

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
İSTANBUL İLİ ANADOLU KUZEY KAMU HASTANELERİ BİRLİĞİ
GENEL SEKRETERLİĞİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAYDARPAŞA NUMUNE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
PATOLOJİ KLİNİĞİ

KOLOREKTAL ADENOKARSİNOMLARDA
PD-L1 EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ,
HİSTOPATOLOJİK VE PROGNOSTİK PARAMETRELER İLE
KARŞILAŞTIRILMASI

DR. NİLÜFER GÜRSAN

(UZMANLIK TEZİ)

İDARİ VE EĞİTİM SORUMLUSU: DOÇ. DR. FÜGEN VARDAR AKER

TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. SELVİNAZ ÖZKARA

TEZ DANIŞMAN YARDIMCISI: UZM. DR. MAKBULE ÇIKRIKÇIOĞLU

İSTANBUL 2017

ÖZET

AMAÇ: Çeşitli malignitelere programlı hücre ölümü proteini ve ligandı-1 (PD-1/PD-L1) immün kontrol noktasını hedef alan immünoterapinin etkisi gösterilmiştir. Çalışmamızda, bu tedaviye yanıt için prediktif olduğu bildirilen PD-L1 ekspresyonunun kolorektal karsinomlarda (KRK) histopatolojik prognostik parametrelerle ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlandı.

YÖNTEM: Aralık 2015-Şubat 2017 tarihleri arasında Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji laboratuvarında değerlendirilmiş adenokarsinom tanılı kolorektal rezeksiyon yapılmış 144 hasta çalışmaya dahil edildi. Tümör hücreleri ve stromal immün sistem hücrelerinin immünohistokimyasal PD-L1 ekspresyonu ile tümörün demografik ve mikroskopik özellikleri karşılaştırıldı.

BULGULAR: PD-L1 tümör hücrelerinin %6,9'unda, stromal immün sistem hücrelerinin %65,3'ünde pozitif bulundu. Tümör ve immün hücre PD-L1 pozitifliği (PD-L1(+))T ve PD-L1(+))İ ile Crohn benzeri reaksiyon (CBR) ve tümörü infiltre eden lenfosit varlığı arasında korelasyon saptandı ($p<0,05$). PD-L1(+))T grup "mismatch repair"(MMR) kaybı ile ilişkili bulundu ($p<0,01$). PD-L1(+))İ grupta düşük tümör evresi ve lenf nodu metastazı yokluğunun negatif gruba göre yüksek olduğu görüldü ($p=0,012$, $p=0,003$). PD-L1(+))İ grupta lenfovasküler invazyon negatif gruptan düşük bulundu ($p<0,05$). Çok değişkenli analizde ise MMR kaybı ve CBR varlığının tümördeki PD-L1 ekspresyonu üzerine, pT evresinin immün hücre PD-L1 ekspresyonu üzerine etkili olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Hastaya ve tümöre bağlı diğer değişkenlerle PD-L1 ekspresyonu arasında ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

SONUÇ: PD-L1(+))T grup MMR kaybı ve CBR varlığı ile, PD-L1(+))İ grup ise düşük tümör evresi ile korelasyon göstermektedir. Bu nedenle; PD-L1(+))T olgularda bu yolağı hedefleyen immünoterapinin sporadik KRK'lardan ziyade MMR kaybı gösteren hasta grubu için uygun olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca PD-L1(+))İ grubun düşük tümör evresi ile korele olması; immünoterapi için bir prediktif değer ifade etmese de düşük evreyi işaret ettiğinden prognostik açıdan anlamlı olabilir.

Anahtar kelimeler: kolorektal kanser, PD-L1, immün kontrol noktası, mikrosatellit instabilite

ABSTRACT

AIM: Immunotherapy targeting programmed cell death 1 and its ligand 1 (PD-1/PD-L1) immune checkpoint has been demonstrated to be effective in the treatment of various malignancies. In the present study, we aimed to analyze the relationship between PD-L1 expression which is predictive for the response to this therapy and histopathologic parameters of colorectal carcinoma (CRC).

MATERIALS AND METHODS: A total number of 144 patients who were diagnosed as adenocarcinoma and undergone colorectal surgery between December 2015 and February 2017 in Haydarpaşa Numune Education and Research Hospital were included in the study. PD-L1 expression of tumor and stromal cells by immunohistochemistry were correlated with demographic and microscopic features.

RESULTS: PD-L1 stain was positive in 6.9% of tumor and 65.3% of the stromal cells. PD-L1 positivity of tumor and stromal cells were found to be associated with the presence of Crohn-like reaction (CLR) and tumor infiltrating lymphocytes ($p < 0.05$). PD-L1(+)T was positively correlated with the loss of “mismatch repair” (MMR) genes ($p < 0.01$). Low tumor stage and absence of lymph node metastasis were more common in PD-L1(+)I group compared to the PD-L1(-)I cases ($p = 0.012$, $p = 0.003$). Lymphovascular invasion was also less common in PD-L1(+)I group ($p < 0.05$). Logistic regression analysis revealed that loss of MMR and the presence of CLR were associated with the expression of PD-L1 in tumor cells, and pT was associated with the expression of PD-L1 in immune cells ($p < 0.05$). Other patient and tumor related factors were not related with the PD-L1 expression ($p > 0.05$).

CONCLUSION: The present study demonstrated that PD-L1(+)T was associated with MMR loss and the presence of CLR, whereas PD-L1(+)I with low tumor stage. Thus, immunotherapy targeting this checkpoint would be appropriate for the cases with MMR loss rather than the sporadic CRC. Besides, although PD-L1(+)I was not a predictive factor for immunotherapy, it could represent a prognostic factor which indicates low tumor stage.

Keywords: colorectal carcinoma, PD-L1, immune checkpoint, microsatellite instability

İÇİNDEKİLER TABLOSU

1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İNSİDANS VE EPİDEMİYOLOJİ.....	3
2.2. ETYOLOJİ.....	3
2.3. KOLOREKTAL KARSİNOGENEZ.....	4
2.4. HİSTOPATOLOJİK ÖZELLİKLER.....	7
2.5. PROGNOSTİK FAKTÖRLER.....	11
2.6. İMMÜN SİSTEM VE TÜMÖR.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
4. BULGULAR.....	30
5. TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇLAR.....	52
KAYNAKLAR.....	54

KISALTMALAR

KRK	: Kolorektal karsinom
DNA	: Deoksiribonükleik asit
CIN	: Kromozomal instabilite
MSI	: Mikrosatellit instabilite
İHK	: İmmünohistokimyasal
PD-1	: Programlı hücre ölümü proteini-1
PD-L1	: Programlı hücre ölümü ligandı-1
MMR	: “mismatch repair”
CIMP	: Sitozin guanin adacık metilatör fenotip
APC	: Adenomatöz polipozis koli
KRAS	: “kristen rat sarcoma viral onkogen homolog”
BRAF	: B-raf protoonkogen, serin/treonin kinaz
PIK3CA	: “phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide”
MLH1	: mutL homolog 1
MSH2	: mutS homolog 2
MSH6	: mutS homolog 6
PMS2	: “postmeiotic segregation increased” 2
MHC	: “major histocompatibility complex”
CTLA-4	: sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4
TCR	: T hücre reseptörü
MAPK	: “mitogen-activated protein kinase”

PI3K	: fosfotidil inozitol 3 kinaz
H&E	: Hematoksilen-eozin
DMA	: Doku makroarray
TIL	: Tümörü infiltre eden lenfositler
CBR	: Crohn benzeri reaksiyon
PD-L1(+)T	: Tümör hücre PD-L1 pozitifliği
PD-L1(+)İ	: İmmün hücre PD-L1 pozitifliği
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
MSS	: Mikrosatellit stabil
MSI-L	: Mikrosatellit instabilitesi düşük
MSI-H	: Mikrosatellit instabilitesi yüksek
WHO	: Dünya sağlık örgütü
AJCC	: “American Joint Comitte on Cancer”
UICC	: “International Uninon Against Cancer”
TNM	: Tümör, lenf nodu, metastaz
NK	: “natural killer”
IFNγ	: İnterferon gama
TNF	: Tümör nekrotizan faktör

TABLolar VE ŐEKİLLER

Tablo 1: WHO 2010 kolorektal karsinom sınıflaması.....	8
Tablo 2: Kolorektal adenokarsinomlarda histolojik derecelendirme.....	10
Tablo 3: Kolorektal kanserlerde tümör, lenf nodu, metastaz (TNM 7) evrelemesi....	10
Tablo 4: Kolorektal kanserlerde histopatolojik prognostik faktörler.....	11
Tablo 5: Değerlendirilen histopatolojik parametrelerin tanımlanması.....	21
Tablo 6: Tanımlayıcı özelliklerin dağılımı.....	31
Tablo 7: MSI düşündüren histopatolojik bulguların dağılımı.....	32
Tablo 8: Tümör ve stromal immün sistem hücrelerinin PD-L1 ekspresyon dağılımları.....	33
Tablo 9: Tümör PD-L1 ekspresyonu ile tanımlayıcı özelliklerin ilişkisi.....	34
Tablo 10: MSI düşündüren histopatolojik bulgular ile tümör PD-L1 ekspresyon ilişkisi.....	35
Tablo 11: Tanımlayıcı özelliklere göre stromal immün sistem hücrelerinin PD-L1 ekspresyonunun değerlendirilmesi.....	37
Tablo 12: MSI düşündüren histopatolojik bulgulara göre stromal immün hücre PD-L1 değerlendirmesi.....	40
Şekil 1. Tümör immün düzenlenmesi.....	13
Şekil 2. İmmün kontrol noktası blokajı.....	17
Şekil 3. Tümör hücrelerindeki immün kontrol noktası ligandlarının iki temel ekspresyon mekanizması.....	18
Şekil 4. Tümörü infiltre eden lenfositler (H&E, x200).....	22
Şekil 5. Tümörü infiltre eden lenfositler (H&E, x400).....	22
Şekil 6. Tümör tomurcuklanma paterni (H&E, x100).....	23
Şekil 7. Tümör tomurcuklanma paterni (H&E, x200).....	23
Şekil 8. Müsinöz komponent içeren adenokarsinom (H&E, x20).....	24
Şekil 9. Crohn benzeri reaksiyon (H&E, x20).....	24
Şekil 10. Doku makroarray bloklarının hazırlanması.....	25
Şekil 11. Tümör hücrelerinde immünohistokimyasal olarak PD-L1 boyanması.....	27

Şekil 12. İmmün hücrelerde immünhistokimyasal olarak PD-L1 boyanması.....	28
Şekil 13. Tümör PD-L1 ekspresyonuna göre MMR dağılımları.....	35
Şekil 14. MSI düşündüren histopatolojik bulgulardan en az birinin varlığı ile tümör PD-L1 ekspresyon ilişkisi.....	36
Şekil 15. Stromal hücre PD-L1 pozitifliğine göre patolojik tümör evresi dağılımı....	39
Şekil 16. Stromal immün hücre PD-L1 ekspresyonuna göre lenfovasküler invazyon dağılımı.....	39



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal karsinomlar (KRK) dünyada ve ülkemizde kanser vakalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Dünyada erkeklerde üçüncü, kadınlarda ikinci en sık malignitedir [1-3]. İnsidansı yaş ile birlikte artış gösterir. İnsidans ve mortalite oranları erkeklerde kadınlara göre daha fazladır [4].

Son yıllarda cerrahi tekniklerde ve tedavi protokollerinde önemli gelişmeler kaydedilmiş olmakla birlikte ileri evre KRK prognozu hala kötüdür [5]. Bu nedenle hedefe yönelik yeni tedavi rejimlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Tümör immün mikroçevresinin tümör progresyonundaki öneminin anlaşılmasıyla, immün yolakları hedef alan yeni tedavi ajanları araştırılmaya başlanmıştır [5, 6]. İmmün kontrol noktası blokajı yoluyla antitümör immünitinin aktivasyonu en umut verici yaklaşımlardan biridir [7]. Kanser tedavisinde üzerinde en çok çalışılan ve etkinliği gösterilmiş immün kontrol noktası inhibitör yolaklarından biri programlı hücre ölümü proteini-1 (PD-1)/programlı hücre ölümü ligandı-1 (PD-L1) yolağıdır [8, 9].

Malign melanom, küçük hücreli dışı akciğer karsinomu ve renal hücreli karsinom gibi malignitelerde PD-1/PD-L1 yolağını hedef alan immünoterapötik ajanların etkili olduğu gösterilmiştir [10, 11]. Tümör hücrelerinin PD-L1

ekspresyonunun ise bu tedavilere yanıt için prediktif bir belirteç olduğu ileri sür÷lmüştür [10]. Kolorektal kanserlerde bu yolağı hedef alan tedavilere büyük oranda yanıt alınmadığı [10, 11], yanıt gör÷len sınırlı hasta grubunda ise “mismatch repair” (MMR) kaybının tedavi yanıtı için prediktif olduğu bildirilmektedir [12].

Çalışmamızda kolorektal adenokarsinomlarda PD-L1 ekspresyonunun değerlendirilmesi, histopatolojik prognostik parametrelerle karşılaştırılması ve PD-1/PD-L1 immün kontrol noktası inhibitörleri ile tedaviye aday olabilecek hasta profilinin belirlenebilmesi amaçlandı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNSİDANS VE EPİDEMİYOLOJİ:

Kolorektal karsinomlar dünya çapında kanser vakalarının %9,7'sini oluşturmaktadır. Erkeklerde üçüncü, kadınlarda ise ikinci en sık görülen kanserdir [1-3]. Ülkemizde sıklık sıralamasında erkeklerde akciğer ve prostat kanserlerinden sonra, kadınlarda ise meme ve tiroid kanserlerinden sonra üçüncü sırada gelmektedir [2]. Dünyada kansere bağlı ölümlerin % 8,5'undan sorumludur [1].

Gelişmiş ülkelerde, gelişmekte olan ülkelere oranla sıklığı daha fazladır. Avustralya, Yeni Zelanda, Avrupa ve Amerika'da daha sık görülürken, Afrika ve Güneydoğu Asya'da görülme oranı daha azdır [1].

İnsidansı yaş ile birlikte artış gösterir. İnsidans ve mortalite oranı erkeklerde kadınlara göre %30-40 daha fazladır [4].

2.2. ETYOLOJİ:

2.2.1. Diyet ve Yaşam Tarzı:

Hayvansal yağlardan zengin, yüksek kalorili, batı tipi diyet ve sedanter yaşam tarzı kolorektal kanser riskini artırmaktadır. Obezite, kırmızı et tüketimi, sigara ve

alkol kullanımı değiştirilebilir risk faktörleridir. Meyve, sebze ve tahıl tüketimi, kalsiyum, D vitamini, uzun süreli nonsteroid antiinflatuar ilaç kullanımı, kadınlarda östrojen replasman tedavisi ve fiziksel aktivite ise koruyucu faktörlerdir [13].

2.2.2. Kronik İnflamasyon:

Kronik inflamatuvar barsak hastalıkları KRK riskini artırmaktadır. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı bulunan, özellikle erken yaşta tanı almış ve yaygın tutulum ile giden vakalarda 8-10 yıldan sonra KRK riski artmaktadır [13]. Kronik kolitli hastalarda KRK gelişme oranının %2-40 arasında değiştiiği bildirilmektedir [14]. Ülseratif kolitli olgularda KRK gelişme riski ilk 10 yılda %2, 20 yılda %8, 30 yılda %18 olarak saptanırken Crohn hastalığı olan vakalarda bu oranlar sırasıyla %2,9, %5,6 ve %8,3 olarak belirlenmiştir [15, 16].

2.2.3. Genetik Faktörler:

Kolorektal karsinomların yaklaşık %10-35 kadarı ailesel kümelenme göstermekte olup bunların sadece bir kısmı bilinen sendromlarla açıklanabilmektedir. Yüksek riskli germline mutasyon bulunan bu predispozan sendromlar tüm vakaların %6'dan azını oluşturmaktadır [13, 17].

Kolorektal kanser riski taşıyan genetik hastalıklar başlıca familyal adenomatöz polipozis gibi adenomatöz polipozis sendromları, Peutz-Jeghers ve juvenil polipozis gibi hamartomatöz polipozis sendromları, hiperplastik polipozis ve Lynch (Hereditör non-polipozis kolorektal kanser) sendromlarıdır [18].

2.3. KOLOREKTAL KARSİNOGENEZ:

Kolorektal kanserler, çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin aşamalı birikimi sonucu normal kolonik mukozanın invaziv kansere dönüşümü ile karakterize heterojen bir hastalık grubudur [19]. Tüm kolorektal kanserlerin yaklaşık %5 kadarı kalıtsal genetik mutasyonlara bağlı olarak meydana gelmektedir. Geri kalan %95'lik kısmın yaklaşık %20 kadarında pozitif aile öyküsü bulunmakla birlikte herhangi bir hereditör KRK sendromu altında sınıflandırılmamaktadır [19, 20].

Kolorektal karsinogenezde rol alan ana moleküler yollar; kromozomal instabilite (CIN) yolağı, mikrosatellit instabilite (MSI) yolağı ve sitozin guanin metilatör fenotip (CIMP) yolağıdır[21].

2.3.1. Kolorektal Karsinogenezde Ana Moleküler Yollar:

2.3.1.1. Kromozomal instabilite yolağı:

Kromozomal instabilite KRK'ların %70-80'inde görülmektedir [21]. Bu yoldan gelişen kanserler, anöloid karyotip, geniş kromozom segment delesyon ve duplikasyonları, artmış nükleer DNA (deoksiribonükleik asit) içeriğı gibi büyük kromozomal anomaliler ile karakterizedir. Bu tümörlerde hemen her zaman (%90'dan fazla) Adenomatöz Polipozis Koli (APC) gen mutasyonu, %50'sinde "kristen rat sarcoma viral onkogen homolog" (KRAS) mutasyonu, %70'inde TP53 mutasyonu ve %80'inde 18q allel kaybı görülmektedir. Bazı tümörlerde "B-raf protoonkogen, serin/treonin kinaz" (BRAF) mutasyonu görülebilir. "Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide" (PIK3CA) mutasyonları tümörlerin %25'inde görülen geç evre olaylardır [13, 22, 23].

Kromozomal instabilite klasik adenom-karsinom progresyonunda alta yatan major genetik anormalliktir ve dolayısıyla sol kolon yerleşimli neoplazmlardaki baskın instabilite formudur [21, 24].

2.3.1.2. Mikrosatellit instabilite yolağı:

Sporadik KRK'ların %15 kadarı ve Lynch sendromlu hastalarda görülen KRK'ların hemen tamamı MSI yolağından gelişir [13, 25].

Mikrosatellitler tekrarlayan kısa nükleotid dizileridir ve tekrarlayıcı tutumları nedeniyle replikasyon sırasında eşleşme hatalarına neden olurlar. MMR (mismatch repair) genleri DNA replikasyonu esnasında oluşan bu hatalı eşleşmiş (mismatch) baz çiftlerinin tanınması ve onarımında görevlidir [19]. Mikrosatellit instabilite, DNA MMR genlerindeki bozukluk sonucu meydana gelir. Bu süreçte anahtar rol oynayan mutL homolog 1 (MLH1), mutS homolog 2 (MSH2), mutS homolog 6 (MSH6) and "postmeiotic segregation increased" 2 (PMS2) olmak üzere 4 adet MMR gen tanımlanmıştır [26].

Mikrosatellit instabilite immünohistokimyasal (İHK) olarak MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 proteinleri ile değerlendirilir ve bu proteinlerden biri ya da daha fazlasının komplet kaybı MMR kaybı olarak tanımlanır. Bir başka yöntem ise polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı MSI tarama testidir. Bu yöntemde PCR ile mononükleotid ve dinükleotid tekrarları (BAT-25, BAT-26, D5S346, D2S123 ve D17S250) değerlendirilir. Eğer bu paneldeki 5 belirteçten hiçbirinde instabilite yoksa mikrosatellit stabil (MSS) olarak, belirteçlerden birinde instabilite varsa mikrosatellit instabilitesi düşük (MSI-L) olarak, iki ya da daha çok belirteçte instabilite saptanırsa mikrosatellit instabilitesi yüksek (MSI-H) olarak sınıflandırılır [26].

Sporadik tümörlerde MMR kaybı ya da MSI-H fenotip çoğunlukla MLH1 geni promotör bölgesinin metilasyonu ile oluşur ve MLH1 protein ekspresyonunun kaybı ile sonuçlanır. Sporadik MSI-H tümörlerde genellikle CpG (sitozin guanin) adacık metilatör fenotip gibi bir global hipermetilasyon görülür [13]. Bu durum “serrated” yolaktan gelişmiş KRK’ların karakteristik özelliğidir [27]. Lynch sendromunda ise MMR kaybı en sık MSH2 ve MLH1 olmak üzere 4 MMR geninden birinin “germline” mutasyonunun sonucudur [13].

Mikrosatellit instabilitesi yüksek KRK’lar çeşitli spesifik klinik ve patolojik özellikler gösterirler. Sporadik MSI-H KRK’ların %90 kadarı sağ kolon yerleşimli olup yaşlı kadın hastalarda daha sık görülmektedir. MSI-H tümörler multipl, polipoid ya da ekzofitik paternde gelişmiş, iyi sınırlı, makroskopik olarak seçilebilir nekroz içeren tümörler olmaya meyillidir. Müsinöz ya da taşlı yüzük hücreli komponent, medüller komponent, Crohn benzeri reaksiyon, intratümöral lenfosit infiltrasyonu, yüksek histolojik grade MSI-H tümörlerde görülmesi beklenen morfolojik özelliklerdendir [21, 28].

2.3.1.3. Sitozin guanin (CpG) adacık metilatör fenotip (CIMP):

Birçok genin promotör bölgesinde CpG adacıkları adı verilen sitozin ve guanin dinükleotidlerinden zengin alanlar bulunur. CpG adacıklarındaki sitozin rezidülerinin metilasyonu kromozomal yapıyı değiştirir ve gen ekspresyonunun inhibisyonuna yol açar. Böylece genlerde mutasyon olmaksızın epigenetik fonksiyon kaybı meydana gelir [13].

Kolorektal kanserlerde CpG adacık metilatör fenotip (CIMP) sporadik MSI-H tümörlerin çoğunda bulunmakla birlikte MSS tümörlerin yalnızca bir kısmında mevcuttur [29].

CpG adacık metilatör fenotip kolorektal kanserler kadınlarda daha sık görülmesi, kötü diferansiyasyon ve tümör ilişkili lenfoid reaksiyon gibi MSI-H tümörlere benzer klinikopatolojik özellikler taşımakla birlikte MSI-H tümörlere göre yaşlı hastalarda daha sık görülür ve daha kötü klinik gidişlidir [30, 31].

2.3.2. Kolorektal Kanserlerin Moleküler Sınıflaması:

Kolorektal karsinomların MSI ve CIMP durumu, KRAS ve BRAF somatik mutasyonlarının varlığına göre 5 ayrı grupta sınıflandırılması önerilmektedir [32, 33]:

Grup 1: MSI-H, CIMP pozitif, BRAF mutant, KRAS mutasyonu negatif

Grup 2: MSS/MSI-L, CIMP pozitif, BRAF mutant, KRAS mutasyonu negatif

Grup 3: MSS/MSI-L, CIMP negatif, BRAF mutasyonu negatif, KRAS mutant

Grup 4: MSS/MSI-L, CIMP negatif, BRAF ve KRAS mutasyonu negatif

Grup 5: MSI-H, CIMP negatif, BRAF ve KRAS mutasyonu negatif

Her bir moleküler grup için görülme oranları sırasıyla %7, %4, %26, %47 ve %4 olup %12 oranında bu gruplardan farklı genetik değişiklikler görülmüştür. Mortalite oranları grup 2’de en yüksek iken, grup 5’te en düşük bulunmuştur [32].

2.4. HİSTOPATOLOJİK ÖZELLİKLER:

2.4.1. Makroskopik Bulgular:

Kolorektal kanserler intraluminal baskın büyüme gösteren egzofitik/fungatif; intramural gelişim gösteren endofitik/ülseratif; luminal obstrüksiyon ya da çepeçevre duvar tutulumu ile giden annüler veya daha az sıklıkta diffüz infiltratif/“linitis plastica” patern gibi farklı makroskopik görünümlere sahip olabilirler [13, 21]. Splenik fleksura proksimalinde yerleşmiş tümörler egzofitik kitleler yapmaya

meylli iken inen kolon ve rektum tümörleri endofitik veya anüler patern gösterme eğilimindedir [13].

Hemen tüm tümörlerin kesit yüzü genellikle homojen görünümde gri-beyaz renkte olmakla birlikte müsinöz tümörlerde kesit yüzünde jelatinöz görünüm mevcuttur. Bazen makroskopik nekroz alanları izlenebilir [13, 21].

2.4.2. Mikroskopik Bulgular:

2.4.2.1. Histolojik alt tipler:

Kolorektal karsinomların histolojik alt tiplendirmesi Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2010 sınıflamasına göre yapılır (Tablo 1).

Tablo 1. WHO 2010 kolorektal karsinom sınıflaması

Adenokarsinom
Kribriform komedo tip adenokarsinom
Medüller karsinom
Mikropapiller karsinom
Müsinöz adenokarsinom
“Serrated” adenokarsinom
Taşlı yüzük hücreli adenokarsinom
Adenoskuamoz karsinom
İğsi hücreli karsinom
Skvamoz hücreli karsinom
İndiferansiye karsinom

Kolorektal karsinomların %90'dan fazlası adenokarsinomdur. Bunların büyük kısmı iyi ve orta diferansiye adenokarsinomlardır [13, 21]. Çoğu tümör, adenomlarda izlenen displastik epitele benzer yüksek kolumnar epitel hücrelerinden oluşur. İnvaziv tümör komponenti karakteristik sert kıvamdan sorumlu desmoplastik stromal yanıt içerir [34].

Tümörün %50'den fazlası tek hücreler, tabakalar ve asiner yapılar halinde malign epitel hücreleri içeren ekstraselüler mürin gölcüklerinden oluşuyorsa mürinöz adenokarsinom, tümörün %50'den fazlası nükleusları kenara itilmiş, belirgin intrastoplazmik mürin içeren taşlı yüzük morfolojisinde hücrelerden oluşuyorsa taşlı yüzük hücreli karsinom olarak tanımlanır. Her iki tümör için bu mürinöz ya da taşlı yüzük hücreli komponent %50'den az olduğunda mürinöz komponent içeren ya da taşlı yüzük hücreli komponent içeren karsinom şeklinde isimlendirilir [13, 35].

Medüller karsinomlar veziküler nükleuslu, nükleolleri belirgin, bol eozinofilik stoplazmalı malign hücrelerden oluşan, çok sayıda intraepitelyal lenfositin eşlik ettiği, neredeyse her zaman MSI-H olan iyi prognozlu nadir görülen tümörlerdir [13, 21].

“Serrated” adenokarsinomlar nadir görülen tümörlerden olup mürin gölcükleri içinde yüzen hücre kümeleri ve papiller çıkıntılar şeklinde eozinofilik stoplazmalı veziküler nükleuslu hücrelerden oluşur. Kribriform komedo tip adenokarsinom memenin komedo ve kribriform insitu duktal karsinomuna benzer şekilde santral nekroz içeren geniş kribriform glandlardan zengin, nadir görülen bir tümör tipidir. Mikropapiller adenokarsinomlar ise vasküler kanalları taklit eden stromal boşluklar içerisinde küçük tümör hücre kümeleri ile karakterizedir [13, 35].

Kolorektal karsinomlar ayrıca birbiri ile karışık halde veya ayrı ayrı adenokarsinom ve skuamoz hücreli karsinom komponentleri içeren adenoskuamoz karsinomlar; immünhistokimyasal olarak keratinlerle en az fokal ekspresyon gösteren tümör hücreleri ile iğsi hücreli sarkomatoid komponentin birlikte izlendiği iğsi hücreli karsinomlar ya da epitelyal tümör olmanın ötesinde morfolojik, immünhistokimyasal ya da moleküler biyolojik diferansiyasyon göstermeyen indiferansiye karsinomlar şeklinde de izlenebilirler [13, 21, 35].

2.4.2.2. Histolojik derecelendirme:

Kolorektal adenokarsinomlarda histolojik derecelendirme tümör hücrelerinin oluşturduğu gland yapılarının miktarına göre WHO 2010 histolojik derecelendirme sistemi kullanılarak yapılır (Tablo 2). Tümörde heterojenite mevcut olduğđu durumlarda histolojik derece en az diferansiye olduğđu alana göre verilir [13].

Tablo 2. Kolorektal adenokarsinomlarda histolojik derecelendirme

Kriter	Diferansiyasyon	Derece	Tanımlayıcı derece
>%95 glandüler yapılanma	İyi	1	Düşük
%50-95 glandüler yapılanma	Orta	2	Düşük
%0-49 glandüler yapılanma	Az	3	Yüksek
Yüksek dereceli mikrosatellit insabilite (MSI-H)	Değişken	Değişken	Düşük

2.4.3. Patolojik Evreleme:

Günümüzde kolorektal kanser evrelemesinde “American Joint Comitte on Cancer (AJCC)” ve “International Union Against Cancer (UICC)” nin tümör, lenf nodu, metastaz (TNM) sınıflaması kullanılmaktadır (Tablo 3).

Tablo 3. Kolorektal kanserlerde tümör, lenf nodu, metastaz (TNM 7) evrelemesi

Primer tümör (pT)	
pTx	Primer tümör değerlendirilemiyor
pT0	Primer tümör yok
pTis	Karsinoma in situ-intraepitelyal (lamina propria invazyonu yok)
	Karsinoma in situ-lamina propria/müskülaris mukoza invazyonu
pT1	Tümör submukozaya invaze
pT2	Tümör müskülaris propriaya invaze
pT3	Tümör müskülaris propriayı aşmış, perikolorektal dokulara invaze
pT4a	Tümör visseral peritonu perforé etmiş
pT4b	Tümör çevre organ ve yapılara direk invaze
Bölgesel lenf nodları (pN)	
Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1a	1 adet bölgesel lenf nodunda metastaz
N1b	2-3 adet bölgesel lenf nodunda metastaz

N1c	Bölgesel lenf nodu metastazı olmaksızın subserozada, nonperitonealize perikolik veya perirektal dokularda tümör depozitleri
N2a	4-6 adet bölgesel lenf nodunda metastaz
N2b	7 veya daha fazla bölgesel lenf nodunda metastaz
Uzak metastaz (M)	
M0	Uzak metastaz yok
M1a	Tek bir organ veya bölge metastazı (Örn. karaciğer, akciğer, over, bölgesel olmayan lenf nodu)
M1b	Birden fazla organ / bölge veya periton metastazı

2.5. PROGNOSTİK FAKTÖRLER:

Kolorektal kanser rezeksiyon spesmenlerinin patolojik incelemesi, hastalığın anatomik yaygınlığının tespit edilmesi, patolojik bulgular doğrultusunda adjuvan tedavi kararının belirlenmesi ve önemli prognostik faktörlerin değerlendirilmesi açısından kritik öneme sahiptir. KRK için önemli histopatolojik prognostik faktörler Tablo 4'te özetlenmiştir [36].

Tablo 4. Kolorektal kanserlerde histopatolojik prognostik faktörler

Patolojik evre (TNM)
Tümör tipi ve özel alt tipler
Cerrahi sınırların durumu
Evreden bağımsız morfolojik faktörler <ul style="list-style-type: none"> Lenfovasküler ve büyük damar invazyonu Perinöral invazyon Tümör sınırlarının konfigürasyonu ve tümör tomurcuklanması Tümöre karşı lenfoid yanıt
Mikrosatellit instabilite düşündürülen morfolojik işaretler

Hastalığın anatomik yaygınlığı yani patolojik tümör evresi KRK için en önemli prognostik faktördür. Özellikle mürskularis propriayı aşan tümör yayılımı prognozu önemli ölçüde etkilemektedir. Ayrıca visseral periton tutulumu peritoneal karsinomatozis açısından risk taşıdığından önemli bir kötü prognostik faktördür [21].

Mikrosatellit instabilitesi yüksek olmayan müsinöz adenokarsinomlar ile taşlı yüzük hücreli karsinomlar daha kötü prognozla ilişkili bulunmuştur [37].

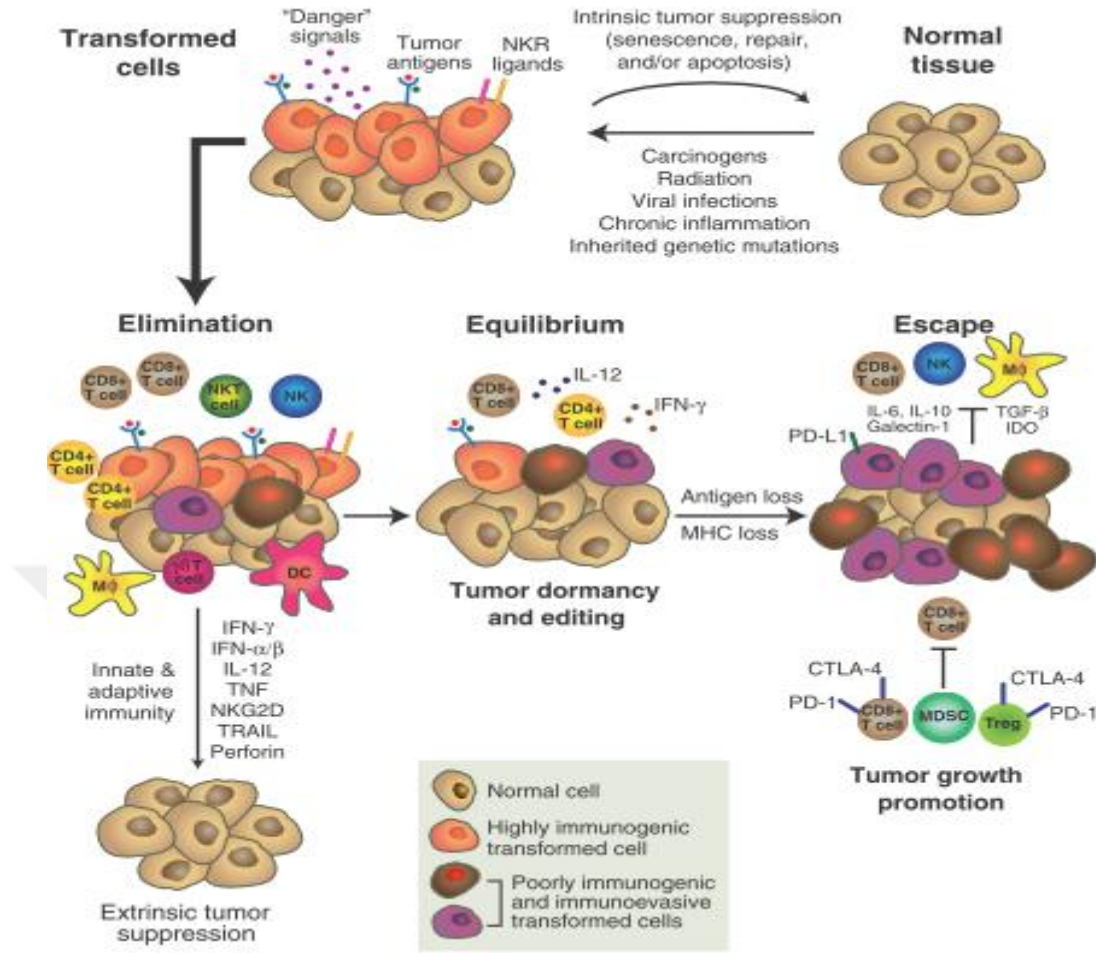
Kısa longitudinal cerrahi sınırın (2-5 cm) kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmektedir [13]. Ayrıca sirkumferensiyel radial cerrahi sınır rektal tümörlerde lokal rekürrens ve prognoz ile ilişkili bulunmuştur [38].

Ekstramural venöz invazyon, anjiolenfatik invazyon, perinöral invazyon, tümör sınırında infiltratif patern, tümör tomurcuklanması kötü prognozla ilişkili morfolojik faktörler iken tümöre karşı lenfoid yanıt varlığı ve mikrosatellit instabilite iyi prognostik faktörlerdir [13, 21, 36].

2.6. İMMÜN SİSTEM VE TÜMÖR:

Kanseri önlemede konak immün sisteminin günümüzde bilinen 3 önemli rolü bulunmaktadır. Bunlardan ilki, konağı viral enfeksiyonlardan ve virüs kaynaklı tümör oluşumundan korumak; ikincisi, tümör oluşumunu tetikleyebilen inflamatuvar yanıtı neden olabilecek patojenleri ortadan kaldırmak ve inflamatuvar yanıtın rezolüsyonunu sağlamak; üçüncüsü, tümör hücre yüzey moleküllerini ve tümör antijenlerini tanıyarak tümörü ortadan kaldırmaktır. Bu üçüncü süreç “tümör immün gözetimi” (immün sürveyans) olarak tanımlanmaktadır [39, 40].

Tümör immün gözetime rağmen, fonksiyonel bir immün sistem varlığında bile tümör gelişebilmektedir. Bu nedenle immün sistemin tümör gelişimindeki rolünü daha iyi açıklayabilecek “tümör immün düzenlenmesi” (“tumor immunoediting”) kavramı gündeme gelmiştir. Tümör immün düzenlenme kavramı 3 aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar tümör immün düzenlenmesinin 3E’si olarak bilinen bertaraf etme (“elimination”), denge (“equilibrium”) ve kaçış (“escape”) aşamalarıdır (Şekil 1) [39-41].



Şekil 1. Tümör immün düzenlenmesi [39]

2.6.1. Tümör İmmün Düzenlenmesi (“immunoediting”) Aşamaları:

2.6.1.1. Eliminasyon (bertaraf etme):

Eliminasyon (bertaraf etme) aşaması tümör immün gözetime karşılık gelmektedir. Bu aşamada doğal ve kazanılmış immün sistem birlikte çalışarak tümör hücrelerini yok etmeye çalışır. Süreç başarılı bir şekilde tamamlanırsa tümör ortadan kaldırılır ve diğer aşamalara geçiş gerçekleşmez [42]. Eliminasyon süreci dört basamakta gerçekleşir.

İlk basamakta solid tümör belirli bir büyüklüğe ulaştığında invaziv büyüme göstermeye, artmış kan akımına ihtiyaç duymaya ve bu ihtiyacı karşılamak için bazı anjiyogenik ve stromajenik proteinler üretmeye başlar [42, 43]. İnvaziv büyüme çevre

dokuda küçük hasarlar oluşturur, inflamatuvar yanıtı uyararak doğal immün sistem elemanları olan “Natural Killer” (NK) hücreleri, NK-T hücreleri, $\gamma\delta$ T hücreleri, makrofaj ve dendritik hücrelerin göç ederek tümör alanında toplanmalarına neden olur. Göç eden bu inflamatuvar hücrelerden interferon gama ($IFN\gamma$) salınımı başlar [42, 44].

İkinci basamakta $IFN\gamma$ antiproliferatif ve apoptotik mekanizmalar ile sınırlı miktarda tümör hücrelerinin ölümüne sebep olur. Ayrıca tümör hücrelerinden ve çevre dokudan CXCL10, CXCL9 ve CXCL11 gibi kemokinlerin üretimini uyarır. Bu kemokinlerin bazıları güçlü anjiostatik etkiye sahiptir ve yeni damar oluşumunu engelleyerek daha fazla tümör hücrelerinin ölümüne neden olur. $IFN\gamma$ 'nın direk ve indirek etkisiyle oluşan hücrel debris dendritik hücreler tarafından toplanarak lenf nodlarına taşınır. Kemokinlerin etkisiyle ortama daha fazla NK hücresi ve makrofaj toplanır.

Üçüncü basamakta tümörü infiltre eden NK hücreleri ve makrofajların etkisiyle daha fazla $IFN\gamma$ ve interlökin-12 (IL-12) salınımı olur ve tümör nekrotizan faktör (TNF) ilişkili apoptoz indükleyici ligand, perforin, reaktif oksijen ve nitrojen metabolitleri ile daha fazla tümör hücresi ölür. Lenf nodlarına ulaşan dendritik hücreler tümör-spesifik yardımcı CD4+ T hücrelerini (TH1) uyararak tümör-spesifik CD8+ T hücrelerinin oluşumuna yardımcı olan $IFN\gamma$ ekspresyonu yaparlar.

Dördüncü basamakta tümör bölgesine gelen tümör-spesifik CD4+ ve CD8+ T lenfositler, $IFN\gamma$ yardımı ile immünojenitesi artırılmış tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasına yardımcı olurlar.

Eliminasyon fazı tümörün ortadan kaldırılmasıyla tamamlanabilir ya da tümörün bir kısmı ortadan kaldırılabildiği inkomplet eliminasyon ile sonuçlanabilir [39-42, 44]. Eliminasyon inkomplet olduğunda immün sistem ve tümör gelişimi arasında bir denge aşaması ortaya çıkar [40].

2.6.1.2. Denge (“equilibrium”):

Denge aşamasında konak immün sistemi ile eliminasyon aşamasından kurtulabilen tümör hücreleri arasında dinamik bir denge oluşur. Bu aşamada $IFN\gamma$ ve

lenfositler hızlı mutasyon gösteren ve genetik olarak stabil olmayan tümör hücreleri üzerinde güçlü bir seçilme baskısı uygularlar. Bu Darwin tipi seçilme sürecinde orjinal tümör hücreleri hasara uğratılırken, bir yandan da immün sisteme karşı dirençli, farklı mutasyonlar taşıyan yeni tümör hücre varyantları ortaya çıkar. Denge, tümör immün düzenlenmesinin en uzun süren aşamasıdır [42].

2.6.1.3. Kaçış (“escape”):

Kaçış aşamasında genetik ve epigenetik değişiklikler sonucunda immunojenik tespite veya eliminasyona duyarsız hale gelen tümör hücre varyantları kontrolsüz biçimde çoğalmaya başlar. Bu durum klinik olarak tespit edilebilir malign hastalığa, kontrol edilmediği takdirde konağın ölümüne yol açar [42].

Tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışında çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür [45]:

a- Antijen negatif türlerin seçici olarak çoğalması: Tümör progresyonu sırasında güçlü immünojenitesi olan subklonlar eliminasyon aşamasında ortadan kaldırılırlar.

b- Majör doku uygunluğu bileşeni (major histocompatibility complex, MHC) moleküllerinin ekspresyonunda azalma veya kayıp: Tümör hücreleri doku uygunluk antijenlerini (“human leukocyte antigen”, HLA) normal seviyelerde eksprese edemediklerinde sitotoksik T hücrelerinden kurtulabilirler.

c- İmmünsüpresif faktörlerin sekresyonu: Tümör hücreleri konak immün yanıtını inhibe edebilecek birtakım ürünler sekrete edebilirler. Örneğin “transforming growth factor beta” (TGF- β) birçok tümör tarafından sekrete edilebilen güçlü bir immünsüpresandır. Ayrıca interlökin 10 (IL-10), prostaglandin E2 (PGE2), çeşitli triptofan metabolitleri ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi tümör hücreleri tarafından sekrete edilen birçok faktör immün yanıtı baskılayabilir.

d- Regülatuar T hücrelerinin (Treg) indüksiyonu: Tümör hücreleri immünsüpresif Treg hücrelerinin gelişimini destekleyecek faktörler üretebilirler.

e- İmmünregülatuar yolların aktivasyonu: Tümör hücrelerinin immün sistemin düzenleyicileri olarak görev yapan “kontrol noktaları”na bağlanarak tümör immünitesini baskılamaları yeni geliştirilen önemli bir konudur.

2.6.2. İmmün Kontrol Noktaları ve Kanser İmmünoterapisi:

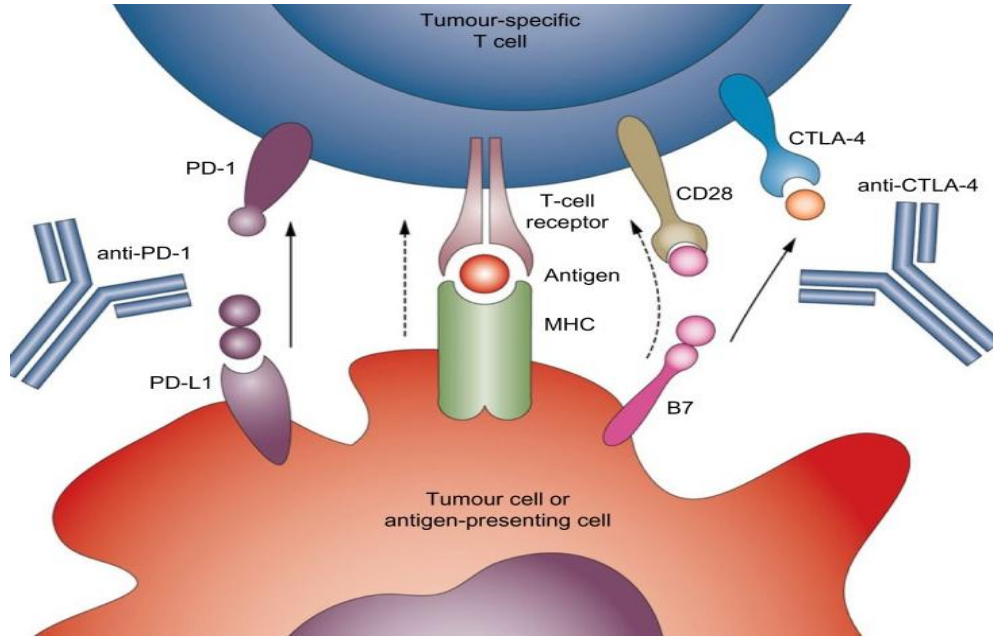
Tüm kanserlerde çok sayıda genetik ve epigenetik değişiklik tümör hücrelerinde çeşitli antijenlerin ortaya çıkmasına yol açar, böylece tümör hücrelerinin immün sistem tarafından tanınmasını ve normal hücrelerden ayırt edilmesini sağlar. T hücre reseptörlerinin (TCR) antijeni tanınması ile başlayan T hücre yanıtı, immün kontrol noktaları adı verilen, kostimülatör ve inhibitör sinyaller arasındaki denge ile düzenlenir. Normal fizyolojik koşullarda immün kontrol noktaları self-toleransın devamlılığı ve patojenik bir enfeksiyona yanıt esnasında dokunun hasardan korunmasında kritik öneme sahiptir. Tümör hücreleri ise bu immün kontrol noktası proteinlerinin ekspresyonunu bozarak immün direnç geliştirebilmektedir [8].

Günümüzde bu immün kontrol noktaları hedef alınarak geliştirilen immünoterapi kansere karşı umut verici tedavi yöntemleri arasına girmiştir. Kanser tedavisinde üzerinde en çok çalışılan ve etkinliği gösterilmiş iki immün kontrol noktası inhibitör yolağı sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4 (CTLA-4) ve PD-1/PD-L1 (B7-H1, CD274) yollarıdır (Şekil 2) [8, 9, 46].

Antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde, T hücrelerinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak kostimülatör ya da inhibitör etkiyle T hücre yanıtının artırılması ya da azaltılmasına neden olan çeşitli membran protein ligandları bulunur. T hücre aktivasyonu için antijen sunucu hücre yüzeyindeki MHC molekülüne bağlı antijenik peptidin TCR tarafından tanınması ve T hücresinde bulunan CD28 ile antijen sunucu hücredeki B7 proteinleri ile birleşmesi (kostimülasyon) gerekir. B7 proteinleri T hücre yüzeyinde bulunan ve CD28 homoloğu olan CTLA-4 ile birleştiğinde ise T hücre aktivasyonunu ve sitokin üretimini inhibe eder [47, 48]. CTLA-4’ün immünitenin negatif regülatörü olmasının anlaşılmasıyla CTLA-4 antikör blokajı ile antitümör immünitenin sağlanabileceği gündeme gelmiştir [49].

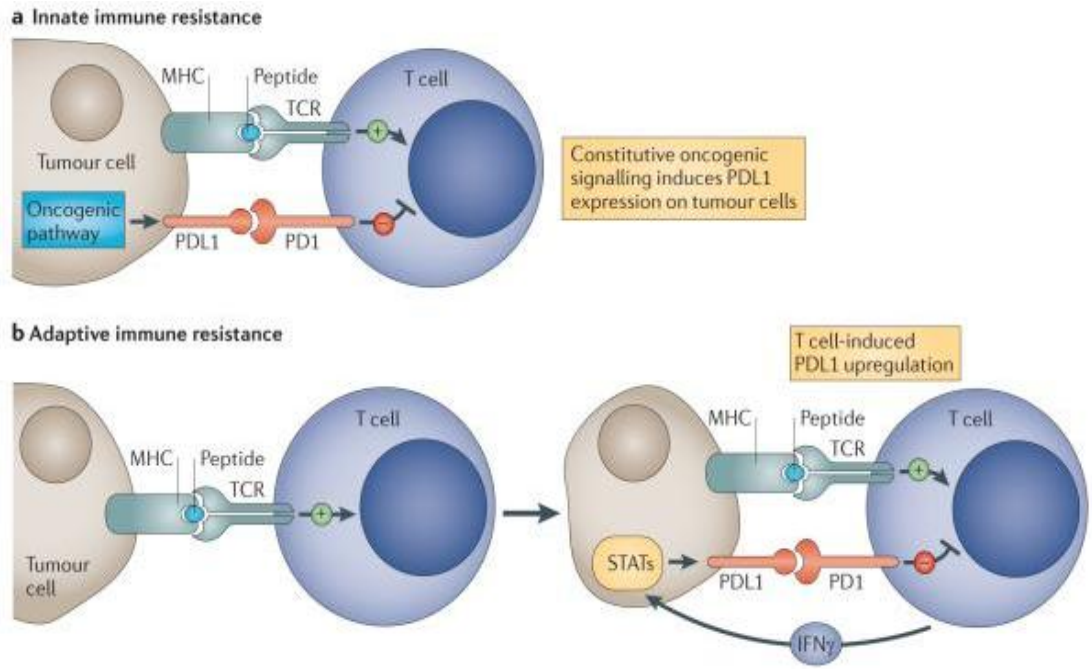
İmmün kontrol noktalarından bir diğesinde görev alan PD-1 immünglobulin süperailesinin bir üyesi olup tip 1 transmembran glikoprotein yapısındadır [50]. PD-1 T lenfositler, B lenfositler ve bazı myeloid hücrelerde eksprese edilmektedir [51]. PD-L1 ve PD-L2 olmak üzere iki adet ligandı vardır ve bunlar B7 ailesinin birer üyesi olan transmembran proteinlerdir. PD-L1 T ve B lenfositler, monositler, dendritik hücreler ve NK hücreler gibi hematopoietik hücrelerde eksprese edilebildiği gibi epitelyal ve endotelyal hücrelerde de eksprese edilmektedir. PD-L2'nin makrofajlar, dendritik hücreler ve mast hücrelerinde olmak üzere daha sınırlı bir ekspresyonu vardır [47]. PD-1, ligandları olan PD-L1 veya PD-L2 ile bağlandığında T hücre proliferasyonunu ve fonksiyonunu inhibe eder, apoptozu indükler ve CD4+ T lenfositlerin Treg hücrelerine diferansiyasyonuna neden olur [48].

Çeşitli kanser türlerinde tümörü infiltrate eden lenfositlerde yüksek oranda PD-1 ekspresyonu, tümör hücrelerinde ise artmış PD-1 ligand ekspresyonu tespit edilmiştir. Solid tümörlerdeki baskın PD-1 ligand formu PD-L1'dir. PD-L1 aynı zamanda tümör mikroçevresindeki myeloid hücrelerde de eksprese edilmektedir [8].



Şekil 2. İmmün kontrol noktası blokajı [46]

Programlı hücre ölüm ligandı 1'in tümör hücrelerindeki ekspresyonu iki mekanizma ile açıklanmaktadır (Şekil 3). Bunlardan ilki tümör hücrelerindeki asıl onkojenik sinyallerin etkisiyle PD-L1 ekspresyonunun sağlanmasıdır (doğal immün direnç). Bu mekanizmada rol alan genetik yollar başlıca "mitogen-activated protein kinase" (MAPK) yolağı ve fosfotidil inozitol 3 kinaz (PI3K/Akt) yolağıdır. Diğer mekanizma ise PD-L1'in normal dokuların enfektif durumlarda ortaya çıkan immün hasara karşı korunmasındaki ekspresyon artışına benzer şekilde tümör hücrelerinin kendilerini antitümör immüniteden koruması olup kazanılmış immün direnç olarak adlandırılmaktadır. Kazanılmış immün direnç mekanizmasında PD-L1 ekspresyonu IFN γ etkisiyle olmaktadır [8, 48].



Şekil 3. Tümör hücrelerindeki immün kontrol noktası ligandlarının iki temel ekspresyon mekanizması [8]

Çeşitli malignitelerde, tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun PD-1 ya da PD-L1'i hedef alan immünoteraplere yanıt için prediktif bir belirteç olduğu tespit

edilmiştir. Ancak farklı tümör tiplerinde PD-1 ve PD-L1 ekspresyonunun prognostik önemi halen tartışmalıdır [52].

Malign melanom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve renal hücreli karsinom gibi bazı tümörlerde PD-1 inhibitör tedavinin umut verici klinik sonuçları olsa da KKK'lardaki etkisi büyük oranda bilinmemektedir [53].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. OLGULARIN SEÇİMİ:

Çalışmamız için 1 Aralık 2015 ile 28 Şubat 2017 tarihleri arasında Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi (HNEAH)'nde kolorektal rezeksiyon yapılmış ve rezeksiyon spesmenleri HNEAH Patoloji laboratuvarında değerlendirilmiş olgular hastane kayıt sisteminde taranarak dökümante edildi.

Çalışmaya HNEAH patoloji arşivinden parafin blok ve lam preparatlarına ulaşılabilen, 18 yaş üstü, neoadjuvan tedavi almamış, rezeksiyon spesmeninde kolorektal adenokarsinom tanısı almış olgular dahil edildi. Özel tip adenokarsinom (müsinöz adenokarsinom, taşlı yüzük hücreli karsinom, medüller karsinom vb.), adenokarsinom dışı epitelyal ve mezenkimal tümör, nöroendokrin neoplazi tanısı almış vakalar ile nüks tümörler çalışmaya dahil edilmedi.

3.2. VERİLERİN TOPLANMASI:

144 olguya ait yaş ve cinsiyet verileri hastane kayıt sisteminden elde edildi. Tümör lokalizasyonu, histolojik diferansiasyon derecesi, patolojik tümör ve lenf nodu evresi, lenfovasküler ve perinöral invazyon varlığı/yokluğu, MSI durumu için uygulanan İHK değerlendirmeler, neoadjuvan tedavi durumu ve primer/nüks tümör bilgisi rezeksiyon spesmenlerine ait patoloji raporlarında kayıtlı klinik bilgi notu, makroskopik ve mikroskopik bulgulardan elde edildi.

3.3. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME:

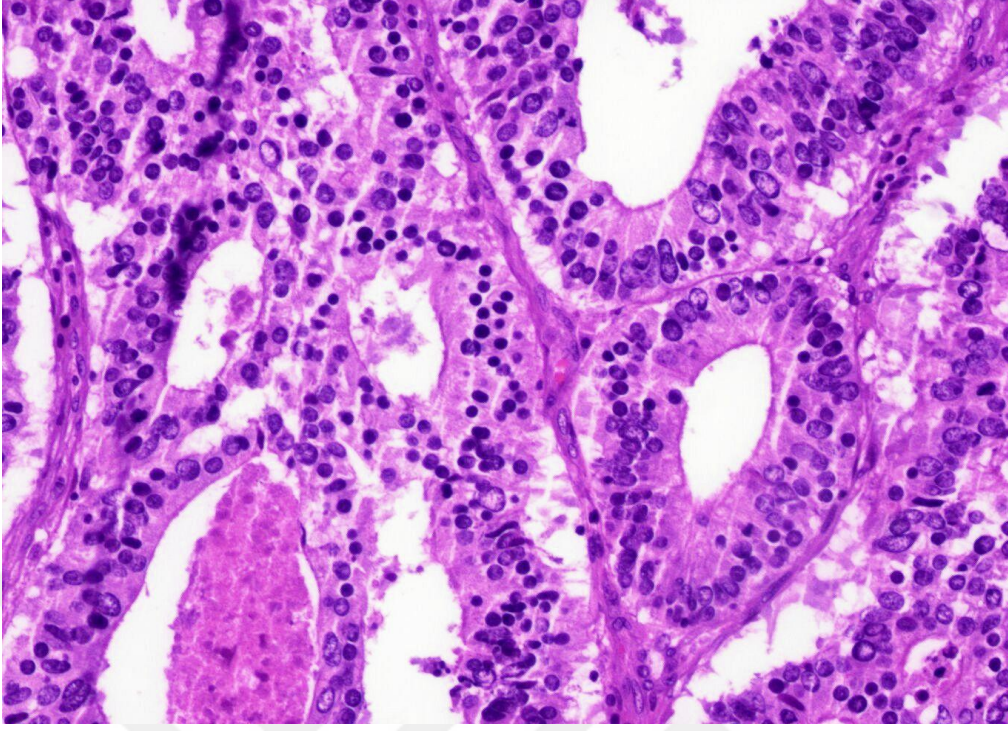
Değerlendirme için kolorektal rezeksiyon spesmenlerine ait parafin blok ve lam preparatlar patoloji arşivinden çıkarıldı. Histopatolojik değerlendirme tümöre ait hematoxilen eozin (H&E) boyalı lam preparatlardan yapıldı. H&E kesitler çift başlı ışık mikroskopunda biri gastrointestinal patoloji dalında deneyimli iki patolog tarafından yeniden değerlendirildi.

Patoloji raporlarından elde edilen histopatolojik parametrelere ek olarak MSI düşündürülen histopatolojik bulgular (tümörü infiltre eden lenfositler (Şekil 4 ve Şekil 5), Crohn benzeri reaksiyon (Şekil 9), medüller ve müsinöz komponent (Şekil 8) ve yüksek histolojik grade), tümör büyüme paterni ve tümör tomurcuklanması (Şekil 6 ve Şekil 7) açısından tekrar değerlendirme yapıldı. Değerlendirme kriterleri Tablo 5'te özetlenmiştir.

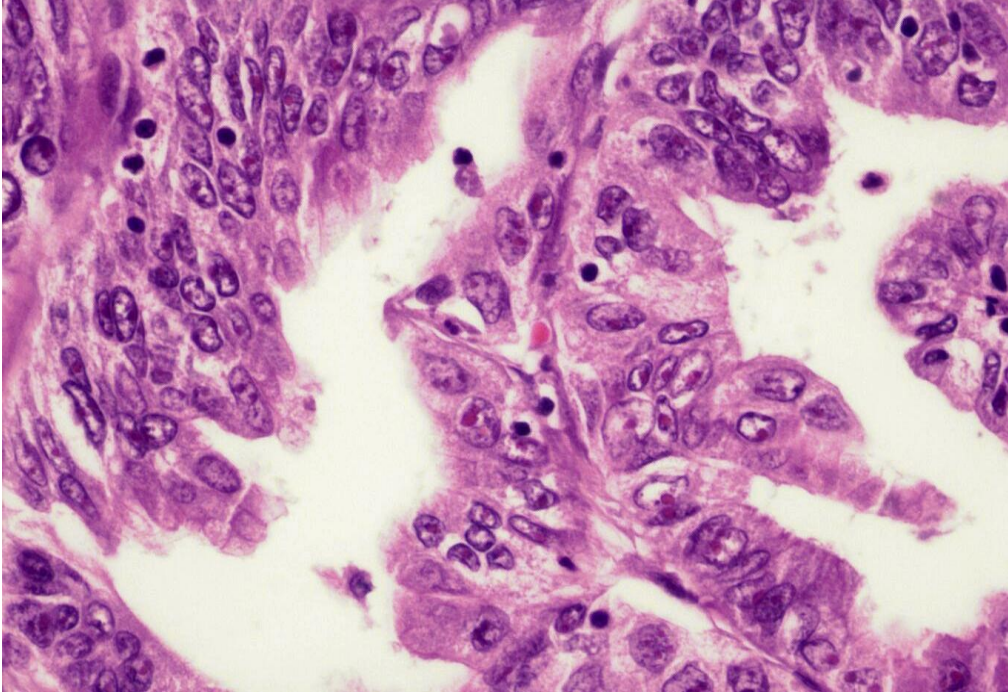
Tablo 5. Değerlendirilen histopatolojik parametrelerin tanımlanması

Histopatolojik parametre	
Crohn benzeri reaksiyon	0: yok, 1: mevcut (germinal merkezleri belirgin lenfoid foliküller veya iki ya da daha fazla büyük lenfoid agregatlar)
Tümörü infiltre eden lenfositler	0: yok 1: hafif-orta derecede (0-2/1BBA) 2: belirgin ($\geq 3/1BBA$)
Müsinöz komponent	0: yok, 1: mevcut, tümörün %50'sinden az
Medüller komponent	0: yok, 1: mevcut
Yüksek histolojik grade	0: yok, 1: mevcut
Tümör büyüme paterni	1: infiltratif, 2: ekspansif
Tümör tomurcuklanması	0: yok, 1: mevcut (invazyon sınırında beş yada daha az tümör hücresinden oluşan ince kordonlar yada küçük agregatlar)

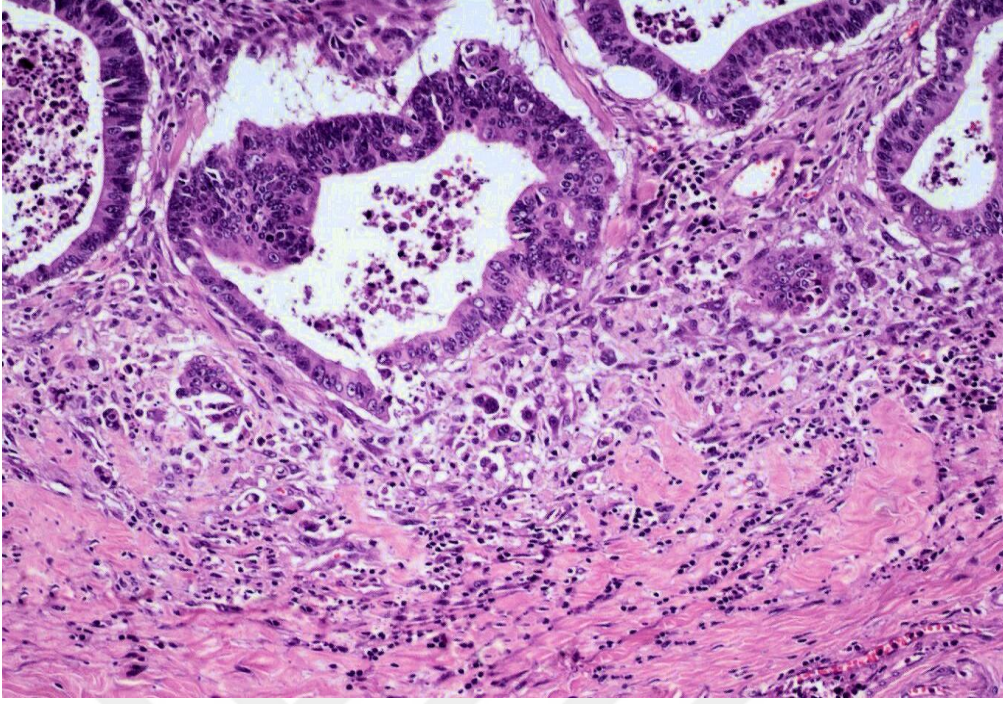
BBA: Büyük büyüme alanı



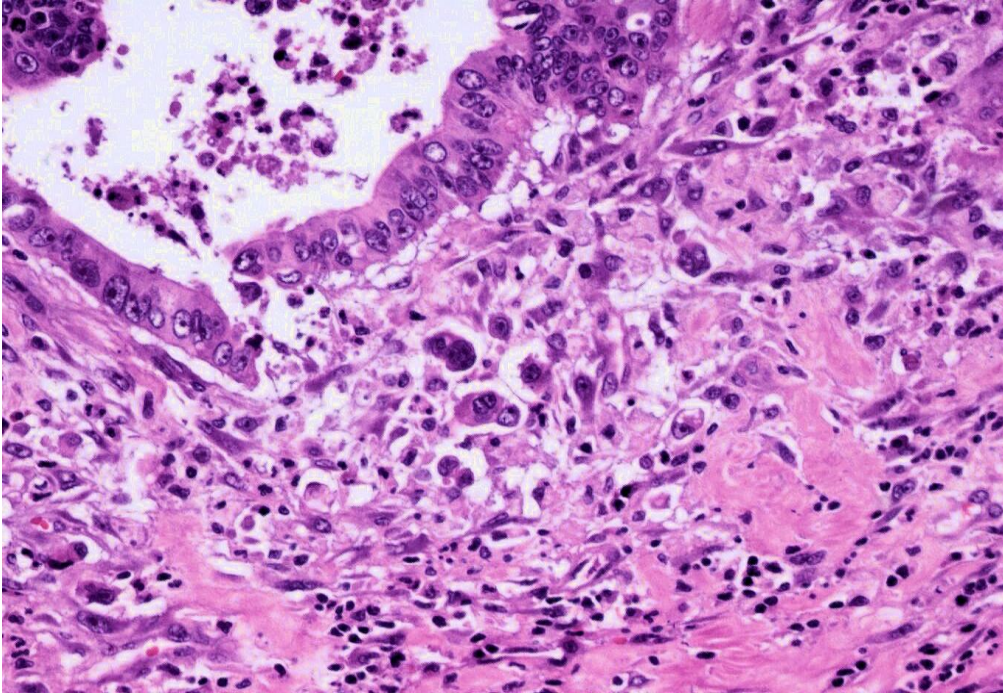
Şekil 4. Tümörü infiltre eden lenfositler (H&E, x200)



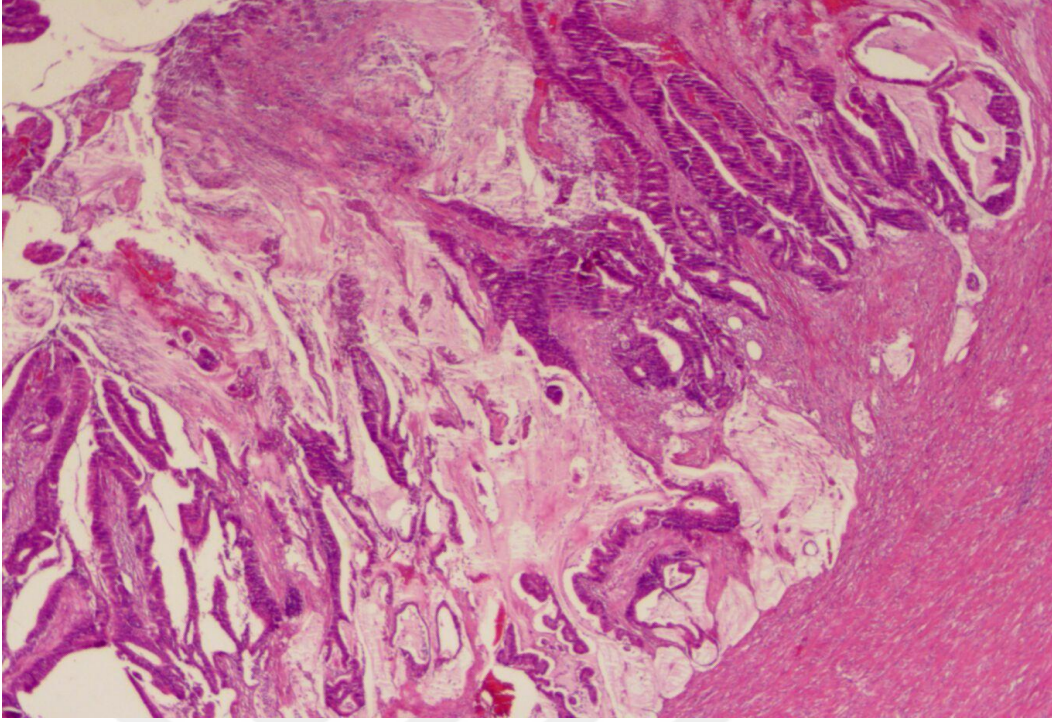
Şekil 5. Tümörü infiltre eden lenfositler (H&E, x400)



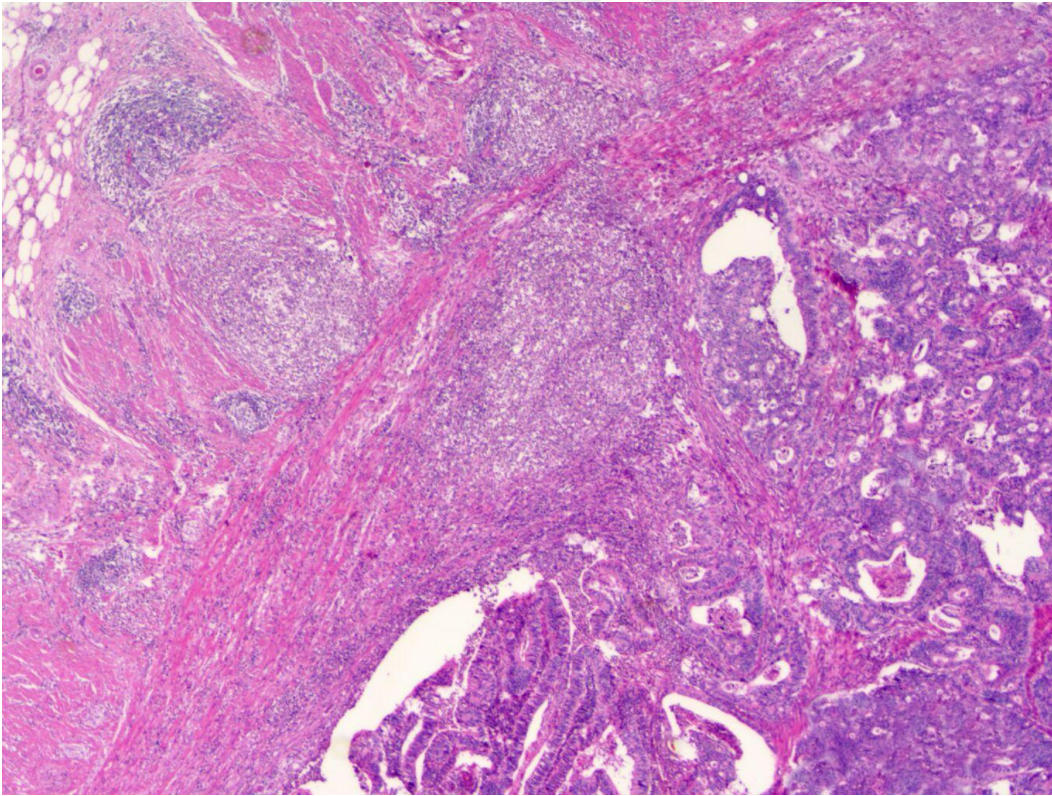
Şekil 6. Tümör tomurcuklanma paterni (H&E, x100)



Şekil 7. Tümör tomurcuklanma paterni (H&E, x200)



Şekil 8. Müsinöz komponent içeren adenokarsinom (H&E, x20)



Şekil 9. Crohn benzeri reaksiyon (H&E, x20)

3.3. DOKU MAKROARRAY BLOKLARININ HAZIRLANMASI:

Tümörden alınan örneklere ait H&E boyalı lamlar tekrar incelenerek immünohistokimyasal çalışma için uygun, nekroz içermeyen ya da nekrozun en az izlendiği tümör alanları belirlendi. Her olgu için çalışmaya uygun, en az %50 tümör dokusu içeren 8 mm çaplı birer adet tümör alanı lam üzerinde işaretlendi. İşaretli tümör alanları parafin bloklardan çıkarıldı.

Tümör bloklarından çıkarılan dokulardan, her 6 olguya ait 1 yeni alıcı blok olacak şekilde toplam 24 adet doku makroarray (DMA) bloğu hazırlandı. Dokuların DMA bloklarına dökümü sırasında, her yeni blok için biyopsi numaralarını içeren DMA blok haritaları oluşturuldu. Hazırlanan parafin bloklardan pozitif şarjlı lamlara 3µm kalınlıkta kesitler alındı.



Şekil 10. Doku makroarray bloklarının hazırlanması (sırasıyla çalışma için uygun tümör alanının lam ve parafin bloklarda işaretlenmesi, dokunun bloktan çıkarılması, yeniden döküm, hazırlanan kesitler)

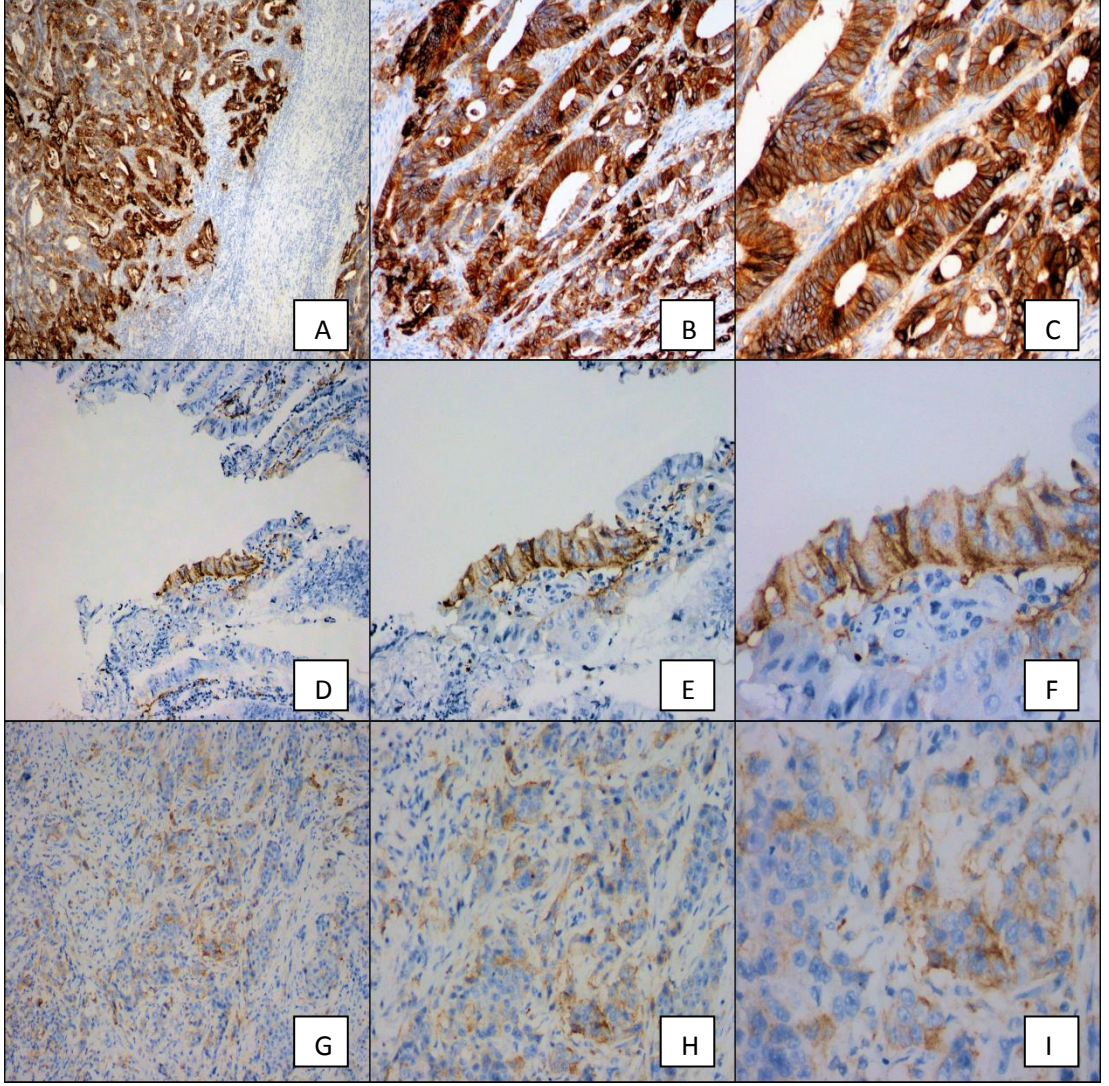
3.4. İMMÜNHİSTOKİMYASAL İNCELEME:

3.4.1. İmmünhistokimya Prosedürü:

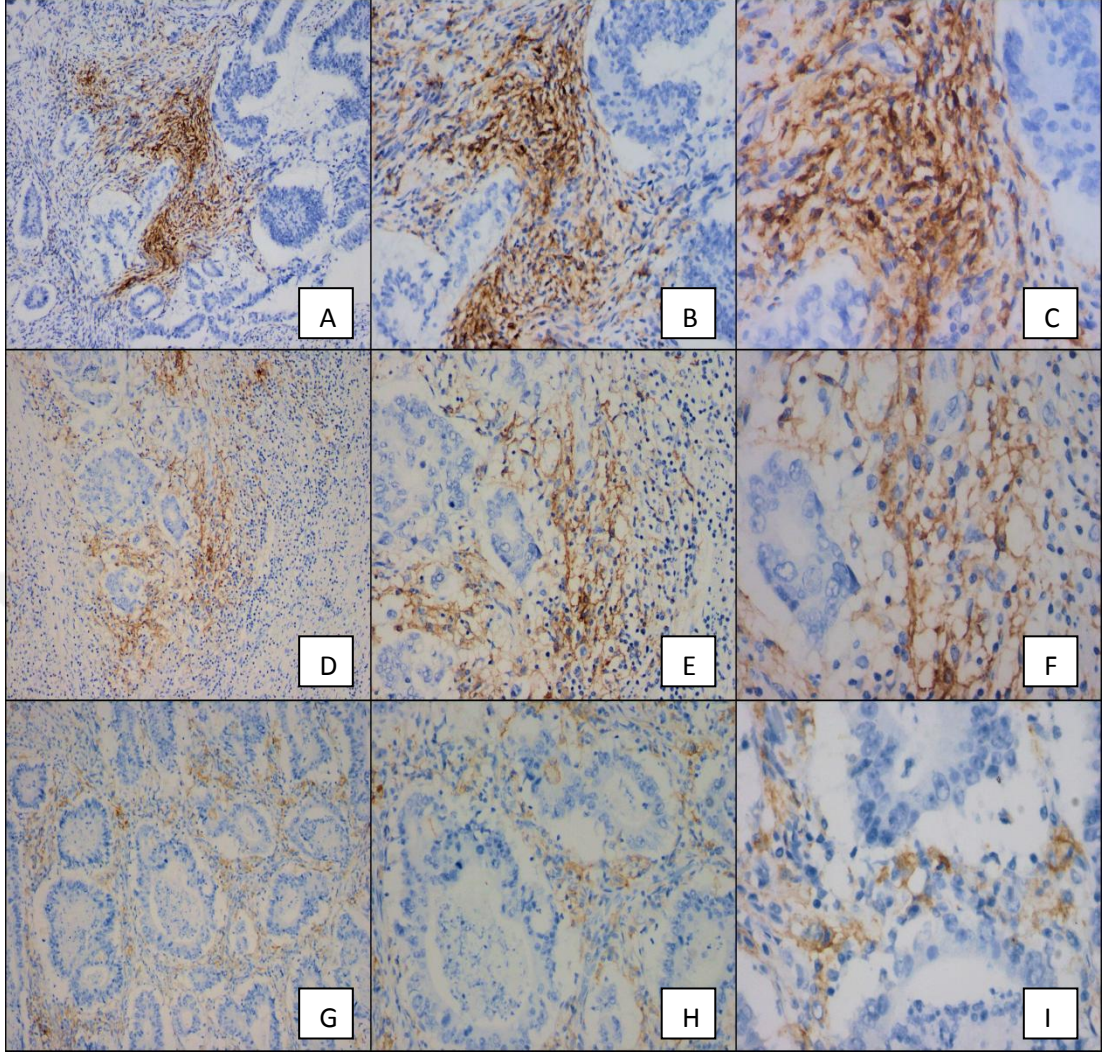
İmmünhistokimyasal analiz için parafin bloklardan alınan 3µm kalınlıktaki kesitlere immünhistokimyasal olarak PD-L1 antikoru (22C3 klonu, 1/50, Dako, Glostrup, Danimarka) uygulandı. İmmünhistokimyasal boyanma Dako Omnis tam otomatik İHK cihaz sistemi ve EnVision™ FLEX+ “detection” sistem kullanılarak yapıldı. Kromojen olarak diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Çalışma için hücre kültürü yöntemiyle üretilmiş (“cell line”) pozitif ve negatif kontroller kullanıldı.

3.4.2. İmmünhistokimyasal Boyanmanın Değerlendirilmesi:

İmmünhistokimyasal değerlendirme hem tümör hücreleri hem de stromal immün sistem hücrelerinde ayrı ayrı boyanma şiddeti ve boyanan hücre yüzdesine göre yapıldı. Sitoplazmik ve/veya membranöz boyanma görülen hücre yüzdesi; <%1=skor 0, %1-9=skor 1, %10-50=skor 2, >%50=skor 3 olarak derecelendi. Boyanma şiddeti ise; boyanma yok=skor 0, zayıf boyanma=skor 1, orta şiddette boyanma=skor 2 ve kuvvetli boyanma=skor 3 olarak değerlendirildi (Şekil 11 ve Şekil 12). Boyanma şiddeti ve yüzdesine ait skorlar toplanarak her olgu için bir “immünreaktivite skoru” elde edildi. PD-L1 immünreaktivite skoru ≥ 2 olan olgular pozitif, <2 olan olgular negatif olarak tanımlandı.



Şekil 11. Tümör hücrelerinde immünohistokimyasal olarak PD-L1 boyanması (A-B-C) kuvvetli boyanma-skor 3 (sırasıyla x40, x100, x200), (D-E-F) orta şiddette boyanma-skor 2 (sırasıyla x100, x200, x400), (G-H-I) zayıf boyanma-skor 1(sırasıyla x100, x200, x400)



Şekil 12. İmmün hücrelerde immünohistokimyasal olarak PD-L1 boyanması (A-B-C) kuvvetli boyanma-skor 3 (sırasıyla x100, x200, x400), (D-E-F) orta şiddette boyanma-skor 2 (sırasıyla x100, x200, x400), (G-H-I) zayıf boyanma-skor 1(sırasıyla x100, x200, x400)

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

İstatistiksel analizler için NCSS (“Number Cruncher Statistical System”) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım göstermeyen parametrelerin iki grup karşılaştırmalarında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Pearson Ki-Kare testi, Fisher-Freeman-Halton testi ve Fisher’s Exact test kullanıldı. Tümörün immünreaktivite skoru ve stromal immün sistem hücrelerinin immünreaktivite skoru üzerine etki eden risk faktörlerinin değerlendirilmesinde “Backward” (“Conditional”) Lojistik regresyon analizi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. TANIMLAYICI ÖZELLİKLERİN DAĞILIMI:

Çalışma 1 Aralık 2015 – 28 Şubat 2017 tarihleri arasında HNEAH Patoloji Kliniği'nde değerlendirilmiş olan; %44,4'ü (n=64) kadın, %55,6'sı (n=80) erkek olmak üzere 144 olgu ile gerçekleştirilmiştir. Olguların yaşları 19 ile 92 arasında değişmekte olup, ortalama 65,70±13,26 yıldır (Tablo 6).

Tümör lokalizasyonu; olguların %25'inde (n=36) sağ kolon, %7,6'sında (n=11) transvers kolon, %47,3'ünde (n=68) sol kolon ve %20,1'inde (n=29) rektumdur. Histolojik diferansiyasyon derecesi incelendiğinde; tümörlerin %17,4 (n=25)'ü iyi diferansiye, %71,5 (n=103)'i orta derecede diferansiye ve %11,1 (n=16)'i az diferansiye olarak saptanmıştır. Tümör büyüme paterni olguların %66,7'sinde (n=96) infiltratif, %33,3'ünde (n=48) ekspansiftir ve olguların %52,8'inde (n=76) tümör tomurcuklanması görülmektedir. Tümör evrelendirmesinde, olguların %1,4'ü (n=2) pT1, %14,6'sı (n=21) pT2, %60,4'ü (n=87) pT3, %22,9'u (n=33) pT4 ve %0,7'si (n=1) pTis'dir. N evresi incelendiğinde; olguların %52,8'i (n=76) pN0, %27,1'i (n=39) pN1 ve %20,1'i (n=29) pN2'dir. Olguların %53,5'inde (n=77) lenfovasküler invazyon, %29,9'unda (n=43) perinöral

invazyon ve %9,7'sinde (n=14) immünohistokimyasal olarak mikrosatellit instabilite saptanmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. Tanımlayıcı özelliklerin dağılımı

		Min-Mak(Medyan)	Ort±Ss
Yaş (yıl)		19-92 (67)	65,70±13,26
		n	%
Cinsiyet	Kadın	64	44,4
	Erkek	80	55,6
Tümör lokalizasyonu	Sağ kolon	36	25,0
	Transvers kolon	11	7,6
	Sol kolon	68	47,3
	Rektum	29	20,1
Histolojik grade	İyi diferansiye	25	17,4
	Orta diferansiye	103	71,5
	Az diferansiye	16	11,1
Tümör büyüme paterni	İnfiltratif	96	66,7
	Ekspansif	48	33,3
Tümör tomurcuklanması	Var	76	52,8
	Yok	68	47,2
T evresi	pTis	1	0,7
	pT1	2	1,4
	pT2	21	14,6
	pT3	87	60,4
	pT4	33	22,9
N evresi	pN0	76	52,8
	pN1	39	27,1
	pN2	29	20,1
Lenfovasküler invazyon	Var	77	53,5
	Yok	67	46,5
Perinöral invazyon	Var	43	29,9
	Yok	101	70,1
MMR kaybı	Var	14	9,7
	Yok	130	90,3

MMR: "Mismatch repair"

Mikrosatellit instabilite düşündüren histopatolojik parametreler incelendiğinde, Crohn benzeri reaksiyon oranı %28,5 (n=41) saptanmıştır. Tümörü infiltre eden lenfositler (TIL); olguların %72,2'sinde (n=104) görülmezken, %12,5'sinde (n=18) hafif-orta seviyede, %15,3'ünde (n=22) belirgindir. Olguların %20,1'inde (n=29) müsinöz komponent, %11,1'inde (n=16) yüksek histolojik grade saptanmıştır. Olguların hiçbirinde medüller komponent görülmedi (n=0). MSI düşündüren histopatolojik bulgulardan (CBR, TIL, müsinöz komponent, medüller komponent, yüksek histolojik grade) en az birinin varlığı ise %56,3 (n=81) oranında saptanmıştır (Tablo 7).

Tablo 7. MSI düşündüren histopatolojik bulguların dağılımı

		n	%
Crohn benzeri reaksiyon	Var	41	28,5
	Yok	103	71,5
TIL	Yok	104	72,2
	Hafif - Orta	18	12,5
	Belirgin	22	15,3
Müsinöz komponent	Var	29	20,1
	Yok	115	79,9
Yüksek histolojik grade	Var	16	11,1
	Yok	128	88,9
MSI düşündüren bulgu	Var	81	56,3
	Yok	63	43,8

TIL: Tümörü infiltre eden lenfositler, MSI: Mikrosatellit instabilite

Tümör hücrelerinin PD-L1 immünreaktivite skoru 0 ile 6 arasında değişmekte olup, ortalama $0,25 \pm 0,96$ 'dır ve olguların %6,9'unda (n=10) pozitif saptanmıştır. Stromal immün sistem hücrelerinin PD-L1 immünreaktivite skoru 0 ile 6 arasında değişmekte olup, ortalama $2,05 \pm 1,72$ 'dir ve olguların %65,3'ünde (n=94) pozitif saptanmıştır (Tablo 8).

Tablo 8. Tümör ve stromal immün sistem hücrelerinin PD-L1 ekspresyon dağılımları

Tümör PD-L1 IRS	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	0-6 (0)
	<i>Ort±Ss</i>	0,25±0,96
	PD-L1 pozitif	10 (6,9)
	PD-L1 negatif	134 (93,1)
Stromal hücre PD-L1 IRS	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	0-6 (2)
	<i>Ort±Ss</i>	2,05±1,72
	PD-L1 pozitif	94 (65,3)
	PD-L1 negatif	50 (34,7)

PD-L1: Programlı hücre ölüm proteini 1, IRS: immünreaktivite skoru

4.2. TÜMÖR HÜCRELERİNİN PD-L1 EKSPRESYONUNUN TANIMLAYICI ÖZELLİKLER İLE İLİŞKİSİ:

Yaş ve cinsiyet dağılımlarına göre tümör hücrelerinin PD-L1 pozitif/negatif grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Tümör hücrelerinin PD-L1 pozitifliğine (PD-L1 (+) T) göre, tümör lokalizasyonu, histolojik grade, tümör tomurcuklanması, pT ve pN evreleri, lenfovasküler ve perinöral invazyon istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$). Tümör hücrelerinin PD-L1 pozitifliği ile tümör büyüme paterni arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmazken; pozitif grupta ekspansif büyüme paterni oranının yüksek olması dikkat çekicidir ($p=0,084$; $p>0,05$) (Tablo 9).

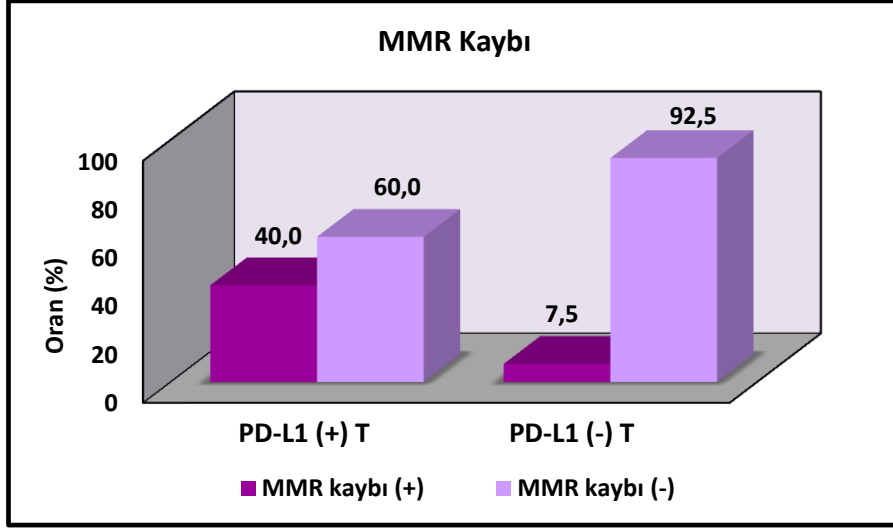
Tümör hücrelerinin PD-L1 pozitifliği ile MMR kaybı oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmış olup; pozitif grupta MMR kaybı oranı, negatif gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,01$) (Tablo 9 ve Şekil 13).

Tablo 9. Tümör PD-L1 ekspresyonu ile tanımlayıcı özelliklerin ilişkisi

		PD-L1 (+) T	PD-L1 (-) T	p
		(n=10)	(n=134)	
		n (%)	n (%)	
Yaş (yıl)	<i>Min-Mak</i>	43-77 (62,5)	19-92 (67)	^a 0,201
	<i>(Medyan)</i>			
	<i>Ort±Ss</i>	60,50±12,46	66,09±13,28	
Cinsiyet	Kadın	4 (40,0)	60 (44,8)	^b 1,000
	Erkek	6 (60,0)	74 (55,2)	
Tümör lokalizasyonu	Sağ kolon	4 (40,0)	32 (23,9)	^c 0,654
	Transvers kolon	0 (0)	11 (8,2)	
	Sol kolon	5 (50,0)	63 (47,0)	
	Rektum	1 (10,0)	28 (20,9)	
Histolojik grade	İyi diferansiye	3 (30,0)	22 (16,4)	^c 0,215
	Orta diferansiye	5 (50,0)	98 (73,1)	
	Az diferansiye	2 (20,0)	14 (10,4)	
Tümör büyüme paterni	İnfiltratif	4 (40,0)	92 (68,7)	^b 0,084
	Ekspansif	6 (60,0)	42 (31,3)	
Tümör tomurcuklanması	Var	5 (50,0)	71 (53,0)	^b 1,000
	Yok	5 (50,0)	63 (47,0)	
T evresi	pT1+pT2+pTis	2 (20,0)	22 (16,4)	^b 0,673
	pT3+pT4	8 (80,0)	112 (83,6)	
N evresi	pN0	7 (70,0)	69 (51,5)	^c 0,452
	pN1	1 (10,0)	38 (28,4)	
	pN2	2 (20,0)	27 (20,1)	
Lenfovasküler invazyon	Var	6 (60,0)	71 (53,0)	^b 0,751
	Yok	4 (40,0)	63 (47,0)	
Perinöral invazyon	Var	2 (20,0)	41 (30,6)	^b 0,723
	Yok	8 (80,0)	93 (69,4)	
MMR kaybı	Var	4 (40,0)	10 (7,5)	^b 0,009**
	Yok	6 (60,0)	124 (92,5)	

^aMann Whitney U Test, ^bFisher's Exact Test, ^cFisher Freeman Halton Test, **p<0,01

PD-L1: Programlı hücre ölüm proteini 1, MMR: "mismatch repair"



Şekil 13. Tümör PD-L1 ekspresyonuna göre MMR dağılımları

Tümör PD-L1 pozitifliği ile Crohn benzeri reaksiyon ve MSI düşündüren histopatolojik bulgulardan en az birinin varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. PD-L1 pozitif grupta Crohn benzeri reaksiyon ve MSI düşündüren histopatolojik bulgu varlığı oranı negatif gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0,006$; $p<0,01$ ve $p=0,043$; $p<0,05$) (Tablo 10 ve Şekil 14).

Tümör PD-L1 pozitifliğine göre tümörü infiltre eden lenfositlerin varlığı istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p=0,018$; $p<0,05$). PD-L1 pozitif olgularda TIL varlığı da yüksek bulunmuştur.

Müsinöz komponent ve yüksek histolojik grade ile tümör PD-L1 pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

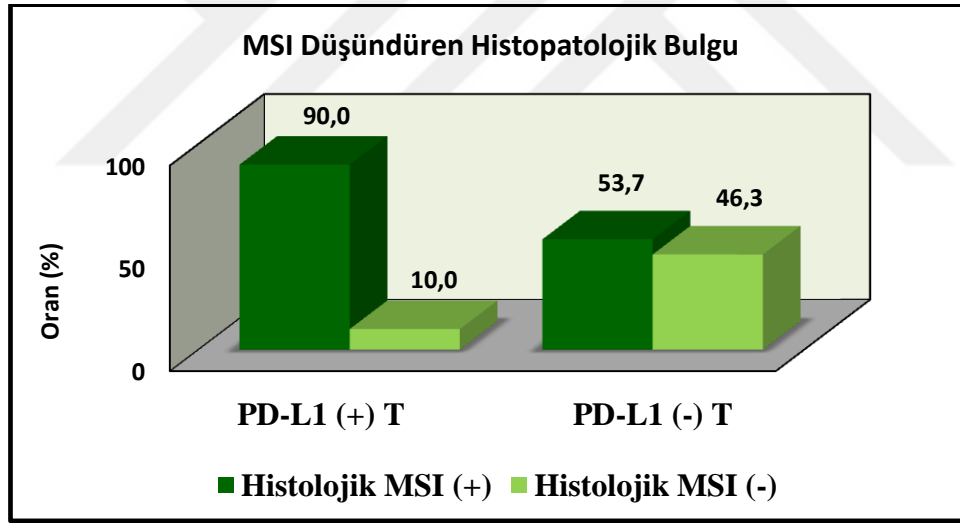
Tablo 10. MSI düşündüren histopatolojik bulgular ile tümör PD-L1 ekspresyon ilişkisi

	PD-L1 (+) T (n=10)	PD-L1 (-) T (n=134)	<i>p</i>
n (%)	n (%)	n (%)	

Crohn benzeri reaksiyon	Var	7 (70,0)	34 (25,4)	^b 0,006**
	Yok	3 (30,0)	100 (74,6)	
TIL	Yok	4 (40,0)	100 (74,6)	^b 0,028*
	Var	6 (60,0)	34 (25,4)	
Müsinöz komponent	Var	3 (30,0)	26 (19,4)	^b 0,421
	Yok	7 (70,0)	108 (80,6)	
Yüksek histolojik grade	Var	2 (20,0)	14 (10,4)	^b 0,307
	Yok	8 (80,0)	120 (89,6)	
MSI düşündürücü histopatolojik bulgu	Var	9 (90,0)	72 (53,7)	^b 0,043*
	Yok	1 (10,0)	62 (46,3)	

^bFisher's Exact Test, ^cFisher Freeman Halton Test, *p<0,05, **p<0,01

TIL: tümörü infiltre eden lenfositler, MSI: mikrosatellit instabilite



Şekil 14. MSI düşündürücü histopatolojik bulgulardan en az birinin varlığı ile tümör PD-L1 ekspresyon ilişkisi

Tümör hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu üzerine etki eden risk faktörlerinden tek değişkenli değerlendirmelerde anlamlı ve anlamlılığa yakın olduğu gözlenen yaş, MSI düşündürücü histopatolojik bulgu varlığı, immünohistokimyasal MMR kaybı, Crohn benzeri reaksiyon ve TIL varlığının etkileri lojistik regresyon analizi ile değerlendirilmiştir.

Tümör PD-L1 ekspresyonu üzerine etki edebileceği düşünülen değişkenler “backward” (“conditional”) lojistik regresyon analizi ile değerlendirildiğinde modelin anlamlı olduğu bulunmuştur (p:0,002; p<0,01). İmmünohistokimyasal MMR kaybı ve Crohn benzeri reaksiyon etkilerinin tümördeki PD-L1 ekspresyonu üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (sırasıyla; p:0,044; p:0,030; p<0,05). Analize alınan diğer değişkenlerin ise tek değişkenli değerlendirmelerde anlamlı olmalarına rağmen modelde anlamsız hale geldikleri gözlenmiştir (p>0,05).

4.3. STROMAL İMMÜN SİSTEM HÜCRELERİNDEKİ PD-L1 EKSPRESYONUNUN TANIMLAYICI ÖZELLİKLER İLE İLİŞKİSİ:

Yaş ve cinsiyet dağılımlarına göre stromal immün sistem hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05). Stromal hücre PD-L1 pozitifliğine göre tümör lokalizasyonu istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermezken; pozitif grupta sağ kolon oranının negatif gruptan yüksek olması dikkat çekicidir (p=0,075; p>0,05).

Stromal immün hücre PD-L1 pozitifliği (PD-L1 (+) İ) ile histolojik grade, tümör büyüme paterni, tümör tomurcuklanması, perinöral invazyon ve immünohistokimyasal MMR kaybı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (p>0,05) (Tablo 11).

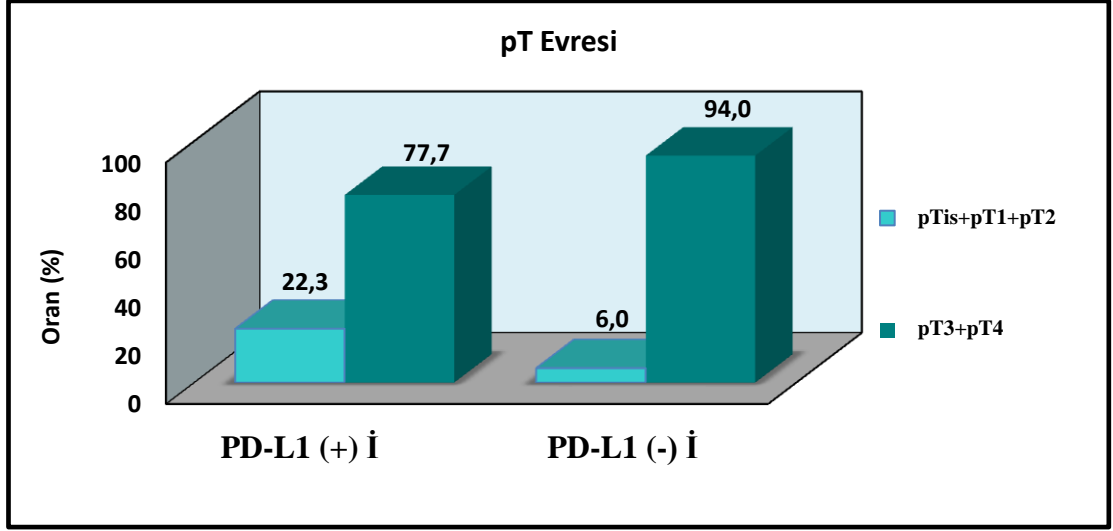
Tablo 11. Tanımlayıcı özelliklere göre stromal immün sistem hücrelerinin PD-L1 ekspresyonunun değerlendirilmesi

		PD-L1 (+) İ (n=94) n (%)	PD-L1 (-) İ (n=50) n (%)	p
Yaş (yıl)	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	19-90 (68)	34-92 (65)	^a 0,373
	<i>Ort±Ss</i>	66,37±12,89	64,44±13,97	
Cinsiyet	Kadın	42 (44,7)	22 (44,0)	^b 1,000
	Erkek	52 (55,3)	28 (56,0)	
Tümör lokalizasyonu	Sağ kolon	28 (29,8)	8 (16,0)	^c 0,075
	Transvers kolon	5 (5,3)	6 (12,0)	
	Sol kolon	46 (48,9)	22 (44,0)	

	Rektum	15 (16,0)	14 (28,0)	
Histolojik grade	İyi diferansiye	17 (18,1)	8 (16,0)	^c 0,962
	Orta diferansiye	67 (71,3)	36 (72,0)	
	Az diferansiye	10 (10,6)	6 (12,0)	
Tümör büyüme paterni	İnfiltratif	60 (63,8)	36 (72,0)	^d 0,322
	Ekspansif	34 (36,2)	14 (28,0)	
Tümör tomurcuklanması	Var	48 (51,1)	28 (56,0)	^d 0,572
	Yok	46 (48,9)	22 (44,0)	
T evresi	pTis+pT1+pT2	21 (22,3)	3 (6,0)	^d 0,012*
	pT3+pT4	73 (77,7)	47 (94,0)	
N evresi	pN0	58 (61,7)	18 (36,0)	^d 0,005**
	pN1	18 (19,1)	21 (42,0)	
	pN2	18 (19,1)	11 (22,0)	
Lenfovasküler invazyon	Var	43 (45,7)	34 (68,0)	^d 0,011*
	Yok	51 (54,3)	16 (32,0)	
Perinöral invazyon	Var	26 (27,7)	17 (34,0)	^d 0,429
	Yok	68 (72,3)	33 (66,0)	
İmmünohistokimyasal MMR kaybı	Var	11 (11,7)	3 (6,0)	^b 0,380
	Yok	83 (88,3)	47 (94,0)	

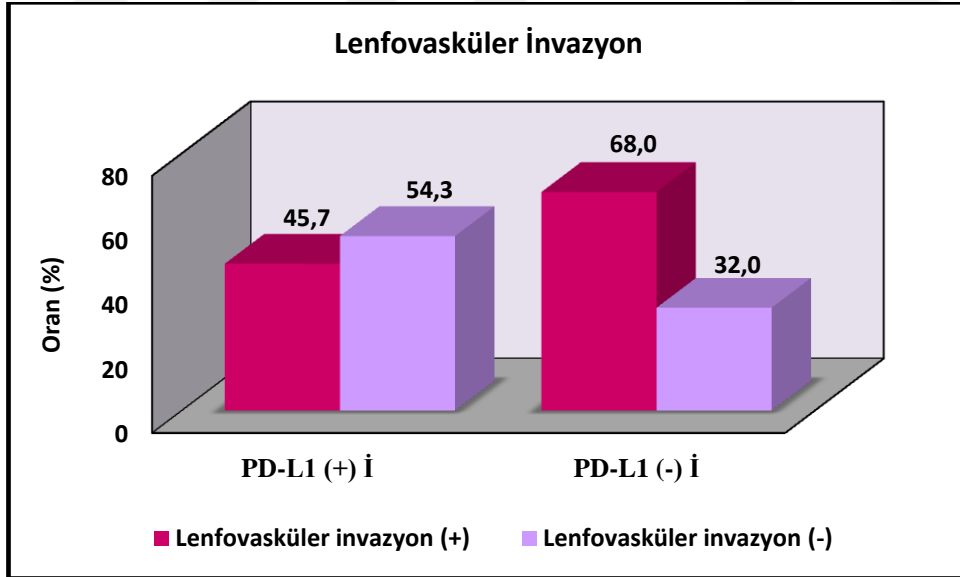
^aMann Whitney U Test, ^bFisher's Exact Test, ^cFisher Freeman Halton Test, ^dPearson Chi-Square Test, **p<0,01

Patolojik tümör evresi ile PD-L1 (+) İ arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmış olup pozitif grupta düşük tümör evresi (pTis, pT1, pT2) negatif gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p=0,012; p<0,05) (Şekil 15). Stromal hücre PD-L1 pozitifliğine göre N evresi istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (p=0,005; p<0,01). Pozitif grupta pN0 olma oranı negatif gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p=0,003; p<0,01). Ayrıca pozitif grupta pN1 olma oranı ise negatif gruptan anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p=0,003; p<0,01) (Tablo 11).



Şekil 15. Stromal hücre PD-L1 pozitifliğine göre patolojik tümör evresi dağılımı

Stromal immün sistem hücre PD-L1 pozitif grupta lenfovasküler invazyon oranı negatif gruptan anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p=0,011$; $p<0,05$) (Şekil 16).



Şekil 16. Stromal immün hücre PD-L1 ekspresyonuna göre lenfovasküler invazyon dağılımı

Crohn benzeri reaksiyon oranı PD-L1 (+) İ grupta PD-L1 (-) İ gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p=0,042; p<0,05).

Stromal hücre PD-L1 pozitifliğine göre TIL varlığı istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (p=0,021; p<0,05). PD-L1 pozitif olgularda TIL varlığı da yüksek olarak saptanmıştır.

Müsinöz komponent ve yüksek histolojik grade ile stromal hücre PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05).

Stromal hücre PD-L1 pozitifliğine göre MSI düşündüren histopatolojik bulgu oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmış olup; PD-L1 pozitif grupta MSI düşündüren histopatolojik bulgu varlığı oranı negatif gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p=0,031; p<0,05) (Tablo 12).

Tablo 12. MSI düşündüren histopatolojik bulgulara göre stromal immün hücre PD-L1 değerlendirmesi

		PD-L1 (+) İ (n=94)	PD-L1 (-) İ (n=50)	^d p
		n (%)	n (%)	
Crohn benzeri reaksiyon	Var	32 (34,0)	9 (18,0)	0,042*
	Yok	62 (66,0)	41 (82,0)	
TIL	Yok	62 (66,0)	42 (84,0)	0,021*
	Var	32 (34,0)	8 (16,0)	
Müsinöz komponent	Var	21 (22,3)	8 (16,0)	0,366
	Yok	73 (77,7)	42 (84,0)	
Yüksek histolojik grade	Var	10 (10,6)	6 (12,0)	0,804
	Yok	84 (89,4)	44 (88,0)	
MSI düşündüren histopatolojik bulgu	Var	59 (62,8)	22 (44,0)	0,031*
	Yok	35 (37,2)	28 (56,0)	

^dPearson Chi-Square Test

*p<0,05

Stromal immün hücre PD-L1 ekspresyonu üzerine etki eden risk faktörlerinden tek değişkenli değerlendirmelerde anlamlı ve anlamlılığa yakın olduğu gözlenen Crohn benzeri reaksiyon, tümörü infiltre eden lenfositler, pT evresi, MSI düşündürülen histopatolojik bulgu, lenfovasküler invazyon varlığı ve pN evrelerinin etkileri lojistik regresyon analizi ile değerlendirilmiştir.

Stromal immün hücrelerin PD-L1 ekspresyonu üzerine etki edebileceği düşünülen değişkenler “backward” (“conditional”) lojistik regresyon analizi ile değerlendirildiğinde modelin anlamlı olduğu bulunmuştur ($p:0,001$; $p<0,01$). pT evresinin immün hücre PD-L1 ekspresyonu üzerine etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p:0,031$; $p<0,05$), ancak modelde Crohn benzeri reaksiyon ve TIL değişkeninin etkisi de anlamlılığa yakın olarak saptanmıştır ($p=0,053$; $p=0,087$; $p>,05$). Analize alınan diğer değişkenlerin ise tek değişkenli değerlendirmelerde anlamlı olmalarına rağmen modelde anlamsız hale geldikleri gözlenmiştir ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

Dünyada ve ülkemizde kolorektal kanserler tüm kanser vakalarının önemli bir kısmını temsil etmektedir [2]. Mortalite oranları dünyada birçok ülkede düşüşe geçmiş olmakla birlikte bazı ülkelerde halen artış göstermektedir [3].

Kolorektal kanserin temel tedavisi cerrahi rezeksiyondur. Ancak olguların %30-40'ı bölgesel olarak ilerlemiş ya da metastatik olduğundan yalnızca cerrahi ile kür sağlamak mümkün değildir [54]. Günümüzde kullanılan tedavi yöntemlerinin metastatik hastalarda etkinliği azdır ve önemli ölçüde toksiktir [55]. KRK tedavi protokollerinde ve cerrahi tekniklerde kaydedilen önemli gelişmelere rağmen ileri evre kolorektal kanser prognozu hala kötüdür [5]. Bu nedenle ileri evre KRK'larda etkili olabilecek ve ilaç toksisitesini minimize edecek yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Programlı hücre ölümü proteini 1'i hedef alan immünoterapinin malign melanom, küçük hücreli dışı akciğer karsinomu ve renal hücreli karsinom gibi bazı tümörlerde umut verici klinik sonuçları mevcuttur [53, 56, 57]. Kolorektal kanserlerde ise PD-1/PD-L1 blokajına yanıtın düşük olduğunu bildiren az sayıda çalışma [10, 11] bulunmakla birlikte bu tedavinin etkisi henüz büyük oranda bilinmemektedir [53, 58].

Tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun PD-1/PD-L1 yolağını hedef alan immünoterapilere yanıt için prediktif bir belirteç olduğu [52] ve bazı malignitelerde kötü prognoz ile ilişkili bulunduğu bildirilmektedir [59, 60].

Çalışmamızda kliniğimizin verilerinde tümör ve stromal immün sistem hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun değerlendirilmesi, sonuçların histopatolojik prognostik faktörlerle karşılaştırılması ve PD-1/PD-L1 immün kontrol noktası inhibitörleri ile tedaviye aday olabilecek hasta profilinin belirlenebilmesi amaçlanmıştır.

5.1. PD-L1 EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ:

Kolorektal kanserlerde PD-L1 ekspresyonu literatürde tümör hücrelerinde ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerde değerlendirilmiştir. Ekspresyonun değerlendirilmesinde boyanma şiddeti ve yaygınlığını temel alan çeşitli skorlama sistemleri kullanılmıştır. Örneğin Droseser ve ark. [61] tümör hücrelerinin PD-L1 ekspresyonunu boyanma şiddetine göre değerlendirmiş (0: negatif, 1: çok zayıf, 2: orta kuvvette, 3: kuvvetli ekspresyon), düşük ekspresyon (skor 0 ve 1) ve yüksek ekspresyon (skor 2 ve 3) olarak gruplandırmıştır [61, 62]. Li ve ark. ise boyanma şiddeti (skor 0-3) ve boyanan hücre yüzdesine (skor 0-4) ait skorların toplamından oluşan bir immünreaktivite skoru elde etmiştir. Bu skorun eşik değerini 4 olarak belirleyerek tümörleri yüksek ve düşük PD-L1 ekspresyon gruplarına ayırmıştır [52]. Yapılan başka çalışmalarda farklı yüzdelerle göre ayırmakla birlikte buna benzer metodlar kullanılmıştır [63-65]. Diğer yayınlarda ise boyanma şiddetinden bağımsız, boyanan hücre yüzdesine göre gruplandırma yapılmıştır [66-68]. Literatürdeki bu metodlar ışığında çalışmamızda tümör hücreleri ve stromal immün sistem hücrelerinin PD-L1 immünreaktivite skoru boyanma kuvveti ve yüzdesine göre değerlendirilmiştir. Toplam immünreaktivite skoru 0 ile 6 arasında değişmektedir. PD-L1 pozitifliği için eşik değer skor 2 olarak belirlenmiştir.

Literatürde yapılan birçok çalışmada tümör hücrelerinin PD-L1 ekspresyon oranları (%5-89) değişkenlik göstermektedir [61, 65, 67, 69, 70]. İmmün sistem hücrelerinde ise PD-L1 pozitifliği yine farklı oranlarda (%15-57) saptanmıştır [63, 66, 68, 71]. Bizim çalışmamızda PD-L1 tümör hücrelerinde olguların % 6,9'unda

(n=10), immün hücrelerde olguların % 65,3'ünde (n=94) pozitif bulunmuştur. Kolorektal kanserlerde PD-L1'in immünhistokimyasal değerlendirmesi için yöntem ve antikor seçimi bakımından bir standardizasyon henüz yoktur. Çalışmalar arasındaki ekspresyon oranı farklılığı, antikor seçimi ve değerlendirme için kullanılan yöntemin farklılığına bağlı olabilir.

5.2. PD-L1 EKSPRESYONUNUN HASTAYA BAĞLI ETKENLER İLE İLİŞKİSİ:

Yaş ve cinsiyet dağılımlarının PD-L1 ekspresyonu ile ilişkisini değerlendiren çalışmaların bir kısmında tümör hücrelerinin yüksek PD-L1 ekspresyonu ile ileri yaş ve kadın cinsiyet arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur [70, 71]. Bununla birlikte birçok çalışmada yaş ve cinsiyet ile tümör yada immün hücrelerdeki PD-L1 pozitifliği arasında ilişki saptanmamıştır [52, 63, 64, 72, 73]. Çalışmamıza alınan olguların %44,4'ü kadın, %55,6'sı erkek olmak üzere yaşları 19 ile 92 arasında değişmektedir. Literatürdeki çalışmaların çoğu ile benzer olarak çalışmamızda da olguların yaş ve cinsiyet dağılımları ile tümör hücrelerinin ve immün sistem hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu arasında ilişki bulunmamıştır.

5.3. TÜMÖRE BAĞLI DEĞİŞKENLER İLE PD-L1 EKSPRESYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI:

Literatürde tümör hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu ile tümör lokalizasyonunu karşılaştıran çalışmaların çoğunda bu iki değişken arasında ilişki saptanmamıştır [63, 64, 73, 74]. Bununla birlikte Lee ve ark. [65] tümör hücrelerindeki yüksek PD-L1 ekspresyonu ile sağ kolon yerleşimi arasındaki ilişkiyi anlamlı bulmuştur. Inaguma ve ark. [67] ise tümörün PD-L1 ekspresyonu ile sağ kolon ve transvers kolon yerleşimi arasında anlamlı farklılık saptamıştır. Bizim çalışmamızda tümör lokalizasyonu ile tümör hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki anlamlı bulunmamıştır. İmmün hücre PD-L1 pozitifliği ile tümör lokalizasyonunu karşılaştıran çalışmalarda ise bu iki değişken arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır [63, 66, 68, 69]. Buna benzer olarak çalışmamızda da stromal immün sistem hücrelerinin PD-L1 pozitifliği ile tümör lokalizasyonu istatistiksel olarak

anlamli farklilik gostermemistir, ancak pozitif grupta sag kolon oraninin negatif gruptan yuksek olması dikkat cekicidir.

Patolojik tumör ve lenf nodu evrelemesi KRK'ların en önemli prognostik faktörlerindedir [36, 75]. Tümör hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu ile pT ve pN evrelerini karşılaştıran çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin Droeser ve ark. MMR kaybı olmayan hastalarda tümörün güçlü PD-L1 ekspresyonu ile düşük tümör evresi arasında korelasyon saptamıştır [61]. Öte yandan Zhao ve ark. ise tümör PD-L1 pozitifliğini ileri tümör evresi ile korele bulmuştur [73]. Ancak bu çalışma sınırlı hasta popülasyonu (56 hasta) üzerinde yapılmıştır. Bununla birlikte bizim çalışmamızın bulguları ile paralel olarak literatürde patolojik evre ile tümör hücre PD-L1 pozitifliği arasında anlamlı farklilik saptanmayan çalışmalar çoğunluktadır [63-65, 68-70]. Çalışmamızda pT ile stromal immün sistem hücrelerinin PD-L1 pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı farklilik saptanmıştır. PD-L1 pozitif grupta düşük tümör evresi (pTis, pT1, pT2) oranı negatif gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu değişkenlerin ilişkisini değerlendiren yayınlarda çalışmamızdan farklı olarak bu iki değişken arasında anlamlı farklilik saptanmamıştır [63, 66, 68, 69].

Kolorektal kanser evrelemesinde bir diğer değişken lenf nodu metastazı durumudur. pN evresinin tümör PD-L1 pozitifliği ile ilişkisini değerlendiren çalışmalarda genellikle bu iki değişken arasında anlamlı farklilik saptanmamıştır [52, 63, 65, 66, 69, 70, 74]. Ancak bu konuda farklı sonuçlar elde eden daha az sayıda çalışma da bulunmaktadır. Örneğin Liang ve ark. lenf nodu metastazının yaygınlığı ile tümör hücrelerindeki PD-L1 pozitifliği arasında korelasyon olduğunu göstermiştir [72]. Benzer şekilde Koganemaru ve ark. [68] ile Zhao ve ark. [73] da lenf nodu metastazı ile PD-L1 ekspresyonu arasında korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Bunların aksine Droeser ve ark. MMR kaybı olmayan KRK'lu hastalarda tümör PD-L1 pozitifliği ile lenf nodu metastazı yokluğunun korele olduğunu bulmuştur [61]. Bu çalışma diğerlerine göre geniş bir vaka serisinde uygulanmış olmakla birlikte bu anlamlı sonuç sadece MMR kaybı olmayan vakalar için bildirilmiştir [61]. Çalışmamızda da literatürün büyük kısmı ile uyumlu olarak pN evresi ile tümördeki PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki anlamlı bulunmamıştır. Patolojik lenf nodu

evrelemesinin immün sistem hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu ile ilişkisini değerlendiren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların tümünde immün sistem hücrelerindeki PD-L1 pozitifliği ile pN evresi ilişkisiz bulunmuştur [63, 68, 69]. Bizim çalışmamızda ise bu iki değişken istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir. PD-L1 pozitif grupta lenf nodu metastazı yokluğu oranı negatif gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Ayrıca PD-L1 pozitif grupta pN1 olma oranı PD-L1 negatif gruptan anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Ancak lojistik regresyon analizinde bu değişkenler arasındaki ilişki anlamını yitirmiştir.

Tümöre ait değişkenlerden biri olan histolojik diferansiyasyon derecesinin PD-L1 ekspresyonu ile ilişkisinin analizinde, bu değişkenler arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Literatürde bu bulguyu destekleyen çok sayıda çalışma mevcuttur [52, 63, 64, 66, 68, 69, 72-74]. Çalışmamızda da tümör hücre PD-L1 ekspresyonu ile histolojik diferansiyasyon derecesi arasında anlamlı ilişki olmadığı görülmüştür. Buna karşılık Inaguma ve ark [67] ile Rosenbaum ve ark. [70] tümör hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu ile kötü diferansiyasyon derecesini korele bulmuşlardır. Kim ve ark. [71] MSI-H KRK'larda tümör PD-L1 pozitifliğini yüksek histolojik diferansiyasyon ile korele bulurken Drosler ve ark. [61] MMR kaybı olmayan vakalarda tümör hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu ile düşük histolojik diferansiyasyon derecesi arasında anlamlı farklılık saptamıştır. Histolojik diferansiyasyon derecesi ile immün sistem hücrelerindeki PD-L1 pozitifliğini değerlendiren yayınlar [63, 66, 68, 69] ile uyumlu olarak çalışmamızda bu iki değişken arasındaki ilişki anlamlı bulunmamıştır.

Lenfovasküler invazyon ile PD-L1 ekspresyonunun ilişkisine bakıldığında literatürde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Liang ve ark. [72] artmış PD-L1 ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon ve metastaz arasında anlamlı farklılık olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde Kim ve ark. [71] MSI-H KRK'larda PD-L1 pozitifliği ile lenfovasküler invazyonu ilişkili bulmuştur. Ancak çalışmamızın bulgularına benzer şekilde bu iki değişken arasında anlamlı farklılık saptanmayan çalışmalar da mevcuttur [64, 70]. Literatürde immün sistem hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon ilişkisini değerlendiren tek çalışmaya ulaşılabilmektedir. Bu çalışmada Lee ve ark. [66] tümörü infiltre eden immün hücrelerin

PD-L1 ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon ilişkisini anlamlı bulmamıştır. Çalışmamızda ise tek değişkenli analizde PD-L1 pozitif grupta lenfovasküler invazyon oranı negatif gruptan anlamlı düzeyde düşük bulunmuş, ancak çok değişkenli analizde anlamlılığını yitirmiştir.

Perinöral invazyon KRK için kötü prognostik faktörlerdendir [36, 76, 77]. Literatürde sınırlı sayıda çalışmada KRK'larda PD-L1 ekspresyonunun perinöral invazyon ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmaların tümünde bu değişkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır [52, 66, 70]. Bizim çalışmamızda da tümör hücrelerindeki PD-L1 pozitifliği ile perinöral invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. İmmün sistem hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu ile perinöral invazyonu karşılaştıran Lee ve ark. [66] bu iki değişken arasındaki ilişkiyi anlamlı bulmamıştır. Benzer şekilde çalışmamızda da stromal immün sistem hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu ile perinöral invazyon arasında ilişki saptanmamıştır.

Kolorektal karsinomlar için bir başka prognostik faktör ise tümör sınırlarının konfigürasyonudur [21]. Literatürde tümör invazyon sınırı ile PD-L1 ekspresyonunu karşılaştıran çalışmalarda tümörün infiltratif ya da ekspansif sınıra sahip olması ile PD-L1 pozitifliği arasında ilişki bulunmamıştır [61, 66, 69, 70]. Bununla birlikte Kim ve ark. [71] tümör hücrelerinin PD-L1 pozitifliği ile infiltratif büyüme paterni arasında korelasyon olduğunu göstermiştir. Ancak bu çalışmada bu değişkenler sadece MSI-H KRK'lar için değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda bu parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ancak PD-L1 pozitif grupta ekspansif büyüme paterni oranının yüksek olması dikkat çekicidir. İmmün sistem hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu ile tümör büyüme paterni ilişkisini değerlendiren yayınlarda bizim bulgularımız ile paralel olarak bu iki değişken anlamlı istatistiksel farklılık göstermemektedir [66, 69, 71].

Tümör tomurcuklanmasının KRK'larda bağımsız prognostik gücü olduğu çok değişkenli analizlerde gösterilmiş ve standart patoloji değerlendirmesine girmiştir [21, 78, 79]. KRK'larda PD-L1 ekspresyonu ile tümör tomurcuklanması ilişkisini değerlendiren tek yayına ulaşılabilmıştır. Bu çalışmada Kim ve ark. [71] tümör hücrelerinin PD-L1 pozitifliğinin tümör tomurcuklanması ile korele olduğunu

göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise bu iki değişken arasında ilişki bulunmamıştır. Kim ve ark. [71] bu iki değişkeni sadece MSI-H tümörlerde değerlendirirken, bizim çalışmamızda MMR kaybı olan ve olmayan tüm vakalarda değerlendirilmiştir. Yine tümör tomurcuklanması ile immün hücre PD-L1 ekspresyonunun değerlendirilmesinde bizim çalışmamızın bulgularına benzer şekilde Kim ve ark. [71] bu değişkenler arasında anlamlı farklılık saptamamıştır.

Kolorektal kanserlerde PD-1/PD-L1 immün kontrol noktasını hedef alan immünoterapiye MSI tümörlerin MSS tümörlerden daha iyi yanıt vereceği ileri sürülmektedir [12, 80, 81]. Bu nedenle KRK'larda PD-L1 ekspresyonunu değerlendiren çalışmaların büyük kısmında MSI durumu ile PD-L1 pozitifliği arasındaki ilişki ele alınmıştır [52, 61, 65, 66, 69, 70]. Li ve ark. [52] tümör hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu ile mikrosatellit instabilite durumu arasında anlamlı farklılık saptamamıştır. Masugi ve ark. [69] ise PD-L1 pozitifliği ile MSI-H fenotip arasında ters ilişki bulmuştur. Buna karşılık Lee ve ark. [65] ile Rosenbaum ve ark. [70] bu iki değişkenin birbiri ile korele olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde PD-L1 pozitif tümör grubunda MMR kaybı oranı, negatif gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu bulgudan yola çıkarak MMR kaybı gösteren grupta PD-L1 pozitifliği açısından bir alt grup ayrımı yapabilir miyiz diye sorguladığımızda öncelikle bizim serimizdeki hasta sayısının ve buna paralel olarak MMR kaybı gösteren vaka sayısının da sınırlı olması bizi kesin bir sonuca ulaştırmak açısından kısıtlamıştır. Bu kısıtlılığı bilerek yine de bu gruba tümör evresi açısından baktığımızda PD-L1(+)/T olguların %75'i pT3 (3 olgu), %25'i pT2 (1 olgu) iken, PD-L1 negatif grupta olguların %60'ı pT3 ve pT4(6 olgu) , %40'ı ise pT2 (4 olgu) tümörlerdir. Görüldüğü üzere bu iki grupta patolojik tümör evresi dağılımı açısından belirgin farklılık gözlenmemiştir. Masugi ve ark. [69] ek olarak çalışmalarında stromal hücrelerde de PD-L1 pozitifliği değerlendirmiş ve mikrosatellit instabilite ile arasında anlamlı ilişki olmadığını göstermiştir. Bu bulgu bizim sonuçlarımıza paraleldir.

Tümörü infiltre eden lenfositler mikrosatellit instabilite düşündürülen morfolojik bulgulardan biri olup KRK'larda iyi prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmektedir [82, 83]. PD-L1 ekspresyonu ile TIL yoğunluğunu kıyaslayan

çalışmaların bir kısmında bu iki değişken arasında korelasyon saptanmıştır [52, 65, 70]. Bizim çalışmamızda tek değişkenli analizde elde edilen sonuçlar bu yayınlar ile uyumludur. Ancak çok değişkenli analizde bu değişkenler arasındaki ilişki anlamını yitirmekle birlikte anlamlılığa yakındır. Lee ve ark. [66] MSI-H KRK'larda PD-L1 pozitifliği ile yüksek CD3+ ve CD8+ TIL varlığı arasındaki ilişkiyi anlamlı bulurken, Droese ve ark. [61] MMR kaybı olmayan olgularda TIL yoğunluğu ile PD-L1 ekspresyonunu korele bulmuşlardır. Ayrıca Masugi ve ark. [69] tek değişkenli analizde TIL yoğunluğu ile PD-L1 ekspresyonu arasında ters ilişki saptamış ancak çok değişkenli analizde bu ilişkinin anlamlı olmadığını görmüşlerdir. Tümörü infiltrate eden immün sistem hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu ile TIL yoğunluğunu değerlendiren sınırlı sayıda çalışma mevcuttur [66, 68, 69]. Masugi ve ark. [69] çalışmalarında bu iki değişken arasında anlamlı ilişki olmadığını ileri sürmüştür. Lee ve ark. [66] ise MSI-H KRK'larda immün hücre PD-L1 pozitifliği ile CD3+ ve CD8+ T hücre infiltrasyonunun korele olduğunu göstermiştir. Koganemaru ve ark. [68] ise immün hücre PD-L1 pozitifliğinin CD8+ T hücre infiltrasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda tek değişkenli analizde benzer şekilde TIL varlığı ile immün sistem PD-L1 pozitifliği arasında anlamlı istatistiksel farklılık olduğu görülmüş ancak lojistik regresyon analizinde bu ilişki anlamlılığını kaybetmiştir.

Mikrosatellit instabilite düşündüren morfolojik bulgulardan bir diğeri Crohn benzeri reaksiyondur. Çalışmamızda hem tümör hücre hem de immün hücre PD-L1 pozitif grupta Crohn benzeri reaksiyon varlığı oranı negatif gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Literatürde benzer çalışmalardan birinde Masugi ve ark. [69] bu değişkenler arasında anlamlı istatistiksel farklılık bulmamıştır. Lee ve ark. [65] ise çalışmamızın bulgularına benzer şekilde tümör hücrelerinin PD-L1 pozitifliği ile peritümöral lenfoid agregat skoru arasındaki ilişkinin anlamlı olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda müsinöz tümör komponenti varlığı ile tümör hücre PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmamıştır. Literatürde benzer sonuç elde eden çalışmalar mevcuttur [65, 67, 70]. Bununla birlikte diğer çalışmalarda tümör PD-L1 pozitifliğinin müsinöz komponentin yokluğu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [66, 69, 71].

Yapılan birçok çalışmada KRK'larda tümör hücre PD-L1 ekspresyonunun sağkalımı olumsuz yönde etkilediği bildirilmektedir [64, 65, 68, 70, 72].

Çalışmamızda yakın tarihli vakaların seçilmesi nedeniyle tümör hücreleri ve immün hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonunun sağkalıma etkisi değerlendirilememiştir. Ancak prognoz ile ilişkili olabilecek diğer bulgulardan MSI durumu dışında, diğer prognostik faktörler ile tümör hücre PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Tümör hücre PD-L1 ekspresyonunun MMR kaybı ve bu kaybı düşündürecek histopatolojik bulgulardan Crohn benzeri reaksiyon ile korele olduğu gösterilmiştir. Bu durum literatürün önemli bir kısmı ile uyumludur.

İmmün sistem hücrelerinin PD-L1 ekspresyonunun KRK prognozuna etkisini değerlendiren çalışmaların bir kısmında PD-L1 pozitifliğinin sağkalıma etkisi olmadığı görülmüştür [63, 69]. Bununla birlikte Lee ve ark. [66] hem MSI-H hem de MSS KRK'larda immün hücre PD-L1 pozitifliğini iyi prognozla ilişkili bulmuştur. Koganemaru ve ark. [68] tek değişkenli analizde immün hücre PD-L1 ekspresyonu ile hastalıksız sağkalım ilişkisinin anlamlı olduğunu, ancak çok değişkenli analizde bu anlamı yitirdiğini göstermiştir. Kim ve ark. [71] ise MSI-H KRK'larda immün hücre PD-L1 pozitifliğinin daha iyi sağkalımla ilişkili olmaya eğilimli olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptamamıştır. Çalışmamızda immün hücre PD-L1 pozitifliğinin sağkalıma etkisi değerlendirilememiş olmakla birlikte; prognostik faktörlerden biri olan düşük tümör evresi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bu durum literatürde immün hücre PD-L1 pozitifliğinin iyi prognoz ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir. Ancak bu tümörlerde cerrahi rezeksiyon ile kür sağlanabilmekte, ek bir tedaviye ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu nedenle immün hücre PD-L1 ekspresyonunun immünoterapi kararı için belirleyici özellikte olmayacağı düşünülmüştür.

Literatürde anti-PD-1 tedavinin ileri evre küçük hücreli dışı akciğer karsinomu, malign melanom, renal hücreli karsinom gibi malignitelerde etkili olduğu ve tedaviye yanıtının PD-L1 pozitifliği gösteren vakalarda yoğunlaştığı bildirilmektedir [10]. İleri evre KRK'ların ise bu tedavilere büyük oranda yanıt vermediği gösterilmiştir [10, 11]. İmmünoterapi verilen vakalara bakıldığında yanıtın MSI-H fenotip gösteren olgularda MSS fenotipli olgulara göre daha yüksek olduğu

gözlenmiştir [12]. Bu durum, MSI-H grup hastalarda PD-L1 pozitifliğinin MSS gruba oranla daha fazla görüldüğünü bildiren çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir. Tüm bu literatür bilgileri, KRK'larda PD-1/PD-L1 yolağını hedef alan immünoterapinin sporadik tümörlerden ziyade PD-L1 ekspresyonu gösteren Lynch sendromlu hastalarda kullanılabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda da KRK'larda tümör hücrelerinin PD-L1 ekspresyonu literatürün önemli bir kısmı ile uyumlu olarak MMR kaybı ile korele bulunmuştur.

Sonuç olarak, vaka sayısının azlığı, bununla paralel olarak MMR kaybı gösteren hasta grubunun az sayıda olması, uzun dönem takip sonuçlarının olmaması, olguların her evre için beklenen homojeniteyi göstermesi ve bu nedenle ileri evre olgular açısından sınırlı sayıda kalması çalışmamızın kısıtlılıkları olarak sıralanabilir. Bundan sonraki süreçte MMR kaybı olan hasta grubu sayısını artırarak, her ne kadar bu çalışmada tümör evresi açısından anlamlı bir fark yaratılarak alt grup oluşturulamamışsa da, PD-L1 pozitifliği/negatifliği açısından bir alt grup yaratılıp yaratılamayacağını araştırmak amaçlanmaktadır. Böylelikle belki de PD-L1 pozitif MMR kaybı gösteren olgularda tedaviye yanıt açısından farklılık yaratabilecek bir alt grup oluşturulabilir.

6. SONUÇLAR

- 1- Çalışmamızda 144 olguda tümör hücreleri ve stromal immün sistem hücrelerinde immünohistokimyasal olarak PD-L1 ekspresyonu değerlendirilmiş olup, olguların %6,9'unda tümör hücrelerinde, %65,3'ünde immün sistem hücrelerinde PD-L1 pozitifliği saptanmıştır.
- 2- Yaş ve cinsiyet dağılımlarına göre tümör hücrelerinin ve immün hücrelerin PD-L1 pozitif/negatif grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).
- 3- Tümör hücrelerinin PD-L1 pozitifliği ile tümör lokalizasyonu, histolojik grade, tümör büyüme paterni, tümör tomurcuklanması, pT ve pN evreleri, lenfovasküler ve perinöral invazyon arasında ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).
- 4- Tümör hücre PD-L1 pozitif grupta CBR varlığı ve immünohistokimyasal MMR kaybı oranı, negatif gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,01$).
- 5- Tümörü infiltre eden lenfositlerin varlığı ile tümör hücre PD-L1 ekspresyonu tek değişkenli analizde istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p<0,05$). PD-L1 pozitif olgularda TIL varlığı da yüksek bulunmuştur. Ancak bu değer çok değişkenli analizde anlamını yitirmiştir.
- 6- Müsinöz komponent ve yüksek histolojik grade ile tümör PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).
- 7- Stromal hücre PD-L1 pozitifliğine göre tümör lokalizasyonu istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermezken; pozitif grupta sağ kolon oranının negatif gruptan daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,075$; $p>0,05$).
- 8- Stromal immün hücre PD-L1 pozitifliği (PD-L1 (+) İ) ile histolojik grade, tümör büyüme paterni, tümör tomurcuklanması, perinöral invazyon ve immünohistokimyasal MMR kaybı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).
- 9- İmmün hücre PD-L1 pozitif grupta düşük tümör evresi negatif gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

10- Tek değişkenli analizde stromal immün hücre PD-L1 pozitif grupta pN0 olma oranı negatif gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,01$). Ayrıca pozitif grupta pN1 olma oranı ise negatif gruptan anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p<0,01$). Ancak çok değişkenli analizde bu değişkenler arasında ilişki olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

11- Stromal immün sistem hücre PD-L1 pozitif grupta tek değişkenli analizde lenfovasküler invazyon oranı negatif gruptan anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak çok değişkenli analizde bu iki değişken arasında ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

12- Tek değişkenli analizde CBR ve TIL varlığı oranı PD-L1 (+) İ grupta PD-L1 (-) İ gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuş ($p<0,05$) ancak bu değer çok değişkenli analizde anlamını yitirmiştir ($p>0,05$).

13- Müsinöz komponent ve yüksek histolojik grade ile stromal hücre PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015; 136(5): p. E359-86.
2. Şencan İ, Keskinçilic B, Editörler. Türkiye kanser istatistikleri. 2017: Ankara.
3. Torre L A, Bray F, Siegel R L, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, and Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015; 65(2): p. 87-108.
4. Siegel R, Desantis C, and Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 2014; 64(2): p. 104-17.
5. Jacobs J, Smits E, Lardon F, Pauwels P, and Deschoolmeester V. Immune Checkpoint Modulation in Colorectal Cancer: What's New and What to Expect. *J Immunol Res*, 2015; 2015: p. 158038.
6. Markman J L and Shiao S L. Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*, 2015; 6(2): p. 208-23.
7. Chen T T. Milestone Survival: A Potential Intermediate Endpoint for Immune Checkpoint Inhibitors. *J Natl Cancer Inst*, 2015; 107(9).
8. Pardoll D M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2012; 12(4): p. 252-64.
9. Li X, Hu W, Zheng X, Zhang C, Du P, Zheng Z, et al. Emerging immune checkpoints for cancer therapy. *Acta Oncol*, 2015; 54(10): p. 1706-13.
10. Topalian S L, Hodi F S, Brahmer J R, Gettinger S N, Smith D C, McDermott D F, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 2012; 366(26): p. 2443-54.
11. Brahmer J R, Tykodi S S, Chow L Q, Hwu W J, Topalian S L, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*, 2012; 366(26): p. 2455-65.
12. Le D T, Uram J N, Wang H, Bartlett B R, Kemberling H, Eyring A D, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*, 2015; 372: p. 2509-20.
13. Bosman FT C F, Hruban RH, Theise ND. WHO Classification Of Tumours Of The Digestive System. 4 ed. 2010.
14. Van Der Kraak L, Gros P, and Beauchemin N. Colitis-associated colon cancer: Is it in your genes? *World J Gastroenterol*, 2015; 21(41): p. 11688-99.
15. Eaden J A, Abrams K R, and Mayberry J F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, 2001; 48(4): p. 526-35.
16. Canavan C, Abrams K R, and Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006; 23(8): p. 1097-104.
17. Aaltonen L, Johns L, Jarvinen H, Mecklin J P, and Houlston R. Explaining the familial colorectal cancer risk associated with mismatch repair (MMR)-deficient and MMR-stable tumors. *Clin Cancer Res*, 2007; 13(1): p. 356-61.

18. Kennelly R P, Gryfe R, and Winter D C. Familial colorectal cancer: Patient assessment, surveillance and surgical management. *Eur J Surg Oncol*, 2017; 43(2): p. 294-302.
19. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, and Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012; 27(9): p. 1423-31.
20. Power D G, Glogowski E, and Lipkin S M. Clinical genetics of hereditary colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2010; 24(5): p. 837-59.
21. Odze R G, JR. Epithelial Neoplasms of the Large Intestine. in *Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas*. 2015. p. 737-778.
22. Seth R, Crook S, Ibrahim S, Fadhil W, Jackson D, and Ilyas M. Concomitant mutations and splice variants in KRAS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signalling pathway in advanced colorectal cancer. *Gut*, 2009; 58(9): p. 1234-41.
23. Ogino S, Nosho K, Kirkner G J, Shima K, Irahara N, Kure S, et al. PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. *J Clin Oncol*, 2009; 27(9): p. 1477-84.
24. Pino M S and Chung D C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 2010; 138(6): p. 2059-72.
25. Sinicrope F A and Sargent D J. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*, 2012; 18(6): p. 1506-12.
26. Richman S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Int J Oncol*, 2015; 47(4): p. 1189-202.
27. Snover D C. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol*, 2011; 42(1): p. 1-10.
28. Alexander J, Watanabe T, Wu T T, Rashid A, Li S, and Hamilton S R. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol*, 2001; 158(2): p. 527-35.
29. McGivern A, Wynter C V, Whitehall V L, Kambara T, Spring K J, Walsh M D, et al. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer*, 2004; 3(2): p. 101-7.
30. Bae J M, Kim J H, Cho N Y, Kim T Y, and Kang G H. Prognostic implication of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancers depends on tumour location. *Br J Cancer*, 2013; 109(4): p. 1004-12.
31. Ogino S, Nosho K, Kirkner G J, Kawasaki T, Meyerhardt J A, Loda M, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut*, 2009; 58(1): p. 90-6.
32. Phipps A I, Limburg P J, Baron J A, Burnett-Hartman A N, Weisenberger D J, Laird P W, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology*, 2015; 148(1): p. 77-87 e2.
33. Jass J R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 2007; 50(1): p. 113-30.

34. Turner J R. The Gastrointestinal Tract. in Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, A.A. Kumar V, Fausto N, Editor. 2015, Saunders Press Philadelphia p. 749-819.
35. Cooper H S. Intestinal Neoplasms. in Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, S.E. Mills, Editor. 2015, Wolters Kluwer Health. p. 1505-1576.
36. Washington M K. Colorectal carcinoma: selected issues in pathologic examination and staging and determination of prognostic factors. *Arch Pathol Lab Med*, 2008; 132(10): p. 1600-7.
37. Hyngstrom J R, Hu C Y, Xing Y, You Y N, Feig B W, Skibber J M, et al. Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: analysis from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol*, 2012; 19(9): p. 2814-21.
38. Adam I J, Mohamdee M O, Martin I G, Scott N, Finan P J, Johnston D, et al. Role of circumferential margin involvement in the local recurrence of rectal cancer. *Lancet*, 1994; 344(8924): p. 707-11.
39. Schreiber R D, Old L J, and Smyth M J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 2011; 331(6024): p. 1565-70.
40. Swann J B and Smyth M J. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*, 2007; 117(5): p. 1137-46.
41. Dunn G P, Old L J, and Schreiber R D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*, 2004; 22: p. 329-60.
42. Dunn G P, Bruce A T, Ikeda H, Old L J, and Schreiber R D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 2002; 3(11): p. 991-8.
43. Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996; 86(3): p. 353-64.
44. Dunn G P, Old L J, and Schreiber R D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 2004; 21(2): p. 137-48.
45. Neoplasia. in Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, A.A. Kumar V, Fausto N, Editor. 2015, Saunders Press: Philadelphia. p. 265-340.
46. Garcia-Tejido P, Cabal M L, Fernandez I P, and Perez Y F. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple Negative Breast Cancer: The Future of Immune Targeting. *Clin Med Insights Oncol*, 2016; 10(Suppl 1): p. 31-9.
47. Singh P P, Sharma P K, Krishnan G, and Lockhart A C. Immune checkpoints and immunotherapy for colorectal cancer. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 2015; 3(4): p. 289-97.
48. Chen J, Jiang C C, Jin L, and Zhang X D. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann Oncol*, 2016; 27(3): p. 409-16.
49. Postow M A, Callahan M K, and Wolchok J D. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*, 2015; 33(17): p. 1974-82.
50. Folk A and Bienzle D. Structure and function of programmed death (PD) molecules. *Vet Immunol Immunopathol*, 2010; 134(1-2): p. 33-8.
51. Dyck L and Mills K H G. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol*, 2017; 47(5): p. 765-779.

52. Li Y, Liang L, Dai W, Cai G, Xu Y, Li X, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Mol Cancer*, 2016; 15(1): p. 55.
53. Toh J W, de Souza P, Lim S H, Singh P, Chua W, Ng W, et al. The Potential Value of Immunotherapy in Colorectal Cancers: Review of the Evidence for Programmed Death-1 Inhibitor Therapy. *Clin Colorectal Cancer*, 2016; 15(4): p. 285-291.
54. Deschoolmeester V, Smits E, Peeters M, and Vermorken J B. Status of Active Specific Immunotherapy for Stage II, Stage III, and Resected Stage IV Colon Cancer. *Current Colorectal Cancer Reports*, 2013; 9(4): p. 380-390.
55. Gallagher D J and Kemeny N. Metastatic colorectal cancer: from improved survival to potential cure. *Oncology*, 2010; 78(3-4): p. 237-48.
56. Luke J J and Ott P A. PD-1 pathway inhibitors: the next generation of immunotherapy for advanced melanoma. *Oncotarget*, 2015; 6(6): p. 3479-92.
57. Kroemer G, Galluzzi L, Zitvogel L, and Fridman W H. Colorectal cancer: the first neoplasia found to be under immunosurveillance and the last one to respond to immunotherapy? *Oncoimmunology*, 2015; 4(7): p. e1058597.
58. Llosa N J, Cruise M, Tam A, Wicks E C, Hechenbleikner E M, Taube J M, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov*, 2015; 5(1): p. 43-51.
59. Wu P, Wu D, Li L, Chai Y, and Huang J. PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 2015; 10(6): p. e0131403.
60. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*, 2010; 116(7): p. 1757-66.
61. Droeser R A, Hirt C, Viehl C T, Frey D M, Nebiker C, Huber X, et al. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 2013; 49(9): p. 2233-42.
62. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007; 104(9): p. 3360-5.
63. Wang L, Ren F, Wang Q, Baldrige L A, Monn M F, Fisher K W, et al. Significance of Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Immunohistochemical Expression in Colorectal Cancer. *Mol Diagn Ther*, 2016; 20(2): p. 175-81.
64. Zhu H, Qin H, Huang Z, Li S, Zhu X, He J, et al. Clinical significance of programmed death ligand-1 (PD-L1) in colorectal serrated adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015; 8(8): p. 9351-9.
65. Lee L H, Cavalcanti M S, Segal N H, Hechtman J F, Weiser M R, Smith J J, et al. Patterns and prognostic relevance of PD-1 and PD-L1 expression in colorectal carcinoma. *Mod Pathol*, 2016; 29(11): p. 1433-1442.
66. Lee K S, Kwak Y, Ahn S, Shin E, Oh H K, Kim D W, et al. Prognostic implication of CD274 (PD-L1) protein expression in tumor-infiltrating immune cells for microsatellite unstable and stable colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 2017.

67. Inaguma S, Lasota J, Wang Z, Felisiak-Golabek A, Ikeda H, and Miettinen M. Clinicopathologic profile, immunophenotype, and genotype of CD274 (PD-L1)-positive colorectal carcinomas. *Mod Pathol*, 2017; 30(2): p. 278-285.
68. Koganemaru S, Inoshita N, Miura Y, Miyama Y, Fukui Y, Ozaki Y, et al. Prognostic value of programmed death-ligand 1 expression in patients with stage III colorectal cancer. *Cancer Sci*, 2017; 108(5): p. 853-858.
69. Masugi Y, Nishihara R, Yang J, Mima K, da Silva A, Shi Y, et al. Tumour CD274 (PD-L1) expression and T cells in colorectal cancer. *Gut*, 2016.
70. Rosenbaum M W, Bledsoe J R, Morales-Oyarvide V, Huynh T G, and Mino-Kenudson M. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. *Mod Pathol*, 2016; 29(9): p. 1104-12.
71. Kim J H, Park H E, Cho N Y, Lee H S, and Kang G H. Characterisation of PD-L1-positive subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Br J Cancer*, 2016; 115(4): p. 490-6.
72. Liang M, Li J, Wang D, Li S, Sun Y, Sun T, et al. T-cell infiltration and expressions of T lymphocyte co-inhibitory B7-H1 and B7-H4 molecules among colorectal cancer patients in northeast China's Heilongjiang province. *Tumour Biol*, 2014; 35(1): p. 55-60.
73. Zhao L W, Li C, Zhang R L, Xue H G, Zhang F X, Zhang F, et al. B7-H1 and B7-H4 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumor FOXP3(+) regulatory T-cell infiltration. *Acta Histochem*, 2014; 116(7): p. 1163-8.
74. Zhu J, Chen L, Zou L, Yang P, Wu R, Mao Y, et al. MiR-20b, -21, and -130b inhibit PTEN expression resulting in B7-H1 over-expression in advanced colorectal cancer. *Hum Immunol*, 2014; 75(4): p. 348-53.
75. Türkoğlu A. Prognostic factors in colorectal cancers. *Dicle Medical Journal*, 2014; 41(4): p. 724-731.
76. Zhou Y, Wang H, Gong H, Cao M, Zhang G, and Wang Y. Clinical significance of perineural invasion in stages II and III colorectal cancer. *Pathol Res Pract*, 2015; 211(11): p. 839-44.
77. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2009; 27(31): p. 5131-7.
78. Lai Mun Wang D K, Hugh Mulcahy, Jacintha O'Sullivan, David Fennelly, John Hyland, Diarmuid O'Donoghue, Kieran Sheahan. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*, 2009; 33: p. 134-141.
79. Mitrovic B, Schaeffer D F, Riddell R H, and Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol*, 2012; 25(10): p. 1315-25.
80. Llosa N J, Cruise M, Tam A, Wicks E C, Hechenbleikner E M, Taube J M, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discovery*, 2015; 5: p. 43-51.
81. Xiao Y and Freeman G J. The Microsatellite Instable Subset of Colorectal Cancer Is a Particularly Good Candidate for Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Cancer Discovery*, 2015; 5(1): p. 16-18.

82. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 2006; 313(5795): p. 1960-4.
83. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol*, 2011; 29(6): p. 610-8.

