



T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

KOLON ADENOKARSİNOMLARINDA ANJİOGENEZİS VE
PROSTAT-SPESİFİK MEMBRAN ANTİJEN (PSMA)
EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK FAKTÖRLER
İLE OLAN İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Gülnur GÜVEN

ANKARA, 2009



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KOLON ADENOKARSİNOMLARINDA ANJİOGENEZİS VE
PROSTAT-SPESİFİK MEMBRAN ANTİJEN (PSMA)
EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK FAKTÖRLER
İLE OLAN İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Gülnur GÜVEN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. B. Handan ÖZDEMİR

ANKARA, 2009

15.01.2009 tarih ve KA 09/03 nolu sayı

Bu tez çalışması Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Ülkemizde; organ, doku alınması, saklanması ve nakline öncülük eden, transplantasyonda birçok ilke imza atan, dünyaca tanınmış bilim adamı Sayın Prof. Dr. Mehmet Haberal'ın kurucusu olduğu üniversitede eğitim alma ayrıcalığına sahip olduğum için şanslıyım, gururluyum ve kendisine minnettarım.

İşine dört elle sarılan, yaptığı işi sürekli en iyi yapma arzusunda olan, kişisel ve mesleki gelişimime büyük katkı sağlayan başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Beyhan Demirhan'a, kendini tanıma ve eğitim alma şansına sahip olduğum için mutluluk duyduğum Prof. Dr. Bülent Celasun'a, son derece dikkatli, en iyiyi gerçekleştirmeyi hedef alan Prof. Dr. Banu Bilezikçi'ye, tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar her aşamada bilimsel desteğini esirgemeyen, özenle gözden geçirerek düzelttiği, sihirli dokunuşları ile geliştirdiği için özel teşekkürlerimi borçlu olduğum Prof. Dr. B. Handan Özdemir'e, özveri ve desteklerini her zaman hissettiğim Doç. Dr. Özlem Özen ve Yrd. Doç. Dr. Nihan Haberal'a, işine duyduğu heyecanı yıllar geçmesine rağmen kaybetmeyen ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum Yrd. Doç. Dr. Ünser Arıkan'a, fikirleri ve bireysel stillerindeki farklılıklar ile herbiri bana örnek olan hocalarıma teşekkür ediyor, şükranlarımı sunuyorum.

Tezimin klinik verilerindeki katkısı için Yrd. Doç. Dr. Feza Karakayalı'ya ve istatistiklerini yapan Aydan Özdemir'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Asistanlık eğitimlerini tamamlayarak aramızdan ayrılan Dr. Pınar Uyar, Dr. Dinç Süren, Dr. Serap Toru, Dr. Aydan Kılıçarslan, Dr. Alper Koçbıyık, Dr. Müge Ünlükaplan ve Dr. Aysel Çolak bana olan katkılarınız için teşekkür ederim.

Birlikte başlayıp sonuna geldiğimiz asistanlık süresince kader ortağım Dr. Berrin Çaylak'a teşekkür ediyorum, iyi ki vardın.

Aramıza yeni katılan Uzm. Dr. Çiğdem Vural, Dr. Alev Ok Atılgan, Dr. Kadriye Aygün ve Yasemin Sezgin sizi tanıma fırsatı bulduğum için mutluyum.

Laboratuvarda birlikte çalışarak tanıdığım ve sevdiğim teknisyenlerimiz, tezimin immünohistokimyasal boyamalarını özenle yaptığı için Büşra Okursoy'a, arşiv ile ilgili kısmında yardımları için Gürkan Gümüšođlu'na, intaoperatif kesit yaparken zor anlarımda yardımını hiç esirgemeyen Leyla Başkan'a, laboratuvardaki düzeni sağlayan ve gerekli olduğunda katkı sağlayan Halil Özcan'a gönülden teşekkür ediyorum.

Hiçbir isteğimi geri çevirmeyen, her an güler yüzü ile işinin başında olan, samimi dostluğu için Ayten Şahin'e, Sema Behlülğil ve Ümit Yılmaz'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, Sultan Değirmenci ve Mustafa Akdemir ve Gülden Ünal sizi tanıdığım için mutluyum.

Bugüne gelmemde hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan anneme, babama, kardeşime ve dedeme, sabırları, sevgileri, destekleri ve yokluğuma katlanmada gösterdikleri anlayış ile birlikte ödediğimiz bedel için canımdan çok sevdiğim kızım Öykü'ye ve sevgili eşim Şahin'e çok teşekkür ederim, iyi ki varsınız.

Gölnur Güven

Aralık - 2009

ÖZET

Anti-anjiogenik tedaviye yönelik birçok çalışmanın yapıldığı ve anjiogenezisin kötü prognostik parametre olduğu kabul edilmekle birlikte bu alanda halen kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu amaçla biz çalışmamızda kolon adenokarsinomlarında anjiogenezisi etkilediğini düşündüğümüz makrofaj infiltrasyonu, “vascular endothelial growth factor” (VEGF) ve “prostate-specific membrane antigen” (PSMA) ekspresyonu gibi faktörleri inceledik ve bu parametreleri kolorektal karsinomların klasik kabul edilmiş prognostik parametreleri ile olan ilişkisini araştırdık.

Çalışmamıza, 1995-2005 yılları arasında tanı almış, düzenli takibi olan 100 kolorektal adenokarsinom olgusu dahil edildi. Olguların tüm biyopsileri yeniden değerlendirilerek gradelendi ve evrelendi. Lenf nodu metastaz varlığı ve sayısı belirlendi. Vasküler - perinöral invazyon ve hastaların dosyaları uzak metastaz, hayatta kalma süresi ve hastalıktan ölüm açısından incelendi. Yüz olgudan seçilen örneklerle ortalama damar sayısını belirlemek için CD34, ayrıca VEGF ve PSMA antikoları ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Tüm parametreler birbiri ile karşılaştırıldı.

H&E boyalı kesitler ve klinik veriler değerlendirildiğinde tümör diferansiasyonu, evresi, vasküler – perinöral invazyon , lenf nodu metastaz varlığı ve sayısı ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur. Ancak bu parametrelerin hiçbiri ile hastalıktan ölüm arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Tümör çapının hiçbir prognostik parametre ile anlamlı ilişkisi yoktur. Evre ve grade hariç, tüm bu parametreler ile ortalama damar sayısı arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmıştır. Tümöral ve endotelyal VEGF ve PSMA ekspresyonlarının ortalama damar sayısı ile pozitif korelasyon gösterdiği izlenmiş olup CD68 yoğunluğunun da ortalama damar sayısı ile birlikte arttığı izlenmiştir. Tümöral ve endotelyal VEGF ve PSMA'nın vasküler invazyon, lenf nodu metastaz varlığı ve sayısı, uzak metastaz ve hastalıktan ölüm ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Evre ile sadece damar - vasküler endotelyal “growth” faktör (D-VEGF)'nin anlamlı ilişkisi vardır. Perinöral invazyon ile hem D-VEGF, hem tümör – vasküler endotelyal “growth” faktör (T-VEGF) anlamlı ilişki göstermiştir.

Sonuç olarak; kolorektal adenokarsinomlarda tümörün evresi ve grade'i önemli prognostik parametrelerden biri olmakla birlikte vasküler-perinöral invazyon, lenf nodu metastaz varlığı ile sayısının uzun dönem prognozu belirlemede daha etkili olduğu izlendi. Ortalama damar sayısının tüm parametrelerden bağımsız olarak önemli bir prognostik parametre ve kuvvetli anjiogenik faktörler olan VEGF ve PSMA ekspresyonları ile paralellik gösterdiği saptandı. Ayrıca artan makrofaj infiltrasyonu ile damar sayısının arttığı dikkati çekti. Bu bulgular bize ilerde planlanan anti-anjiogenik tedavi planında tümör içindeki damar proliferasyonunun engellenmesinde üzerinde düşünülmesi gereken önemli faktörlerin başında VEGF ve PSMA ekspresyonlarının engellenmesi ve makrofaj infiltrasyonunun bu alanda önlenmesi olduğunu düşündürdü.

Anahtar kelimeler: Kolon adenokarsinoma, tümör anjiogenezis, CD34, VEGF, PSMA, prognoz, makrofaj.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER.....	ix
RESİMLER.....	x
TABLOLAR.....	xi
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolon anatomisi ve embriyolojisi	3
2.2. Kolon histolojisi	4
2.3. Kolon kanseri.....	5
2.4. Anjiogenezis	19
2.5. Tümördeki anjiogenezisin gelişimi	23
2.6. Anjiogenezisin değerlendirilmesinde kullanılan immünohistokimyasal belirteçler	25
GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Olguların genel özellikleri	28
3.2. Hematoksilen & Eozin (H&E) boyalı kesitlerin değerlendirilmesi	28
3.3. İmmünohistokimyasal boyama yöntemleri	29
3.4. İmmünohistokimyasal olarak boyanan kesitlerin değerlendirilmesi	30
3.4. İstatistiksel analiz	38
BULGULAR	39
TARTIŞMA.....	48
KAYNAKLAR.....	56

KISALTMALAR

aa	amino acid
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Ang-1	angiopoietin-1
Ang-2	angiopoietin-2
APC	adenomatosis polyposis coli
α -SMA	α -smooth muscle actin
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2
bFGF	basic fibroblast growth factor
CEA	carcinoembryonic antigen
DCC	deleted in colon cancer
DNA	deoxyribonucleic acid
FAP	familial adenomatous polyposis
FGF	fibroblast growth factor
FGF-2	fibroblast growth factor-2
FLNa	filamin A
hCG	human chorionic gonadotrophin
HIF-1	hypoxia-inducible transcription factor
HLA-A	human leucocyte antigen-A
HLA-DR	human leucocyte antigen-DR
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer
IL-1 β	interleukin-1 β
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MMPs	matrix metalloproteinases
NAALADase	N-acetylated, α -linked acidic dipeptidase
N-cadherin	nonepithelial cadherin
NO	nitrik oksit
pT	primer tümör
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR- β	platelet-derived growth factor receptor β
PSMA	prostate-specific membrane antigen
T-PSMA	tümör-prostat spesifik membran antijen

D-PSMA	damar-prostat spesifik membran antijen
REC	recycling endosomal compartment
SPARC	secreted protein acidic and rich in cysteine
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TNM	T – primer tümör, N – bölgesel lenf nodu, M – uzak metastaz
TfR	transferrin receptor
TSP-1	thrombospondin-1
TSP-2	thrombospondin-2
VE-cadherin	vascular endothelial cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor
T-VEGF	tümör-vasküler endotelial “growth” faktör
D-VEGF	damar-vasküler endotelial “growth” faktör
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
WHO	world health organization

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Hemanjioblastların endotelial ve hematopietik hücrelere farklılaşması	21
Şekil 2.2. Önceden var olan damarlardan anjiogenez	23
Şekil 2.3. PSMA'nın yapısı	26
Şekil 2.4. PSMA'nın fonksiyonu.....	26

RESİMLER

	<u>Sayfa</u>
Resim 2.1. Kolon adenokarsinomu, iyi diferansiye	11
Resim 2.2. Kolon adenokarsinomu, orta derecede diferansiye	12
Resim 2.3. Kolon adenokarsinomu, kötü diferansiye	12
Resim 2.4. Müsinöz adenokarsinoma	13
Resim 2.5. Taşlı yüzük hücreli karsinom.....	14
Resim 2.6. İndiferansiye karsinom	15
Resim 2.7. Mural hücrelerin normal ve tümör kan damarlarındaki morfolojileri	24
Resim 3.1. CD34 antikoru ile boyanan yeni kan damarları	30
Resim 3.2. T-VEGF antikoru ile tümör hücrelerinde grade 1 boyanma.....	31
Resim 3.3. T-VEGF antikoru ile tümör hücrelerinde grade 2 boyanma.....	32
Resim 3.4. T-VEGF antikoru ile tümör hücrelerinde grade 3 boyanma.....	32
Resim 3.5. D-VEGF antikoru ile tümör damar endotellerinde grade 1 boyanma.....	33
Resim 3.6. D-VEGF antikoru ile tümör damar endotellerinde grade 2 boyanma.....	33
Resim 3.7. D-VEGF antikoru ile tümör damar endotellerinde grade 3 boyanma.....	34
Resim 3.8. T-PSMA antikoru ile tümör hücrelerinde grade 1 boyanma	34
Resim 3.9. T-PSMA antikoru ile tümör hücrelerinde grade 2 boyanma	35
Resim 3.10. T-PSMA antikoru ile tümör hücrelerinde grade 3 boyanma	35
Resim 3.11. D-PSMA antikoru ile tümör damar endotellerinde grade 1 boyanma.....	36
Resim 3.12. D-PSMA antikoru ile tümör damar endotellerinde grade 2 boyanma.....	36
Resim 3.13. D-PSMA antikoru ile tümör damar endotellerinde grade 3 boyanma.....	37
Resim 3.14. CD-68 antikoru ile makrofajlarda grade 3 boyanma	38

TABLULAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Kolon ve rektum tümörlerinde “world health organization (WHO) histolojik sınıflaması	10
Tablo 2.2. Dukes ve Modifiye Dukes evreleme sistemi.....	16
Tablo 2.3. Kolon ve rektum tümörlerinde TNM klasifikasyonu	17
Tablo 4.1. Tümörün diferansiasyonu, evresi, vasküler invazyonu, perinöral invazyonu ve uzak metastaz varlığının lenf nodu metastazı, lenf nodu metastaz grubu ve ölümü ile ilişkisi.....	41
Tablo 4.2. Tümör çapı, damar sayısı ve hayatta kalma süresinin prognostik faktörler ile ilişkisi	42
Tablo 4.3. T-VEGF ve D- VEGF'nin prognostik faktörler ile karşılaştırılması	44
Tablo 4.4. T-PSMA ve D- PSMA'nın prognostik faktörler ile karşılaştırılması	45
Tablo 4.5. CD68'in prognostik faktörler ile karşılaştırılması	46

GİRİŞ

Tümör büyümesinde ve yayılmasında anjiogenezis kritik role sahiptir. Tümör ile ilişkili anjiogenik faktörler tümör hücrelerinden ve tümördeki inflamatuvar hücre infiltrasyonundan sağlanır (1). Aynı zamanda tümörün fenotipi tümörün vasküler niteliğini belirlemektedir (2). Tümör hücreleri doğrudan anjiogenik faktörleri üretir yada tümör matriksinde bulunan anjiogenik faktörleri aktive ederler. Bunun yanı sıra tümör hücreleri aynı zamanda anti-anjiogenik faktörleri de üretirler. Anjiogenezisi indükleyen en önemli faktörlerden biri VEGF olup, trombospondin 1 anti-anjiogenik özelliğe sahiptir (3).

Tümörde erken dönemde perfüzyon eksikliği nedeni ile hipoksi, vasküler hasar ve yoğun metabolik aktivite oluşur ve inflamatuvar hücreler bu bölgeye gelir. Tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerden ve özellikle makrofajlardan salınan anjiogenik faktörler endotel hücrelerin proliferasyonu, diferansiasyonu ve migrasyonunu arttırarak büyük arter ve küçük damarlarda büyümeyi sağlarlar (1). Hipoksi ayrıca normal ve malign hücrelerde VEGF üretimi için önemli bir stimulustur. VEGF endotel hücrelerine yüksek derecede spesiflik gösterir, parakrin etki ile endotel hücrelerinin proliferasyon ve motilitesini stimüle ederek yeni kapiller tomurcukların oluşmasını başlatır ve damar permeabilitesini arttırır (4).

İlk kez Folkman tarafından tümör anjiogenezisini durdurmanın kanser tedavisinde bir seçenek olabileceği görüşünün savunulmasını takiben (5) Saclarides tarafından 1994'te rektum kanserlerinde yapılan prognostik çalışmada ve daha sonra yapılan birçok çalışmada anjiogenezisin kolon kanserleri üzerine olumsuz prognostik etkisi olduğu görülmüştür (6).

Birçok solid tümörde meme, kolon karsinomu, hepatoma, mesane, mide ve prostat karsinomlarında anjiogenezis ile ilişkili olarak VEGF ve reseptörleri suçlanmaktadır. VEGF blokajına yönelik yaklaşımlar endojen tümör VEGF sekresyonunun inhibisyonuna dayanmaktadır. VEGF sinyal yolu tümör anjiogenezisinin inhibisyonunda hedeftir ve geliştirilen ilaçlar erken faz I/II klinik çalışmalar ile test edilmektedir (4).

PSMA tip II transmembran glikoproteindir (7). PSMA normal prostat glandlarında güçlü ekspresyon göstermektedir (8). Prostatik epitelde folat hidrolaz aktivitesi gösterir (9).

Prostatın yanı sıra PSMA beyin, tükürük bezi, ince bağırsak dokusu ve solid tümörlerin endotel hücreleri ile bazı tümörlerde sadece tümör içinde yeniden gelişme gösteren damarların endotel hücrelerinde de eksprese olur (10). PSMA, ne benign dokuların vasküler endotel hücrelerinde ne de vasküler tümörlerin neoplastik hücrelerinde eksprese olmaz (11). Tümörlerin içindeki vasküler yapıların farklı yapısı diğer tümör dışı normal damarların yapısını bozmadan tedavi yapılmasına olanak sağlar (12).

PSMA'ya spesifik monoklonal antikor ilk olarak 1987 yılında tarif edilmiştir ve 7E11 olarak adlandırılmıştır (13). Başlangıçta 7E11 antikoru immünohistokimyasal olarak renal hücreli karsinom, transizyonel hücreli karsinom, mesane ve kolon karsinomlarında yeni kan damar endotelinde boyanma göstermiştir (14). Bu antikor immünohistokimyasal olarak teşhiste, serum seviyeleri klinik izlemde, radyolojik görüntüleme ile klinik evrelemede ve immünterapötik ilaç olarak tümör tedavisinde kullanılabilir. Transmembran glikoproteini olan PSMA'nın ekstrasellüler parçasına spesifik bir antikor olduğundan ayrıca idealdir. Gong ve arkadaşlarının çalışmasında şu anda PSMA antikorunun klinik kullanımının prostat kanserlerinde teşhiste, görüntüleme ve immünohistokimya ile sınırlı olduğunu belirtmektedir (15). PSMA'nın ekstrasellüler parçasına karşı geliştirilmiş yeni bir antikor olan J591 nanomolar afiniteli nonpermeabilize hücrelerde Dr. Neil Bander ("Cornell-Weill School of Medicine") tarafından gösterilmiştir (16). Antikor ve aşı yaklaşımları PSMA hedefli tedavi yöntemleri faz 1 çalışmalar olarak incelenmektedir (16,17).

Anti-anjiogenik tedaviye yönelik birçok çalışmanın yapıldığı ve anjiogenezisin kötü prognostik parametre olduğu kabul edilmekle birlikte bu alanda halen kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu amaçla biz çalışmamızda kolon adenokarsinomlarında anjiogenezisi etkilediğini düşündüğümüz makrofaj infiltrasyonu, VEGF ve PSMA ekspresyonu gibi faktörleri inceledik ve bu parametreleri kolorektal karsinomların klasik kabul edilmiş prognostik parametreleri ile olan ilişkisini araştırdık.

GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon anatomisi ve embriyolojisi

Kolon karın boşluğunun yan, üst ve alt kısımlarında yer alır. İleoçekal bölgeden anüse kadar olan uzunluğu yetişkinlerde 189.5 +/- 26.3 cm'dir. Kolorektal uzunluk 60 yaşından büyüklerde değişmemektedir. 60 yaşından küçüklerde transvers kolonun uzunluğu yaş, cinsiyet ve vücut kitle indeksine bağlı olarak değişiklik gösterir (18). Kolon ileoçekal bölgeden anüse kadar 6 alt bölgeye ayrılır. Çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum (19). Kolon dış yüzünde, rektum dışında, bağırsağın uzunluğuna paralel üç şerit vardır. Tenia coli adı verilen bu şeritler bağırsağın dıştaki longitudinal kas tabakasını yapan kas liflerinin bir araya toplanarak sıkışmasından meydana gelir. Teniaların uzunluğu bağırsağın uzunluğuna göre daha az olduğundan bağırsak duvarının tenialar arasında kalan çıkıntı ve kabartılara haustra coli denir (20). Rektumun distal 8 cm'den 15 cm'ye kadar olan kısmı periton ile örtülü değildir (19).

Embriyolojik gelişim sırasında sağ kolon; çekum, çıkan kolon, transvers kolonun 2/3 proksimal parçası midguttan (orta bağırsak) gelişir. Sol kolon; transvers kolonun 1/3 distal parçası, inen kolon, sigmoid kolon, rektum ve anal kanalın üst kısmı hindguttan (son bağırsak) gelişir. Primitif bağırsağın daha geniş olan son parçasına kloaka denir. Kloaka önde primitif ürogenital sinüs ve arkada da anorektal kanal adı verilen iki parçaya ayrılır. Endoderm ve ektodermin birleşim yeri anal kanalda yer alan pektinat çizgidir (21).

Sağ ve sol kolonun arterial kanlanması, parasempatik ve sempatik innervasyonu embriyolojik gelişimlerine bağlı olarak farklılık gösterir. Sağ kolon A. Mesenterika süperior'dan, sol kolon A. Mesenterika inferior'dan kanlanır. Venöz direnajları Vena Portaya'dır. Rektum damarlarını 3 arterden alır. A. Rectalis superior (A. Mesenterica inferiorun dalı), media (A. İliaca internanın dalı), inferior (A. Pudantalis internanın dalı). Rektumdan gelen venöz kan V. Mesenterica inferior aracılığı ile Vena Portaya dökülür. Lenfatik direnaji öncelikle ve en fazla mezenterde bulunan parakolik lenf nodlarına olur. Sağ kolonun parasempatik innervasyonu N. Vagustan, sempatik innervasyonu süperior mezenterik gangliondan, sol kolonun parasempatik innervasyonu sakral pleksustan (S2, S3 ve S4), sempatik innervasyonu inferior mezenterik gangliondandır. Rektumun

parasempatik innervasyonu nervi erigentesten (S4), sempatik innervasyonu hypogastrik pleksusun lumbal spinal segmentindedir (L1, L2, L3) (20).

2.2. Kolon histolojisi

Kolon, içten dışa doğru dört histolojik tabaka olmak üzere mukoza, submukoza, mükülaris propriya ve serozadan oluşur. Mukoza, epitel tabakası, lamina propriya ve müsülaris mukozadan oluşan üç komponente ayrılır (19,22).

2.2.1. Mukoza:

2.2.1.1. Epitel tabakası:

Kolon mukozasında beş farklı epitelyal hücre tipi vardır. Absortif kolonositler, mukus sekrete eden goblet hücreleri, enteroendokrin hücreler, Panet hücreleri, M hücreleri (23,24). Absortif kolonositler eozinofilik sitoplazmalı, goblet hücrelerinin müsüninden farklı müsün içeren küçük apikal vezikülleri vardır. Goblet hücrelerinin nükleusu absortif kolonositler gibi hiperkromatik, dens ve irregülerdir. Apikal pollerinde çok sayıda, müsün kompozisyonu farklı mukus granülleri bulunur (25). Endokrin hücreler dominant olarak kripterlerde, nadiren lamina propriada lokalizedirler. Küçük, yuvarlak ve koyu eozinofilik granüller içerirler (26). Panet hücreleri piramidal hücrelerdir. Bazalde oval nükleusları ve apikalde karakteristik dens eozinofilik sitoplazmik granülleri vardır. Panet hücrelerinin sellüler immünitede önemli rolü ve hücre – matriks etkileşimi ile apopitoziste rolü vardır (27). Membranöz (M) hücreler absortif kolonositlerin varyantıdır. İmmünolojik hücreler olup antijen sunarlar (23).

2.2.1.2. Lamina propriya:

Lamina propriya inflamatuvar ve mezenkimal hücreler ile ekstrasellüler matriksten oluşur. İnflamatuvar hücreler B lenfosit, T lenfosit, plazma hücreleri, eozinofiller, mast hücreleri ve makrofajlardır ve lamina propriya alanının %30-50'sini kaplarlar (28). Lamina propriyada kripterin çevresindeki miyofibroblastalar ve subepitelyal miyofibroblastlar olmak üzere iki farklı popülasyonda miyofibroblast ile kapillerler ve lenfatik kanallar bulunur (22).

2.2.1.3. Müskülaris mukoza:

Lamina propriya ile submukoza arasında, daha çok sirküler seyirli düz kas liflerinden oluşur (22).

2.2.2. Submukoza:

Lamina propriyada olduğu gibi gevşek bağ dokusundan oluşur ve burada submukozada yerleşen Meissner pleksusu vardır (22).

2.2.3. Müskülaris propriya:

İçte sirküler, dışta longitudinal kas tabakası vardır. Sirküler ve longitudinal kas tabakaları arasında Auerbach pleksusu vardır. Peristaltizmi düzenleyen, interstisiyel Cajal hücreleri Meissner ve Auerbach pleksuslarında ağ oluşturur (29).

2.2.4. Seroza:

Mezotel hücreleri ve altında ince, gevşek bir bağ dokusundan ibarettir (22).

2.3. Kolon kanseri

2.3.1. İnsidans ve epidemiyoloji:

Kolorektal karsinomların yaygınlığı Kuzeybatı Avrupa ve Kuzey Amerika'da fazla, Asya, Afrika ve Güney Amerika'nın bazı bölgelerinde düşüktür. Kolorektal karsinomlar hem erkek hem de kadınlarda en yaygın üçüncü kanser tipidir. Kolorektal kanser insidansı 1985 yılında 100,000'de 66,3 iken, 2004 yılında 48,2 olarak saptanmıştır. Ancak 1998-2004 yılları arasında her yıl kolorektal kanser insidansında %2,3 azalma görülmüştür ve bu azalmadaki en önemli sebep kolorektal poliplerin kansere ilerlemeden önce bulunup çıkarılmasıdır. Kolon ve rektum kanserlerinden ölüm tüm kanser ölümlerinin %9'unu oluşturmaktadır (30).

2.3.2. Risk faktörleri:

Yaş ve cinsiyet:

Kolorektal kanser riski yaş ile birlikte artar ve en sık 60-79 yaşlarında görülür. Genç yaşta kolorektal karsinom saptanırsa olguda ülseratif kolit veya polipozis sendromları araştırılmalıdır. Rektum kanseri erkeklerde daha fazla izlenirken proksimalde yerleşen

kanserlerde kadın-erkek dağılımında fark yoktur (31). Kadınlarda kolon kanseri daha agresif seyretmesine rağmen östrojenin anti-kanser etkisi menapoza kadar koruyucu olmaktadır (32).

Polip:

Kolorektal polipler kript hücrelerinde kontrol edilemeyen bölünme ile epitelyal displazinin görülebileceği, çevre dokudan iyi sınır ile ayrılan, yumru şeklinde lezyonlardır. Genellikle hücrelerde subklonal yeni mutasyonlar aracılığı ile gelişirler. Çoğu adenomlar benign ve asemptomatiktirler. Tesadüfen endoskopi sırasında görülürler. Bu lezyonların küçük bir alanında malignensi gelişebilir. Bu bulgu kolorektal karsinomların büyük çoğunluğunun adenomatöz poliplerden gelişebileceğinin kanıtıdır. Adenomlarda şiddetli displazi ile çapının 1 cm'den büyük olması ve villöz bileşenin belirgin olması ile kanser riski artar (33).

Hiperplastik polipler genellikle rektum ve sigmoid kolonda lokalize olurlar. Benign lezyonlardır, malign potansiyelleri yoktur. Bununla birlikte kalın bağırsağın çeşitli bölgelerine dağılmış hiperplastik polipozis malign tümör gelişimi ile ilişkilidir (34).

Serrated polipler yaşlı hastalarda ve distal kolonda yerleşim gösterirler. Küçük lezyonlardan son zamanlarda tanımlanan sesil serrated adenomlara kadar geniş bir spektrumu kapsamaktadır. Sesil serrated adenom sıklıkla proksimal kolonda, bol müsin sekrete eden, aşırı serrasyon gösteren, atipik yapıda (35), önemlisi kesin malign potansiyeli olan lezyonlardır. Serrated lezyonlarda sıklıkla BRAF gen mutasyonu ve yaygın "deoxyribonucleic acid" (DNA) metilasyonu görülür (36).

"Familial adenomatous polyposis" (FAP) otozomal dominant geçiş gösteren ve kolon karsinom gelişimi için yüksek risk oluşturan sayısız adenomatöz polipler ile karakterizedir. FAP'de 5q21-22 kromozomda bulunan "adenomatosis polyposis coli" (APC) geninde heterozigot mutasyon vardır (37). APC geni β -katenin regülasyonunda, sitoskeleton organizasyonunda, apoptoziste, hücre siklusunun kontrol edilmesinde ve hücre adezyonunda etkilidir (38). β -katenin nükleusa geçerek lenfosit çoğaltıcı faktör olan transkripsiyon bölgesine katılır. Aktive edilen genler c-myc ve cyclin D1 gibi hücre proliferasyonu ve apoptozunu düzenleyen genlerdir (39,40).

Gen mutasyonları, genetik ve heredite:

K-ras geni kolon kanserlerinde ve adenomlarında en sık görülen aktive olmuş onkogendir. Mutasyona uğramış formlar hücre proliferasyonu, transformasyonu ve diferansiasyonunu stimüle eder (41). Ras gen mutasyonu karsinomlarda %47, 1 cm'den büyük adenomlarda %58 ve 1 cm'den küçük adenomlarda %9 görülür (42).

Smad proteinlerinden, özellikle Smad4'ün inaktivasyonuna yol açan mutasyonlar pankreatik ve kolorektal kanserlerde bildirilmiştir. Smad4 kolonda yüzey epitelinde, kolumnar absortif hücrelerde, proliferasyon bölgelerinde bulunur ve mutasyon sonucu bu hücrelerde apoptozis görülür (43).

K-ras ve APC gen mutasyonları erken evre kolon karsinogenezisinde, “deleted in colon cancer” (DCC) ve p53 mutasyonları geç evre kolon karsinogenezisinde etkilidir. DCC geninde kodlanan protein hücre adezyonu ile ilişkilidir ve p53 proteini hücre siklus ve apoptozisin regülasyonunda etkili transkripsiyon faktörüdür (44).

Telomeraz ökaryotik hücrelerin kromozomlarında bulunan, revers transkriptaz içeren bir ribonükleoprotein kompleksidir. Somatik hücrelerde, hücrenin her bir bölünmesinde kısalır. Bu kısalma hücre yaşlanmada önemlidir. Kısalma belli bir seviyeye geldiğinde hücre büyümesi durur. Bunu apoptozis ve hücre ölümü takip eder. Bazı hücreler bu mekanizmadan kaçır ve proliferer olur (45). Adenom karsinom sekansında telomerik disfonksiyon gösterilmiştir (46).

Hücre bölünmesi sırasında DNA polimeraz enzimi DNA kopyalama hataları yapar. Tümörlerde, nükleotid insersiyon ve delesyon mutasyonlarının birikmesine mikrosatellit instabilitesi denir (47,48).

Lynch sendromu olarak bilinen kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser sendromu (HNPCC) otozomal dominant geçiş gösterir ve bunlarda kolorektal kanser gelişme riski yüksektir (49,50). Tüm kolorektal malignansilerin yaklaşık %3-5'i HNPCC'dir. HNPCC ortalama 45 yaşında, splenik fleksuranın proksimalinde lokalize olmaya eğilimlidir ve sıklıkla çok sayıdadır. HNPCC'de görülen mikrosatellit instabilitesi tamir genlerinden hMSH2, hMSH1, hPMS1, hPMS2 ve hMSH6/GTBP gen çizgisi mutasyonlarından biri ile ilişkilidir (50,51).

Özgeçmiş ve aile öyküsü:

Kolon kansinomlarında ailesel geçişten bahsedebilmek için Amsterdam II kriterlerine göre; en az üç akrabasında nonpolipozis ile ilişkili, histolojik olarak kolorektal kansinom bulunması ve bunlardan birin birinci dereceden akraba olması gerekir. En az ardışık iki nesilde kolon kansinom tanısı alınmış kişi olmalıdır. Bunlardan biri 50 yaşından önce tanı almış olmalıdır. Kolorektal kansinomlu herhangi bir akrabada FAP dışlanmış olmalıdır. (52). Hastalarda endometriyum, over, mide, ince bağırsak, hepatobilier sistem, beyin ve üst ürotelial kanser riski Lynch sendromlu hastalarda kolorektal kanserlere ek olarak artar (53).

İnflamatuvar bağırsak hastalığı:

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olan olgularda kolorektal kansinom gelişme riski fazladır. Bu risk kronik inflamasyonun kümülatif etkisi ve hastalığın süresi gibi inflamasyonun şiddeti ile ilgilidir. İnflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda kolon mukozasındaki displazi prekanseröz lezyondur (54).

Diyet:

Yağlı, kalorisi yüksek kırmızı et ve düşük lifli işlenmiş gıdalar ile beslenenlerde kolorektal kanser gelişme riski yüksektir. Beslenme dengesizliği, fiziksel obezite, hareketsizlik, sigara, ağır alkol tüketimi ve diabetli hastalarda kolorektal kansinom riski artar (55). Yetersiz kalsiyum, D vitamini ve folat alınması riski arttırır (56).

İlaçlar:

Düzenli ve uzun süreli aspirin kullanımı kolorektal kanser riskini azaltır. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar da benzer etkiye sahiptir. (57).

2.3.3. Prognostik faktörler

Kolorektal karsinomlarının prognozu ile ilişkili parametreler “College of American Pathologists” tarafından aşağıdaki gibi sınıflanmıştır (58).

Kategori 1 faktörler:

1. Lokal yayılım (pT)
2. Bölgesel lenf nodu metastazı
3. Vasküler veya lenfatik damar invazyonu
4. Rezidüel tümör klasifikasyonu
5. Preoperatif “carcinoembryonic antigen” CEA elevasyonu

Kategori 2 faktörler:

Kategori 2A faktörler:

1. Histolojik grade
2. Radial marjin
3. Tümör klasifikasyonundan sonra neoadjuvan terapi

Kategori 2B faktörler:

1. Histolojik tip
2. Tümör sınırları

Kategori 3 faktörler:

1. DNA yapısı
2. Perinöral invazyon
3. Mikrodamar dansitesi
4. Hücre protein ve karbonhidratları
5. Peritümöral fibrozis (desmoplazi)
6. Peritümöral inflamatuvar reaksiyon
7. Hiçbir histolojik tip ile ilişkili olmayan fokal nöroendokrin hücre diferansiasyonu
8. Nükleolar organize bölge
9. Proliferasyon indeksi

Kategori 4 faktörler:

1. Tümörün çapı
2. Gros tümör konfigürasyonu

2.3.3.1. Histolojik tip:

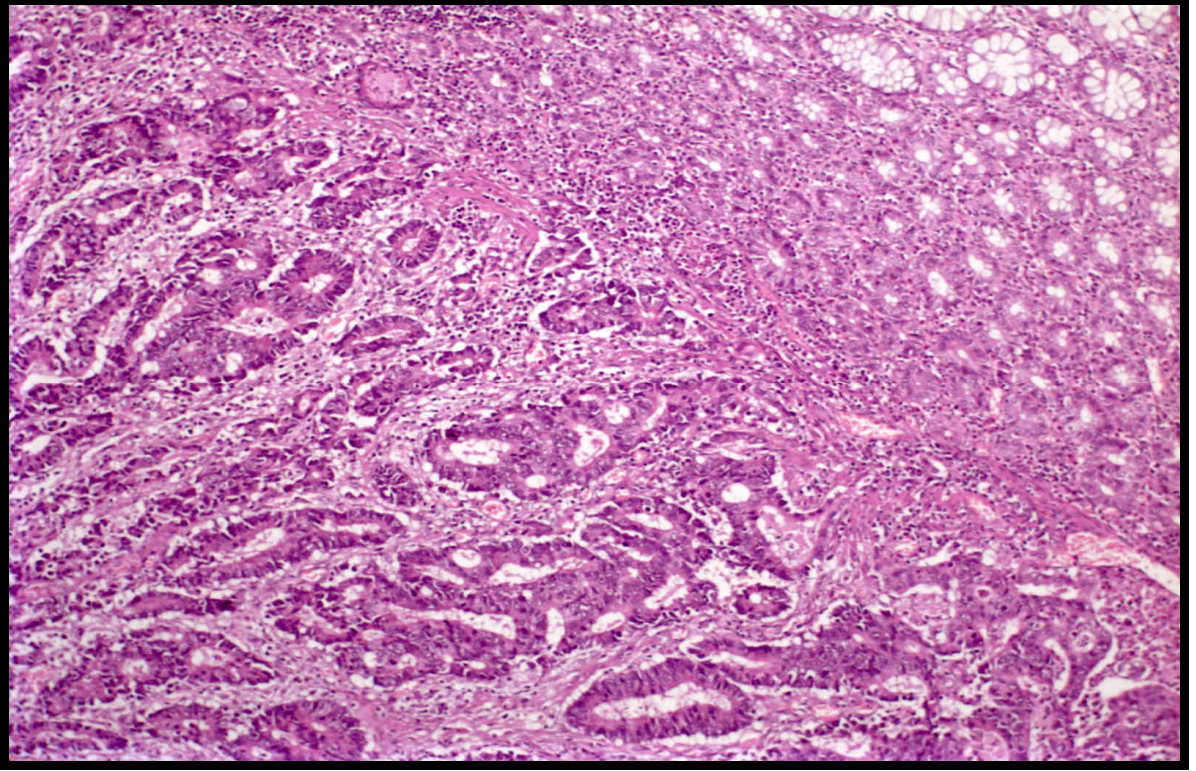
Kolonda izlenen benign ve malign tümörlerin histolojik sınıflaması Tablo 2.1’de verilmiştir. Histolojik tiplendirmede karsinomlar sekiz ana başlık altında verilmiştir.

Tablo 2.1. Kolon ve rektum tümörlerinde “world health organization” (WHO) histolojik sınıflaması

Epitelyal tümörler	Nonepitelyal tümörler
Adenoma	Lipoma
Tübüler	Leiomyoma
Villöz	Gastrointestinal stromal tümör
Tübülovillöz	Leiomyosarkom
Serrated	Anjiosarkoma
Kronik inflamatuvar hastalık ile ilişkili itraepitelyal neoplazi (displazi)	Kaposi sarkoma
Low-grade glandüler intraepitelyal neoplazi	Malign melanoma
High-grade glandüler intraepitelyal neoplazi	Diğerleri
Karsinoma	Malign lenfomalar
Adenokarsinoma	Marjinal zon B hücreli lenfoma
Müsinöz adenokarsinoma	“mucosa-associated lymphoid tissue” (MALT) tip
Taşlı yüzük hücreli karsinoma	Mentle hücreli lenfoma
Küçük hücreli karsinom	Diffüz büyük B hücreli lenfoma
Skvamöz hücreli karsinom	Burkitt lenfoma
Adenoskuamöz karsinom	Diğerleri
Medüller karsinom	Sekonder tümörler
Andiferansiye karsinom	Polipler
Karsinoid (iyi diferansiye endokrin neoplazm)	Hiperplastik (metaplastik)
Mikst karsinoid-adenokarsinoma	Peutz-Jeghers
Diğerleri	Juvenil

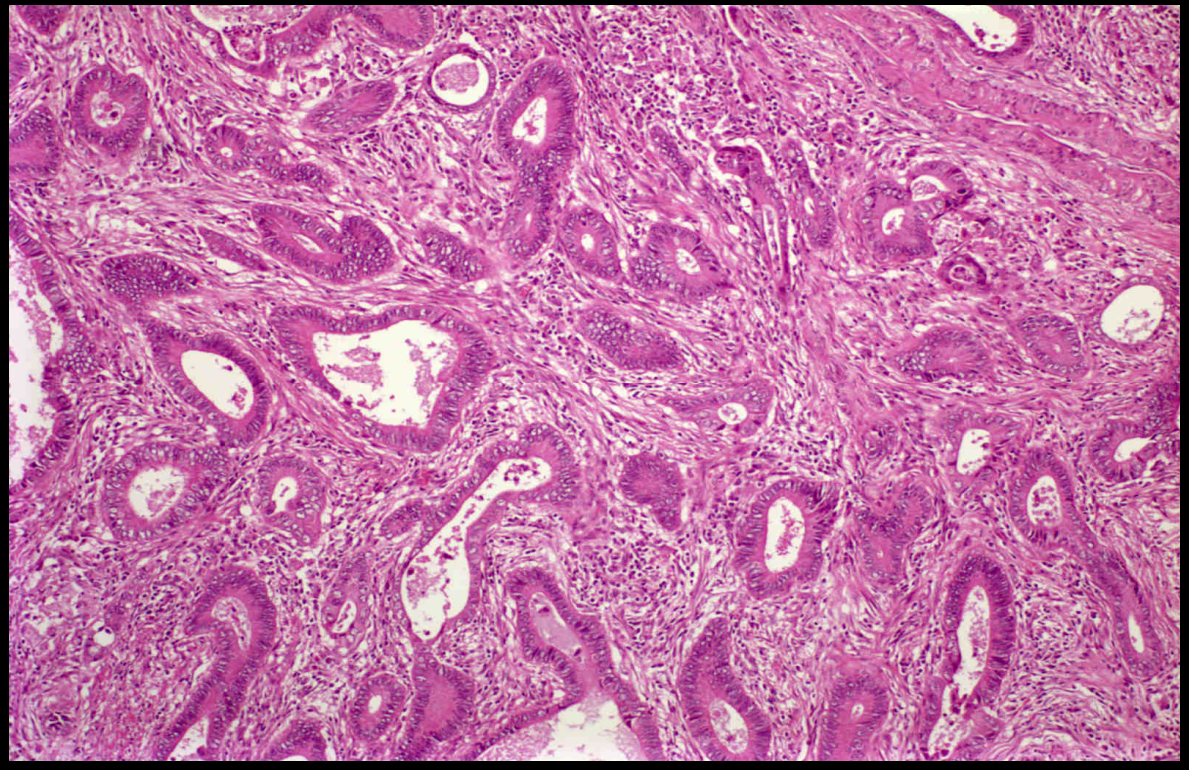
Adenokarsinoma:

Tüm kolorektal karsinomlar in situ lezyonlar olarak başlamakla birlikte farklı morfolojik paternler şeklinde gelişir. İnvaziv tümör kuvvetli bir desmoplastik stromal yanıt uyandırır. Adenokarsinomda tümör hücreleri adenoid yapılar yapar. İyi diferansiye tümörlerde, kompleks veya basit gland formasyonu, kolayca ayırt edilebilen nükleer polarite, üniform nükleoller vardır (Resim 2.1).

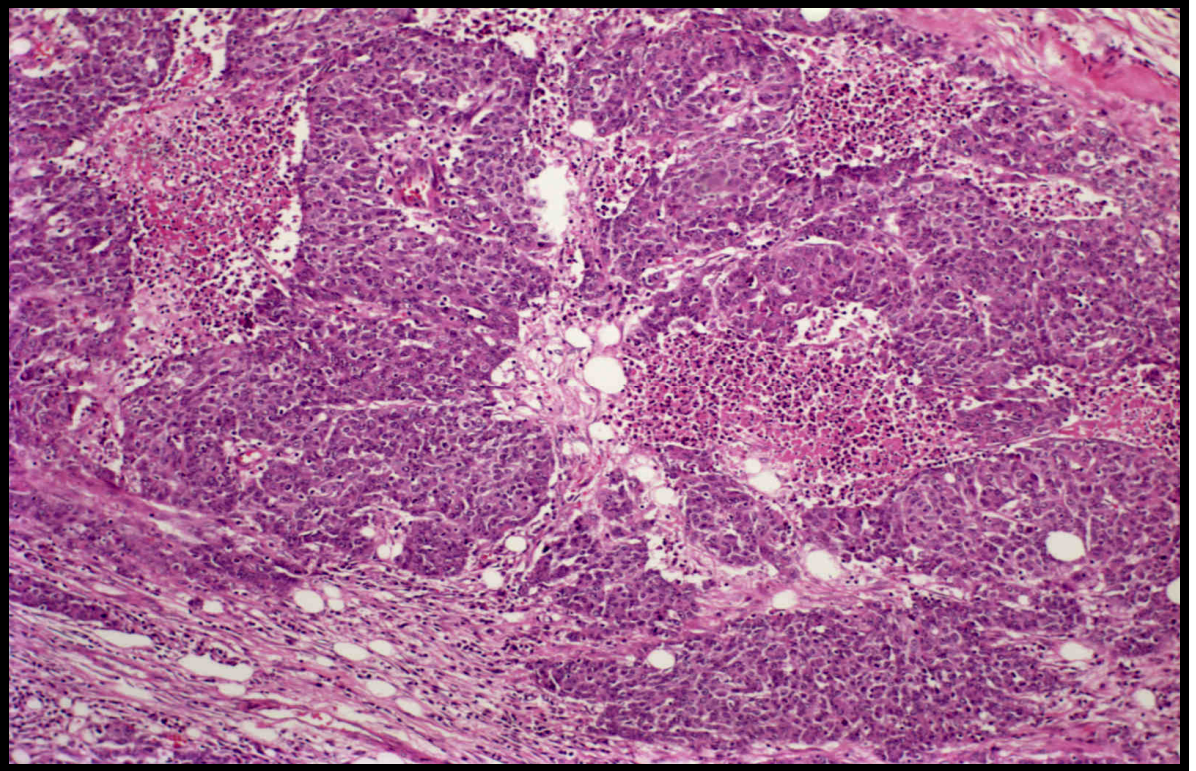


Resim 2.1. Kolon adenokarsinomu, iyi diferansiye (H&E, x100)

Orta derecede diferansiye tümörlerde, kompleks, basit veya hafif irregüler gland formasyonu, nükleer polaritede kayıp izlenir (Resim 2.2). Kötü diferansiye tümörlerde, son derece irregüler glandlar veya glandüler diferansiasyonun olmaması ile nükleer polarite kaybı görülür (Resim 2.3). Karsinom, tümör kenarlarında belirgin inflamatuvar ve demoplastik yanıt ortaya çıkartır. İnflamatuvar hücrelerin çoğu T lenfositlerdir. Ama B lenfositler, plazma hücreleri, histiyositler, dendritik hücreler de mevcut olabilir (19,59).



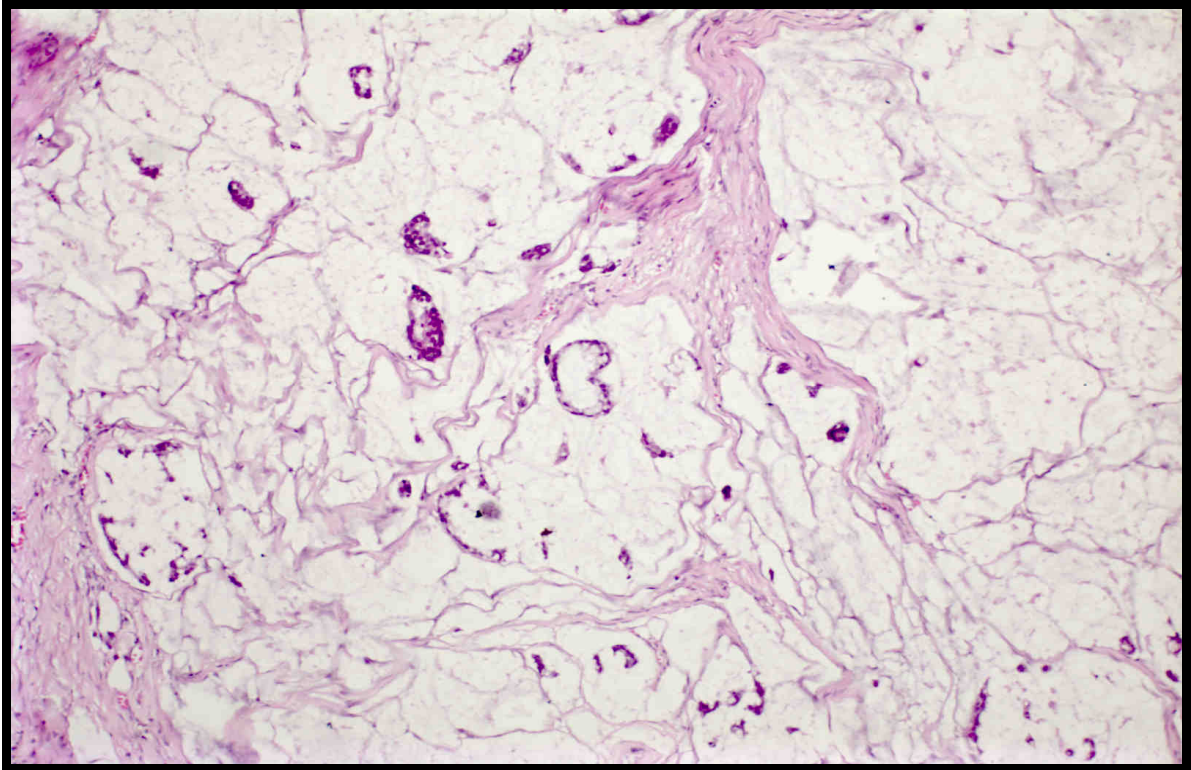
Resim 2.2. Kolon adenokarsinomu, orta derecede diferansiye (H&E, x100)



Resim 2.3. Kolon adenokarsinomu, kötü diferansiye (H&E, x100)

Müsinöz adenokarsinoma:

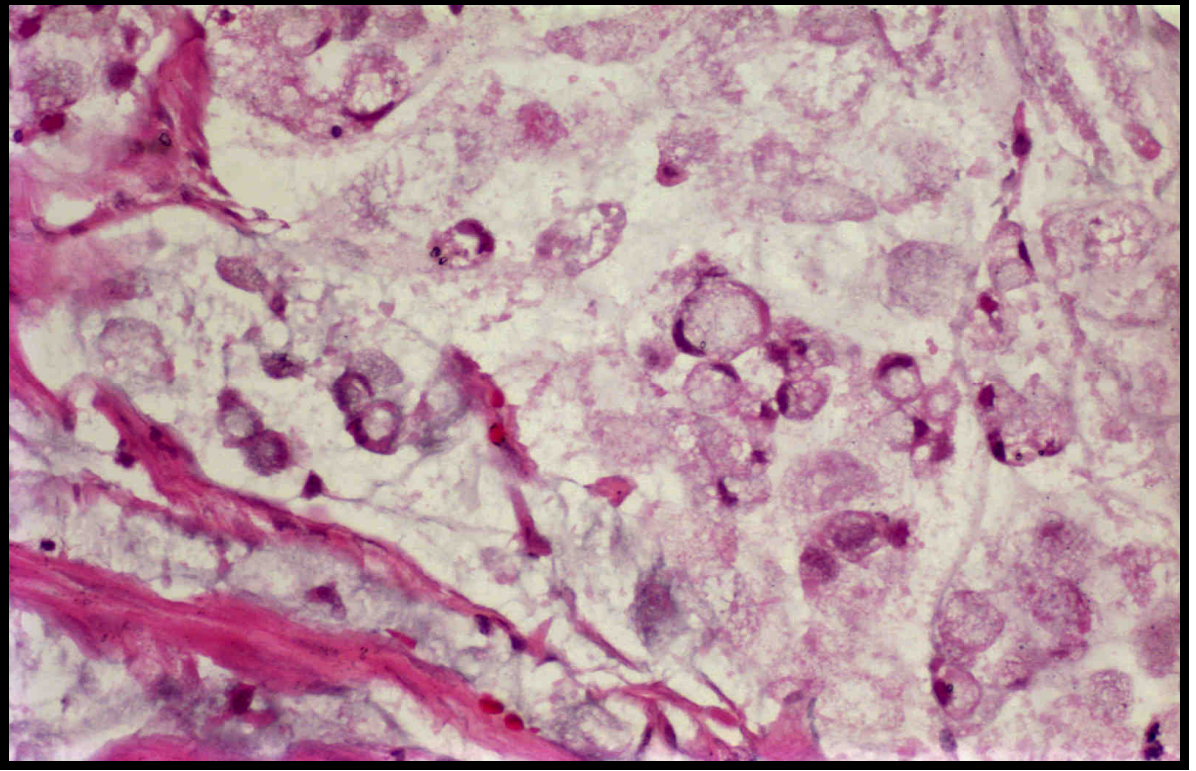
Genelde kalın bağırsağın adenokarsinomları çeşitli miktarlarda müsin üretir. Müsin glandların lümeninde veya serbest olarak bağırsak duvarında izlenebilir. Müsin bağırsak duvarını diseke ettiği için malignitenin yayılmasını kolaylaştırır ve prognozun kötüleşmesine neden olur. Müsinöz tümörler kolorektal tümörlerin %15'ini oluşturur ve en sık rektumda görülür. Glandların lümeninde ve glandlar arasında ekstrasellüler müsin büyük gölcükler oluştur (Resim 2.4). Müsinöz adenokarsinom tanısı koymak için müsin odakları tümör kitlesinin en az %50'sini oluşturması gerekir. Bu tümörlerin sekrete ettiği müsin yapısında MUC-2 protein bulunur (2,42). MUC-2 normal intestinal epitelde bulunan apomüsindir. Şiddetli epitelyal atipi gösteren malignite potansiyeli daha fazla olan adenomlarda MUC-2 boyanması azalmaktadır (60). Müsinöz adenokarsinomların prognostik önemi tartışmalıdır (61).



Resim 2.4. Müsinöz adenokarsinoma (H&E, x100)

Taşlı yüzük hücreli karsinoma (Signet ring cell carcinoma):

Tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasında intrasitoplazmik müsin olması gereklidir (59). Kolorektal karsinomların nadir görülen, agresif gidişli formudur. Prognozu kötüdür (62). Duvarı diffüz olarak infiltre eder, minimal ekstrasellüler müsin vardır (Resim 2.5) (19,59).



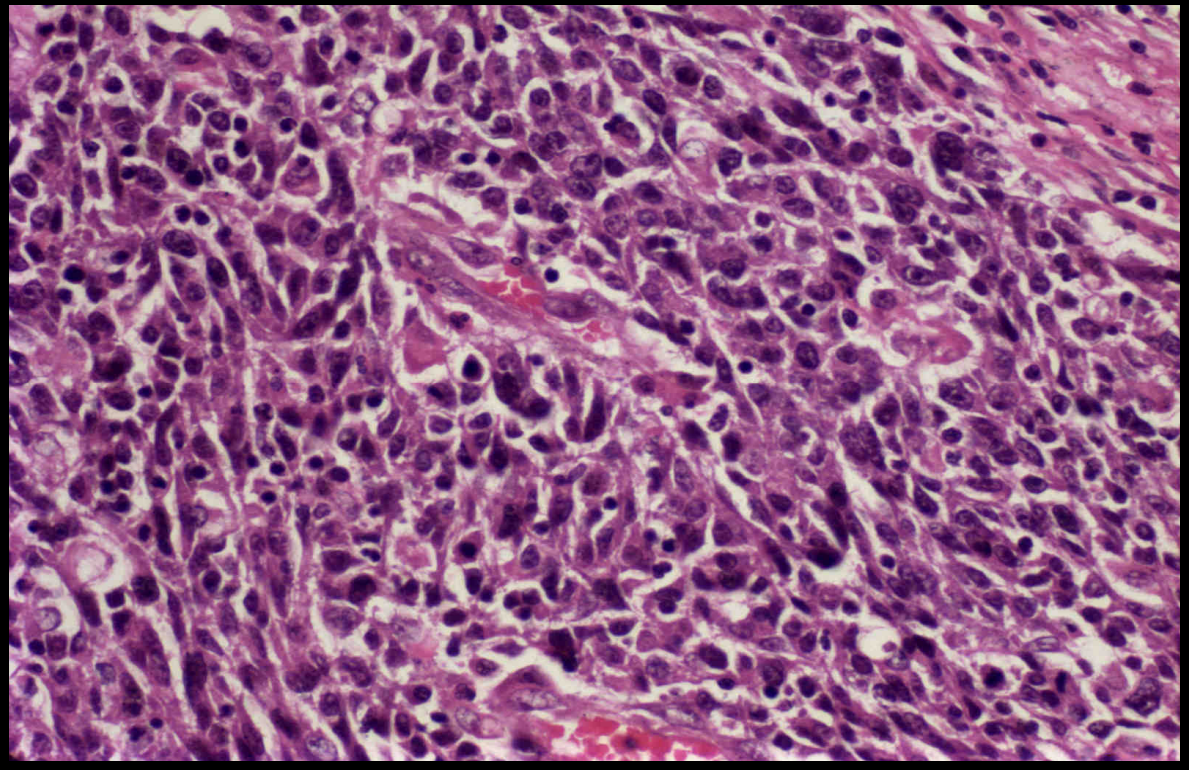
Resim 2.5. Taşlı yüzük hücreli karsinom (H&E, x400)

Medüller (solid, kötü differansiye) adenokarsinoma:

Genelde kadınlarda çekum ve sağ kolonda yerleşim gösterir. Bazen sitolojik ve yapısal olarak nöroendokrin diferansiyasyon gösterebilir, ancak nöroendokrin belirteçler negatiftir. Agressif davranış gösterirler. Genetik olarak mikrosatellit instabilite ile karakterizedir (19,59,63).

İndiferansiye karsinom:

Adenokarsinomun nadir görülen bir varyatıdır. Gland formasyonu olmayan morfolojik olarak diferansiyasyon azlığı olan tümör tipidir (Resim 2.6). Agressif davranış gösterirler (59).



Resim 2.6. İndiferansiye karsinom (H&E, x400)

2.3.3.2. Kolon karsinomunda derecelendirme:

Mikroskopik olarak kolorektal karsinomlar WHO klasifikasyonu ile histolojik olarak grade'lenir.

Grade I: İyi diferansiye, kompleks veya basit gland formasyonu, kolayca ayırt edilebilen nükleer polarite, üniform nükleoller vardır.

Grade II: Orta derecede diferansiye, kompleks, basit veya hafif irregüler gland formasyonu, nükleer polaritede kayıp izlenmiştir.

Grade III: Kötü diferansiye, son derece irregüler glandlar veya glandüler diferansiasyonun olmaması ile nükleer polarite kaybının görülmesi.

Grade IV: İndiferansiye karsinom (59,64,65).

“American Joint Committee on Cancer “ (AJCC) kolorektal çalışma grubu kanser prognostik faktörleri konsensus konferansında diferansiasyonu iki grupta birleştirmeyi önermiştir (Düşük grade: İyi ve orta diferansiye tümörler. Yüksek grade: Kötü diferansiye ve indiferansiye tümörler) (64,65). Yüksek gradeli tümörler kötü prognozlu, düşük grade'li tümörler iyi prognoz ile ilişkilidir (65).

2.3.3.3. Kolon kansinomlarında evrelendirme

Kolorektal kanserlerde evreleme sistemini ilk kez 1932 yılında Dukes önermiştir. Daha sonra Aster ve Coller 1954 yılında Dukes evreleme sistemini modifiye etmiştir (Tablo 2.2) (19,66,67).

Tablo 2.2. Dukes ve Modifiye Dukes evreleme sistemi

Dukes sınıflaması:	Aster and Coller (Modifiye Dukes):
Stage A; mukozaya sınırlı (müskülaris propriya tabakasına kadar)	Stage A; mukozaya sınırlı
Stage B; tüm bağırsak duvarı tutulmuş	Stage B1; müskülaris propriyaya ulaşmış, ancak aşmamış
Stage C; lenf nodu tutulumu, C1 bölgesel lenf nodu tutulumu, C2 mezenterik damarlara kadar ulaşan lenf nodu tutulumu	Stage B2; serozaya ulaşmış Stage C1; serozayı aşmamış, lenf nodu tutulumu var
Stage D; uzak metastaz	Stage C2; serozayı aşmış, lenf nodu tutulumu var

Günümüzde kolorektal kanserlerin evrelemesinde TNM klasifikasyonu kullanılmaktadır (Tablo 2.3) (59). Kolorektal kanserlerde en önemli prognostik faktör tanı sırasında tümörün yaygınlığı yani evresidir (31).

Tablo 2.3. Kolon ve rektum tümörlerinde TNM klasifikasyonu

T- Pimer tümör	M- Uzak metastaz
Tx Primer tümör hakkında bilgi yok	Mx Uzak metastaz hakkında bilgi yok
T0 Primer tümör saptanamamış	M0 Uzak metastaz yok
Tis Karsinoma in-situ	M1 Uzak metastaz var
T1 Tümör submukozaya ulaşmış	
T2 Tümör mükölaris propriyaya ulaşmış	Stage grupları
T3 Tümör mükölaris propriyayı aşmış subserozaya ulaşmış veya peritonize olmayan perirektal, perikolik dokulara ulaşmış	Stage 0 Tis No Mo
T4 Tümör visseral peritonu aşmış ve çevre dokuları invaze etmiş	Stage I T1 No Mo T2 No Mo
	Stage II T3 No Mo T4 No Mo
N- Bölgesel lenf nodu	Stage III Any T N1 Mo Any T N2 Mo
Nx Bölgesel lenf nodları hakkında bilgi yok	Stage IV Any T Any N M1
N0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok	
N1 Perikolik veya perirektal 1-3 lenf nodu metastazı mevcut	
N2 Perikolik veya perirektal 4 veya daha fazla metastaz mevcut	

Diğer prognostik faktörler:

Yaş ve cinsiyet:

Çok genç ve çok yaşlı hastalar kötü prognoz ile ilişkilidir. Yaş rektal tümörlerde kolonik tümörlere göre daha fazla önem taşımaktadır (68). Prognoz kadınlarda erkeklere göre daha iyidir (32,68).

CEA serum seviyesi:

Ameliyat öncesi yüksek CEA seviyesi olan kolorektal karsinomlu hastaların prognozu CEA seviyesi düşük olan hastalara göre daha iyidir. Serum CEA seviyesinin normal değeri sigara içmeyen olgular için <2.5 ng/ml, sigara içenler için <5.0 ng/ml'dir. CEA seviyesinin >5.0 ng/ml olması kötü prognoz ile ilişkilidir (69).

Tümörün lokalizasyonu:

Bu faktör tartışmalıdır, öneminin az olduğu belirtilmektedir. Sol kolon, sigmoid kolon ve rektum yerleşimli tümörlerin prognozunun ve geç dönem rekürrensini yüksek olduğu söylenmektedir. Sağ kolon ve trasvers kolon kanserlerinin prognozu ise daha iyidir (19,70).

Eş zamanlı tümör varlığı:

Senkron kanserlerin biyolojik davranışı daha ağırdır. Ancak senkron malignitesi olan hastalarda sağ kalım soliter kolorektal kanserli hastalara benzerdir (71).

Tümör çapı:

Tümör çapı ile prognoz arasında ilişki olmasına rağmen çok sayıda istisna da vardır ve güvenilir bir kriter değildir. Evrelemede Dukes sınıflamasında kullanılmış olup Dukes C evresi tümör derinliği, tümör çapı yanı sıra pozitif lenf nodu sayısı ile ilgilidir (19,72).

Obstruksiyon ve perforasyon:

Kolon perforasyonunun morbidite ve mortalite riski yüksektir. Bağırsak duvarının ekstansif tümör invazyonu ile tutulmasına bağlı perforasyon kötü prognoz göstergesidir (73).

Vasküler ve perinöral invazyon:

Ven invazyonu varlığında 5 yıllık sağ kalım belirgin azalır. Bağırsak duvarında bulunan kas tabakası dışındaki damarlar tutulduğunda daha fazla prognostik önemi vardır. Lenf damarı invazyonu, kan damarı invazyonundan daha az önemlidir. Ancak lenfovasküler invazyon evre III hastalığı temsil eder. Perinöral invazyon genellikle ileri evrenin işaretidir. Diğer olumsuz patolojik bulgulara eşlik etme eğilimindedir (19,74).

Cerrahi sınırlar:

Rektal kanserlerde nonperitonize yüzde adventisial yumuşak doku sınırının tutulumu en önemli prognostik faktörlerdendir. Rektal adenokarsinomlarda eğer radial cerrahi sınır 2 mm'den az ise lokal rekürrens riski yüksektir (75).

Lenf nodu tutulumu:

Kolon kanserlerinin prognoz ve tedavisi için yeterli sayıda lenf nodunun değerlendirilmesi önemlidir (76). Lenf nodu metastazı olması 5 yıllık sağ kalımı azaltmaktadır. Metastazı

olan lenf nodunun lokalizasyonu ve sayısı da önemlidir. Altı adet metastatik lenf nodu olan hastanın 5 yıllık sağ kalımı %10'dan azdır. Mezenterde 16 adet metastatik lenf nodu olan hastalar ise 5 yıl içinde ölmüşlerdir. Metastatik lenf nodunun en geniş çapı ile en büyük metastaz odağının çapı da önemli faktörlerdir (77).

Genetik ve onkojen ekspresyonu:

Tümörlerde genelde homojen DNA paterni vardır. Anöploidi, kromozom 18q alel kaybı, K-ras mutasyonu (41), telomeraz negatifliği (45,46) ve bcl-2, BAX, p53 protein ekspresyonu ve mikrosatellit instabilitesi ilerlemiş prognoz ile ilişkili iken “transforming growth factor- β ” (TGF- β) tip II reseptör mutasyonu, “human leucocyte antigen-DR” (HLA-DR) ve “human leucocyte antigen-A” (HLA-A) ekspresyonları iyi prognoz ile ilişkilidir (35).

2.4. Anjiogenezis

Kan damarlarının gelişimi iki mekanizma ile olur; vaskulogenezis ve anjiogenezis (78). Prenatal hayat sırasında ilkel kalp ve vasküler pleksus vaskulogenezis ile olur (79). Anjiogenezis mevcut mikrovasküler yataktan yeni kapiller ve kan damarlarının oluşması olarak da tanımlanabilir. Anjiogenezis ve vaskulogenezis arasındaki ayrım net değildir, birbiri ile örtüşmektedir (80). Postnatal hayatta anjiogenezis fizyolojik olarak follikül ve korpus luteum, uterus ve plasenta, ovarian ve menstruel siklusta ve hamilelikte, patolojik olarak ise kronik inflamasyon (diabetik retinopati veya romatoid artrit gibi) veya neoplazide etkilidir (81).

2.4.1. Damarların bileşenleri:

2.4.1.1. Endotelial hücreler:

Kan damarlarının içini astar gibi döşeyen hücrelerdir. Nitrik oksit ve prostasiklin gibi vazodilatörler ile endotelin gibi vazokonstrüktörler salgırlar (82). Endotel hücreleri migrasyon ve proliferasyon ile damar duvarı dışına çıkarlar (83). Endotel hücrelerinin yarı ömrü birkaç yıldır. Ancak endotel hücreleri büyüme faktörleri VEGF, “angiopoietin-1” (Ang-1) ve 2, TGF- β gibi, stimüle olduklarında hızlı bir şekilde çoğalır ve dışarı doğru tomurcuklanarak migrasyon gösterirler. Endotel hücreleri diğer endotel hücreleri ve periendotelial hücreler ile etkileşime girerler ve buna göre farklılaşırlar (84). “Vascular

endothelial cadherin” (VE-cadherin) endotel-endotel hücreleri arasında (85), endothelial-mural hücreler arasında VE-cadherin ve “nonepithelial cadherin” (N-cadherin) ile bağlantı vardır. Ayrıca $\alpha 5$ connexin/connexion 40 ve $\alpha 4$ connexin/connexion 37 ile bağlantı da vardır (86). Hücre yüzeyindeki adezyon molekülleri integrinler endotel hücreleri, mural hücreler ve çevreleyen matriks arasında iletişimi kontrol eder (87). Endotel hücreleri β -catenin aracılığı ile hücre içi ile etkileşimde bulunurlar (88).

2.4.1.2. Periendotelial hücreler/mural hücreler:

Kan damarları endotelial hücreler, bazal membran, periendotelial hücreler veya mural hücrelerden oluşur. Mural hücreler kapillerler ve postkapiller venüllerde perisitler, büyük damarlarda düz kas hücreleridir (89). Mural hücrelerde “ α -smooth muscle actin” (α -SMA), myosin, tropomyosin, desmin, nestin ve “platelet-derived growth factor receptor β ” (PDGFR- β) farklı organ ve damar türlerine göre bulunur (90).

2.4.1.3. Bazal membran:

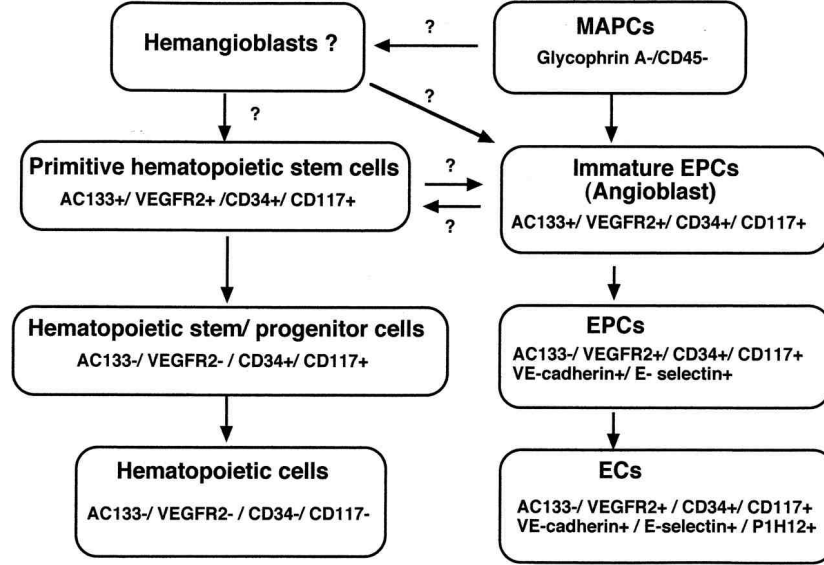
Bazal membran ekstrasellüler matriksin özel bir şeklidir. Epitel ve stromayı birbirinden ayırır. Hücreleri çevreleyen ekstrasellüler matrikste uzun filamentöz protein lifleri gerilme ve hücre hareketlerini ayarlar. Ekstrasellüler matrikste ayrıca yapısal proteinler ve kollajen, fibroblastlar, lektikan, perlekan ve heparin sülfat gibi proteoglikanlar, latent ve aktif büyüme faktörleri matrisellüler proteinler “secreted protein acidic and rich in cysteine” (SPARC), “thrombospondin-1” (TSP-1) ve “thrombospondin-2” (TSP-2), osteopontin, tenascins-C ve X bulunur (91).

2.4.2. Vaskülojenesis:

2.4.2.1. Prenatal vaskülojenesis:

Hematopoietik ve vasküler sistemlerin oluşumu embriyonik gelişim sırasında birbiri ile ilişkilidir. Ortak prekürsörleri vardır (92). Tipik olarak yolk sac içinde kan adalarında bulunan, hemanjioblastlardan oluşur. Hemanjioblastlar endotelial ve hematopoietik hücrelerin prekürsörleridir (Şekil 2.1) (93). Kan damarları embriyonik gelişim sırasında, vaskülojenesis ile anjioblast denilen endotel hücre prekürsörlerinin farklılaşması ve birleşmesi ile primitif bir vasküler ağ ve tübüller oluşur (79, 84, 92). VEGF ve “vascular endothelial growth factor receptor” (VEGFR) endotelial hücre prekürsörleri ile oluşan vaskülojenesis aktive eder. VEGF eksik embriyolarda primitif vasküler yapılar defektif

olur (94,95). VEGFR-2 eksikliğinde vaskulogenezisin ilk basamağı olan anjioblast migrasyonunda blokaj görülür (96). VEGDR-3 inaktivasyon büyük damarlarda erken gelişim sırasında lümen formasyonunu etkiler (97).



Şekil 2.1. Hemanjioblastların endotelial ve hematopietik hücelere farklılaşması

Masuda, H. et al. Cardiovasc Res 2003 58:390-398

MAPCs: Multipotent adult progenitor cells, EPCs: Endothelial progenitor cells, ECs: Endothelial cells

2.4.2.2. Postnatal vaskülogenezis:

Adultlarda kan damarlarının oluşumu anjiogenezis veya neovaskülarizasyon olarak bilinir. Endotelial progenitor hücelerden ve önceden var olan damarlardan olmak üzere iki yol ile anjiogenezis meydana gelir (31).

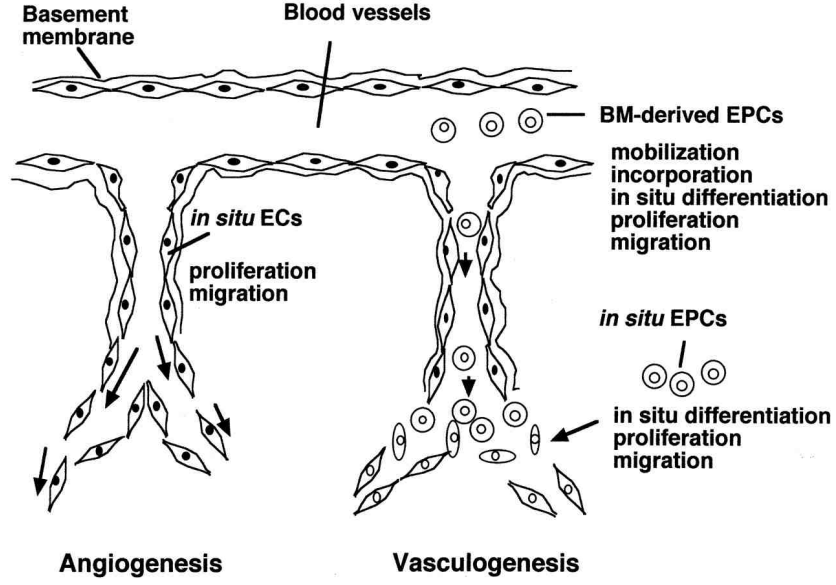
2.4.2.2.1. Endotelial progenitor hücelerden anjiogenezis:

Yeni bin yılın başında endotelial progenitor hüceler erişkinlerde kemik iliğinde depolandığı (98) ve anjiogenezi başlatmak üzere dokularda toplanabildiği anlaşılmıştır. Bu hedefe yönelme “homing” mekanizması belli değildir (31). Endotelial progenitor hüceler kemik iliğinden başka yağ doku, damar duvarı, özellikle adventisia, dalak, karaciğer ve bağırsakta bulunabilir (99). Endotelial progenitor hüceler CD31, CD34, VEGFR-2 (96), VE-cadherin, E-selektin ve angiopietin reseptörü Tie2 gibi endotele spesifik belirleyicileri de eksprese ederler (100). VEGF, tirozin kinaz reseptörü aracılığı ile kemik iliğinden mobilize olur endotelial progenitor hüceler kaybedilen endotel hücelerinin yerine konmasında, vasküler implantların yeniden edotelizasyonunda ve iskemik organların,

kutanöz yaraların ve tümörlerin neovaskülarizasyonunda görev alırlar (31). Endotelial progenitor hücreler prolifer olurlar, periferik bölgelere göç ederler, endotel hücrelerine farklılaşırlar (Şekil 2.2). VEGF stromal ve mezenkimal hücreler tarafından salgılanır ve postnatal hayatta anjioblastların endotel hücrelerine farklılaşmasını düzenler. Endotel hücre proliferasyonu, diferansiasyonu ve göçü “fibroblast growth factor-2” (FGF-2) tarafından da arttırılabilir. Ayrıca perisitleri ve damar duvarlarının düz kas hücrelerini de periendotelial hücreler oluşturabilirler.

2.4.2.2.2. Önceden var olan damarlardan anjiogenez:

Hipoksi vasküler yatağın genişlemesi için önemli bir uyarıcı faktördür. Nitrik oksite (NO) yanıt olarak vazodilatasyon ve VEGF'nin uyarısı ile damar geçirgenliğinde artış olur (31). Damar içindeki plazma ve proteinlerin damar dışına sızması geçici bir süre matriks olarak hizmet verir. “Matrix metalloproteinases” (MMPs) ile ana damarın bazal membranında proteolitik yıkım ve plazminojen aktivatörü ile damarın endotel hücreleri arasındaki hücre-hücre bağlantısını bozar (31,101). Endotel hücrelerinin anjiogenik uyarıya doğru göçü hücre adezyon molekülleri olan integrinler ve ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşim ile olur. Göç eden hücrelerin hemen arkasındaki endotel hücrelerinin proliferasyonu VEGF gibi mitojenlere cevap olarak gerçekleşir (Şekil 2.2) (31,84). Büyüme inhibisyonu ve kapiller tüplerin yeniden biçimlendirilmesini içeren endotel hücreleri matürleşirler (31). Kapiller oluşumuna yol açan olay ne olursa olsun yeni oluşan damarlar son derece fajildir, stabilize olması gerekir. Stabilizasyon ise perisitlerin ve düz kas hücrelerinin toplanmasını ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin depolanmasını gerektirir. Ang-1 ve Ang-2, “platelet derived growth factor” (PDGF) ve TGF- β stabilizasyon sürecine katılırlar. Ang 1, Tie 2 reseptörüne periendotel hücrelerini çekmek için bağlanır. Tie 2 endotel hücre yüzeylerinde bulunur. PDGF düz kas hücrelerinin toplanmasında görev alır. TGF- β ekstrasellüler matriks proteinlerinin üretimini arttırarak yeni damarları stabilize eder. Tie 2'ye bağlanan Ang 2, Ang 1'e zıt etki yapar (102). Periendotelial hücrelerin (kapillerler için perisitler, daha büyük damarlar için vasküler düz kas hücreleri) endotel tüpleri desteklemek ve matür damarı oluşturmak üzere toplanırlar (103).



Şekil 2.2. Önceden var olan damarlardan anjiyenez

Masuda H. et al. Cardiovasc Res 2003 58:390-398

2.4.2.2.3. Anjiyenez düzenleyicisi ekstrasellüler matriks proteinleri:

İntegrinler: Anjiyenez için bir integrin olan $\alpha\beta3$ hipoksi ile uyarılır.

Matrisellüler proteinler: Trombospondin 1, SPARC ve tenasin C hücre-matriks etkileşimini destabilize eder.

Plazminojen aktivatörleri ve proteinazlar: Endotel invazyonu sırasında dokunun yeniden biçimlendirilmesinde önemlidir. Proteinazlar VEGF ve FGF-2 anjiyenezi uyaran matrikse bağlı büyüme faktörlerinin serbest kalmasını sağlar. Ayrıca anjiyenezi inhibe eden kollajenin küçük bir fragmanı olan endostatinin serbest kalmasına yol açar.

Fibronektin, trombospondin ve osteopontin gibi ekstrasellüler matriks koponentleri adezyonda aracılık eder (31).

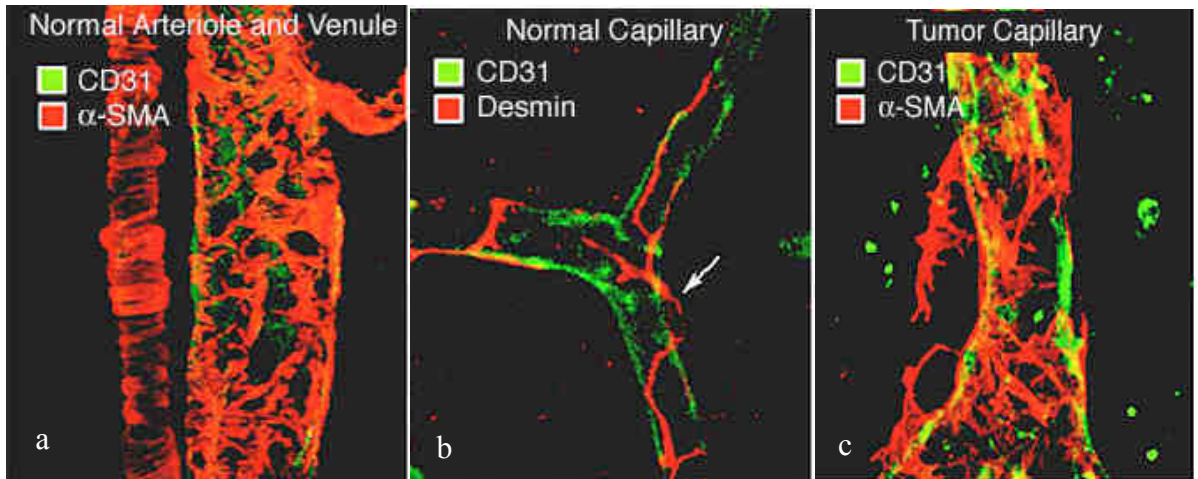
2.5. Tümördeki anjiyenezisin gelişimi

Vaskülarizasyon olmazsa tümörler 1-2 mm'lik çap veya kalınlıktan daha fazla büyüyemezler. Çevre ile oksijen, besin ve artık maddelerin difüzyonu 2 mm çaplık bir alandan daha fazla alanda gerçekleşmez. Tümördeki damarlanma yerel hücrelerden salınan faktörler ile kontrol edilir. Erken dönemde perfüzyon eksikliği nedeni ile hipoksi olur. Vasküler hasar ve yoğun metabolik aktivite nedeni ile bu bölgeye inflamatuvar hücreler gelir. Tümör ile ilişkili anjiyjenik faktörler, tümör hücreleri veya tümörü infiltre eden inflamatuvar hücrelerden (örneğin makrofajlar) kaynaklanabilir. Tümör ile ilişkili bir

düzine anjiogenik faktörden en önemli ikisi VEGF ve “basic fibroblast growth factor” (bFGF)’dür (104).

Çoğu insan tümörü büyümenin erken döneminde anjiogenezi uyarmaz. Aylarca ve yıllarca in situ olarak kalırlar. Daha sonra tümörün bazı hücreleri anjiogenik fenotipe dönüşür. Bu değişiklik anjiogenik anahtar (“switch”) olarak bilinir (105). p53’ün her iki alelinin mutasyonel inaktivasyonunda trombospondin-1 düzeyi düşer, VEGF artar. Tümör hipoksisi ile “hypoxia-inducible transcription factor-1” (HIF-1) üretimi artar. Böylece denge anjiogenik faktörler lehine değişir. Tümör hücreleri aynı zamanda trombospondin-1 gibi anti-anjiogenik moleküller de üretirler. Anjiogenezi inhibitörleri ayrıca plazminojenin (anjiostatin) ve kollajenin (endostatin, tumstatin) proteolitik yıkımından elde edilir (31).

Tümörlerdeki kan damarlarının tanınması tedavide hedef olacağı için klinik olarak önemlidir (106). Tümörün kan damarları kıvrıntılı, düzensiz şekilli ve sızdıran özellikte olmaları ile normal damarlardan ayrılır. Tümör damarları sürekli olarak büyüyebilir (31). Tümör damarlarındaki perisitler endotel hücreleri ile gevşek ilişkidir, bazı perisitler parankime doğru çıkıntı yapar, bazı perisitlerde üst üste binme görülür (Resim 2.7) (107). Tümör damarları yapılarındaki bu anormal özellikler nedeni ile normal damar yapısını bozmadan tedavi ve nüksün önlenmesinde hedef olurlar (90).



Resim 2.7. Mural hücrelerin normal ve tümör kan damarlarındaki morfolojileri

Am J Pathol 160: 985-1000, 2002.

Soldaki geniş olan arteriol, sağdaki venüldür (a). Normal perisitler (b) ve bazı perisitlerde parankime doğru çıkıntı vardır ve bazı perisitlerde üst üste binme görülmektedir (c) (86).

2.6. Anjiogenezin değerlendirilmesinde kullanılan immünohistokimyasal belirteçler

2.6.1. CD34 (Endotelyal hücre belirteci):

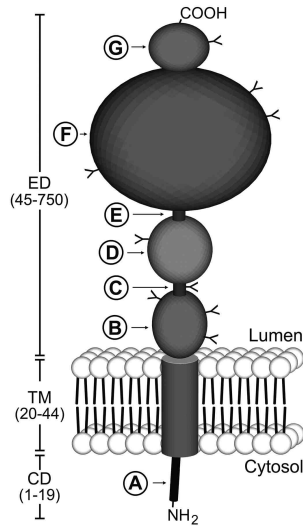
CD34 tek zincirli transmembran glikoproteinidir. Özellikle seçici olarak insan lenfoid ve myeloid hematopoietik progenitor hücrelerde eksprese olur. CD34 antikoru aynı zamanda normal dokuda, benign ve malign proliferasyonlardaki vasküler endotelyal hücrelerde immünreaktivite gösterir. Bu antikor anjiogenezi ölçmek ve tümör rekürrensini tahmin etmek için kullanılmaktadır. CD34 neoanjiogenezi derecesini doğrudan işaretleyerek damar yoğunluğunu vurgulamak için kullanılan endotelyal antijendir (108).

2.6.2. VEGF (Vascular endothelial growth factor):

VEGF homodimerik, disülfid bağımlı glikoproteindir. VEGF ailesinin şu anda altı üyesi VEGF, plasental “growth” faktör, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E olarak bilinmektedir. VEGF geni kromozom 6p21.3’te yerleşmiş, 8 exon ve 7 intron bölgesinden oluşmuştur. Peptit zincirindeki aminoasitlerin farklı olması nedeni ile altı farklı isoformu VEGF-121, VEGF-145, VEGF-183, VEGF-189 ve VEGF-206 vardır. Çalışmamızda VEGF-121, VEGF-165 ve VEGF-189 olmak üzere üç izoform içeren ve VEGF-165 izoformu baskın olan tip kullanılmıştır. VEGF’nin üç reseptörü, VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1/KDR ve VEGFR-3/Flt-4’tür. Bu reseptörlerin fonksiyonu vasküler gelişim sırasında sinyal iletimidir. VEGFR-1 ve VEGFR-2’leri embriyonik gelişim sırasında endotel hücreleri yüzeyinde bulunan tirozin kinaz (RTKs) reseptörleridir. VEGFR-2 tümör vaskularizasyonu, büyümesi, metastazı ve Flk-1 reseptörü tümör anjiogenezi ile alakalıdır. VEGF ile indüklenen büyüme faktörleri ve sitokinler ki bunlar PDGF, “fibroblast growth factor” (FGF), “tumor necrosis factor- α ” (TNF- α), TGF- β ve “interleukin-1 β ” (IL-1 β) aracılığı ile parakrin etki ile anjiogenezi başlatılır. Ayrıca otokrin etki ile tümör hücreleri stimüle olur (4,109,110). Saclarides tarafından 1994’te rektum kanserlerinde yapılan prognostik çalışmada ve daha sonra yapılan birçok çalışmada anjiogenezin kolorektal kanserler üzerine negatif prognostik etkisi olduğu görülmüştür (6).

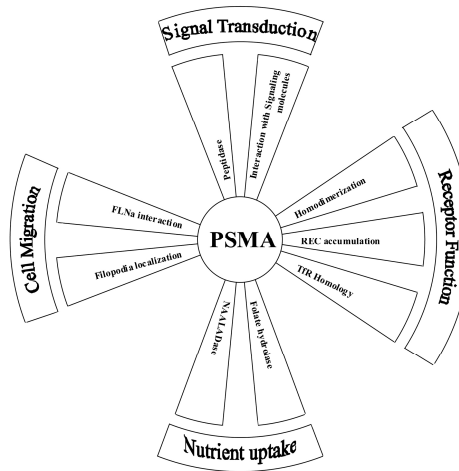
2.6.3. Prostat spesifik memebran antijen (PSMA):

PSMA tip II transmembran glikoproteindir. Ortalama moleküler ağırlığı 100kDa'dur. Kromozom 11'in kısa kolundaki DNA segmenti tarafından kodlanır (7). NH₂ sitoplazmik uçtur ve 19 aa'ten oluşan intrasellüler kısımdır. Hidrofobik transmembran alanı 24 aa'ten oluşur. Ekstrasellüler alan 707 aa'ten oluşan en büyük kısımdır ve COOH ucunu kapsar (Şekil 2.3) (111,112).



Şekil 2.3. PSMA'nın yapısı

Am J Physiol Cell Physiol 288: 975-981, 2005



Şekil 2.4. PSMA'nın fonksiyonu

Am J Physiol Cell Physiol 288: 975-981, 2005

PSMA'nın hücre içinde birden çok fonksiyonu vardır (Şekil 2.4). Reseptör fonksiyonu; “transferrin receptor” (TfR) homolojisi, “recycling endosomal compartment” (REC) birikimi ve homodimerizasyonudur. “N-acetylated, α -linked acidic dipeptidase” (NAALADase) (nörokarboksi peptidaz) ve folat hidrolaz aktiviteleri besin alımı ile ilgili enzim aktiviteleridir. “Filamin A” (FLNa) ile filopodial yapı hücre göçü ile ilişkilidir. Sinyal iletimi fonksiyonu ve sinyal iletim molekülleri ile etkileşimi; peptidaz aktivitesi hücre sağ kalım, migrasyon ve proliferasyonunu aktive eder (113).

PSMA başlangıçta prostat glandlarında güçlü ekspresyon göstermesi ile karakterize idi. Benign prostat sekretuar - asiner epitelde, prostatik intraepitelyal neoplazi veya yüksek grade prostatik adenokarsinomada ve hormona duyarsız prostat adenokarsinomunda güçlü ekspresyon gösterir (114). Normal prostatik sekretuar epitelde heterojen olarak düşük seviyede ekspresyon gösterirken, prostatik adenokarsinomada homojen ve yüksek seviyede

ekspresyon göstermektedir. Tümör grade'i ve evresi yüksek olan olgularda PSMA ekspresyonu direkt artmış olarak izlenmektedir (115,116).

PSMA ekspresyonu prostat dokusu yanı sıra benign dokularda duodenum, böbrek ve memede de bulunur (9,117). Bu dokulardaki ekspresyonu epitel ile sınırlıdır ve damarlarda ekspresyon görülmez. Tersine PSMA solid malign tümörlerde yeni kan damarlarında ekspresyon olur. Yeni kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunur. PSMA daha çok solid kanserlerde tümör ile ilişkili yeni kan damarlarında izlenirken, normal damar endotelinde görülmez (9,11). PSMA'nın tümör ile ilişkili endotele özgüllüğü, PSMA'yı malignitelerin tedavisinde potansiyel hedef yapar (11).

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olguların genel özellikleri

Bu çalışmada 1995-2005 yılları arasında Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı arşivi kullanılarak kolon karsinomu tanısı almış olan olgular yeniden gözden geçirilmiş ve çalışmaya düzenli klinik takibi olan 100 olgu alınmıştır. Olgu seçiminde yaş ve cinsiyet göz önünde bulundurularak istatistiksel olarak eşit dağılım göstermesine dikkat edilmiştir. Her olgunun dosyasından hayatta kalma süresi, metastaz varlığı, hastalıktan ölüm ve ortalama takip süresi araştırılmıştır.

3.2. Hematoksilen & Eozin (H&E) boyalı kesitlerin değerlendirilmesi

Olguların H&E boyalı preparatlarının tamamı yeniden değerlendirilerek tümörün grade'i, patolojik evresi belirlenmiştir. Ayrıca tümörlerin tümünde, vasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı ve metastatik lenf nodu sayısı yeniden değerlendirilmiştir.

Mikroskopik olarak kolorektal karsinomlar WHO klasifikasyonu (59) ile grade'lenmiştir. Buna göre; kompleks veya basit tübül formasyonu kolayca ayırt edilebilen, nükleer polaritesi korunmuş, üniform nükleusları olan tümörler iyi diferansiye tümörler olarak, kompleks, basit veya hafif irregüler tübül formasyonu olan ve nükleer polaritede kaybı olan tümörler orta derecede diferansiye tümörler olup son derece irregüler glandlar ,çeren veya glandüler diferansiasyonu olmayan ve nükleer polarite kaybı olan tümörler kötü diferansiye olarak gradelenmiştir.

Kolon karsinomlarının evrelendirmesi TNM klasifikasyonuna göre yapılmıştır (2,98).

Olguların hepsinde diseke edilen ortalama lenf nodu sayısı $16,3 \pm 2,3$ olarak bulunmuştur. Lenf nodlarının tümü yeniden değerlendirilmiş ve metastaz varlığı açısından incelenmiştir. Metastaz gösteren lenf nodu sayısı kayıt edilerek lenf nodları metastaz gösterme açısından gruplandırılmıştır. Buna göre lenf nodları grade 0'dan grade 3'e kadar aşağıdaki gibi 4 grupta sınıflandırılmıştır.

- LN 0 = Hiç metastaz olmayan grup
LN 1= 1 – 4 adet lenf nodu metastazı olan grup
LN 2= 5 – 7 adet lenf nodu metastazı olan grup
LN 3= >7 adet lenf nodu metastazı olan grup olarak belirlenmiştir.

3.3. İmmünohistokimyasal boyama yöntemleri

Her bir olgu için histomorfolojik olarak tümör diferansiasyonunu en iyi temsil eden, komşu normal mukozanın da izlendiği, doku fiksasyon ve takip sorunu olmayan, morfolojinin en iyi korunmuş olduğu kesite ait parafin blok çalışma için seçildi. Seçilen parafin bloklarında poly-l-lysine ile kaplı lamlara 3 µ kalınlığında kesitler alındı. İmmünohistokimya uygulanacak kesitler 37 ° C etüvde bir gece boyunca deparafinize edildi. Hidrate edilen kesitlerin distile suda taze hazırlanan %3 H₂ O₂ çözeltisi ile 15 dakikada endojen peroksidaz aktivitesi baskılandı. 10mMol pH 8 EDTA çözeltisi ile antijen retrieval işlemi mikrodalga fırında 15 dakika süre ile uygulandı. 15 dakika soğumaya bırakılan preparatlar distile su ile yıkanarak pH 7.6 olan Phosphate Buffer Saline (PBS) çözeltisine alındı. PBS'de hazırlanan %5 Bovine Serum Albumine Fraction V ile oda ısısında 5 dakika protein blokajı uygulanan kesitlere PSMA (monoclonal mouse, clone YPSMA-1, GeneTex) 3 saat oda ısısında uygulandı. Biotinlenmiş immünglobulin oda ısısında 20 dakika süre ile uygulandı. 20 dakika süre ile oda ısısında peroksidaz konjuge streptovidin uygulanan kesitlerin görüntülenmesi DAB ile sağlandı, zemin boyaması için Harris Haematoxyline kullanıldı. Dehidrate edilen kesitler nonaqueus kapama maddesi ile kapatıldı. Çalışmada yöntemin kontrolü için pozitif kontrol olarak prostat adenokarsinomu kullanıldı. Sitoplazmik ve hücre membran boyanması gösteren hücreler pozitif olarak değerlendirildi.

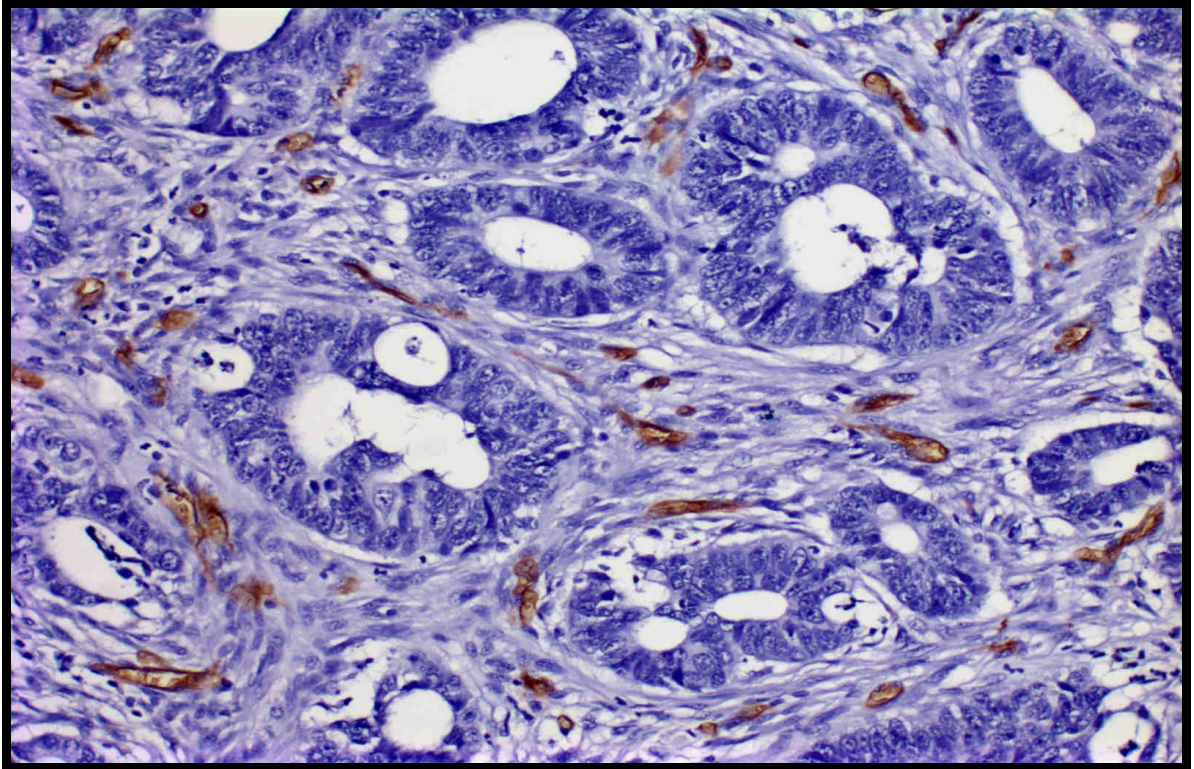
Aynı basamaklar VEGF antikoru (monoclonal mouse, clone VG-1, DakoCytomation), CD34 antikoru (monoclonal mouse, clone QBEnd/10, ScyTek) ve CD68 antikoru (monoclonal mouse, clone KP1, Dako) için de farklı seri kesitlerde tekrarlanmıştır. CD34 boyamasında farklı basamak olarak antikor inkübasyon süresi 2 saat olarak uygulanmıştır. CD68 boyamasında ise farklı olarak EDTA yerine CİTRAT kullanılmış ve antikor inkübasyonu 2 saat olarak uygulanmıştır.

Pozitif kontrol olarak VEGF antikorunu için kuvvetli sitoplazmik boyanma gösterdiği kolon adenokarsinomu, CD34 antikorunu için böbrek dokusu ve CD68 antikorunu için tonsil kesitleri kullanıldı.

3.4. İmmünohistokimyasal olarak boyanan kesitlerin değerlendirilmesi

3.4.1. Anjiogenezis değerlendirmesi:

Damar yoğunluğunu belirlemek için her bir olguda, nekrozu olmayan ve CD34 pozitif hücre yoğunluğunun en fazla olduğu alan sayım için seçildi. Damar sayımı için CD34 pozitif tüm hücreler sayıma dahil edildi ve sayım Zeiss MC 80 Dx (Germany-Axioplan) mikroskopta x200 büyütme altında, 1 cm²'lik alana sahip grid alanında sayıldı. 1 cm²'lik grid alanında sayılan CD34 pozitif hücre sayısı tümörün 1 cm²'deki damar sayısı olarak kabul edildi (Resim 3.1).



Resim 3.1. CD34 antikorunu ile boyanan yeni kan damarları (x200)

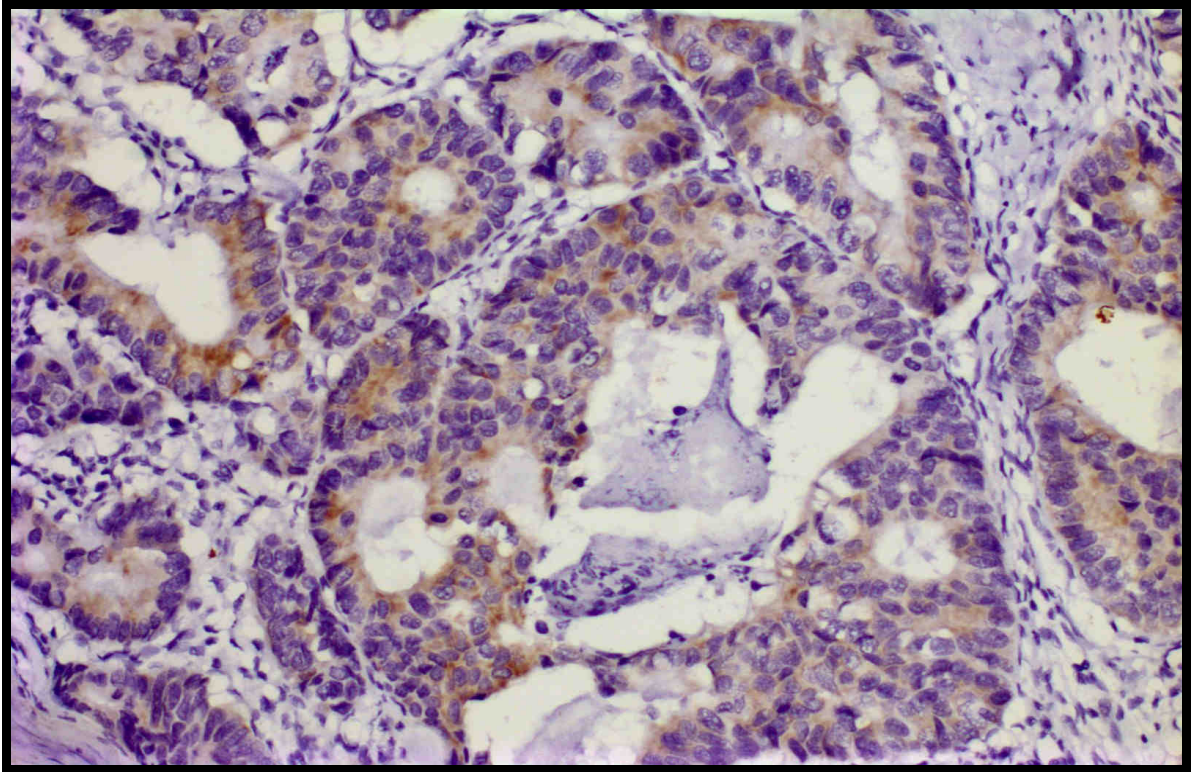
3.4.1.1. VEGF ve PSMA antikorum ile boyanan kesitlerin değerlendirilmesi:

VEGF ve PSMA ile boyanan tüm örnekler, hem tümör hücrelerinde hem de tümörün içinde yer alan damar endotelindeki ekspresyonu değerlendirildi. Tümör hücrelerinde boyanma gösteren VEGF ve PSMA, T-VEGF ve tümör – prostat spesifik membran antijen (T-PSMA) olarak belirlendi. Damar endotelinde boyanan VEGF ve PSMA, D-VEGF ve damar – prostat spesifik membran antijen (D-PSMA) olarak belirlendi. Değerlendirmeler semikantitatif olarak yapıldı ve aşağıdaki gibi sınıflandırıldı.

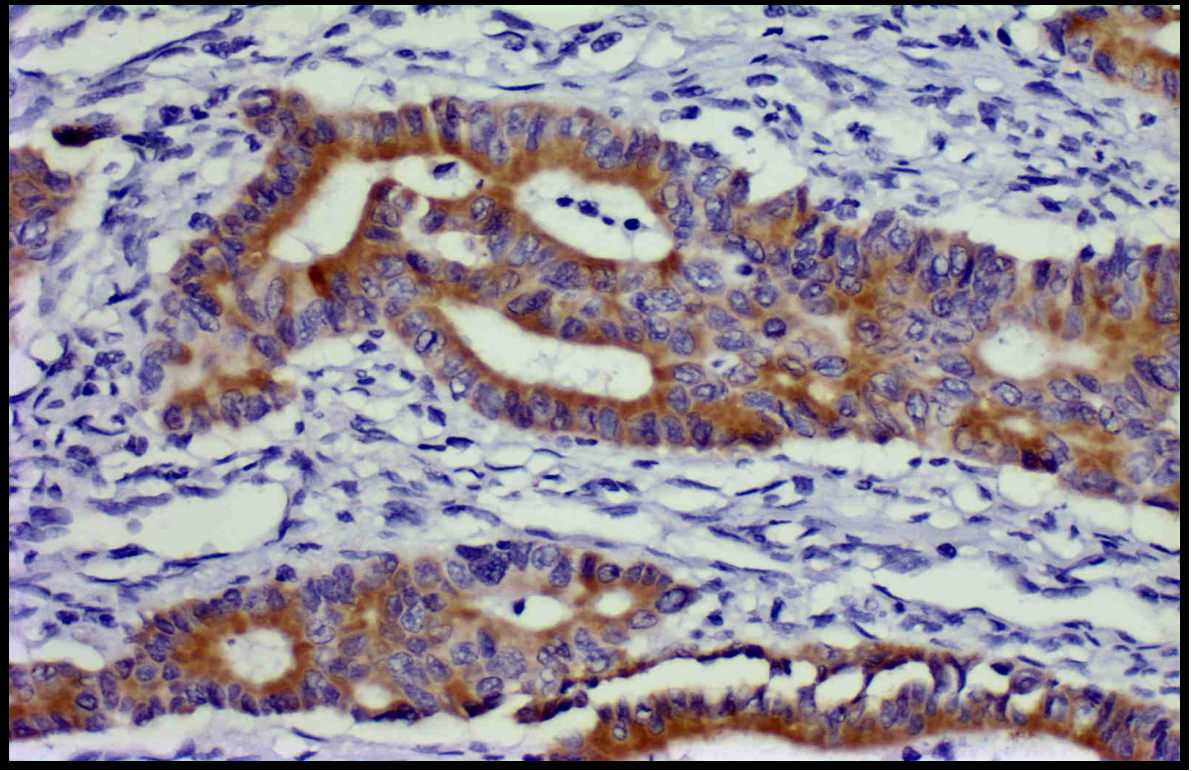
Grade 1= < %30 (tümör hücrelerinin, damar endotellerinin %30'undan azında boyanma varsa) (Resim 3.2, resim 3.5, resim 3.8, resim 3.11)

Grade 2= %31-60 (tümör hücrelerinin, damar endotellerinin %31-60'ında boyanma varsa) (Resim 3.3, resim 3.6, resim 3.9, resim 3.12)

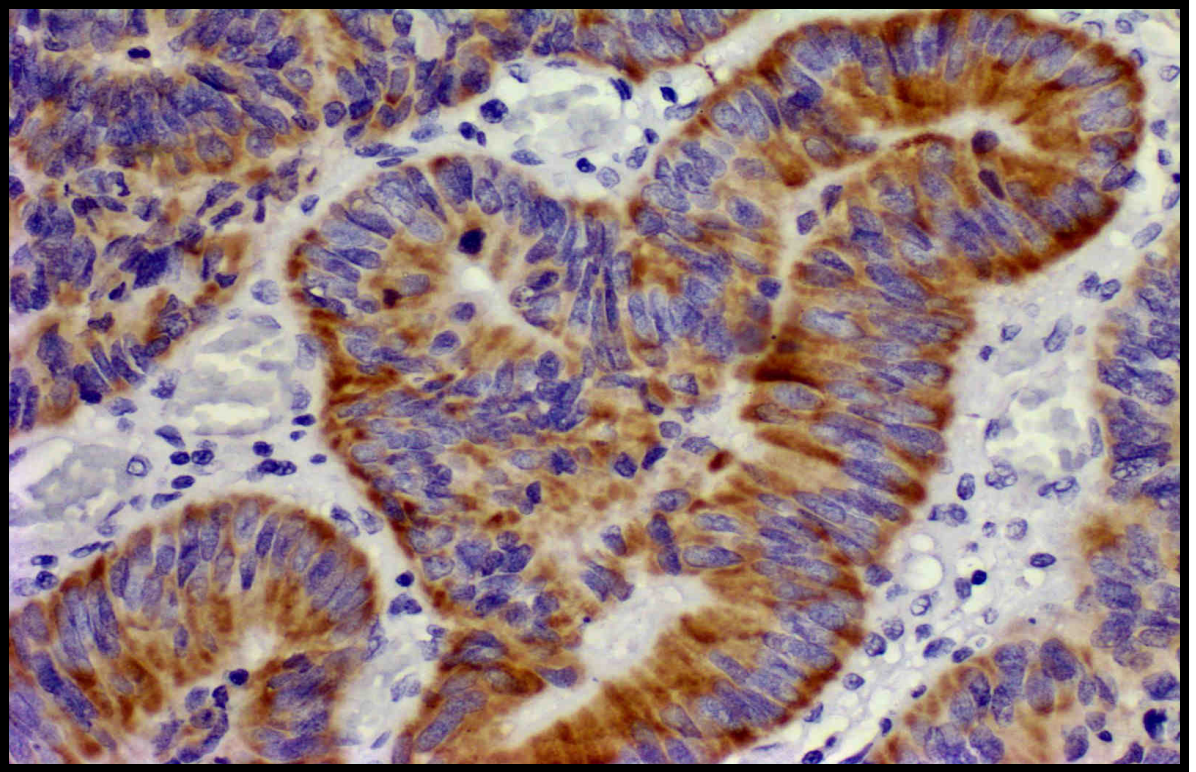
Grade 3= > %60 (tümör hücrelerinin, damar endotellerinin %60'ından fazlasında boyanma varsa) (Resim 3.4, resim 3.7, resim 3.10, resim 3.13)



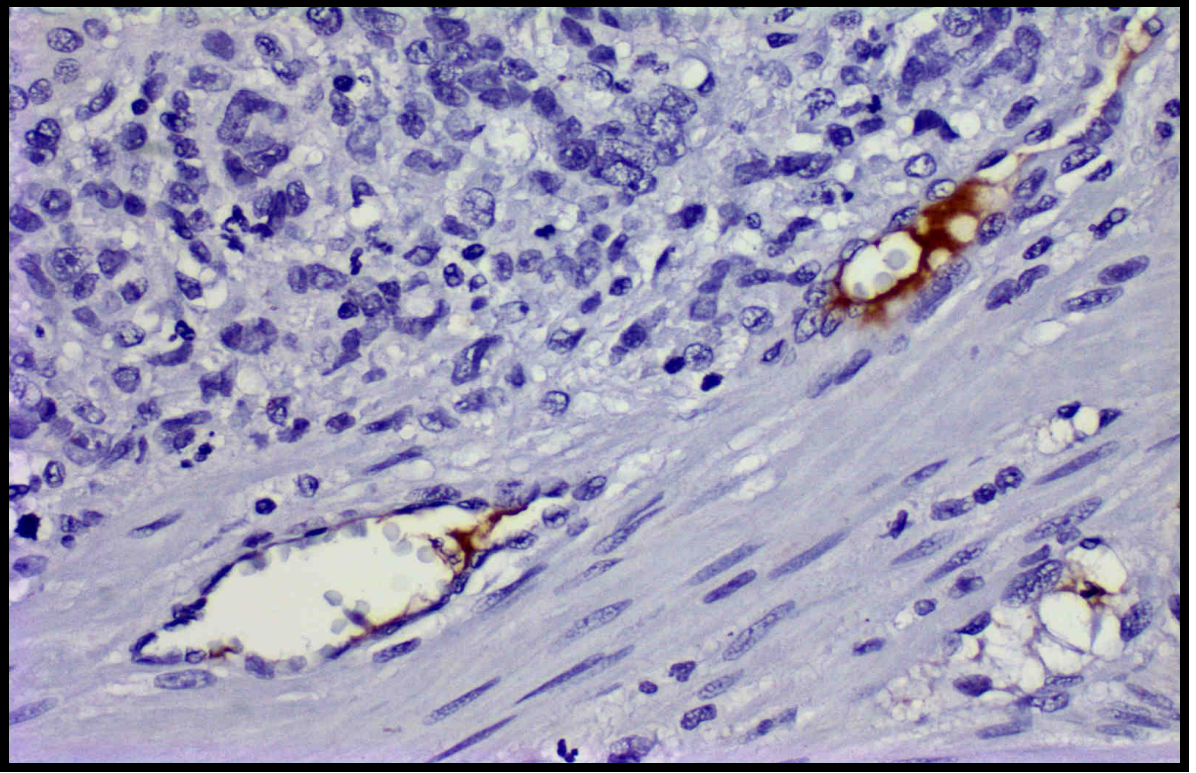
Resim 3.2. T-VEGF antikoru ile tümör hücrelerinde grade 1 boyanma (x200)



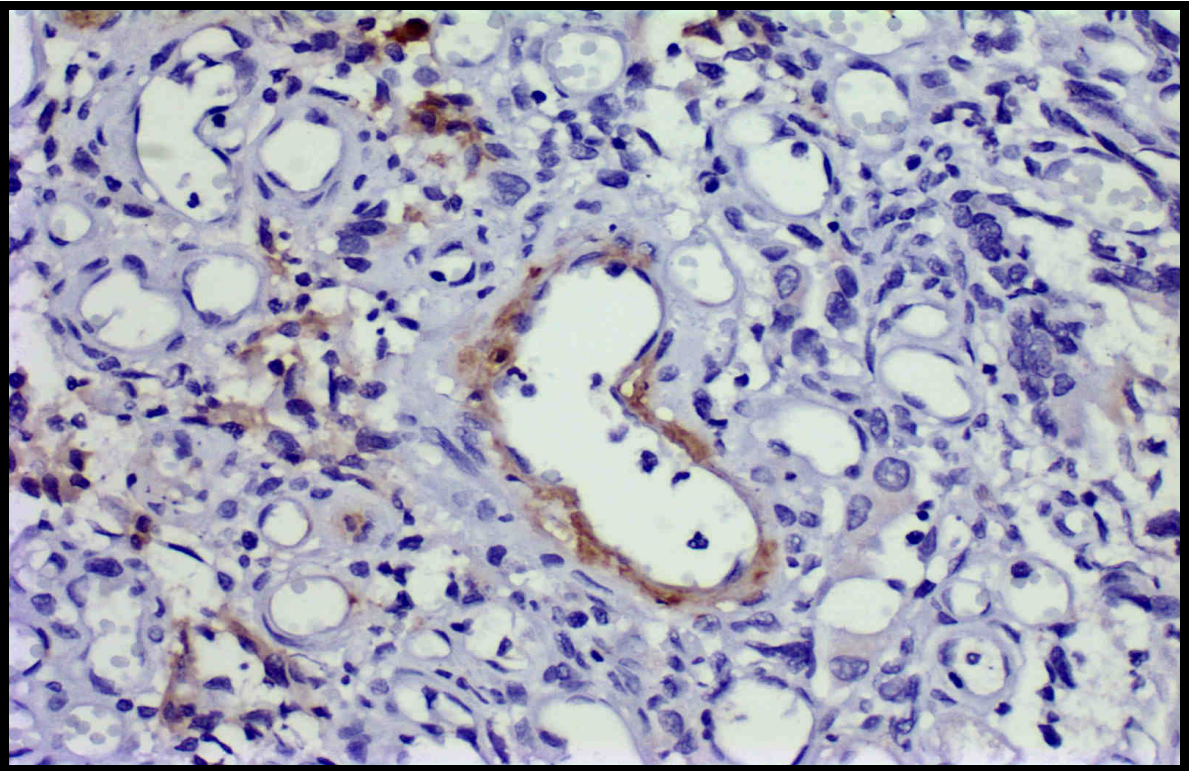
Resim 3.3. T-VEGF antikoru ile tümör hücrelerinde grade 2 boyanma (x400)



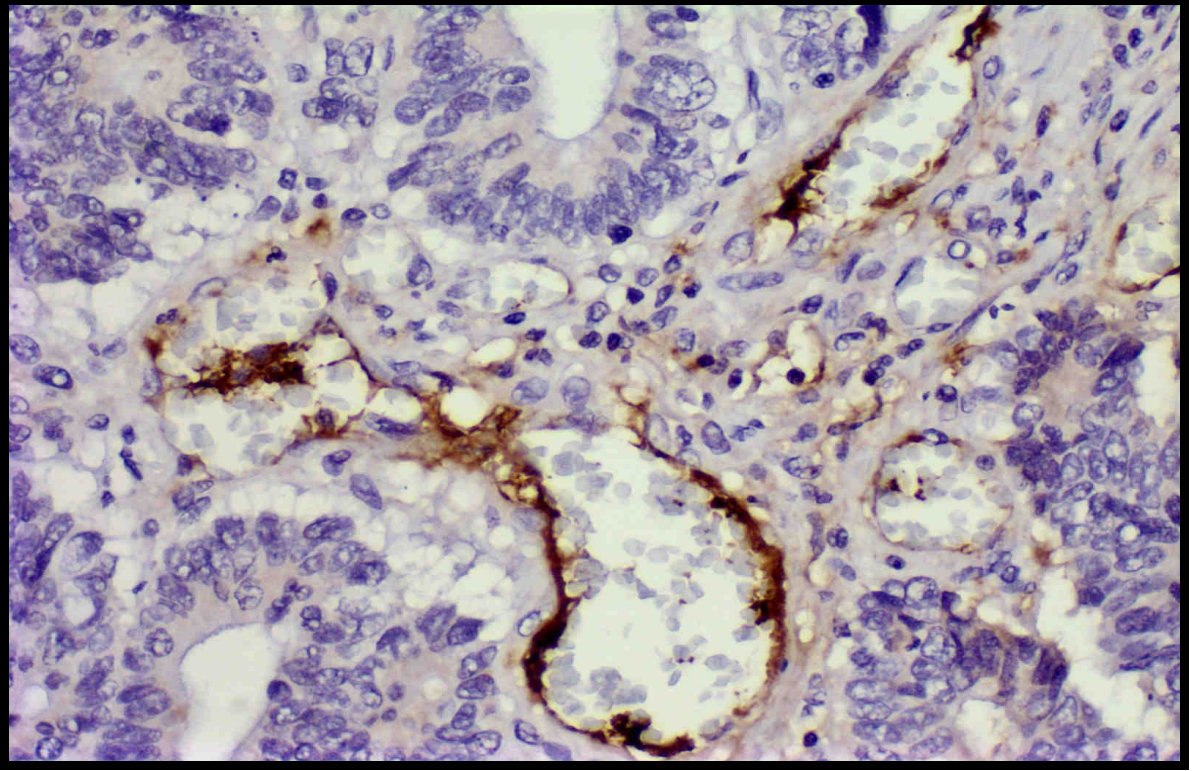
Resim 3.4. T-VEGF antikoru ile tümör hücrelerinde grade 3 boyanma (x400)



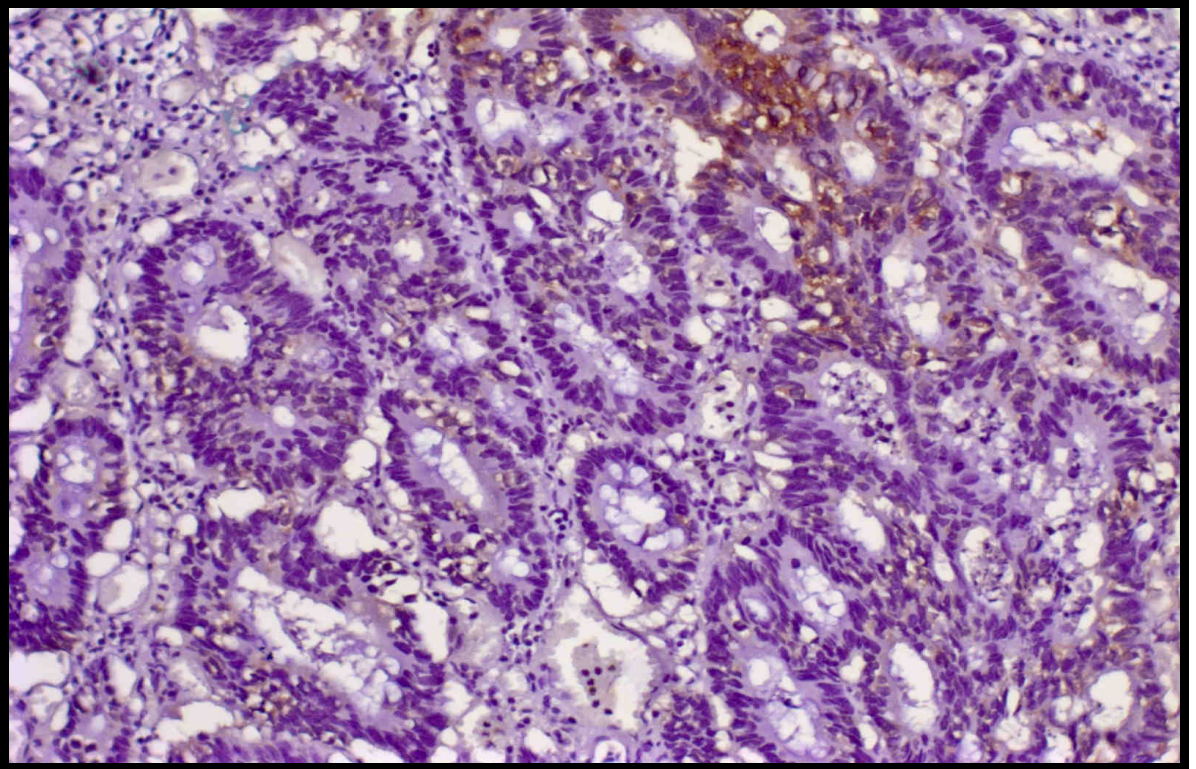
Resim 3.5. D-VEGF antikoru ile tümör damar endotellerinde grade 1 boyanma (x400)



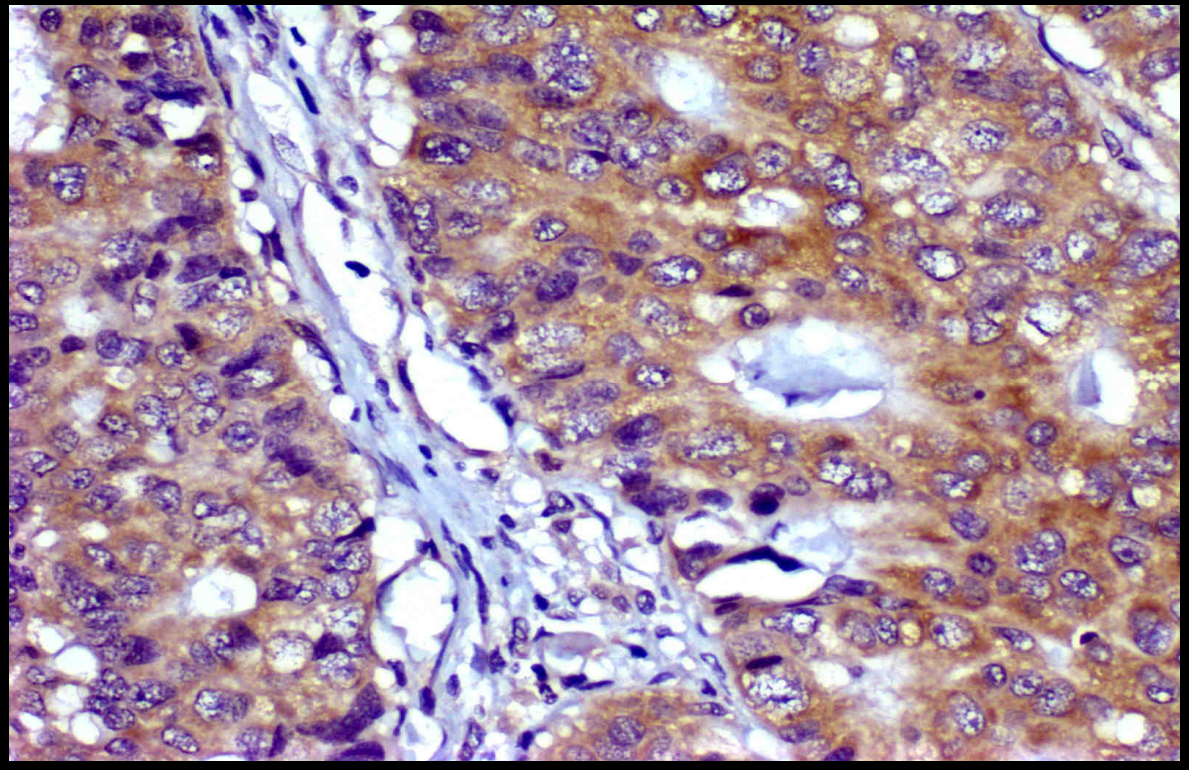
Resim 3.6. D-VEGF antikoru ile tümör damar endotellerinde grade 2 boyanma (x400)



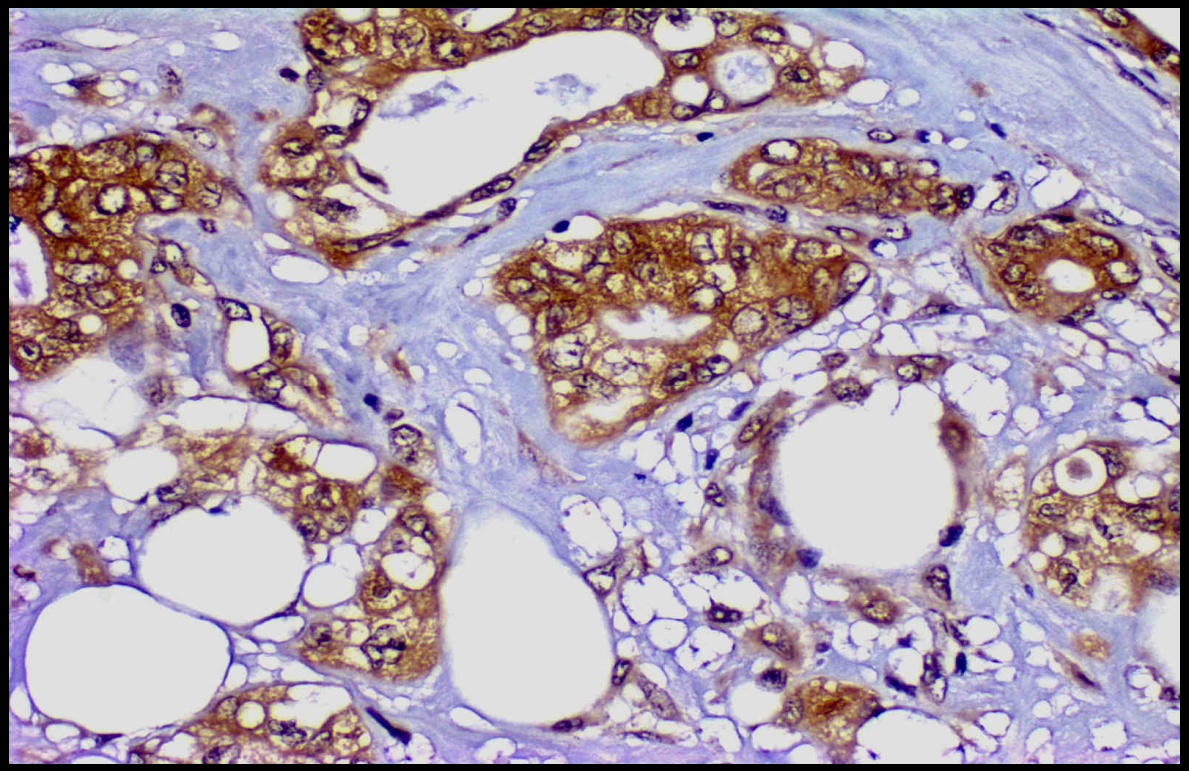
Resim 3.7. D-VEGF antikoru ile tümör damar endotellerinde grade 3 boyanma (x400)



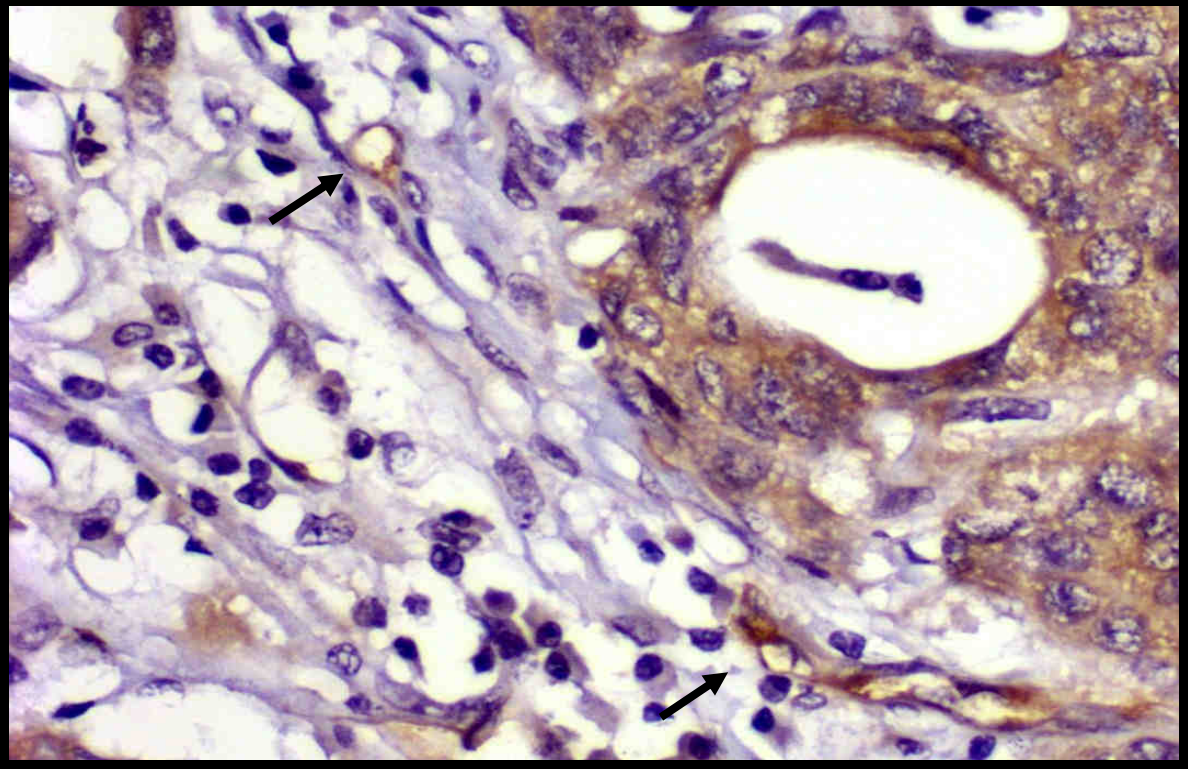
Resim 3.8. T-PSMA antikoru ile tümör hücrelerinde grade 1 boyanma (x200)



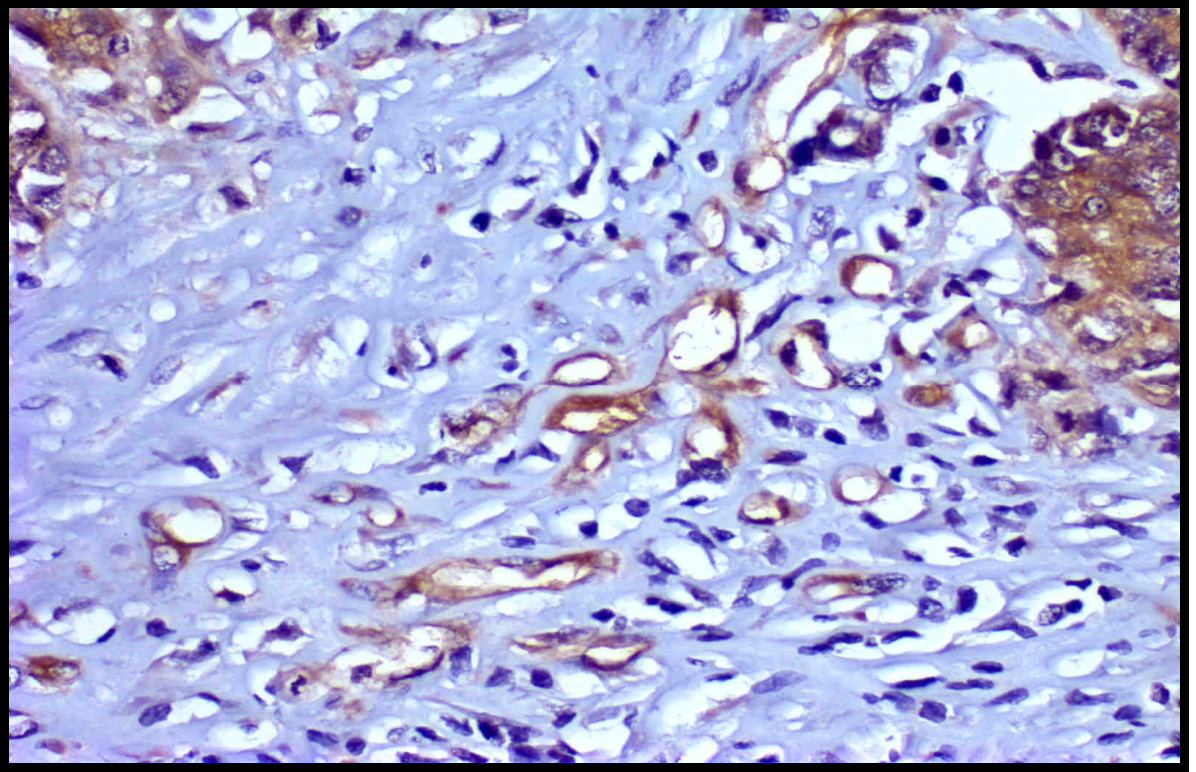
Resim 3.9. T-PSMA antikoru ile tümör hücrelerinde grade 2 boyanma (x400)



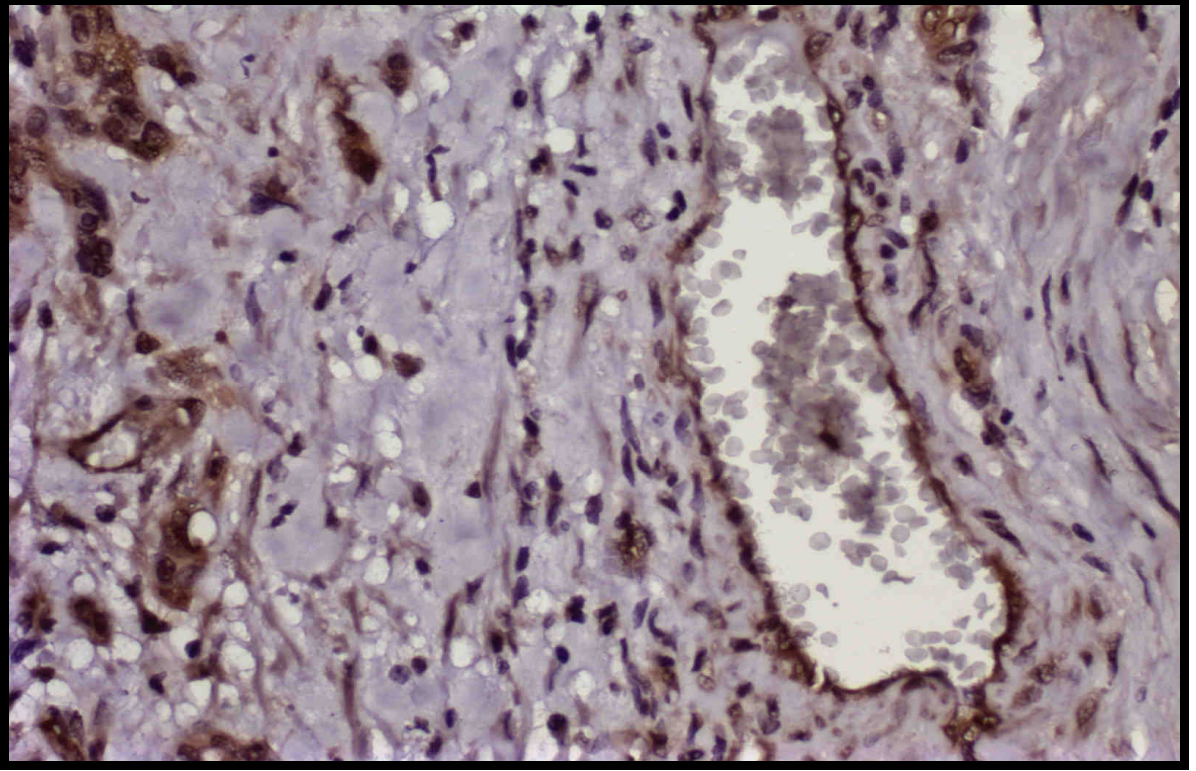
Resim 3.10. T-PSMA antikoru ile tümör hücrelerinde grade 3 boyanma (x400)



Resim 3.11. D-PSMA antikoru ile tümör damar endotellerinde grade 1 boyanma (x400)



Resim 3.12. D-PSMA antikoru ile tümör damar endotellerinde grade 2 boyanma (x400)



Resim 3.13. D-PSMA antikoruna ile tümör damar endotelinde grade 3 boyanma (x400)

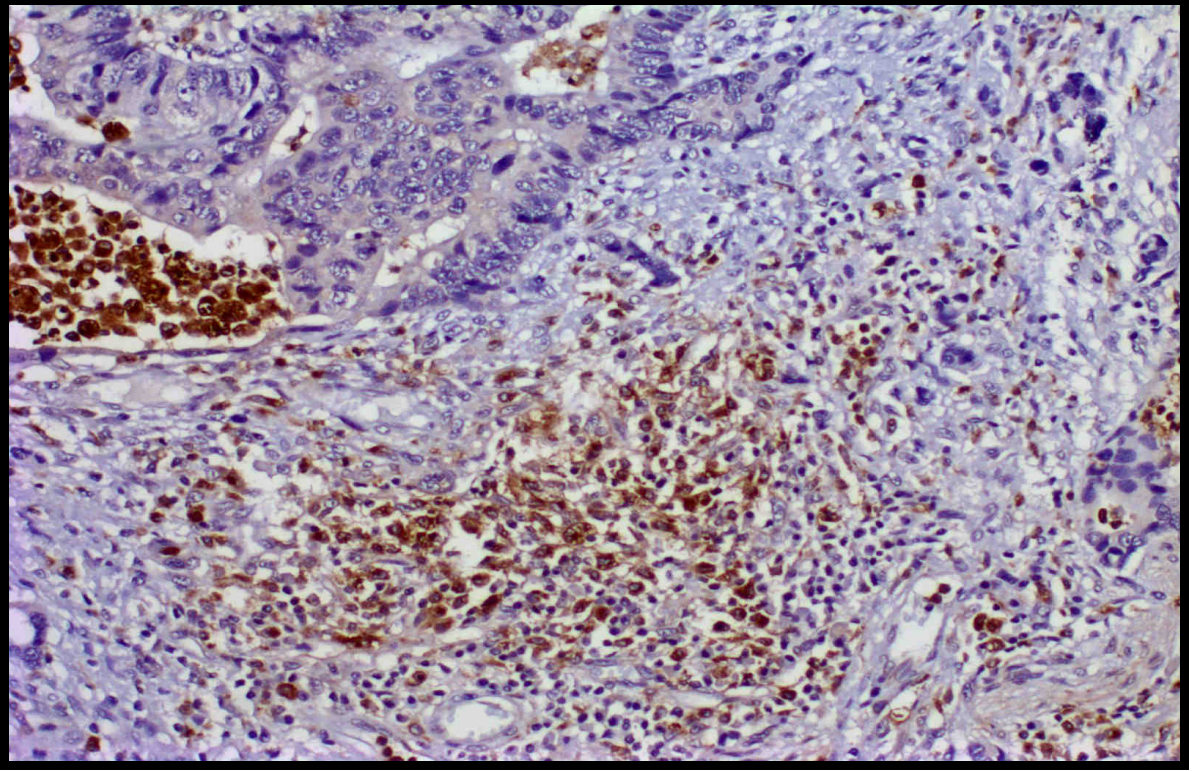
3.4.1.2. CD68 antikoruna ile boyanan kesitlerin değerlendirilmesi:

CD68 monoklonal antikoruna ile tümör içindeki makrofajların varlığı araştırıldı. CD68 ile boyanan makrofajların tümör içinde infiltrasyon gösteren inflamatuvar hücrelere olan oranı belirlenerek CD68 pozitif makrofajlar 3 grade altında değerlendirildi.

Grade 1= < %30 (CD68 pozitif makrofajlar tümör içinde infiltrasyon gösteren inflamatuvar hücrelerin %30'undan azını oluşturmaktadır)

Grade 2= %31-60 (CD68 pozitif makrofajlar tümör içinde infiltrasyon gösteren inflamatuvar hücrelerin %31-60'ını oluşturmaktadır)

Grade 3= > %60 (CD68 pozitif makrofajlar tümör içinde infiltrasyon gösteren inflamatuvar hücrelerin %60'ından fazlasını oluşturmaktadır) (Resim 3.14)



Resim 3.14. CD-68 antikoruna ile makrofajlarda grade 3 boyanma (x200)

3.4. İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS yazılımı (Statistical Package for the Social Sciences, Version 11.0, SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) ile yapılmıştır. Gruplanabilen veriler için ki-kare testi kullanılmıştır. Kantitatif değişkenler için değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Ortalama değerlerin karşılaştırılmasında one-way ANOVA testi kullanılmıştır. Histokimyasal ve immünohistokimyasal parametrelerin birbiri ile karşılaştırılması “Spearman” korelasyon testi ile yapılmıştır ve p değeri 0,05’in altında olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda incelenen primer kolon adenokarsinomlu 100 olgunun 56 (%56)'sı erkek, 44 (%44)'ü kadın olup ortalama yaşları $65,6 \pm 12,5$ (27-91)'tur ve tüm olgular ortalama $52 \pm 14,5$ ay süre ile takip edilmiştir.

Tablo 4.1'den de anlaşılacağı gibi olguların 15 (%15)'i iyi diferansiye, 62 (%62)'si orta derecede diferansiye ve 23 (%23)'ü kötü diferansiyedir. Tümör diferansiyasyonu ile lenf nodu metastazı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p < 0,05$). İyi diferansiye tümörlerde lenf nodu metastazı oranı düşük iken kötü diferansiye tümörlerin 16/23 (%69,6)'ünde lenf nodu metastazı izlenmiştir. İyi diferansiye tümörlerin sadece 5/15 (%33,3)'inde 1-4 arasında metastatik lenf nodu izlenirken, kötü diferansiye tümörlerde 4/23 (%17,4)'ünde 7'den fazla metastatik lenf nodu saptanmıştır ($p = 0,01$). Bununla birlikte vasküler ve perinöral invazyon, uzak metastaz ile olguların hastalıktan ölüm oranı ile tümör diferansiyasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir.

Olguların tümünde evre değerlendirilmiş ve 12 (%12)'si pT2, 20 (%20)'si pT3 ve 68 (%68)'i pT4 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.1). Olguların evresi ile uzak metastaz ve hastalıktan ölüm oranı arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir. Evre ile lenf nodu metastazı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcuttur ($p < 0,01$) ve en fazla lenf nodu metastazı olan olgular evre pT4 tümörlerde (%57,4) saptanmıştır (Tablo 4.1). Lenf nodu metastazı olan olgular içinde de metastatik lenf nodu sayısı açısından bakıldığında evre pT2 tümörlerde 1-4 arası metastatik lenf nodu (%8,3) ve evre pT4 tümörlerde 5-7 arası (%4,4) ve 7'den fazla (%11,8) metastatik lenf nodu izlenmiştir ($p < 0,01$). Tablo 4.1'den de izleneceği üzere evre arttıkça metastaz gösteren lenf nodu sayısında artış saptanmıştır ($p < 0,01$).

Vasküler invazyon olguların 36 (%36)'sında izlenirken, 64 (%64)'ünde görülmemiştir. Vasküler invazyon, tümörün patolojik evresi ve perinöral invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki izlenmiştir ($p < 0,05$). Vasküler invazyonu olan tümörler daha yüksek evreli tümörler olduğu ve çoğunda beraberinde perinöral invazyon da gösterdiği saptanmıştır. Vasküler invazyonu olan olgularda, olmayanlara oranla daha yüksek oranda lenf nodu metastazı izlenmiştir (%80,6) (Tablo 4.1). Ayrıca vasküler invazyonu olan

olgularda metastaz görülen lenf nodu sayısı, vasküler invazyonu olmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla bulunmuştur ($p<0,001$). Uzak metastaz ve hastalıktan ölüm ile vasküler invazyon arasında istatistiksel anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 4.1).

Perinöral invazyon olguların 23 (%23)'ünde izlenirken, 77 (%77)'sinde görülmemiştir. Perinöral invazyonu olan tümörlerin hepsi (%100) evre pT4 tümörlerdir. Perinöral invazyon ile hayatta kalma süresi ve uzak metastaz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur. Perinöral invazyonu olan olgularda lenf nodu metastaz riski ve metastazı görülen lenf nodu sayısı, perinöral invazyon görülmeyen olgulara oranla daha fazladır (Tablo 4.1).

Çalışmaya alınan 100 olgunun 49 (%49)'unda lenf nodu metastazı görülürken, 51 (%51)'inde lenf nodu metastazı saptanmamıştır. Lenf nodu metastazı daha çok kötü diferansiye ($p<0,05$) ve yüksek evreli tümörlerde görülmüştür ($p<0,01$). Aynı zamanda lenf nodu metastazı olan olguların 12/49 (%75)'unda uzak metastaz saptanmıştır. Ancak lenf nodu metastazı ile hastalıktan ölüm arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.2'de olguların tümör çapları ile hayatta kalma süresinin prognostik parametreler ile olan karşılaştırılması verilmiştir. Tablodan da izleneceği gibi tümör çapı ile evre, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, lenf nodu metastaz grubu, uzak metastaz ve hastalıktan ölüm arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki izlenmemiştir. Ancak tümör çapı ile tümör diferansiyasyonu ve vasküler invazyon arasında istatistiksel olarak pozitif korelasyon bulunmuştur. Tablodan da anlaşılacağı üzere tümör diferansiyasyonu kötüleşirken ortalama tümör çapı artış göstermektedir. Ayrıca tümör çapı vasküler invazyonu olan olgularda $6,26\pm 2,19$ iken vasküler invazyonu olmayan olgularda $5,27\pm 1,83$ olarak saptanmıştır.

Hayatta kalma süresi ile tümör diferansiyasyonu, evre, vasküler - perinöral invazyon, lenf nodu metastazı ve lenf nodu metastaz grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır. Sadece uzak metastaz ile hayatta kalma süresi arasında negatif ilişki vardır ($p<0,001$). Uzak metastaz olan olgularda hayatta kalma süresi ortalama $33,13\pm 14,71$ ay iken, uzak metastaz olmayan olgularda ortalama $55,71\pm 11,5$ ay olarak izlenmiştir.

Tablo 4.1. Tümörün diferansiasyonu, evresi, vasküler invazyonu, perinöral invazyonu ve uzak metastaz varlığının lenf nodu metastazı, lenf nodu metastaz grubu ve hastalıktan ölümü ile ilişkisi

		n	LN met N (%)	p değeri	LN met grubu				p değeri	Uz met n (%)	p değeri	Ölüm n (%)	p değeri
					0 n (%)	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)					
T dif	iyi	15	5 (33,3)	p=0,021*	10 (66,7)	5 (33,3)	0 (0)	0 (0)	p=0,010*	3 (20)	p=0,570	6 (40)	p=0,234
	orta	62	28 (45,2)		34 (54,8)	20 (32,3)	3 (4,8)	5 (8,1)		10 (16,1)		18 (29)	
	kötü	23	16 (69,6)		7 (30,4)	11 (47,8)	1 (4,3)	4 (17,4)		3 (13)		5 (21,7)	
Evre	pT2	12	1 (8,3)	p=0,003*	11 (91,7)	1 (8,3)	0 (0)	0 (0)	p=0,007*	0 (0)	p=0,427	2 (16,7)	p=0,386
	pT3	20	9 (45)		11 (55)	7 (35)	1 (5)	1 (5)		5 (25)		6 (30)	
	pT4	68	39 (57,4)		29 (42,6)	28 (41,2)	3 (4,4)	8 (11,8)		11 (16,2)		21 (30,9)	
Vİ	var	36	29 (80,6)	p=0,000*	7 (19,4)	18 (50)	4 (11,1)	7 (19,4)	p=0,000*	8 (22,2)	p=0,161	12 (33,3)	p=0,311
	yok	64	20 (31,2)		44 (68,8)	18 (28,1)	0 (0)	2 (22,2)		8 (12,5)		17 (26,6)	
Pİ	var	23	18 (78,3)	p=0,001*	5 (21,7)	13 (56,5)	2 (8,7)	3 (13)	p=0,012*	4 (17,4)	p=0,530	10 (43,5)	p=0,071
	yok	77	31 (40,3)		46 (59,7)	23 (29,9)	2 (2,6)	6 (7,8)		12 (15,6)		19 (24,7)	
LN met	var	49								12 (75)	p=0,001*	15 (30,6)	p=0,449
	yok	51								4 (7,8)		14 (27,5)	

T dif: Tümörün diferansiasyonu, LN met: Lenf nodu metastazı, LN met gr: Lenf nodu metastaz grubu, Uz met: Uzak metastaz, Vİ: Vasküler invazyon, Pİ: Perinöral invazyon

Tablo 4.2: Tümör çapı, damar sayısı ve hayatta kalma süresinin prognostik faktörler ile ilişkisi

		n	Tümörün çapı	p değeri	Damar sayısı	p değeri	Hayatta kalma süresi	p değeri
T dif	iyi	15	4,35±1,25	p<0,001*	46,60±19,09	p>0,05	52,93±11,45	p>0,05
	orta	62	5,46±1,74		50,66±25,54		51,29±15,96	
	kötü	23	6,91±2,45		53,74±24,77		53,74±12,79	
Evre	pT2	12	4,75±2,14	p>0,05	40,82±12,12	p>0,05	60,0±0,0	p>0,05
	pT3	20	5,44±1,35		55,90±29,46		51,2±14,91	
	pT4	68	5,8±2,15		51,25±23,99		51,18±15,48	
Vİ	var	36	6,26±2,19	p=0,017*	58,89±20,05	p=0,012*	51,58±14,12	p>0,05
	yok	64	5,27±1,83		46,19±25,53		52,39±14,95	
Pİ	var	23	6,15±2,67	p>0,05	62,0±24,28	p=0,011*	47,78±17,90	p>0,05
	yok	77	5,47±1,77		47,40±23,54		53,39±13,31	
LN met	var	49	5,67±2,11	p>0,05	64,28±24,39	p<0,001*	50,61±16,61	p>0,05
	yok	51	5,59±1,95		39,24±17,65		53,37±12,65	
LN met grubu	0	51	5,63±1,99	p>0,05	38,35±16,55	p<0,001*	53,61±12,44	p>0,05
	1	36	5,85±2,26		60,03±26,35		50,58±17,02	
	2	4	4,63±1,11		70,50±13,13		49,25±21,5	
	3	9	5,17±1,34		75,22±17,54		50,89±13,96	
Uz met	var	16	5,68±2,43	p>0,05	81,56±23,83	p<0,001*	33,13±14,71	p<0,001*
	yok	84	5,62±1,94		44,89±19,72		55,71±11,50	
T-PSMA	1	53	5,54±2,09	p>0,05	39,55±17,73	p<0,001*	56,47±9,04	p<0,001*
	2	22	5,74±1,88		48,86±16,41		49,86±17,73	
	3	25	5,72±2,05		76,2±24,09		44,8±17,99	
D-PSMA	1	58	5,57±2,0	p>0,05	40,14±17,85	p<0,001*	55,55±11,56	p<0,001*
	2	24	5,51±1,90		52,67±16,16		50,67±15,49	
	3	18	5,97±2,26		82,44±24,25		42,89±18,27	
T-VEGF	1	68	5,71±2,0	p>0,05	40,32±17,24	p<0,001*	55,56±11,2	p<0,001*
	2	17	5,03±1,55		59,0±13,02		49,41±17,17	
	3	15	5,9±2,48		88,73±20,78		39,47±18,17	
D-VEGF	1	71	5,57±1,93	p>0,05	42,0±17,32	p<0,001*	55,21±11,67	p<0,001*
	2	18	5,83±1,89		62,72±28,24		48,94±16,50	
	3	11	5,75±2,83		87,73±11,17		37,18±18,89	
CD68	1	43	5,42±1,75	p>0,05	33,77±10,78	p<0,001*	55,60±9,63	p<0,05*
	2	28	5,51±1,63		49,14±17,09		53,39±15,21	
	3	29	6,05±2,64		77,52±21,41		45,66±18,09	

T dif: Tümörün diferansiyasyonu, LN met: Lenf nodu metastazı, LN met gr: Lenf nodu metastaz grubu, Uz met: Uzak metastaz, Vİ: Vasküler invazyon, Pİ: Perinöral invazyon

İmmünohistokimyasal bulgular:

CD34 antikoruna ile x200 büyütmede sayılan ortalama damar sayısı ile prognostik parametrelerin karşılaştırılması tablo 4.2’de verilmiştir. Tablodan da anlaşılacağı üzere ortalama damar sayısı ile vasküler – perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, lenf nodu metastaz grubu ve uzak metastaz ile istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişkili saptanmıştır. Vasküler – perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, lenf nodu metastaz grubu ve uzak metastaz olan olguların olmayanlara göre daha yüksek ortalama damar sayıları gösterdiği izlenmiştir. Ayrıca metastaz gösteren lenf nodu sayısı ile de ortalama damar sayısı arasında anlamlı pozitif ilişki olduğu saptanarak grup 3 lenf nodu metastaz grubunda ortalama damar sayısı $75,22 \pm 17,54$ iken lenf nodu metastazı olmayan grupta ortalama damar sayısı $38,35 \pm 16,55$ olarak tespit edilmiştir ($p < 0,001$).

Tümöral ve endotelial VEGF ve PSMA ekspresyonu ile prognostik parametreler tablo 4.3’te karşılaştırılmıştır. T-VEGF ve D-VEGF ekspresyonu ile tümör diferansiyasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmemiştir. Ayrıca T-VEGF ve D-VEGF ile vasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, lenf nodu metastaz grubu, uzak metastaz, hayatta kalma süresi ve hastalıktan ölüm ile arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki izlenmiştir. Bununla birlikte T-VEGF ile evre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yokken D-VEGF ile evre arasında anlamlı pozitif ilişki saptanmıştır. Artan evre ile endotelial VEGF ekspresyonunun arttığı izlenmiştir. Ayrıca T-VEGF ve D-VEGF ile ortalama damar sayısı arasında pozitif ilişki saptanmıştır. Tablo 4.2’de de görüldüğü gibi T-VEGF ve D-VEGF ekspresyonu yüksek olanlarda ortalama damar sayısı da fazladır.

T-PSMA ve D-PSMA ekspresyonu ile tümör diferansiyasyonu ve perinöral invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki görülmemiştir. Tümörün patolojik evresi ile T-PSMA ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanırken ($p < 0,05$), D-PSMA ekspresyonu ile tümörün patolojik evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmemiştir. Bununla birlikte T-PSMA ve D-PSMA ekspresyonları ile vasküler invazyon, lenf nodu metastazı, lenf nodu metastaz grubu, uzak metastaz, hastalıktan ölüm (Tablo 4.3) ve hayatta kalma süresi arasında pozitif güçlü anlamlı istatistiksel ilişki vardır. Aynı zamanda ortalama damar sayısı ile T-PSMA ve D-PSMA ekspresyonları arasında istatistiksel olarak güçlü pozitif ilişki saptanmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.3. T-VEGF ve D- VEGF'nın prognostik faktörler ile karşılaştırılması

		n	T- VEGF			p değeri	D- VEGF			p değeri
			1	2	3		1	2	3	
			n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	n (%)	
T dif	iyi	15	10 (66,7)	4 (26,7)	3 (6,7)	p=0,958	11 (73,3)	3 (20)	1 (6,7)	p=0,666
	orta	62	41 (66,1)	11 (17,7)	2 (8,7)		43 (69,4)	13 (21)	6 (9,7)	
	kötü	23	1 (6,7)	10 (16,1)	4 (17,4)		17 (73,9)	2 (8,7)	4 (17,4)	
Evre	pT2	12	10 (83,3)	2 (16,7)	0 (0)	p=0,139	12 (100)	0 (0)	0 (0)	p=0,015*
	pT3	20	13 (65)	5 (25)	2 (10)		14 (70)	6 (30)	0 (0)	
	pT4	68	45 (66,2)	10 (14,7)	13 (19,1)		45 (66,2)	12 (17,6)	11 (16,2)	
Vİ	var	36	19 (52,8)	7 (19,4)	10 (27,8)	p=0,005*	20 (55,6)	8 (22,2)	8 (22,2)	p=0,003*
	yok	64	49 (76,6)	10 (15,6)	5 (7,8)		51 (79,7)	10 (15,6)	3 (4,7)	
Pİ	var	23	12 (52,2)	5 (21,7)	6 (26,1)	p=0,048*	11 (47,8)	6 (26,1)	6 (26,1)	p=0,002*
	yok	77	56 (72,7)	12 (15,6)	9 (11,7)		60 (77,9)	12 (15,6)	5 (6,5)	
LN met	var	49	25 (51)	10 (20,4)	14 (28,6)	p=0,000*	27 (55,1)	11 (22,4)	11 (22,4)	p=0,000*
	yok	51	43 (84,3)	7 (13,7)	1 (2)		44 (86,3)	7 (13,7)	0 (0)	
LN met grubu	0	51	43 (84,3)	7 (13,7)	1 (2)	p=0,000*	44 (86,3)	7 (13,7)	0 (0)	p=0,000*
	1	36	22 (61,1)	7 (19,4)	7 (19,4)		21 (58,3)	10 (27,8)	5 (13,9)	
	2	4	0 (0)	2 (50)	2 (50)		3 (75)	0 (0)	1 (25)	
	3	9	3 (33,3)	1 (11,1)	5 (55,6)		3 (33,3)	1 (11,1)	5 (55,6)	
Uz met	var	16	2 (12,5)	3 (18,8)	11 (68,8)	p=0,000*	2 (12,5)	6 (37,5)	8 (50)	p=0,000*
	yok	84	66 (78,6)	14 (16,7)	4 (4,8)		69 (82,1)	12 (14,3)	3 (3,6)	
Ölüm	sağ	71	56 (78,9)	10 (14,1)	5 (7)	p=0,000*	56 (78,9)	12 (16,9)	3 (4,2)	p=0,001*
	ölü	29	12 (41,4)	7 (24,1)	10 (34,5)		15 (51,7)	6 (20,7)	8 (27,6)	

T dif: Tümörün diferansiyasyonu, LN met: Lenf nodu metastazı, LN met gr: Lenf nodu metastaz grubu, Uz met: Uzak metastaz, Vİ: Vasküler invazyon, Pİ: Perinöral invazyon

Tablo 4.4. T-PSMA ve D- PSMA'nın prognostik faktörler ile karşılaştırılması

		n	T-PSMA			p değeri	D-PSMA			p değeri
			1	2	3		1	2	3	
			n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	n (%)	
T dif	iyi	15	9 (60)	3 (20)	3 (20)	p=0,159	8 (53,3)	6 (40)	1 (6,7)	p=0,501
	orta	62	34 (54,8)	15 (24,2)	13 (21)		37 (59,7)	14 (22,6)	11 (17,7)	
	kötü	23	10 (43,5)	4 (17,4)	9 (39,1)		13 (56,5)	4 (17,4)	6 (26,1)	
Evre	pT2	11	11 (91,7)	1 (8,3)	0 (0)	p=0,047*	10 (83,3)	2 (16,7)	0 (0)	p=0,083
	pT3	20	8 (40)	6 (30)	6 (30)		9 (45)	9 (45)	2 (10)	
	pT4	68	34 (50)	15 (22,1)	19 (27,9)		39 (57,4)	13 (19,1)	16 (23,5)	
Vİ	var	36	12 (33,3)	7 (19,4)	17 (47,2)	p=0,000*	11 (30,6)	12 (33,3)	13 (36,1)	p=0,000*
	yok	64	41 (64,1)	15 (23,4)	8 (12,5)		47 (73,4)	12 (18,8)	5 (7,8)	
Pİ	var	23	10 (43,5)	5 (21,7)	8 (34,8)	p=0,210	11 (47,8)	5 (21,7)	7 (30,4)	p=0,112
	yok	77	43 (55,8)	17 (22,1)	17 (22,1)		47 (61)	19 (24,7)	11 (14,3)	
LN met	var	49	12 (24,5)	14 (28,6)	23 (46,9)	p=0,000*	17 (34,7)	15 (30,6)	17 (34,7)	p=0,000*
	yok	51	41 (80,4)	8 (15,7)	2 (3,9)		41 (80,4)	9 (17,6)	1 (2)	
LN met grubu	0	51	41 (80,4)	8 (15,7)	2 (3,9)	p=0,000*	41 (80,4)	9 (17,6)	1 (2)	p=0,000*
	1	36	11 (30,6)	12 (33,3)	13 (36,1)		15 (41,7)	12 (33,3)	9 (25)	
	2	4	1 (25)	0 (0)	3 (75)		1 (25)	1 (25)	2 (50)	
	3	9	0 (0)	2 (22,2)	7 (77,8)		1 (11,1)	2 (22,2)	6 (66,7)	
Uz met	var	16	1 (6,3)	2 (12,5)	13 (81,3)	p=0,000*	1 (6,3)	4 (25)	11 (68,8)	p=0,000*
	yok	84	52 (61,9)	20 (23,8)	12 (14,3)		57 (67,9)	20 (23,8)	7 (8,3)	
Ölüm	sağ	71	42 (59,2)	16 (22,5)	13 (18,3)	p=0,017*	46 (64,8)	17 (23,9)	8 (11,3)	p=0,007*
	ölü	29	11 (37,9)	6 (20,7)	12 (41,4)		12 (41,4)	7 (24,1)	10 (34,5)	
T-VEGF	1	68	46 (67,6)	16 (23,5)	6 (8,8)	p=0,000*	53 (77,9)	13 (19,1)	2 (2,9)	p=0,000*
	2	17	7 (41,2)	6 (35,3)	4 (23,5)		5 (29,4)	11 (64,7)	1 (5,9)	
	3	15	0 (0)	0 (0)	15 (100)		0 (0)	0 (0)	15 (100)	
D-VEGF	1	71	48 (67,6)	15 (21,1)	8 (11,3)	p=0,000*	54 (76,1)	14 (19,7)	3 (4,2)	p=0,000*
	2	18	5 (27,8)	7 (38,9)	6 (33,3)		4 (22,2)	10 (55,6)	4 (22,2)	
	3	11	0 (0)	0 (0)	11 (100)		0 (0)	0 (0)	11 (100)	

T dif: Tümörün diferansiyasyonu, LN met: Lenf nodu metastazı, LN met gr: Lenf nodu metastaz grubu, Uz met: Uzak metastaz, Vİ: Vasküler invazyon, Pİ: Perinöral invazyon

Tümördeki inflamatuvar hücre infiltrasyonunda bulunan CD68 antikoruna ile boyanma gösteren makrofajların oranı prognostik parametreler ile tablo 4.5'te karşılaştırılmıştır. CD68 pozitif makrofajların oranı ile tümör diferansiyasyonu, evre, vasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, lenf nodu metastaz grubu ve uzak metastaz arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki görülmüştür. Ancak makrofajların hastalıktan ölüm ile ilişkisi saptanmamıştır. Ayrıca CD68 pozitif makrofaj infiltrasyonu ile ortalama damar sayısı arasında pozitif anlamlı ilişki saptanmıştır (Tablo 4.2). CD68 pozitif makrofaj infiltrasyonu arttıkça, ortalama damar sayısının da arttığı izlenmektedir.

Tablo 4.5. CD68'in prognostik faktörler ile karşılaştırılması

		n	CD68			p değeri
			1	2	3	
			n (%)	n (%)	n (%)	
T dif	iyi	15	9 (60)	4 (26,7)	2 (13,3)	p=0,006*
	orta	62	29 (46,8)	17 (27,4)	16 (25,8)	
	kötü	23	5 (21,7)	7 (30,4)	11 (47,8)	
Evre	pT2	12	11 (91,7)	1 (8,3)	0 (0)	p=0,004*
	pT3	20	9 (45)	3 (15)	8 (40)	
	pT4	68	23 (33,8)	24 (35,3)	21 (30,9)	
Vİ	var	36	7 (19,4)	13 (36,1)	16 (44,4)	p=0,001*
	yok	64	36 (56,3)	15 (23,4)	13 (20,3)	
Pİ	var	23	4 (17,4)	7 (30,4)	12 (52,2)	p=0,002*
	yok	77	39 (50,6)	21 (27,3)	17 (22,1)	
LN met	var	49	6 (12,2)	19 (38,8)	24 (49)	p=0,000*
	yok	51	37 (72,5)	9 (17,6)	5 (9,8)	
LN met grubu	0	51	37 (72,5)	9 (17,6)	5 (9,8)	p=0,000*
	1	36	5 (13,9)	17 (47,2)	14 (38,9)	
	2	4	0 (0)	2 (50)	2 (50)	
	3	9	1 (11,1)	0 (0)	8 (88,9)	
Uz met	var	16	0 (0)	4 (25)	12 (75)	p=0,000*
	yok	84	43 (51,2)	24 (28,6)	17 (20,2)	
Ölüm	sağ	71	33 (46,5)	22 (31)	16 (22,5)	p=0,064
	ölü	29	10 (34,5)	6 (20,7)	13 (44,8)	

T dif: Tümörün diferansiyasyonu, LN met: Lenf nodu metastazı, LN met gr: Lenf nodu metastaz grubu, U met: Uzak metastaz, Vİ: Vasküler invazyon, Pİ: Perinöral invazyon

Parametrelerin korelasyonu:

Lenf nodu metastaz sayısı ile ortalama damar sayısı ($r_s=0,580$, $p<0,001$), T-VEGF ($r_s=0,470$, $p<0,001$), D-VEGF ($r_s=0,424$, $p<0,001$), T-PSMA ($r_s=0,637$, $p<0,001$), D-PSMA ($r_s=0,577$, $p<0,001$) ve CD68 ($r_s=0,642$, $p<0,001$)'in pozitif korelasyon gösterdiği izlenmiştir.

Hayatta kalma süresi ile ortalama damar sayısı ($r_s=-0,319$, $p<0,01$), T-VEGF ($r_s=-0,377$, $p<0,001$), D-VEGF ($r_s=-0,366$, $p<0,001$), T-PSMA ($r_s=-0,318$, $p<0,01$), D-PSMA ($r_s=-0,321$, $p<0,01$) ve CD68 ($r_s=-0,238$, $p<0,05$)'in negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

Ortalama damar sayısı ile T-VEGF ($r_s=0,662$, $p<0,001$), D-VEGF ($r_s=0,556$, $p<0,001$), T-PSMA ($r_s=0,578$, $p<0,001$), D-PSMA ($r_s=0,584$, $p<0,001$) ve CD68 ($r_s=0,753$, $p<0,001$)'in pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

T-VEGF ile D-VEGF ($r_s=0,759$, $p<0,001$), T-PSMA ($r_s=0,576$, $p<0,001$), D-PSMA ($r_s=0,701$, $p<0,001$) ve CD68 ($r_s=0,560$, $p<0,001$)'in pozitif korelasyon gösterdiği izlenmiştir.

D-VEGF ile T-PSMA ($r_s=0,555$, $p<0,001$), D-PSMA ($r_s=0,664$, $p<0,001$) ve CD68 ($r_s=0,574$, $p<0,001$)'in pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

T-PSMA ile D-PSMA ($r_s=0,810$, $p<0,001$) ve CD68 ($r_s=0,563$, $p<0,001$)'in pozitif korelasyon gösterdiği izlenmiştir.

D-PSMA ile CD68 ($r_s=0,514$, $p<0,001$)'in pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

TARTIŞMA

Kolorektal karsinomlar hem erkek hem de kadınlarda en yaygın olarak izlenen üçüncü kanser tipidir (30). Kolorektal kanser riski yaş ile birlikte artış gösterir ve en sık 60-79 yaşlarında görülür. Kadın-erkek dağılımında fark olmadığı bildirilmiştir (31). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde olguların 56'sı erkek, 44'ü kadın olup ortalama yaşları $65,6 \pm 12,5$ (27-91) olarak saptanmıştır.

Kolorektal kanserlerin günümüzde primer tedavi şekli cerrahi rezeksiyondur. Prognostik faktörler adjuvan tedavi, tedaviye cevap ve hayatta kalma süresini belirlemede bize yardımcı olur (61). AJCC kolorektal çalışma grubu ilk kez 1977 yılında kolorektal kanserlerinin prognostik faktörlerini yayınladı. Buna göre T (tümörün kapsadığı alan), N (lenf nodu durumu) ve M (metastaz varlığı yada yokluğu) organize edilerek şematize edildi. Bu şemanın amacı, klinisyene tedavi planını oluşturma sırasında yardımcı olmak ve hastalığın prognozunu belirlemede, tedaviye yanıtı ölçmede standart bir veri elde etmektir (65). O günden bugüne yapılan çalışmalar gösterdi ki tümörün evresi önemli bir prognostik faktördür (61). Yüksek evreli tümörlerin daha agresif tedaviye ihtiyaç duydukları ve daha kısa hayatta kalma süresi olduğu bildirilmiştir (61,65). Ayrıca lenf nodu ve uzak metastaz risklerinin evre ile birlikte arttığı gösterilmiştir (58,61). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da yüksek evreli tümörler daha fazla oranda lenf nodu metastazı ve uzak metastaz gösterdiği izlenmiştir. Ancak literatürün aksine hayatta kalma süresi ile evre arasında çalışmamızda anlamlı fark bulunmadı. Bunun nedeni olarak bizim tümörlerimizin çoğu evre pT4 tümörler olup (%68) evre pT1 tümörlerin hiç olmaması ve evreler arasındaki hasta dağılımının dengeli olmamasına bağlı olarak istatistiksel çalışma dağılımının uygun olmaması gösterilebilir.

Kolorektal adenokarsinomların histolojik grade'lenmesi "College of American Pathologists" tarafından 1999 yılında beyan edilen kolorektal kanserlerin prognostik faktörlerinin sınıflamasında kategori IIA'da yer almaktadır (58). Histolojik grade'lemenin temelinde mikroskopik olarak gland yapısının derecesi önemlidir (61,65). Yüksek grade, tümörlerde olumsuz prognostik faktördür. Çalışmamızda tümör grade'i arttıkça lenf nodu metastaz varlığı, metastatik lenf nodu sayısının arttığı ve hayatta kalma süresinin azaldığı görülmüştür. Takahashi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (118) tüm olgularda metastatik

lenf nodu %46,2 iken bunların sadece %29,5'i iyi diferansiye kolorektal adenokarsinomlarda bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda iyi diferansiye adenokarsinomlarda metastatik lenf nodu %33,3 iken kötü diferansiye tümörlerde %69,6'dır. Aynı çalışmada beş yıllık hayatta kalma süresi iyi diferansiye karsinomlarda %75,3 iken kötü diferansiye tümörlerde %25 olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise hayatta kalma süresi iyi diferansiye tümörlerde %60 iken kötü diferansiye tümörlerde %78 olarak izlendi. Buna göre bizim çalışmamızda histolojik grade ile hayatta kalma süresi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Bu bulgu yine aynı evrede olduğu gibi olguların grade dağılımının istatistiki olarak düzgün olmaması ile açıklanabilir.

Amerika Kanser Enstitüsü tarafından lenf nodu değerlendirmesinin yeterliliği için en az 12 lenf nodu olması gerektiği bildirilmiştir (119). Priolli ve arkadaşlarının 2009 yılında 113 kolorektal adenokarsinom ile yaptıkları çalışmada en az 12 lenf nodu diseke edilmiş olgularda metastatik lenf nodu olmayan grup LNR-0, diseke edilen lenf nodlarının %20'sinde metastaz olan grup LNR-1 ve %21 ve daha fazla metastazı olan grup LNR-2 kabul edilmiştir. Biz çalışmamızda lenf nodu metastaz grupları, LN-0 metastaz olmayan grup, LN-1 1-4 metastatik lenf nodu olan gruptur ve Priolli ve arkadaşlarının LNR-1 grubu ile aynıdır. Priolli ve arkadaşlarının çalışmasında LNR-2 grubu bizim LN-2 ve LN-3 gruplarımıza karşılık gelmektedir. Ding ve arkadaşları (120) gastrik kanserlerde yaptıkları çalışmada metastatik lenf nodu için sınır değerini Priolli ve arkadaşları gibi %20 olarak kabul etmişlerdir. Priolli ve arkadaşlarının çalışmasında çok değişkenli analizde histolojik grade, TNM evrelemesi, lenf nodu tutulumu ve lenf nodu metastaz grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer olarak lenf nodu metastazı ve lenf nodu metastaz grubu ile histolojik grade, evre, vasküler invazyon ve perinöral invazyon arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmuştur. Kötü diferansiye ve yüksek evreli tümörlerde lenf nodu metastazı daha yüksek oranda izlenirken iyi diferansiye ve düşük evreli tümörlerde lenf nodu metastazı daha düşük görülmüştür. Tümör diferansiasyonu ve evresi arttıkça metastaz görülen lenf nodu sayısının da arttığı izlenmiştir. Bu bulgular Priolli'nin çalışmasını desteklemekle birlikte ondan farklı olarak bizim çalışmamızda ölüm ve hayatta kalma süresi ile lenf nodu metastaz grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bununla birlikte Priolli ve arkadaşlarının çalışmasında lenf nodu metastaz grubu ile hayatta kalma süresi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki

izlenmiştir. Priolli ve arkadaşları lenf nodu metastaz grubunu bağımsız prognostik faktör olarak bildirmişlerdir (121).

Diğer önemli prognostik faktörlerden biri de vasküler ve/veya lenfatik invazyondur (122). Kolorektal kanserlerde lenfovasküler invazyon evreden bağımsız güçlü prognostik faktördür ve evre II olgularda adjuvan kemoterapiyi etkilemektedir (123). Bizim çalışmamızda vasküler invazyon pT2 tümörlerde görülmemiş olup pT3 tümörlerde (%11,1) ve pT4 tümörlerde (%88,9) izlenmiştir. Wang ve arkadaşlarının çalışmasında vasküler invazyon ile seroza invazyonu, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz arasında istatistiksel anlamlı ilişki görülmüştür. Vasküler invazyon ve tümör çapı arasında ise istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır (124). Bizim çalışmamızda ise vasküler invazyon ile tümör çapı arasında anlamlı ilişki izlenmiştir. Ancak vasküler invazyon ile uzak metastaz arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Tümör metastazı direkt olarak hematojen veya lenfatik yayılım ile ilişkilidir (125,126). Tümör ilk olarak primer bulunduğu alandaki kan ve/veya lenfatik damarları invaze eder (127). Wang ve arkadaşlarının çalışmasında vasküler invazyonu olan 17 olgunun 14'ünde (%82,4) lenf nodu metastazı izlenmiştir. Bizim çalışmamızda vasküler invazyonu olan olgularda 29/36 (%80,6)'sında lenf nodu metastazı saptanmıştır. Vasküler invazyonu olan olguların sadece 7/36 (%19,4)'sında lenf nodu metastazı görülmemiştir. Vasküler invazyonu olan olguların metastatik lenf nodu sayısına baktığımızda vasküler invazyon varlığının metastaz gösteren lenf nodu sayısının artışına neden olduğunu saptadık.

Anjiogenezis tümör büyümesi ve metastaz için itici güç oluşturmaktadır. Tümör hücrelerinin lenfatik damar içinde bulunmaları metastaz için çok önemlidir. Lenfanjiogenezis de metastaza katkıda bulunmaktadır. Bilinen lenfanjiogenik büyüme faktörleri VEGF-C ve VEGF-D'dir (128). Bir çalışmada vasküler invazyonu olan olgularda, vasküler invazyonu olmayanlara göre ortalama damar sayısı yüksek bulunmuştur (124). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde de vasküler invazyonu olan tümörlerde ortalama damar sayısı vasküler invazyonu olmayan tümörlere göre daha yüksek bulunmuştur.

Oh-e ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 254 kolon tümörü olan olguda CD34 antikoru ile saptanan ortalama damar sayısının lenf nodu metastazı ile istatistiksel anlamlı ilişki gösterdiğini bildirmişlerdir. Ancak uzak metastaz ile karşılaştırma yapmamışlardır (129).

Vermeulen ve arkadaşlarının çalışmasında ise, 145 kolon karsinomlu olguda, ortalama damar sayısının lenf nodu metastazı ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki göstermediği izlenirken uzak metastaz ile anlamlı ilişki gösterdiği saptanmıştır (130). Bizim çalışmamızda ortalama damar sayısı lenf nodu metastazı olan grupta (64,28±24,39), olmayan gruba (39,24±17,65) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Uzak metastazı olan olgularda ise (81,56±23,83), metastaz olmayanlara (44,89±19,72) göre ortalama damar sayısı belirgin şekilde yüksektir. Buna göre ortalama damar sayısı ile vasküler invazyon, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz arasında güçlü korelasyon olduğunu düşündük.

VEGF direkt etkili en güçlü anjiogenik protein olarak bilinmektedir. Endotelial hücreler için spesifik mitojen ve anjiogenik faktör olup hem de vasküler permeabilityyi arttırmaktadır (131). VEGF ailesinin altı üyesi VEGF-A, plasental “growth” faktör, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E olarak bilinmektedir (4,131). VEGF-A ekspresyonu akciğer (132), özofagus (133) ve kolorektal (134) kanserlerin progresyonu ile ilişkili bulunmuştur. VEGF-A ekspresyonu meme kanserlerinde de negatif östrojen reseptör durumu, yüksek proliferasyon oranı ve kötü prognoz ile ilişkilidir (135). VEGF-C ve VEGF-D’lerin reseptörü VEGFR-3/Flt-4 olup tirozin kinaz reseptörüdür ve özellikle lenfatik endotelial hücrelerde eksprese olur (136). VEGF-C ekspresyonu kolorektal karsinomlarda derin tümör invazyonu, lenfovasküler invazyon, lenf nodu metastazı ve karaciğer metastazı ile ilişkilidir. VEGF-D ekspresyonu derin tümör invazyonu, lenf nodu metastazı ve karaciğer metastazı ile ilişkilidir. VEGF-C ve VEGF-D pozitif tümörlerde hayatta kalma süresi negatif tümörlere göre kısadır. VEGF-C ve VEGF-D ekspresyonu kolorektal karsinomlarda kötü prognoz göstergesidir. Anjiogenezis, lenfanjiogenezis, büyüme ve metastazda önemli rol oynarlar (137). VEGF-A daha fazla anjiogenik faktör iken VEGF-C daha çok lenfanjiogenik faktördür. Ding ve arkadaşlarının mide kanserlerindeki çalışmasında VEGF-A ve VEGF-C tümör yayılması ve prognoz ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Her iki faktörün de hayatta kalma süresi ile ters ilişkili olduğu görülmüştür. Bununla beraber VEGF-A ile uzak metastaz ve venöz invazyon arasında pozitif ilişki izlenmişken, VEGF-C ile lenfatik damar invazyonu, lenf nodu metastazı ve tümör invazyon derinliği arasında güçlü ilişki tespit edilmiştir (138). Mohammed ve arkadaşlarının meme kanserlerinde VEGF-A, VEGF-C ve VEGF-D’nin anjiogenezis ve lenfanjiogenezis ile ilişkisi ve prognostik önemini araştırdıkları çalışmada VEGF-A ekspresyonu ile tümörün grade’i, lenf nodu metastazı, östrojen reseptör durumu, ortalama

damar sayısı ve lenf damar dansitesi arasında istatistiksel anlamlı ilişki izlenmiştir. VEGF-C ekspresyonu ile lenf nodu metastazı ile ortalama damar sayısı ve lenf damar yoğunluğu arasında istatistiksel anlamlı ilişki görülmüştür. Bizim çalışmamızda kolon adenokarsinomlarında T-VEGF ekspresyonu ile tümörün diferansiasyonu ve evresi arasında istatistiksel anlamlı ilişki görülmemiştir. T-VEGF ekspresyonu ile vasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, lenf nodu metastaz grubu, uzak metastaz ve hastalıktan ölüm arasında istatistiksel anlamlı ilişki görülmüştür. D-VEGF ekspresyonu ile tümörün evresi, vasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, lenf nodu metastaz grubu, uzak metastaz ve hastalıktan ölüm arasında istatistiksel anlamlı ilişki görülmüştür. D-VEGF ile tümörün diferansiasyonu ve tümörün çapı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. T-VEGF ve D-VEGF ekspresyonları ile damar sayısı, hayatta kalma süresi arasında güçlü istatistiksel ilişki izlenmiştir. Buna göre VEGF ekspresyonu kolon karsinomlarında kötü prognoz, tümör büyümesi, metastaz ve hastalıktan ölüm ile ilişkili olup anjiogeneziste tümör içinde gelişen yeni damarların büyümesinden ve organizasyondan sorumlu tutulan PSMA ekspresyonu ile de önemli derecede pozitif ilişki göstermektedir. VEGF ekspresyonunun PSMA ekspresyonuna ek olarak anjiogenezisi indükleyerek tümör büyümesine ve metastaz gelişmesine neden olduğunu düşündük.

Benign prostatik asiner sekretuar epitelde folat hidrolaz aktivitesi gösteren PSMA pozitifdir. PSMA transmembran glikoproteindir. Tipik olarak luminal yüzdeki hücrelerde sitoplazmik membran veya sitoplazmik boyanma olur. Bazal epitel ve stromal hücreler PSMA negatifdir. PSMA antikoruna ile ayrıca prostat dışı benign dokularda da reaktivite görülebilmektedir. Bunlar, duodenal kolumnar epitel, renal proksimal tübüler epitel, benign meme epiteli ve kolonik ganglion hücreleridir (117). Çizgili kas sadece antikor 7E11 ile boyanır (139). Bütün benign dokudaki damarlar PSMA negatifdir. Benign dokusunda yoğun PSMA ekspresyonu gösteren prostat, karsinom geliştiği zaman tümör içindeki yeni kan damarlarında PSMA ekspresyonu izlenebilmektedir (117). PSMA antikorlarının endotel hücrelerdeki lokalizasyonu CD34 antikoruna ile karşılaştırılmıştır. PSMA'nın beş tip antikoruna da nadir istisnalar dışında geniş spektrumdaki malign neoplazmların yeni kan damarlarında güçlü reaksiyon göstermiştir. Malign tümörler içindeki damarların endotelinde PSMA ekspresyonu izlenirken damarların benign ve malign tümörlerinde; hemanjiom, hemanjiyoendotelioma ve anjiosarkomlarda neoplastik hücrelerde PSMA ekspresyonu görülmez (117).

O'Keefe ve arkadaşları (112) ile Chang ve arkadaşları (117) nın çalışmalarında anjiogenezisi major stimüle eden protein olan VEGF ile PSMA ekspresyonu arasında uyum tanımlanmıştır. Tsui ve arkadaşlarının tümör anjiogenezisinde prostat adenokarsinomlarında PSMA ve VEGF ekspresyonları arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmada güçlü korelasyon bulunmuştur (10). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde tümöral ve endotelial VEGF ile PSMA ekspresyonları arasında güçlü pozitif ilişki saptanmıştır. Michael ve arkadaşları 119 mide ve 130 kolorektal kanserlerde yeni kan damarlarında PSMA ekspresyonunu incelenmişlerdir. Kolorektal kanserlerde lenf nodu metastazı olan olgularda %80 ve karaciğer metastazı olan olgularda %84,2 oranında PSMA ekspresyonu izlenmiştir. PSMA mevcut antianjiogenik tedavi stratejileri için ek veya başka bir seçenek olabilir (140). Mhaweck-Fauceglia ve arkadaşlarının tümör hücrelerindeki PSMA ekspresyonunun endometriyal adenokarsinomlarda potansiyel prognostik belirteç olarak araştırıldığı çalışmada endometriyal adenokarsinomlu olguların %40'ında negatif PSMA ekspresyonu, %60'ında pozitif PSMA ekspresyonu izlenmiştir. Tümördeki damarlarda endotel hücrelerinde PSMA ekspresyonu görülmemiş veya çok seyrek boyanma izlenmiştir (141). Kolon ve mide karsinomlarında PSMA kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (140).

Bizim çalışmamızda kolon adenokarsinomlarında T-PSMA ile vasküler invazyon, lenf nodu metastazı, lenf nodu metastaz grubu, uzak metastaz, hastalıktan ölüm, hayatta kalma süresi ve ortalama damar sayısı arasında istatistiksel olarak çok güçlü ilişki saptanmıştır. Tümörün patolojik evresi ile T-PSMA arasında daha zayıf olmak üzere istatistiksel anlamlı ilişki görülmüştür. T-PSMA antikoru ile tümörün diferansiasyonu, tümör çapı ve perinöral invazyon arasında anlamlı ilişki izlenmemiştir. D-PSMA antikoru ile vasküler invazyon, lenf nodu metastazı, lenf nodu metastaz grubu, uzak metastaz, hayatta kalma süresi ve ortalama damar sayısı arasında istatistiksel olarak çok güçlü ilişki saptanmıştır. Hastalıktan ölüm ve D-PSMA arasında güçlü anlamlı istatistiksel ilişki görülmüştür. D-PSMA ile tümör diferansiasyonu, tümörün patolojik evresi, tümörün çapı ve perinöral invazyon arasında istatistiksel anlamlı ilişki izlenmemiştir. VEGF ve PSMA antikorumları hem tümör hücrelerinde hem de tümördeki damarlarda karşılaştırıldığında istatistiksel olarak birbirine paralel artış gösteren pozitif ilişki bulunmuştur.

Ayrıca hem tümöral hem de endotelial VEGF ve PSMA ekspresyonlarının ortalama damar sayısı ile pozitif korelasyon gösterdiği izlenmiştir. Bu da literatür ile uyumlu olarak bize tümörden ve endotelden eksprese olan VEGF ve PSMA'nın anjiogenezis üzerinde önemli etkisi ve katkısı olduğunu ve dolaylı olarak da anjiogenezisi arttırarak bölgesel ve uzak metastazlara neden olarak hastalığın progresyonuna neden olabileceğini ve kötü prognoza işaret ettiğini göstermektedir.

Tümördeki makrofajlar mononükleer fagositer sistem hücrelerindedir ve tümör hücresine karşı direkt sitotoksik etki göstermektedir (142). Makrofajlar ayrıca VEGF, bFGF ve "angiopoietin" gibi anjiogenezisi stimüle eden çeşitli faktörler salgılayabilirler (143). Primer tümörlerde makrofaj infiltrasyonunun şiddetli olarak arttığı görülmektedir ve malignensilerde anjiogenik "switch" ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Genetik olarak "colony stimulating factor-1" (CSF-1) delesyonu ile makrofaj maturasyonunda inhibisyon ve tümörlerde infiltrasyon ile anjiogenik "switch" oluşur. Bu hipoteze göre makrofajlar tümör progresyonunu regüle ederler ve agresivite ile ilgili süreçte, tümör anjiogenezisinde rol oynarlar (144). Lin ve arkadaşının çalışmasında tümör ile ilişkili makrofajlar ortalama damar sayısı ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (145). Tataroğlu ve arkadaşlarının kolorektal karsinomlardaki çalışmasında makrofajların sayısı ve invazyon derinliği, lenf nodu metastazı ve neovaskülarizasyon arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (146). Bizim çalışmamızda ise tümördeki makrofajların oranının tümör diferansiasyonu, evresi, vasküler invazyon ve perinöral invazyon ile istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki gösterdiği izlenmiştir. Lenf nodu metastazı, lenf nodu metastaz grubu, uzak metastaz ve ortalama damar sayısı ile makrofajlar arasında güçlü anlamlı ilişki izlenmiştir. Bunun nedeni olarak tümör içinde artan makrofaj sayısı ile anjiogenik faktörlerin artması sonucu anjiogenezis indüklenmesi olarak düşünülebilir. Artan anjiogenezis tümör progresyonuna ve bölgesel ile uzak metastaza neden olabileceğinden tümör içinde makrofaj yoğunluğunun artması tümör hücrelerine karşı direkt sitotoksik etkiye sahip olmalarına rağmen, bu özelliklerini baskılayan anjiogenezisi uyarıcı etkileri nedeni ile hastanın progresyonu kötü yönde etkilenir.

Sonuç olarak; kolorektal adenokarsinomlarda tümörün evresi ve grade'i önemli prognostik parametrelerden biri olmakla birlikte vasküler-perinöral invazyon, lenf nodu metastaz varlığı ile sayısının uzun dönem prognozu belirlemede daha etkili olduğu izlendi. Ortalama damar sayısının tüm parametrelerden bağımsız olarak önemli bir prognostik parametre ve

kuvvetli anjiogenik faktörler olan VEGF ve PSMA ekspresyonları ile paralellik gösterdiği izlendi. Ayrıca artan makrofaj infiltrasyonu ile damar sayısının arttığı dikkati çekti. Bu bulgular bize ilerde planlanan anti-anjiogenik tedavi planında tümör içindeki damar proliferasyonunun engellenmesinde üzerinde düşünülmesi gereken önemli faktörlerin başında VEGF ve PSMA ekspresyonlarının engellenmesi ve makrofaj infiltrasyonunun bu alanda önlenmesi olduğunu düşündürdü.

KAYNAKLAR

1. Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wound and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 70:478-490, 2001.
2. Bergers G, Benjamin LE. Angiogenesis: tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401, 2003.
3. Böhle AS, Kalthoff H. Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbeck's Arch Surg* 384:133-140, 1999.
4. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *The Oncologist* 5(suppl 1):3-10, 2000.
5. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285(21):1182-1186, 1971.
6. Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E, Szeluga DJ and Rubin DB. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 37:921-926, 1994.
7. Rinker-Schaeffer CW, Hawkins AL, Su SL, Israeli RS, Griffin CA, Isaacs JT, Heston WD. Localization and physical mapping of the prostate-specific membrane antigen (PSM) gene to human chromosome 11. *Genomics* 30:105-108, 1995.
8. Kawakami M, Nakayama J. Enhanced expression of prostatic-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. *Cancer Res* 57:2321-2324, 1997.
9. Silver DA, Pellicer I, Fair WR, Heston WD and Cordon-Cardo C. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin Cancer Res* 3: 81-85, 1997.
10. Tsui P, Rubenstein M and Guinan P. Correlation between PSMA and VEGF expression as markers for LNCaP tumor angiogenesis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 3:287-290, 2005.
11. Chang SS, Reuter VE, Heston WD, Bander NH, Grauer LS and Gaudin PB. Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res* 59:3192-3198, 1999.
12. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK and McDonald DM. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 160:985-1000, 2002.
13. Hotoszewicz JS, Kawinski E, Murphy GP: Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients. *Anticancer Res* 7:927-935, 1987.
14. Silver DA, Pellicer I, Fair WR, Heston WD, Cordon-Cardo C: Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin Cancer Res* 3:81-85, 1997.
15. Gong MC, Chang SS, Sadelain M, Bander NH and Heston WDW. Prostate-specific membrane antigen (PSMA)-specific monoclonal antibodies in the treatment of prostate and other cancers. *Cancer and Metastasis Reviews* 18:483-490, 1999.
16. Olson WC, Heston WDW and Rajasekaran AK. Clinical trials of cancer therapies targeting prostate-specific membrane antigen. *Reviews on Recent Clinical Trials* 2:182-190, 2007.
17. Milowsky MI, Nanus DM, Kostakoğlu L, Sheehan CE, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ, Ross JS and Bander NH. Vascular targeted therapy with anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 in advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 25:540-547, 2007.

18. Khashab MA, Pickhardt PJ, Kim DH, Rex DH. Colorectal anatomy in adults at computed tomography colonography: normal distribution and the effect of age, sex, and body mass index. *Endoscopy* 41(8):674-678, 2009.
19. Rosai J. Rosai and Ackermans's Surgical Pathology. Ninth edition, Vol. 1. Philadelphia, Elsevier's Health Sciences, 2004.
20. Netter FH. Abdomen. Atlas of Human Anatomy (Netter FH, Colacino S, eds). NJ, Ciba-Geigy Corp. 251-256, 264-268, 1989.
21. William JL, Sherman LS, Potter S, Scott WJ. Development of the gastrointestinal tract. Human Embryology (William JL, ed). Third edition. Philadelphia, Churchill Livingstone, 235-251, 2001.
22. Dahl J, Greenson KJ. Colon. Histology for Pathologists (Stacey EM, ed). Third edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 627-648, 2009.
23. Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:301-332, 2000.
24. Halm DR, Halm ST. Secretagogue response of goblet cells and columnar cells in human colonic crypts. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C212-C233, 2000.
25. Jass JR. Mucin core proteins as differentiation markers in the gastrointestinal tract. *Histopathology* 37:561-564, 2000.
26. Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB. Minireview: development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* 145:2639-2644, 2004.
27. Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci* 59:156-170, 2002.
28. Lee E, Schiller LR, Fordtran JS. Quantification of colonic lamina propria cells by means of a morphometric point-counting method. *Gastroenterology* 94:409-418, 1988.
29. Rumessen JJ, Vanderwinden JM, Rasmussen H, Hansen A, Harn T. Ultrastructure of interstitial cells of Cajal in myenteric plexus of human colon. *Cell Tissue Res* 337(2):197-212, 2009.
30. Cancer Facts & Figures – 2008. Erişim: (www.cancer.org/downloads/STT/2008CAFFfinalsecured.pdf).
31. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Seventh edition. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2005.
32. Brozek W, Kriwanek S, Bonner E, Peterlik M, Cross HS. Mutual associations between malignancy, age, gender, and subsite incidence of colorectal cancer. *Anticancer Res* 29(9):3721-3726, 2009.
33. Konishi F, Morson BC. Pathology of colorectal adenomas: A colonoscopic survey. *J Clin Pathol* 35:830-841, 1982.
34. Teoh HH, Delahunt B, Isbister WH. Dysplastic and malignant areas in hyperplastic polyps of the large intestine. *Pathology* 21:138-142, 1989.
35. Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G, Nesland JM. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol* 27:65-81, 2003.
36. Kambara T, Simms LA, Whitehall VLJ, Bahar KJ, Wynter CVA, Walsh KD, Barker MA, Arnold S, McGivern A, Matsubara N, Tanaka N, Higuchi T, Genç J, Jass JR, Leggett BA. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 53:1137-1144, 2004.
37. Khan PM, Tops CMJ, Broek Mvd, Breukel C, Wijnen JT, Oldenburg M, Bos Jvd, van Leeuwen-Cornelisse ISJ, Vasen HFA, Griffioen G, Verspaget HM and Jager FCA den H. Close linkage of a highly polymorphic marker (D5S37) to familial adenomatous polyposis (FAP) and confirmation of FAP localization on chromosome 5q21-22. *Hum Genet* 79:183-185, 1988.

38. Sieber OM, Tomlinson IP, Lamlum H. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor—genetics, function and disease. *Mol Med Today* 6:462-469, 2000.
39. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev cancer* 1:55-67, 2001.
40. Tetsu O, McCormick F. β -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398:422-426, 1999.
41. Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A, Sander C. The ras protein family: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* 30:4637-4648, 1991.
42. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM and Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319:525-532, 1988.
43. Korchyskyi O, Landström M, Stoika R, Funa K, Heldin CH, Duke PT and Souchelnytskyi S. Expression of Smad proteins in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 82(2):197-202, 1999.
44. Takahashi M, Wakabayashi K. Gene mutation and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci* 95(6):475-480, 2004.
45. Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet* 310(7):677-685, 2001.
46. Bautista CV, Felis CP, Espinet JM, Garcia JB and Salas JV. Telomerase activity and telomere length in the colorectal polyp-carcinoma sequence. *Rev Esp Enferm Dig* 101(3):179-186, 2009.
47. Hamelin R, Chalastanis A, Colas C, El Bchiri J, Mercier D, Scheurs AS, Simon V, Svrcek M, Zaanani A, Borie C, Buhard O, Capel E, Zouali H, Praz F, Muleris M, Flejou JF, Duval A. Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancer. *Bull Cancer* 95(1):121-132, 2008.
48. Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, Rashid A, Longo P, Eshleman JR, Booker S, Lynch HT, Jass JR, Green JS, Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 153:1063-1078, 1998.
49. Vasen HF, Möslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Burn J, Capella G, Engel C, Frayling I, Friedl W, Hes FJ, Hodgson S, Mecklin JP, Moller P, Nagengast F, Parc Y, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Wijnen J. *J Med Genet* 44(6):353-362, 2007.
50. Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: The syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 87:1114-1125, 1995.
51. Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R and Yuasa Y: Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res* 57:3920-3923, 1997.
52. Vasen HFA, Watson P, Mecklin J-P, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology* 116:1453-1456, 1999.
53. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen HJ. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 81(2):214-218, 1999.
54. Zisman TL, Rubin DT. Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14(17):2662-2669, 2008.

55. Marchand LL, Wilkens LR, Kolonel LN, Hankin JH and Lyu LC. Associations of sedentary lifestyle, obesity, smoking, alcohol use, and diabetes with the risk of colorectal cancer. *Cancer Research* 57:4787-4794, 1997.
56. Johnson IT, Lund EK. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 26(2):161-181, 2007.
57. Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhart JA, Schernhammer ES, Curhan GC, Fuchs CS. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA* 294(24):3090-3091, 2005.
58. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C. Prognostic factors in colorectal cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124:979-994, 2000.
59. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P, Rubio CA, Sobin LH, Fogt F, Winawer SJ, Goldgar DE, Jass JR. Carcinoma of the colon and rectum. WHO Classification Tumors of the Digestive System (Hamilton SR, Aaltonen LA, eds). Lyon, IARC Press, 105-119, 2000.
60. Lebe B, Küpelioğlu A. Kolorektal adenomlardaki HGM ve MUC2 mürin değişikliklerinin immünhistokimyasal yöntemle araştırılması ve karsinom gelişimindeki rolü (54 olgu). *Türk Patoloji Dergisi* 17(1-2):38-42, 2001.
61. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic and molecular features. *Mod Pathol* 16:376-388, 2003.
62. Makino T, Tsujinaka T, Mishima H, Ikenaga M, Sawamura T, Nakamori S, Fujitani K, Hirao M, Kashiwazaki M, Masuda N, Takeda M, Mano M. Primary signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum: report of eight cases and review of 154 Japanese cases. *Hepatogastroenterology* 53(72):845-849, 2006.
63. Arai T, Esaki Y, Sawabe M, Honma N, Nakamura K and Takubo K. Hypermethylation of the hMLH1 promoter with absent hMLH1 expression in medullary-type poorly differentiated colorectal adenocarcinoma in the elderly. *Mod Pathol* 17(2):172-179, 2004.
64. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic and molecular features. *Mod Pathol* 16:376-388, 2003.
65. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: colorectal working grup. *Cancer* 88:1739-1757, 2000.
66. Hosshino S, Yamauchi Y, Mikami K, Shinohara T, Noritomi T, Yamashita Y, Maekawa T, Shirakusa T. Does a correlation exist between tumor occupation rate and Dukes classification in rectal cancer? *Int Surg* 92(3):133-137, 2007.
67. Wolmark N, Fisher ER, Wieand HS, Fisher B and Contributing NSABP Investigator. The relationship of depth of penetration and tumor size to the number of positive nodes in Dukes C colorectal cancer. *Cancer* 53:2707-2712, 1984.
68. Griffin MP, Bergstralh EJ, Coffey RJ, Beart RWj, Melton LJ III. Predictors of survival after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 60:2318-2324, 1987.
69. Nazato DM, Matos LL, Waisberg DR, Souza RM, Martins LC and Waisberg J. Prognostic value of carcinoembryonic antigen distribution in tumor tissue of colorectal carcinoma. *Arq Gastroenterol* 46(1):26-31, 2009.
70. Eisenberg B, Decosse JJ, Harford F and Michalek J. Carcinoma of the colon and rectum: The natural history reviewed in 1704 patients. *Cancer* 49:1131-1134, 1982.

71. Latournerie M, Jooste V, Cottet V, Lepage C, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and prognosis of synchronous colorectal cancers. *Br J Surg* 95(12):1528-1533, 2008.
72. Wolmark N, Fisher ER, Wieand HS, Fisher B and Contributing NSABP Investigator. The relationship of depth of penetration and tumor size to the number of positive nodes in Dukes C colorectal cancer. *Cancer* 53:2707-2712, 1984.
73. Chen HS, Chen SMS. Obstruction and perforation in colorectal adenocarcinoma: an analysis of prognosis and current trends. *Surgery* 127(4):370-376, 2000.
74. Krasna MJ, Flancbaum L, Cody RP, Shneibaum S and Ari GB. Vascular and neural invasion in colorectal carcinoma. Incidence and prognostic significance. *Cancer* 61:1018-1023, 1988.
75. Tzardi M. Role of total mesorectal excision and of circumferential resection margin in local recurrence and survival of patients with rectal carcinoma. *Dig Dis* 25:51-55, 2007.
76. Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA. Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review. *J Natl Cancer Inst* 99(6):433-441, 2007.
77. Spratt JS Jr, Spjut HJ. Prevalence and prognosis of individual clinical and pathologic variables associated with colorectal carcinoma. *Cancer* 20:1976-1985, 1967.
78. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674, 1997.
79. Risau W, Flamme B. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73-91, 1995.
80. Drake CJ, Little CD. Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci* 92:7657-7761, 1995.
81. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1:27-31, 1995.
82. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, NcCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91(10):3527-3561, 1998.
83. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438:932-936, 2005.
84. Lahdenranta J. Vascular diversity and the functional role of peptidases in angiogenesis. Academic dissertation, the Faculty of Biosciences, University of Helsinki, Department of Biological and Environmental Sciences, Helsinki, 2004.
85. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP and Dejana E. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* 118:1511-1522, 1992.
86. Darland DC, D'Amore PA. Cell-cell interactions in vascular development. *Curr Top Dev Biol* 52:107-149, 2001.
87. Martinez-Lemus LA, Wu X, Wilson E, Hill MA, Davis GE, Davis MJ and Meininger GA. Integrins as unique receptors for vascular control. *J Vasc Res* 40:211-233, 2003.
88. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98(2):147-157, 1999.
89. Allt G, Lawrenson JG. Pericytes: Cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* 169:1-11, 2001.

90. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK and McDonald DM. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 160:985-1000, 2002.
91. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 200:423-428, 2003.
92. Larrivee B, Karsan A. Involvement of marrow-derived endothelial cells in vascularization. *Handb Exp Pharmacol* (180):89-114, 2007.
93. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125:725-732, 1998.
94. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380(6573):435-439, 1996.
95. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380:439-442, 1996.
96. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376:62-66, 1995.
97. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. Cardiovascular failure in Mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 282:946-949, 1998.
98. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-228, 1999.
99. Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovascular Research* 78:413-421, 2008.
100. Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res* 58(2):390-398, 2003.
101. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2:161-174, 2002.
102. Hristov M, Weber C. Progenitor cell trafficking in the vascular wall. *J Thromb Haemost* 7(1):31-34, 2009.
103. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev* 100(2):157-163, 2001.
104. Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wound and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 70:478-490, 2001.
105. Bergers G, Benjamin LE. Angiogenesis: tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401, 2003.
106. Jain RK. The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nat Med* 4:655-657, 1998.
107. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumor. *Am J Pathol* 160:985-1000, 2002.
108. Wang JM, Kumar S, Pye D, Haboubi N, al-Nakib L. Breast carcinoma: comparative study of tumour vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 86:386-388, 1994.

109. Tsirlis TD, Papastratis G, Masselou K, Tsigris C, Papachristodoulou A, Kostakis A, Nikiteas NI. Circulating lymphangiogenic growth factors in gastrointestinal solid tumors, could they be of any clinical significance? *World J Gastroenterol* 14(17):2691-2701, 2008.
110. Mohammed RAA, Green A, El-Shikh S, Paish EC, Ellis IO and Martin SG. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors-A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *British Journal of Cancer* 96:1092-1100, 2007.
111. Israeli RS, Powell CT, Fair WR and Heston WD. Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res* 53:227-230, 1993.
112. O'Keefe DS, Su SL, Bacich DJ, Horiguchi Y, Luo Y, Powell CT, Zandvliet D, Russell PJ, Molloy PL, Nowak NJ, Shows TB, Mullins C, Vonder Haar RA, Fair WR and Heston WD. Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene. *Biochim Biophys Acta* 1443:113-127, 1998.
113. Rajasekaran AK, Anilkumar G and Christiansen JJ. Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein? *Am J Physiol Cell Physiol* 288:975-981, 2005.
114. Kawakami M, Nakayama J. Enhanced expression of prostatic-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. *Cancer Res* 57:2321-2324, 1997.
115. Olson WC, Heston WDW and Rajasekaran AK. Clinical trials of cancer therapies targeting Prostate-Specific Membrane Antigen. *Reviews on Recent Clinical Trials* 2:182-190, 2007.
116. Perner S, Hofer MD, Kim R, Shah RB, Li H, Møller P, Hautmann RE, Gschwend JE, Kuefer R, Rubin MA. Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. *Human Pathology* 38:696-701, 2007.
117. Chang SS, Reuter VE, Heston WDW, Bander NH, Grauer LS and Gaudin PB. Five different anti-prostatic-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res* 59:3192-3198, 1999.
118. Takahashi K, Mori T and Yasuno M. Histologic grade of metastatic lymph node and prognosis of rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 43(Suppl):S40-S46, 2000.
119. Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA. Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review. *J Natl Cancer Inst* 99:433-441, 2007.
120. Ding YB, Chen GY, Xia JG, Zang XW, Yang HY, Yang L, Liu YX. Correlation of tumor-positive ratio and number of perigastric lymph nodes with prognosis of patients with surgically-removed gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 10(2):182-185, 2004.
121. Priolli DG, Cardinalli IA, Pereira JA, Alfredo CH, Margarido NF, Martinez CAR. Metastatic lymph node ratio as an independent prognostic variable in colorectal cancer: study of 113 patients. *Tech Coloproctol* 13:113-121, 2009.
122. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 16(4):376-388, 2003.
123. Harris EI, Lewin DN, Wang HL, Lauwers GY, Srivastava A, Shyr Y, Shakhtour B, Revetta F, Washington MK. Lymphovascular invasion in colorectal cancer: an interobserver variability study. *Am J Surg Pathol* 32(12):1816-1821, 2008.
124. Wang YD, Wu P, Mao JD, Huang H, Zhang F. Relationship between vascular invasion and microvessel density and micrometastasis. *World J Gastroenterol* 13(46):6269-6273, 2007.

125. Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 50:6130-6138, 1990.
126. Weiss L, Bronk J, Pickren JW, Lane WW. Metastatic patterns and target organ arterial blood flow. *Invasion Metastasis* 1:126-135, 1981.
127. Van Trappen PO, Pepper MS. Lymphatic dissemination of tumour cells and the formation of micrometastases. *Lancet Oncol* 3:44-52, 2002.
128. Achen MG and Stacker SA. Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread-new players begin to emerge. *Int J Cancer* 119:1755-1760, 2006.
129. Oh-e H, Tanaka S, Kitadai Y, Shimamoto F, Yoshihara M, Haruma K. Angiogenesis at the site of deepest penetration predicts lymph node metastasis of submucosal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 44:1129-1136, 2001.
130. Vermeulen PB, van den Eynden GG, Huget P, Goovaerts G, Weyler J, Lardon F, van Marck E, Hubens G, Dirix LY. Prospective study of intratumoral microvessel density, p53 expression and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 79:316-322, 1999.
131. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18:4-25, 1997.
132. Han H, Silverman JF, Santucci TS, Macherey RS, d'Amato TA, Tung MY, Weyant RJ, Landreneau RJ. Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis. *Ann Surg Oncol* 8:72-79, 2001.
133. Kleespies A, Bruns CJ, Jauch KW. Clinical significance of VEGF-A, -C and -D expression in esophageal malignancies. *Onkologie* 28:281-288, 2005.
134. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, Breau JL, Perret GY. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer* 94:1823-1832, 2006.
135. Fuckar D, Dekanic A, Stifter S, Mustac E, Krstulja M, Dobrila F, Jonjic N. VEGF expression is associated with negative estrogen receptor status in patients with breast cancer. *Int J Surg Pathol* 14:49-55, 2006.
136. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3566-3570, 1995.
137. Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S, Kuwai T, Kimura S and Chayama K. Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 95:32-39, 2004.
138. Ding S, Li C, Lin S, Han Y, Yang Y, Zhang Y, Li L, Zhou L and Kumar S. Distinct roles of VEGF-A and VEGF-C in tumour metastasis of gastric carcinoma. *Oncology Reports* 17:369-375, 2007.
139. Liu H, Moy P, Kim S, Xia Y, Rajasekaran A, Navarro V, Beatrice K, and Bander NH. Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium. *Cancer Research* 57:3629-3634, 1997.
140. Haffner MC, Kronberger IE, Ross JS, Sheehan CE, Zitt M, Gilbert M, Öfner D, Zelger B, Ensinger C, Yang XJ, Geley S, Margreiter R, Bander NH. Prostate-specific membrane antigen expression in the neovasculature of gastric and colorectal cancers. *Human Pathology – 2009*. Erişim: (www.elsevier.com/locate/humpath).
141. Mhawech-Fauceglia P, Smiraglia DJ, Bshara W, Andrews C, Schwaller J, South S, Higgs D, Lele S, Herrmann F, and Odunsi K. Prostate-specific membrane antigen expression is a potential prognostic marker in endometrial adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(3):571-577, 2008.

142. Shimura S, Yang G, Ebara S, Wheeler TM, Frolov A, Thompson TC. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. *Cancer Res* 60:5857-5861, 2000.
143. Ohno S, Inagawa H, Soma GI, Nagasue N. Role of tumor associated macrophage in malignant tumors: should the location of the infiltrated macrophages be taken into account during evaluation? *Anticancer Res* 22:4269-4276, 2002.
144. Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, Qian H, Xue X and Pollard JW. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* 66(23):11238-11246, 2006.
145. Lin EY and Pollard JW. Tumor-associated macrophages pres the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res* 67(11): 5064-5066, 2007.
146. Tataroğlu C, Polat A, Kargı A, Őengiz S, amdeviren H, Kpelioğlu A. Kolorektal karsinomlarda invazyon derinliğinin neovasklarizasyon, peritmral NK hcreti, makrofaj ve eozinofil lkositlerle iliŐkisinin araştırılması. *Trk Patoloji Dergisi* 21(3-4):49-53, 2005.