

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

**Yasemin Çakır
DEÜTF Tıbbi Patoloji**

Amaç/Hipotez

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

Tablo 1: Kolorektal Kanser Kök Hücre Belirteçleri

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

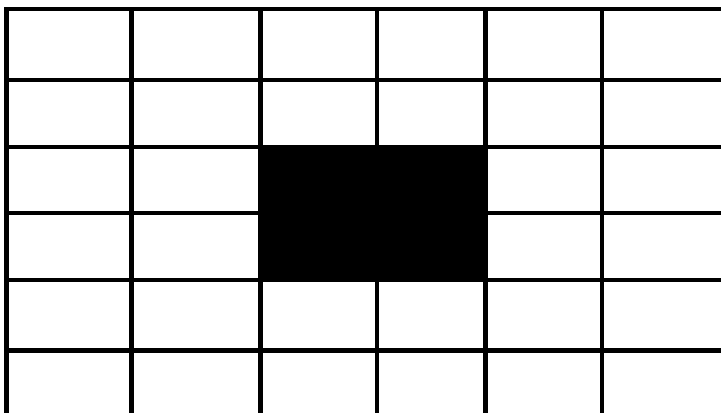
Kısaltmalar: ALCAM, activated leukocyte cell adhesion molecule; ALDH-1, aldehyde dehydrogenase-1; APC, adenomatous polyposis coli; Bmi-1, B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; Lgr-5, leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5; Msi-1,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

Entropi, Karmaşıklık ve Oran Kavramları

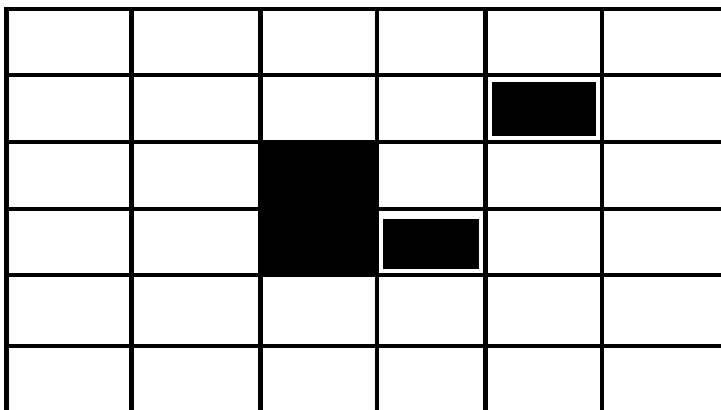
Entropi

- ✓ Evrendeki düzensizliğin, belirsizliğin, bilgi eksikliğinin ve kullanılmaz hale gelmiş enerjinin bir ölçüsü olarak tanımlanmaktadır.
- ✓ Entropi, aynı zamanda moleküler düzensizlik veya moleküler rastgeleliğin bir ölçüsü olarak da ifade edilmektedir.
- ✓ Karsinogenez sırasında, genomik mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler sonucu, rastgeleliğin arttığı ve nükleustaki uzaysal entropinin yükselerek bilgi içeriğinin azaldığı belirtilmektedir. Bu nedenle tümör malignitesinde artışla birlikte nükleer kromatin entropisinde de artış olacağı beklenmektedir

Examples on binary grid: Black pixels represent value 1 and whites represent value 0.



Entropy = 1.1550



Entropy = 1.1966

Oran

Oran öznitelikleri, belli bir görüntü alanı içerisindeki tümör (T_m), stroma (St) veya lümen (L_m) olarak işaretlenmiş piksellerin frekans oranlarından elde edilen öznitelikler olarak tanımlanır.

Bu öznitelik değeri, incelenen bir vakaya ait toplam T_m pikselleri sayısının, toplam St piksel sayısına bölünmesi ile elde edilir.

Karmaşıklık

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

Bu çalışmada T_m , St ve L_m pikselleri arasındaki geçiş sayıları karmaşıklık öznitelikleri kullanılmıştır.

GEREÇ-YÖNTEM

- Çalışmaya 2005-2011 yılları arasında DEÜTF'de radikal cerrahi tedavi uygulanan ve kolon adenokarsinomu tanısı alan, neoadjuvan tedavi almamış 248 hasta dahil edildi.
- Demografik ve patolojik verilere patoloji raporlarından, klinik bilgilere Genel Cerrahi Anabilim Dalı'na ait verilerden ulaşıldı.

İmmünohistokimyasal Boyama ve Değerlendirme

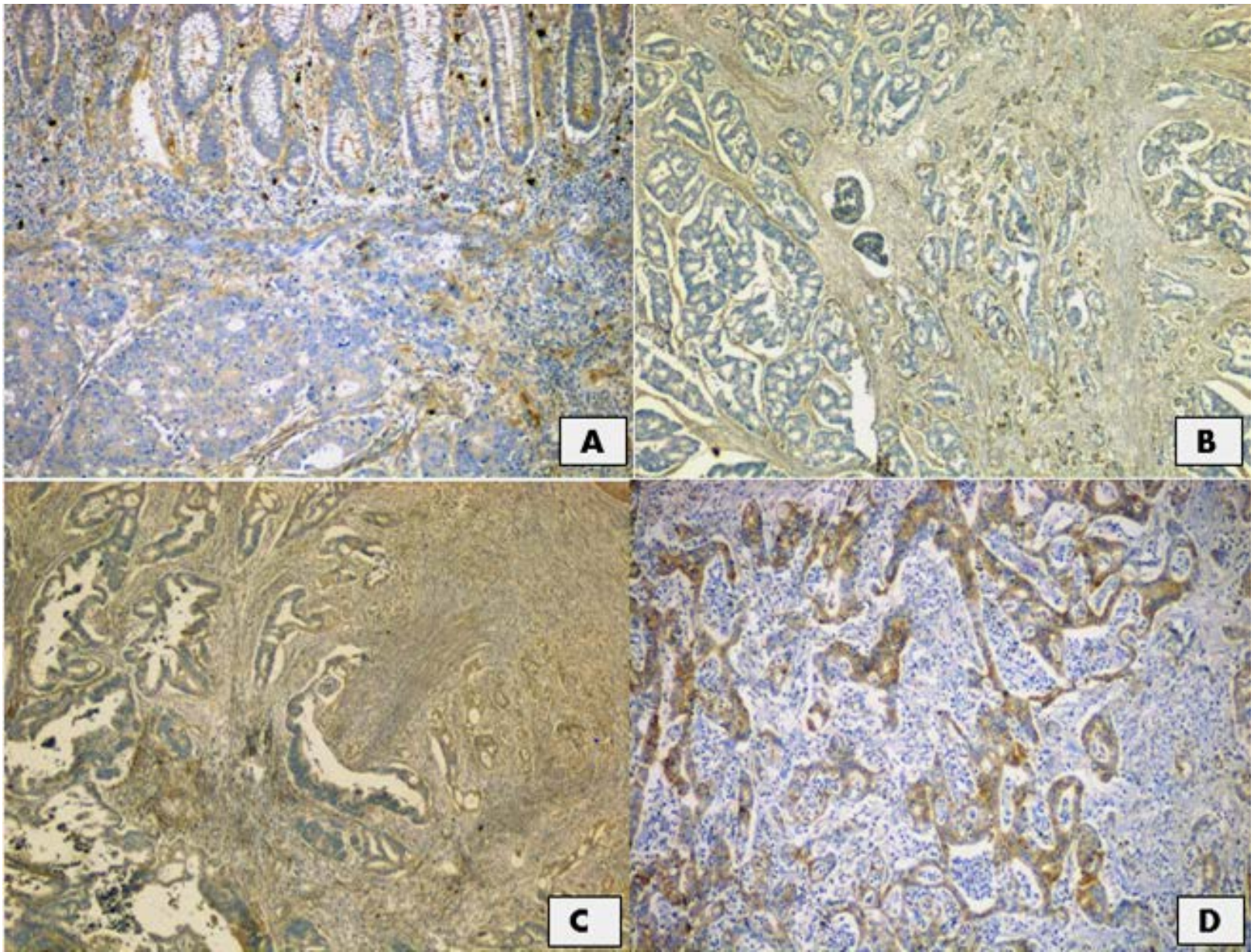
- ✓ CD133 ve Lgr5 ile immünohistokimyasal boyama gerçekleştirildi.
- ✓ **Pozitif internal kontrol** olarak neoplastik olmayan komşu kolon mukozası kullanıldı.
- ✓ Ekspresyon, **tüm tümör alanındaki** hücreler dikkate alınarak incelendi.
- ✓ CD133 ve Lgr5'in ekspresyonları **semikantitatif** olarak değerlendirildi.
- ✓ %5 ve üzeri hücre boyanması (**Lgr5 ile sitoplamik, CD133 ile apikal membranöz**) pozitif olarak değerlendirildi.
- ✓ Pozitif boyanma yaygınlığı göre;
 - ✓ %5 hücrede boyanma..... 1+
 - ✓ %5- 50 hücrede boyanma..... 2+
 - ✓ %50'den fazla hücrede boyanma..... 3+

* Choi, D., et al., Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. World J Gastroenterol, 2009. 15(18): p. 2258-64.

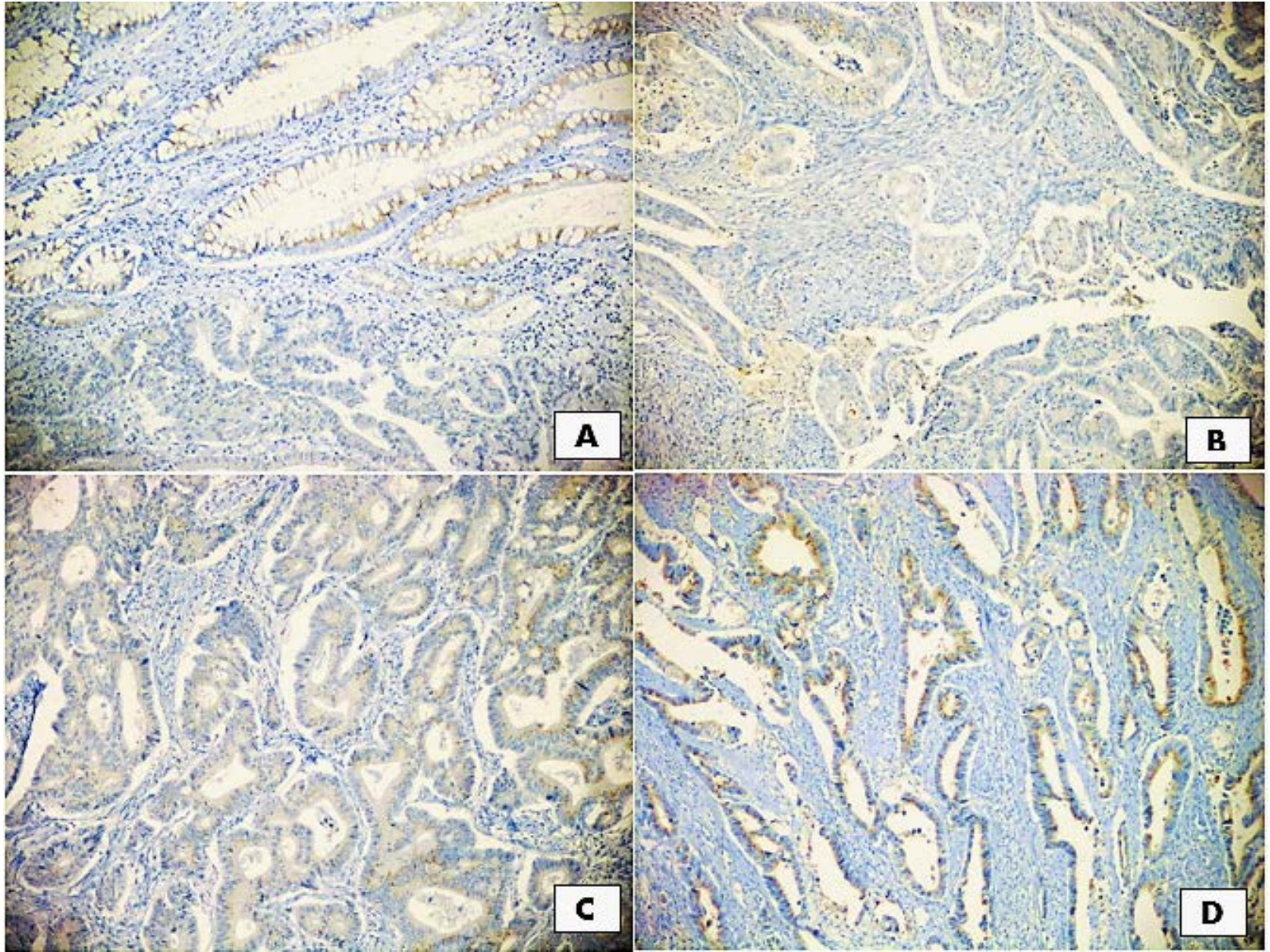
* Horst, D., et al., CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. Br J Cancer, 2008. 99(8): p. 1285-9

* Fan, X.S., et al., Expression of Lgr5 in human colorectal carcinogenesis and its potential correlation with beta-catenin. Int J Colorectal Dis, 2010. 25(5): p. 583-90.

* Kleist, B., et al., Expression of the adult intestinal stem cell marker Lgr5 in the metastatic cascade of colorectal cancer. Int J Clin Exp Pathol, 2011. 4(4): p. 327-35.



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



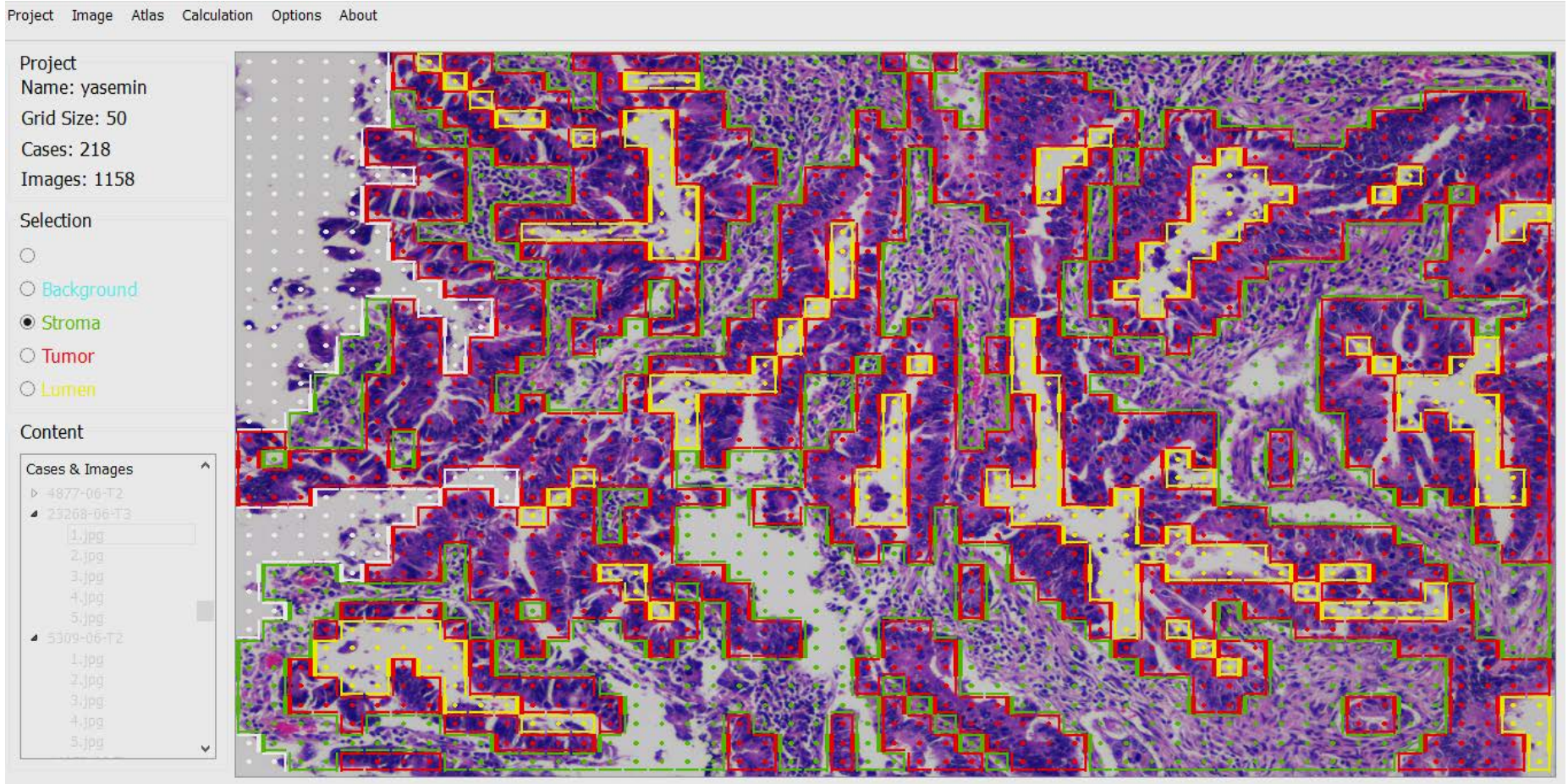
Resim 1: Farklı yaygınlıkta apikal sitoplazmik Lgr5 ekspresyonu
(A: pozitif kontrol ve negatif boyanma, B: skor 1, C: skor 2, D: skor 3)

Görüntü Analizi Yöntemi-1

- Hastalara ait hematoksilen eozin boyalı preparatlardan **tümörün en derin invazyon alanını** temsil eden ve tercihen normal mukozayı da içeren preparatlar seçildi.
- Bu preparatlardan, ışık mikroskobuna (Nicon Eclips Ci-L) bağlı video kamera (Nicon DS-Fi2) ile **X20'lik büyütmede, tümörü yüzeyden derine doğru tam kat yansıtacak şekilde çoklu** (3-10 adet, ortalama $5,35 \pm 1,32$ görüntü) dijital fotoğraflar elde edildi.
- Toplam 1327 fotoğraf, bilgisayar ortamında, bu araştırma kapsamında geliştirilmiş olan **Arachne (Netform Mühendislik, <http://www.netformvision.com/arachne.asp>)** yazılım aracı kullanılarak incelendi.

Görüntü Analizi Yöntemi-2

- Bu incelemede her bir vakaya ait histopatolojik görüntüler, istenilen boyutlarda piksellere ayrılabilme olanağı sağlayan bu yazılım aracı kullanılarak **400 μm^2 'lik** alanlara ayrıldı.
- Pikselleme sonrası, bilgisayar faresinde sol/sağ tıklama ile her bir noktanın üzerinde yer aldığı farklı görüntü elemanına (Tümör (Tm), stroma (St), lümen (Lm)) göre **noktalar farklı renklerle** kodlandı.
- Tümör çevresinde **retraksiyonuna bağlı oluşan boşluklar** “stroma” olarak, **tümör nekrozu alanları** “tümör” ve gland **lümenlerine, dökülen nekrotik tümör hücreleri** “lümen” olarak kabul edildi.
- Toplamda her olguda **ortalama 3,95 mm^2 (2,22-7,7 mm^2)** tümör alanı kodlandı.



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

Görüntü Analizi Değerlendirilmesi

Kodlanmış görüntü elemanları, bir tamsayı olan iki boyutlu görüntüler olup bu bilgi dışında herhangi bir gri seviye veya renkli görüntü bilgisi kullanılmadı.

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

Karmaşıklık özneliği; T_m , St ve L_m pikselleri arasındaki geçiş sayıları kullanıldı.

Entropi

Hərhangi bir D pikseller arası məsafə və θ pikseller arası açı üçün, bir I görüntüsünün B görüntü ilgi alanı içərisində C eş-oluşum matrisi hesablandı (Formül 1);

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

Eş-oluşum matrisləri əldə edildikdən sonra, sözkonusu matris element dəyərləri istifadə edilərək o görüntü ilgi alanına aid entropi dəyəri hesablandı (Formül 2);

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

Hastalara ait öznitelikler hesaplanırken farklı kümelemeler kullanıldı.

Bunlar;

Hasta bazında kümeleme: Herhangi bir hastaya ait bütün görüntülerin toplamından elde edilen değerlerle öznitelikler hesaplandı.

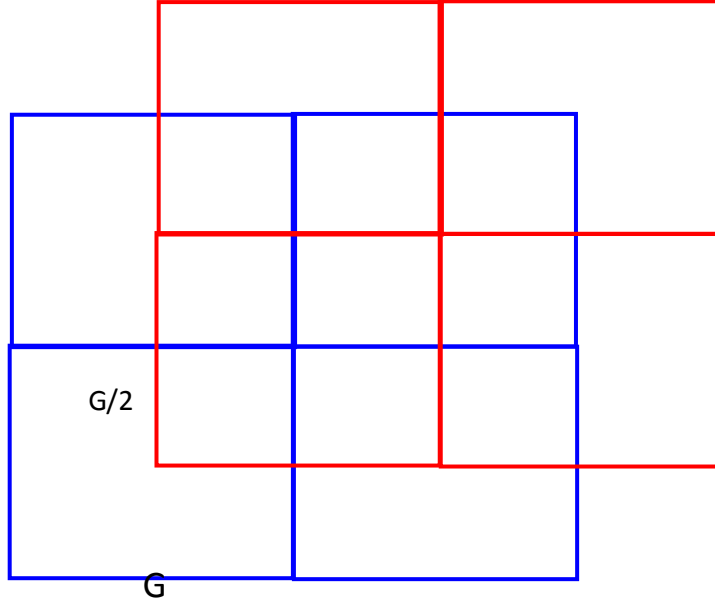
Hasta görüntüleri bazında kümeleme: Herhangi bir hastayı oluşturan her bir görüntüden tek tek elde edilen özniteliklerin oluşturduğu dizinden istatistik ifadeler hesaplandı.

Bu istatistik ifadeler; ortalama, varyans, en küçük ve en büyük'tür. Bu yaklaşımda her bir hasta görüntüsüne karşılık gelen özniteliklerle bir sayı dizini oluşturuldu.

Alt görüntüler bazında kümeleme:

- Bu yaklaşımda da her bir hastaya karşılık gelen öznitelikler bir sayı dizisidir.
- Bir hastayı oluşturan **her bir görüntünün içindeki, farklı piksel kenar uzunluğundaki kare bölgelerde** hesaplamalar yapıldı.
- Bu çalışmada G değişkeni kare kenar uzunluğuna karşılık gelmektedir.
- Hesaplama yapılan her bir kare bölge $G/2$ kadar kaydırılarak bir sonraki bölge elde edildi (Şekil 1)

İnvaziv kenar bazında kümeleme: Bir hastaya tümörün **en invaziv olduğu ve son görüntünün temsil ettiği** invaziv kenar görüntüsünden öznitelikler hesaplandı.



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

Verilerin Değerlendirilmesi

- Veriler SPSS 15.0 paket programı ile değerlendirildi.
- Gruplar arasında klinik, patolojik ve hesaplanabilir değişkenler yönünden farkın önemliliği **Ki-kare** ve **Mann-Whitney** testleri ile değerlendirildi.
- Gruplar arasında belirteçlerin boyanma yaygınlığı yönünden farkın önemliliği bağımsız grup sayısı iki olduğunda **Mann Whitney U** testi, ikiden fazla olduğunda ise **Kruskal Wallis** testiyle değerlendirildi.
- Bağımsız risk faktörlerini belirlemek amacıyla **Logistic ve Cox regresyon** analizleri uygulandı.
- Belirteçlerin birbiriyle ve diğer parametrelerle korelasyonu **Sperman'ın Korelasyon testiyle** araştırıldı.
- Belirteçlerin hastaların sağkalımları ile karşılaştırılması **Kaplan–Meier** yöntemi ile değerlendirilmiştir.
- $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

- Çalışmaya dahil edilen 248 hastanın, 148'i erkek (%59,7) ve 100'ü kadın (%40.3)'dir. Hastaların yaş aralığı 29-89, ortalamaları 65,9'dur.
- ✓ 163'ü (%65,7) yaşayan, 85'i (%34,3) ölen hastaların;
 - ✓ Lokal nüks..... 2'sinde (%5) hastada +
 - ✓ Uzak nüks..... 41'inde (%16,5) hastada +
 - ✓ Uzak metastaz..... 68'inde (%27,4) hastada +
- ✓ Adjuvan tedavi..... 185 (%74,6) hastada +, 63 (%25,4) -

- ✓ İHK'sel belirteçlerde skora göre oluşturulan alt gruplar arasında, genel sağkalım, nüks ve metastaz gelişimi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.
- ✓ CD133 ve Lgr5 kök hücre belirteçleri arasında korelasyon saptanmadı.

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

Kaplan Meier yaşam analizinde;

- Hastaların klinik takip sürelerinin 1 ay - 87 ay
- Ortalama takip süresinin $35,7 \pm 22,78$ ay
- Yaşayan ve ölen hastaların tümünün sağkalım analizine göre tahmini yaşam süreleri ortalama 60,89 ay (CI: 56,16-65,56)

➤ **Elde edilen analiz sonuçları incelendiğinde;**

- istatistiksel anlamlı sonuçların birçoğunun, oluşturulan 8x8 ve 16x16'lık **alt görüntülerden** elde edildiği görülmüştür.
- Ayrıca **invaziv kenarda** yapılan değerlendirmelerde de önemli miktarda anlamlılık saptanmıştır.
- Oran özniteliği sonuçları, **tümör miktarındaki artışın ölüm, nüks ve metastaz gelişimi ile anlamlı ilişkili** olduğunu göstermiştir.

➤ **Ölüm riskinin;**

- 8x8'lik alt görüntülerde maksimum Tm/St oranı ile 1,02 kat;
- 16x16'lık alt görüntülerde ortalama Tm/St oranı ile 1,2 kat

➤ **Nüks riskinin;**

- 16x16'lık alt görüntülerde varyans Tm/St oranı ile 1,002 kat arttığı görülmüştür.

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

Tarafımızca yürütülen bu çalışmada;

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

Sonuç Olarak;

Bu çalışmada;

- Morfometrik analizlerin kalitatif sistemlerle karşılaştırıldığında, çok sayıda doku bileşeninin, **tümörün genelini** daha iyi yansıtabilecek şekilde daha geniş alanlarda, çok daha **hassas** ve **doğru** ölçülebilmesine olanak sağladığı görülmüştür.

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

TEŐEKKÜRLER...