)	0,514 (0,11 - 2,406)	0,398	0,702 (0,116 - 4,259)	0,701
Uzak organ metastazı (M)						
M0	211 (91,3)	20 (8,7)		Referans		
M1	19 (100)	0 (0)	---	---	---	---
Evre (TNM)						
Evre 0	2 (100)	0 (0)	---	---	---	---
Evre 1	18 (81,8)	4 (18,2)	---	---	---	---
Evre 2	108 (93,9)	7 (6,1)	---	---	---	---
Evre 3	83 (90,2)	9 (9,8)	---	---	---	---
Evre 4	19 (100)	0 (0)	---	---	---	---

Cox & Snell R²= %4,9, Nagelkerke R²=%11,6

MSI grup incelendiğinde; 20 adet olgu tespit edilmiştir. Bu olgulardaki ekspresyon kaybı dağılımları Tablo 23’de belirtilmiştir.

Tablo 23. Mikrosatellit proteinlerdeki ekspresyon kaybı dağılımı

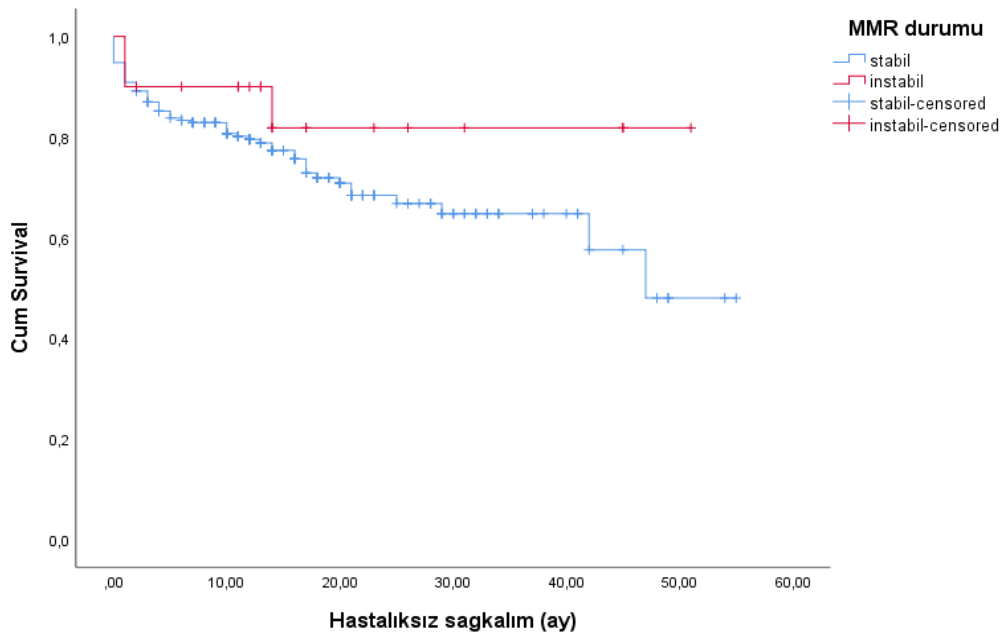
	Frekans	Yüzde
MLH1	4	20
PMS2	1	5
MSH2	2	10
MSH6	5	25
MLH1, PMS2	4	20
MSH2, MSH6	2	10
MLH1, MSH2, MSH6	1	5
MLH1, PMS2, MSH2, MSH6	1	5
Toplam	20	100

MMR durumlarına göre hastalıksız sağkalım süreleri ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,234$) (Tablo 24 ve Şekil 32).

Tablo 24. MMR durumunun hastalıksız sağkalıma etkisi

	Mean (%95 CI)	p*
MMR		
Stabil	37,535 (33,654 - 41,416)	0,234
İnstabil	42,973 (34,63 - 51,316)	
Overall	38,398 (34,796 - 42)	

*LogRank Test



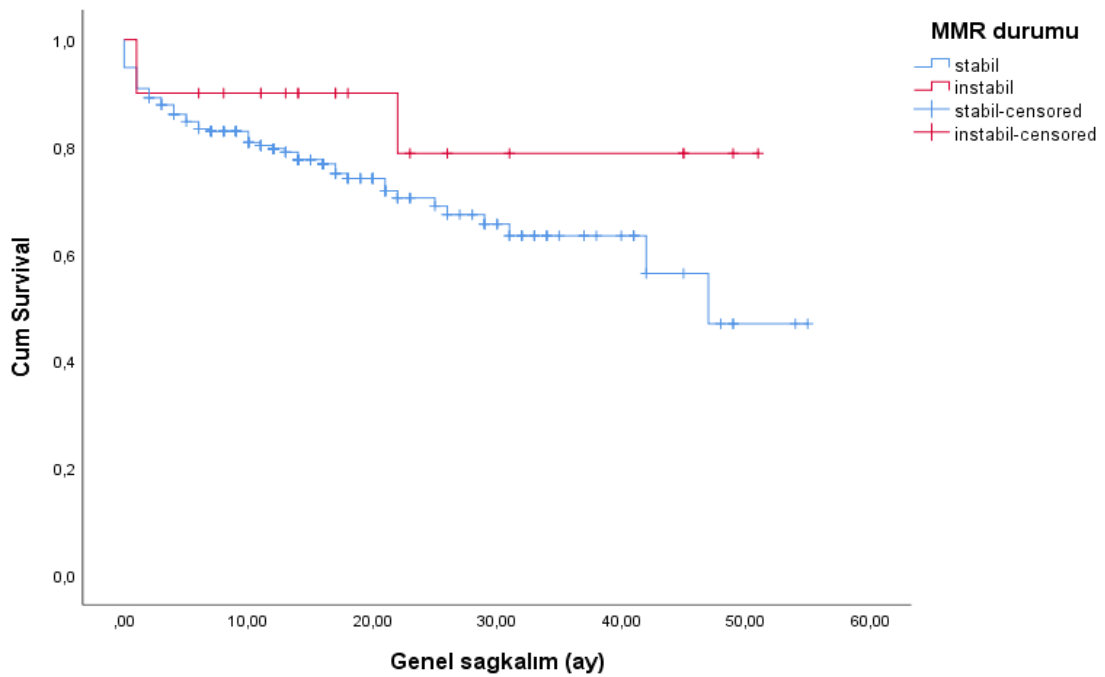
Şekil 32. MMR durumlarına göre hastalıksız sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi)

MMR durumlarına göre genel sağkalım süreleri ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,167$) (Tablo 25 ve Şekil 33).

Tablo 25. MMR durumunun genel sağkalıma etkisi

	Mean (%95 CI)	p*
MMR		
Stabil	37,534 (33,671 - 41,396)	0,167
İnstabil	42,738 (34,196 - 51,279)	
Overall	38,529 (34,998 - 42,059)	

*LogRank Test



Şekil 33. MMR durumlarına göre genel sağkalım süreleri (Kaplan Meier Analizi)

4.6. MMR Gen Durumunun İmmün Yanıt ile İlişkisi

MMR durumlarına göre TIL %-invaziv sınır ortanca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0,008$). MMS olanlarda ortanca değer 20 iken MMI olanlarda bu değer 30 olarak elde edilmiştir (Tablo 26).

MMR durumları ile CLR varlığı arasındaki bağlantı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$). MMS olanlarda CLR olanların oranı %10,4 iken MMI olanlarda bu oran %40 olarak elde edilmiştir (Tablo 27).

MMR ve TIL kategorilerinin etkileşim gruplarına göre hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım sürelerinin arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup/olmadığı bazı kategorilere düşen vaka sayıları az olduğu için analiz edilememiştir.

Tablo 26. MMR durumlarına göre TIL değerlerinin karşılaştırılması

	MMR durumu				Test İst.	p*
	Stabil		İnstabil			
	Ortalama ± ss	Ortanca (min-mak)	Ortalama ± ss	Ortanca (min-mak)		
TIL %-tümör merkezi	32,72 ± 22,66	30 (1 - 90)	36 ± 11,42	30 (30 - 80)	1874,5	0,166
TIL %-invaziv sınır	24,57 ± 20,15	20 (1 - 90)	35,25 ± 20,23	30 (10 - 80)	1489	0,008

*Mann Whitney U Testi

Tablo 27. MMR durumuna göre CLR varlığının dağılımları

MMR durumu			Test İst.	p*
	Stabil	İnstabil		
Crohn benzeri reaksiyon				
Var	24 (10,4)	8 (40)	---	0,001
Yok	206 (89,6)	12 (60)		

*Fisher's Exact Testi

4.7 APOBEC3B Ekspresyonu ve MMR Gen Durumunun Birlikte İmmün Yanıt Üzerine Etkisi

A3B ve MMR durumu etkileşimlerine göre gruplar oluşturulduğunda A3B düşük ve MSS olanların oranı %47,6, A3B düşük ve MSI olanların oranı %5,2, A3B yüksek ve MSS olanların oranı %44,4 ve A3B yüksek ve MSI olanların oranı %2,8 olarak elde edilmiştir (Tablo 28).

A3B ve MMR durumu etkileşimlerine göre TIL % tümör merkezi kategorileri arasındaki bağlantı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). A3B düşük ve MSS olanlarda düşük TIL oranı %37 iken, A3B yüksek ve MSS olanlarda %14,4 olarak elde edilmiştir. A3B düşük ve MSS olanlarda TIL orta olanların oranı %46,2, A3B düşük ve MSI olanlarda %92,3, A3B yüksek ve MSS olanlarda %49,5 iken A3B yüksek ve MSI olanlarda bu oran %100 olarak elde edilmiştir. A3B düşük ve MSS olanlarda TIL yüksek olanların oranı %16,8, A3B düşük ve MSI olanlarda %7,7 iken A3B yüksek ve MSS olanlarda %36 olarak elde edilmiştir.

A3B ve MMR durumu etkileşimlerine göre TIL % invaziv sınır kategorileri arasındaki bağlantı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,002$). A3B düşük ve MSS olanlarda düşük TIL oranı %46,2, A3B düşük ve MSI olanlarda %7,7 iken A3B yüksek ve MSS olanlarda %27,9 olarak elde edilmiştir. A3B düşük ve MSS olanlarda TIL orta olanların oranı %42, A3B düşük ve MSI olanlarda %61,5, A3B yüksek ve MSS olanlarda %55 iken A3B yüksek ve MSI olanlarda bu oran %100 olarak elde edilmiştir. A3B düşük ve MSS olanlarda TIL yüksek olanların oranı %11,8, A3B düşük ve MSI olanlarda %30,8 iken A3B yüksek ve MSS olanlarda %17,1 olarak elde edilmiştir.

A3B ve MMR durumu etkileşimlerine göre CLR varlığı arasındaki bağlantı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). A3B düşük ve MSS olanlarda CLR olanların oranı %6,7, A3B düşük ve MSI olanlarda %46,2, A3B yüksek ve MSS olanlarda %14,4 iken A3B yüksek ve MSI olanlarda bu oran %28,6 olarak elde edilmiştir. Burada farklılık A3B düşük ve MSI olanlar ile A3B düşük ve MSS olanlar ve A3B yüksek ve MSS olanlar arasında görülmüştür (Tablo 29).

Tablo 28. A3B kategorileri ve MMR durumlarının etkileşimlerinin dağılımları

	Frekans	Yüzde
A3B düşük, MSS	119	47,6
A3B düşük, MSI	13	5,2
A3B yüksek, MSS	111	44,4
A3B yüksek, MSI	7	2,8

Tablo 29. A3B ve MMR etkileşimlerinde TIL ve CLR dağılımları

	A3B düşük, MSS	A3B düşük, MSI	A3B yüksek, MSS	A3B yüksek, MSI	Test İst	p*
TIL %-tümör merkezi						
Düşük	44 (37) ^a	0 (0) ^b	16 (14,4) ^b	0 (0) ^{ab}	37,675	<0,001
Orta	55 (46,2) ^a	12 (92,3) ^b	55 (49,5) ^{ac}	7 (100) ^{bc}		
Yüksek	20 (16,8) ^a	1 (7,7) ^{ab}	40 (36) ^b	0 (0) ^{ab}		
TIL %-invaziv sınır						
Düşük	55 (46,2) ^a	1 (7,7) ^b	31 (27,9) ^b	0 (0) ^{ab}	21,418	0,002
Orta	50 (42) ^a	8 (61,5) ^{ab}	61 (55) ^{ab}	7 (100) ^b		
Yüksek	14 (11,8)	4 (30,8)	19 (17,1)	0 (0)		
Crohn benzeri reaksiyon						
Var	8 (6,7) ^a	6 (46,2) ^b	16 (14,4) ^a	2 (28,6) ^{ab}	18,714	<0,001
Yok	111 (93,3)	7 (53,8)	95 (85,6)	5 (71,4)		

*Pearson Ki-Kare Testi; a-c: Aynı harfe sahip etkileşim grupları arasında bir fark yoktur.

5. TARTIŞMA

TIL yanıtının, A3B ekspresyonu yüksek olan hasta grubunda, düşük olanlara kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde, MSI hasta grubunda, MSS olanlara göre TIL yanıtı anlamlı olarak daha yüksektir.

KRK riski, 50 yaş üstü bireylerde belirgin bir şekilde artmaktadır ve en sık 65 yaş ve üstünde görülmektedir. 65 yaş ve üzerindeki bireyler; 50-64 yaş grubuna kıyasla üç kat, 25-49 yaş grubuna kıyasla otuz kat daha fazla KRK tanısı almaktadırlar (93). Moore ve ark.'nın 1981-2013 yıllarını kapsayan ve 182.095 vakayı içeren çalışmalarında, vakaların %93'ünün 50 yaşın üzerinde olduğu belirlenmiştir (94). Ancak, son yıllarda 50 yaş altı bireylerde KRK riskinin göreceli olarak arttığına dair gözlemler mevcuttur. Bu artışın, sedanter yaşam tarzı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (93). Çalışmamızda da, literatürle uyumlu olarak, ortalama tanı yaşı 64 bulunmuştur ve hastaların %88,4'ü 50 yaşın üzerindedir.

Dünya genelinde KRK insidansı erkeklerde kadınlara oranla 1,5 kat daha fazladır (93,95). Çalışmamızda ise vakaların %67,2'si erkek, %32,8'i kadın olarak bulunmuştur ve erkeklerde görülme oranı kadınlara oranla 2 kat daha fazla tespit edilmiştir.

KRK'ların primer tümör yerleşimi prognostik öneme sahiptir. Tümörler histopatolojik özellikler, moleküler yolaklar, tanısal prosedürler ve tedavi açısından yerleşim yerlerine göre farklılık gösterirler. Tümörlerin çoğunluğu sol kolon veya rektum yerleşimlidir (49). Kadınlarda, erkeklere kıyasla tümörün sağ kolonda yerleşim gösterme ihtimali daha fazladır (93). Çalışmamızda tümörlerin %46,4'ü sol kolonda, %27,2'si sağ kolonda ve %26,4'ü rektumdadır. Literatür ile uyumlu olarak vakaların çoğunluğu sol kolon yerleşimine sahiptir. Erkeklerde sağ kolon yerleşim oranı %23,8 iken; kadınlarda sağ kolon yerleşim oranı daha yüksek olup, %34,1 olarak bulunmuştur.

KRK'da histopatolojik alt tip tayini, genel pratikte kolaylıkla uygulanabilir ve prognostik öneme sahiptir. Histopatolojik alt tiplerin çoğunluğunu adenokarsinom, NOS grubu oluştururken, yaklaşık %10'u andiferansiye karsinom, %10'u müsinöz adenokarsinom ve %1'i taşlı yüzük hücreli karsinomdur. Müsinöz adenokarsinom, andiferansiye karsinom ve taşlı yüzük hücreli karsinom alt tiplerinde, genetik olarak MSI ve BRAF mutasyon insidanslarının yüksek olduğu bilinmektedir. Bu

durum, histolojik alt tiplerin genetik analiz öncesi prognostik tahmin açısından yardımcı olabileceğini göstermektedir (96). Çalışmamızda, vakaların %84'ü adenokarsinom, NOS tanısı almıştır ve vakaların büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Diğer alt tiplerin dağılımı ise sırasıyla; %10,8 müsinöz adenokarsinom, %3,6 andiferansiye karsinom, %1,2 taşlı yüzük hücreli karsinom şeklindedir ve literatür ile benzer bir dağılıma sahiptir.

Literatürdeki bazı çalışmalarda, müsinöz komponent içeren (>%5) ve içermeyen (<%5) KRK'ların farklı genetik mutasyon profillerine sahip olduğu belirlenmiştir. Müsinöz komponent içeren adenokarsinomlar (>%5 müsin) ve müsinöz adenokarsinomların (>%50 müsin) ise benzer genetik mutasyon profillerine sahip oldukları tespit edilmiştir. Müsinöz komponent içeren adenokarsinomlarda, EGFR sinyal yolağının iki anahtar faktörü olan KRAS ve BRAF'ın kombine mutasyonları, müsinöz komponent içermeyenlere kıyasla daha yüksek oranda (sırasıyla %95,9 ve %52,1) bulunmuştur. Bu durum, müsinöz diferansiyasyonun anti-EGFR tedavilerine yanıt vermeme ihtimalinin bir göstergesi olabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, müsinöz komponent içeren adenokarsinomlarda, müsinöz komponent içermeyenlere göre daha yüksek oranda MSI görülmüştür (97). Ancak, kendi çalışmamızda, vakaların %23,2'sinde müsinöz diferansiyasyon belirlenmiş olmasına rağmen, MSI ile arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p=0,455$).

KRK tedavisinde kullanılan klinik rehberler esas olarak TNM sınıflandırmasına dayanır. Fakat, aynı evrede olan hastaların klinik sonuçlarının çok farklı olabildiği görülmektedir. Bu durum, mevcut TNM evreleme sisteminin tedavi stratejilerini planlama ve prognozu değerlendirme konusunda kısmen yetersiz kaldığını düşündürmektedir. TNM sisteminin tamamlayıcısı olarak ek prognostik ve prediktif belirteçlerin tanımlanması gerekliliği ortaya çıkmıştır (98,99).

Son dönemlerde, tümör hücreleri ve immün sistem arasındaki karmaşık ve dinamik etkileşimi vurgulayan yeni bir kanser tanımı geliştirilmiştir (100). Tümöral immün yanıtın ölçülebilir ve immünoterapi ile aktive edilebilir olması, ayrıca etkin immünoterapi tedavisi için tümöral immün yanıtın gerekliliği, onkoloji alanında ciddi bir ilerleme sağlamıştır. Dikkatleri tümöre karşı oluşan immün yanıtı çekmiştir (89).

Galon ve ark. tümör merkezinde ve tümörün invaziv sınırında bulunan T lenfositleri, CD3 ve CD8 immünohistokimyasal boyama yöntemi ile analiz ederek bir

immün-skor oluşturmışlardır. Bu skoru, KRK'larda en az TNM kadar güvenilir bir prognostik belirteç olarak kabul etmiş ve 'TNM-İmmün' şeklinde yeni bir sınıflandırma önermişlerdir (101).

Pages ve ark. 2681 KRK hastasının doku örneklerinde immün-skor değerlendirmesi yaparak bu hastaları prognoz açısından takip etmişlerdir (median takip süresi 96 ay). Sonuç olarak, yüksek immün yanıtın DFS ve OS üzerine olumlu etkisi olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, immün-skorun prognostik performansını TNM evrelemesi, diferansiyasyon ve VELIPI (venöz emboli, lenfatik invazyon, perinöral invazyon) klinikopatolojik parametreleri ile karşılaştırmışlardır. İmmün-skorun en iyi tümör risk parametresi olduğunu ileri sürmüşlerdir (89).

Başka bir geniş çaplı çalışmada, Rozek ve ark. 2369 KRK hastasının tümörlerinde, H&E kesitlerinde intratümöral TIL ve peritümöral CLR'u ve bunların sağkalım üzerine etkilerini araştırmışlardır. TIL ve CLR'un daha uzun sağkalım süresi ile ilişkili olduğunu ve her bir TIL/HPF değerinin ölüm riskinde yaklaşık %3-4'lük bir azalma ile sonuçlandığını tespit etmişlerdir. Bu nedenle, TIL ve CLR'un evreleme kılavuzlarında dikkate alınması gerektiğini savunmaktadırlar (71). Ayrıca, CLR'un TIL yoğunluğu ve TNM evresinden bağımsız olarak sağkalım süresi ile ilişkili olduğunu belirtmektedirler (102).

İmmün yanıtın prognostik bir faktör olduğu net bir şekilde kabul edilmesine rağmen, değerlendirilmesinin patolojik bağımlı, subjektif olması ve KRK'lar için standardize edilmiş bir yöntemin henüz belirlenmemesi zorluk teşkil etmektedir (71). Değerlendirmenin H&E kesitlerde veya immünohistokimyasal boyamayla, tümör merkezinde veya invaziv sınırdaki, en yüksek alanda veya tümörün genelinde mi yapılacağı konusu tartışmalıdır (103). İmmün yanıtın çeşitli yöntemlerle değerlendirildiği çalışmaların bir kısmının özeti Tablo 30'da verilmiştir.

Tablo 30. KRK’da immün yanıt değerlendirilmesi yapılan çalışmaların bir kısmının özeti.

Çalışma	Değerlendirme Alanı	Yöntem	Cut-Off	Sonuç Parametresi
Klintrup ve ark. 2005 (70)	TC, IM	H&E	4 dereceli skorlama	DFS, OS
Huh ve ark. 2012 (104)	IM	H&E	4 dereceli skorlama	DFS, OS
Funada ve ark. 2003 (105)	IM	CD8+	Mean	OS
Chiba ve ark. 2004 (106)	TC	CD8+	Median	OS
Nosho ve ark. 2010 (66)	TC	CD8+	25-75 persentil	OS
Menon ve ark. 2004 (107)	IM	CD8+	75.persentil	DFS
Frey ve ark. 2010 (108)	TC	FOXP3+	Median	OS
Deschoolmeester ve ark. 2011 (109)	IM, TC	CD8+ CD3+	<20/BBA >50/BBA	OS, DFS

Mei ve ark. toplamda 2988 hastanın dahil edildiği 30 farklı çalışmayı analiz etmişlerdir. Farklı değerlendirme alanları ve cut-off değerlerinin kullanıldığı bu çalışmalarda, immün infiltratın sağkalım üzerinde olumlu etkisi olduğunu saptamışlardır (99). Mevcut bulgular, tümöre karşı oluşan immün yanıtın, değerlendirmedeki sınırlamalara rağmen, KRK hastaları için prognozu tahmin etmede güçlü bir belirteç olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu yanıt, immünoterapi tedavilerinin hücresel temeli olarak işlev görür. Ancak, immün yanıtı değerlendirmek için standardize edilmiş protokollerin oluşturulması ve bu konuda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda; tümöre karşı oluşan immün yanıt H&E kesitlerinde, invaziv sınırdaki TIL cevabı, tümör merkezindeki TIL cevabı ve CLR olarak 3 farklı şekilde değerlendirilmiştir. Her birinin ayrı ayrı DFS ve OS üzerine etkileri incelenmiştir. **TIL-tümör merkezi değerinin artışının, hem univariate hem de multiple analizlerde, rekürrens riskini azalttığı ve DFS’i arttırdığı görülmüştür (univariate HR=0,982; p=0,004 ve multiple HR=0,980; p=0,009). Benzer şekilde, TIL-tümör merkezi değerinin artışının, hem univariate hem de multiple analizlerde, ölüm riskini azalttığı ve OS’i arttırdığı saptanmıştır (univariate HR=0,982; p=0,006, multiple HR=0,981; p=0,011). TIL-invaziv sınır ve CLR’un DFS ve OS’i arttırdığı görülmüştür, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir (p>0,050).**

Sonuç olarak, immün yanıtın değerlendirildiği bölge ve sunum şekli ne olursa olsun DFS ve OS üzerinde olumlu bir etkisi olduğu ve iyi prognoz ile ilişkilendirilebileceği; ancak tümör merkezindeki TIL miktarının daha güçlü bir prognostik belirteç olduğu tespit edilmiştir.

Tümör hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından yabancı görülerek temizlenmeleri tümörü sınırlandırmakta ve prognostik katkı sağlamaktadır. Ancak, tümör hücreleri bu engeli aşmak için kaçış mekanizmaları geliştirirler. Bu mekanizmalardan biri; fizyolojik koşullar altında bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu sınırlandırarak bağışıklık homeostazını sürdüren ve otoimmüniteyi önleyen, immün kontrol noktalarını tümörlerin kullanmalarıdır. Böylece, T hücre aktivasyonunu azaltır ve immün yanıtı kaçarlar. Bu kaçış mekanizması bağışıklığın antitümöral etkisini kısıtlamaktadır (110).

İmmünoterapinin farklı formları yıllardır bazı kanserlerin tedavisinde yer almaktadır. Ancak, tümör hücrelerinin immün kontrol noktalarını nasıl kullandığının anlaşılması, immünoterapi tedavilerinde önemli ilerlemeler kaydedilmesini sağlamıştır. Bu keşif, immün kontrol noktası inhibitörlerinin (ICI) geliştirilmesine yol açmış ve böylece tümör hücrelerinin immün yanıtı kaçımasını engelleyebilmeyi mümkün kılmıştır (62,110).

ICI'lerin keşfi, kanser tedavisinde devrim niteliğinde bir ilerleme olarak kabul edilmektedir. Ancak, immünoterapiye yanıt verecek hasta gruplarını belirlemek için daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum, immünoterapi tedavisinin temelini oluşturan TIL cevabının, neden bazı tümörlerde yüksek seviyede, bazılarında ise düşük seviyede olduğu sorusunu gündeme getirmiştir. Dolayısıyla, immün yanıtı tetikleyen genomik instabiliteden sorumlu gen ekspresyonlarının daha iyi anlaşılması gerekmektedir (111).

Genomik instabilite, kanser hücrelerinin genetik yapısını şekillendirir ve böylece, kanser hücrelerinin davranışını ve tedaviye yanıtını etkiler. Kalıtsal veya somatik DNA onarım hataları, onkogen kaynaklı replikasyon stresi, hatalı mitotik kromozom ayrılması ve genotoksik anti-kanser tedavileri gibi çeşitli mekanizmalar, genomik instabiliteye yol açabilir. Bu durum, tümörlerin daha hızlı çoğalmasını, metastaz yapmasını kolaylaştırabilir ve standart tedavilere karşı direnç geliştirebilir (111). Ancak, artan kanıtlar, genomik instabilite ilişkili hipermutasyonun yüksek TMB'ye neden olduğunu

ve sonuç olarak bağışıklık hücreleri tarafından tanınan neoantijenlerin üretimini arttırdığını göstermektedir. Dolayısıyla, genomik instabilitenin, tümör hücrelerine karşı daha etkin bir immün yanıt verilmesine aracılık edeceği, prognoz açısından avantaj sağlayacağı düşünülmektedir (112,113).

Giannakis ve arkadaşları, 619 KRK olgusunda tüm ekzom sekanslama yöntemini kullanarak, yüksek neoantijen yükünün lenfosit infiltrasyonunu arttırdığını ve KRK'larda sağkalım oranlarını olumlu yönde etkilediğini göstermişlerdir. Bu sonuçların gelecekte KRK'larda immünoterapi tedavisi için hasta seçimi hakkında bilgi verebileceğini ileri sürmüşlerdir (114).

Biz ise çalışmamızda; yüksek mutasyon yüküne ve buna bağlı neoantijen artışına neden oldukları için lenfosit cevabını arttıracaklarını düşündüğümüz, genomik instabiliteden sorumlu A3B ve MMR genlerinin ekspresyonlarını 250 adet KRK vakasında inceledik.

A3B mutasyon imzası birçok kanser tipinde saptanmıştır ve kanser genomundaki en sık görülen mutasyon imzalarından birisi, hatta yaşlanmaya bağlı mutasyonlardan sonra ikinci en yaygın mutasyon süreci, olarak tanımlanmıştır. Genomik instabiliteden sorumludur (115,116).

A3B'nin kanser genomunda keşfi ile birlikte, bu protein klinik önemi ve sağkalım üzerine etkileri açısından kapsamlı bir araştırma konusu haline gelmiştir. Ancak, bu alandaki çalışmalar sınırlıdır ve çoğunlukla bazı kanser türlerine odaklanmıştır. A3B mutagenezi kanserlerin yarısından fazlasında artmış olsa da; meme, baş/boyun, akciğer, mesane ve serviks kanserleri bilinen en yüksek A3B ilişkili mutasyon yüküne sahip olduklarından ve A3B enzimlerinin yüksek spesifikite gösterdikleri TpCpW (W: adenin veya timin) motifler bu beş kanser türünde daha yüksek oranda görüldüklerinden yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalar bu kanser türlerine yöneliktir (117).

Literatürde, A3B'nin hasta üzerine etkilerine dair en fazla bilgi ve araştırma meme kanserlerine aittir. Bu araştırmalardan biri, Kim ve ark.'nın 138 meme kanseri olgusunda, DNA ve RNA örnekleri üzerinde yaptıkları çalışmadır. Yapılan analizler sonucunda, A3B mRNA ekspresyon seviyelerinin triple negatif meme tümörlerinde, hormon reseptörleri pozitif ve HER2 negatif meme tümörlerine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, A3B artmış ekspresyonu ile klinikopatolojik özellikleri (yaş, BMI,

menopoz, sigara ve alkol kullanımı, aile öyküsü, diyabet, hipertansiyon, tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, lenf nodu metastazı, evre, grade, lenfatik invazyon, Ki67 proliferasyon indeksi) karşılaştırmışlardır. İleri yaş ve yüksek Ki67 indeksini, A3B mRNA ekspresyon düzeylerinin artmasıyla ilişkili olduğunu saptamışlardır. Diğer klinikopatolojik özelliklerle A3B artmış ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görmemişlerdir. Meme kanseri alt tiplerine göre A3B mRNA ekspresyon seviyelerinde farklılık olduğu ve yüksek A3B mRNA ekspresyonunun agresif fenotiple ilişkilendirilebileceği sonuçlarına varmışlardır (118).

Bir meta-analiz çalışması, A3B ekspresyonunun farklı kanser türlerindeki prognoz ve klinik sonuçlarını incelemiştir. Çalışmada, belirlenen kriterlere uygun 19 araştırma değerlendirilmiştir. Bu araştırmalar arasında 5 meme kanseri, 4 over kanseri, 2 küçük hücreli dışı akciğer kanseri, 2 skuamöz hücreli karsinom, 2 mide kanseri, 1 nöroendokrin karsinom, 1 mesane, 1 nazofaringeal kanser ve 1 renal hücreli karsinom çalışması bulunmaktadır. Araştırmaların 11'inde İHK yöntemi, 8'inde ise PCR yöntemi kullanılmıştır. Meta-analiz sonuçlarına göre, A3B ekspresyonunun akciğer kanseri ve meme kanserinde sağkalım üzerine olumsuz etkisi olduğu saptanırken; geri kalan kanserler için istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir. Yaş ve cinsiyete dayalı analiz sonuçlarının hiçbirisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Araştırmaların 10'unda A3B ekspresyonu evre ile karşılaştırılmış 9'unda lenf nodu metastazı ile karşılaştırılmış olup herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Grade ile ilişkisi değerlendirilen 11 araştırmanın bir kısmında yüksek A3B ekspresyonu ile grade arasında doğrudan ilişki olduğu ima edilse de, istatistiksel bir fark görülmemiştir. Tümör boyutu ile de arasında bir bağlantı kaydedilmemiştir (119).

A3B'nin KRK dahil birçok kanser türünde aşırı ekspresyon gösterdiği ile ilgili moleküler düzeydeki çalışmaların sayısı artmaktadır (120–123). Ancak, A3B ekspresyonunun KRK vakalarındaki klinikopatolojik özellikler ile ilişkisi ve sağkalım üzerindeki etkisi gibi klinik sonuçlarına dair çalışmalara da ihtiyaç vardır. Bu amaçla yapılan literatür taraması sonucunda; Li ve ark.'nın ve Karihtala ve ark.'nın çalışmalarına ulaşılmıştır. Ancak bu çalışmalar A3B özgü olmayıp, genel APOBEC mutagenезinin klinik sonuçlarına odaklanmıştır:

Li ve ark. genomik özellikleri aydınlatmayı amaçlayarak 133 KRK vakasında, 425 kanserle ilişkili gen panelini incelemiştir. Elde ettikleri sonuçlar arasında, T3N1/2/3

evresindeki hastaların, T3N0'a kıyasla daha yüksek APOBEC imzası içerdiği bulunmaktadır. Bu bulguyu, KRK'da lenf nodu metastazının APOBEC imzasıyla ilişkili olabileceği, şeklinde yorumlamışlardır (122).

Karihtala ve ark. Kanser Genomu Atlası ve Tüm Genomların Pan-Kanser Analizi verilerini kullanarak, yedi farklı tip gastrointestinal kanserde mutasyon imzaları ile sağkalım arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. Sol kolon yerleşimli KRK hastalarında, APOBEC aktivitesiyle oluşan SBS2 imzasını yüksek bulmuşlardır. Bu yüksek SBS2 imzasının, genel sağkalım (OS) süresini olumsuz etkilediği sonucuna varmışlardır (124).

Biz ise, KRK'larda A3B ekspresyonunun, klinikopatolojik özellikler ve sağkalım üzerine etkilerini 250 vakada inceledik. Bu konuda bilinen ilk spesifik çalışma olmamızın yanı sıra, bulgularımızın literatüre önemli katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

Çalışmamızda, öncelikle A3B'nin kontrol grubu ve KRK hasta grubundaki ekspresyon durumu karşılaştırılmıştır. A3B İHK skorunun ortanca değerleri ve A3B İHK kategorilerinin dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (sırasıyla; $p < 0,001$ ve $p = 0,004$). Böylece, A3B'nin tümör hücrelerinde, normal kolon epiteline kıyasla, belirgin bir şekilde daha fazla eksprese edildiği tespit edilmiştir.

Daha sonra, KRK'larda yüksek A3B ekspresyonunun, klinikopatolojik özellikler ile arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki olup olmadığı, univariate ve multiple olarak araştırılmıştır. Karihtala ve ark.'nın çalışmalarıyla benzer şekilde, **tümör lokalizasyonu sol kolon olanlarda A3B ekspresyonunun daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p = 0,047$)**. Diğer klinikopatolojik özellikler ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p > 0,050$). Ancak, istatistiksel fark kaydedilmese de A3B yüksekliğinin, kadınlarda ve tümör çapı 4 cm'den büyüklerde daha fazla olduğu görülmüştür.

Ayrıca, A3B ekspresyonunun genel sağkalım (OS) ve hastalıksız sağkalım (DFS) üzerine etkileri araştırılmıştır; A3B yüksek grubun OS ve DFS süreleri daha uzun bulunmuştur. Fakat p değerleri sırasıyla 0,076 ve 0,080 olup istatistiksel olarak farklılık olmadığı görülmüştür. Vakalarımızı KRK grade alt kategorilerine (düşük grade, yüksek grade) göre sınıflandırarak sağkalım açısından değerlendirdiğimizde ise; **A3B-yüksek/grade-düşük grubun OS sürelerinin, A3B-düşük/grade-yüksek grubun OS sürelerinden anlamlı şekilde daha uzun olduğu saptanmıştır ($p = 0,039$)**. A3B-

yüksek/grade-düşük grubun DFS süreleri de daha uzundur, ancak istatistiksel bir farklılık tespit edilmemiştir ($p=0,050$). Sonuç olarak, A3B yüksek KKR'lerde OS ve DFS sürelerinin daha uzun ve prognoz daha iyi olabileceğini, bunun grade ile birlikte değerlendirildiğinde daha anlamlı hale geldiğini düşünmekteyiz.

A3B'nin birçok kanser türünde mutasyon kaynağı olarak önemi, artan kanıtlarla kabul görmektedir; ancak prognostik değeri tartışmalıdır. Bizim çalışmamız da dahil olmak üzere, bu konuda yapılan çalışmalar (Tablo 31), heterojen kanser türleri üzerinde yapılmış oldukları için belirli bir kanser türüne ilişkin yeterli veri henüz toplanmamıştır. Ayrıca, çalışmalar arasında cut-off değerlerindeki değişkenlik, kullanılan yöntemlerin (PCR veya İHK) farklılığı ve İHK yöntemi kullanılanlarda klonların farklı olması gibi faktörler, A3B'nin prognoz üzerindeki etkisinin tam olarak aydınlatılamamasına neden olmuştur. A3B ekspresyonunun hipermutasyona bağlı olarak karsinogenez ve tedavi direncini tetiklediği düşünülse de, hipermutasyon sonucunda artan neoantijen üretimi ilişkili artmış immün yanıtın prognoza olumlu etkisi, prognostik değerlendirmeyi karmaşık hale getirmektedir. Bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Tablo 31. Farklı kanser türlerinde A3B ifadesini İHK yöntemi kullanarak araştıran önceki çalışmaların özeti

Çalışma	Kanser Türü	Olgu Sayısı	APOBEC3B Klon	Cut-Off	Sonuç
Xia ve ark. (2021) (125)	Mide kanseri	482	ab191695	Minimal-p-değeri metodu (boyanma yüzdesi X boyanma yoğunluğu)	Yüksek A3B, daha kısa OS ve DFS ilişkilidir. A3B-yüksek/CD8+T lenfosit hastalar adjuvan kemoterapi ve PD-1 blokajı tedavisinden yararlanma olasılığı en fazla olan gruptur.
Mao ve ark. (2019) (126)	Meme kanseri	120	ab191695	%25 (Boyanma yüzdesi)	Yüksek A3B, kanser progresyonunda değişken bir role sahiptir. Özellikle luminal A grupta kötü prognoz ile ilişkilendirilirken, yüksek TIL seviyeleri ile ilişkisi nedeniyle sağkalıma olumlu etkiye sahiptir.
Xu ve ark. (2015) (127)	Renal hücreli karsinom	299	sc-130955	75.persentil (boyanma yüzdesi X boyanma yoğunluğu)	Yüksek A3B, düşük riske sahip RCC hasta grubunda daha belirgin olarak, RCC'lerde rekürrens bağımsız bir göstergesidir.

Tablo 31. Farklı kanser türlerinde A3B ifadesini İHK yöntemi kullanarak araştıran önceki çalışmaların özeti (devamı)

Çalışma	Kanser Türü	Olgu Sayısı	APOBEC3B Klon	Cut-Off	Sonuç
Liao ve ark. (2022) (128)	Servikal Adenokarsinom	58	Abcam	Median	Yüksek A3b, tümörögenezi indükler ve yüksek mutasyon yüküne sebep olur; buna rağmen iyi prognoz ile ilişkilidir. Neoantijenlerin immün yanıtın hedefi olması ile açıklanabilir.
Zhang ve ark. (2021) (129)	Gliom (WHO grade II-IV)	58	Proteintech	Median	Yüksek A3B, agresif klinikopatolojik özellikler, kötü prognoz ve immün yanıt ile ilişkilidir. Gelecekte immün tedavilerin optimize edilmesinde kullanılabilir.
Serebrenik ve ark. (2020) (87)	Overin berrak hücreli karsinomu	57	Abcam 184990 veya Proteintech 14559-1-ap	Median (Boyanma yüzdesi X boyanma yoğunluğu)	Yüksek A3B, iyi prognoz ile ilişkilidir ve platin içeren kemoterapilere cevap veren hastaları belirlemede biyobelirteç olarak kullanılabilir.
He ve ark. (2022) (4)	Ürotelyal karsinom	78	ab191695	Skor0-4: düşük, skor 6-9: yüksek (boyanan hücre oranı: 1-2-3) X (boyanma yoğunluğu: 1-2-3)	Yüksek A3B, iyi prognoz göstergesidir.
Argyris ve ark. (2023) (130)	Baş-boyunun primer mukozal melanomu	26	5210-87-13	Median	Yüksek A3B, mutajenik rol oynar.
Rüder ve ark. (2019) (131)	Yüksek dereceli seröz over kanseri	219	ab191695	Skor ≤4: düşük, skor >4 yüksek (boyanan hücre oranı: 1-2-3-4) X (boyanma yoğunluğu: 1-2-3)	Yüksek A3B, uzun DFS ve TIL yanıtı ile ilişkilidir.

Tablo 31’de özetlenen çalışmalarda da görüldüğü gibi, A3B ekspresyonunun iyi prognoz göstergesi olduğunu düşünen araştırmacılar, bu durumu artmış neoantijenlerin immün yanıtın hedefi olması ile açıklamaktadırlar. A3B ekspresyonunun, somatik mutasyonların birikmesini indükleyerek yüksek TMB oluşturduğu ve neoantijen üretimini arttırdığı moleküler düzeyde yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. İlgili bazı çalışmalar şunlardır:

Roper ve ark. tümör gelişimi ve tümör heterojenitesi mekanizmalarını aydınlatmak amacıyla hızlı otopsi ile elde edilmiş 40 metastatik torasik tümörü (33 metastatik akciğer adenokarsinomu ve 7 metastatik timik karsinom) incelemişlerdir. Çalışmalarında tüm ekzom sekanslama, transkriptom sekanslama, kopya sayısı değişiklikleri için SNP dizisi ve metastazlara ait kantitatif proteomik analizler için kütle spektrometresi teknikleri kullanılmıştır. Analiz sonuçları, artmış A3B ekspresyonun hipermutasyon ile ilişkili olduğunu göstermiştir (116).

Burns ve ark. 19 farklı kanser türünde gerçekleştirdikleri araştırmada, APOBEC ailesi üyelerinin hepsinin ekspresyon profillerini kapsamlı bir şekilde (toplam 4.800 ekzom ve 1.000.000 somatik mutasyon) analiz etmişlerdir. Bulgular, median tümör mutasyon yükü ile median APOBEC3B ekspresyon seviyeleri arasında güçlü bir pozitif korelasyon olduğunu desteklemiştir (Spearman $p = 0.0013$, $r = 0.68$) (132).

Driscoll ve ark. fare modeli kullanarak yaptıkları çalışmada, APOBEC3B ile modifiye edilmiş bir aşı kullanmış ve bunun immün kontrol noktası blokajı ile sinerjisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Sonuçlar, A3B’nin DNA mutasyonlarını indükleyerek kanser evrimi ve terapötik direnç yol açtığını; fakat aynı zamanda antitümöral T hücrelerini uyaran neoantijenlerin oluşumunu da tetiklediğini göstermiştir. Ayrıca, immün kontrol noktası blokajına karşı duyarlılığı da arttırdığını saptamışlardır (133).

Lin ve ark. altı farklı kanser türünden 533 hastadaa sürücü mutasyonları, mutasyon imzalarını, tümörle ilişkili neoantijenleri ve moleküler kanser gelişimini araştırmışlardır. Araştırmaya dahil edilen vakaların 129’u KRK’dır. Çalışmada, nükleik asitlerin ekstraksiyonu sonrasında sekanslama, her tümör için TMB hesaplaması ve immün yanıt gen ekspresyonunun değerlendirilmesi analizleri yapılmıştır. Sonuç olarak; hipermutant tümörlerde mutasyon imzası 1 (yaş ilişkili), mutasyon imzası 2 (APOBEC ilişkili), mutasyon imzası 11 (alkilleyici ajan ilişkili) ve mutasyon imzası 30’u (DNA

tamir mekanizması defekti ilişkili) belirgin olarak saptamışlardır (sırasıyla 31%, 9%, 24% ve 33%). Ayrıca, hipermutant tümörlerin diğerlerine göre immünoterapiye daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir (134).

Biz, bu moleküler verileri göz önünde bulundurarak, hipermutasyona sahip kanserlerin mutasyonel sürücüleri arasında yer alan A3B'nin TIL yanıtını arttırabileceğini öne sürmekteyiz. Yaptığımız çalışmada; A3B'nin KRK'larda immün yanıt üzerine etkileri incelenmiştir ve bilğimiz dahilinde, bu konudaki ilk araştırmadır. Analiz sonuçlarımızda, **yüksek A3B ekspresyonuna sahip vakaların, TIL-tümör merkezi ve TIL-invaziv sınır cevapları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p<0,001$ ve $p=0,015$, Mann Whitney U Testi).**

Sonuç olarak, A3B ekspresyonunun prognoza olan etkisi hakkında belirsizlik olsa da, çalışmamızın bulguları, yüksek TIL yanıtı nedeniyle A3B ekspresyonunun iyi prognoz ve uzun sağkalım ile ilişkilendirilebileceği yönündedir. Hatta, daha ileri çalışmalarla desteklenmesi halinde immünoterapiden fayda görebilecek gruplardan biri olabileceğini savunmaktayız.

Daha önce de belirttiğimiz gibi, vakalarımızdan yüksek A3B eksprese edenlerin DFS ve OS süreleri diğerlerinden daha uzun olmasına rağmen, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi. Fakat, vakaları A3B ve TIL seviyelerine göre gruplandırıdığımızda, **yüksek A3B ve yüksek veya orta TIL-tc seviyesine sahip olanların DFS ve OS sürelerinin düşük A3B ve düşük TIL-tc seviyesine sahip olanlardan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha uzun olduğu bulunmuştur (sırasıyla; $p=0,038$ ve $p=0,047$).** Bu bulgular, A3B'nin TIL yanıtını indükleyerek iyi klinik sonuçlara katkı sağladığı hipotezimizi desteklemektedir. Dolayısıyla, A3B ekspresyonunun TIL yanıtı ile birlikte değerlendirilmesinin klinik açıdan daha anlamlı olacağını düşünmekteyiz.

Genomik instabiliteden sorumlu olduğu bilinen en önemli belirteçlerden biri de, MMR gen durumudur (111). Günümüzde, klinik yaklaşımlar ve tedavi uygulamaları için yol gösterici olmuştur ve bu nedenle güncel bir araştırma konusu olmaya devam etmektedir.

KRK'ların yaklaşık %15'inde MSI saptanmaktadır (135). Ancak çalışmamızda, literatüre göre daha düşük oranda, vakalarımızın %8'inde MSI tespit edilmiştir. Bu

durum, çalışmamızın tek merkezli olması ve tam anlamıyla genel popülasyonu temsil edemeyebileceği şeklinde yorumlanabilir.

MSI tümörler içerisinde de dikkate değer genetik çeşitlilik ve moleküler heterojenite mevcuttur. Son zamanlarda yeni nesil dizileme (NGS) çalışmaları, MSH2 ve MSH6'nın birlikte mutasyonuna uğramasının, MLH1 ve PMS2'nin birlikte mutasyonuna göre daha yüksek bir TMB ile sonuçlandığını göstermiştir (136,137). Yeni gelişmeler ile birlikte MSI alt grupları da merak konusu olmuştur. Toyran ve ark. çalışmalarında, MSI tümörlerde en sık kaybın görülme şeklini sırasıyla; MLH1, MLH1/PMS2, MSH2/MSH6 olarak bulmuşlardır (138). Bizim çalışmamızda ise, MSI vakalarda mutasyon en sık MSH6 (%25), MLH1 (%20) ve MLH1-PMS2 (%20) olarak tespit edilmiştir.

MSI sporadik tümörler daha çok yaşlı kadın hastalarda görülürken, Lynch Sendromu ilişkili olanlar genellikle <50 yaş hastalarda ortaya çıkar. Bu durum, olasılıkla LS'da allellerden birisinin germline olarak doğuştan bulunması; sporadik KRK'larda ise her iki allelin de somatik inaktivasyonundan kaynaklanıyor olması ile açıklanmaktadır (139). Bizim çalışmamızda, MSI hasta grubunun yaş ortalaması 60,95±18,22 olarak saptanmıştır. Cinsiyetler arası dağılımda anlamlı bir farklılık görülmemiştir (p= 0,781).

Literatürde yer alan birçok çalışma, MSI'nın sağ kolon yerleşimli tümörlerde daha yaygın olduğunu belirtmektedir (138,140). Bu çalışmalardan biri, Yoon ve ark'nın 2028 KRK hastası üzerinde MSI'yı değerlendirdikleri çalışma olup; yerleşim yeri fark etmeksizin vakaların tamamında %10,2 oranında MSI saptanmıştır. Yerleşim yerlerine göre ayrı değerlendirildiğinde ise MSI oranı; sağ kolonda %21, sol kolonda %8, rektumda %5 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise, **sağ kolonda yerleşim gösteren tümörlerde MSI oranı %13,2 olup, bu oran istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksektir (p=0,032) ve rektumda yerleşim gösteren tümörlere kıyasla 9,915 kat daha fazladır.**

Özellikle müsinöz adenokarsinom olmakla birlikte andiferansiye karsinom ve taşlı yüzük hücreli karsinom subtiplerinde genetik olarak MSI insidansının yüksek olduğu bilinmektedir (96,138,141). Ancak çalışmamızda; adenokarsinom, NOS grubu ile diğer subtipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (univariate p=0,612, multiple p=0,806).

‘Pushing’ tarzda tümör sınır konfigürasyonunun, MSI görülme oranı yüksek KRK’larda sık rastlanan histopatolojik özelliklerden olduğu kabul edilmektedir (138,142). Ancak, Koelzer ve ark. çalışmalarında, MSI grupta sınır konfigürasyonunun alt gruplara göre farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Pushing tarzda büyüme paterninin MSI vakalarında, özellikle LS’unda, yaygın olduğunu; BRAF mutasyonuna sahip tümörlerde ise infiltrate edici tümör büyüme paterninin daha sık olduğunu gözlemlemişlerdir (82). Ancak, bizim çalışmamızda sınır konfigürasyonu ile MSI durumu arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p=0,448$).

Battaglin ve ark.’nın araştırmasında, KRK’larda MSI olasılığının, özellikle hastalığın evresine bağlı olarak değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir. Erken evrelerde (evre I ve II’de yaklaşık %20 ve evre III’te yaklaşık %12) daha yüksek bir insidans görülürken, metastatik olanlarda daha düşük insidans (%4-5) saptanmıştır (136). MSI’nın erken evrelerde daha yüksek insidans gösterdiği, literatürdeki birçok çalışma tarafından desteklenmektedir (140,143). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde; tüm vakalarımızda MSI oranı %8 iken, evre-1 hastaların %18,2’sinde MSI görülmüştür. Ayrıca, evre-4 (metastatik) hastaların tamamı MSS olup, MSI vakalarımızda metastaz görülmemiştir.

MSI tümörlerin daha erken evrelerde (TNM) görüldüğü, ancak ileri lokal invazyon (T) ile ilişkili olduğu saptanmıştır (140). Bu durum, MSI tümörlere karşı oluşan yüksek lenfosit yanıtı nedeniyle lenf nodu tutulumunun ve metastazın daha az görülmesiyle açıklanmıştır (144). Han ve ark.’nın T4bM0 grubu KRK’lar üzerinde yaptığı retrospektif çalışmada; MSI oranının bu hasta grubunda daha yüksek olduğu belirtilmiştir (145). Bizim çalışmamızda da, metastazdan bağımsız olarak T4b hastalarda MSI insidansı %28,6, T4bM0 hastalarda %33,4 olarak saptanmıştır ve literatür ile uyumlu şekilde daha yüksektir.

Histolojik grade ile MSI ilişkisi araştırıldığında, yüksek gradeli tümörlerde MSI oranının daha yüksek olduğu izlenmiştir (138,143). Bizim vakalarımızda, MSI oranı yüksek gradeli hastalarda %10, düşük gradeli hastalarda ise %7,7 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da, yüksek gradeli hastalarda MSI oranı daha fazladır ($p=0,668$).

MSI’nın belirlenmesi prognostik öneme sahiptir. Ancak, her ne kadar moleküler testler yaygınlaşmaya başlamış olsa da, bu testlerin her hastaya uygulanması mümkün

olmamaktadır çünkü yüksek maliyetlidir ve henüz dünya genelinde kolay erişilebilir değildir. Bu nedenle, en azından moleküler testlere yönlendirilecek hasta grubunun belirlenmesine yardımcı olabilecek parametreler araştırılmaktadır.

İmmünohistokimyasal yöntemler, bu hasta grubunun belirlenmesinde oldukça başarılıdır, ancak klinikopatolojik özelliklerin de ek katkısı olduğu kabul edilmektedir. Sağ kolon yerleşimli bir tümörde müsinöz farklılaşma, solid büyüme paterni, pushing tümör sınırı, intraepitelyal lenfositlerin ve Crohn benzeri lenfositik reaksiyonun varlığı gibi morfolojik özelliklerin eşlik etmesi durumunda, MSI için duyarlılığın %78, özgüllüğün %93'e olduğu düşünülmektedir (82,146). Fakat, Alenxander ve ark. 323 sporadik KRK vakasında yaptıkları çalışmada, MSI vakalarının histopatolojik bulgularla yaklaşık %40'ının güvenilir bir şekilde tespit edilemediğini, %6'sının ise hiç tespit edilemediğini belirtmişlerdir (142). Morfolojik değerlendirmenin, MSI moleküler analizini gerektiren hasta yönetimine ilişkin kararlardaki yeterliliği tartışmalıdır. Bizim çalışmamızda; ileri yaş kadın, sağ kolon, diğer histolojik subtip, itici tarz büyüme paterni, erken evre lokal ileri invazyon, TIL cevabı orta-yüksek ve CLR varlığı gibi MSI ile ilişkilendirilen kriterlerin en az bir tanesinin varlığı araştırıldığında, MSI hastalarını belirleme oranımız %100, en az iki tanesinin varlığı araştırıldığında %95 olarak bulunmuştur.

MSI tümörler, yüksek riskli histopatolojik alt tipler ve yüksek histolojik grade ile ilişkilendirilmiş olmalarına rağmen, iyi prognoza sahiptirler (49). Toh ve ark. MSI durumuna göre erken ve ileri evre KRK'larda prognozu değerlendirmek için 136 çalışmayı inceleyerek yaptıkları meta-analizde, MSI'nın daha yüksek sağkalım oranları ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (147). Simon ve ark. ise 509 KRK hastasının tümör DNA'sında yaptıkları moleküler analiz ile hastaları moleküler alt gruplara ayırmış ve uzun dönem (median takip süresi 8,4 yıl) takip etmişlerdir. MSI hastaların en iyi sağkalım sürelerine sahip olduğunu saptamışlardır (148). Bir başka çalışmada, Rosty ve ark. yüksek gradeli olanların sadece MSS hastalarda düşük gradeli olanlara göre daha kötü prognoza sahip olduğunu; fakat, MSI hastalarda bu durumun geçerli olmadığını tespit etmişlerdir. Bu nedenle, yüksek histolojik gradeli KRK'ların derecelendirilmesinin MSI durumuna göre yapılmasını önermişlerdir (149). Çalışmamızda, MSI vakalarda hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım sürelerinin daha uzun olduğu saptanmıştır, ancak ortalama değerleri

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (DFS, $p=0,234$ ve OS, $p=0,167$).

MSI tümörler hemen daima yüksek oranda mutasyon göstermektedirler. Diğer hipermutasyona sahip tümörlerde olduğu gibi, bu özellik genellikle hızlı tümör büyümesi ve ilaç direnci ile ilişkilendirilmektedir (114,150). Fakat buna rağmen MSI tümörler, MSS tümörlere kıyasla daha iyi prognoza ve daha uzun sağkalım sürelerine sahiptirler (151,152). MSI'nın sağkalım avantajının temelinde yatan faktörler tamamen anlaşılmamış olsa da, bu avantaj genellikle MSI tümör grubundaki belirgin lenfositik infiltrasyona bağlanmaktadır. Yüksek lenfosit yanıtı, aynı zamanda immünoterapiye verilen olumlu yanıtlarla da ilişkilidir ve üstelik MSI KRK'larda immünoterapinin kullanımı FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır (153,154).

Rodriguez ve ark. 848 KRK vakasını içeren çalışmalarında, MSI ile tümöre konakçının adaptif tepkisini temsil eden TIL düzeyini ve sağkalım üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. TIL yanıtının, MSI'larda daha yüksek olduğunu ve bunun MSI tümörlerin neoantijen yükü ile ilişkilendirilebileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, MSI hasta grubunda sağkalım sürelerini daha uzun bulmuşlardır (155).

Kendi hasta grubumuzda, MSI tümörlerin iyi prognoz ile ilişkisi ve immünoterapi yanıtından sorumlu, TIL yanıtı analiz edilmiştir. **MSI tümörlerde, TIL-im değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,008$; Mann Whitney U Testi).** Fakat bu tümörlerde TIL-tc değerleri yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p=0,166$; Mann Whitney U Testi). Bu bulgular eşliğinde; literatürdeki çalışmalara benzer şekilde MSI'nın TIL yanıtını arttırdığı; ancak peritümöral (invaziv sınır) stromal TIL yanıtının, tümör merkezi stromal TIL yanıtına göre MSI gösteren KRK'larda daha anlamlı olabileceği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, tümöre immün yanıtın prezantasyonlarından biri olan CLR ile MSI arasındaki ilişki de değerlendirilmiştir. **MSI'nın CLR ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($p=0,001$; Fisher's Exact Testi).** MSI olan hastalarda CLR oranı %40 iken, MSS olan hastalarda bu oranı %10,4 olarak bulunmuştur. Bu bulgular, peritümöral lenfoid agregatlarla karakterize edilen CLR'nun, MSI tümörlerde iyi prognoz ile ilişkilendirilen immün yanıtın önemli bir bileşeni

olduğunu düşündürmektedir. Rozek ve ark da çalışmalarında, CLR'un MSI tümörlerin ortak bir özelliği olduğunu ve iyi prognoz ile ilişkilendirilebileceğini belirtmişlerdir (71).

Mevcut veriler, genomik instabilitenin artmış immün yanıt ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Ancak, tümör ve tümör mikroçevresine ait çeşitli histopatolojik ve moleküler faktörlerin de immün yanıtı etkileyebileceği düşünülmektedir (65). Çalışmamızda, yüksek A3B ekspresyonuna sahip tümörlerde tümör merkezi ve invaziv sınırdaki belirgin immün yanıt izlenirken, MSI tümörlerde ise immün yanıt sadece invaziv sınırdaki belirgin olarak saptanmıştır. Ayrıca, MSI tümörlerde CLR artışı gözlenirken, yüksek A3B eksprese eden tümörlerde bu artış tespit edilmemiştir. Bu bulgular, tümör ve tümör mikroçevresi arasındaki etkileşimin, immün yanıtın seviyesini ve oluşum şeklini etkileyebilecek birçok faktörü içerdiğini desteklemektedir. Bu faktörlerin dikkate alınmasının ve bu konuda daha fazla araştırma yapılmasının, daha doğru klinik yorumlar için gerekli olduğu kanaatindeyiz.

Bazı araştırmacılar, karsinogenez esnasında MMR'nin APOBEC mutasyonlarını indükleyebileceği hipotezini öne sürmüşlerdir. Bu konuda belirli mekanizmalardan bahsedilmektedir:

Kanser genomunda, kümelenmiş mutasyonların 'omikli' olarak adlandırılan farklı bir mutasyon deseni tanımlanmıştır, bu mutasyonlar, tekrar etmeyen diffüz hipermutasyonlardır. Bilinen fokal hipermutasyonlar olan kataegis mutasyonlarından bağımsız bir şekilde meydana gelirler. A3'ün ihtiyaç duyduğu tek sarmallı DNA substratını sağlayabilen ve genom çapında A3 mutasyonların önemli bir kısmına katkıda bulunan, MMR yolunun aktivitesi ile ilişkilendirilirler. MMR, erken kopyalanan gen açısından zengin alanlara odaklanır. Bu nedenle A3 mutagenezi, tütün dumanı ve UV'ye maruz kalma gibi diğer yaygın kanserojenlerden daha etkili ve fazla mutasyonlar üretme eğilime sahiptir. Bu mekanizmalara dayanarak, MMR'nin APOBEC3 aracılı yaygın hipermutasyonu teşvik edebileceği düşünülmüştür (156).

MMR'nin APOBEC ilişkilendirilen mutasyonlara zemin hazırlayabileceğini ileri süren başka bir mekanizma da şu şekildedir: Normal genomik DNA, spontan deaminasyon ve metilasyonlar ile üretilen yüzlerce yanlış eşleşme içerir. Bu nedenle, mutasyonların onarılması ciddi bir genetik yük oluşturmaya rağmen, normal işleyişte her zaman onarımları gerçekleşir. Ancak yanlış eşleşme kontrol edilmediği durumlarda,

yüksek oranda mutasyonlar meydana gelebilir. Bu mutasyonların çoğu, APOBEC sitidin deaminazların substratı olan TpC motifinin C'ini içerir (157).

Ancak, literatürde A3B ekspresyonu ile MMR gen durumunun etkileşiminin histopatolojik ve klinik sonuçlar üzerindeki etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

Çalışmamızda, A3B ekspresyonu ve MMR gen durumunun etkileşimlerini araştırmak amacıyla vakalar dört gruba ayrılmış ve bu grupların TIL üzerine etkileri analiz edilmiştir. **A3B ve MMR durumu etkileşim gruplarının, TIL-tümör merkezi ve TIL-invaziv sınır üzerine etkileri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır (sırasıyla, $p<0,001$ ve $p=0,002$).** MSI grupların, lenfosit cevabı açısından mutlak avantajlı olduğu; MSS gruplarda ise, yüksek A3B ekspresyonuna sahip olanların lenfosit cevabının daha fazla olduğu görülmüştür. Pages ve ark. immünskor kategorilerini MSI durumuna göre sınıflandırdıkları çalışmada; MSI gruptaki vakaların %45'inin, MSS gruptaki vakaların %21'nin yüksek TIL seviyesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bu durumu, MSI'dan bağımsız yüksek TIL seviyesine sahip bir hasta grubunun olduğu ve araştırılması gerektiği şeklinde yorumlamışlardır (89). Elde ettiğimiz bulgular, A3B'nin bu hasta gruplarından olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamız, özgün bir araştırmadır ve birçok konuda literatürde ilk olma özelliğine sahiptir; ayrıca güncel çalışmalarda netlik kazanmamış, merak konusu olan, hastalık tedavisi ve seyrini belirgin şekilde etkileyebilecek konularda literatüre katkı sağlama ve yeni araştırmalara ışık tutma açısından önem taşımaktadır. Fakat çalışmamızın sınırlı kaldığı bazı yönleri olup yeni yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Birincisi, retrospektif, tek merkezli bir çalışma olmasıdır. Bu nedenle, bulgularımızın daha geniş bir popülasyonda çok merkezli ve prospektif çalışmalar ile doğrulanması gerekmektedir.

İkincisi, çalışma konumuz ile ilgili önceki araştırmaların kısıtlılığıdır. A3B İHK skoru için net bir cut-off değeri yoktur, bu durum tekrarlanabilirliği kısmen engelleyebilir. Gelecekteki çalışmalar ile A3B ifadesinin optimal sınırının belirlenmesi önem taşımaktadır. TIL cevabının değerlendirilmesiyle de ilgili daha fazla çalışma mevcut olsa da benzer kısıtlamalar geçerlidir.

Üçüncüsü, çalışmamızda moleküler düzeyde mutasyon imzalarının ve tümör mutasyon yükünün verilerinin mevcut olmamasıdır. Saptadığımız bulguların ilişkilerinin biyolojik mekanizmalarının kanıtlanarak analiz edildiği dolayısıyla moleküler çalışmaların da kullanıldığı daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Son olarak, tedavi alternatifleri ve tedaviye verilen yanıtlar ile ilgili gözlemlerin bulunmamasıdır. Klinik düzeyde, tedavi etkilerinin ve özellikle immünoterapi tedavisine duyarlı hastaları öngörme değerinin doğrulanması gerekmektedir.



6. SONUÇLAR

Tümöre karşı oluşan immün yanıt H&E kesitlerinde, invaziv sınırdaki TIL yanıtı, tümör merkezindeki TIL yanıtı ve CLR olarak 3 farklı şekilde incelenmiştir. Analiz sonuçları, değerlendirme alanı ve sunum şeklinden bağımsız olarak, immün yanıtın uzun DFS ve OS süreleri ve iyi prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ancak, **tümör merkezindeki TIL yanıtının daha güçlü bir prognostik belirteç olduğu tespit edilmiştir**. Bu bulguların, KRK'larda henüz standardize edilememiş olan immün yanıt değerlendirmesi konusunda literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Genomik instabiliteye sebep olan A3B ekspresyonun ve MSI'nın, artmış immün yanıt ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Yüksek A3B ekspresyonuna sahip tümörlerde, tümör merkezi ve invaziv sınırda belirgin immün yanıt izlenirken, MSI tümörlerde ise, immün yanıt sadece invaziv sınırda belirgin olarak saptanmıştır. Ek olarak, MSI tümörlerde CLR varlığı gözlenmiştir. Bu nedenle, **A3B ekspresyonu ve MSI'nın, TIL yanıtı ile ilişkili biyobelirteçler olduğunu ve gelecekteki immünoterapi tedavilerinde yanıt verecek hastaların belirlenmesinde kullanılabileceğini öne sürmekteyiz**.

Yüksek A3B ekspresyonunun ve MSI'nın, TIL yanıtını indüklemeleri sebebiyle, iyi prognoz ile ilişkilendirilebileceğini ve uzun sağkalım sürelerine katkıda bulunabileceğini savunmaktayız.

Bulgularımızın, literatürde henüz veri olmayan veya netleşmemiş önemli konulara ışık tuttuğunu, ancak daha fazla ve daha geniş çaplı çalışmalar ile desteklenmesinin gerekliliğini vurgulamaktayız.

KAYNAKLAR

1. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2023 Jan 28];13(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33922197/>
2. Fan A, Wang B, Wang X, Nie Y, Fan D, Zhao X, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: current achievements and future perspective. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2021 [cited 2023 Jan 28];17(14):3837. Available from: [/pmc/articles/PMC8495390/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3495390/)
3. Johdi NA, Sukor NF. Colorectal Cancer Immunotherapy: Options and Strategies. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Sep 18 [cited 2023 Jan 28];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33042104/>
4. Kim H, Kim O, Lee MA, Lee JY, Hong SH, Ha US, et al. Prognostic impact of APOBEC3B expression in metastatic urothelial carcinoma and its association with tumor-infiltrating cytotoxic T cells. *Current Oncology*. 2021 Jun 1;28(3):1652–62.
5. Guo H, Zhu L, Huang L, Sun Z, Zhang H, Nong B, et al. APOBEC Alteration Contributes to Tumor Growth and Immune Escape in Pan-Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2022 Jun 8 [cited 2023 Jan 28];14(12). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35740493>
6. Jakobsdottir GM, Brewer DS, Cooper C, Green C, Wedge DC. APOBEC3 mutational signatures are associated with extensive and diverse genomic instability across multiple tumour types. *BMC Biol*. 2022 Dec 1;20(1).
7. Fountzilias E, Kurzrock R, Vo HH, Tsimberidou AM. Wedding of Molecular Alterations and Immune Checkpoint Blockade: Genomics as a Matchmaker. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2021 Nov 29;113(12):1634–47.
8. Driscoll CB, Schuelke MR, Kottke T, Thompson JM, Wongthida P, Tonne JM, et al. APOBEC3B-mediated corruption of the tumor cell immunopeptidome induces heteroclitic neoepitopes for cancer immunotherapy. *Nat Commun*. 2020 Dec 1;11(1).

9. Wen WX, Soo JSS, Kwan PY, Hong E, Khang TF, Mariapun S, et al. Germline APOBEC3B deletion is associated with breast cancer risk in an Asian multi-ethnic cohort and with immune cell presentation. *Breast Cancer Research*. 2016 May 27;18(1).
10. Wang S, Jia M, He Z, Liu XS. APOBEC3B and APOBEC mutational signature as potential predictive markers for immunotherapy response in non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2018 Jul 19;37(29):3924–36.
11. Vacher S, Suybeng V, Girard E, Masliah Planchon J, Thomson G, le Goux C, et al. Genomic Instability Signature of Palindromic Non-Coding Somatic Mutations in Bladder Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Oct 8 [cited 2023 Jan 28];12(10):1–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33049910>
12. Embryology, Bowel - StatPearls - NCBI Bookshelf. In [cited 2023 Apr 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545247/>
13. La NG Man's Embryology. *embryology*.
14. Larsen's human embryology - Google'da Ara [Internet]. [cited 2023 Sep 24]. Available from: https://www.google.com/search?q=larsen%27s+human+embryology&oq=larsens&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUqCQgCEAAAYChiABDIGCAAQRRg5MgkIARAAGAoYgAQyCQgCEAAAYChiABDIJCAMQABgKGIAEMgkIBBAAGAoYgAQyCQgFEAAAYChiABDIJCAYQABgKGIAEMgYIBxAAGB4yCAgIEAAAYChgeMg4ICRAuGAoYHhjHARjRA9IBCDU2NzZqMGo3qAIAAsAIA&sourceid=chrome&ie=UTF-8
15. Kostouros A, Koliarakis I, Natsis K, Spandidos DA, Tsatsakis A, Tsiaoussis J. Large intestine embryogenesis: Molecular pathways and related disorders (Review). *Int J Mol Med* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2023 Jan 29];46(1):27–57. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2020.4583/abstract>
16. Netter FH (Frank H, Machado CAG, Neumann PE, Tubbs RS, Brueckner JK, Gdowski MJ, et al. *Netter atlas of human anatomy : classic regional approach*. :202.
17. -1 Replacing Tissues and Organs. 2007.
18. *Gray's Basic Anatomy-Elsevier* (2022).

19. Ellis H. Anatomy of the caecum, appendix and colon. *Surgery*. 2011;29:1–4.
20. Kassam Z, Lang R, Arya S, Bates DDB, Chang KJ, Fraum TJ, et al. Update to the structured MRI report for primary staging of rectal cancer: Perspective from the SAR Disease Focused Panel on Rectal and Anal Cancer. *Abdominal Radiology*. 2022;
21. Textbook of Histology: 5th edition | Leslie P. Gartner | ISBN: 9780323672726 | Elsevier Asia Bookstore [Internet]. [cited 2023 Sep 26]. Available from: <https://www.asia.elsevierhealth.com/textbook-of-histology-9780323672726.html>
22. Mills SE. Histology for pathologists 4th edition.
23. Lindberg MR. <https://t.me/MedicalBooksStore> [Internet]. Available from: <https://t.me/MedicalBooksStore>
24. SEER-CancerStatisticsReview.
25. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3).
26. Kanser_Rapor_2018.
27. Sninsky JA, Shore BM, Lupu G V., Crockett SD. Risk Factors for Colorectal Polyps and Cancer. *Gastrointest Endosc Clin N Am* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2023 Aug 24];32(2):195–213. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35361331/>
28. Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Aug 24];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30646512/>
29. Sinicrope FA. Lynch Syndrome-Associated Colorectal Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Aug 23 [cited 2023 Aug 24];379(8):764–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30134129/>
30. Hampel H, Kalady MF, Pearlman R, Stanich PP. Hereditary Colorectal Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2023 Aug 24];36(3):429–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35577708/>

31. Shah SC, Itzkowitz SH. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. *Gastroenterology* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2023 Aug 24];162(3):715-730.e3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34757143/>
32. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis.
33. Malki A, Elruz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 130 [Internet]. 2020 Dec 24 [cited 2023 Sep 24];22(1):130. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/1/130/htm>
34. Bian J, Dannappel M, Wan C, Firestein R. Transcriptional Regulation of Wnt/ β -Catenin Pathway in Colorectal Cancer. *Cells* [Internet]. 2020 Sep 19 [cited 2023 Aug 25];9(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32961708/>
35. De'angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De'angelis N, Leandro G, Di Mario F, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Bio Medica : Atenei Parmensis* [Internet]. 2018 [cited 2023 Aug 27];89(Suppl 9):97. Available from: </pmc/articles/PMC6502181/>
36. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research* 2008 18:1 [Internet]. 2007 Dec 24 [cited 2023 Aug 27];18(1):85–98. Available from: <https://www.nature.com/articles/cr2007115>
37. Lynch JP, Hoops TC. The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematology/Oncology Clinics* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2023 Aug 27];16(4):775–810. Available from: <http://www.hemonc.theclinics.com/article/S0889858802000291/fulltext>
38. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol* [Internet]. 2015 Jun 16 [cited 2023 Aug 27];89(6):899–921. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25701956/>
39. Iacopetta B, Grieco F, Amanuel B. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2023 Aug 27];6(4):260–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21114775/>

40. Wu M, Kim YS, Ryu HS, Choi SC, Kim KY, Park WC, et al. MSI status is associated with distinct clinicopathological features in BRAF mutation colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Aug 28];216(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31866097/>
41. Amemiya K, Hirotsu Y, Nagakubo Y, Watanabe S, Amemiya S, Mochizuki H, et al. Simple IHC reveals complex MMR alternations than PCR assays: Validation by LCM and next-generation sequencing. *Cancer Med* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Sep 24];11(23):4479–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35596629/>
42. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, Burgart LJ, Smyrk TC, Shimizu D, et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* [Internet]. 2007 [cited 2023 Aug 27];133(1):48–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17631130/>
43. Dudley JC, Lin MT, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2016 Feb 15 [cited 2023 Aug 27];22(4):813–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26880610/>
44. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2023 Aug 27];19(3):133–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30755690/>
45. Lizardo DY, Kuang C, Hao S, Yu J, Huang Y, Zhang L. Immunotherapy efficacy on mismatch repair-deficient colorectal cancer: From bench to bedside. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2020 Dec 1;1874(2):188447.
46. Chang SC, Li AFY, Lin PC, Lin CC, Lin HH, Huang SC, et al. Clinicopathological and Molecular Profiles of Sporadic Microsatellite Unstable Colorectal Cancer with or without the CpG Island Methylator Phenotype (CIMP). *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Aug 25];12(11):1–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33238621/>

47. Mark Redston DKD. Epithelial Neoplasms of the Large Intestine. In: Robert D. Odze M, FRCP(C), John R. Goldblum, MD, editor. *Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas*. 3 ed: Elsevier; 2015. p. 737-77.
48. Remo A, Fassan M, Vanoli A, Bonetti LR, Barresi V, Tatangelo F, et al. Morphology and Molecular Features of Rare Colorectal Carcinoma Histotypes. *Cancers* 2019, Vol 11, Page 1036 [Internet]. 2019 Jul 23 [cited 2023 Aug 26];11(7):1036. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/7/1036/html>
49. Id N, Mj A, Rd O, Ak L. Tumours of the colon and rectum. *WHO Classification of tumours of digestive system*. 5 ed 2019. p. 156-88.
50. Cervena K, Siskova A, Buchler T, Vodicka P, Vymetalkova V. Methylation-Based Therapies for Colorectal Cancer. *Cells*. 2020 Jun 24;9(6).
51. Wang W, Kandimalla R, Huang H, Zhu L, Li Y, Gao F, et al. Molecular subtyping of colorectal cancer: Recent progress, new challenges and emerging opportunities. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2023 Aug 26];55:37–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29775690/>
52. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2023 Aug 26];21(11):1350–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26457759/>
53. Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2023 Aug 25];469(2):125–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27325016/>
54. PD D, DG M, CA B, PG O, HL B, R C, et al. Challenging the Cancer Molecular Stratification Dogma: Intratumoral Heterogeneity Undermines Consensus Molecular Subtypes and Potential Diagnostic Value in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2016 [cited 2023 Aug 27];22(16). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27151745/>
55. Zhou P, Cao Y, Li M, Ma Y, Chen C, Gan X, et al. HCCANet: histopathological image grading of colorectal cancer using CNN based on multichannel fusion

- attention mechanism. *Scientific Reports* 2022 12:1 [Internet]. 2022 Sep 6 [cited 2023 Sep 26];12(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-18879-1>
56. Weiser MR. *AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer*. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2023 Aug 26];25(6):1454–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29616422/>
 57. Salibasic M, Pusina S, Bicakcic E, Pasic A, Gavric I, Kulovic E, et al. Colorectal Cancer Surgical Treatment, our Experience. *Med Arch* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Aug 27];73(6):412–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32082011/>
 58. Zhang C, Stampfl-Mattersberger M, Ruckser R, Sebesta C. [Colorectal cancer]. *Wien Med Wochenschr* [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2023 Aug 27];173(9–10):216–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36348129/>
 59. Lièvre A, Ouine B, Canet J, Cartier A, Amar Y, Cacheux W, et al. Correction: Protein biomarkers predictive for response to anti-EGFR treatment in RAS wild-type metastatic colorectal carcinoma. *Br J Cancer* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2023 Aug 27];119(3):387. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29899390/>
 60. Corcoran RB, Andre T, Atreya CE, Schellens JHM, Yoshino T, Bendell JC, et al. Combined BRAF, EGFR, and MEK Inhibition in Patients with BRAFV600E-Mutant Colorectal Cancer. *Cancer Discov* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2023 Aug 27];8(4):428–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29431699/>
 61. Ganesh K. Optimizing immunotherapy for colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Aug 27];19(2):93. Available from: [/pmc/articles/PMC9487162/](https://pmc/articles/PMC9487162/)
 62. Yang M, Olaoba OT, Zhang C, Kimchi ET, Staveley-O’Carroll KF, Li G. Cancer Immunotherapy and Delivery System: An Update. *Pharmaceutics* 2022, Vol 14, Page 1630 [Internet]. 2022 Aug 4 [cited 2023 Sep 28];14(8):1630. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/8/1630/htm>

63. Jardim DL, Goodman A, de Melo Gagliato D, Kurzrock R. The Challenges of Tumor Mutational Burden as an Immunotherapy Biomarker. *Cancer Cell* [Internet]. 2021 Feb 8 [cited 2023 Oct 1];39(2):154–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33125859/>
64. Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2023 Aug 29];17(8):807. Available from: [/pmc/articles/PMC7395159/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33125859/)
65. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* (1979) [Internet]. 2006 Sep 29 [cited 2023 Aug 29];313(5795):1960–4. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1129139>
66. Nosho K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2023 Aug 29];222(4):350. Available from: [/pmc/articles/PMC3033700/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33125859/)
67. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* [Internet]. 2013 Oct 17 [cited 2023 Aug 28];39(4):782–95. Available from: <http://www.cell.com/article/S1074761313004378/fulltext>
68. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest* [Internet]. 2013 Aug 8 [cited 2023 Aug 28];123(8):3446. Available from: [/pmc/articles/PMC3726160/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33125859/)
69. McFarland DC, Jutagir DR, Miller AH, Breitbart W, Nelson C, Rosenfeld B. Tumor Mutation Burden and Depression in Lung Cancer: Association With Inflammation. *J Natl Compr Canc Netw* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2023 Aug 28];18(4):434–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32259781/>

70. Klintrup K, Mäkinen JM, Kauppila S, Väre PO, Melkko J, Tuominen H, et al. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* [Internet]. 2005 Nov [cited 2023 Aug 28];41(17):2645–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16239109/>
71. Rozek LS, Schmit SL, Greenson JK, Tomsho LP, Rennert HS, Rennert G, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Crohn’s-Like Lymphoid Reaction, and Survival From Colorectal Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2023 Aug 29];108(8). Available from: </pmc/articles/PMC5017930/>
72. Seplyarskiy VB, Soldatov RA, Popadin KY, Antonarakis SE, Bazykin GA, Nikolaev SI. APOBEC-induced mutations in human cancers are strongly enriched on the lagging DNA strand during replication. *Genome Res* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2023 Aug 30];26(2):174. Available from: </pmc/articles/PMC4728370/>
73. Salter JD, Bennett RP, Smith HC. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2023 Aug 30];41(7):578. Available from: </pmc/articles/PMC4930407/>
74. Petljak M, Alexandrov LB, Brummel JS, Price S, Wedge DC, Grossmann S, et al. Characterizing Mutational Signatures in Human Cancer Cell Lines Reveals Episodic APOBEC Mutagenesis. *Cell* [Internet]. 2019 Mar 3 [cited 2023 Aug 30];176(6):1282. Available from: </pmc/articles/PMC6424819/>
75. Taylor BJM, Nik-Zainal S, Wu YL, Stebbings LA, Raine K, Campbell PJ, et al. DNA deaminases induce break-associated mutation showers with implication of APOBEC3B and 3A in breast cancer kataegis. *Elife* [Internet]. 2013 Apr 16 [cited 2023 Aug 30];2(2):534. Available from: </pmc/articles/PMC3628087/>
76. Zou J, Wang C, Ma X, Wang E, Peng G. APOBEC3B, a molecular driver of mutagenesis in human cancers. *Cell Biosci* [Internet]. 2017 May 30 [cited 2023 Aug 30];7(1):1–7. Available from: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-017-0156-4>
77. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, Greenman CD, Raine K, et al. Mutational Processes Molding the Genomes of 21 Breast Cancers. *Cell*

- [Internet]. 2012 May 5 [cited 2023 Aug 30];149(5–10):979. Available from: [/pmc/articles/PMC3414841/](#)
78. Song JH, Dávalos LM, Maccarthy T, Damaghi M. Role of APOBEC in cancer intratumor heterogeneity Evolvability of cancer-associated genes under APOBEC3A/B selection. [cited 2023 Aug 30]; Available from: <https://doi.org/10.1101/2023.08.27.554991>
 79. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 2002 418:6898 [Internet]. 2002 Jul 14 [cited 2023 Aug 30];418(6898):646–50. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature00939>
 80. Faden DL, Ding F, Lin Y, Zhai S, Kuo F, Chan TA, et al. APOBEC mutagenesis is tightly linked to the immune landscape and immunotherapy biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2023 Aug 31];96:140. Available from: [/pmc/articles/PMC7492081/](#)
 81. Swanton C, McGranahan N, Starrett GJ, Harris RS. APOBEC Enzymes: Mutagenic Fuel for Cancer Evolution and Heterogeneity. *Cancer Discov* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2023 Aug 31];5(7):704–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26091828/>
 82. Koelzer VH, Lugli A. The Tumor Border Configuration of Colorectal Cancer as a Histomorphological Prognostic Indicator. *Front Oncol* [Internet]. 2014 [cited 2023 Sep 3];4. Available from: [/pmc/articles/PMC3927120/](#)
 83. Karamitopoulou E, Zlobec I, Koelzer VH, Langer R, Dawson H, Lugli A. Tumour border configuration in colorectal cancer: proposal for an alternative scoring system based on the percentage of infiltrating margin. *Histopathology* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2023 Sep 3];67(4):464–73. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/his.12665>
 84. Etiologic Insights From Surface Adjustment of Colorectal Car... : Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG [Internet]. [cited 2023 Sep 1]. Available from: https://journals.lww.com/ajg/abstract/2008/11000/etiologic_insights_from_surface_adjustment_of.28.aspx

85. Dai W, Li Y, Meng X, Cai S, Li Q, Cai G. Does tumor size have its prognostic role in colorectal cancer? Re-evaluating its value in colorectal adenocarcinoma with different macroscopic growth pattern. *International Journal of Surgery*. 2017 Sep 1;45:105–12.
86. Guyot D'Asnières De Salins A, Tachon G, Cohen R, Karayan-Tapon L, Junca A, Frouin E, et al. Discordance between immunochemistry of mismatch repair proteins and molecular testing of microsatellite instability in colorectal cancer. *ESMO Open* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2023 Sep 1];6(3):100120. Available from: [/pmc/articles/PMC8102173/](https://pmc/articles/PMC8102173/)
87. Serebrenik AA, Argyris PP, Jarvis MC, Brown WL, Bazzaro M, Vogel RI, et al. The DNA Cytosine Deaminase APOBEC3B is a Molecular Determinant of Platinum Responsiveness in Clear Cell Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2020 Jul 7 [cited 2023 Sep 2];26(13):3397. Available from: [/pmc/articles/PMC7334080/](https://pmc/articles/PMC7334080/)
88. Salgado R, Fox S, Anat A, Author P. Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the host immune response, TILs in invasive breast carcinoma and ductal carcinoma in situ, metastatic tumor deposits and areas for further research HHS Public Access Author manuscript. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(5):235–51.
89. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet* [Internet]. 2018 May 26 [cited 2023 Sep 3];391(10135):2128–39. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S014067361830789X/fulltext>
90. Lea D, Watson M, Skaland I, Hagland HR, Lillesand M, Gudlaugsson E, et al. A template to quantify the location and density of CD3 + and CD8 + tumor-infiltrating lymphocytes in colon cancer by digital pathology on whole slides for an objective, standardized immune score assessment. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2023 Sep 3];70(7):2049. Available from: [/pmc/articles/PMC8195795/](https://pmc/articles/PMC8195795/)

91. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of Oncology* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2023 Sep 3];26(2):259. Available from: [/pmc/articles/PMC6267863/](#)
92. Ueno H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Shinto E, Kajiwarra Y, Nakanishi K, et al. Objective Criteria for Crohn-like Lymphoid Reaction in Colorectal Cancer. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2023 Sep 3];139(4):434–41. Available from: <https://dx.doi.org/10.1309/AJCPWHUEFTGBWKE4>
93. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny* [Internet]. 2019 [cited 2023 Sep 7];14(2):89–103. Available from: <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
94. Moore KJ, Sussman DA, Koru-Sengul T. Peer Reviewed: Age-Specific Risk Factors for Advanced Stage Colorectal Cancer, 1981–2013. *Prev Chronic Dis* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2023 Sep 7];15(8):170274. Available from: [/pmc/articles/PMC6110401/](#)
95. Baidoun F, Elshiwly K, Elkeraiye Y, Merjaneh Z, Khoudari G, Sarmini MT, et al. Colorectal Cancer Epidemiology: Recent Trends and Impact on Outcomes. *Curr Drug Targets*. 2020 Nov 19;22(9):998–1009.
96. Miyakawa T, Kawamura H, Honda M, Takano Y, Kinuta S, Kamiga T, et al. Impact of histological subtype on prognosis in stage IV colorectal cancer: A population-based cohort study. *PLoS One* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2023 Sep 8];17(3). Available from: [/pmc/articles/PMC8893698/](#)
97. Li X, Sun K, Liao X, Gao H, Zhu H, Xu R. Colorectal carcinomas with mucinous differentiation are associated with high frequent mutation of KRAS or BRAF mutations, irrespective of quantity of mucinous component. *BMC Cancer* [Internet]. 2020 May 8 [cited 2023 Sep 8];20(1):1–7. Available from: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-020-06913-2>

98. Benson AB, Bekaii-Saab T, Chan E, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS, et al. Localized colon cancer, version 3.2013: featured updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* [Internet]. 2013 [cited 2023 Sep 13];11(5):519–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23667203/>
99. Mei Z, Liu Y, Liu C, Cui A, Liang Z, Wang G, et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* [Internet]. 2014 Mar 3 [cited 2023 Sep 13];110(6):1595. Available from: [/pmc/articles/PMC3960618/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25360618/)
100. Bruni D, Angell HK, Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Sep 13];20(11):662–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32753728/>
101. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, et al. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med* [Internet]. 2012 Jan 3 [cited 2023 Sep 13];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22214470/>
102. Väyrynen JP, Sajanti SA, Klintrup K, Mäkelä J, Herzig KH, Karttunen TJ, et al. Characteristics and significance of colorectal cancer associated lymphoid reaction. *Int J Cancer* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2023 Sep 13];134(9):2126–35. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.28533>
103. Iseki Y, Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Fukuoka T, Matsutani S, et al. A new method for evaluating tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer using hematoxylin and eosin (H-E)-stained tumor sections. *PLoS One* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2023 Sep 13];13(4). Available from: [/pmc/articles/PMC5919485/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/)
104. Huh JW, Lee JH, Kim HR. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Colorectal Cancer. *Archives of Surgery* [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2023 Sep 14];147(4):366–72. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamasurgery/fullarticle/1151010>
105. Funada Y, Noguchi T, Kikuchi R, Takeno S, Uchida Y, Gabbert HE. Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal

- cancer. *Oncol Rep* [Internet]. 2003 Mar 1 [cited 2023 Sep 14];10(2):309–13. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.10.2.309/abstract>
106. Chiba T, Ohtani H, Mizoi T, Naito Y, Sato E, Nagura H, et al. Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *Br J Cancer* [Internet]. 2004 Nov 1 [cited 2023 Oct 11];91(9):1711–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15494715/>
 107. Menon AG, Janssen-Van Rhijn CM, Morreau H, Putter H, Tollenaar RAEM, Van De Velde CJH, et al. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest* [Internet]. 2004 [cited 2023 Oct 11];84(4):493–501. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14968119/>
 108. Frey DM, Droeser RA, Viehl CT, Zlobec I, Lugli A, Zingg U, et al. High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int J Cancer* [Internet]. 2010 Jun 1 [cited 2023 Oct 11];126(11):2635–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19856313/>
 109. Deschoolmeester V, Baay M, Lardon F, Pauwel P, Peeters M. Immune Cells in Colorectal Cancer: Prognostic Relevance and Role of MSI. *Cancer Microenvironment* [Internet]. 2011 Dec [cited 2023 Oct 11];4(3):377. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2234325/>
 110. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 2012 12:4 [Internet]. 2012 Mar 22 [cited 2023 Sep 8];12(4):252–64. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc3239>
 111. Chen M, Linstra R, van Vugt MATM. Genomic instability, inflammatory signaling and response to cancer immunotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2022 Jan 1;1877(1):188661.
 112. Germano G, Lamba S, Rospo G, Barault L, Magri A, Maione F, et al. Inactivation of DNA repair triggers neoantigen generation and impairs tumour growth. *Nature*

- 2017 552:7683 [Internet]. 2017 Nov 29 [cited 2023 Sep 8];552(7683):116–20. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature24673>
113. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Dec 12 [cited 2023 Sep 15];377(25):2500. Available from: [/pmc/articles/PMC6549688/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27149842/)
 114. Giannakis M, Mu XJ, Shukla SA, Qian ZR, Cohen O, Nishihara R, et al. Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma. *Cell Rep* [Internet]. 2016 Apr 26 [cited 2023 Sep 8];15(4):857–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27149842/>
 115. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin A V., et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013 500:7463 [Internet]. 2013 Aug 14 [cited 2023 Sep 8];500(7463):415–21. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature12477>
 116. Roper N, Gao S, Maity TK, Banday AR, Zhang X, Venugopalan A, et al. APOBEC Mutagenesis and Copy-Number Alterations Are Drivers of Proteogenomic Tumor Evolution and Heterogeneity in Metastatic Thoracic Tumors. *Cell Rep*. 2019 Mar 5;26(10):2651-2666.e6.
 117. Burns MB, Temiz NA, Harris RS. Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Sep [cited 2023 Sep 9];45(9):977. Available from: [/pmc/articles/PMC3902892/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27149842/)
 118. Kim Y seok, Sun DS, Yoon J sook, Ko YH, Won HS, Kim JS. Clinical implications of APOBEC3A and 3B expression in patients with breast cancer. *PLoS One* [Internet]. 2020 [cited 2023 Sep 9];15(3):e0230261. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0230261>
 119. Jafarpour S, Yazdi M, Nedaeinia R, Ghobakhloo S, Salehi R. Unfavorable prognosis and clinical consequences of APOBEC3B expression in breast and other cancers: A systematic review and meta-analysis. *Tumor Biology*. 2022 Jan 1;44(1):153–69.
 120. Roberts SA, Lawrence MS, Klimczak LJ, Grimm SA, Fargo D, Stojanov P, et al. An APOBEC Cytidine Deaminase Mutagenesis Pattern is Widespread in Human

- Cancers. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Sep [cited 2023 Sep 9];45(9):970. Available from: [/pmc/articles/PMC3789062/](#)
121. Roufas C, Georgakopoulos-Soares I, Zaravinos A. Molecular correlates of immune cytolytic subgroups in colorectal cancer by integrated genomics analysis. *NAR Cancer* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2023 Sep 9];3(1). Available from: [/pmc/articles/PMC8210146/](#)
 122. Li P, Meng Q, Xue Y, Teng Z, Chen H, Zhang J, et al. Comprehensive genomic profiling of colorectal cancer patients reveals differences in mutational landscapes among clinical and pathological subgroups. *Front Oncol* [Internet]. 2022 Nov 10 [cited 2023 Sep 9];12. Available from: [/pmc/articles/PMC9685809/](#)
 123. Zou Q, Wang X, Ren D, Hu B, Tang G, Zhang Y, et al. DNA methylation-based signature of CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes enables evaluation of immune response and prognosis in colorectal cancer. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2021 [cited 2023 May 3];9:2671. Available from: <http://jitc.bmj.com/>
 124. Karihtala P, Porvari K, Kilpivaara O. Mutational Signatures Associate With Survival in Gastrointestinal Carcinomas. *Cancer Genomics Proteomics* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2023 Sep 9];19(5):556. Available from: [/pmc/articles/PMC9353727/](#)
 125. Xia S, Gu Y, Zhang H, Fei Y, Cao Y, Fang H, et al. Immune inactivation by APOBEC3B enrichment predicts response to chemotherapy and survival in gastric cancer. *Oncoimmunology* [Internet]. 2021 [cited 2023 Oct 10];10(1). Available from: [/pmc/articles/PMC8451457/](#)
 126. Mao Y, Lv M, Zhang Y, Nie G, Cui J, Wang Y, et al. APOBEC3B expression and its prognostic potential in breast cancer. *Oncol Lett* [Internet]. 2020 [cited 2023 Sep 17];19(4):3205. Available from: [/pmc/articles/PMC7074638/](#)
 127. Xu L, Chang Y, An H, Zhu Y, Yang Y, Xu J. High APOBEC3B expression is a predictor of recurrence in patients with low-risk clear cell renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2015 Aug 1;33(8):340.e1-340.e8.

128. Liao X, Xia X, Su W, Yan H, Ma Y, Xu L, et al. Association of recurrent APOBEC3B alterations with the prognosis of gastric-type cervical adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2023 Sep 15];165(1):105–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35151492/>
129. Zhang H, Chen Z, Wang Z, Dai Z, Hu Z, Zhang X, et al. Correlation Between APOBEC3B Expression and Clinical Characterization in Lower-Grade Gliomas. *Front Oncol*. 2021 Mar 26;11:625838.
130. Argyris PP, Naumann J, Jarvis MC, Wilkinson PE, Ho DP, Islam MN, et al. Primary mucosal melanomas of the head and neck are characterised by overexpression of the DNA mutating enzyme APOBEC3B. *Histopathology* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2023 Oct 10];82(4):608–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36416305/>
131. Rüder U, Denkert C, Kunze CA, Jank P, Lindner J, Jöhrens K, et al. APOBEC3B protein expression and mRNA analyses in patients with high-grade serous ovarian carcinoma. *Histol Histopathol* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2023 Sep 16];34(4):405–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30289149/>
132. Burns MB, Temiz NA, Harris RS. Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Sep [cited 2023 Sep 9];45(9):977. Available from: [/pmc/articles/PMC3902892/](https://pmc/articles/PMC3902892/)
133. Driscoll CB, Schuelke MR, Kottke T, Thompson JM, Wongthida P, Tonne JM, et al. APOBEC3B-mediated corruption of the tumor cell immunopeptidome induces heteroclitic neoepitopes for cancer immunotherapy. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Sep 15];11(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7005822/](https://pmc/articles/PMC7005822/)
134. Lin PC, Yeh YM, Hsu HP, Chan RH, Lin BW, Chen PC, et al. Comprehensively exploring the mutational landscape and patterns of genomic evolution in hypermutated cancers. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2023 Sep 9];13(17). Available from: [/pmc/articles/PMC8431047/](https://pmc/articles/PMC8431047/)
135. Hu J, Yan WY, Xie L, Lei C, Mi Y, Li L, et al. Coexistence of MSI with KRAS mutation is associated with worse prognosis in colorectal cancer. *Medicine*

- [Internet]. 2016 [cited 2023 Sep 10];95(50):e5649. Available from: /pmc/articles/PMC5268058/
136. Battaglin F, Naseem M, Lenz HJ, Salem ME. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer: Overview of Its Clinical Significance and Novel Perspectives. *Clin Adv Hematol Oncol* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2023 Sep 10];16(11):735. Available from: /pmc/articles/PMC7493692/
 137. Salem ME, Grothey A, Kim ES, Xiu J, Goldberg RM, Korn WM, et al. Impact of MLH1, PMS2, MSH2, and MSH6 alterations on tumor mutation burden (TMB) and PD-L1 expression in 1,057 microsatellite instability-high (MSI-H) tumors. https://doi.org/101200/JCO20183615_suppl3572. 2018 Jun 1;36(15_suppl):3572–3572.
 138. Toyran T, Erdoğan KE, Kılıç Bağır E, Açıkalın A, Aksın M, Paydaş S, et al. Effect of microsatellite instability on histopathological parameters and prognosis in colon cancers Kolon kanserlerinde mikrosatellite instabilitenin histopatolojik parametreler ve prognoz üzerine etkisi. *Cukurova Medical Journal Cukurova Med J*. 2023;48(1):1–10.
 139. De’angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De’angelis N, Leandro G, Di Mario F, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Bio Medica : Atenei Parmensis* [Internet]. 2018 [cited 2023 Sep 10];89(Suppl 9):97. Available from: /pmc/articles/PMC6502181/
 140. Kang S, Na Y, Joung SY, Lee S Il, Oh SC, Min BW. The significance of microsatellite instability in colorectal cancer after controlling for clinicopathological factors. *Medicine* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 Sep 10];97(9). Available from: /pmc/articles/PMC5851768/
 141. Reynolds IS, Furney SJ, Kay EW, McNamara DA, Prehn JHM, Burke JP. Meta-analysis of the molecular associations of mucinous colorectal cancer. *British Journal of Surgery* [Internet]. 2019 Apr 11 [cited 2023 Sep 11];106(6):682–91. Available from: <https://dx.doi.org/10.1002/bjs.11142>

142. Alexander J, Watanabe T, Wu TT, Rashid A, Li S, Hamilton SR. Histopathological Identification of Colon Cancer with Microsatellite Instability. *Am J Pathol*. 2001 Feb 1;158(2):527–35.
143. Mei WJ, Mi M, Qian J, Xiao N, Yuan Y, Ding PR. Clinicopathological characteristics of high microsatellite instability/mismatch repair-deficient colorectal cancer: A narrative review. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Dec 23 [cited 2023 Sep 10];13. Available from: /pmc/articles/PMC9822542/
144. Søreide K, Janssen EAM, Söiland H, Körner H, Baak JPA. Microsatellite instability in colorectal cancer. *British Journal of Surgery* [Internet]. 2006 Mar 22 [cited 2023 Sep 11];93(4):395–406. Available from: <https://dx.doi.org/10.1002/bjs.5328>
145. Han K, Tang JH, Liao LE, Jiang W, Sui QQ, Xiao BY, Li WR, Hong ZG, Li Y, Kong LH, Li DD, Zhang XS, Pan ZZ, Steele SR, Ding PR. Neoadjuvant Immune Checkpoint Inhibition Improves Organ Preservation in T4bm0 Colorectal Cancer With Mismatch Repair Deficiency: A Retrospective Observational Study. *Dis Colon Rectum*. 2022 Apr 29. doi: 10.1097/DCR.0000000000002466. Epub ahead of print. PMID: 35485833.
146. Román R, Verdú M, Calvo M, Vidal A, Sanjuan X, Jimeno M, et al. Microsatellite instability of the colorectal carcinoma can be predicted in the conventional pathologic examination. A prospective multicentric study and the statistical analysis of 615 cases consolidate our previously proposed logistic regression model. *Virchows Arch* [Internet]. 2010 May [cited 2023 Sep 11];456(5):533–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20393748/>
147. Toh JWT, Phan K, Reza F, Chapuis P, Spring KJ. Rate of dissemination and prognosis in early and advanced stage colorectal cancer based on microsatellite instability status: systematic review and meta-analysis. *International Journal of Colorectal Disease* 2021 36:8 [Internet]. 2021 Feb 18 [cited 2023 Sep 11];36(8):1573–96. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00384-021-03874-1>
148. Simons CCJM, Hughes LAE, Smits KM, Khalid-de Bakker CA, de Bruïne AP, Carvalho B, et al. A novel classification of colorectal tumors based on microsatellite instability, the CpG island methylator phenotype and chromosomal instability:

- Implications for prognosis. *Annals of Oncology* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2023 Sep 11];24(8):2048–56. Available from: <http://www.annalsofoncology.org/article/S0923753419367985/fulltext>
149. Rosty C, Williamson EJ, Clendenning M, Walters RJ, Win AK, Jenkins MA, et al. Should the grading of colorectal adenocarcinoma include microsatellite instability status? *Hum Pathol*. 2014 Oct 1;45(10):2077–84.
 150. Germano G, Amirouchene-Angelozzi N, Rospo G, Bardelli A. The clinical impact of the genomic landscape of mismatch repair-deficient cancers. *Cancer Discov* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2023 Sep 8];8(12):1518–28. Available from: <https://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0150>
 151. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, Yamauchi M, Nishihara R, et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2013 Aug 7 [cited 2023 Sep 27];105(15):1151–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23878352/>
 152. Raut CP, Pawlik TM, Rodriguez-Bigas MA. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res* [Internet]. 2004 Dec 21 [cited 2023 Sep 27];568(2):275–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15542114/>
 153. Eno, MS, PA-C J. Immunotherapy Through the Years. *J Adv Pract Oncol* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2023 Oct 12];8(7):747. Available from: </pmc/articles/PMC6188092/>
 154. Banerjea A, Ahmed S, Hands RE, Huang F, Han X, Shaw PM, et al. Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. *Mol Cancer* [Internet]. 2004 Aug 6 [cited 2023 Sep 12];3:21. Available from: </pmc/articles/PMC514528/>
 155. Jimenez-Rodriguez RM, Patil S, Keshinro A, Shia J, Vakiani E, Stadler Z, et al. Quantitative assessment of tumor-infiltrating lymphocytes in mismatch repair proficient colon cancer. *Oncoimmunology* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Sep 17];9(1). Available from: </pmc/articles/PMC7671050/>

156. Mas-Ponte D, Supek F. DNA mismatch repair promotes APOBEC3-mediated diffuse hypermutation in human cancers. *Nat Genet* [Internet]. 2020 Sep 9 [cited 2023 Sep 18];52(9):958. Available from: [/pmc/articles/PMC7610516/](#)
157. Chen J, Miller BF, Furano A V. Repair of naturally occurring mismatches can induce mutations in flanking DNA. *Elife* [Internet]. 2014 Apr 29 [cited 2023 Sep 18];2014(3):2001. Available from: [/pmc/articles/PMC3999860/](#)

