

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

**KOLON ADENOKARSİNOMLARINDA
TÜMÖR/STROMA ORANI, TÜMÖR KÖK
HÜCRELERİ İLE ENTROPİNİN İLİŞKİSİ VE
PROGNOSTİK ÖNEMİ**

DR. YASEMİN ÇAKIR

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2015

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

**KOLON ADENOKARSİNOMLARINDA
TÜMÖR/STROMA ORANI, TÜMÖR KÖK
HÜCRELERİ İLE ENTROPİNİN İLİŞKİSİ VE
PROGNOSTİK ÖNEMİ**

DR. YASEMİN ÇAKIR

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: PROF. DR. SÜLEN SARIOĞLU

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	I
RESİM LİSTESİ.....	III
FİĞÜR LİSTESİ.....	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
GRAFİK LİSTESİ.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
TEŞEKKÜR.....	VIII
ÖZET	1
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	3
I GİRİŞ VE AMAÇ	5
1.1 Giriş	5
2.6 Tümör Stroması.....	20
2.7 Entropi (Düzensizlik), Karmaşıklık ve Oran Kavramları.....	24
2.7.1 Entropi	24
2.7.2 Karmaşıklık	25
2.7.3 Oran	25
1.2 Amaç.....	5
II GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 Kolon Kanseri Epidemiyolojisi.....	7
2.2 Kolon Kanseri Etyolojisi	7
2.3 Kolon Kanseri Patogenezi	7
2.3.1 Genomik İnstabilite	8
2.3.1.1 Kromozomal instabilite arayolu	8
2.3.1.2 DNA Onarım Hataları.....	9
2.3.1.3 Aberan DNA Metilasyonu	10
2.3.2 Tümör Supresör Genlerin Mutasyonel İnaktivasyonu.....	10
2.3.2.1 APC.....	10
2.3.2.2 TP53.....	10
2.3.2.3 TGF- β , Tümör Supresör Yolağı	10
2.3.3 Onkogen Yolağının Aktivasyonu	10

2.3.3.1 RAS ve BRAF	10
2.3.3.2 Posfotidilinozitol-3-kinaz (PI3K)	11
2.3.4 Büyüme Faktörü Yolakları.....	11
2.3.4.1 Prostaglandin sinyalinde aberran regülasyon	11
2.3.4.2 Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)	11
2.3.4.3 Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)	11
2.3.5 Kök Hücre Yolakları.....	11
2.4 Kolon Kanseri Prognostik Faktörler	11
2.5 Kök Hücre Tanımı ve Türleri	13
2.5.1 Normal Kolon Kök Hücreleri.....	15
2.5.2 Kolorektal Kanser Kök Hücreleri.....	16
2.5.2.1 CD133/Prominin1	17
2.5.2.2 Lgr5 (Gpr49)	18
III GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1 Araştırmanın şekli	26
3.2 Hastaların Seçimi	26
3.3 Verilerin Toplanması.....	26
3.4 İmmünohistokimyasal Yöntem.....	26
3.5 İmmünohistokimyasal Boyamanın Değerlendirilmesi	27
3.6 Görüntü Analizi Yöntemi	28
3.7 Görüntü Analizi Değerlendirilmesi	29
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi	31
IV BULGULAR.....	32
4.1 Klinik ve patolojik bulgular	32
4.2 İstatistiksel bulgular	32
V TARTIŞMA.....	48
KAYNAKLAR.....	57

TABLO LİSTESİ

1. Kolorektal Kanser Kök Hücre Belirteçleri.....	16
2. Genel sağkalıma göre hastaların demografik, prognostik ve immünohistokimyasal verilerinin dağılımı.....	34
3. Genel sağkalıma göre gruplandırılan hastalarda hesaplanmış öznitelik ortalamaları..	35
4. Nüks durumuna göre hastaların demografik, prognostik ve immünohistokimyasal verilerinin dağılımı	36
5. Nüks durumuna göre hesaplanmış özniteliklerin dağılımı.....	37
6. Uzak metastaz durumuna göre hastaların demografik, prognostik ve immünohistokimyasal verilerinin dağılımı.....	39
7. Uzak metastaz durumuna göre hesaplanmış hesaplanmış özniteliklerin dağılımı.....	39
8. pT evresine göre gruplandırılmış hastalarda hesaplanmış öznitelik ortalamaları	40
9. pN evresine göre gruplandırılmış hastalarda hesaplanmış öznitelik ortalamaları.....	40
10. pT1+pT2 ile pT4 evrelerindeki hastalarda hesaplanmış öznitelik ortalamaları.....	40
11. pT3 ile pT4 evrelerindeki hastalarda hesaplanmış öznitelik ortalamaları	41
12. pN0 ile pN1 evrelerindeki hastalarda hesaplanmış öznitelik ortalamaları	41
13. pN0 ile pN2 evrelerindeki hesaplanmış özniteliklerin ortalamaları	42
14. pN1 ile pN2 evrelerindeki hastalarda hesaplanmış öznitelik ortalamaları.....	42

15. CD133 için istatistiksel anlamlı bulunan hesaplanmış öznitelik ortalamalarının karşılaştırılması.....	43
16. Lgr5 için istatistiksel anlamlı bulunan hesaplanmış öznitelik ortalamalarının karşılaştırılması	44
17. Genel sağkalım için bağımsız risk faktörlerinin belirlenmesine yönelik uygulanan çok değişkenli logistik regresyon analizi sonuçları	45
18. Nüks için bağımsız risk faktörlerinin belirlenmesine yönelik uygulanan çok değişkenli logistik regresyon analizi sonuçları.....	45
19. Uzak metastaz gelişimi için bağımsız risk faktörlerinin belirlenmesine yönelik uygulanan çok değişkenli logistik regresyon analizi sonuçları	46

RESİM LİSTESİ

1. Farklı yaygınlıta sitoplazmik CD133 ekspresyonu.....27
2. Farklı yaygınlıta sitoplazmik Lgr5 ekspresyonu.....28

FİGÜR LİSTESİ

- 1. Arachne yazılım aracında tümör, stroma ve lümen seçilmiş görüntü örneği.....29**

ŞEKİL LİSTESİ

1. Lokal öznitelik hesaplama geometrisi (G piksel kare kenar uzunluğu)..... 31

GRAFİK LİSTESİ

1. Kaplan-Meier eğrisinde Lgr5 ekspresyonunun yaşam süresi ile ilişkisi
(1: skor1+, 2: skor2+, 3: skor3+)..... 47
2. Kaplan-Meier eğrisinde CD133 ekspresyonunun yaşam süresi ile ilişkisi
(1: skor1+, 2: skor2+, 3: skor3+)..... 47

SİMGELER VE KISALTMALAR

- KRK:** Kolorektal karsinom
FAP: Familyal Adenomatöz Polipozis
JPS: Juvenil Polipozis Sendromu
HNPCC: Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser
APC: Adenomatöz polipozis koli
MMR: Hatalı eşleşme onarımı
MSI: Mikrosatellit instabilite
TGF β R2: Transforme Edici Büyüme Faktörü Reseptör Tip II
MUTYH: mutY homolog
EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü
LN: Lenf Nodu
KH: Kök hücre
EKH: erişkin kök hücre
FKH: Fetal kök hücreleri
MSI-1: Musashi-1
Mo-MLV: Moloney murine leukemia virüs
Bmi-1: Insertion region 1 homolog
Tert: Telomerase reverse transcriptase
KKH: Kanser kök hücresi
ECM: Ekstrasellüler matriks
SMA: Düz kas aktini
EMT: Eptelial mezenkimal transformasyon
HGF: Hepatosit büyüme faktörü
KİF: Kanser ilişkili fibroblastlar
HIF-1: Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1
MMP: Matriks metalloproteinaz
TCA: trikarboksilikasit
ATP: adenozintrifosfat

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak yetismemde büyük katkıları bulunan çok kıymetli tez danışmanım Prof. Dr. Slen SARIOĞLU başta olmak üzere;

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda hizmet veren, dekan hocamız Prof. Dr. Tülay CANDA, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Erdener ÖZER ve değerli hocalarım Prof. Dr. Kutsal YRKOĞLU, Prof. Dr. Meral KOYUNCUOĞLU, Prof. Dr. Özgül SAĞOL, Prof. Dr. Burçin TUNA, Prof. Dr. Sermin ÖZKAL, Prof. Dr. Çağnur ULUKUŐ, Doç. Dr. Duygu GREL, Doç. Dr. Merih GÜRAY DURAK, Doç Dr. Mehtat ÜNLÜ'ye, Yrd Doç. Dr. Ayça ERŐEN DANYELİ'ye, kendileri ile çalışmaktan onur duyduğum, saygıdeğer emekli hocam Prof. Dr. őerafettin CANDA'ya,

hastaların klinik takiplerine ulaşmak konusunda destek gösteren ve verilerini benimle paylaşan Prof Dr Selman SÖKMEN'e, verilerin oluşturulması aşamasında büyük katkıları bulunan Devrim ÖNDER'e, verilerin değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a, tezimde jüri yesi olarak katkıda bulunan Prof. Dr. Fulya ÇAKALAĞAOĞLU'na, bu süreçte yanımda olan sevgili ve çok değerli araştırma görevlisi arkadaşlarıma, gerek uzmanlık eğitimi gerekse tez sürecinde büyük emekleri bulunan, Anabilim Dalımızın güleryüzlü ve içten tüm çalışanlarına,

Tüm zor anlarımda her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen güzel ailemin değerli büyükleri Ayfer-Abdülkadir BALKAN, Tülay-Alaattin ÇAKIR'a, kardeşim Mine BALKAN'a,

Yol arkadaşım, en büyük destekçim eşim Volkan ÇAKIR'a ve daima yüzümü güldüren, hayatımdaki en güzel varlığa kızım Deniz'e

En içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Yasemin Çakır

İzmir, 2015

ÖZET

KOLON ADENOKARSİNOMLARINDA TÜMÖR/STROMA ORANI, TÜMÖR KÖK HÜCRELERİ İLE ENTROPİNİN İLİŞKİSİ VE PROGNOSTİK ÖNEMİ

Dr. Yasemin Çakır

yasemin.cakir@deu.edu.tr

Amaç/Hipotez: Bu araştırmada kolon tümörlerinde bir kısmı önceki çalışmalarda prognostik belirteç olarak tanımlanan, tümörde ve tümör invaziv kenarındaki tümör stroma heterojenitesinin belirteçleri olabilecek matematiksel öznitelikler olan tümör/stroma oranı, entropi ve karmaşıklığın tümöral kök hücreler, histopatolojik ve klinik prognostik belirteçler ile ilişkisinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

Yöntem:

Radikal cerrahi ile tedavi edilmiş 248 hastanın hematoksilen ve eozin boyalı doku kesitlerinden, mikroskopik digital görüntüler alınmış ve çalışma grubumuz tarafından geliştirilen görüntü analizi programı ile tümör, stroma ve lümen işaretlenerek kaydedilmiştir. Daha sonra bu işaretlenmiş görüntülerde; oran, entropi ve karmaşıklık öznitelikleri ve her bir özniteliğe ait ortalama, en büyük, en küçük ve varyans değerleri tüm görüntülerde ve invaziv kenarı temsil eden son görüntülerde ayrı ayrı matematiksel olarak hesaplanmıştır. Ayrıca ana görüntüler içerisinde 8x8 ve 16x16 piksellik boyutlarda alt görüntüler oluşturularak tüm hesaplamalar bu alanlarda da gerçekleştirilmiştir.

Kök hücreleri belirlemek üzere yüzey belirteçleri olduğu bildirilen CD133 ve Lgr5 antikoru ile immünohistokimyasal inceleme yapılmış ve semikantitatif olarak skorlanmıştır.

Klinik, histopatolojik prognostik faktörler ve hesaplanan özniteliklerden elde edilen tüm veriler dahil edilerek elde edilen 80 ayrı parametre ile istatistiksel inceleme yapılmıştır.

Bulgular:

Cox regresyon analizinde ölüm riskinin; yaş ile 1,07; pN evresi ile 2,5; perinöral invazyon varlığı ile 2,2 kat; 8x8 piksellik alt görüntülerde maksimum Tümör/Stroma oranı ile 1,02 kat; 16x16 piksellik alt görüntülerde ortalama Tümör/Stroma oranı ile 1,2 kat ve invaziv kenarda hesaplanan entropi ile 1,9 kat arttığı saptanmıştır.

Nüks riskinin ise pT evresi ile 2,4 kat, pN evresi ile 4,211 kat, 16x16'lık alt görüntülerde varyans Tümör/Stroma oranı ile 1,002 kat arttığı görülmüştür.

Uzak metastaz riskinin ise pT evresi ile 3,357 kat ve pN evresi ile 9,479 kat arttığı saptanmıştır. Yukarıda belirtilen tüm belirteçlerin, çok değişkenli analiz ile bağımsız değişken oldukları belirlenmiştir.

Tümör kök hücresi belirteçleri ile prognoz arasında ilişki saptanmamıştır. CD133 ekspresyonu ile tüm tümör ve invaziv kenar entropileri, Lgr5 ekspresyonu ile tümör/stroma oranı ve entropi öznitelik değerlerinde istatistiksel anlamlı farklılık olduğu ancak bu değerlerin skorlarla paralel olarak değişmediği görülmüştür.

Sonuçlar:

Tümör/stroma oranı öznitelik hesaplamaları, birçok çalışmada belirtilenin aksine, tümör miktarındaki artış ile ölüm, nüks ve metastaz gelişimi arasında anlamlı ilişki bulunduğu ve tümör miktarındaki artışın ölüm ve nüks gelişimi için bağımsız değişken olduğu bununla birlikte invaziv kenardaki entropi öznitelik değerindeki artışın çok değişkenli analizlerde de anlamlılığını koruyarak ölüm riskini artırdığı belirlenmiştir.

Kök hücre belirteçleri ile genel sağkalım, nüks ve metastaz gelişimi arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmadığı bununla birlikte, CD133 alt grupları arasında entropi ve karmaşıklık öznitelik ortalamaları, Lgr5 alt grupları arasında ise oran ve entropi öznitelik ortalamaları arasında anlamlı fark bulunduğu ancak bu değerlerin skorlarla paralel olarak değişmediği saptanmıştır.

Bu çalışmanın özgün bulgusu tümörlerde entropi, karmaşıklık özniteliklerinin tanımlanması ve kolon tümörü invaziv kenarındaki tümör/stroma ilişkili entropinin hesaplanabilir bir bağımsız prognostik öznitelik olarak tanımlanmasıdır. Önceki çalışmalarda kantitatif değerlendirmeye dayanmayan stroma artışının prognostik önemli olma verisi, bu çalışmada kullanılan kantitatif yöntemle anlamlı bulunmamıştır. Kök hücre belirteçleri olarak kabul edilen LGR5 ve CD133 de prognostik ya da hesaplanabilir öznitelikler olarak bu seride anlamlı bulunmamışlardır.

Anahtar kelimeler: Kolon kanseri, Tümör/stroma oranı, Kanser kök hücresi, CD133, Lgr5, entropi, prognoz

ABSTRACT

THE RELATION AND PROGNOSTIC IMPORTANCE OF PROPORTION OF TUMOR-STROMA, TUMOR STEM CELLS AND ENTROPY IN COLON ADENOCARCINOMA

Yasemin Cakir, MD

yasemin.cakir@deu.edu.tr

Aim: In this study, the relationship and prognostic value of the tumor stem cells and mathematical features including tumor/stroma proportion, entropy and complexity were evaluated.

Method:

Microscopic digital images were captured from tissue slides stained with hematoxylin-eosin from 248 patients which was treated with radical surgery and tumor, stroma and lumen were manually marked and recorded by using an image analysis programme which was developed by our study group. Mathematical calculation of features proportion, entropy and complexity and mean, maksimum, minimum and variance values for each feature were calculated for the whole analysed tumor area and on images representing invasive side separately. Also, sub-images with different sizes were formed in main images and all calculations were done for these sub-images of 8x8 and 16x16 pixels.

Immunohistochemical examination with CD133 and Lgr5 antibodies, which are reported to be stem cell markers were scored semi quantitatively.

Statistical analysis was done with 80 parameters including clinic, histopathologic prognostic and all data acquired by calculated features.

Results:

Cox regression analysis revealed an increase of death risk of, 1.07 fold for age, 2,5 fold for pN stage, 2,2 fold for perineural invasion, 1,02 fold for tumor stroma proportion at the maximum group of 8x8 pixel images, 1,2 fold for tumor stroma proportion at the mean group of 16x16 pixel images and 1,9 fold for entropy at the invasive tumor border.

Recurrence risk increased 2,4 fold for pT, 4,21 fold for pN and 1,002 times for variance of tumor stroma proportion at 16x16 pixel images.

The risk of distant metastasis increased 3,357 times with pT stage, 9,479 times for pN stage.

There was no relation with stem cell markers and prognosis. Statistically significant difference was identified for entropy feature values calculated in all tumor area and invasive side between CD133 subgroups and statistically significant difference was identified for entropy feature values and tumor/stroma proportion calculated in all tumor area between Lgr5 subgroups but these values did not change parallel to the scores.

Conclusions:

In contrast to reports of many studies, calculations for tumor/stroma proportion showed that statistical significance exists between tumor mass increase and death, recurrence and metastasis. Also, it was determined that increase in tumor/stroma proportion increased the risk of death and recurrence; increase in entropy feature value on invasive side increased the risk of death, as an independent prognostic factor in multivariate analysis.

No statistical significance was found between stem cell markers and overall survival, recurrence and metastasis. In CD133 subgroups, there is a significant difference between the mean of entropy and complexity features, in Lgr5 subgroups there is a significant difference between the mean of entropy and tumor/stroma proportion features but these values did not change parallel to the scores.

The original finding of this study is defining entropy and complexity features in tumors and defining entropy related to tumor/stroma on invasive side of colon tumor as an independent prognostic feature. The prognostically important data acquired in previous studies showing an increase in stroma not related to quantitative evaluation was not found to be significant by the quantitative method used in this study. Lgr5 and CD133, accepted as stem cell markers, were not found significant in this series as prognostic or computable features.

Key words: Colorectal cancer, tumor/stroma proportion, cancer stem cell, CD133, Lgr5, entropy, prognosis.

I GİRİŞ ve AMAÇ

1.1 Giriş

Kanser dünya üzerindeki en büyük sağlık problemi olup, kolorektal karsinom (KRK) en sık görülen üçüncü kanser ve kanserden ölümlerin dördüncü en sık nedenidir. Her yıl 1,2 milyon insan KRK tanısı almakta tedavideki tüm gelişmelere rağmen 600 bin'den fazla insan hastalığa bağlı olarak 5 yıl içinde kaybedilmektedir.

Kolorektal karsinomlarda; tümör invaziv sınırındaki infiltratif patern, tümör tomurcuklanması, tümör stroma oranı ve tümörde bulunan kök hücre miktarı prognostik önemi bulunan histopatolojik faktörler arasında olup birbiriyle ilişkili bir fenotipi yansıtır olabirler. Tümör tomurcuklanması, son dönemde özellikle kolorektal karsinomlarda olmak üzere birçok karsinomada dikkat çeken önemli bir prognostik belirleyici olup dezmoplazi ve kök hücre özellikleri ile ilişkisi vurgulanmaktadır [1-3].

Güncel bilgiler, invaziv kenarda tümör hücrelerinin epitelyal mezanşimal yönde transdiferansiasyonu ile kök hücre tarzı özellikler kazandığı yönündedir [2]. Kök hücreler uzun yaşam süreleri ve kendi kendini yenileyebilme özellikleri nedeniyle tümörojenik mutasyonların doğal hedefidirler. Artık kanserin bir kök hücre hastalığı olduğuna ve tümörlerin sadece kök hücrelerden geliştiğine inanılmaktadır. Kök hücrelerin, tümörün hem başlangıç aşamasında hem de invazyon ve metastaz yapma aşamalarında rolü olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, birçok araştırmacı tümördeki kök hücre yoğunluğu ile hastalıksız sağkalım süresi arasında ters bir orantı bulunduğunu görüşündedir. Ayrıca bu çalışmada üzerinde durulan bir kavram olan entropi [4-6] daha önceki araştırmalarda termodinamik ile ilişkili bir özellik olarak tanımlandığı gibi, sistem heterojenitesi de bu terimle tanımlanmaktadır. Tümör ve stroma arasındaki yapısal heterojenitenin, tümör sınırının infiltratif olduğu durumlarda, ekspansif olanlara göre daha düşük olması beklenebilir.

1.2 Amaç

Retrospektif klinikopatolojik bir çalışma olarak planlanan bu çalışmada; immünohistokimyasal olarak CD133 ve Lgr5 antikorları kullanılarak kolon adenokarsinomlarında kök hücre popülasyonunun araştırılması, dijital olarak kaydedilmiş mikroskopik görüntülerde görüntü analizi programı ile tümör, stroma ve lümen alanlarının işaretlenerek oran, entropi ve karmaşıklık özniteliklerinin matematiksel olarak değerlendirilip,

tüm bu verilerin klinikopatolojik prognostik faktörler ve hastalık prognozu ile ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Bu çalışmanın performansının beklenen şekilde yüksek olması halinde de kolon tümörlerinde sayısal olarak ölçülebilir özellikte yeni bir prognostik veri elde edilmesi hedeflenmiştir.

II GENEL BİLGİLER

2.1 Kolon Kanseri Epidemiyolojisi

Kanser dünya üzerindeki en büyük sağlık problemi olup, KRK en sık görülen üçüncü kanser ve kanserden ölümlerin dördüncü en sık nedenidir. Batı dünyasında hayat boyu kanser gelişme riski %4-5'tir. En sık Avustralya/Yeni Zelanda, Kanada, Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da görülmektedir [7]. Dünya genelinde farklı popülasyonlarda farklı KRK insidans oranları izlenmekte ve bu oranlar zaman içerisinde değişmektedir. Batı ve Doğu Avrupa'nın bazı bölgelerinde stabil seyrederken Amerika'da düşüş göstermektedir [8]. İnsidans özellikle ekonomik geliri artan Japonya, Singapur ve Doğu Avrupa ülkelerinde artmaktadır [7].

T.C Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı'nın yaptığı istatistiklere göre ülkemizde kolorektal kanser, akciğer kanseri ve meme kanserini takiben 3. sırada yer almaktadır. Görülme sıklığı %7.7'dir. Hastaların %59'u erkek, %41'i kadındır. Erkek/Kadın oranı 1.44'dür. Erkeklerde kolorektal kanser, akciğer ve mide kanserinden sonra 3. sırada yer alırken, kadınlarda meme, deri, mide ve over kanserini takiben 5. sırada yer almaktadır [9].

Her yıl 1,2 milyon insan KRK tanısı almakta tedavideki tüm gelişmelere rağmen 600 bin'den fazla insan hastalığa bağlı olarak 5 yıl içinde kaybedilmektedir. Erken tanı konulabilmesi ve genetik olarak farklı tümörlerin ayrımlarının yapılabilmesiyle birlikte yeni tedavi stratejileri geliştirmek de gerekli hale gelmiştir. 5 yıllık sağkalım lokalize evrede %80-90, bölgesel tümörlerde %70 ve uzak metastazlarda %10 olarak saptanmış [10] ve bu veriler KRK'de erken tanının gerekliliğini ortaya koymuştur.

2.2 Kolon Kanseri Etyolojisi

Diyet ve yaşam stili, çevresel faktörler, sigara, inflamatuvar barsak hastalıkları, özgeçmişte adenom ve karsinom öyküsü bulunması, genetik faktörler ve aile öyküsü, obezite ve insulin direnci sorumlu tutulmaktadır.

2.3 Kolon Kanseri Patogenezi

Popülasyonun %50'sinden fazlasında 70 yaş civarında adenomatöz polip gelişmekte ancak bunların sadece %10'unda kansere ilerleme görülmektedir [11]. Çoğu KRK'nin sporadik olduğu ancak %5-6 gibi anlamlı bir kısmının da Familial Adenomatöz Polipozis (FAP), Juvenil Polipozis Sendromu (JPS) ve Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanser (HNPCC) gibi net bir genetik zemine sahip olduğu anlaşılmıştır. Adenom gelişimi ile buradan

karsinoma ve metastatik hastalığa ilerlemede APC (adenomatöz polipozis koli), p53, TGF- β gibi hem koruyucu mekazimlarda hata oluşumu hem de Ras gibi onkogenik yolların aktivasyonu gerekmektedir. Geleneksel kanser gelişim mekanizmalarına bakıldığında tümör popülasyonu içindeki tüm hücrelerin tümör gelişimini başlatma ve sürdürme yetenekleri bulunduğu belirtilirken günümüzde tartışılmakta olan kanser kök hücre modellerinde, sadece küçük bir hücre grubunun tümörü çoğaltma yeteneğine sahip olduğu düşünülmektedir. Genel olarak KRK, çok sayıda ardışık genetik değişikliğin kümülatif etkisi ile oluşmaktadır. Ek olarak epigenetik değişiklikler de sporadik kolon karsinomlarının önemli bir kısmının gelişimi ve progresyonunda önemli rol oynamaktadır [12].

2.3.1 Genomik İnstabilite

2.3.1.1 Kromozomal instabilite arayolu; kromozom yapısı ve kopya sayısında pek çok değişikliğe neden olmaktadır. Böylece APC, p53, SMAD4 gibi tümör supresör genlerin “wild-type” kopyalarında fiziksel kayıp oluşmaktadır [13]. Çeşitli onkojen ve tümör supresör genlerde görülen seri mutasyonların ardı ardına birikimi sonucu kromozomal instabilite ortaya çıkmaktadır. İlk olarak Fearon ve Vogelstein tarafından 1990 yılında tanımlanmış olan adenom- karsinom sekansı olarak bilinen kolorektal tümörögenез modeline göre sırasıyla lokalize epitel proliferasyonu, küçük adenom oluşumu, daha sonra bunların büyümesi ile displastik değişiklikler ortaya çıkmakta ve en sonunda invaziv karsinom gelişmektedir [14]. Çoğu KRK’de normal kolonik mukozanın gelişiminden sorumlu olan Wnt/ β -katenin yolağında disfonksiyonel regülasyon söz konusudur [15]. Bu konseptte göre, APC tümör supresör gende görülen mutasyon adenom gelişimi boyunca erken dönemde yer almakta, daha sonra adenomatöz evre boyunca K-ras mutasyonu, maligniteye geçişte ise p53 mutasyonu ve kromozom 18q delesyonundan söz edilmektedir. FAP olgularının %80’inde β -katenin stabilitesini kontrol eden komplekste yer alan APC geninde kayıp ya da mutasyon bulunmaktadır. APC molekülü mutasyona uğradığında sitozolik β -katenin düzeyleri sabitlenmekte ve sonrasında nükleusta toplanmaktadır. Burada transkripsiyon faktörlerinin Tcf ailesi için koaktivatör olarak davranmakta ve bazı metalloproteinazlar, fibronektin, c-myc ve siklin-D1 gibi onkogenlerin ekspresyonunun aktive olmasına yol açmaktadır [16]. Bununla birlikte sporadik kolorektal karsinomların %80’inde de APC’de somatik mutasyon saptanmıştır.

2.3.1.2 DNA Onarım Hataları;

Bir grup kolorektal karsinom, DNA'daki baz-baz hatalı eşleşme onarımından sorumlu olan, hatalı eşleşme onarımı (MMR) geni olarak adlandırılan genlerdeki inaktivasyon nedeniyle oluşmaktadır. Burada da çeşitli gen mutasyonlarının birikimi söz konusudur ancak etkilenen genler farklıdır ve adenoma- karsinoma sekansından farklı olarak bu genetik değişikliklerin tam karşılığı olabilecek morfolojik değişiklikler henüz tam olarak belirlenememiş olmakla birlikte, son yıllarda, “serrated” morfolojiye sahip öncü lezyonların karsinoma ilerleyebilecekleri ileri sürülmektedir.

DNA MMR genler. spontan mutasyonlar sonucu DNA'da oluşan uyumsuz baz çifti eşleşmelerini belirleyerek düzeltilmiş nükleotidin yerleştirilmesinden sorumludur. Replikasyon boyunca doğru DNA sentezinin sağlanmasında rol alarak genomun stabilizasyonunu sağlarlar. Etkin MMR gen aktivitesinin yokluğunda mikrosatellit instabilite (MSI) gözlenir [17].

İnaktivasyonları, HNPCC'de olduğu gibi kalıtsal ya da bazı tümörlerdeki gibi DNA MMR proteinini kodlayan genin metilasyonla-ilişkili susturulmasında olduğu gibi kazanılmış olabilir [18]. HNPCC'li olgularda MMR fonksiyonu kaybı sadece mutant germ-line MMR genine bağlı olarak değil “wild-type” parental allelin somatik inaktivasyonu ile de oluşabilmektedir [19]. MMR eksikliğinde, Transforme Edici Büyüme Faktörü Reseptör Tip II (TGFβR2) ve BCL2-ilişkili X protein (BAX)'i kodlayan genler gibi tümör supresör genler de inaktive olabilmektedir [20].

MSI gösteren tümörlerin farklı klinik özellik gösterdiği saptanmıştır. Bu tümörler proksimal kolonda lokalizedir [7]. Genellikle müsinöz ve andiferansiye özelliktedir. Stromalarında belirgin lenfositik infiltrasyon bulunmaktadır. Mikrosatellit stabil tümörlere göre daha iyi prognoz göstermektedirler [17].

Kolorektal karsinom gelişiminde bir başka alternatif yol da baz eksizyon onarım genlerindeki, mutY homolog (MUTYH, aynı zamanda MYH olarak da adlandırılır), germ-line inaktivasyondur. İki inaktif germ-line MYH alleli taşıyan bireylerde polipozis fenotipi gelişmekte ve 60 yaş civarında %100 kolorektal karsinom gelişme riski bulunmaktadır [18].

2.3.1.3 Aberan DNA Metilasyonu; kolorektal kanser genomunda, sitozin metilasyonunda geniş çaplı azalma ancak önemli miktarda aberan metilasyon kazanımı vardır. Bu aberan promoter ilişkili metilasyon, gen ekspresyonunun epigenetik susturulmasını indükleyebilmektedir.

2.3.2 Tümör Supresör Genlerin Mutasyonel İnaktivasyonu

2.3.2.1 APC; WNT-sinyal yolağının aktivasyonu, kolorektal kanser başlatıcı olaylardan birisi olarak gösterilmektedir. Hücresel aktivasyonda yer alan genleri regüle eden transkripsiyon faktörlerinin oluşumunu başlatan ve bir onkoprotein olan β -kateninin bağlanmasıyla Wnt sinyali oluşmaktadır. β -katenin kompleksi, proteolizis yoluyla β -katenin düzeylerini kontrol eder. Bu kompleksin bir komponenti olan APC, β -katenini degrade etmesi yanısıra nükleer lokalizasyonunu da inhibe etmektedir[21].

2.3.2.2 TP53; Hatalı eşleşme onarım bozukluğu bulunan birçok KRK'de TP53 "wild-type" olarak bulunmakta, buna rağmen bu kanserlerde P53 yolağı aktivitesinde BAX'ın indüklediği apoptozdaki mutasyonlara bağlı olarak olasılıkla azalma vardır[22].

2.3.2.3 TGF- β , Tümör Supresör Yolağı; KRK'nin 1/3'ünde somatik mutasyonlarla TGF- β R2 inaktivedir. Hatalı eşleşme onarım hasarı bulunan tümörlerde farklı çerçeve kayması mutasyonları ile TGF β R2 inaktivedir. Wild-type hatalı eşleşme onarım bulunan KRK'nin en az 1/2'sinde ise TGF- β sinyal yolağı, TGF β R2 kinaz domainini etkileyen inaktive edici sessiz mutasyonları ile ya da daha yaygın olarak TGF- β komponenti olan SMAD4'ü inaktive eden mutasyon ve delesyonlar ile ortadan kalkmaktadır[23, 24].

2.3.3 Onkogen Yolağının Aktivasyonu

2.3.3.1 RAS ve BRAF; RAS-RAF-MEK-ERK-MAP kinaz yolağı önemli bir hücresel sinyal transdüksiyon yolağıdır. Ekstrasellüler sinyallere yanıt olarak bu yolak, hücre proliferasyonu, hücre sağ kalımı, hücre-siklusu arresti, terminal diferansiasyon ve apoptozu düzenlemektedir [25, 26]. KRK'da KRAS veya BRAF mutasyon insidansı yaklaşık %50 (%40 KRAS, %10 BRAF) olup kötü prognozla ilişkidir [27]. Hem KRAS hem de BRAF'da oluşan mutasyonlar MEK-ERK-MAP kinaz yolağını stimüle etmektedir [28]. KRAS sinyal oluşumuna, BRAF geni tarafından kodlanan proteinaz aracılık etmektedir. KRAS'ın mutasyonel aktivasyonu, EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) yolağında abberan aktivasyona neden olmaktadır [29].

Ayrıca KRAS geninde ekzon 2'nin 12 ve 13 kodonunda oluşan mutasyon ile RAS-Raf sinyal yolağı aktive olamakta ve tümör proliferasyonu, anjiogenez, invazyon ve metastatik potansiyelle sonuçlanan mitojenik sinyal kaskadı başlatılmaktadır [30, 31].

2.3.3.2 Posfotidilinozitol-3-kinaz (PI3K); Bir başka akış aşağı sinyal yolağı olup, aktivasyonu Ras/Raf/MAPK yanısıra EGFR tarafından stimüle edilmektedir. KRK’da temel olarak PIK3CA mutasyonu görülmektedir[32, 33].

2.3.4 Büyüme Faktörü Yolakları

2.3.4.1 Prostaglandin sinyalinde aberran regülasyon; Adenom gelişiminde en erken ve kritik bir basamaktır. Bu anormal yanıt inflamasyon ya da COX-2’nin mitojen-ilişkili upregülasyonu ile oluşmaktadır[18].

2.3.4.2 Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR); Epidermal büyüme faktörü intestinal hücreler üzerinde trofik etkiye sahip bir proteindir. EGFR, MAPK ve PI3K sinyal yolaklarına aracılık etmektedir[18].

2.3.4.3 Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF); Hasarlanma ve normal büyüme sırasında anjiogenez oluşumunu sağlamaktadır. Klinik çalışmalar sonucu kolorektal kasrinomda büyüme sırasında anjiogenik yolaklarda ve letal potansiyede rolü olduğu düşünülmektedir[18].

2.3.5 Kök Hücre Yolakları

İlgi çekici ve yeni bir konsept olarak, solid tümör içerisinde yer alan kök hücre-benzeri özelliklere sahip küçük bir alt grup hücre varlığına bağlı olarak kanser progresyonu ve kemoterapiye direnç geliştiği düşünülmektedir[34].

2.4 Kolon Kanserinde Prognostik Faktörler

Prognoz, birtakım faktörlere bağlı olarak hastalar arasında belirgin farklılıklar göstermektedir. Günümüzde altın standart prognostik belirleyici TNM kalsifikasyonuna dayalı klinikopatolojik evrelemedir. Tanı anındaki evrenin prognozda en büyük etkiye sahip olduğu bilinmekle birlikte, aynı evredeki hastaların farklı prognozlara sahip olabilmeleri nedeniyle bir çok klinik, histopatolojik ve biyomoleküler belirteçlerin de hastalık seyri üzerinde potansiyel etkileri bulunduğu düşünülmektedir. Prognoz hakkında bilgiye sahip olmak iki nedenle önem taşımaktadır. İlki yüksek rekürrens riskine sahip evre I-II olguların belirlenerek adjuvan tedavi şansı verilmesi ya da düşük rekürrens riskine sahip evre III olguların belirlenerek gereksiz adjuvan tedavi almalarının önlenmesi, diğeri ise bireysel olarak rekürrens riski hesaplamalarına dayalı olarak takip programının sıklığının belirlenmesi ve gereksiz ve pahalı tetkiklerin önlenmesidir.

Tümör Lokalizasyonu: Prognoz üzerine etkisi tartışmalıdır. Sol kolonda rekürrensin daha fazla olduğu sigmoid kolon ve rektum yerleşimli tümörlerde sağkalımın kötü olduğu gösterilmiştir [35, 36].

Makroskopik Büyüme Paterni: Ülser kanserler, polipoid, sesil yada ekzofitik kanserlere göre daha kötü prognozludur. Ayrıca uzak ve yakın metastaz insidansı da yüksektir [37, 38].

Obstrüksiyon ve Perforasyon: Tamamen tıkalı kalın bağırsak karsinomlu hastalarda, aynı evredeki hastalar ile kıyaslandığında 5 yıllık sağ kalımı azaltmaktadır [39]. Perforasyon sonucu tümör bağırsak duvarına yayılmakta ve kötü prognozu göstermektedir [40].

Tümör Sınırları: Proksimal distal ve radial cerrahi sınırlarda tümör varlığında lokal rekürrens gelişme riski artmaktadır [41, 42].

Histolojik tür: Prognoz adenokarsinomda en iyi iken küçük hücreli karsinomda en kötüdür. %50 den fazlal müsin üretimi varlığında müsinöz tümör olarak klasifiye edilmekte olup erkeklerde ve sağ kolonda daha yaygın olarak görülmekte ve sağkalım daha düşük olarak izlenmektedir [43].

Tümör diferansiasyon derecesi: İyi, orta, kötü diferansiye ve andiferansiye olarak değerlendirilmektedir. Kötü diferansiasyon kötü seyir ile ilişkilidir [44]. Bununla birlikte Collage of American Pathologists tümörleri düşük ve yüksek dereceli olarak ayırmaktadır[45].

Tümör Evresi (pT): İleri evredeki olgularda beklenen yaşam süresi kısalmaktadır [44]. Evre II tümörlerde (pT3-4, pN0, M0) olguların yaklaşık %20-30'unda rekürrens beklendiği belirtilmiştir [46, 47].

Lenf Nodu (LN) metastazı: LN metastazı varlığı ile sağkalım azalmakta, metastatik lenf düğümü sayılarında artış ile de prognoz kötüleşmektedir [48]. Doğru bir değerlendirme için cerrahi disseksiyonun genişliğine bağlı olarak değişen toplam LN sayısı ve metastatik olan LN sayısı belirlenmelidir.

Uzak Metastaz: Uzak metastaza sahip olgular en kötü prognoza sahiptir.

Venöz invazyon: Prognoz üzerindeki negatif prognostik etkisi iyi dökümante edilmiştir [44].

Lenfovasküler İnvazyon: Bölgesel LN'lere yayılım için bir basamak olduğu kabul edilmekte ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir [44].

Perinöral İnvazyon: Negatif prognostik etkisi olduğu kabul edilmektedir [44, 46].

Peritümöral Lenfositik İnfiltrasyon: Belirgin peritümöral lenfositik infiltrasyon iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir [49].

Tümör İnvazyon Paterni: Tümör sınırlarının evreden bağımsız olarak prognostik önemi olduğu ve karaciğer metastazını öngördürücü olabileceği gösterilmiştir. Yapılan çok değişkenli analizlerde itici paternde büyümeyle karşılaştırıldığında infiltrate edici paternde büyümenin bağımsız kötü prognostik faktör olduğu belirlenmiştir [50].

Tümör Tomucuklanması: İnvaziv tümör etrafında, mikroskobik andiferansiye kanser hücresi kümeleri olarak tanımlanmaktadır [51]. Dereceden bağımsız olarak LN metastazı ve hastalık seyrinde öngördürücü olduğu belirtilmektedir [52, 53].

Peritoneal ve Serozal Yayılım: Lokal peritoneal yayılım intraperitoneal rekürrens ve pelvik rekürrensin güçlü bir kanıtıdır [54].

Birden Fazla Tümör Odağı Varlığı: Birden fazla tümör odağı olmasının tek başına sağ kalıma etkisi yoktur.

2.5 Kök Hücre Tanımı ve Türleri

Kök hücreler (KH) uzun hücre bölünmesi periyodları boyunca kendisini yenileyebilme (self renewal) ve progenitor hücrelere farklılaşabilme (diferansiasyon) gibi karakteristik özellikleri ile diğer hücrelerden ayrılmaktadır. Her organda var oldukları düşünülen, asıl görevleri tamir ve vücutta zarar gören dokuların yenilenebilmesini sağlamak olan özelleşmemiş hücrelerdir.

İnsanda 4-6 günlük bir blastokistin iç hücre kitlesinde yer alan hücreler embriyon kök hücresi olarak adlandırılır ve bunlar embriyon gövdesine ait bütün hücre tabakalarını ve onlardan köken alan organ sistemlerini oluşturma yetkinliğine (totipotent) sahiptir. Ancak gelişmekte olan organizmada embriyon kök hücrelerinin yerini, çeşitli organ ve doku bölgelerinde bulunan, gerektiğinde kendini çoğaltabilen, kararlanabilen (determinasyon) ve farklanabilen erişkin kök hücreler (EKH) veya dokuya özgü kök hücreler alır. Az sayıda hücre türüne farklanabilen bu hücreler prekürsör veya progenitor olarak da değerlendirilmektedir. Bir diğer grup hücre ise kadında oogonyumları, erkekte spermatogonyumları oluşturan primordiyal germ hücreleridir. Kök hücrelerin bir bölümünün ise çeşitli yönleriyle embriyon ve yetişkin kaynaklı kök hücreler arasında çoğalma ve farklanma yeteneklerine sahip olduğu bu hücrelerin fetal kök hücreleri (FKH) olarak adlandırılacakları belirtilmektedir [55].

KH asimetrik hücre bölünmesine uğradığında iki hücre meydana gelir. Bunlardan birisi kök hücre özellikleri taşıması ile ilk hücreye benzerken diğer hücre daha özelleşmiştir [56].

EKH genellikle doku homeostazından sorumlu olmakla birlikte hasarlanma sonrası doku onarımında da rol alır [57]. Nöral kök hücre çalışmalarında, EKH'nın genellikle istirahat halinde bulundukları ve nadiren populasyonun büyüklüğünü korumak amacıyla kararlı durumdayken asimetric bölünmeye uğradıkları gösterilmiştir [58]. Bununla birlikte, hasarlanma veya hastalığı takiben, kök hücre sayısındaki azalma pahasına simetric bölünme oranını artırarak hasarlanmayı onardıkları görülür [59]. Hızlı rejenere olan hücrelerde yapılan çalışmalarda KH arasındaki siklus kinetiklerinde heterojeniteler bulunduğu görülmüştür [60]. Tüm yaşam süreleri boyunca oluşan hücresel bölünme sayılarına bağlı olarak farklı kök hücre oranlarına sahip 2 grup bulunduğu öne sürülmüştür. Kök hücrelerin büyük çoğunluğunu oluşturan bir grup, sık olarak siklusa girer ve normal homeostazda fonksiyon gösterir; diğer grup daha küçük bir KH rezervini oluşturur ve yavaş döngü sergiler ve kriz durumları için KH rezervinin sağlanmasından sorumludur. Bu sınırlı hücresel bölünme, dominant master KH'de en yüksek uzun dönemli proliferasyon potansiyeli sağlamakta ve aynı zamanda genom değişikliklerini kazanmaktadır. Ancak epidermis üzerinde yapılan çalışmalarda aktif olarak döngüye giren ve DNA replikasyon hatalarına maruz kalan hücrelerin, hasarlanma sonrası hala niş oluşturmak için kullanıldıkları gösterilmiştir [61].

KH döngüsünde oluşan bu tür değişikliklerin kanser patogeneze aracılık edebileceği düşünülmüştür. Kanser kök hücresinin anormal diferansiasyon sonrası kendini yenileyebilen normal hücrelerden ya da kanser hücrelerini direkt meydana getiren veya kendisini yeniden programlayan progenitor hücrelerden köken alabileceği ve kanseri indüklemeyen önce KH davranışları kazandığı fikri öne sürülmüştür [62]. Bundan başka KH'ler simetric bölünme ile de çoğalır. Sonrasında bu hücre populasyonunun tam transformasyonu için genetik ve epigenetik değişiklikler gerekmektedir [63]. Drosophila nöroblastlarında gösterildiği üzere, hücre polaritesini ve kaderini belirleyen faktörlerde oluşan mutasyonlar da simetric bölünmeyi indükleyebilmektedir [64].

Cicalese ve arkadaşları, floresans boyası kullanarak gerçekleştirdikleri analizlerde meme kanser KH'lerinin simetric olarak bölünebildiklerini göstermişlerdir [65]. Araştırmacılar Erbb2- tümör mamosferlerinde kök hücrelerin normal memeden 5 kat daha fazla bulunduğunu saptamış ve bu fenomeni kendini yenileyici hücre bölünmelerindeki artış ile

ilişkilendirmişlerdir. Normal ve tümörlü dokuyu karşılaştırdıklarında simetrik ve asimetrik bölünmelerin her ikisinde de gerçekleştiği ancak farklı oranlarda olduğu tespit edilmiştir,

Normal hücre daha çok asimetrik, tümör hücresi ise simetrik bölünme sergilemiştir. Başka çalışmalarda normal meme KH'sinin kültür ortamına alındıklarında kendini yenileyebilme potansiyelini hızla kaybettikleri, oysa ki erbb2-tümör KH'nin ise neredeyse ölümsüz olduğu ve her bir pasajda yaklaşık 5 kat arttığı saptanmıştır.

2.5.1 Normal Kolon Kök Hücreleri

Birçok dokuda KH kompartmanlarını belirlemek üzere KH'nın nadiren bölünme özelliği göz önüne alınarak Bromodeoksiüridin ile işaretleme ile DNA'daki işaretin daha hızlı bölünen progenitör hücrelerden daha uzun süre kaldığı görülmüştür. Sonrasında hücre yüzeyindeki stemness belirleyicilerinin bulunması ile KH'nın flow sitometri ile izolasyonuna başlanmıştır. RNA bağlayan protein musashi-1 (MSI-1) belirlenen ve insan kolon KH markeri olarak kabul edilen ilk moleküldür.

Kolon mukozasında lümen bakan yüzeyi döşeyen tek katlı epitel tabakası, submukozal dokuya parmaklı uzanımlar yaparak "Liberkühn kriptleri" adı verilen işlevsel birimleri oluşturmaktadır. Her bir kriptte yaklaşık olarak 2000 hücre bulunmakta ve enterosit, goblet hücresi ve endokrin hücrelerden oluşan üç ana terminal olarak diferansiye hücre nesli içermektedir. Bu hücreler beş günde bir kript tabanında yer alan kolon KH aracılığı ile yenilenmektedir. KH çoğunlukla asimetrik bölünmeye uğramakta ve oluşan progenitör hücre kript tepesine doğru göç ederek tam diferansiye olmaktadır. Simetrik bölünme ise hasarlanma, hastalık durumu veya kanser gelişimi sırasında oluşmaktadır.

Unitarian teoriye göre bağırsak kriptleri monoklonal doğada olduğu düşünülmektedir. Ancak son veriler doğumda olasılıkla poliklonal olan kriptlerin nötral kayma paternini takiben monoklonalite kazandığı yönündedir. Kriptlerin yaklaşık olarak 16 KH içerdiği ve bunların iki farklı havuz oluşturduğu belirtilmektedir. Havuzlardan biri kript tabanında yer almakta ve Lgr-5 (leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5) eksprese etmekte, diğeri ise +4 pozisyonunda yer alarak Mo-MLV (B lymphoma Moloney murine leukemia virüs), Bmi-1 (insertion region 1 homolog) ve Tert (telomerase reverse transcriptase) eksprese eden hücrelerden oluşmaktadır [66].

2.5.2 Kolorektal Kanser Kök Hücreleri

Son yıllarda kanser kök hücrelerini (KKH) saptamak ve izole etmek için birçok yöntem denenmiştir. Ancak bazıları büyük teknik uzmanlık gerektiren ve zaman alıcı yöntemlerdir. Bu nedenle daha kolay, antikora bağlı teknikler olan immün boyama, floresans-aktif hücre ayırma (FACS) analizleri ve immünomanyetik ayırma gibi yöntemler üzerinde çalışılmıştır. İlk saptanan KKH belirteci olan insan KRK'da saptanan CD133 olmuştur. Diğer KKH belirteçleri ve fonksiyonları tablo 1'de görülmektedir [66].

Tablo 1: Kolorektal Kanser Kök Hücre Belirteçleri

BELİRTEÇ	FONKSİYON	ÖNEMİ
CD133 (Prominin1)	Pentaspın transmembran glikoprotein, plazma membran organizasyonu	Zenograftlarda tümör başlaması, koloni formasyonu, korelasyon: kötü prognosis, sağkalım, rekürrens, metastaz, tedavi direnci
CD44	Hücre adezyon molekülü, hyalüronik asit reseptörü	Zenograftlarda tümör başlaması, koloni formasyonu, ilişkili: evre, lenf nodu infiltrasyonu, prognosis, sağkalım
CD166 (ALCAM)	Hücre adezyon molekülü	Zenograftlarda tümör başlaması, koloni formasyonu, korelasyon: prognosis ve sağkalım
CD24	Hücre adezyon molekülü	↑ klonojenik yetenek, çokköklenli potansiyel, korelasyon: invazyon, diferansiyasyon, sağkalım
ALDH-1	Detoksifiye edici enzim, alkilleyici ajanlara direnç	Zenograftlarda tümör başlaması, kolitten kansere transizyon, mitokondrial izoformu KRK'da ↑
CD29 (β)	Hücre adezyon molekülü	Koloni formasyonu, KRK'da ↑, ilişkili: evre, KRK'da ↑ mRNA
Msi-1	RNA-bağlayıcı protein, KH andiferansiyasyon durum koruyucu	CD133 ⁺ hücreler ve sferoit kültürlerde ekspresyon, KRK'da ↑, ilişkili: evre, KRK'da ↑ mRNA
Wnt yoluğu aktivitesi, β-katenin	KH rezervuar proliferasyonu ve koruyucusu	↑ aktivite ↑ klonojenite ve tümörojenite ile ilişkili, düşük evre KRK'da ↑ relaps ile ilişkili
Lgr-5	Wnt hedef geni, bilinmeyen fonksiyon	↑ tümörojenite, kötü prognostik, metastaz oluşumu, APC knockout Lgr5 ^{-/-} farelerde haftalar içinde adenom oluşumu
EpCAM (ESA)	Hücre adezyon molekülü	CD133 ⁺ ve CD44 ⁺ hücrelerde ekspresyon
CD26	Hücre yüzey glikoproteini	Fare modelinde tümör başlangıcı ve metastaz gelişimi
Oct-4, Sox-2, Nanog, Lin-28, Klf-4, c-myc	Transkripsiyon faktörleri	Korelasyon: kötü prognosis, relaps, uzak rekürrens, tedaviye direnç
Bmi-1, CDX-2	Proliferasyon ve diferansiyasyon regülasyonu	CD133 ⁻ ve CD44 ⁻ hücrelerde ekspresyon

Kısaltmalar: ALCAM, activated leukocyte cell adhesion molecule; ALDH-1, aldehyde dehydrogenase-1; APC, adenomatous polyposis coli; Bmi-1, B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; Lgr-5, leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5; Msi-1, musashi-1;

2.5.2.1 CD133/Prominin 1:

İnsan CD133, 120 kDa ağırlığında, prominin ailesine üye, pentaspan-transmembran glikoproteindir. Bir ekstrasellüler N-terminal bir de sitoplazmik C-terminal alandan oluşur. C-terminal alanda beş tirozin rezidüsü, iki küçük sisteinden-zengin sitoplazmik loop ve 2 büyük ekstrasellüler loop içerir. CD133, ilk kez Yin ve arkadaşları tarafından hematopoetik KH'ler, progenitör hücreler ve kemik iliği kökenli dolaşan endotelial progenitör hücrelerin yüzey protein belirteci olarak gösterilmiştir. Takiben birçok insana ait normal dokuda ve beyin, kolon, karaciğer ve prostat gibi dokularda gelişen solid tümörlerde gösterilmiştir [67]. Eş zamanlı olarak yürütülen iki çalışmada KKK'da KH belirteci olarak gösterilmiştir. Ricci-Vitiani ve arkadaşları [68], seri transplantasyonlar uygulanmış immünyetmezlikli farelerde, CD133+insan KKK'lerinin tümörjenik potansiyelini, engraft (melezleme/hibridizasyon) olma yetenekleri bulunduğu ve görülebilir bir tümör oluşturdıkları belirlenmiştir. O'Brien ve arkadaşları [68] tarafından insan KKK örneklerinden izole ettikleri CD133+ hücre alt grubunun ayrılmamış kanser hücre popülasyonuna kıyasla kanser-başlatıcı hücre içeriğinin 200 kat daha zengin olduğu saptanmıştır. Bunun ötesinde karaciğer metastazlarının CD133+ kanser hücre popülasyonundan zengin olduğu ve CD133+ hücrelerden oluşan tümör ksenograftlarının (heterograft) orijinal tümörün histolojik özelliklerini oluşturduğu gösterilmiştir.

Ancak başka çalışmalarda immünyetmezlikli farelerde CD133⁻ KKK hücre popülasyonunun da tümör gelişimini başlatabildiğinin gösterilmesi üzerine CD133'ün KKH belirteci olarak etkin değeri ve kullanılabilirliği tartışma konusu olmuştur [69]. Yakın zaman önce Feng ve Arkadaşları [68] CD133⁺ ve CD133⁻ hücrelerin, iki hücre alt grubu arasında değişime uğrayabildiklerini göstererek tartışmalı bu konuyu açıklayabilecek bir başka öneride bulunmuştur. Bunun ötesinde Hsu ve arkadaşları çevresel strese maruziyet, hipoksi ve hücre adezyonundan bağımsız bir ortamın SW620 CD133⁻ hücrelerin SW620 CD133⁺ hücrelere dönüştüğünü göstermiştir. Bu iki hücre grubu arasında dönüşümün tümör kolonizasyonunda mikroçevreye adaptasyonda önemi olabileceği belirtilmektedir. Bu bilgilere dayanarak tümör içindeki KH olmayan hücrelerin çevresel etkenlere bağlı olarak kök hücre benzeri evreye dönüşerek, KKH'nin KH olmayan hücrelere tek yönlü dönüşümü görüşü ile çelişmektedir [70].

Birçok araştırmada immünohistokimyasal olarak gösterilen CD133 ekspresyonunun kolon kanserindeki prognostik rolü araştırılmış, progresyon ve metastaz gelişimi ile güçlü ilişkisi bulunduğu gösterilmiştir. Kojima ve arkadaşları [71], KRK'da CD133 overekspresyonunun kötü seyir ve yüksek metastaz riski arasında ilişki bulunduğuna işaret etmiş, Horst ve diğerleri ise [72] CD133 ekspresyonunun genel sağkalım için bağımsız prognostik faktör olduğunu göstermiştir.

Chao ve arkadaşları [72], CD133⁺ KRK hücrelerinin, tümör mikroçevresindeki CXCR4-SDF1 parakrin sinyal aksının karsinom-ilişkili fibroblastlarla etkileşimi nedeniyle, CD133⁻ hücrelerden daha tümörjenik olduklarını belirtmiştir. Zhang ve arkadaşları [73] tümör hücrelerinde CXCR4 ve CD133 koekspresyonu olduğunu göstermiş ve evre II-III KRK'lı olgulardaki kötü genel sağkalım ile ilişkilendirmiştir. Kemper ve arkadaşları [74], CD133 ekspresyonu ile KRAS ve BRAF gen mutasyon varlığını ilişkilendirmiş ve CD133'ün Ras-Raf-Mek-Erk yolağı ile regüle ediyor olabileceğini belirtmişlerdir.

Mohammadi ve arkadaşları [75] tarafından, premalign kolorektal lezyonlarda CD133'ü ilk kez çalışılmış ve sesil serrated adenom-polip lezyonlarında CD133 ekspresyonunun hiperplastik poliplerden yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu premalign kolorektal lezyonların CD133 immünohistokimyasal incelemesi ile saptanabileceği söylenmiştir.

Farali ve arkadaşları [76] da KRK'lı hastalarda yapılan çok değişkenli analizlerde CD133 ekspresyonunun hasta sağkalımında bağımsız bir risk faktörü olduğunu bildirmiştir. Ancak ulaşılabilen tüm literatürler incelendiğinde CD133'ün potansiyel prognostik önemine dair kesin verilerin henüz bulunmadığı görülmüştür. Bu durum kullanılan antikorlar, protokoller ve skorlama kriterleri arasındaki farklılığa bağlanmaktadır [77]. CD133 ekspresyonu ile tümörogenezdeki moleküler yolların ilişkisi incelendiğinde Wang ve arkadaşları [78], Akt Vw Erk yollarının inaktivasyonunun primer KRK'dan elde edilen CD133⁺ kolon kanser hücrelerinin sağkalımını önlediği ve tümörogenezlerinin azaldığını bildirmiştir.

2.5.2.2 Lgr5 (Gpr49):

Lgr5 (leucine-rich repeat-containing G protein coupled reseptör 5), orphan G protein coupled reseptördür. Büyük, lösinden zengin ekstrasellüler bölge ve yedi transmembran bölgeden oluşur. Canonical wnt/ β -katenin sinyal yolağında sekrete edilmiş agonistler olarak bulunan R-spondin proteinlerinin reseptörüdür [79, 80]. Lgr5'in ilk kez insan kolorektal karsinomlarında [81], daha sonra over, hepatosellüler, özofageal ve bazal hücreli karsinomlarda

overekspresyonu gösterilmiştir [82]. Lgr5, wnt hedef genlerinden biri olmakla birlikte farklı KH'lerde ekspresyonu gösterilmiştir [83, 84]. Kript tabanında matür intestinal KH'lerde eksprese edilmektedir [84, 85]. Birçok çalışma grubu Lgr5 ekspresyonu ile kolon kanseri progresyonu arasında yakın ilişki bulunduğunu göstermiştir [80, 82]. Normalde kript tabanı bazalinde bulunan Lgr5'in malign transformasyon sırasında oluşan genom mutasyon akümüasyonu sonucu polarite kaybına uğrayan hücreler nedeniyle in situ karsinomda tümör-host interfaz bölgesinde, ileri kanserde ise tüm tümörde dağıldığı saptanmıştır [86]. Lgr5 'in adenomlarda selektif olarak periferel bölgelerde saptanması, intestinal KKH'lerini işaret ediyor olabileceğini düşündürmüştür. Battle ve arkadaşları [87] bu hipotezi destekler şekilde Lgr5'in selektif olarak insan kolon KKH'lerinde eksprese edildiğini bildirmiştir. Lgr5'in ayrıca invazyon ve metastaz süreçlerinde de rol oynadığı belirtilmektedir. Bunun da ötesinde yüksek Lgr5 ekspresyonunun tümörün mezenkimal özellikleri olan yüksek vimentin ekspresyonu, düşük miR-200c ekspresyonu, artmış invazivite ve lenf nodu metastazı ile korole olduğu gösterilmiştir [82, 86].

Elde edilebilen tüm verilerin ışığında Lgr5'in tümör gelişimi ve progresyonunda anahtar rol oynayabileceği sonucuna varılmaktadır.

2.6 Tümör Stroması

Bazı kanser tipleri üzerinde yapılan son çalışmalarda elde edilen veriler, tümör stroma oranının prognostik önemini göstermektedir [88-94]. Stephan Paget 1889 yılında "tohum ve toprak" isimli hipotezinde tümör stroma arasındaki ilişki olduğunu öne sürmüştür. Araştırmacıya göre kanserin patolojisine yönelik en iyi çalışma tohumun doğasına (kansere hücreleri) yönelik yapılmış olup ve toprak (sekonder organ) üzerine yapılacak araştırmaların yararlı olabileceği belirtilmiştir [95].

Son üç dekad boyunca elde edilen veriler, tümör stromasının invazyon, metastaz, progresyon ve prognoz üzerindeki rolünü desteklemektedir. 1993 yılında Dingemans ve arkadaşları [96] yaptıkları deneysel bir modelde infiltratif fenotipteki kolon karsinomu hücrelerini granülasyon dokusuna transplante ederek kapsüllü ve iyi diferansiye bir subkutanöz tümör oluşturmuştur. Bu çalışma sonucunda, tümörün infiltratif paternde büyümesi gibi prognostik fenotipik özellikleri üzerinde tümör stromasının etkin olduğu gösterilmiştir. Tümör stromasına ilişkin diğer bir çok faktör de tanımlanmıştır. Bunlar tümör mikroçevresi olarak adlandırılan yapıyı

oluşturan ekstrasellüler matriks, immün ve inflamatuvar hücreler, kan damarları ve miyofibroblastlardır [97].

Kanser heterojen multisellüler bir antite olup birbirleriyle etkileşen bir çok hücre nesli, ekstrasellüler matriks (ECM) ve hücre proliferasyonu, hareketi, diferansiasyonu, ECM metabolizması ile eş zamanlı olarak hücre ölümünün sınırlayan çözünebilir moleküllerden oluşur. Tüm kanserler karşılıklı etkileşim içinde olan farklı hücre popülasyonlarından oluşur. Normal hücreler ve tümör hücreleri arasında oluşan tüm bu etkileşimler tümörojenisiteyi belirlemektedir.

İnflamasyon ile kanser arasındaki fonksiyonel ilişki uzun zamandır bilinmektedir. Granülosit, dendritik hücreler, makrofajlar, NK hücreler ve mast hücrelerinden oluşan doğumsal immünite hücreleri proliferasyon, migrasyon, angienez, doku remodelasyonu, metabolizma ve genomik bütünlüğü düzenleyen potent solubl medyatörler aracılığıyla kanser gelişimine fonksiyonel katkıda bulunmaktadır. Eskiden pasif olarak tümörde yer aldıkları düşünülen fibroblastlar, primer olarak ECM sentezi, depolanması, ve remodelasyonu yanısıra hücre proliferasyonu, morfolojisi, sağkalımı ve ölümü regüle eden çözünebilir parankim büyüme faktörlerinin de üretiminden sorumlu olan önemli bir hücre grubudur. İnflamatuvar hücrelerle birlikte dokuların neoplastik programlanmasını sağladıkları düşünülmektedir [98].

Kan damarları doku homeostazının sürdürülmesinde esas olup tüm doku tamiri, büyüme süreçleri ve aynı zamanda tümör gelişiminde aktive olmaktadır. Tümör angiogenezisinin bir kısmından endotelial ve perivasküler hücre proliferasyonu, diferansiasyonu, migrasyonu ve/veya tüp formasyonu üzerinde pro veya antiangiogenik etki gösteren solubl ve insolubl moleküller arasındaki rölatif dengede gelişen lokal değişiklikler sorumludur. Her hangi bir dokudaki ECM veya stromanın üç boyutlu organizasyonu dinamik olup uygunsuz sentez ve yıkımı hücre fizyolojisini değiştirecek hastalıklara neden olmaktadır. Ultrastrüktürel çalışmalar, immünohistokimyasal ve biyokimyasal analizler stromanın, neoplastik sürecin kritik basamaklarında değişime uğradığını göstermiştir [99, 100].

İlk yapılan çalışmalarda α -düz kas aktini, vimentin, düz kas miyozini, kalponin, tenaskin, ve desmin proteinlerinde kazanılmış ekspresyonun izlendiği bir değişiklik saptanmıştır [99, 101]. Bu proteinler genellikle yara iyileşmesi ve inflamasyon [102] sırasında eksprese edilmekte ve mezenkimal hücre diferansiasyonunu yansıtan bir çok yeni protein üretimi olmaktadır.

Aynı zamanda stroma ve stromal komponentlerin miktarı da prognostik özellikler arasında tanımlanmıştır. Sis ve arkadaşları [103] tarafından, KRK'da van Gieson boyalı kesitler üzerinde yaptıkları bilgisayar destekli görüntü analizi ölçümleri ile dezmozplazinin kötü prognostik faktör olduğu saptanmıştır.

Bir başka çalışmada Mesker ve arkadaşları, karsinoma stroma oranını KRK'da prognostik faktör olarak önermiştir. Tümör kesitlerinde tümör stroma oranı tahmini yapmış ve skorladıkları en düşük yüzdeyi belirleyici olarak nitelendirmişlerdir. Bu çalışmada ikili kategorizasyon kullanılarak %50 eşik değer olarak kabul edilmiş ve cox regresyon analizinde tümör yüzdesinin bağımsız prognostik faktör olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmayı takiben Courrech Staal ve arkadaşları[92] tarafından aynı yöntem kullanılarak tümör stroma oranının oldukça önemli bir prognostik faktör olduğu doğrulanmıştır. Kruijf ve arkadaşlarından [91, 93] ile Moorman ve arkadaşlarından [91, 93] oluşan farklı araştırma grupları da Mesker'e benzer bir yöntem kullanarak, triple negatif meme karsinomları üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda tümör stroma oranının prognostik önemi olduğu sonucuna varmışlardır.

Solid tümörlerin bir çoğunda düz kas aktini (SMA)-pozitif miyofibroblastların (peritümöral fibroblastlar, karsinomla ilişkili fibroblastlar) stromal kompartmanda yer aldığı saptanmıştır [104]. Miyofibroblastlar ekstrasellüler matriks ve sitokin üreten, dokuda kontraktıl gerilim sağlayan hücrelerdir. Miyofibroblastlar bir çok karsinom tipinde olduğu gibi KRK'da da kötü prognoz ile ilişkilidir [105, 106]. En sık olarak miyofibroblastların, lokal olarak fibroblastlardan farklılaştığı tariflenmiştir [104]. Ancak günümüzde adipozistler, stellat hücreler, perisitler, dolaşımdaki mezenkimal hücreler ve CD34-pozitif fibrositlerin de miyofibroblastik transdiferansiasyona uğradıkları saptanmıştır [104, 107]. Ayrıca son yıllarda epteliyal mezenkimal transformasyon (EMT) üzerindeki dikkatler artmış ve stromal hücrelerin epteliyal tümör hücrelerinden köken almış olabileceği belirtilmektedir [108, 109].

Miyofibroblastlar bir çok karsinom tipinde kötü prognozla ilişkili bulunmuştur [110, 111]. Tsujino ve arkadaşları [105], SMA ekspresyonunun KRK'da kötü prognoz için bağımsız bir prognostik belirteç olduğu ve hastalık rekürrensi yüksek olan bireyleri saptadığını göstermiştir. Ayrıca rektal karsinomlu olgularda, down-regüle immün yanıtla birlikte olan şiddetli immatür stroma varlığının kötü prognoza yol açtığı düşünülmektedir [112]. Bunun ötesinde adenomlarda artmış olduğu gösterilen miyofibroblastların tümör oluşumunun başlatılmasında rol oynadığı rapor edilmiştir [113]. Miyofibroblastların angiogenez, invazyon ve metastaz dahil bir grup tümör-geliştirici fonksiyonu regüle ettiği gösterilmiştir [104, 107,

114]. Miyofibroblast yoğunluğunun genellikle tümörün invaziv bölgesinde arttığı ve solubl faktör sekrete ederek KRK'da invazyonu geliştirdikleri gösterilmiştir [104, 107]. Miyofibroblastlar aynı zamanda ECM remodelasyonu, ayrıca kanser ve stromal hücrelerden üretilen metalloproteinazlar ve inhibitörlerinin tümör mikroçevre kompozisyonunu değiştirerek KRK prognozunu etkilemektedir. Fibriller kollagen (tip I ve III)'den zengin, miyofibroblast kaynaklı dezmoplastik stromal reaksiyon, primer KRK'da kötü prognostik gösterge olarak belirtilmiştir [103, 115].

Vermeulen ve arkadaşları [116], yaptıkları bir çalışmada KRK'da KH'ler ile miyofibroblastlar arasında yeni bir bağlantı tariflemiş ve miyofibroblast-türevi hepatosit büyüme faktörü (HGF)'nin, KRK'da WNT sinyalini aktive ederek KH feenotipinin daha diferansiye hücreye dönüştüğünü belirtmişlerdir. Bu veriler, mikroçevrenin KH nişinin regülasyonunda kritik rol oynadığını düşündürmüştür.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda da farklı tümörlerde çok sayıda fibroblast alt tiplerinin altı çizilmektedir. Kanser ilişkili fibroblastlar (KİF), bir çok kanserde tümör stromasında en belirgin hücre tipidir [117, 118].

KİF tümör progresyonunda çok yönlü role sahiptir. İmmün hücrelere benzer şekilde tümör progresyonunun erken evrelerinde aktive fibroblastlar arasındaki gap junctionlar aracılığıyla inhibitör etkinlik göstermektedir. İleriki evrelerde ise tümörden-sekrete edilen faktörlerle aktive hale geçerek hem tümör büyümesi hem de progresyonuna katkıda bulunmaktadır [119, 120]. Kanser ve stromal hücreler arasında iki yolak tanımlanmaktadır [121, 122];

1- Efferent yolak; kanser hücreleri tümör stromasında rölatif bir yanıt oluşumunu tetiklenmektedir.

2- Afferent yolak; mikroçevrede yeralan modifiye stromal hücreler kanser hücre cevabını etkilemektedir.

KİF'in orjini henüz çözülememiş olmakla birlikte farklı histolojik tipler ve lokalizasyonlara göre değişen, multipl orjinli oldukları düşünülmektedir. Kabaca; i) yerli ii) mezenkimal kök hücre kaynaklı ve iii) mutasyonel olarak sınıflandırılabilir.

KİF çeşitli büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinlere katkıda bulunarak tümör hücre proliferasyonunu direkt stimüle etmektedir. Kanser hücreleri için klasik mitojenler olarak bilinen HGF, β -fibroblast büyüme faktörü ve sitokinlerin tümü, farklı tipleriyle ilişkili olarak KİF tarafından çok miktarda eksprese edilmektedir. Büyüme faktörleri yanısıra salgılanan proinflamatuvar sitokinler (IL, IFN ve TNF ailesi üyeleri), tümör- modüle edici etkilere

sahiptir [123]. KİF tarafından eksprese edilen sitokin ve kemokinler immün hücre infiltrasyonuna, sonrasında bu durum anjiogenez ve metastaza öncülük etmektedir [124]. KİF'in hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 (HIF-1)'in oksidatif stres aracılı aktivasyonundan etkilendiği gösterilmiştir [125].

KİF aynı zamanda plazminojen aktivatörlerini ve matriks metalloproteinaz (MMP) ailesinin pek çok üyesini sektrete edebilmektedir. Bu enzimler iki temel amaç için kullanılabilir.

- 1- ECM'nin direkt degradasyonu ile tümör ekspansiyonu, invazyon ve anjiogenez oluşumu
- 2- Büyüme hormonu, proinflamatuvar sitokinler ve reseptörlerinin kesilerek aktivasyonlarının sağlanması ya da hücre adezyon moleküllerinin kesilerek motilitelerinin ve EMT'nin artırılması [126, 127].

Kanserin progresyonu, malign evrede çevre dokuya invazyon yeteneğinin kazanılması ve çevredeki ECM'nin ileri remodelasyonu ile gerçekleşmektedir [128]. Kanser hücrelerinden kaynaklanan efferent sinyaller stromal yanıtı tetikleyerek, tümör invazyonu ve doku bütünlüğünde kayba yol açan parakrin afferent sinyalleri başlatmaktadır. Stromal hücreler uyarıldıklarında KİF hücrelerine diferansiye olarak kanser hücrelerinin uyku halinden çıkmasını, hücrelerinin motilitesini ve agresivitesini etkilemektedir. Daha sonra aktive KİF hücre-hücre teması ya da difüze olabilen parakrin sinyaller ile invaziv büyümeyi indüklemektedir.

Afferent proinvaziv sinyaller ile MF ve MIF tarafından, proinvaziv büyüme sinyalleri oluşturan TGF- β , HGF, VEGF, FDG, SPF-1 ve MMP, katepsin ve plazminojen aktivatörleri gibi çeşitli sekrete edilmektedir [129, 130].

EMT'nin promigratuvar etkileri yanısıra KKH fenotipi indüksiyonu ile de korelasyon içinde olduğu gösterilmiştir. Meme ve prostat karsinomlarında KKH jenerasyonu olan tümör hücrelerinin, EMT yoluyla Snail ve Twist transkripsiyon faktörlerinin overekspresyonu ile oluştuğu gösterilmiştir [122]. Aynı zamanda KİF, KKH belirteçlerinin (CD133+, CD44/CD24 oranı) ekspresyonunu artırarak, karsinom hücrelerinin klonajenite ve kendisini-yenileyebilme yeteneklerini etkilemektedir. Embriyonik EMT'nin aksine, doku tamiri ve metastatik yayılım süreçlerinde gelişen EMT genellikle doku inflamasyonu ile ilişkili olmakta ve provake eden etken elimine olana kadar persiste etmektedir [129].

KİF ve kanser hücreleri arasındaki sinyal iletimi, epigenetik mekanizmalara ek olarak stromal mutasyonlar ile de başlatılabilmektedir. Fare prostat karsinomu hücrelerinin temel olarak

parakrin bir mekanizma ile stromal KİF'de p53 upregülasyonunu indüklediği ve böylece oluşturduğu selektif baskının p53'den-yoksun KİF popülasyonunda artışa yol açtığı gösterilmiştir[131]. P53'den-yoksun KİF, kanser invazyonuna ve ileride epitelde p53 kaybına katkıda bulunmaktadır. Bunun ötesinde bir çok sporadik meme karsinomunda KİF'de p53 mutasyonu bulunduğu ve bunun lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu bildirilmektedir [132]. Stromal fibroblastların tümörlerin kompleks mekanizmasına katılarak Warburg etkisiyle kanser hücrelerinin solumasını zorlayarak enerji açığı oluşumunun üstesinden gelmelerini sağlamaktadır. Özellikle epitelyal hücrelerle temas halindeki fibroblastlar, miyofibroblastik diferansiasyona uğrayarak aerobik glikoliz ile laktat ve pirüvat üretilmektedir [133]. Bu enerjiden zengin metabolitler, tümör hücrelerinde trikarboksilikasit (TCA) siklusu ve adenozintrifosfat (ATP) üretiminde kullanılmaktadır.

Tümör mikroçevresi hem sellüler hem de nonsellüler bileşenler içermektedir. Temel sellüler bileşenler fibroblastlar, endoteliyal ve immün hücrelerden oluşmaktadır. Bu bileşenler müşterek olarak tümör stromasının nonsellüler bileşenleri olan ECM proteinleri, proteazlar, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi çeşitli molekülleri üretmektedirler. ECM yapısının tümörlerde ciddi olarak değiştiği ve ECM proteinleri olan kollagen, fibronektin, proteazlar, ECM proteinlerinin transkripsiyonel modifikasyonunda yer alan diğer enzimler gibi çeşitli proteinlerin üretiminden temel sorumlu olan KİF'inde majör rol oynadığı belirtilmektedir. Bunun yanısıra bazı kanserlerde tip 1 ve tip 3 kollagen birikimine bağlı olarak gelişen dezmozoplazinin hem primer hem de metastatik tümörlerde kötü prognoz ile ilişkili olduğu vurgulanmaktadır [134, 135].

2.7 Entropi (Düzensizlik), Karmaşıklık ve Oran Kavramları

2.7.1 Entropi

Entropi klasik termodinamik, istatistiksel termodinamik, bilgi teorisi ve sosyal sistem kuramı gibi farklı disiplinler tarafından incelenmiş olan bir kavramdır. Evrendeki düzensizliğin, belirsizliğin, bilgi eksikliğinin ve kullanılmaz hale gelmiş enerjinin bir ölçüsü olarak tanımlanmaktadır. Entropi yasası, evrende herşeyin maksimum düzensizlik ve minimum enerji yönünde hareket ederek; çoktan aza, kullanılabilir halden kullanılamaz olana, doğumdan ölüme, düzenden düzensizliğe doğru doğal bir gidişe eğilimli olduğunu söylemektedir. Bu sebeple entropi, aynı zamanda moleküler düzensizlik veya moleküler rastgeleliğin bir ölçüsü olarak da ifade edilmektedir. Bir sistem daha düzensiz bir hal aldıkça,

moleküllerinin konumları belirsizleşecek ve entropi artacaktır [136]. Karsinogenez sırasında, genomik mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler sonucu, rastgeleliğin arttığı ve nükleustaki uzaysal entropinin yükselerek bilgi içeriğinin azaldığı belirtilmektedir. Bu nedenle tümör malignitesinde artışla birlikte nükleer kromatin entropisinde de artış olacağı beklenmektedir.

Görüntü analizinde ikinci derece özniteliklerden olan entropinin hesaplanmasında, eş-oluşum matrisleri (co-occurrence matrices) kullanılmaktadır. Eş-oluşum matrisleri, seçilen belli bir görüntü alanı içerisinde, birbirlerine belli mesafe ve açıdaki piksel çiftlerine ait değerlerin eşli olasılık dağılımını yaklaşıklamaktadır [137].

Herhangi bir D pikseller arası mesafe ve θ pikseller arası açı için, bir I görüntüsünün B görüntü ilgi alanı içerisinde C eş-oluşum matrisi şu şekilde hesaplanır;

$$C(i,j|D,\theta) = \frac{\sum_{p,q \in B} 1\{I(p) = i, I(q) = j, r(p,q) = D, \angle(p,q) = \theta\}}{\sum_{p,q \in B} 1\{r(p,q) = D, \angle(p,q) = \theta\}}$$

Bu ifadede p ve q görüntüdeki pikselleri, $\rho(p,q)$ bu iki piksel arasındaki mesafeyi, $\angle(p,q)$ bu iki piksel arasındaki açıyı ve $1\{\bullet\}$ de argümanı doğru olduğunda 1, aksi halde 0 değerini alan bir fonksiyonu belirtmektedir. Piksel çiftlerinin aldığı değerler i ve j değişkenleri ile temsil edilmektedir.

Eş-oluşum matrisleri elde edildikten sonra, sözkonusu matris eleman değerleri kullanılarak o görüntü ilgi alanına ait entropi değeri aşağıdaki şekilde hesaplanır;

$$\text{Entropi} = - \sum_i \sum_j C(i,j | D,\theta) \log(C(i,j | D,\theta))$$

Bu ifadeden pozitif entropi değerleri elde edilir. En küçük değer olan sıfır, analiz yapılan görüntü alanında düzensizliğin en düşük olduğu anlamına gelir. Artan entropi değerleri yükselen düzensizlik anlamına gelir.

Analizi yapılan görüntülerdeki bilginin rotasyon bağımsız olduğu düşünüldüğünde $\theta = 0, 45, 90$ ve 135 dereceler için ayrı ayrı hesaplanan entropi değerlerinin istatistik ifadeleri (ortalama, varyans vb) ile yeni bir öznitelik serisi oluşturur.

2.7.2 Karmaşıklık

Bir görüntüdeki veya ilgi alanındaki i değerindeki piksellerden komşuluk ilişkisi ile j değerindeki piksellere geçiş sayısı olarak tanımlanır [138].

2.7.3 Oran

Belli bir görüntü alanı içerisindeki farklı olarak işaretlenmiş piksellerin, frekans oranlarından elde edilen özniteliklerdir.

III GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın şekli

Bu çalışma, kolon adenokarsinomlarında tümör stroma oranı, entropi ve karmaşıklık gibi hesaplanabilir özniteliklerin tanımlanması; bunlarla kök hücre miktarı arasında bir ilişki olup olmadığını araştırılması ve bu değişkenlerin prognostik önemini belirlemeye yönelik retrospektif klinikopatolojik bir çalışmadır.

3.2 Hastaların Seçimi

Bu çalışmada, 2005-2011 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda takibi olan, neoadjuvan tedavi almamış hastalar arasından seçilen 248 kolon adenokarsinomu vakası ele alındı. Patoloji materyalleri kolon rezeksiyonlarından oluşan olgular yeniden değerlendirildi ve tanıları doğrulandı.

3.3 Verilerin Toplanması

Hastalara ait demografik ve patolojik verilere (yaş, cinsiyet, tümör yerleşim yeri, tümör çapı, tümörün makroskopik büyüme paterni, histolojik tipi ve derecesi, lenfovasküler ve perinöral invazyon, proksimal, distal ve radyal cerrahi sınırların durumu, disseke edilen ve metastaz saptanan lenf nodlarının sayısı) patoloji raporlarından, klinik bilgilere (tanı anındaki metastaz, takipteki metastaz, lokal ve uzak nüks bilgisi, tedavi, klinik takip süresi, hastalıksız ve genel sağkalım süreleri, hastaların son durumları ve hastalığa bağlı ölüm) ise Cerrahi Anabilim Dalı'na ait verilerden ulaşıldı.

3.4 İmmünohistokimyasal Yöntem

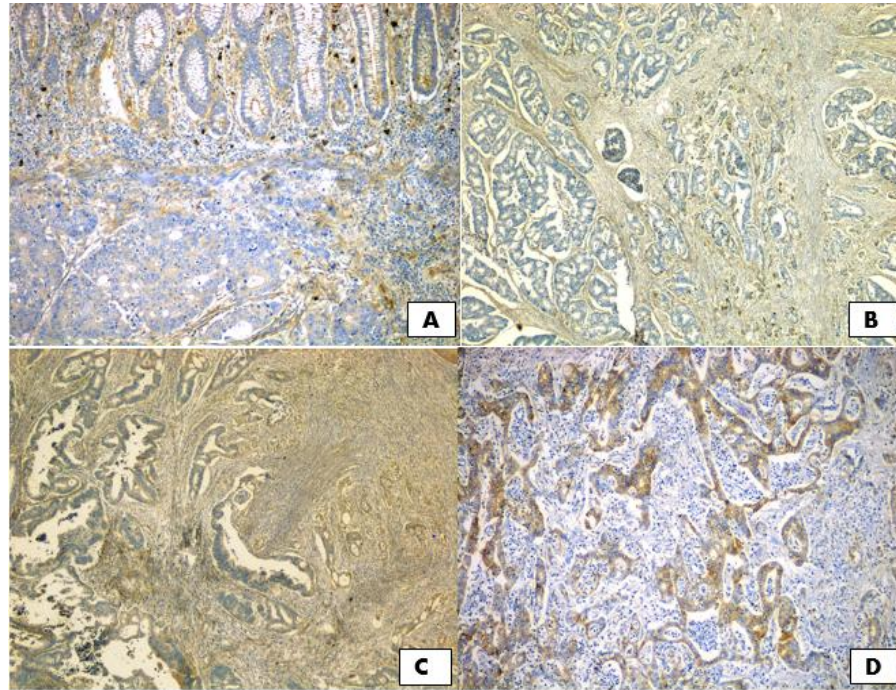
%10'luk formaldehit ile tesbit edilen tümör dokularına ait parafin blok kesitleri incelenerek, her bir olguya ait tümörü en iyi temsil eden bir adet parafin blok seçildi. İmmünohistokimya (İHK) boyama protokolü özetle şu aşamaları içermektedir.

1. 3 mikron kalınlığında elde edilen kesitler poly-l-lysine kaplı lam üzerine alındı.
2. Kesitler etüvde yaklaşık 60°C'de 2-3 saat bekletilerek parafin eritildi.
3. Lamlar cihaza (Ventana Benchmark Ultra) yerleştirildi. CD133 İHK'si uygulanan lamlarda 8 dakika protease-1, Lgr5 İHK'si uygulanan lamlarda 52 dakika, 95C'de CC1 solüsyonu ile antijen açığa çıkarma uygulandı.

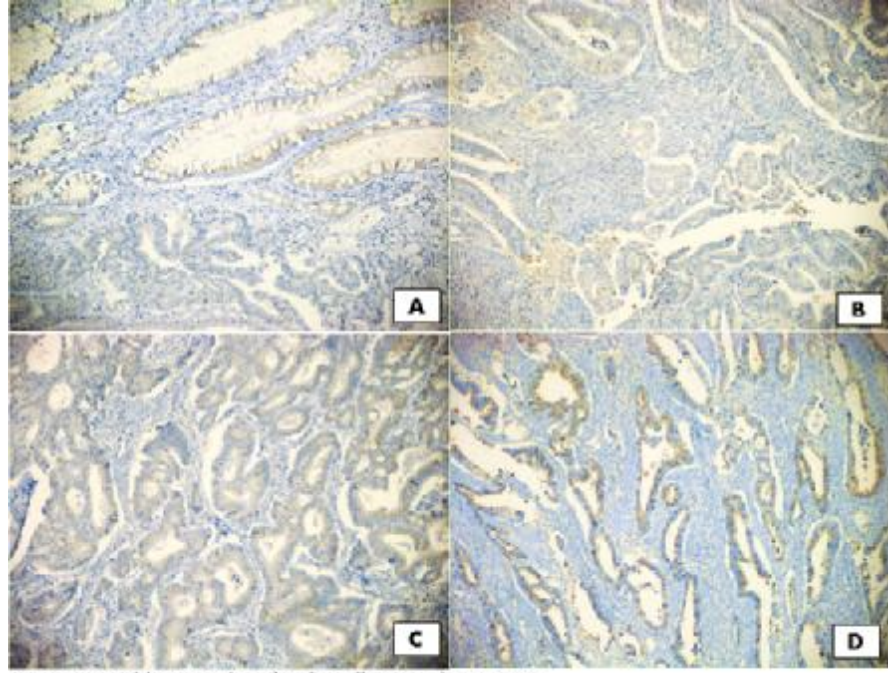
4. Primer antikorlar (Novus Biologicals, Rabbit Anti-GPR49/LGR5 Polyclonal Antibody, NBP1-28904, 100ul ve Boster İmmunoleader, Polyclonal Anti-PROM1 Antibody, pa1217, 100µg) 1/300 dilüsyonda damlatılarak 40 dk inkübe edildi.
5. Ultra view Universal DAB Detection kit sekonder antikorı uygulandı.
6. Hematoksilen ile 8 dk kontrast boyama uygulandı.
7. Kesitler otomatik kapama cihazında (Sakura, Tissue-Tek Film) kapatıldı.

3.5 İmmünohistokimyasal Boyamanın Değerlendirilmesi

İmmünohistokimya preparatları, vakaların klinik özellikleri bilinmeden, tek gözlemci tarafından değerlendirildi. İHK'sel yöntemin uygunluğunun değerlendirilebilmesi için pozitif internal kontrol olarak neoplastik olmayan komşu kolon mukozası kullanıldı. Ekspresyon, tüm tümör alanındaki hücreler dikkate alınarak incelendi. İHK'sel boyanma sonucunda CD133 ve Lgr5'in ekspresyonları semikantitatif olarak değerlendirildi. Literatürdeki çalışmalara benzer şekilde, %5 ve üzeri hücre boyanması (Lgr5 ile sitoplazmik, CD133 ile apikal membranöz) pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif boyanma yaygınlığı daha sonra kendi içinde, %5 hücrede boyanma varsa 1+, %5- 50 hücrede boyanma varsa 2+ ve %50'den fazla hücrede boyanma varsa 3+ olarak kabul edildi [139-142]. (Resim 1,2).



Resim 1: Farklı yaygınlıta apikal sitoplazmik/membranöz CD133 ekspresyonu (A: pozitif kontrol ve negatif boyanma, B: skor 1, C: skor 2, D: skor 3)

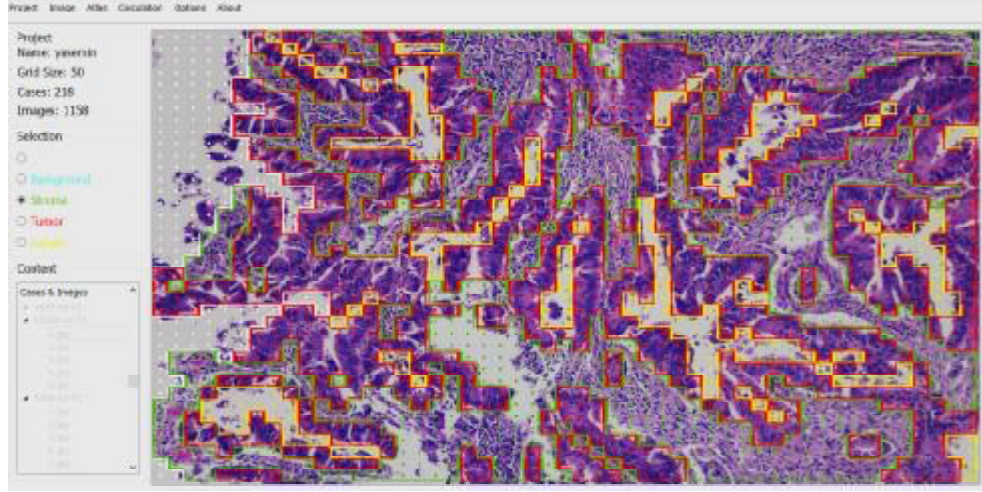


Resim 2: Farklı yaygınlıta sitoplazmik Lgr5 ekspresyonu
(A: pozitif kontrol ve negatif boyanma, B: skor 1, C: skor 2, D: skor 3)

3.6 Görüntü Analizi Yöntemi

Olgulara ait daha önce arşivimizde yer alan hematoksilin eozin boyalı preparatlar arasından tümörün en derin invazyon alanını temsil eden ve tercihen normal mukozayı da içeren preparatlar seçildi. Bu preparatlardan, ışık mikroskobuna (Nicon Eclips Ci-L) bağlı video kamera (Nicon DS-Fi2) ile X20'lik büyütmede, tümörü yüzeyden derine doğru tam kat yansıtacak şekilde çoklu (3-10 adet, ortalama $5,35 \pm 1,32$ görüntü) dijital fotoğraflar elde edildi. Toplam 1327 fotoğraf, bilgisayar ortamında, bu araştırma kapsamında geliştirilmiş olan Arachne (Netform Mühendislik, <http://www.netformvision.com/arachne.asp>) yazılım aracı kullanılarak incelendi. Bu incelemede her bir vakaya ait histopatolojik görüntüler, istenilen boyutlarda piksellere (küçük kareler) ayrılabilme olanağı sağlayan, bu yazılım aracı kullanılarak $400 \mu m^2$ 'lik alanlara ayrıldı. Noktalamalardan oluşan bu otomatik pikselleme sonrası, bilgisayar faresinde sol/sağ tıklama ile her bir noktanın üzerinde yer aldığı farklı görüntü elemanına (Tümör (Tm), stroma (St), lümen (Lm)) göre noktalara farklı renklerle kodlandı (Tümör alanı üzerindeki noktalar kırmızı, stroma üzerindikiler yeşil, glandlara ait lüminal boşluk üzerindikiler sarı ve ayrıca özellikle ilk ve son görüntülerde oluşabilen dokunun yer almadığı boş alanlar üzerindeki noktalar beyaz renk). Tümör çevresinde retraksiyonuna bağlı oluşan boşluklar “stroma” olarak, tümör nekrozu alanları “tümör” ve gland lümenlerine, dökülen nekrotik tümör hücreleri “lümen” olarak kabul edilerek uygun

kodlamalar yapıldı ve tüm bu kodlanmış görüntüler kayıt altında alındı. Toplamda her olguda ortalama 3,95 mm² (2,22-7,7 mm²) tümör alanı kodlandı (Figür 1).



Figür 1: Arachne yazılım aracında tümör, stroma ve lümen seçilmiş görüntü örneği

3.7 Görüntü Analizi Değerlendirilmesi

Kodlanmış görüntü elemanları, bir tamsayı olan iki boyutlu görüntüler olup bu bilgi dışında herhangi bir gri seviye veya renkli görüntü bilgisi kullanılmadı. Bu çalışmada, oran, entropi ve karmaşıklıktan oluşan farklı öznitelikler (feature) hesaplanarak hasta sağkalım süreleri, nüks ve uzak metastaz ile istatistiksel açıdan ilişkili olup olmadıkları incelendi.

Oran özniteliği; T_m/St , $(T_m+L_m)/St$ ve T_m/L_m oranlarından oluşan üç farklı formül kullanılarak hesaplandı.

Entropi özniteliği; öncelikle herhangi bir D pikseller arası mesafe ve θ pikseller arası açı için, bir I görüntüsünün B görüntü ilgi alanı içerisinde C eş-oluşum matrisi hesaplandı (Formül 1);

$$C(i,j|D,\theta) = \frac{\sum_{p,q \in B} 1\{I(p) = i, I(q) = j, r(p,q) = D, \angle(p,q) = \theta\}}{\sum_{p,q \in B} 1\{r(p,q) = D, \angle(p,q) = \theta\}}$$

Formül 1: Bu ifadede p ve q görüntüdeki pikselleri, $r(p,q)$ bu iki piksel arasındaki mesafeyi, $\angle(p,q)$ bu iki piksel arasındaki açıyı ve $1\{\bullet\}$ de argümanı doğru olduğunda 1, aksi halde 0 değerini alan bir fonksiyonu belirtmektedir. Piksel çiftlerinin aldığı değerler i ve j değişkenleri ile temsil edilmektedir.

Eş-oluşum matrisleri elde edildikten sonra, sözkonusu matriks eleman değerleri kullanılarak o görüntü ilgi alanına ait entropi değeri hesaplandı (Formül 2);

$$\text{Entropi} = - \sum_i \sum_j C(i, j | D, q) \log(C(i, j) | D, q)$$

Karmaşıklık özniteliği olarak; Tm, St ve Lm pikselleri arasındaki geçiş sayıları kullanıldı.

Hastalara ait öznitelikler hesaplanırken farklı kümelemeler kullanıldı. Bunlar;

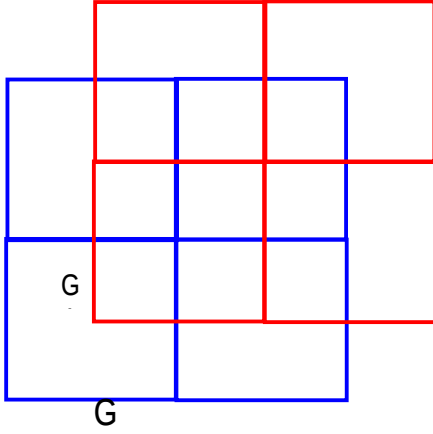
Hasta bazında kümeleme: Herhangi bir hastaya ait bütün görüntülerin toplamından alınan değerlerle öznitelikler hesaplandı (Hastadaki toplam Tm sayısı/hastadaki toplam St sayısı). Bu yaklaşımda her bir hastaya karşılık gelen öznitelik tek bir sayıdır.

Hasta görüntüleri bazında kümeleme: Herhangi bir hastayı oluşturan her bir görüntüden tek tek elde edilen özniteliklerin oluşturduğu dizinden istatistik ifadeler hesaplandı. Bu istatistik ifadeler; mean (ortalama), varyans, minimum, maksimum'dur. Bu yaklaşımda her bir hasta görüntüsüne karşılık gelen özniteliklerle bir sayı dizini oluşturuldu.

Alt görüntüler bazında kümeleme: Bu kümeleme yaklaşımında, herhangi bir hastayı oluşturan görüntüler içerisindeki alt görüntülerden elde edilen özniteliklerin istatistik ifadeleri hesaplandı. Bu yaklaşımda da her bir hastaya karşılık gelen öznitelikler bir sayı dizinidir. Bir hastayı oluşturan her bir görüntünün içindeki, farklı piksel kenar uzunluğundaki kare bölgelerde hesaplamalar yapıldı. Hesaplama geometrisine ait çizim Şekil 1'de verilmiştir. Bu çalışmada G değişkeni kare kenar uzunluğuna karşılık gelmektedir. Hesaplama yapılan her bir kare bölge G/2 kadar kaydırılarak bir sonraki bölge elde edildi.

İnvaziv kenar bazında kümeleme: Bir hastaya tümörün en invaziv olduğu ve son görüntünün temsil ettiği invaziv kenar görüntüsünden öznitelikler hesaplandı. İnvaziv kenar görüntülerinin her birinde, yukarıda verilen yaklaşımlar takip edilerek öznitelik değerleri elde edildi.

Bu çalışmada, her bir özniteliğe açıklayıcı bir başlık ismi ("mean Tm/St G16", "var Entropi", "min karmaşıklık G16(inv)" gibi) (var=varyans, min=minimum, max=maksimum, inv=invaziv kenar, G8/G16=8 veya 16 piksel kenar uzunluklarındaki kare bölgeler) verilerek sonuçların kolayca takip edilebilmesi sağlandı.



Şekil 1: Lokal öznelilik hesaplama geometrisi (G piksel kare kenar uzunluğu)

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Veriler bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra SPSS 15.0 paket programı ile değerlendirilmiştir. Tanımlayıcı istatistikler sunulurken, ortalama $\pm$ standart sapma, en küçük, en büyük değerler ve sınıflanabilir değişkenler için hasta sayıları ve yüzdeleri (%) verilmiş, belirteçlere ait boyanma yaygınlığı olgu sayılarıyla birlikte ifade edilmistir.

Gruplar arasında klinik, patolojik ve hesaplanabilir değişkenler yönünden farkın önemliliği Ki-kare ve Mann-Whitney testleri ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasında belirteçlerin boyanma yaygınlığı yönünden farkın önemliliği bağımsız grup sayısı iki olduğunda Mann Whitney U testi, ikiden fazla olduğunda ise Kruskal Wallis testiyle değerlendirilmiştir. Bağımsız risk faktörlerini belirlemek amacıyla Logistic ve Cox regresyon analizleri uygulanmıştır. Belirteçlerin birbiriyle ve diğer parametrelerle korelasyonu Sperman'ın Korelasyon testiyle araştırılmıştır. Belirteçlerin hastaların sağkalımları ile karşılaştırılması Kaplan–Meier yöntemi ile değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

IV BULGULAR

4.1 Klinik ve patolojik bulgular

Çalışmaya, kriterlere uygun olan 148'i erkek (%59,7) ve 100'ü kadın (%40,3) olmak üzere toplam 248 hasta retrospektif olarak seçilerek dahil edildi. Hastaların yaş aralığı 29-89, ortalamaları 65,9'dur.

Hastaların patoloji raporlarından elde edilen verilere göre tümör 153 (%61,7) hastada sol kolon, 95 (%38,3) hastada sağ kolon yerleşimlidir. TNM'ye göre tümör 2 (%0,8) hastada T1, 20 (%8,1) hastada T2, 126 (%50,8) hastada T3 ve 100 (%40,3) hastada T4 olarak, lenf nodları 127 (%51,2) hastada N0, 65 (%26,2) hastada N1, 56 (%22,6) hastada N3 olarak evrelendirilmiştir. Tümör dereceleri 236 (%95,2) hastada iyi ve orta diferansiye, 12 (%4,8) hastada kötü ve andiferansiyedir. 100 (%40,3) hastada lenf damarı, 42 (%16,9) hastada vasküler ve 55 (%22,2) hastada perinöral invazyon vardır. Radyal cerrahi sınır pozitifliği 49 (%19,8) hastada saptanmıştır.

163'ü (%65,7) yaşayan, 85'i (%34,3) ölen hastaların 2'sinde (%5) lokal nüks, 41'inde (%16,5) uzak nüks, 68'inde (%27,4) ise uzak metastaz gelişmiştir. Adjuvan tedavi 185 (%74,6) hastaya verilmiş 63 (%25,4) hastaya ise verilmemiştir.

4.2 İstatistiksel bulgular:

Hastalardan genel sağkalım, lokal ve uzak nüks ile metastaz gelişimi göz önüne alınarak her bir parametreye göre ayrı ayrı gruplar oluşturuldu. Oluşturulan her bir ikili grubun kendi içinde patolojik, klinik ve görüntü analizi verileri açısından istatistiksel yönden fark bulunup bulunmadığını tespit etmek üzere istatistik analiz yöntemlerinden Ki-kare ve Mann-Whitney testleri uygulandı. Bu testlerle yaş, pT ve pN evresi, tümör diferansiasyonu, vasküler, lenf damarı ve perinöral invazyon, adjuvan tedavi alımı, LGR5 ve CD133 ekspresyonu ile oran, entropi ve karmaşıklık özneliklerinden oluşan parametreler (90 adet değişken) ayrı ayrı değerlendirildi.

Genel sağkalım için oluşturulan grupta konvansiyonel prognostik faktörler, adjuvan tedavi ve immünohistokimyasal belirteçlere bakıldığında;

- **Patolojik evrelere göre;** T1 ve T2 olan toplam 22 hastadan 5'inin (%22,7), T3 olan toplam 126 hastadan 37'sinin (%29,4) ve T4 olan 100 hastadan 43'ünün (%43) öldüğü ve bu sonuçlara göre genel sağkalım ile pT evresi arasında anlamlı ilişki ($p=0,049$) bulunduğu saptandı.

- **Patolojik lenf nodu tutulumuna göre;** N0 olan toplam 127 hastadan 30'unun (%23,6), N1 olan toplam 65 hastadan 28'inin (%43,1) ve N2 olan toplam 56 hastadan 27'sinin (%48,2) öldüğü, bu sonuçlara göre sağkalım ile pN evresi arasında anlamlı ilişki ($p=0,001$) bulunduğu saptandı.
- **Lenf damarı invazyonuna göre;** invazyon bulunan toplam 100 hastadan 45'inin (%45), bulunmayan toplam 144 hastadan 40'ının (%27,8) öldüğü, bu sonuçlara göre sağkalım ile lenf damarı invazyonu arasında anlamlı ilişki ($p=0,005$) bulunduğu saptandı.
- **Vasküler invazyonuna göre;** invazyon bulunan toplam 42 hastadan 22'sinin (%52,4), bulunmayan toplam 205 hastadan 62'sinin (%30,2) öldüğü, bu sonuçlara göre sağkalım ile vasküler invazyon arasında anlamlı ilişki ($p=0,006$) bulunduğu saptandı.
- **Perinöral invazyona göre;** invazyon bulunan toplam 55 hastadan 27'sinin (%49,1), bulunmayan toplam 190 hastadan 57'sinin (%30) öldüğü, bu sonuçlara göre sağkalım ile perinöral invazyon arasında anlamlı ilişki ($p=0,009$) bulunduğu saptandı.
- **Adjuvan tedavi uygulanımına göre;** tedavi uygulanan toplam 185 hastadan 55'inin (%29,7), tedavi uygulanmayan toplam 63 hastadan 30'unun (%47,6) öldüğü, bu sonuçlara göre genel sağkalım ile adjuvan tedavi uygulanımı arasında anlamlı ilişki ($p=0,01$) bulunduğu saptandı.
- Genel sağkalım ile incelenen diğer parametreler olan cinsiyet, tümör derecesi, CD133 ve Lgr5 skorları arasında ise anlamlı ilişki görülmedi (Tablo 2).

Genel sağkalıma göre oluşturulan grupta bakılan hesaplanmış öznitelik parametreleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunanlar Tablo 3'de yer almakta olup;

- **Tm/St oranı,** yaşayan hastalarda ölen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,008$) düşük (sırasıyla $0,77 \pm 0,53$ ve $1,15 \pm 2,03$)
- **(Tm+Lm)/St oranı,** yaşayan hastalarda ölen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,023$) düşük (sırasıyla $0,91 \pm 0,59$ ve $1,29 \pm 2,03$)
- **Tm/Lm oranı,** yaşayan hastalarda ölen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,018$) düşük (sırasıyla $8,37 \pm 10,77$ ve $45,29 \pm 298,06$)
- **Mean Tm/St (G8) oranı,** yaşayan hastalarda ölen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,036$) düşük (sırasıyla $2,24 \pm 1,47$ ve $2,93 \pm 2,69$)

- **Var Tm/St (G8) oranı**, yaşayan hastalarda ölen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,038$) düşük (sırasıyla $32,23 \pm 32,98$ ve $49,64 \pm 62,80$)
- **MaxTm/St (G8) oranı**, yaşayan hastalarda ölen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,006$) düşük (sırasıyla $46,0 \pm 17,95$ ve $52,16 \pm 14,74$)
- **Mean Tm/St (G16) oranı**, yaşayan hastalarda ölen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,026$) düşük (sırasıyla $2,04 \pm 2,07$ ve $3,81 \pm 7,59$)
- **Tm/St (inv. A) oranı**, yaşayan hastalarda ölen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,042$) düşük (sırasıyla $0,46 \pm 1,25$ ve $0,61 \pm 1,35$) saptandı.

Tablo 2: Genel sağkalıma göre hastaların demografik, prognostik ve immünohistokimyasal verilerinin dağılımı

		Yaşayanlar		Ölenler		Toplam	P değeri
		n	%	n	%		
Cinsiyet	Erkek	95	64,2	53	35,8	148	0,535
	Kadın	68	68	32	32	100	
Derece	İyi-orta	157	66,5	79	33,5	236	0,349
	Kötü- Andif.	6	50	6	50	12	
pT	pT1-pT2	17	77,3	5	22,7	22	0,049
	pT3	89	70,6	37	29,4	126	
	pT4	57	57	43	43	100	
pN	pN0	97	76,4	30	23,6	127	0,001
	pN1	37	56,9	28	43,1	65	
	pN2	29	51,8	27	48,2	56	
Lenf damarı inv.	Var	55	55	45	45	100	0,005
	Yok	104	72,2	40	27,8	144	
Vasküler inv.	Var	20	47,6	22	52,4	42	0,006
	Yok	143	69,8	62	30,2	205	
Perinöral inv.	Var	28	50,9	27	49,1	55	0,009
	Yok	133	70	57	30	190	
Adjuvan tedavi	Var	130	70,3	55	29,7	185	0,01
	Yok	33	52,4	30	47,6	63	
Radyal CS	Pozitif	31	63,3	18	36,7	49	0,73
	Negatif	132	66,3	67	33,7	199	
CD133	1+	65	65,7	34	34,3	99	0,986
	2+	64	65,3	34	34,7	98	
	3+	34	66,7	17	33,3	51	
Lgr5	1+	65	63,7	37	36,3	102	0,768
	2+	49	65,3	26	34,7	75	
	3+	49	69	22	31	71	

*İnv.= invazyon, CS= cerrahi sınır, Andif.: andiferansiye

Tablo 3: Genel sağkalıma göre gruplandırılan hastalarda hesaplanmış öznitelik ortalamaları

	Yaşayanlar			Ölenler			P
	ort ± SD	EK	EB	ort ±SD	EK	EB	
Yaş	63,4 ±10,7	29	85	70,6 ±10,7	41	89	<0,001
Tm/St	0,77 ±0,53	0,14	3,98	1,15 ±2,03	0,14	18,64	0,008
(Tm+Lm)/St	0,91 ±0,59	0,21	3,98	1,29 ±2,03	0,17	18,64	0,023
Tm/Lm	8,37 ±10,77	1,24	83,95	45,29 ±298,06	1,44	2721,66	0,018
Ort Tm/St (G8)	2,24 ±1,47	0,25	8,42	2,93 ±2,69	0,42	20,04	0,036
Var Tm/St (G8)	32,23 ±32,98	0,19	209,02	49,64 ±62,80	0,16	352,10	0,038
EB Tm/St (G8)	46,0 ±17,95	3,53	63,00	52,16 ±14,74	3,07	63,00	0,006
Ort Tm/St (G16)	2,04 ±2,07	0,16	13,13	3,81 ±7,59	0,34	58,28	0,026
Tm/St (inv.)	0,46 ±1,25	0,00	14,50	0,61 ±1,35	0,17	11,92	0,042

*Ort.= ortalama, var= varyans, EB= en büyük, EK= en küçük, inv.= invaziv kenar

Nüks gelişimi için oluşturulan grupta konvansiyonel prognostik faktörler, adjuvan tedavi ve immünhistokimyasal belirteçlere bakıldığında;

- **Patolojik evrelere göre;** T1 ve T2 olan toplam 22 hastadan 2'sinde (%9,1), T3 olan toplam 126 hastadan 15'inde (%11,9) ve T4 olan 100 hastadan 27'sinde (%27) nüks geliştiği ve bu sonuçlara göre nüks gelişimi ile pT evresi arasında anlamlı ilişki (p=0,007) bulunduğu saptandı.
- **Patolojik lenf nodu tutulumuna göre;** N0 olan toplam 127 hastadan 11'inde (%8,7), N1 olan toplam 65 hastadan 14'ünde (%21,5) ve N2 olan toplam 56 hastadan 19'unda (%33,9) nüks geliştiği ve bu sonuçlara göre nüks gelişimi ile pN evresi arasında anlamlı ilişki (p=0,000) bulunduğu saptandı.
- **Lenf damarı invazyonuna göre;** invazyon bulunan toplam 100 hastadan 25'inde (%25), bulunmayan toplam 144 hastadan 18'inde (%12,5) nüks geliştiği ve bu sonuçlara göre nüks gelişimi ile lenf damarı invazyonu arasında anlamlı ilişki (p=0,012) bulunduğu saptandı.
- **Perinöral invazyona göre;** invazyon bulunan toplam 55 hastadan 15'inde (%27,3), bulunmayan toplam 190 hastadan 29'unda (%15,3) nüks geliştiği ve bu sonuçlara göre nüks gelişimi ile perinöral invazyon arasında anlamlı ilişki (p=0,041) bulunduğu saptandı.
- **Radiyal cerrahi sınır durumuna göre;** cerrahi sınır tutulumu olan toplam 49 hastadan 14'ünde (%28,6), tutulumu olmayan toplam 199 hastadan 30'unda (%15,1) nüks geliştiği ve bu sonuçlara göre nüks gelişimi ile radiyal cerrahi sınır tutulumu arasında anlamlı ilişki (p=0,036) bulunduğu saptandı.

- Nüks gelişimi ile incelenen diğer parametreler olan cinsiyet, tümör derecesi, vasküler invazyon, adjuvan tedavi alımı, CD133 ve Lgr5 skorları arasında ise anlamlı ilişki görülmedi (Tablo 4).

Tablo 4: Nüks durumuna göre hastaların demografik, prognostik ve immünohistokimyasal verilerinin dağılımı

		Nüks (-)		Nüks (+)		Toplam	P
		n	%	n	%		
Cinsiyet	Erkek	119	80,4	29	19,6	148	0,353
	Kadın	85	85	15	15	100	
Derece	İyi-orta	194	82,2	42	17,8	236	1,00
	Kötü- Andif.	10	83,3	2	16,7	12	
pT	pT1- pT2	20	90,9	2	9,1	22	0,007
	pT3	111	88,1	15	11,9	126	
	pT4	73	73	27	27	100	
pN	pN0	116	91,3	11	8,7	127	0,000
	pN1	51	78,5	14	21,5	65	
	pN2	37	66,1	19	33,9	56	
Lenf damarı inv.	Var	75	75	25	25	100	0,012
	Yok	126	87,5	18	12,5	144	
Vasküler inv.	Var	32	76,2	10	23,8	42	0,230
	Yok	172	83,9	33	16,1	205	
Perinöral inv.	Var	40	72,7	15	27,3	55	0,041
	Yok	161	84,7	29	15,3	190	
Adjuvan tedavi	Var	146	78,9	39	21,1	185	0,18
	Yok	58	92,1	5	7,9	63	
Radyal CS	Pozitif	35	71,4	14	28,6	49	0,036
	Negatif	169	84,9	30	15,1	199	
CD133	1+	80	80,8	19	19,2	99	0,265
	2+	85	86,7	13	13,3	98	
	3+	39	76,5	12	23,5	51	
Lgr5	1+	65	63,7	37	36,3	102	0,932
	2+	49	65,3	26	34,7	75	
	3+	49	69	22	31	71	

*İnv.= invazyon, CS= cerrahi sınır, Andif.: andiferansiye

Nüks gelişimine göre oluşturulan grupta bakılan hesaplanmış öznitelik parametreleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunanlar Tablo 5’de yer almakta olup;

- **Tm/St oranı**, nüks gelişen hastalarda gelişmeyen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0,042$) yüksek (sırasıyla $0,97 \pm 0,72$ ve $0,89 \pm 1,36$)

- **8x8'lik görüntüde ortalama Tm/St oranı**, nüks gelişen hastalarda gelişmeyen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p= 0,035$) yüksek (sırasıyla $2,96 \pm 2,16$ ve $2,38 \pm 1,95$)
- **8x8'lik görüntüde varyans Tm/St oranı**, nüks gelişen hastalarda gelişmeyen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p= 0,018$) yüksek (sırasıyla $53,92 \pm 64,53$ ve $34,80 \pm 40,45$)
- **8x8'lik görüntüde en büyük Tm/St oranı**, nüks gelişen hastalarda gelişmeyen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p= 0,012$) yüksek (sırasıyla $52,53 \pm 15,30$ ve $47,16 \pm 17,40$)
- **16x16'lık görüntüde ortalama Tm/St oranı**, nüks gelişen hastalarda gelişmeyen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p= 0,022$) yüksek (sırasıyla $3,82 \pm 5,91$ ve $2,39 \pm 4,51$)
- **16x16'lık görüntüde ortalama (Tm+Lm)/St oranı**, nüks gelişen hastalarda gelişmeyen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p= 0,048$) yüksek (sırasıyla $3,47 \pm 2,34$ ve $2,89 \pm 2,08$) olarak saptandı.

Tablo 5: Nüks durumuna göre hesaplanmış özniteliklerin ortalamaları

	Nüks (-)			Nüks (+)			p
	ort $\pm$ SD	EK	EB	ort $\pm$ SD	EK	EB	
Tm/St	0.89 $\pm$ 1.36	0.14	18.64	0.97 $\pm$ 0.72	0.19	4.66	0.042
Ort Tm/St (G8)	2.38 $\pm$ 1.95	0.25	20.04	2.96 $\pm$ 2.16	0.42	10.97	0.035
Var Tm/St (G8)	34.80 $\pm$ 40.45	0.16	323.15	53.92 $\pm$ 64.53	0.94	352.10	0.018
EB Tm/St (G8)	47.16 $\pm$ 17.40	3.07	63.00	52.53 $\pm$ 15.30	12.00	63.00	0.012
Ort Tm/St (G16)	2.39 $\pm$ 4.51	0.16	58.28	3.82 $\pm$ 5.91	0.30	31.80	0.022
Ort (Tm+Lm)/St (G16)	2.89 $\pm$ 2.08	0.37	20.04	3.47 $\pm$ 2.34	0.52	11.46	0.048

*ort: ortalama, EK: en küçük, EB: en büyük, var: varyans, G8/G16: 8x8'lik/16x16'lık görüntü

Uzak metastaz gelişimi için oluşturulan grupta konvansiyonel prognostik faktörler, adjuvan tedavi ve immünohistokimyasal belirteçlere bakıldığında;

- **Patolojik evrelere göre;** T1 ve T2 olan toplam 22 hastadan 2'sinde (%9,1), T3 olan toplam 126 hastadan 27'sinde (%21,4) ve T4 olan 100 hastadan 39'unda (%39) uzak metastaz geliştiği ve bu sonuçlara göre uzak metastaz gelişimi ile pT evresi arasında anlamlı ilişki ($p=0,002$) bulunduğu saptandı.
- **Patolojik lenf nodu tutulumuna göre;** N0 olan toplam 127 hastadan 15'inde (%11,8), N1 olan toplam 65 hastadan 20'sinde (%30,8) ve N2 olan toplam 56

hastadan 33'ünde (%58,9) uzak metastaz geliştiği ve bu sonuçlara göre uzak metastaz gelişimi ile pN evresi arasında anlamlı ilişki ($p=0,000$) bulunduğu saptandı.

- **Lenf damarı invazyonuna göre;** invazyon bulunan toplam 100 hastadan 41'inde (%41), bulunmayan toplam 144 hastadan 26'sında (%18,1) uzak metastaz geliştiği ve bu sonuçlara göre uzak metastaz gelişimi ile lenf damarı invazyonu arasında anlamlı ilişki ($p=0,000$) bulunduğu saptandı.
- **Vasküler invazyonuna göre;** invazyon bulunan toplam 42 hastadan 21'i nde (%50), bulunmayan toplam 205 hastadan 46'sında (%22,4) uzak metastaz geliştiği ve bu sonuçlara göre uzak metastaz gelişimi ile vasküler invazyon arasında anlamlı ilişki ($p=0,000$) bulunduğu saptandı.
- **Perinöral invazyona göre;** invazyon bulunan toplam 55 hastadan 24'ünde (%43,6), bulunmayan toplam 190 hastadan 44'ünde (%23,2) uzak metastaz geliştiği ve bu sonuçlara göre uzak metastaz gelişimi ile perinöral invazyon arasında anlamlı ilişki ($p=0,003$) bulunduğu saptandı.
- Uzak metastaz gelişimi ile incelenen diğer parametreler olan cinsiyet, tümör derecesi, adjuvan tedavi alımı, radyal cerrahi sınır tutulumu, CD133 ve Lgr5 skorları arasında ise anlamlı ilişki görülmedi (Tablo 6).

Metastaz gelişimine göre oluşturulan bakılan hesaplanmış öznitelik parametreleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunanlar Tablo 7'de yer almakta olup;

Tm/Lm oranı, metastaz gelişen hastalarda gelişmeyen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p= 0,048$) düşük (sırasıyla $25,14 \pm 206,10$ ve $10,59 \pm 16,85$)

- **8x8'lik görüntüde varyans Tm/St oranı,** nüks gelişen hastalarda gelişmeyen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,018$) yüksek (sırasıyla $47,24 \pm 55,95$ ve $34,78 \pm 41,42$)
- **8x8'lik görüntüde en büyük Tm/St oranı,** nüks gelişen hastalarda gelişmeyen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p= 0,012$) yüksek (sırasıyla $52,64 \pm 14,42$ ve $46,40 \pm 17,80$) olarak saptandı.

Tablo 6: Uzak metastaz durumuna göre hastaların demografik, prognostik ve immünohistokimyasal verilerinin dağılımı

		Uzak metastaz (-)		Uzak metastaz (+)		Toplam	P
		n	%	n	%		
Cinsiyet	Erkek	109	73,6	39	26,4	148	0,646
	Kadın	71	71	29	29	100	
Derece	İyi-orta	170	72	66	28	236	0,52
	Kötü- Andif.	10	83,3	2	16,7	12	
pT	pT1- pT2	20	90,9	2	9,1	2	0,002
	pT3	99	78,6	27	21,4	126	
	pT4	61	61	39	39	100	
pN	pN0	112	88,2	15	11,8	127	0,00
	pN1	45	69,2	20	30,8	65	
	pN2	23	41,1	33	58,9	56	
Lenf damarı inv.	Var	59	59	41	41	100	0,00
	Yok	118	81,9	26	18,1	144	
Vasküler inv.	Var	21	50	21	50	42	0,00
	Yok	159	77,6	46	22,4	205	
Perinöral inv.	Var	31	56,4	24	43,6	55	0,003
	Yok	146	76,8	44	23,2	190	
Adjuvan tedavi	Var	129	69,7	56	30,3	185	0,085
	Yok	51	81	12	19	63	
Radiyal CS	Pozitif	31	63,3	18	36,7	49	0,11
	Negatif	149	74,9	50	25,1	199	
CD133	1+	70	70,7	29	29,3	99	0,838
	2+	73	74,5	25	25,5	98	
	3+	37	72,5	14	27,5	51	
Lgr5	1+	73	71,6	29	28,4	102	0,522
	2+	52	69,3	23	30,7	75	
	3+	55	77,5	16	22,5	71	

*İnv.= invazyon, CS= cerrahi sınır, Andif.: andiferansiye

Tablo 7: Uzak metastaz durumuna göre hesaplanmış hesaplanmış özniteliklerin ortalamaları

	Uzak metastaz (-)			Uzak metastaz (+)			p
	ort ± SD	EK	EB	ort ± SD	EK	EB	
Tm/Lm	25,14±206,10	1,24	2721,66	10,59±16,85	2,36	130,62	0,048
Var Tm/St (G8)	34,78±41,42	0,16	323,15	47,24±53,95	0,94	352,10	0,044
EB Tm/St (G8)	46,40±17,80	3,07	63,00	52,64±14,42	8,14	63,00	0,005

*ort: ortalama, var: varyans, EB: en büyük, G8: 8x8'lik görüntü

Konvansiyonel prognostik faktörler olan pT ve pN evresi ile hesaplanabilir öznitelikler arasındaki olası ilişkiyi belirlemek üzere yapılan istatistiksel analizlerde, pT ve pN ile anlamlı ilişkisi bulunan parametreler sırasıyla Tablo 8 ve Tablo 9'de verilmiştir. Ayrıca her bir evre arasında karşılaştırmalı analizlerde yapılmıştır.

Tablo 8: pT evresine göre gruplandırılmış hastalarda hesaplanmış öznitelik ortalamaları

	pT1+pT2	pT3	pT4	p
Var Karmaşıklık	16445,62±11396,62	15480,73±11192,04	11721,91±9658,62	0,001
EK Karmaşıklık	119,90±71,18	103,93±83,76	150,77±9283	0,001
Var Entropi	0,16±0,10	0,18±0,15	0,12±0,13	0,008
EK Entropi	0,86±0,35	0,74±0,46	0,94±0,43	0,003
Var Entropi G8	0,50±0,07	0,50±0,07	0,47±0,07	0,011
Var Entropi G16	0,32±0,13	0,33±0,12	0,28±0,12	0,012
EK Entropi G16	0,49±0,15	0,04±0,15	0,075±0,21	0,044
EK Tm/St (G16) inv	0,02±0,04	0,08±0,36	0,12±0,32	0,000
EK (Tm+Lm)/St (G16) inv	0,02±0,06	0,08±0,37	0,13±0,33	0,000
Karmaşıklık inv	146,86±75,70	146,97±93,60	201,41±109,74	0,000
Ort Kompleksite G8 inv	3,05±1,66	3,11±2,01	4,23±2,40	0,001
Var Kompleksite G8 inv	14,84±8,54	14,19±7,68	17,40±9,00	0,017
EB Karmaşıklık G8 inv	14,50±3,52	13,72±3,72	14,93±3,71	0,030
Ort Karmaşıklık G16 inv	39,86±13,07	40,22±16,55	46,28±19,46	0,003
EK Karmaşıklık G16 inv	2,13±4,08	2,67±6,13	4,85±8,97	0,011
Entropi (inv)	1,01±0,35	0,98±0,42	1,16±0,44	0,003
Ort Entropi (G8) inv	0,60±0,30	0,60±0,34	0,78±0,38	0,001
EB Entropi (G8) inv	1,90±0,09	1,86±0,20	1,90±0,10	0,017
Ort Entropi (G16) inv	0,76±0,43	0,80±0,43	1,00±0,46	0,002
EK Entropi (G16) inv	0,13±0,24	0,15±0,32	0,27±0,44	0,003

*Ort: ortalama, EK: en küçük, EB: en büyük, inv: invaziv kenar, G8/16: 8x8/ 16x16'lık görüntü

Tablo 9: pN evresine göre gruplandırılmış hastalarda hesaplanmış öznitelik ortalamaları

	pN0	pN1	pN2	p
Tm/Lm	8,62±11,78	51,05±339,27	14,18±23,91	0,049
EB Tm/St G8)	46,79±17,85	44,76±18,29	55,00±11,64	0,003
Var Karmaşıklık (G8) inv	14,12±8,09	17,11±8,34	16,94±8,84	0,036
EB (Tm+Lm/St) (G8)	56,45±15,38	52,90±17,94	61,62±6,19	0,008
Var Karmaşıklık (G16) inv	164,57±140,98	221,06±163,29	213,41±176,28	0,021

*EB: en büyük, inv: invaziv kenar, G8/G16: 8x8/16x16'lık görüntü

pT1+pT2 ve pT4 evrelerindeki hesaplanabilir öznitelikler karşılaştırıldığında; invaziv kenarlarda ileri evrede tümör/stroma oranı, karmaşıklık ve entropinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 10).

Tablo 10: pT1+pT2 ile pT4 evrelerindeki hastalarda hesaplanmış öznitelik ortalamaları

	pT1+pT2	pT4	p
EK Tm/St (G16) inv	0,02±0,04	0,12±0,32	0,019
EK (Tm+Lm)/St (G16) inv	0,02±0,06	0,13±0,33	0,023
Karmaşıklık inv	146,86±75,70	201,41±109,74	0,024
Ort Karmaşıklık (G8) inv	3,05±1,66	4,23±2,40	0,028
Ort Karmaşıklık (G16) inv	13,39±9,86	23,36±14,12	0,014
Ort Entropi (G8) inv	0,60±0,30	0,78±0,38	0,037
Ort Entropi (G16) inv	0,76±0,43	1,00±0,46	0,035

*Ort: ortalama, EK: en küçük, inv: invaziv kenar, G8/G16:8x8/16x16'lık görüntü

pT3 ve pT4 evrelerindeki hesaplanabilir öznitelikler karşılaştırıldığında; invaziv kenarlarda 8x8'lik ve 16x16'lık görüntülerde, hesaplanmış oranı, karmaşıklık ve entropinin özniteliklerinin birçoğunda evredeki artışla birlikte anlamlı olarak daha yükseldiği görülmüştür (Tablo 11).

Tablo 11: pT3 ile pT4 evrelerindeki hastalarda hesaplanmış öznitelik ortalamaları

	pT3	pT4	p
Var Entropi (G8)	0,50±0,07	0,47±0,07	0,003
Ort Entropi (G8) inv	0,60±0,34	0,78±0,38	0,000
EB Entropi (G8) inv	1,86±0,20	1,90±0,10	0,003
Var Entropi (G16) inv	0,27±0,16	0,23±0,15	0,003
Ort Karmaşıklık (G8) inv	3,11±2,01	4,23±2,40	0,000
Var Karmaşıklık (G8) inv	14,19±7,68	17,40±9,00	0,003
EB Karmaşıklık (G8) inv	13,72±3,72	14,93±3,71	0,012
Ort Entropi (G16) inv	0,80±0,43	1,0±0,46	0,033
EK Entropi (G16) inv	0,15±0,32	0,27±0,44	0,001
EK Tm/St (G16) inv	0,08±0,36	0,12±0,32	0,000
Ort Karmaşıklık (G16) inv	17,43±11,84	23,36±14,12	0,002
EK Karmaşıklık (G16) inv	2,67±6,13	4,85±8,97	0,003
EB Karmaşıklık (G16) inv	40,22±16,55	46,28±19,46	0,012
Karmaşıklık inv	146,97±93,6	201,41±109,74	0,000
Entropi inv	0,98±0,42	1,16±0,44	0,001
Var Karmaşıklık	13480,73±11192,04	11721,91±9658,62	0,007
Var Entropi	0,18±0,15	0,12±0,13	0,002
Ort Entropi	1,33±2,24	1,40±0,21	0,020

*Ort: ortalama, var: varyans, EK: en küçük, EB: en büyük, inv: invaziv kenar, G16: 16x16'lık görüntü

pN0 ve pN1 evrelerindeki hesaplanabilir öznitelikler karşılaştırıldığında; invaziv kenarlarda 8x8'lik ve 16x16'lık görüntülerde, lenf nodu pozitif olan hastalarda karmaşıklık özniteliğinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 12).

Tablo 12: pN0 ile pN1 evrelerindeki hastalarda hesaplanmış öznitelik ortalamaları

	pN0	pN1	p
Var Karmaşıklık (G8) inv	14,12±8,09	17,11±17,94	0,019
Var Karmaşıklık (G16) inv	164,57±140,98	221,06±163,39	0,009
EB Karmaşıklık (G16) inv	39,88±17,81	46,09±16,47	0,019

*var: varyans, EK: en küçük, EB: en büyük, inv: invaziv kenar, G8/G16: 8x8/16x16'lık görüntü

pN0 ve pN2 evrelerindeki hesaplanabilir öznitelikler karşılaştırıldığında; lenf nodu pozitif olan hastalarda Tm/Lm oranının ve 8x8'lik görüntülerde Tm/Stroma oranının daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 13)

Tablo 13: pN0 ile pN2 evrelerindeki hesaplanmış özniteliklerin ortalamaları

	pN0	pN2	p
Tm/Lm	8,62±11,78	14,18±23,91	0,015
EB Tm/St (G8)	46,79±17,85	55,00±11,64	0,004
EB (Tm+Lm)/St (G8)	56,45±15,38	61,62±6,19	0,015

*EB: en büyük, inv: invaziv kenar, G8: 8x8'lik görüntü

pN1 ve pN2 evrelerindeki hesaplanabilir öznitelikler karşılaştırıldığında; 8x8'lik görüntülerde, lenf nodu pozitif olan hastalarda tm/stoma oranının anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 14)

Tablo 14: pN1 ile pN2 evrelerindeki hastalarda hesaplanmış öznitelik ortalamaları

	pN1	pN2	p
Tm/Lm	51,05±339,27	14,18±23,91	0,001
EB (Tm+Lm)/St (G8)	52,90±17,94	61,62±6,19	0,002

*EB: en büyük, G8: 8x8'lik görüntü

CD133 boyanma yaygınlıklarına göre oluşturulan alt gruplarda;

- **Genel sağkalıma göre;** skoru 1+ olan 99 (% 39,9) hastadan 34'ünün (%34,3), skoru 2+ olan 98 (%39,5) hastadan 34'ünün (%34,7), skoru 3+ olan 51 (%20,6) hastadan 17'sinin (%33,3) öldüğü belirlendi.

Lgr5 boyanma yaygınlıklarına göre oluşturulan alt gruplarda;

- **Genel sağkalıma göre;** skoru 1+ olan 102 (%41,1) hastadan 37'sinin (3,6,3), skoru 2+ olan 75 (%30,2) hastadan 26'sının (%34,7) ve skoru 3+ olan 71 (%28,6) hastadan 22'sinin (%31) öldüğü belirlendi.

İHK'sel belirteçlerde skorlara göre oluşturulan alt gruplar arasında, genel sağkalım, nüks ve metastaz gelişimi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Ayrıca her ikisi de kök hücre belirteci olduğu belirtilen CD133 ve Lgr5 arasında yapılan istatistiksel analizlerde, bu iki belirteç arasında korelasyon saptanmadı.

İHK'sel belirteçlerde skorlara göre oluşturulan alt gruplarda, hesaplanmış öznelilik parametreleri arasındaki ilişki Kruskal–Wallis tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi.

CD133 için;

- ortalama entropi (G16) ($p=0,042$),
- invaziv kenarda 16x16'lık görüntüde en küçük karmaşıklık ($p=0,023$),
- invaziv kenarda 16x16'lık görüntüde ortalama entropi ($p=0,011$),
- invaziv kenarda 16x16'lık görüntüde en küçük entropi ($p=0,006$) ve
- invaziv kenarda 16x16'lık görüntüde en büyük entropi ($p=0,048$) parametrelerinde, alt gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark elde edildi (Tablo 15).

Tablo 15: CD133 için için istatistiksel anlamlı bulunan hesaplanmış öznelilik ortalamalarının karşılaştırılması

	CD133	n	Ort. $\pm$ St. Hata	P Değeri
Ort Entropi (G16)	1+	99	1,26 (0,247)	0,042
	2+	98	1,17 (0,240)	
	3+	51	1,22 (0,274)	
EK Karmaşıklık (G16 inv)	1+	99	4,66 (8,420)	0,023
	2+	98	2,42 (6,415)	
	3+	51	3,31 (6,561)	
Ort Entropi (G16 inv)	1+	99	0,97 (0,456)	0,011
	2+	98	0,77 (0,442)	
	3+	51	0,89 (0,449)	
EK Entropi (G16 inv)	1+	99	0,26 (0,416)	0,006
	2+	98	0,13 (0,317)	
	3+	51	0,19 (0,367)	
EB Entropi (G16 inv)	1+	99	1,65 (0,257)	0,048
	2+	98	1,53 (0,402)	
	3+	51	1,58 (0,326)	

*Ort: ortalama, EK: en küçük, EB: en büyük, inv: invaziv kenar, G16: 16x16'lık görüntü

Lgr5 için;

- 16x16'lık görüntüde en küçük Tm/St oranı ($p=0,049$) ve
- invaziv kenarda 16x16'lık görüntüde varyans entropi ($p=0,043$) parametreleri ile (Tablo 16)

Tablo 16: Lgr5 için istatistiksel anlamlı bulunan hesaplanmış öznitelik ortalamalarının karşılaştırılması

	Lgr5	n	Ort.±SD	P Değeri
EK Tm/St (G16)	1+	102	0,23 (0,038)	0,049
	2+	75	0,57 (0,249)	
	3+	71	0,07 (0,261)	
Var Entropi (G16 inv)	1+	102	0,23 (0,133)	0,043
	2+	75	0,26 (0,174)	
	3+	71	0,29 (0,169)	

*EK: en küçük, Ort: ortalama, var: varyans, G16: 16x16'lık görüntü

Bağımsız risk faktörlerini belirlemek amacıyla uygulanan Logistic ve Cox regresyon analizlerinde; genel sağkalım durumu, nüks ve uzak metastaz gelişimi ile klinikopatolojik ve hesaplanmış öznitelik parametreleri arasında yapılan tek değişkenli analizlerde istatistiksel anlamlılık saptanan parametreler modele alındı.

Genel sağkalım için; yaş, pT ve pN evreleri, lenf damarı, vasküler ve perinöral invazyonlar, Tm/St (A), (Tm+Lm)/St (A), mean Tm /St (G8), var Tm/St (G8), max Tm/St (G8), mean Tm/St (G16), var entropi (G8) ve Tm/St inv, (A)'dan oluşan parametreler modele alındı ve analiz sonucunda modelde kalan parametrelere göre ölüm riskinin;

- yaş ile 1,07 kat,
- pN evresi ile 2,5 kat,
- perinöral invazyon varlığı ile 2,2 kat,
- max Tm/St (G8) ile 1,02 kat,
- mean Tm/St (G16) ile 1,2 kat ve
- Entropi (inv) ile 1,9 kat arttığı saptandı (Tablo 17).

Tablo 17: Genel sağkalım için bağımsız risk faktörlerinin belirlenmesine yönelik uygulanan çok değişkenli logistik regresyon analizi sonuçları

	P değeri	Odd's Oranı	%95 Güven Aralığı (CI)
Yaş	0,000	1,074	1,042-1,107
pN	0,018	2,597	1,176-5,756
Perinöral invazyon	0,037	2,217	1,049-4,689
EB Tm/St (G8)	0,032	1,025	1,002-1,048
Ort Tm/St (G16)	0,850	1,259	0,989-1,635
Entropi (mv)	0,078	1,922	0,929-3,979

*Ort: ortalama, EB: en büyük, inv: invazyon kenar, G8/G16:8x8/ 16x16'lık görüntü

Nüks için; pT ve pN evreleri, lenf damarı ve perinöral invazyonlar, radyal cerrahi sınır durumu, adjuvan tedavi alımı, Tm/St (A), Tm/Lm (A), mean Tm/St (G8), var Tm/St (G8), max Tm/St (G8), mean Tm/St (G16), varTm/St (G16) ve mean (Tm+Lm)/St (G8)'den oluşan parametreler modele alındı ve analiz sonucunda modelde kalan parametrelere göre nüks riskinin;

- pT evresi ile 2,4 kat,
- pN evresi ile 4,211 kat ve
- 16x16'lık görüntülerde varyans Tm/St oranı ile 1,002 kat arttığı saptandı (Tablo 18).

Tablo 18: Nüks için bağımsız risk faktörlerinin belirlenmesine yönelik uygulanan çok değişkenli logistik regresyon analizi sonuçları

	P değeri	Odd's Oranı	%95 Güven Aralığı (CI)
pT	0,281	2,400	0,488-11,809
pN	0,002	4,211	1,711-10,359
Var Tm/St (G16)	0,024	1,002	1,000-1,003

*Var: varyans, G16: 16x16'lık görüntü

Uzak metastaz için; analize pT ve pN evreleri, lenf damarı, vasküler ve perinöral invazyonlar, Tm/Lm (A) ve max Tm/St (G8)'den oluşan parametreler modele alındı ve analiz sonucunda modelde kalan parametrelere göre metastaz riskinin;

- pT evresi ile 3,357 kat ve
- pN evresi ile 9,479 kat arttığı saptandı (Tablo 19).

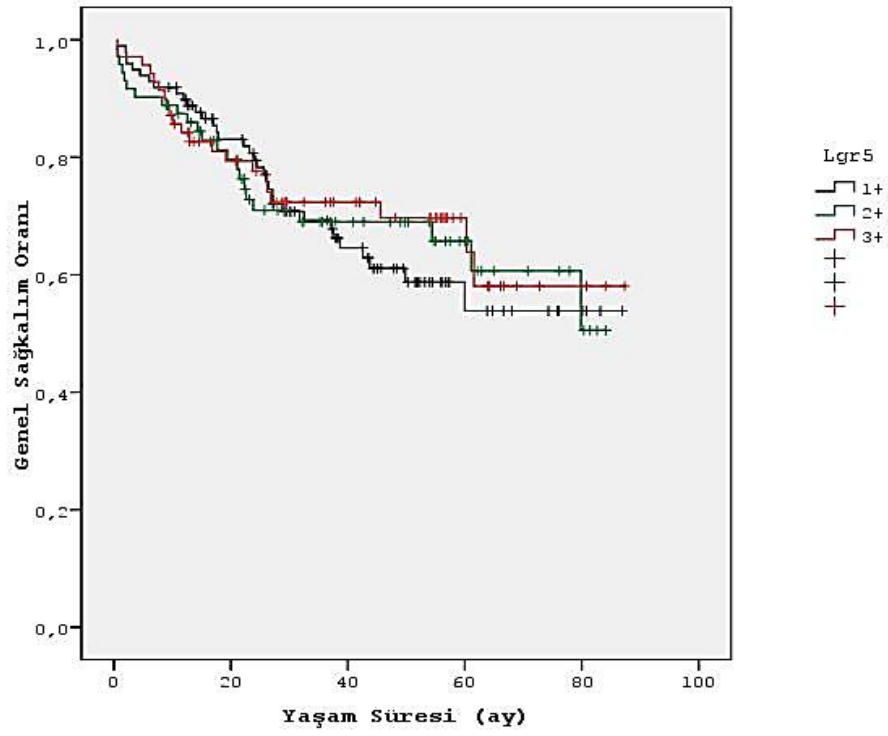
Tablo 19: Uzak metastaz gelişimi için bağımsız risk faktörlerinin belirlenmesine yönelik uygulanan çok değişkenli logistik regresyon analizi sonuçları

	P değeri	Odd's Oranı	%95 Güven Aralığı (CI)
pT	0,153	3,337	0,691-16,296
pN	0,000	9,479	4,263-21,063

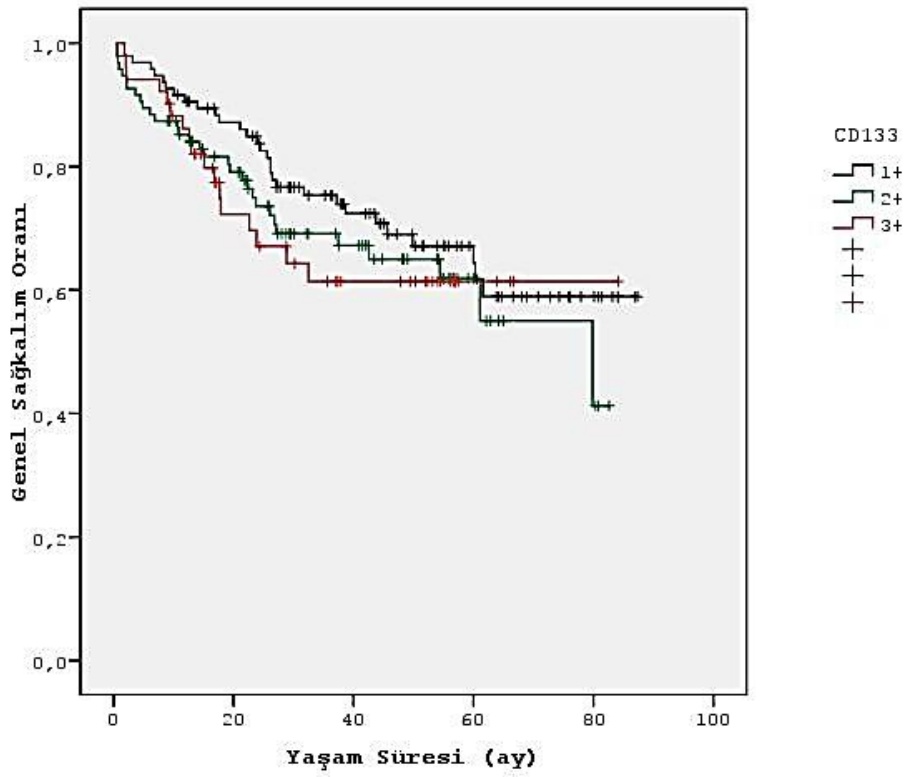
Patolojik prognostik veriler hesaplanmış öznitelik parametreleri ve İHK'sel sonuçlar ile genel sağkalım arasındaki ilişkiyi belirlemek için Kaplan Meier testi uygulandı. Hastaların klinik takip sürelerinin 1 ay ile 87 ay arasında değiştiği, ortalama takip süresinin $35,7 \pm 22,78$ ay olduğu belirlendi. Yaşayan ve ölen hastaların tümünün sağkalım analizine göre tahmini yaşam süreleri ortalama 60,89 ay (CI: 56,16-65,56) olarak tespit edildi.

Patolojik prognostik verilerden pN evresi ($p=0,02$), lenf damarı invazyonu ($p=0,09$), venöz invazyon ($p=0,01$), perinöral invazyon ($p=0,015$) ve adjuvan tedavinin ($p=0,032$) genel sağkalım oranı ile istatistiksel anlamlı ilişkisi bulunduğu belirlendi.

Lgr5 skoru 1+ olan hastaların bulunduğu grup 1'de ortalama yaşam süresi $59,39 \pm 3,7$ ay, skoru 2+ olan hastaların bulunduğu grup 2'de $59,68 \pm 4,1$ ve skoru 3+ olan hastaların bulunduğu grup 3'te ise $62,69 \pm 4,4$ olup Lgr5 ekspresyonu ile genel sağkalım oranı arasında anlamlı fark izlenmedi. CD133 skoru 1+ olan hastaların bulunduğu grup 1'de ortalama yaşam süresi $64,16 \pm 3,4$ ay, skoru 2+ olan hastaların bulunduğu grup 2'de $56,63 \pm 3,7$ ve skoru 3+ olan hastaların bulunduğu grup 3'te ise $57,61 \pm 5,1$ olup CD133 ekspresyonu ile yaşam süresi arasında anlamlı fark izlenmedi. Her iki belirteç için skorlar ile elde edilen, Kaplan Meier eğrileri Grafik 1 ve 2'de sunulmuştur.



Grafik 1: Kaplan-Meier eğrisinde Lgr5 ekspresyonunun yaşam süresi ile ilişkisi (1: skor1+, 2: skor2+, 3: skor3+)



Grafik 2: Kaplan-Meier eğrisinde CD133 ekspresyonunun yaşam süresi ile ilişkisi (1: skor1+, 2: skor2+, 3: skor3+)

V TARTIŞMA

Kolorektal kanser Batı ülkelerinde en sık görülen malignitelerden biridir. Oldukça erken evrelerde semptomlara yol açabilmesine ve kolaylıkla tanı konulup rezeksiyon ile tedavi edilebilmesine karşın, hala kanser ile ilişkili ölümlerde Avrupa’da ikinci, Birleşik Devletlerde üçüncü sırada yer almaktadır. Ortalama yaşam süresi bir çok faktöre bağlı olarak bir aydan kısa ya da beş yıldan uzun olabilmektedir [143].

KRK prognozu üzerinde dekadlar önce yoğun araştırmalar yapılmış ancak KRK için ilk faydalı prognostik sistem, 1930 yılında Cuthbert Dukes tarafından geliştirilmiştir [144]. Dukes, prognozu belirleyen en önemli faktörün tanı anındaki evre olduğunu belirtmiştir. Ancak geleneksel patolojik evreleme sistemleri tedavi kararını belirlemede hala en önemli araç olmakla birlikte, aynı evredeki olgularda sağkalım süreleri arasındaki farklılıkların gözlenmesi ve evre II KRK’lı olguların %25’inde 5 yıl içinde rekürrens gelişmesi gibi nedenlerle klinik seyir ve tedavi cevabı için ılımlı göstergeler oldukları düşünülmeye başlanmıştır. Bu nedenle son yıllardaki çalışmalarda, hastalar arasındaki bu yüksek riskli grubu belirleyerek ek tedaviye uygun bireyleri saptamak üzerine odaklanılmaktadır [145]. Bu amaçla günümüzde, KRK’lı olguları stratifiye etmek için kullanılabilecek ek prognostik belirteçleri belirlemek üzere çalışmalar yapılmaktadır.

Olası bir çok prognostik faktör üzerinde yapılan çalışmalar arasında tümör stroması üzerinde yapılan araştırmalar ilgi uyandırmıştır. Tümör-stroma etkileşimi, “tohum ve toprak” olarak adlandırılan bir hipotez ile ilk kez 1889 yılında Sir James Paget tarafından gündeme getirilmiştir. Diğer malign epitelyal tümörlerde olduğu gibi KRK’da tümör mikroçevresi olarak adlandırılan stroma; fibroblastlar, lenfatik ve vasküler kanallar ve inflamatuvar hücrelerin oluşmaktadır. Giderek artan bir şekilde de, bu mikroçevrenin invazyon, metastaz, hastalık progresyonu ve prognoz üzerinde önemli rolü bulunduğu fikri kabul görmektedir [121].

Meme [91, 93, 146], akciğer [94, 147], deri [148], prostat [88], özofagus[149] ve serviks [150] gibi farklı organ maligniteleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, primer tümör komponentlerinin hastalar arasında belirgin farklılık gösterdiği ve tümör kompozisyonunun hasta sağkalımı ile ilişki olduğu öne sürülmüştür. Geçmişte yapılan bu araştırmalar incelendiğinde benzer nitelikte sonuçlar elde edildiği görülürken, çalışma dizaynları arasında belirgin farklar dikkati çekmektedir.

Sis ve arkadaşları [103] tarafından yapılan bir çalışmada “dezmozplazi” üzerinde çalışılmış ve daha önce akciğer, meme ve deri karsinomları üzerinde yapılmış olan çalışma sonuçlarını destekler şekilde tümör invazyonu, metastaz gelişimi ve rekürrens ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, kolon adenokarsinom tanısı almış 112 hastaya ait tümör kesitleri, histokimyasal olarak van Gieson ile boyanmıştır. Bu boyanmalar ışık mikroskopunda değerlendirilerek semikantitatif olarak az, orta ve şiddetli dezmozplazi olmak üzere sınıflandırılmıştır. Ayrıca boyalı her kesitten alınan 10 adet digital görüntü üzerinde bir yazılım aracı kullanılarak renklere göre segmentasyonlar oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda yapılan tek değişkenli analizlerle semikantitatif dezmozplazi değeri ve dezmozplazi yüzdesi ile sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Ayrıca çok değişkenli analizlerde dezmozplazi yüzdesinin sağkalım için bağımsız belirleyici olduğu gösterilmiştir.

Dezmozplazi üzerinde Tsujino ve arkadaşları [105] tarafından yapılan bir başka çalışmada, dezmozplastik reaksiyonda temel rol oynadığı düşünülen ve stromada yer alan miyofibroblastların tümör rekürrensi üzerindeki etkisini belirlemek için 192 KRK’lı hastada, alfa düz kas aktini (α -SMA) ile immünboyama yapılmıştır. Bu boyanan lamlardan elde edilen görüntülerde rastgele seçilen 5 alanda tümör yüzeyi, orta bölge ve en derin tümör alanlarından her bir hasta için 15 görüntü elde edilmiştir. Boyalı alanın seçilmiş alana oranları alınmış daha sonra her üç bölgenin ortalaması hesaplanmıştır. Tüm hastalar için bu son ortalamalar arasında fark bulunmadığı görülerek bu değer cut-off olarak kullanılmış ve yüksek-SMA’lı ve düşük-SMA’lı 2 grup elde edilmiştir. Bu 2 grup karşılaştırıldığında yüksek-SMA’lı grupta genel sağkalımın anlamlı düşük ($p < 0.0001$) olduğu görülmüştür. Ortalama yerine ortanca değer kullanıldığında ise anlamlı farklılık elde edilememiştir.

Ngan ve arkadaşları [151], o dönemde yapılan çeşitli gen ekspresyonu profillemeye çalışmalarında stromal vimentin ekspresyonu ile tümör gelişimi, progresyonu ve kemosenitivite arasında ilişki saptanmasından yola çıkarak, 142 KRK’lı hastada stromal vimentin ekspresyonunu araştırmayı planlamıştır. Tümörlü kesitlerde vimentin ile immünboyama sonrası, 10 farklı alanda “sıcak nokta” görüntüsü alıp, bu görüntüler üzerinde bir yazılım aracı ile semikantitatif analiz gerçekleştirilmiştir. Yüksek vimentin ekspresyonu bulunan grupta genel ve hastalıksız sağkalım daha düşük olarak saptanırken, patolojik parametrelerden infiltratif patern, tümör tomurcuklanması ve stromal yanıtın yaygınlığı ile vimentin ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Mesker ve arkadaşları [89] da yaptıkları bir çalışmada da, ilk kez 1940 yılında Chalkley'in [152] tanımladığı, bileşenleri objektif olarak ölçebilen morfolometrik bir metod veya benzeri yerine, x2,5 yada x5'lik objektif kullanarak infiltratif kenarlardan tümör görüntüsü almıştır. Bu görüntüler x10'luk objektif ile değerlendirilerek lam üzerindeki tüm infiltratif küçük tümör adacıkları görsel tahmin yöntemi ile skorlanmıştır. Analizler sonucunda ise tümör hücresi yüzdesinin bağımsız bir prognostik faktör olduğu bildirilmiştir [89].

Kruijff ve arkadaşları [91] ile Courrech Staal ve arkadaşları [92] tarafından yürütülmüş olan çalışmalar incelendiğinde de, daha önce Mesker WE tarafından tarif edilen, kalitatif görsel tahmin yöntemi ile en derin invazyon sınırındaki stromadan en zengin bölgeleri değerlendirmiş oldukları görülmektedir.

Yakın dönemlerde yürütülmüş olan bir başka çalışmada ise West ve arkadaşları [90] tümör/stroma oranını belirlemek için, 9 mm² den oluşan bir tümör alanında 300 noktadan oluşan bir grid kullanarak, lüminal yüzeyde tümör hücre yoğunluğunun en fazla olduğu bölgede, kendilerinin geliştirdikleri, kısa sürede ve kesin ölçüme izin veren bir yazılımdan faydalanmışlardır. Çalışma sonucunda düşük tümör oranının bağımsız kötü prognostik faktör olduğu saptanmıştır.

Sonuçları bakımından diğer çalışmalardan farklılıklar gösteren araştırmalar da bulunmaktadır. Ünlü ve arkadaşları tarafından 85 laringeal skuamöz hücreli karsinomlu hastada yapılan araştırmada bir yazılım aracı kullanılarak tümör/stroma oranı kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda tümör/stoma oranının prognostik bir belirteç olduğu sonucuna varılmıştır [153].

Diğer bir araştırma Tanaka ve arkadaşları [154] tarafından 93 meme karsinomlu hasta üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ölçümler tümör maksimum çapını yansıtan alanlar üzerinde yapılmış ve semikantitatif olarak nokta sayımı ile tüm tümörü yansıtacak şekilde malign epitelial tümör hücrelerinin tüm hücrelere oranı alınarak sellülarite indeksi belirlenmiştir. Ayrıca bu indeksin yer aldığı bir formül kullanılarak total kanser hücre sayısı indeksi oluşturulmuştur. Bu hesaplamalardan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ise total kanser hücre sayısı indeksinin prognoz ile ilişki olduğu görülmüştür.

Tarafımızca yapılan bu çalışmada, literatürde yeralan bu bilgiler gözönüne alınarak, kolon karsinomlarında; tümör invaziv sınırındaki infiltratif patern, tümör/stroma oranı ve tümörde

bulunan kök hücre miktarının prognostik önemi bulunan histopatolojik faktörler arasında olup birbiriyle ilişkili bir fenotipi yansıtıyor olabilecekleri yönünde bir hipotez oluşturulmuştur.

Objektif değerlendirmeler yapabilmek amacıyla, literatüre benzer şekilde neoadjuvan tedavi alan ve müsinöz adenokarsinom tanılı hastalar çalışma dışında bırakılmıştır. Hastalara ait tümörün en invaziv olduğu alanı temsil eden preparatlardan tümörü tam kat yansıtacak şekilde çoklu dijital görüntüler alınarak bilgisayar ortamında kayıtlar oluşturulmuştur. Bu araştırma kapsamında geliştirilmiş olan bir yazılım aracı kullanılarak, bilgisayar ortamında hastalara ait her bir görüntü üzerinde tümör, stroma, lümen ve kesite bağlı oluşan boşluklar ayrı ayrı işaretlenmiş ve kayıt altına alınmıştır. Kayıtlı olan bu görüntüler üzerinde, prognostik önemi üzerinde uzun zamandır durulan ve çeşitli kereler incelenmiş olan tümör/stroma oranını değerlendirmek üzere 3 farklı formül kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Bu formülleri oluştururken, lümenal boşlukların dahil olduğu ve hariç bırakıldığı ayrı hesaplamalar yapmak ve ayrıca lümen gelişimin diferansiasyonun bir göstergesi olması nedeniyle bu parametreyi de değerlendirmek amaçlanmıştır.

Tümörün yapısal özelliklerini değerlendirmek amacıyla da entropi ve karmaşıklık özniteliklerinden faydalanılmıştır. Tümörün düzensizliğinin bir göstergesi olan bu öznitelikler, tümörün yapısal özelliklerini daha objektif olarak değerlendirebilmek ve buradan elde edilen sonuçlarla hastaların prognozları arasındaki olası ilişkiyi belirlemek amacıyla hesaplanmıştır. Literatürde yer alan, geçmişte yapılmış ve tarafımızca ulaşılabilen az sayıda çalışmada entropi özniteliğinin genellikle kromatin yapısındaki düzensizliği değerlendirmek amacıyla kullanıldığı görülmüştür.

Bu çalışmada oran, entropi ve karmaşıklık öznitelikleri; her bir hastaya ait çoklu dijital görüntülerin tümü değerlendirmeye dahil edilerek ve bununla birlikte tümörün invazyon paternini en iyi yansıttığını düşündüğümüz son dijital görüntüler için ayrıca değerlendirmeler yapılarak ortalama, varyans, en küçük ve en büyük değerler elde edilecek biçimde hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar esnasında, tümörün heterojenitesine bağlı olarak son alınan ortalamalardan sonra, elde edilen değerlerde anlamlılığın kaybolabildiği dikkatimizi çekmiştir. Bunun üzerine, her bir görüntü içinde 8x8 ve 16x16'lık piksellerden oluşan alt görüntüler oluşturularak ek hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Tüm bu hesaplamalar sonrası klinik, patolojik ve hesaplanan özniteliklerden oluşan toplam 80 farklı parametre, istatistiksel analize alınmıştır.

Yapılan analizlerde hem konvansiyonel prognostik faktörler, hem hesaplanmış öznitelikler, hem de belirteç skorları ile hasta sağkalım süreleri, nüks ve uzak metastaz gelişimi arasında istatistiksel anlamlı bir ilişkili bulunup bulunmadığı incelenmiştir. Bunun yanısıra hesaplanan öznitelikler ile konvansiyonel prognostik faktörler arasındaki olası bir ilişki ve bu ilişkinin istatistiksel anlamlılığı, değerlendirmeye alınan tüm parametrelerin risk faktörü olabilme özellikleri ve ayrıca her iki immün belirteç ile ayrı ayrı elde edilen skorlar arasındaki korelasyon durumu araştırılmıştır.

Elde edilen analiz sonuçları incelendiğinde, istatistiksel anlamlı sonuçların bir çoğunun, oluşturulan 8x8 ve 16x16'lık alt görüntülerden elde edildiği görülmüştür. Ayrıca invaziv kenarda yapılan değerlendirmelerde de önemli miktarda anlamlılık saptanmıştır.

Oran özniteliği hesaplamalarından elde edilen sonuçlar, tümör miktarındaki artışın ölüm, nüks ve metastaz gelişimi ile anlamlı ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca ölüm riskinin; 8x8'lik alt görüntülerde maksimum Tm/St oranı ile 1,02 kat; 16x16'lık alt görüntülerde ortalama Tm/St oranı ile 1,2 kat nüks riskinin ise , 16x16'lık alt görüntülerde varyans Tm/St oranı ile 1,002 kat arttığı görülmüştür.

Tümörün infiltratif karakterini yansıtan entropi ve karmaşıklık özniteliklerine ait analiz sonuçları incelendiğinde, özellikle invaziv kenardaki 8x8 ve 16x16'lık alt görüntülerde anlamlı sonuçlar elde edildiği dikkati çekmiştir. Bu özniteliklerin pT ve pN evreleri ile anlamlı ilişkili olduğu, bu evrelerdeki artışla birlikte entropi ve karmaşıklık öznitelik değerlerinin de yükseldiği saptanmıştır. Bunlara ek olarak invaziv kenarda hesaplanmış olan entropi ile ölüm riskinin 1,9 kat arttığı belirlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, literatürde yeralan ve tarafımızca ulaşabilen benzer özellikler taşıyan çalışmalar ile karşılaştırıldığında, ulaşılan sonuçlar açısından belirgin farklılıklar bulunduğu dikkatimizi çekmiştir. Literatürde yer alan bu çalışmaların çoğu ile tezat oluşturan bu sonuçlara neden olabilecek olası farklılıklar araştırıldığında, başta üzerinde çalışılan organlar (meme, prostat, özofagus, serviks, kolon, akciğer, deri), çalışmalara dahil edilen olgu sayıları (95 ile 2795 arasında değişmekte) ve tümör/stroma oranını değerlendirme yöntemleri olmak üzere belirgin çalışma dizaynı farkları bulunduğu görülmüştür.

Bu çalışmada üzerinde durulan diğer bir parametre de KKH'i olmuştur. Son yıllarda karsinogenezdeki rolü, prognostik etkinliği ve yeni tedavi stratejilerinin hedefi olması

nedeniyle KKH popülaritesi giderek artan konuların başında gelmektedir. KH'lerin hem uzun yaşam süresine sahip olmaları hem de kendi kendilerini yenileyebilme yeteneklerinden dolayı mutasyonların açık bir hedefi oldukları ve bu özellikleri nedeniyle de kanseri başlatan hücrelerin kök hücreler olduğu üzerinde durulmaktadır.

Bu hücrelerin tümörü başlatıcı etkileri yanısıra terapötiklere dirençli olmaları nedeniyle rekürrens ve metastazlardan sorumlu oldukları, bu nedenle bu hücrelerin varlığının prognostik bir gösterge olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Ancak KKH'nin saptanması ve izole edilmesinin oldukça zor olması, ileri teknik bilgi ve donanım gerektirmesi nedeniyle son yıllarda daha kolay uygulanabilir yöntemler geliştirmek ve prognostik etkinliğini gösterebilmek üzerine odaklanılmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda çok sayıda hücre yüzey belirteci tanımlanmıştır. Birçok araştırmacı da bu yüzey moleküllerinin kanser başlatıcı hücrelerin belirlenmesinde kullanılabileceğini savunmaktadır [155-158].

KRK'da en güçlü KH belirteci olduğu düşünülen CD133 (prominin-1), ilk kez 1997 yılında normal hematopoetik hücrelerde gösterilmiştir [159, 160]. 2007 yılında O'Brien ve Ricci-Vitiani tarafından arka arkaya yapılan iki çalışmada, KRK'da kanser başlatıcı özelliği olan, kendini yenileyebilen ve yüksek tümörigenik potansiyeli olan CD133+ hücrelerin izole edildiği yayınlanmıştır. Bu çalışmalardan birinde O'Brien ve arkadaşları tarafından, renal kapsül transplante edilen immünyetmezlikli NOD/SCID farelerde, kanser başlatıcı hücrelerin CD133+, tümörün büyük kısmını oluşturan hücrelerin ise CD133- olduğu ve tümör başlatıcı etkilerinin bulunmadığı gösterilmiştir [156]. Diğer çalışmada ise Ricci-Vitiani ve arkadaşları, kolon karsinomundaki tümörigenik hücrelerin %2,5'inin CD133+ olduğunu bildirmiştir [68].

Ancak Shmelkov ve arkadaşları CD133'ün sadece KH'lere sınırlı olamadığı normal kolonik epitelde de eksprese edildiğini saptamıştır. Bunun da ötesinde, hem CD133+ hem de CD133- metastatik tümör subpopülasyonunun seri ksenotransplantasyon modelinde NOD/SCID farelerde tümörigenez oluşturduğu gösterilmiştir [69]. Kawamoto ve arkadaşları da Shmelkov ile benzer sonuçlar bulmuş, CD133+ hücrelerin daha büyük çaplı tümör oluşumuna neden olduğunu saptamıştır. CD133- hücre enjeksiyonu ile üretilen tümörlerde CD133+ hücrelerin bulunmadığı belirlenmiştir[161]. Bu sonuç CD133+ hücrelerin kendini yenileyebilme özelliği bulunduğunu desteklemiştir. Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak asıl

belirleyicinin CD133 protein miktarı olduğu düşünülmüştür. Liao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hücreler CD133 miktarına göre grupladığında, CD133'ün fazla olduğu grupta daha hızlı büyüme hızı tespit edilmiş, ayrıca diğer grupların da yavaş büyüme sergilemekle birlikte tümörigenisitelerini korudukları izlenmiştir [162].

CD133'ün KKH'i dışındada eksprese olabilmesi; KKH diferansiasyonu sırasında farklı bir glikozilasyona bağlı AC133 tarafından tanınan epitoplara maskelenmesi ya da KKR'a ilerleme sürecinde CD133 CpG adalarında promotor hipermetilasyonu bağlı olası transkripsiyonel baskılanma ile açıklanmaya çalışılmıştır [163].

CD133'ün KKH belirteci olması yanısıra prognostik belirleyici özelliği üzerinde de araştırmalar yapılmıştır. Horst ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada, 57 KKR'lı (T2/T3, N0, M0) olguda CD133 immünohistokimyası kullanılarak KH varlığı ve prognostik önemi araştırılmıştır. CD133 ekspresyonu, tümörde %50'den fazla glandüler boyanma varsa CD133-yüksek, daha az ise CD133-düşük olarak skorlanmıştır. Sağkalım analizlerinde CD133-yüksek grupta 5 ve 10 yıllık sağkalımların anlamlı olarak daha kötü olduğu saptanmıştır. Ayrıca CD133-düşük grup ile karşılaştırıldığında yüksek grupta bağımsız rölaf riskin 2,45 kat fazla olduğu görülmüştür. Araştırmacılar ayrıca prognostik bir belirteç olduğu gösterilmiş olan "tümör tomurcuklanması" bölgelerinde CD133 ekspresyonunu değerlendirmiş ancak pozitiflik saptanmamıştır. Prognostik bir belirteç olması nedeniyle tümör tomurcuklanması alanlarında da KKH'i bulunabileceği ancak bunların farklı olarak CD133 eksprese etmiyor olabilecekleri yorumunda bulunulmuştur [140].

Choi ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada 523 KKR'lı olguda CD133, CD24 ve CD44'den oluşan 3 farklı kök hücre belirleyicisi kullanılarak klinikopatolojik parametreler ve sağkalım ile ilişkisi araştırılmıştır. CD133 ile %24,5, CD24 ile %50,5 ve CD44 ile %4 olguda pozitiflik saptanmıştır. Klinikopatolojik analizlerde CD133 ekspresyonunun ileri T evresindeki olgularda daha fazla olduğu ayrıca CD24 ekspresyonunun diferansiasyon derecesi, CD44 ekspresyonunun ise tümör boyutu ile korele olduğu belirlenmiştir. Genel sağkalımın ise her üç belirteç ile de istatistiksel anlamlı ilişkisi bulunmadığı gösterilmiştir [139].

Bir başka araştırmada Jao ve arkadaşları tarafından, 157 kolon adenokarsinomlu ve 76 neoadjuvan tedavi alan rektal adenokarsinomlu hastada CD133 ekspresyonu incelenmiştir. Ekspresyon apikal ve/veya endolüminal yüzey, sitoplazma ve lümen olmak üzere 3 farklı lokalizasyonda saptanmıştır. Sitoplazmik CD133 ekspresyon düzeyi ile tümörün lokal

rekürrensi ve kolorektal karsinomlu hastaların sağkalımı arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır [164].

Benzer bir çalışmada Coco ve arkadaşları tarafından 137 KRK'lı hastada CD133 immünohistokimyasal incelemesi gerçekleştirmiş ve yüksek ekspresyon bulunan hastalarda hem rekürrensin hem de hastalığa bağlı ölümün daha sık olduğu sonucuna ulaşılmıştır [76].

Diğer çalışmalardan farklı olarak, Kojima ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 189 KRK'lı hastada CD133 İHK'sal incelemesinde 29 (%15,3) hastada pozitiflik saptanmıştır. Pozitiflik oranı hem yüzeyde hem de invazyon alanında ayrı ayrı değerlendirilmiş ancak farklılık görülmemiştir. CD133+ hastalarda klinik seyrin daha kötü olduğu görülmüş ancak CD133 ekspresyonunun sağkalım ve rekürrens için bağımsız bir prognostik faktör olmadığı sonucuna varılmıştır [71].

Ren ve arkadaşları, çalışma sonuçları arasındaki bu farklılıkların olası nedenleri olarak araştırma dizaynı, kullanılan yöntemler, ticari kitlerin farklılığı ve araştırmacıların sonuçları değerlendirme yöntemleri arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceğini bildirmiştir. Ayrıca CD133⁻ olan KKH'lerinin varlığı nedeniyle, tek bir belirteç yerine kombine belirteç kullanılmasının gerekliliği vurgulamıştır [163].

Tarifimizca yapılan bu çalışmada da, üzerinde hala yoğun olarak çalışılmakta olan KKH belirteçlerinin kombine olarak kullanımı uygun bulunmuş ve literatür taramaları sonrasında CD133 ve Lgr5 belirteçlerinin kullanımına karar verilmiştir. Prognostik etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalara bakıldığında Lgr5 üzerinde daha sınırlı sayıda çalışma yapıldığı ve Lgr5 ekspresyonu ile kolon kanseri progresyonu arasında yakın ilişki bulunduğunu gösteren az sayıdaki çalışma da dikkati çekmiştir.

Bu çalışmalardan biri Uchida ve arkadaşlarının tarafından yapılmış olup ileri evre KRK'lı olgularda artmış Lgr5 düzeyleri ile lenf nodu metastazı arasında korelasyon saptanmıştır [165]. Benzer sonuçlara sahip bir başka çalışma ise, Yamanoi ve arkadaşları tarafından gastrik kanserli hastalarda üzerinde gerçekleştirilmiştir [166].

Hsu ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, 296 KRK'lı olguda artmış Lgr5 ekspresyonu ile ileri AJCC evresi, T evresi, N evresi, uzak metastaz arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır. Yüksek Lgr5 ekspresyon düzeylerinin kısa hastalıksız sağkalım ve kısa kanser-spesifik sağkalım ile anlamlı ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca uygulanan 5-FU tedavisine düşük Lgr5 düzeyine sahip grupta yüksek gruba göre daha iyi yanıt elde edilmiştir [167].

Chen ve arkadaşları tarafından 7 farklı çalışmanın yer aldığı 1833 hastayı içeren bir meta-analizde, yüksek Lgr5 düzeylerinin kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir [168].

Yakın zaman önce yapılan ve diğer çalışmalara göre farklı sonuçlar bildirilen bir başka çalışmada pT4 evresindeki 42 KRK'lı hastada, primer kanser dokusu, normal mukoza, metastatik lenf nodu ve uzak metastaz bulunan dokuda immünohistokimyasal yöntemlerle Lgr5, HER2, VEGF ve Ki-67 ekspresyonu incelenmiştir. Lgr5 aşırı-ekspresyonu hem pozitif lenf nodları hem de uzak metastaz bölgesinde primer tümör bölgesinde göre daha sık bulunmuştur. Ek olarak invaziv kenardaki ya da koagülasyon nekrozu çevresindeki rezidü kanser hücrelerinin tümörün merkezinde yer alan hücrelerden daha güçlü Lgr5 ekspresyonu gösterdiği saptanmıştır. Sonuç olarak Lgr5 ve HER2 ekspresyonunun prognozla anlamlı ilişkisi bulunmamıştır [169].

Tarafımızca yürütülen bu çalışmada; korele sonuçlar elde edilmeyen bu iki belirteç ile genel sağkalım, nüks ve metastaz gelişimi arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır. Hesaplanmış özniteliklerden entropi ve karmaşıklık ortalamalarının CD133 alt grupları arasında anlamlı farklılığa sahip olduğu ancak değerlerin skorla paralel olarak değişmediği görülmüştür. Lgr5 alt gruplarında oran ve entropi öznitelik ortalamaları arasında anlamlı fark bulunmuş ancak benzer bir şekilde değerlerin skorla paralel olarak değişmediği saptanmıştır.

Bu çalışmada; morfometrik analizlerin kalitatif sistemlerle karşılaştırıldığında, çok sayıda doku bileşeninin, tümörün genelini daha iyi yansıtabilecek şekilde daha geniş alanlarda, çok daha hassas ve doğru ölçülebilmesine olanak sağladığı görülmüştür.

Bu çalışmanın özgün bulgusu tümörlerde entropi, karmaşıklık özniteliklerinin tanımlanması ve kolon tümörü invaziv kenarındaki tümör/stroma ilişkili entropinin hesaplanabilir bir bağımsız prognostik öznitelik olarak tanımlanmasıdır. Önceki çalışmalarda kantitatif değerlendirmeye dayanmayan stroma artışının prognostik önemli olma verisi, bu çalışmada kullanılan kantitatif yöntemle anlamlı bulunmamıştır, aksine tümör oranının yüksek olması kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Kök hücre belirteçleri olarak kabul edilen LGR5 ve CD133 de prognostik ya da hesaplanabilir öznitelikler olarak bu seride anlamlı bulunmamışlardır.

REFERANSLAR

1. Ueno, H., et al., Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*, 2002. 40(2): p. 127-32.
2. Zlobec, I. and A. Lugli, Invasive front of colorectal cancer: dynamic interface of pro-/anti-tumor factors. *World J Gastroenterol*, 2009. 15(47): p. 5898-906.
3. Yusra, S. Semba, and H. Yokozaki, Biological significance of tumor budding at the invasive front of human colorectal carcinoma cells. *Int J Oncol*, 2012. 41(1): p. 201-10.
4. Metze K, A.L., Kayser G, Kayser K, Pathophysiology of Cancer and the Entropy Concept in: *Model-Based Reasoning in Science & Technology*. 2010: p. 199-206.
5. Metze K., M.M.R.B.D., Adam R.L., Leite N.J., Lorand-Metze I.G.H., Entropy of the chromatin texture in routinely stained cytology is a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Virchows Archiv*, 2007. 451.
6. Kayser, K., Kayser, G., Metze, K., The concept of structural entropy in tissuebased diagnosis. *Quantitative Cytology and Histology*, 2007. 29: p. 296-308.
7. Boyle, P. and J.S. Langman, ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ*, 2000. 321(7264): p. 805-8.
8. Thun, M.J., Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*, 2008. 58(2): p. 71–96.
9. T.C Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı Yayın No:502. 2003.
10. LAG, R., SEER cancer statistics review. 1975-2005.
11. Johns, L.E. and R.S. Houlston, A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol*, 2001. 96(10): p. 2992-3003.
12. Arnold, C.N., et al., Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer*, 2005. 104(10): p. 2035-47.
13. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, 1997. 386(6625): p. 623-7.
14. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990. 61(5): p. 759-67.
15. Pinto, D., et al., Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev*, 2003. 17(14): p. 1709-13.

16. Fanali, C., et al., Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: controversies and perspectives. *World J Gastroenterol*, 2014. 20(4): p. 923-42.
17. Savaş B, E.H., Perçinel S, Ensari A. , Kolorektal Karsinogenez. *Güncel Gastroenteroloji*, 2007. 11.
18. Markowitz, S.D. and M.M. Bertagnolli, Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2009. 361(25): p. 2449-60.
19. Boland, C.R., et al., The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer*, 2008. 7(1): p. 41-52.
20. Grady, W.M. and S.D. Markowitz, Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2002. 3: p. 101-28.
21. Goss, K.H. and J. Groden, Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol*, 2000. 18(9): p. 1967-79.
22. Fearon ER, B.G., Molecular biology of colorectal cancer. De- Vita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology. , 2008. Vol. 1: p. 1218-31.
23. Sjoblom, T., et al., The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, 2006. 314(5797): p. 268-74.
24. Wood, L.D., et al., The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*, 2007. 318(5853): p. 1108-13.
25. Peyssonnaud, C. and A. Eychene, The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell*, 2001. 93(1-2): p. 53-62.
26. Davies, H., et al., Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 2002. 417(6892): p. 949-54.
27. Richman, S.D., et al., KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol*, 2009. 27(35): p. 5931-7.
28. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 2004. 10(8): p. 789-99.
29. Worthley, D.L., et al., Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol*, 2007. 13(28): p. 3784-91.
30. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(2): p. 127-37.

31. Scaltriti, M. and J. Baselga, The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(18): p. 5268-72.
32. Samuels, Y., et al., High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, 2004. 304(5670): p. 554.
33. Parsons, D.W., et al., Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature*, 2005. 436(7052): p. 792.
34. Li, M., et al., Comparison of carcinoembryonic antigen prognostic value in serum and tumour tissue of patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis*, 2009. 11(3): p. 276-81.
35. Michelassi, F., et al., Local recurrence after curative resection of colorectal adenocarcinoma. *Surgery*, 1990. 108(4): p. 787-92; discussion 792-3.
36. Wolmark, N., et al., The prognostic significance of tumor location and bowel obstruction in Dukes B and C colorectal cancer. Findings from the NSABP clinical trials. *Ann Surg*, 1983. 198(6): p. 743-52.
37. Shirouzu, K., et al., Carcinomatous lymphatic permeation. Prognostic significance in patients with rectal carcinoma--a long term prospective study. *Cancer*, 1995. 75(1): p. 4-10.
38. Radespiel-Troger, M., W. Hohenberger, and B. Reingruber, Improved prediction of recurrence after curative resection of colon carcinoma using tree-based risk stratification. *Cancer*, 2004. 100(5): p. 958-67.
39. Kelley, W.E., Jr., et al., Penetrating, obstructing, and perforating carcinomas of the colon and rectum. *Arch Surg*, 1981. 116(4): p. 381-4.
40. Steinberg, S.M., et al., Prognostic indicators of colon tumors. The Gastrointestinal Tumor Study Group experience. *Cancer*, 1986. 57(9): p. 1866-70.
41. Cawthorn, S.J., et al., Extent of mesorectal spread and involvement of lateral resection margin as prognostic factors after surgery for rectal cancer. *Lancet*, 1990. 335(8697): p. 1055-9.
42. Devereux, D.F. and P.J. Deckers, Contributions of pathologic margins and Dukes' stage to local recurrence in colorectal carcinoma. *Am J Surg*, 1985. 149(3): p. 323-6.
43. Papadopoulos, V.N., et al., Prognostic significance of mucinous component in colorectal carcinoma. *Tech Coloproctol*, 2004. 8 Suppl 1: p. s123-5.

44. Compton, C.C., et al., Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med, 2000. 124(7): p. 979-94.
45. www.cap.org, T.C.o.A.P.C.
46. Andre, T., et al., Current issues in adjuvant treatment of stage II colon cancer. Ann Surg Oncol, 2006. 13(6): p. 887-98.
47. Park, S.J., K.Y. Lee, and S.Y. Kim, Clinical significance of lymph node micrometastasis in stage I and II colon cancer. Cancer Res Treat, 2008. 40(2): p. 75-80.
48. Chen, S.L. and A.J. Bilchik, More extensive nodal dissection improves survival for stages I to III of colon cancer: a population-based study. Ann Surg, 2006. 244(4): p. 602-10.
49. Jass, J.R., Pathological staging and prognostic indicators in rectal cancer. Hum Pathol, 1995. 26(1): p. 127.
50. Shepherd, N.A., et al., Prognostic factors in colonic cancer. Histopathology, 1989. 14(6): p. 613-20.
51. Hase, K., et al., Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. Dis Colon Rectum, 1993. 36(7): p. 627-35.
52. Tanaka, M., et al., Tumor budding at the invasive margin can predict patients at high risk of recurrence after curative surgery for stage II, T3 colon cancer. Dis Colon Rectum, 2003. 46(8): p. 1054-9.
53. Prall, F., H. Nizze, and M. Barten, Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. Histopathology, 2005. 47(1): p. 17-24.
54. Shepherd, N.A., K.J. Baxter, and S.B. Love, Influence of local peritoneal involvement on pelvic recurrence and prognosis in rectal cancer. J Clin Pathol, 1995. 48(9): p. 849-55.
55. Raporları, T.B.A., Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik uygulamalar. Vol. 20. 2009.
56. Lin, H. and T. Schagat, Neuroblasts: a model for the asymmetric division of stem cells. Trends Genet, 1997. 13(1): p. 33-9.
57. Weissman, I.L., Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell, 2000. 100(1): p. 157-68.

58. Morshead, C.M., et al., Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*, 1994. 13(5): p. 1071-82.
59. Zhang, R., et al., Stroke transiently increases subventricular zone cell division from asymmetric to symmetric and increases neuronal differentiation in the adult rat. *J Neurosci*, 2004. 24(25): p. 5810-5.
60. Fuchs, E., The tortoise and the hare: slow-cycling cells in the stem cell race. *Cell*, 2009. 137(5): p. 811-9.
61. Ito, M., et al., Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature*, 2007. 447(7142): p. 316-20.
62. Vicente-Duenas, C., et al., The role of cellular plasticity in cancer development. *Curr Med Chem*, 2009. 16(28): p. 3676-85.
63. Wicha, M.S., S. Liu, and G. Dontu, Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res*, 2006. 66(4): p. 1883-90; discussion 1895-6.
64. Gonzalez, C., Spindle orientation, asymmetric division and tumour suppression in *Drosophila* stem cells. *Nat Rev Genet*, 2007. 8(6): p. 462-72.
65. Cicalese, A., et al., The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell*, 2009. 138(6): p. 1083-95.
66. Vaiopoulos, A.G., et al., Colorectal cancer stem cells. *Stem Cells*, 2012. 30(3): p. 363-71.
67. Grosse-Gehling, P., et al., CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. *J Pathol*, 2013. 229(3): p. 355-78.
68. Ricci-Vitiani, L., et al., Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 2007. 445(7123): p. 111-5.
69. Shmelkov, S.V., et al., CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest*, 2008. 118(6): p. 2111-20.
70. Hsu, C.S., et al., Response to stress in early tumor colonization modulates switching of CD133-positive and CD133-negative subpopulations in a human metastatic colon cancer cell line, SW620. *PLoS One*, 2013. 8(4): p. e61133.
71. Kojima, M., et al., Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. *Cancer Sci*, 2008. 99(8): p. 1578-83.

72. Chao, C., et al., CD133⁺ colon cancer cells are more interactive with the tumor microenvironment than CD133⁻ cells. *Lab Invest*, 2012. 92(3): p. 420-36.
73. Zhang, S.S., et al., CD133(+)CXCR4(+) colon cancer cells exhibit metastatic potential and predict poor prognosis of patients. *BMC Med*, 2012. 10: p. 85.
74. Kemper, K., et al., Mutations in the Ras-Raf Axis underlie the prognostic value of CD133 in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2012. 18(11): p. 3132-41.
75. Mohammadi, M., et al., The stem cell marker CD133 is highly expressed in sessile serrated adenoma and its borderline variant compared with hyperplastic polyp. *J Clin Pathol*, 2013. 66(5): p. 403-8.
76. Coco, C., et al., Increased expression of CD133 and reduced dystroglycan expression are strong predictors of poor outcome in colon cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012. 31: p. 71.
77. Sgambato, A., et al., Divergent expression of CD133 in different studies: the need for a consensus panel? *Int J Cancer*, 2011. 128(9): p. 2247-9.
78. Wang, Y.K., et al., Activation of Akt and MAPK pathways enhances the tumorigenicity of CD133⁺ primary colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 2010. 31(8): p. 1376-80.
79. Van der Flier, L.G., et al., The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology*, 2007. 132(2): p. 628-32.
80. de Lau, W.B., B. Snel, and H.C. Clevers, The R-spondin protein family. *Genome Biol*, 2012. 13(3): p. 242.
81. van de Wetering, M., et al., The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, 2002. 111(2): p. 241-50.
82. Wu, X.S., H.Q. Xi, and L. Chen, Lgr5 is a potential marker of colorectal carcinoma stem cells that correlates with patient survival. *World J Surg Oncol*, 2012. 10: p. 244.
83. Haegbarth, A. and H. Clevers, Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin. *Am J Pathol*, 2009. 174(3): p. 715-21.
84. Sangiorgi, E. and M.R. Capecchi, Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet*, 2008. 40(7): p. 915-20.
85. Barker, N., et al., Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 2007. 449(7165): p. 1003-7.

86. Takahashi, H., et al., Significance of Lgr5(+ve) cancer stem cells in the colon and rectum. *Ann Surg Oncol*, 2011. 18(4): p. 1166-74.
87. Batlle, E., et al., Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*, 2002. 111(2): p. 251-63.
88. Yanagisawa, N., et al., Stromogenic prostatic carcinoma pattern (carcinomas with reactive stromal grade 3) in needle biopsies predicts biochemical recurrence-free survival in patients after radical prostatectomy. *Hum Pathol*, 2007. 38(11): p. 1611-20.
89. Mesker, W.E., et al., The carcinoma-stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for survival compared to lymph node status and tumor stage. *Cell Oncol*, 2007. 29(5): p. 387-98.
90. West, N.P., et al., The proportion of tumour cells is an independent predictor for survival in colorectal cancer patients. *Br J Cancer*, 2010. 102(10): p. 1519-23.
91. de Kruijf, E.M., et al., Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. 125(3): p. 687-96.
92. Courrech Staal, E.F., et al., The stromal part of adenocarcinomas of the oesophagus: does it conceal targets for therapy? *Eur J Cancer*, 2010. 46(4): p. 720-8.
93. Moorman, A.M., et al., The prognostic value of tumour-stroma ratio in triple-negative breast cancer. *Eur J Surg Oncol*, 2012. 38(4): p. 307-13.
94. Maeshima, A.M., et al., Modified scar grade: a prognostic indicator in small peripheral lung adenocarcinoma. *Cancer*, 2002. 95(12): p. 2546-54.
95. Paget, S., The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*, 1989. 8(2): p. 98-101.
96. Dingemans, K.P., et al., Transplantation of colon carcinoma into granulation tissue induces an invasive morphotype. *Int J Cancer*, 1993. 54(6): p. 1010-6.
97. Zhang, W. and P. Huang, Cancer-stromal interactions: role in cell survival, metabolism and drug sensitivity. *Cancer Biol Ther*, 2011. 11(2): p. 150-6.
98. Allinen, M., et al., Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*, 2004. 6(1): p. 17-32.
99. van den Hooff, A., Stromal involvement in malignant growth. *Adv Cancer Res*, 1988. 50: p. 159-96.

100. Ronnov-Jessen, L., O.W. Petersen, and M.J. Bissell, Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev*, 1996. 76(1): p. 69-125.
101. Mackie, E.J., et al., Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(13): p. 4621-5.
102. Sappino, A.P., W. Schurch, and G. Gabbiani, Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest*, 1990. 63(2): p. 144-61.
103. Sis, B., et al., Desmoplasia measured by computer assisted image analysis: an independent prognostic marker in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol*, 2005. 58(1): p. 32-8.
104. De Wever, O., et al., Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer*, 2008. 123(10): p. 2229-38.
105. Tsujino, T., et al., Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(7): p. 2082-90.
106. Moutasim, K.A., et al., Betel-derived alkaloid up-regulates keratinocyte α v β 6 integrin expression and promotes oral submucous fibrosis. *J Pathol*, 2011. 223(3): p. 366-77.
107. De Wever, O., et al., Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J*, 2004. 18(9): p. 1016-8.
108. Radisky, D.C., P.A. Kenny, and M.J. Bissell, Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J Cell Biochem*, 2007. 101(4): p. 830-9.
109. Xu, J., S. Lamouille, and R. Derynck, TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*, 2009. 19(2): p. 156-72.
110. Surowiak, P., et al., Occurrence of stromal myofibroblasts in the invasive ductal breast cancer tissue is an unfavourable prognostic factor. *Anticancer Res*, 2007. 27(4C): p. 2917-24.
111. Marsh, D., et al., Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *J Pathol*, 2011. 223(4): p. 470-81.
112. Ueno, H., et al., Histological categorisation of fibrotic cancer stroma in advanced rectal cancer. *Gut*, 2004. 53(4): p. 581-6.

113. Cui, G., et al., Progressive cellular response in the lamina propria of the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Histopathology*, 2009. 54(5): p. 550-60.
114. Marsh, D., et al., α v β 6 Integrin promotes the invasion of morphoeic basal cell carcinoma through stromal modulation. *Cancer Res*, 2008. 68(9): p. 3295-303.
115. Crispino, P., et al., Role of desmoplasia in recurrence of stage II colorectal cancer within five years after surgery and therapeutic implication. *Cancer Invest*, 2008. 26(4): p. 419-25.
116. Vermeulen, L., et al., Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*, 2010. 12(5): p. 468-76.
117. Kalluri, R. and M. Zeisberg, Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(5): p. 392-401.
118. Pietras, K. and A. Ostman, Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*, 2010. 316(8): p. 1324-31.
119. Hinz, B., et al., The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*, 2007. 170(6): p. 1807-16.
120. McAnulty, R.J., Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. 39(4): p. 666-71.
121. De Wever, O. and M. Mareel, Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*, 2003. 200(4): p. 429-47.
122. Giannoni, E., et al., Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res*, 2010. 70(17): p. 6945-56.
123. Rasanen, K. and A. Vaheri, Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res*, 2010. 316(17): p. 2713-22.
124. Gerber, P.A., et al., Chemokines in tumor-associated angiogenesis. *Biol Chem*, 2009. 390(12): p. 1213-23.
125. Toullec, A., et al., Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO Mol Med*, 2010. 2(6): p. 211-30.
126. Hynes, R.O., The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 2009. 326(5957): p. 1216-9.
127. Roy, R., J. Yang, and M.A. Moses, Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol*, 2009. 27(31): p. 5287-97.

128. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(4): p. 239-52.
129. Kalluri, R., EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*, 2009. 119(6): p. 1417-9.
130. Thiery, J.P., et al., Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009. 139(5): p. 871-90.
131. Hill, R., et al., Selective evolution of stromal mesenchyme with p53 loss in response to epithelial tumorigenesis. *Cell*, 2005. 123(6): p. 1001-11.
132. Patocs, A., et al., Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *N Engl J Med*, 2007. 357(25): p. 2543-51.
133. Pavlides, S., et al., The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*, 2009. 8(23): p. 3984-4001.
134. Kaupila, S., et al., Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. *J Pathol*, 1998. 186(3): p. 262-8.
135. Huijbers, I.J., et al., A role for fibrillar collagen deposition and the collagen internalization receptor endo180 in glioma invasion. *PLoS One*, 2010. 5(3): p. e9808.
136. Goksel Alpan, I.E., Bir Yönetim Modeli Önerisi: Toplam Entropi Yönetimi. *Business and Economics Research Journal*. 2(1): p. 53-87.
137. Haralick, R.M., Statistical And Structural Approaches To Texture. . *Proceedings Of The IEEE*. 1979. 67(5): p. 786-804.
138. Kamata, K., Complexity Curves Versus Histograms and Their Application to Image Segmentation. *Proceedings of 7th Scandinavian Conference on Image Analysis, Denmark*.
139. Choi, D., et al., Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*, 2009. 15(18): p. 2258-64.
140. Horst, D., et al., CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2008. 99(8): p. 1285-9.
141. Fan, X.S., et al., Expression of Lgr5 in human colorectal carcinogenesis and its potential correlation with beta-catenin. *Int J Colorectal Dis*, 2010. 25(5): p. 583-90.
142. Kleist, B., et al., Expression of the adult intestinal stem cell marker Lgr5 in the metastatic cascade of colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2011. 4(4): p. 327-35.

143. Ferlay, J., et al., Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 2013. 49(6): p. 1374-403.
144. Dukes, C., The classification of cancer of the rectum. *J. Pathol. Bacteriol.* 34: p. 323.
145. Huijbers, A., et al., The proportion of tumor-stroma as a strong prognosticator for stage II and III colon cancer patients: validation in the VICTOR trial. *Ann Oncol*, 2013. 24(1): p. 179-85.
146. Baak, J.P., et al., The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer*, 1985. 56(2): p. 374-82.
147. das Neves Pereira, J.C., et al., Nuclear and environment morphometric profile in tumor size and nodal metastasis of resected typical pulmonary carcinoid. *Pathol Res Pract*, 2004. 200(6): p. 459-67.
148. Breuninger, H., et al., Desmoplastic squamous cell carcinoma of skin and vermillion surface: a highly malignant subtype of skin cancer. *Cancer*, 1997. 79(5): p. 915-9.
149. Wang, K., et al., Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *J Thorac Oncol*, 2012. 7(9): p. 1457-61.
150. Liu, J., et al., Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in early cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2014. 132(1): p. 81-6.
151. Ngan, C.Y., et al., Quantitative evaluation of vimentin expression in tumour stroma of colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2007. 96(6): p. 986-92.
152. Chalkley, Methods for quantitative morphological analysis of tissue. *J Natl Cancer Inst* 1943. 4: p. 47-53.
153. Unlu, M., et al., The prognostic value of tumor-stroma proportion in laryngeal squamous cell carcinoma. *Turk Patoloji Derg*, 2013. 29(1): p. 27-35.
154. Tanaka, K., et al., Influence of cellularity in human breast carcinoma. *Breast*, 2004. 13(4): p. 334-40.
155. Ricci-Vitiani, L., et al., Colon cancer stem cells. *Gut*, 2008. 57(4): p. 538-48.
156. O'Brien, C.A., et al., A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 2007. 445(7123): p. 106-10.
157. Haraguchi, N., et al., CD133+CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells. *Ann Surg Oncol*, 2008. 15(10): p. 2927-33.

158. Chaudry, M.A., et al., EpCAM an immunotherapeutic target for gastrointestinal malignancy: current experience and future challenges. *Br J Cancer*, 2007. 96(7): p. 1013-9.
159. Miraglia, S., et al., A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, 1997. 90(12): p. 5013-21.
160. Yin, A.H., et al., AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 1997. 90(12): p. 5002-12.
161. Kawamoto, H., et al., Characteristics of CD133(+) human colon cancer SW620 cells. *Cell Transplant*, 2010. 19(6): p. 857-64.
162. Liao, Y., et al., Quantitative analyses of CD133 expression facilitate researches on tumor stem cells. *Biol Pharm Bull*, 2010. 33(5): p. 738-42.
163. Ren, F., W.Q. Sheng, and X. Du, CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. *World J Gastroenterol*, 2013. 19(17): p. 2603-11.
164. Jao, S.W., et al., Cytoplasmic CD133 expression is a reliable prognostic indicator of tumor regression after neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy in patients with rectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 2012. 19(11): p. 3432-40.
165. Uchida, H., et al., Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer. *Cancer Sci*, 2010. 101(7): p. 1731-7.
166. Yamanoi, K., et al., Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in gastric cancer. *Pathol Int*, 2013. 63(1): p. 13-9.
167. Hsu, H.C., et al., Overexpression of Lgr5 correlates with resistance to 5-FU-based chemotherapy in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*, 2013. 28(11): p. 1535-46.
168. Chen, Q., et al., Prognostic value of LGR5 in colorectal cancer: a meta-analysis. *PLoS One*, 2014. 9(9): p. e107013.
169. Gao, F.J., et al., Lgr5 over-expression is positively related to the tumor progression and HER2 expression in stage pTNM IV colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. 7(4): p. 1572-9.