

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GASTROİNTESTİNAL SİSTEM TÜMÖRLERİNDE
LYVE-1, VEGFR-3, CD44 EKSPRESYON DÜZEYLERİ
VE LENFATİK METASTAZ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Dr. Füsün ÖZMEN

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2008**

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GASTROİNTESTİNAL SİSTEM TÜMÖRLERİNDE
LYVE-1, VEGFR-3, CD44 EKSPRESYON DÜZEYLERİ
VE LENFATİK METASTAZ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Dr. Füsün ÖZMEN

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Emin KANSU**

**ANKARA
2008**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Dr. Füsün Özmen tarafından yapılan bu çalışma jürimiz tarafından
Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programında Doktora Tezi olarak
26-06-2008'de kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof.Dr.Şevket Ruacan
(Hacettepe Üniversitesi)



Danışman :

Prof.Dr.Emin Kansu
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye :

Prof.Dr.Dicle Güç
(Hacettepe Üniversitesi)



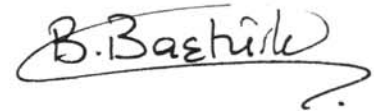
Üye :

Doç.Dr.Evren Özdemir
(Hacettepe Üniversitesi)



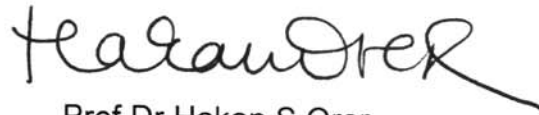
Üye :

Doç.Dr.Bilkay Baştürk
(Gazi Üniversitesi)



ONAY :

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav
Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından
uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof.Dr.Hakan S.Orer

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı desteğini her zaman yanımda hissettiğim, bilimsel kişiliği ve yeniliğe açık tavrıyla beni özgür bırakarak önümde yeni ufuklar açan sayın hocam Prof Dr Emin Kansu'ya,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında heyecanımı paylaşan, bana yol gösteren, ihtiyacım olduğunda hep yanımda olan sevgili hocam Prof Dr Dicle Güç' e,

Tezin ana temasını oluşturan, insan dokularının elde edilmesi konusunda tereddütsüz destek vererek tezin yapılabilirliğini sağlayan, tezin her aşamasında bilimsel bilgi ve birikimini benimle paylaşan, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği şefi sayın Doç Dr Mehmet Mahir Özmen'e ve onun şahsında kliniğinden emeği geçen herkese,

Deneysel çalışmalarıma başladığım zaman karşılaştığım sorunların çözümünde bana yardımcı olan sevgili arkadaşım Uzm Biyolog Cemaliye Akyerli'ye, Western blot tekniğini öğrenmemdeki katkılarından dolayı Uzm Biyolog Hande Canpınar'a, tezin ön görüşmelerinde fikirlerini benimle paylaşarak projeye destek veren sayın Doç Dr Evren Özdemir' e,

İmmünohistokimyasal çalışmanın ne demek olduğunu anlamamı sağlayan, tekniği öğrenmeme yardımcı olan Ankara Numune EAH Patoloji Kliniği şefi sayın Doç Dr Selda Seçkin'e,

Tezin planlanması ve istatistik değerlendirmelerin yapılması aşamasındaki katkılarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof Dr Ergun Karaağaoğlu'na,

Laboratuvarda geçirdiğim çalışma saatleri sırasında bana eşlik ederek çalışmaların daha keyifli hale gelmesini sağlayan sevgili Burçin Taşbasan'a,

Ayrıca Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalının diğer tüm çalışanlarına ilgi ve desteklerinden dolayı en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

En büyük teşekkür, bu zor ve yorucu süreçte hep yanımda olan, beni destekleyen, yüreklendiren, anlayış gösteren sevgili aileme. Onlarsız bu tez asla tamamlanamazdı.

“Bu tez TÜBİTAK-SBAG tarafında 104S581 poje no ile desteklenmiştir”

ÖZET

Fusun Özmen. Gastrointestinal sistem tümörlerinde LYVE-1, VEGFR-3, CD44 ekspresyon düzeyleri ve lenfatik metastaz arasındaki ilişki. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Doktora Tezi, ANKARA, 2008. Gastrointestinal sistem tümörlerinde lenf nodu metastazı önemli prognostik göstergelerdendir. Tümör lenfatik damar yoğunluğunun kantitatif olarak ölçülmesi, lenfanjiyogenez, lenfatik metastaz ve klinikopatolojik durumlar hakkında bilgi verebilir. Bu amaçla mide, kolon, pankreas kanserlerinde lenfatik endotel hücre belirteci olan LYVE-1, VEGFR-3 ile adezyon molekülü CD44'ün mRNA düzeyleri, normal ve tümörlü dokularda real-time PCR ile kantitatif olarak ölçüldü. Elde edilen değerler ile lenf nodu tutulumu, tümörün histolojik tipi, diferansiasyonu, T evresi, stage durumu ve nöral, perinöral, vasküler invazyon arasındaki ilişki araştırıldı. Her üç molekülün dokudaki dağılımına immünohistokimyasal yöntemle bakıldı ve Western blot tekniği ile bu gen mRNA'larının proteine dönüşümü gösterildi. Mide, kolon, pankreas kanserlerinde LYVE-1, CD44 ve VEGFR-3 gen ekspresyonlarının normal dokudaki düzeylerine oranla anlamlı ölçüde arttığı saptandı. Histolojik tip, diferansiasyon ve evre gibi klinikopatolojik kriterler ile gen ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamazken, özellikle mide kanserli hastalarda Pozitif Lenf Nodu sayısının/Total Lenf Nodu sayısına oranı ve perinöral invazyon ile bu artışların ilişkili olduğu görüldü. Mide kanserinde LYVE1 ve CD44 over-ekspresyonları ile perinöral invazyon ve lenfatik tutulum arasında; pankreas kanserlerinde ise CD44 ve VEGFR-3 ile vasküler invazyon arasında anlamlı bir ilişki saptandı. LYVE-1 antikoruna boyanan lenfatik damarların dokudaki dağılımları değerlendirildiğinde, hastaların %13 ünde tümöral, buna karşın %27'sinde peritümöral boyanma olduğu saptandı. Tümöral ve peritümöral boyanmaların her ikisinde de LYVE-1 ile boyanma saptanan hastaların tamamında lenf nodu metastazı pozitif. Bu bulgular, her üç genin de gastrointestinal sistem tümörlerde lenfanjiyogenez, invazyon ve lenf nodu metastazı oluşumunda önemli rol oynadıklarını düşündürmektedir. LYVE-1 güvenilir bir lenfatik damar belirtecidir ve immünohistokimyasal olarak kullanıldığında tümöral ve peritümöral lenfatik damar yoğunluğu saptamakta yararlanılabilir. Bu bulguların biyolojik önemini, hastaların prognozlarını belirlemede ve tedavilerinde kullanılabilirliğini saptamaya yönelik yeni çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: LYVE-1, VEGFR-3, CD44, kanser, lenfanjiyogenez
Destekleyen kurum : TÜBİTAK-SBAG, Proje No: 104S581

ABSTRACT

Füsün Özmen. The relationship between LYVE-1, VEGFR-3, CD44 gene expressions and lymphatic metastasis in gastrointestinal tumors. Hacettepe University, Institute of Health Sciences, PhD thesis on Tumor Biology and Immunology, ANKARA, 2008. Lymph node metastasis is a very important prognostic factor in gastrointestinal tumors. Quantification of lymphatic vessel density in the tumor might give some information on the relationship between lymphangiogenesis, lymphatic metastasis and clinicopathologic parameters. With this purpose mRNA levels of lymphatic endothelial cell marker LYVE-1, vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-3, and adhesion molecule CD44 in normal and tumor tissues of patients with gastric, pancreatic and colonic cancers were quantitatively measured by using real-time PCR and the results were correlated with lymph node metastasis, histologic type and the differentiation of the tumor, T stage, final stage according to TNM and the presence of neural, perineural and vascular invasions. The distribution of these molecules in the tissue was evaluated by using immunohistochemistry and the conversion of their mRNAs into the proteins was shown by Western-Blot. LYVE-1, CD44 and VEGFR-3 gene expression levels in gastric pancreatic and colonic cancers were significantly higher than the normal tissue. While there was no correlation between gene expressions and clinicopathologic features such as histologic type, differentiation and stage, the levels of gene expressions were found to be increased with the ratio of the positive lymph node/total lymph node and the presence of perineural invasion especially in gastric cancers. The significant correlation were also found between LYVE-1 and CD44 overexpressions and perineural invasion and lymph node positivity in gastric cancers; CD44 and VEGFR-3 overexpressions and vascular invasion in pancreatic cancers. When the LYVE-1 antibody stained lymphatic vessels distribution in tissue were evaluated, lymphatic vessels were located intra-tumorally in 13% and peri-tumorally in 27% of the patients. Moreover, lymph node metastasis were also positive in all LYVE-1 stained patients. It is concluded that LYVE-1, VEGFR-3 and CD44 all play an important role in the development of lymphangiogenesis, invasion and lymph node metastasis in gastrointestinal cancers. LYVE-1 is an excellent lymphatic vessel marker tumoral and peritumoral lymphatic vessel density might be evaluated by using immunohistochemical techniques. Future studies are needed to evaluate their biological relevance in prognosis and therapeutics.

Keywords : LYVE-1, VEGFR-3, CD44, Cancer, Lymphangiogenesis
Supported by : TÜBİTAK-SBAG with Project number: 104S581

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	5
2.1 Lenfatik Sistem Gelişimi	6
2.2 Lenfatik Endotel Hücre Belirteçleri	8
2.2.1 Prospero-related homeobox 1 (Prox-1)	8
2.2.2 Padoplanin	9
2.2.3 LYVE-1	9
2.2.4 VEGFR-3	15
2.2.5 Desmoplakin	17
2.2.6 Kemokin CCL21	18
2.3 CD44 ve Lenfatik Metastaz	19
2.4 LYVE-1, VEGFR-3, CD44 ve GIS Tümörleri	21
2.5 Tümör Ve Lenfatik Sistem	24
2.5.1 İntratümoral ve Peritümöral Lenf Damarları	24
2.5.2 Tümör lenfanjiyogenezi nasıl başlar ?	25
2.5.3 Tümör Hücrelerinin Lenfatik Damarlara Neden Gereksinimi Vardır?	26
2.6 Lenfanjiyogenik Faktörler	27
2.6.1 VEGF Ailesi	28
2.6.2 PDGF Ailesi	30
2.6.3 FGF-2	31
2.6.4 Anjiyopoetin	32
2.6.5 HGF	32

2.6.6	IGF	33
2.7	Mide Kanseri	34
2.7.1	Epidemiyoloji ve risk faktörleri	34
2.7.2	Patoloji	37
2.7.3	Mide Lenf Kanalları ve Lenf Bezleri	38
2.7.4	Cerrahi Tedavi	41
2.8	Kolon Kanseri	46
2.8.1	Etyoloji ve patogeneze	46
2.8.2	Genetik Faktörler	46
2.8.3	Adenom-Kanser Dönüşümü	47
2.8.4	Diyet	48
2.8.5	Diğer Etkenler	49
2.8.6	Patoloji	51
2.8.7	Kolon Kanseriinde Yayılma Yolları	51
2.8.8	Evrelendirme	52
2.8.9	Cerrahi Tedavi	55
2.9	Pankreas Kanseri	55
2.9.1	Patoloji	56
2.9.2	Evrendirme	57
2.9.3	Pankreas Kanseriinde Lenf Nodları	57
2.9.4	Cerrahi Tedavi	58
3	HASTALAR VE YÖNTEM	59
3.1	Hasta Seçimi ve Hasta Grupları	59
3.2	Yöntemler	60
3.2.1	Cerrahi Örnekleme Yöntemi	60
3.2.2	Doku Lizisi ve Homojenizasyonu	62
3.2.3	RNA İzolasyonu	63
3.2.4	RNA Miktarının Ölçülmesi	63
3.2.5	Reverse Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu	63
3.2.6	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	64
3.2.7	Agaroz Jel Elektroforezi	66
3.2.8	Real-Time PCR	67

3.2.9	İmmünohistokimyasal Yöntem	69
3.2.10	Dokudan Protein İzolasyonu	72
3.2.11	Protein Ölçümü	73
3.2.12	Western Blot Yöntemi (WB)	73
3.3	İstatistik Analiz	78
4	BULGULAR	79
4.1	PCR Sonuçları	79
4.2	Real Time Kantitatif –RTPCR	80
4.2.1	Mide Kanserli Hastalar	81
4.2.2	Kolon Kanserli Hastalar	89
4.2.3	Pankreas Kanserli Hastalar	90
4.3	İmmunohistokimyasal Analiz	91
4.4	Western Blot Analizi	95
5	TARTIŞMA	97
6	SONUÇ VE ÖNERİLER	107
7	KAYNAKLAR	111
8	EKLER	136
8.1	Etik Kurul Onayı	137

SİMGELER ve KISALTMALAR

Ang-1	Anjiyopoetin-1
Ang-2	Anjiyopoetin-2
APS	Amonyum Per Sülfat
Ark	Arkadaşları
BEC	Kan damarı endotel hücreleri(<i>Blood Endothel Cell</i>)
bp	Baz çifti (Base Pair)
BV	Kan damarları (<i>Blood Vessels</i>)
CCL	CC-tip kemokin tipi ligand
CCR	CC-tip kemokin reseptörü
CD	Hücre yüzey molekülü (<i>Cluster of diferentiation</i>)
CD44-6v	CD44 varyant 6
CD44-9v	CD44 varyant 9
cDNA	Komplementer DNA
c-met	Mezenkimal Epitelyal Transizyon Faktörü(<i>Mesenchymal-epithelial transition Factor</i>)
Ct	Eşik siklus (<i>Treshold Cycle</i>)
Cys	Sistein
D2-40	Padoplanin antikoru
D2 α	Cerrahi diseksiyon şekli
ddH2O	Çift distile su
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
dk	Dakika
EGF	Epitelyal Büyüme Faktörü (<i>Epithelial Growth Factor</i>)
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
FGF2	Fibroblast Büyüme Faktörü 2
Flt-4	Fms benzeri tirozin kinaz-4(<i>Fms- like tyrosine kinase 4</i>)
FMS	<i>M-CSF</i> reseptörü
GAPDH	Giseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
HA	Hiyaluronik Asit
HCl	Hidrojen klorur

HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü (<i>Hepatosit Growth Faktor</i>)
HGF-R	Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü (<i>Hepatosit Growth Faktor Receptor</i>)
HIF-1 α	Hipoksi uyaran faktör-1 α (<i>Hypoxia Inducible Factor-1α</i>)
ICAM-1	İnterselüler Adezyon Molekülü-1(<i>Intercellular Adhesion Molecule1</i>)
IHC	İmmünohistokimya
IGF	İnsülin benzeri Büyüme Faktörü (<i>Insulin-Like Growth Factor-1</i>)
IGF-1R	İnsülin benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü-1 (<i>Insulin-Like Growth Factor Receptor-1</i>)
IGF-2R	İnsülin Büyüme Faktörü Reseptörü-2 (<i>Insulin-Like Growth Factor Receptor-2</i>)
IGFBP	IGF bağlanan protein (<i>IGF binding protein</i>)
M-CSF	Makrofaj Koloni Stimüle edici Faktör (<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
kDa	Kilodalton
LEC	Lenfatik endotel hücresi (<i>Lymphatic Endothel Cell</i>)
LV	Lenfatik damarları (<i>Lymphatic Vessel</i>)
LVD	Lenfatik damar dansitesi (<i>Lymphatic Vessel Density</i>)
LYVE-1	Lenfatik damar endoteli HA reseptörü-1(<i>Lymphatic Vessel Endothelial HA receptor</i>)
mA	Miliamper
MMP	Matriks Metallo Proteinaz
mRNA	Haberci RNA (<i>messenger RNA</i>)
miRNA	Mikro RNA
MW	Moleküler ağırlık (<i>Molecular Weight</i>)
cMYC	Myelocytomatosis (<i>Onkogen</i>)
nm	Nano mol
OD	Optik dansite
p53	Protein 53, tümör baskılayıcı gen
PAL-E	Kan damarı belirteci
PBST	<i>Phospat Buffered Saline+Tween 20</i>
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)

PDGF	Platelet Büyüme Faktörü (<i>Platelet Derived Growth Factor</i>)
PDGFR	Platelet Büyüme Faktörü Reseptörü (<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i>)
PIGF	Plasental Büyüme Faktörü (<i>Placental Growth Factor</i>)
PROX-1	<i>Prospero-related homeobox 1</i> , lenfatik endotel belirteci
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik asit
RPE	RNA izolasyon solüsyonu
RPW1	RNA izolasyonu yıkama solüsyonu
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase- PCR</i>
RTQ RT-PCR	Real-time Quantitative Reverse Transcriptase- PCR
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	TetraMetil Etilen Diamin
Tie2	Endotel hücresi tirozin kinaz reseptörü
TRIS	Trisma baz
uPA	Ürokinaz Plazminojen aktivatör
VEGF	Vasküle Endotel Büyüme Faktörü (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VEGFR	Vasküler Endotel Büyüme Faktör Reseptörü (<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>)
VEGFR-3-Ig	İmmünglobülün VEGFR-3 (<i>Immünglobin vascular endothelial growth factor receptor-3</i>)
VHL	Von Hippel-Lindau
VSMC	Vasküler düz kas hücresi (<i>Vascular Smooth Muscle Cell</i>)
µl	mikrolitre

ŞEKİLLER

- Şekil 2-1 Lenfatik sistemin embriyonel gelişim modeli
- Şekil 2-2 LYVE-1 ile CD44 aminoasit dizilimi
- Şekil 2-3 LYVE-1 ve CD44 molekülleri
- Şekil 2-4 LYVE-1,CD44, HA ilişkisi
- Şekil 2-5 Lenfanjiyogenezi yöneten moleküller
- Şekil 2-6 Anjiyogenez ve Lenfanjiyogenez Molekülleri
- Şekil 2-7 Lenfatik metastazı etkileyen faktörler
- Şekil 2-8 VEGF molekülleri ve görevleri
- Şekil 2-9 Midenin bölgesel lenfatik akımını gösteren şematik çizim
- Şekil 2-10 Midenin lenf bezleri (perigastrik, perivasküler,diğer)
- Şekil 2-11 Adenom-Kanser Dönüşümü için Genetik Model
- Şekil 2-12 Dukes ve Modifiye-Dukes(Astler-Coller) Sınıflandırması
- Şekil 2-13 Peripankreatik ve bölgesel lenf nodu grupları
- Şekil 3-1 Total gastrektomi-D2 Lenf Nodu Diseksiyonu
- Şekil 4-1 Genlerin PCR ürünleri
- Şekil 4-2 PCR ve Real-time PCR
- Şekil 4.3 Mide Kanseri hastalarda normal dokuya oranla
LYVE-1, CD44, VEGFR3 ekspresyon düzeyleri
- Şekil 4-4 Mide Kanseri hastalarda PLN/TLN oranıyla relatif
ekspresyon arasındaki ilişki
- Şekil 4-5 Mide Kanseri hastalarda histolojik tip ile relatif
ekspresyon arasındaki ilişki
- Şekil 4-6 Mide Kanseri hastalarda diferansiasyon ile relatif
ekspresyon arasındaki ilişki
- Şekil 4-7 Mide Kanseri hastalarda T evresi ile relatif ekspresyon
arasındaki ilişki
- Şekil 4-8 Mide Kanseri hastalarda perinöral invazyon ile relatif
ekspresyon arasındaki ilişki
- Şekil 4-9 Perinöral invazyon
- Şekil 4-10 Vasküler invazyon

- Şekil 4-11 Kolon kanserli hastalarda tumor dokusunda
gen ekspresyon düzeyleri
- Şekil 4-12 Pankreas kanserli hastalarda tumor dokusunda
gen ekspresyon düzeyleri
- Şekil 4-13 LYVE-1 pozitif lenfatik damarlar (x100)
- Şekil 4-14 VEGFR-3 pozitif lenfatik damarlar (x100)
- Şekil 4-15 CD44 pozitif lenfoid hücreler ve abortif glandlar(x 100)
- Şekil 4-16 VEGFR-3 western blot sonuçları

TABLolar

- Tablo 2-1 Kan kapilleri ile lenfatik kapiller arasındaki morfolojik ve yapısal farklılıklar
- Tablo 2-2 Lenfatik ve Kan damarı belirteçleri
- Tablo 2-3 American Joint Committee on Cancer'in Mide Kanseri için Evreleme Sistemi
- Tablo 2-4 Midenin Bölgesel Lenf Düğümlerinin Japon Sınıflaması
- Tablo 2-5 Mide tümörünün yerleşimine göre lenf düğümü çıkarılması
- Tablo 2-6 Dukes sınıflandırması
- Tablo 2-7 Astler-Coller sınıflandırması
- Tablo 2-8 Kolorektal kanserde TNM evrelemesi
- Tablo 2-9 Pankreatik karsinom için TNM evrelemesi
- Tablo 3-1 Çalışma Protokolü
- Tablo 3-2 Primer Dizilimleri
- Tablo 3-3 Reaksiyon Bileşenleri
- Tablo 3-4 Real-time PCR reaksiyon bileşenleri
- Tablo 3-5 Real-time PCR reaksiyon koşulları
- Tablo 3-6 Bond-Max, IHC protokolü
- Tablo 4-1 Mide Kanseri hastalarının patolojik özellikleri ve LYVE-1, VEGFR3 ve CD44 gen ekspresyon düzeyleri
- Tablo 4-2 Primer mide kanserleri içinde LYVE-1 pozitif lenfatik damar varlığı
- Tablo 4-3 Gastrointestinal tümörlerde IHC sonuçları

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Hiyaluronik Asit (HA) bir ekstrasellüler matriks glikozaminoglikanıdır. Yaygın olarak dokularda ve vücut sıvılarında bulunur. En fazla bulunduğu yer deri ve kas-iskelet sistemidir. İnflamasyon dışında lökositlerin ektafazasyonunda, yara iyileşmesinde ve tümör hücrelerinin metastazında etkin rol alır.

Hiyaluronik asit yıkım döngüsü sırasında oluşan bazı ürünler anjiyogeneze neden olurken, büyük çoğunluğu lenfatik sisteme geçerek lenf nodları içinde yıkıma uğrar. HA ile etkileşime giren proteinlerin çoğu bağ dokusunun bir parçasıdır. Hyaluronik asitin çok sayıdaki hücre yüzey reseptörü arasından en iyi bilineni CD44' dür. Bu reseptör epiteliyal, mezenkimal ve lenfoid hücrelerin yüzeyinde yüksek oranda eksprese olur ve HA homeostazında önemli rol oynar. CD44–HA arasındaki ilişki sayesinde epitel yapısı korunabilmekte, lenfosit ektafazasyonu ile tümör hücrelerinin hematojen yayılımı gerçekleşmektedir. Buna rağmen CD44, HA'ın sekestrasyonu, lenfatik sisteme geçerek lenf nodları tarafından tutulumu ve burada degradasyonun da rol oynamaz. En önemlisi de lenf damarlarının endotelinde bulunmaz.

Lenfatik damar endoteli HA reseptörü-1(LYVE-1), (*Lymphatic vessel endothelial HA receptor*) Jackson ve arkadaşları tarafından 1999 yılında tanımlanan sadece lenfatik damarlar ve lenf nodlarında bulunan yeni bir hiyaluronik asit reseptörüdür. Bazı çalışmalarda karaciğer sinüzoidlerinde de bulunduğu gösterilmiştir. Bir CD44 homoloğu olan LYVE-1, tip 1 integral membran glikoproteinidir ve 322 aminoasitten oluşur. LYVE-1 ile CD44 reseptörlerinin polipeptidleri arasında % 43 oranında benzerlik vardır.

LYVE-1, lenf damarlarının hem iç hem de dış yüzeyinde bulunur. Bu nedenle lenfositlerin ve diğer benzer hücrelerin lenfatik sisteme geçişinde primer rol oynadığı düşünülmektedir. CD44 ise vasküler sisteme geçişte görev almakta, lenfatik sisteme geçişte ise görevi bulunmamaktadır. HA ile etkileşen hücreler, aynı anda- aynı HA' e bağlanan LYVE-1' ler sayesinde lenf akımına karışmakta ve aynı şekilde lenf nodu tarafından da

tutulmaktadır. Öyleyse sadece lenfatik endotele özgü olması sebebiyle de LYVE-1, tümörün lenfatik metastazında bir gösterge olarak kullanılabilir.

Diğer bir lenfatik endotel hücre belirteci ise Vasküler endotel büyüme faktör reseptörü-3(VEGFR-3)'dür(*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3*).Büyüme faktörlerinden, vasküler endotel büyüme faktörü-C (VEGF-C), lenfatik endoteli VEGFR-3 aracılığıyla uyarır ve lenfanjiyogenezde rol alır. Tümör gelişimi sırasında VEGF-C ekspresyonunun artması, yeni lenf kapillerinin oluşumunu artırmakta ve bu nedenle de lenf nodu metastazı göstergesi olarak kullanılabileceği kabul edilmektedir. Oysa, lenfatik metastaz; lenfatik damar invazyonu, hücrelerin lenfatik damarlar içine taşınımı, lenf nodu tarafından tutulumu ve burada proliferasyonu gibi birçok basamaktan oluşur. VEGFR-3 ekspresyon artımı lenfanjiyogenezin bir göstergesi olabilir fakat tek başına lenf nodu metastazını göstermek açısından yetersizdir. Bu nedenle LYVE-1 gibi, lenfatik sisteme özgü bir başka gen üzerinde daha çalışılması uygun olacaktır.

Bu tez, tümör hücrelerinin, lenf nodu metastazlarını göstermede, lenfatiklere özgü bir molekül olan LYVE-1'in belirteç olarak kullanılabilme olasılığını araştırmak için planlanmıştır. Böyle bir ilişkinin varlığı, aynı zamanda tedavinin planlanabilmesinde de yol gösterici olabilir. Bu amaçla çalışma grubu olarak lenfatik yayılım yaptığı çok iyi bilinen insan gastrointestinal sistem tümörleri seçildi. Çalışmada kullanılan dokular mide, kolon, pankreas kanseri tanısı ile cerrahi tedavi uygulanan hastalardan ameliyat sırasında alındı. Normal, tümörlü ve metastatik dokularda LYVE-1, CD44 ve VEGFR-3 mRNA düzeylerinin real-time PCR ile kantitatif ölçümleri yapılarak normal dokuya göre değişimlerinin hesaplanması amaçlandı.

CD44 de, LYVE-1 ile yapısal benzerlik göstermesi, aynı moleküle bağlanması ve çeşitli tümörlerde artış göstermesi nedeniyle çalışmaya dahil edildi. VEGFR-3'ün, tek başına lenfatik belirteç olarak kullanımında birtakım tartışmalar olması ve yapılan araştırmalardaki sonuçların farklılığı nedeniyle, tümöre ait daha çok bilgi elde edinebileceği düşüncesiyle LYVE1 ile beraber çalışılmasına karar verildi. Literatürde LYVE-1, VEGFR-3, CD44 ekspresyonlarının kantitatif olarak gösterildiği çalışmalar daha çok

immünohistokimyasal yöntemleri içermektedir. İmmünohistokimya ile lenfatik damar yoğunluğunun ölçümüne ait tam bir görüş birliği yoktur ve kişisel uygulama farklılıkları gösterebilir. Bu nedenle kantitatif gen ekspresyon ölçümü için, daha sensitif bir yöntem olan '*real-time quantitative reverse transcriptase- PCR*' (RTQ RT-PCR) kullanıldı.

Bu tez planlanmadan önce LYVE-1, VEGFR-3 ve CD44 genlerinin ekspresyon düzeylerini real-time PCR ile ölçen kolon kanserleri ile yapılmış çalışmalar bulunmasına karşın sonuçlar tartışmalıydı ve insan mide, ve pankreas kanserleri ile yapılmış bu tipte bir çalışma bulunmuyordu.

Bu araştırma tümör dokusunda, LYVE-1 ile birlikte CD44 ve VEGFR-3 mRNA düzeylerinin normal dokuya göre değişimini aynı zamanda gösteren, literatürdeki ilk çalışma olacaktır. Bu sayede, bu üç reseptörün transkripsiyon düzeyleri, bulunan değerlerin birbirleriyle karşılaştırılması, ayrı ayrı veya birlikte lenfatik belirteç olarak kullanılabilirlikleri üzerine yorum getirilebilecektir.

Bu moleküllerin ekspresyon düzeylerinin RTQ RT-PCR kullanılarak ölçümüne ek olarak immünohistokimyasal yöntemlerle de dokularda histolojik olarak değerlendirilmeleri de yapıldı. Ayrıca, LYVE-1, CD44, VEGFR-3' ün kolon, mide ve pankreas dokularında transkripsiyondan sonra translasyonunu da test etmek amacıyla Western Blot tekniği kullanıldı.

RT-PCR, Histopatolojik inceleme ve Western Blot sonucunda elde edilen verilerle :

- 1) Normal ve tümörlü dokularda LYVE-1, VEGFR-3, CD44 ekspresyonunun varlığı ve derecesinin gösterilmesi,
- 2) Başta LYVE-1 olmak üzere VEGFR-3 ve CD44 ekspresyonu ile lenfatik metastaz varlığı arasındaki ilişkinin gösterilmesi,
- 3) LYVE-1 ekspresyon derecesi ile lenfatik metastaz varlığı ve yoğunluğu arasındaki korelasyonun gösterilmesi: hiç lenf nodu metastazı olmayan ile çok sayıda lenf nodu metastazı olan tümörlerin karşılaştırılması,
- 4) Tümör tipi, büyüklüğü, diferansiyasyon derecesi ve evresi ile LYVE-1, VEGFR-3, CD44 ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırılması,

5) LYVE-1, VEGFR-3, CD44 düzeylerinin tümör tipine ve evresine göre birbirleriyle karşılaştırılmaları amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

Lenfatik sistem, kardiyovasküler sistemle birlikte doku homeostazisinde önemli bir rol oynar. Görevi dokuda oluşan lenf sıvısını alarak venöz sisteme iletmektir. Lenfoid sistem, Timus, Dalak, lenfatik damarlar, lenf nodları, tonsiller, mukozal lenfoid dokular ve Peyer plaklarından oluşur. Lenfatik damarlar bir ağ gibi bütün vücudu dolaşan, bir ucu açık olan kapalı bir sistemdir ve en son duktus torasikus aracılığıyla venöz sisteme açılır.

Lenf sıvısı ise vasküler sistemden ekstravaze olarak doku aralığına sızan proteinden zengin bir sıvıdır. Lenfatik sistem bu sıvıyı dokudan, lenf kapillerleri aracılığıyla alır ve giderek genişleyen lenfatik damarlar ve duktus torasikus üzerinden tekrar venöz sisteme verir. Bu dönüş solunum sırasında oluşan basınç değişikliği veya iskelet kasları ile damar düz kaslarının hareketleri sırasında oluşan basınç farkı sayesinde gerçekleşir.

Lenfatik sistem, immün yanıtın oluşumu ve devamını sağlamak gibi çok önemli bir göreve de sahiptir. Lenfosit ve antijen sunan dendritik hücre gibi immün sistem hücrelerini deriden alıp, bölgesel lenf nodlarına taşıyarak immün yanıtı başlatır. Ayrıca bağırsaklarda bulunan lakteal lenf damarları ile yağ ve yağda eriyen A, D, E ve K vitaminlerini gastrointestinal sistemden alarak venöz sisteme taşırlar. Lenfatik sistemin, lenfödem, inflamatuvar hastalıklar ve tümör metastazı gibi birçok patolojik durumda ne kadar önemli rol oynadığı bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir.

Lenfatik kapillerler, tek sıra lenfatik endotel hücrelerden (LEC) oluşur. Kan damarlarının anatomik yapısından farklı olarak, lenfatik endoteli çevreleyen bir kas tabakası, perisit ve devamlılık gösteren bir bazal membran yoktur (Tablo 2-1). Fakat lenfatik endotel hücreleri birbirlerinin üstünde kayarak bir valv yapısı oluştururlar. Bu özellik sayesinde lenf sıvısının, geriye kaçıışı önlenmiş olur (1). Ayrıca lenfatik endotel hücreleri elastik filamentlerle ekstraselüler matrikse tutunurlar. Böylece dokudaki interselüler basıncın değişimine göre lenfatik kapillerin kollabe olması engellenir(2). İnterstisiyel basınç arttığında, filamentlerin gerilmesi, üstüste binmiş endotel hücrelerinin

aralarının açılarak lenfatik sıvı, makromolekül ve hücrelerin lenfatik kapillerlere geçişini sağlar.

Tablo 2-1: Kan kapilleri ile lenfatik kapiller arasındaki morfolojik ve yapısal farklılıklar (9)

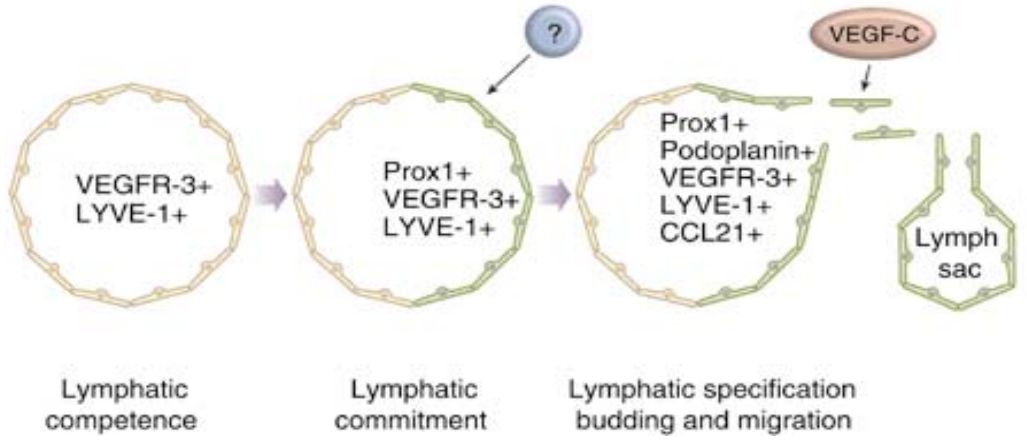
	Kan kapilleri	Lenfatik Kapiller
Çap	7-9 μm	20-120 μm
Lümen	Düzenli(eliptik)	Düzensiz
Ağ organizasyonu	Yoğun (10-40 μm)	Gevşek (100-200 μm)
Sınır katlanmaları	Yok	Var
Sitoplazmik vezikül	Az	Çok
İnvajinasyon	Az	Çok
Fenestrasyon	Var	Yok
İnterselüler junction	Zonula okludens	Zonula adherens
Overlapping junction	Yok	Var
End-to-end junction	Az	Var
Weibel-Palade body	Var	Sık görülmez
Bazal lamina	Devamlılık gösterir	Yok veya kesikli
Perisit	Var	Yok
Ankor filamentleri	Yok	Var

Lenfatik sistem, santral sinir sistemi, retina, kemik iliği ve plasenta dışında hemen hemen bütün organ ve dokularda bulunmaktadır. Bu kadar önemli olmasına karşın bilimsel olarak daha çok vasküler sistem üzerinde durulmuş, lenfatik endotele spesifik belirteçlerin bilinmemesi, lenfatik sistemin gelişimi ve fonksiyonuna ait moleküler regülasyonunu anlamamızı zorlaştırmıştır. Son yıllarda bu belirteçlerin keşfedilmesi lenfanjiyogenezisin oluş mekanizmalarının ve hastalıklarda, özellikle onkolojik süreçlerdeki rolünün anlaşılmasına katkıda bulunmuştur.

2.1 Lenfatik Sistem Gelişimi

Embriyogenez sırasında lenfatik damarların gelişimi, kan damarlarından başlamakta ve bunu yöneten birçok sinyal bulunmaktadır. Bu teori ilk olarak *Florange Sabin* tarafından bir asır önce ileri sürülmüş ve günümüze kadar en fazla kabul gören bir görüş olarak kalmıştır(3, 4). Venöz endotel hücrelerinden filizlenen lenfatik endotel hücreleri primitif lenf

keselerini oluşturur ve çevre organların içine doğru ilerleyerek matür lenfatik sistem gelişir (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Lenfatik sistemin embriyonel gelişim modeli (14)

Yakın zamanda yapılan çalışmalarla PROX-1 ve LYVE-1 gibi lenfatik endotele spesifik belirteçlerin bulunması bu teoriyi desteklemektedir. Bugün için tanımlanmış birçok lenfatik belirteç bulunmaktadır (**Tablo 2-2**).

Tablo 2-2: Lenfatik ve Kan damarı belirteçleri (14)

Marker	Fonksiyonu	LV	BV
Prox1	Transkripsiyon Faktörü	++	-
Podoplanin	Transmembran glikoprotein	++	-
LYVE-1	Hiyaluronik Asit Lenfatik endotel Reseptörü-1	++	-
VEGFR-3	Vasküler Büyüme Faktör Reseptör-3	+	-/(+)
Neurofilin-2	Semaforin ve büyüme faktör reseptörü	+	-/(+)
Makrofaj Mannoz Reseptör 1	L-selektin reseptör	+	-
CCL21	CC-kemokin	+	-
CCL20	CC-kemokin	+ (++)	- (++)
Dezmoplakin	Zonula adherens ankor proteini	+	-
Plakoglobin	Hücre kavşağında kadherini hücre iskeletine bağlar	+	-
Integrin $\alpha 9$	Adhezyon molekülü, osteopontin ve tenascin reseptörleri, VEGFR-3 koreseptör subüniti?	+	-
CD44	Hiyaluronik asit Reseptör	-	+

Marker	Fonksiyonu	LV	BV
VEGF-C	Vasküler Endotelial Büyüme Faktör-C	-	+
VEGFR-1	Vasküler Büyüme Faktör Reseptörü-1	-	+
Neuropilin-1	Semaforin ve büyüme faktörü reseptörü	-	+
Endoglin/CD105	Düşük afiniteli TGF- β reseptörü	-	++
CD34	L-selektin Reseptörü	-(+)	++
IL-8	CXC-kemokin	-	+
N-cadherin	Adezyon molekülü	-	+
ICAM-1/CD54	Adezyon molekülü	-	+
Integrin $\alpha 5$	Adezyon molekülü, fibronektin reseptör subüniti	-	+
Collagen IV	Ekstraselüler matriks proteini	-(+)	++
Versikan	Kondritin sülfat proteoglikanı	-	+
Laminin	Bazalmembran molekülü	-(+)	++
Kollagen XVIII	Bazal membran molekülü	-(+)	++
PAL-E	Kaveolae-eşlik eden glikoprotein?	-	++

2.2 Lenfatik Endotel Hücre Belirteçleri

Bu bölümde araştırmalarda en fazla kullanılan lenfatik endotel belirteçleri kısaca özetlenecektir:

2.2.1 Prospero-related homeobox 1 (Prox-1)

Drosophila Melonagaster' de bulunan prospero geninin homoloğu olarak izole edilmiş bir nükleer transkripsiyon faktörüdür (5). Embriyoda lenfanjiyogenezin başlaması için juguler ven endotel hücrelerinin bazılarında Prox1'in eksprese olması zorunluluktur. Prox1 *knock-out* farelerde lenfatik filizlenmenin etkilenmediği fakat lenfatik sistemin de gelişimini tamamlayamadığı tesbit edilmiştir (6,7,8). Aynı zamanda Prox1 yokluğunda, LYVE-1'in de içinde bulunduğu lenfatik endotele özgü belirteçlerin ekspesyonu yapılamaz buna karşın kan damarlarının belirteçleri eksprese olmaya devam eder. Yani, vasküler belirteçlerden, lenfatik belirteçlerin

ekspresyonuna geçişi sağlayan Prox1'dir (6,9,10,11,12). VEGFR-3 vasküler endotel hücrelerinde lenfanjiyogenez başlamadan öncede eksprese olmakta, Prox1 ekspresyonundan sonra ise lenfatik endotele farklılaşan endotel hücrelerindeki ekspresyonu artmakta, vasküler hücrelerdeki ekspresyonu ise azalmaktadır(12,13). Fakat Prox1'in ekspresyonunu tetikleyen mekanizmalar hala bilinmemektedir.(15)

2.2.2 Padoplanin

Glomerüler filtrasyonu düzenleyen müsin tipi bir transmembran glikoproteinidir. Esas olarak renal korpüsküllerde bulunan padosit membran proteini olarak tanımlanmış, in vivo ve in vitro çalışmalarda sadece lenfatik endotel hücrelerinde tespit edilmiştir(14,15,16,13). Biyolojik fonksiyonu bugün için tam olarak bilinmiyor olsa da in vitro çalışmalarda, hücre iskeletini oluşturan moleküllerden biri olan aktini yöneterek hücre hareketlerinde görev aldığı gösterilmiştir (17). Padoplanin ekspresyonu bulunmayan farelerde lenfödem geliştiği, lenf damarlarının dilate olduğu, sıvı transportunun bozulduğu bu nedenle doğumda solunum yetmezliği ile öldükleri gösterilmiştir(17,18). 2005 yılında Schacht ve arkadaşları D2-40 antikoru tanımlamış ve padoplaninin endotel dışındaki hücrelerden de eksprese olduğunu göstermişlerdir. Padoplaninin squamöz hücre karsinomlarında ve bazı germ hücreli tümörlerde de eksprese olması tümör progresyonu üzerinde rolü olabileceğini düşündürmektedir(14,19,20).

2.2.3 LYVE-1

Tip1 integral membran glikoproteini ve hiyaluronik asit (HA) reseptörüdür(21). Yapısal olarak diğer bir HA reseptörü olan, CD44 ile benzerlik gösterir, 322 aminoasitten oluşur, bunun 21 tanesi transmembran kısmında ve 63 tanesi sitoplazmik kuyrukta yer alır. CD44'de olduğu gibi N-terminal ucunda, glikolize olmuş 'link modül' denilen kısım bulunur ve bu özellik bütün 'link süperaillesi' ne ait proteinlerde mevcuttur. LYVE-1 cDNA'sı, *Expressed Sequence Tag* (EST) veri tabanında, CD44 aminoasit dizilimi üzerinden araştırılarak tanımlanmıştır (22). CD44 ile LYVE-1 , %43 oranında benzerlik gösterir ve bu benzerlik daha çok HA-bağlanan kısım olan link

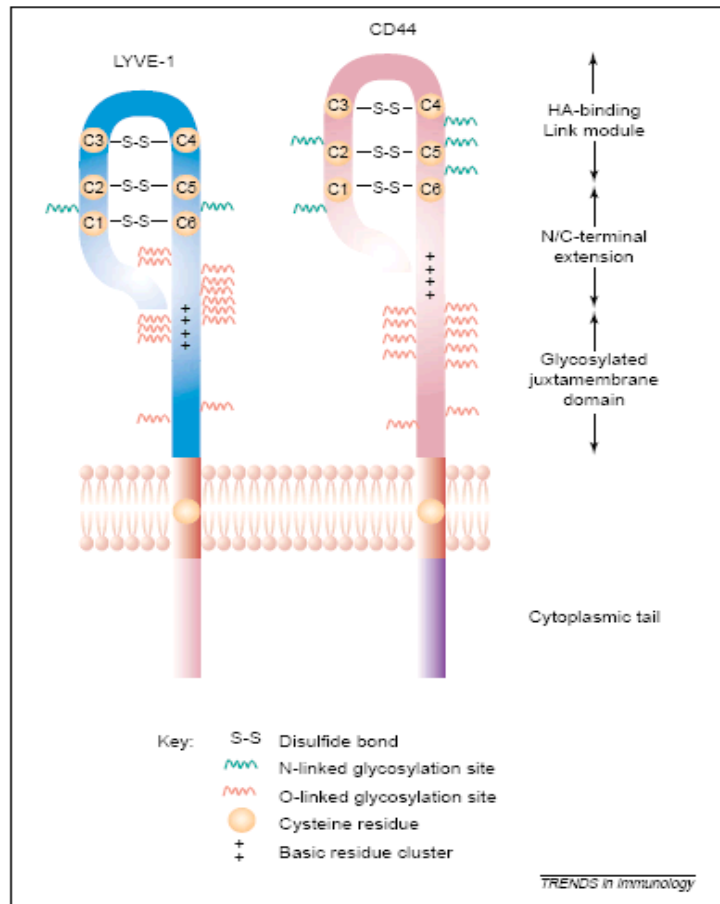
modülde görülmektedir(23, 24). Link modül, transmembran başlangıcı veya sap olarak adlandırılan kısımla devam eder ve bu bölüm yoğun bir şekilde O-glikolizasyonla modifiye olmuştur. Sap kısmı proteinin kütlesine en fazla katkıda bulunan kısımdır, 20 kD'dan daha büyüktür ve çift oluşturmamış bir sistein aminoasiti (Cys101) içerir (Şekil 2-2). Nightingale T ve Jackson DG ' a göre bu sistein molekülü, intermoleküler disülfid köprüleri oluşturarak iki LYVE-1'in dimerik bir yapı oluşturmaya katkıda bulunuyor olabilir. Fakat LYVE-1'lerin kovalent bağlanarak dimerik bir yapı oluşturmalarının fizyolojik önemi var mıdır sorusu henüz açıklığa kavuşmamıştır(25).

CD44	1	M DKFWHHAAGLCLVPLSLAQIDLNITCRFAGVFHVEKNG	40
LYVE-1	1	M ARCSLV LLLTS IWTTRL..LVQGS LRAEELS IQVSCRIMGIT LVS KKA	48
	41	RYSISRTEAADLCKAFNSTLPTMAQMEKALSIGFETCRYGFL EGHVVIP	89
	49	NQQLNETFAKEACRLGLSLAGKDQVETALKA SFETCSYGVWVG DGFVVIS	98
	90	RIHPNSI CAÄNNTGVYILT SNTS. QYDTYGFNASAPPEEDCTSVTDL PNÄ	1 38
	99	RI SPNPKGKNGVGVLIWKVPVSRQFAAYGYNSSDTWTNSC..IPEI ITT	1 46
	139	FDGPITI TI VNRDGTTRY.VQKGEYR.T NPEDI YPSNP TDÖDVSSGSSSER	1 86
	147	KD.PI ENTQTATQTTEFIVSDSTYSVA SPYSTIPAPTTTP PAPÄTSIPR	195
	187	SSTSGGYIF YTFSTVHPIDEDSPWITDSTDRIPATRDQÖTFHPSGGSHT	2 36
	196	RK.....KLIQVTEVEMETS..TMST ETEPFVENKAAPK.....	227
	237	THGSESDGHSHGSQEGGANTTS GPI RTPQI PEWII ILASL.LALA LILAV	285
	248	..NEÄAGF...GG...VPTALLVLALLFFGAAAGLGF	2 56
	286	...I AVNSRRRCGQKKKLVINSNGA VEDRKPSGLN:GEASKSQEMV	329
	297	GVVKRYVKAPFP TNKNQÖKE M IETK...VVKEEKANDSNPNEESKKTÖKN	3 03
	330	HLVNKESSETPDQFMTADETRNLQNVDMKI GV	36 1
	344	PEESKSPSKTIVRCLEÄEV.....	32 2

Şekil 2-2 : LYVE-1 ile CD44 aminoasit dizilimi. **Turkuaz ve mavi**; sırasıyla link modülün N ve C terminali, **kırmızı**: Link bölgesi (C2-C5) ve link uzantısı (C1ve C6) disülfid köprüleri içeren sisteinler, **yeşil**; transmebran bölgesi, **turuncu**; transmebran bölgesinde ve sadece LYVE1' de bulunan sisteinler, **yeşil disk**: iki N-glikozilasyon bölgesi, CD44'deki (N120) kırmızı çerçeveli (25)

CD44 ile en fazla benzerliğin bulunduğu link modül, hidrofobik çekirdeği saran iki adet helezondan oluşmaktadır ve bunlar disülfid köprüleri ile stabilize edilirler. Dört adet merkezi sistein aminoasiti (C2- C5) ve daha aşağı kanat kısmında ise iki adet sistein aminoasiti (C1 ve C6) bulunur,

bunlar disülfid köprüleri ile birbirine bağanmıştır. Bu kısım LYVE-1 ve CD44'ün her ikisinde de birbirinin aynıdır ve aminoasit dizilimi olarak %57 benzerlik gösterirler. CD44'de link modülde çeşitli mutasyonlar saptanmasına karşın LYVE-1'de herhangi bir mutasyon tanımlanmamıştır. İki molekül bu kadar çok benzerlik göstermesine karşın, bir takım farklılıklar da gösterirler ve yapısal farklılıklar esas olarak en çok Sap kısmında bulunur. Bu bölüm her iki molekülde de O-glikolizasyonla modifiye olmuştur fakat LYVE-1'de, CD44'e göre daha kısadır. Bu moleküller arasındaki bir diğer fark da link modüldedir. CD44'de burada beş adet siyalize N-glikan bulunurken, LYVE-1'de bu sayı ikidir.



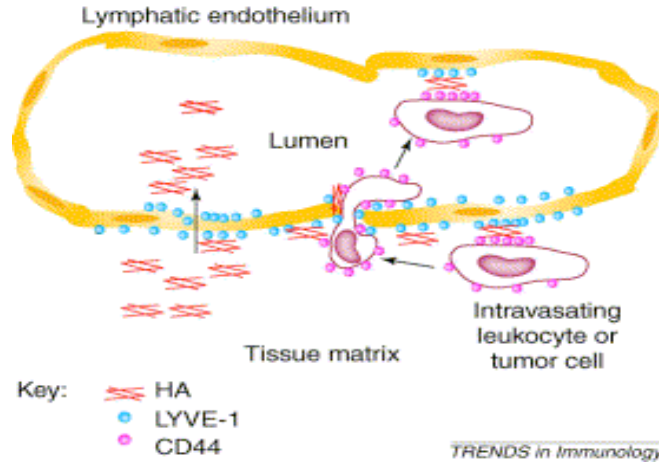
Şekil 2-3: LYVE-1 ve CD44 molekülleri (246)

LYVE-1, link modül özelliğinden dolayı, link süperailisinin bir üyesi olarak kabul edilmekte ve bu nedenle HA reseptörü olarak görev yaptığı

düşünülmektedir. Bu görüşü desteklemek amacıyla yapılan çalışmada transfekte edilmiş hücrelerden eksprese olan LYVE-1' in florasanla boyanmış HA'e bağlandığı saptanmış ve *soluble* olarak sadece ekstraselüler kısmı eksprese olduğunda ise Fc füzyon proteininin hem biotinlenmiş *soluble*, hem de immobilize yüksek moleküler ağırlıklı HA'e bağlandığı saptanmıştır (22). Hiyaluronik asite olan spesifitesini ölçmek için moleküller arası bağlanma kompetisyonu prensibine dayanan '*competitive binding*' çalışmaları oluşturulmuştur. Bunun için heparan sülfat ve kondroitin sülfat gibi çok saf glikozaminoglikanlar kullanılarak HA ile yanyana konulmuş ve LYVE-1'in HA'e olan özgüllüğünün CD44 'ten daha fazla olduğu görüşüne varılmıştır (22, 23). Bununla birlikte LYVE-1'in HA'e bağlanma afinitesi kesin olarak belirlenememiş, Fc füzyon protein HA-bağlanma eğrisi temel alınarak karşılaştırıldığında CD44' e benzer olduğu (yaklaşık 10^{-4} Kd) gözlemlenmiştir (22, 26). Ancak, LYVE-1'in hiyaluronik asite bağlanma afinitesine ait daha güvenilir bir öngörü için monometrik LYVE-1 preparatları ile ölçüm yapılması gereklidir (25)

LYVE-1'in moleküler yapısı kadar hangi dokularda sentezlendiği önemlidir. Lenfatik endotel hücrelerinde ve lenf nodu sinüsoidlerinde spesifik olarak eksprese olduğu ilk olarak proteinin kendisini de tanımlayan Banerji ve arkadaşları tarafından 1999 yılında immumohistokimyasal olarak gösterilmiştir (22). Kan damar endotelinde saptanamamış, deri, intestinal ve sekonder lenfoid organlarda bulunan lenfatik damar endotelinde ise karakteristik olarak boyanma göstermiştir. Daha sonraki çalışmalarda fare bağırsak ve pankreatik dokularında immunoelektron mikroskopik çalışma ile bu reseptörün lenfatik damarların hem luminal, hem de ekstraluminal yüzeyinde bulunduğu tesbit edilmiştir (23, 27)(Şekil 2-4). Embriyogenez sırasında LYVE-1'in kardinal vende, PROX-1 gibi kendiliğinden, ilk lenfatik kesenin tomurcuklanmasından hemen önce eksprese olmaya başladığı, erişkin dönemde ise lenfatik damar ve sinüzoidlerde sekrete olurken duktus torasikusta bulunmadığı gösterilmiştir (28). Ayrıca devamlılık göstermeyen insan ve fare karaciğer sinüzoidlerinde, insan dalak sinüzoidlerinde bol

miktarda bulunmaktadır. Normal kan damarlarında eksprese olmamasına karşın lenfatik endotelde eksprese olması nedeniyle, lenfatik belirteç olarak kullanılabileceği anlaşılmaktadır (29).



Şekil 2-4: LYVE-1,CD44, HA ilişkisi (246)

Bu bulgular farklı laboratuvarlarda yapılan kapsamlı araştırmalarla desteklenmiştir. Ayrıca baş –boyun epitelyal hücreli tümörleri (30,31), cilt melanomları (32,33), tiroid (34), akciğer (35), pankreas (35,36), meme (37,38), serviks (39), kanserleri, erken evre mide (40) ve erken evre kolon (41) kanserlerinde yapılan çeşitli insan doku çalışmalarında, lenfatik damarlarla kan damarlarını ayırmak için kullanılabilecek güvenilir bir belirteç olduğu kanaatine varılmıştır. Bununla birlikte LYVE-1 ekspresyonunun bazı durumlarda, örneğin inflamasyona yanıt olarak azalması söz konusu olabilmektedir (28). Ayrıca bazı çalışmalarda tümöre eşlik eden lenf damarlarında LYVE-1' in gösterilememesi (42,43) LYVE-1/padoplanin veya LYVE-1/ PROX1 gibi birden fazla belirteçle çalışmanın önemini ortaya koymuştur.

LYVE-1'in, son zamanlarda yapılan çalışmalarda inflamasyon olan veya tümör tarafından infiltre edilmiş doku içinde bulunan, makrofaj benzeri hücreler üzerinde de eksprese olduğu belirlenmiştir. Bu bilginin önemi ve doğruluğu korneal neovaskülerizasyon sırasında oluşan lenfanjiyogenez (44) ve transplant böbrek rejeksiyonu (45) çalışmalarıyla desteklenmiştir. Bu hücrelerin LYVE-1⁺/CD68⁺ şeklinde işaretlendiği ve yeni oluşan lenfatik

damarların içinde bulundukları gösterildi. Bu LYVE-1⁺ makrofaj benzeri hücrelerin, belki de kemik iliğinden kaynaklanan progenitör hücreler olabileceği ve VEGF-C'nin uyardığı lenfanjiyogenez sırasında lenfatik endotel hücrelerine dönüştüğü bir görüş olarak ileri sürülmüştür (28).

LYVE'in nereden eksprese olduğu kadar, görevinin ne olduğu hakkında da çeşitli görüşler bulunmaktadır. HA'e bağlandığına göre ya hiyaluronik asit metabolizmasında rol alıyor veya lökositlerin lenf damarları veya lenf nodları içindeki gidiş-gelişlerini düzenliyor olabilirler. Bu konuyla ilgili yapılan araştırmalardan bazı olasılıklar ortaya çıkmıştır.

LYVE-1, HA taşıyıcısı rolüyle, hiyaluronik asit katabolize edilmek üzere endotel hücreleri tarafından alınmasına aracılık ediyor veya HA'in afferent lenfatik damar lümenine geçişini sağlayarak, sonrasında lenf nodları tarafından tutulup, degrade edilmesinde rol alıyor olabilir. Bu her iki durum, LYVE-1 ile transfekte edilmiş fibroblastlarda, yüksek molekül ağırlıklı HA'i LYVE-1'in internalize ettiği gösterilerek desteklenmiştir (23). Bu internalizasyon CD44'de görüldüğü gibi kltrin veya kaveolin aracılı yolları kullanarak gerçekleşmektedir. Weigel ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptığı çalışma, HA' in lenf nodları tarafından alınarak degrade edilmesine LYVE-1' in aracılık ettiği görüşünü destekler niteliktedir (46).

Glikozaminoglikanların sinüzoidlerinden geçişi rastgele ve herhangi bir reseptörle ilişkili değilken, HA 'e tamamen sipesifik ve lenfatik endotelin hem luminal hem de bazolateral kısmında eşit olarak bulunduğu elektron mikroskopla gösterilmiş olan LYVE-1 reseptörünün varlığı, LYVE-1'in HA 'in hücre içine girişinde ki rolüyle uyumlu görünmektedir (23,25). Buna karşıt görüş olarak öne sürülen; lenfatik damarlar zaten birçok makromoleküle geçirgen ve endotel hücreleri arasında da gevşek bağlantılar varken neden HA, spesifik bir reseptöre ihtiyaç duysun sorusuna cevap Sabaratnam'dan gelmiştir. Snoviyal sıvıdan HA'in, lenfatik damarlara geçişiyle ilgili yaptığı araştırmada, HA'in sinoviyal aralıktan, intertisiyel matrikse herhangi bir aracı moleküle ihtiyaç duymadan geçebildiğini ancak lenfatik damarlara kendiliğinden, aracısız geçemediğini göstermiştir (25,47).

LYVE-1'in göreviyle ilgili bir başka bir tartışmada hücre adezyonuna aracılık edip- etmediği konusudur. Plazma membranında yüksek oranda eksprese olduğuna göre, önemli bir yapısal görevde üstlenmesi gerektiği düşünülmektedir. Belki de esas görevlerinden bir tanesi de ,hiyaluronik asiti aracı olarak kullanarak, hücrelerin lenfatik damarlara girişlerini, göç etmelerini sağlamaktır. Bu olay moleküler düzeyde tam olarak açıklığa kavuşturulmamasına rağmen (25) lenfatik damarların CD44 eksprese eden lökositleri taşıdığı ve CD44'ün HA'in diğer endotellere tutunmasına aracılık ettiği bilinmektedir (48). LYVE-1 de, bu göç eden hücrelerin, lenfatiklere giriş- çıkışını veya lenfatiklerdeki yolculuğunu, HA 'i geçici olarak luminal yüzde tutarak kontrol ediyor olabilir. Bu görüş, 96'lık doku kültür plakalarında, LYVE-1 tarafından tutulmuş HA molekülüne, *soluble*-CD44 molekülünün bağlanıp, immobilize olduklarının tesbit edilmesi ile desteklenmiştir (25,22). Yine de görevlerinin tam olarak tanımlanabilmesi için daha fazla in vitro çalışmaya gereksinim olduğu açıktır.

2.2.4 VEGFR-3

Vasküler endotel büyüme faktörü reseptör-3 molekülü yüksek oranda glikolize olmuş, klas III hücre yüzey tirozin-kinaz reseptörüdür. Diğer klas III tirozin kinaz reseptörü olan FMS ile ilişkili olduğu için 'fms- like tyrosine kinase 4' (Flt-4) olarak da isimlendirilir. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ailesinin A, B,C, D, E, F ve Plasental büyüme faktörü (PlGF) olmak üzere yedi üyesi bulunmaktadır. VEGF ailesi, vaskülogenez veya fizyolojik-patolojik anjiyogenezde endotel hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde çok önemli bir regülatör rol oynamaktadır (49, 50). Bu büyüme faktörlerine ait VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 olarak adlandırılan üç adet reseptör bulunur (Şekil 2-6). Bunlardan VEGFR-3, yalnızca endotel hücrelerinde bulunduğu düşünülen bir tirozin kinaz reseptörüdür ve ligandları büyüme faktörlerinden VEGF-C ve VEGF-D'dir. Alitalo ve arkadaşlarının 2002'de , VEGF-C' yi lenfanjiyogenik bir faktör olarak tanımlamalarından sonra (51) VEGFR-3 lenfatik damarlara spesifik belirteçlerden biri olarak kullanılmaya başlanmıştır (52) VEGF-C, D / VEGFR-3 sinyal iletim sisteminin, lenfatik sisteme spesifik

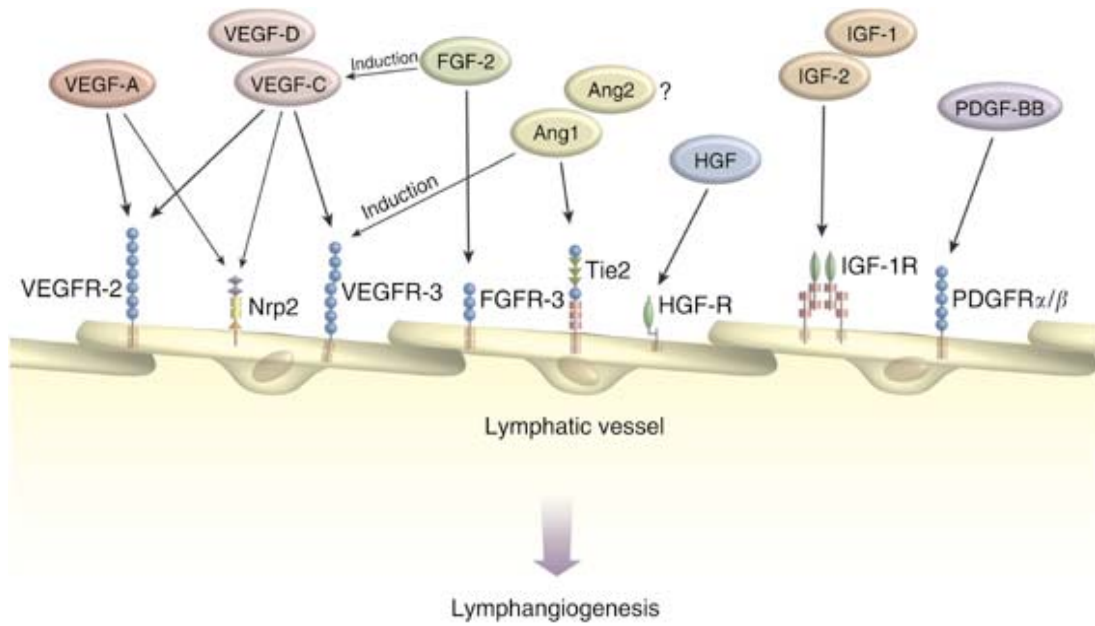
kabul edilerek çok fazla araştırmaya konu olması, VEGFR-3'ün de günümüzde üzerinde en fazla çalışma yapılan lenfatik damar endotel reseptörü olmasına neden olmuştur (52).

VEGFR-3, LYVE-1'in aksine, ilk oluşan primitif kan ve lenf damarlarında yüksek oranda eksprese olur ve bu nedenle her iki damar yapısının gelişiminde kritik rol oynar (53). VEGFR-3 Lenfatik endotel hücrelerinin proliferasyonu ve lenfatik damarların şekillenmesinde kullanılan moleküler mekanizmaların merkezinde yer alır. Erken fetal dönemde kan damarları ve mezenkimal dokuda sekrete olur, fetal dönemin ortasında venöz ve lenfatik endotelde lokalize olarak arteriyel damar endotelinden kaybolur (54). VEGFR-3, geninin inaktive edildiği çalışmalarda, erken fetal dönemde kardiyovasküler sistemde ölümcül anomalilerin ortaya çıktığı tespit edilmiş buna bağlı olarak da vasküler sistemin, lenfatik sistemden önce geliştiği sonucuna varılmıştır (55). Transgenik fare modelinde *soluble* VEGFR-3-Ig füzyon proteininin fazla miktarda sekrete olması sağlandığında, deride dermal lenfatiklerin oluşmadığı, daha derinlerde bulunan lenfatik damarların ise hipoplastik olduğu görülmüştür (56). VEGFR-3'deki *missens* mutasyonlar herediter lenfödem ile ilişkilendirilmiş benzer bir durumun fare lenfödem modelinde de olduğu gözlemlenmiştir (57,58,59,). Diğer bir çalışmada ise deneysel, fare kornea transplantasyon modeli oluşturulmuş ve VEGFR-3'ün adaptif immünitede görev aldığı sonucuna varılmıştır (60).

VEGFR-3'ün lenfatik endotele spesifik olduğunu destekleyen araştırmalar bulunmakla birlikte (52, 61) farklı yerlerde eksprese olduğunu gösteren çalışmalarda mevcuttur. 2000 yılında Partanen ve arkadaşlarının VEGFR-3 antikoru kullanarak yaptığı çalışmada VEGFR-3'ün başka endotel hücrelerinde de eksprese olduğu gösterilmiş ve fenestre kapillerlerin bulunduğu kemik iliği, dalak, karaciğer sinüzoidleri, böbrek glomerülleri, hipoplazik tiroid, paratiroid, adrenal bez, korioid pleksus endotel hücrelerinde de VEGFR-3 ekspresyonu belirlenmiştir. VEGFR-3'ün, tümör dokusu içinde yeni damarların oluşumu sırasında proliferen kan kapillerinde, yara granülasyon dokusu içinde ve fenestrasyon özelliğine sahip bazı kan damarlarında da eksprese olduğu gösterilmiştir (62,63). Bu nedenlerle

VEGFR-3, tek başına lenfatik damar belirteci olarak kullanılması için gerekli olan özgüllüğe sahip olmadığı düşünülmektedir (6).

VEGFR-3 ile ligandları VEGFC ve D'nin tümörün lenfatik yayılımı ile ilgili olduğunu gösteren birçok deneysel model ve klinikopatolojik çalışma bulunmaktadır. Malign hücre dizilerinde yapılan araştırmalar lenfatik yayılımın lenfanjiyogenik büyüme faktörlerinden direk etkilendiğini göstermektedir (64,65 66,67,27). Ancak, altta yatan moleküler mekanizmalar ve tümör lenfanjiyogenezisinin metastazdaki rolü açıklığa kavuşturulamamıştır. VEGFR-3 ile ilgili mRNA düzeylerinin ölçümüne dayanan kantitatif bir çalışmada, kolorektal kanserlerde lenfatik metastazla arasında korelasyon gösterilmiş (68) ancak VEGFR-3'ün makrofajlarda ve tümör kapillerinde de eksprese olması ölçülen düzeylerin lenfatik metastazla olan ilişkisini göstermede yeterli olup olmadığının sorgulanmasına neden olmuştur.



Şekil 2-5: Lenfanjiyogenezi yöneten moleküller

2.2.5 Desmoplakin

Lenfatik endotel hücrelerinin birbirlerine yapışma yerlerindeki (junction) sitoplazmik ankor proteinleridir (69,70). İntermedian filamentlerle plazma membranlarını birbirine bağlarlar. 1999'da Sawa ve arkadaşları tarafından

küçük lenfatik damarların belirteci olduğu , fakat daha büyük lenfatik damarlarda eksprese olmadığı gösterilmiştir (14,70). Bazı çalışmalarda (71) vasküler endotel hücre kültürlerinde saptanmasına karşın 2001'de Ebata ve arkadaşları özellikle lenfatik kapillerde eksprese olduğunu, lenfatik spesifik bir belirteç olarak kullanılabileceğini doğrulamıştır (14).

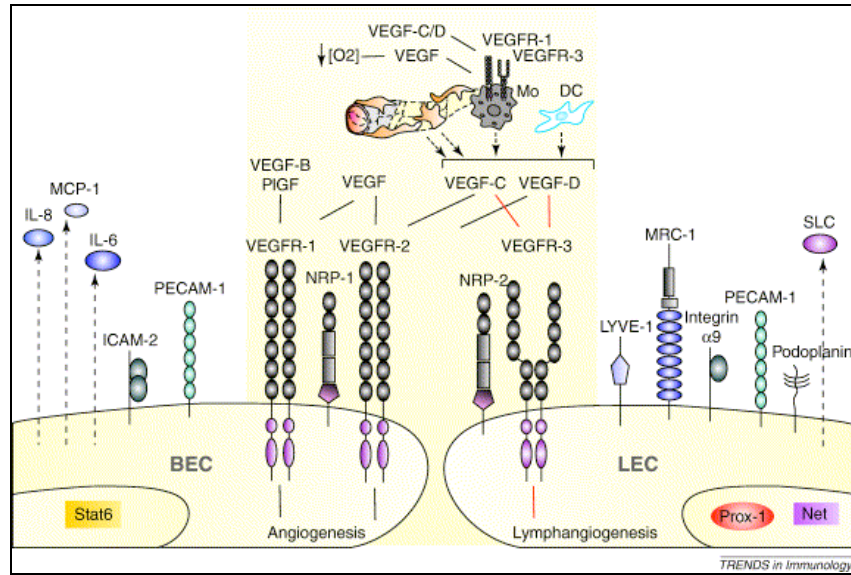
2.2.6 Kemokin CCL21

Sekonder lenfoid kemokin veya Exodus-2 olarak da bilinmektedir. Lenfatik endotel hücrelerinden sekrete olurlar, kan damarlarının endotelinde ise bulunmazlar, reseptörü de CC kemokin reseptör-7'dir (CCR-7) (16). Lenfositlerin ve antijenle uyarılmış dendritik hücrelerin, dokudan lenfatik damarlara girerek, sekonder lenfatik organlara gidişine aracılık eder. Bu nedenle immun regülasyonda ve inflamasyonda önemli rol oynar(14) ve CCL21'in malign melanom zenotransplantlarda lenf nodu metastazını artırdığı gösterilmiştir (14,72).

Yeni tanımlanan LEC spesifik moleküller mannoz reseptör 1, plakoglobin, integrin α 9, kemokin CCL 20'dir. Fakat sonuncusunun kan damarlarında da güçlü bir şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir (14,16).

Kan damarlarına spesifik moleküller ise VEGFR-1, neuropilin-1, endoglin, CD34, ICAM-1, integrin α 5, N-cadherin, kollagen IV, versikan, laminin, kollagen XIII'tür (73). Diğer kan damarları belirteçleri ise PAL-E (74) ve CD34 (75) olarak sayılabilir (Tablo 2-2).

Bu moleküllerin çoğunun regülasyonları ve fonksiyonları hala net olarak anlaşılamamış olup, araştırmalar devam etmektedir.



_ekil 2-6: Anjiyogenez ve Lenfanjiyogenez Molekülleri (3)

2.3 CD44 ve Lenfatik Metastaz

CD44, tip I transmembran glikoproteinidir ve link süper ailesinin bir üyesidir. Adezyon molekülü olarak kabul edilir ve hiyaluronik asit hücre yüzey reseptörüdür.

Hiyaluronik asit ise ekstraselüler matriksde bulunan en önemli glikozaminoglikanlardandır. HA, doku bütünlüğünün sağlanmasında önemlidir, inflamasyon, yara iyileşmesi ve embriyo gelişimi sırasında hücrelerin adezyonuna, göçüne ve diferansiasyonuna aracılık eder (25, 77). Metabolik döngüsü çok hızlıdır, yarılanma ömrü yaklaşık 24 saattir. Ekstraselüler matriksden salınan HA, aferent lenfatik damarlar tarafından degrade edilmek üzere lenf nodlarına götürülür, sonra oluşan metabolitleri eferent lenfatiklerle karaciğer sinüzoidlerine götürülerek hidrolize edilir (25,78,79).

CD44, başta epitelyal ve hematopoetik hücreler olmak üzere birçok hücre grubunda eksprese olur ve HA aracılı olarak bu hücrelerin adezyonunda görev alır (80). CD44'ün on taneden fazla transkripti bulunmaktadır. Bu farklılık CD44 transkriptinde, değişken ekzonlarda (exon 6-15) oluşan alternatif kaymalardan (splasing) kaynaklanmaktadır. Standart

CD44, büyük çoğunluğu mononükleer kemik iliği öncül hücreleri olmak üzere bütün olgun kan hücrelerinde ve bütün CD34⁺ hematopoetik progenitor hücrelerinde eksprese olur. Varyant izoform CD44-6v ve CD44-9v ise monosit, makrofaj, lenfosit ve dendritik hücreler üzerinde tespit edilmiştir(81). CD44 diğer bir link proteini olan LYVE-1 ile yapısal olarak %43 oranında benzerlik gösterir. Hücre proliferasyonu, diferansiasyonu, migrasyonu ve anjiyogeneze görev alır. Ayrıca, lenfositlerin aktivasyonu, sirkülasyonu ve ekstraselüler matrikse adezyonunda rol alır (82). Bu fizyolojik olaylar kadar kanser gibi patolojik olaylara da eşlik eder.

CD44 birçok tümör çeşidinde yüksek oranda sekrete olmaktadır. Akciğer kanseri(83), over kanseri (84), meme kanseri (85), kolon kanseri (86,87), gastrointestinal nöroendokrin tümörleri (88), orofarengeal skuamöz hücre karsinomu (89) gibi tümörlerde artmış ekspresyon düzeyi kötü prognozla ilişkili bulunmuştur(90). Bu çalışmaların çoğu immünohistokimyasal yöntemlerle ya da hücre kültürleriyle yapılan çalışmalardır. Kolon kanserinde real-time PCR ile, CD44 geni mRNA düzeyinin ölçüldüğü çalışma sayısı azdır, ya hücre kültürlerinden ya da hayvan deneylerinden elde edilen sonuçları vermektedir (91,92,93,94). Real-time PCR kullanılarak insan kolon kanserlerinde yapılan araştırmalarda, kanserli dokuda CD44 ekspresyon düzeyinin, prognozla olan ilişkisi ise tartışmalıdır (95,96,97). Mide kanserlerinde CD44'ün kantitatif çalışıldığı birkaç immünohistokimyasal araştırma vardır (98,99).

İnsan mide kanserinde, CD44 gen ekspresyon düzeyinin kantitatif olarak ölçüldüğü bir tek çalışma vardır ve 2007 yılında yayınlanmıştır (94). CD44'ün pankreas kanseriyle olan ilişkisini göstermek amacıyla yakın zamanda yapılan bir çalışma yoktur, daha önce yapılanlar da immünohistokimya çalışmalarıdır ve kötü prognozla CD44 varlığı arasındaki korelasyona işaret etmektedir (101,102,103).

Metastazın gerçekleşmesinde, tümör hücreleri ile ekstraselüler matriks ve tümör hücreleri ile endotel hücreleri arasındaki etkileşim çok önemlidir ve CD44 bunu gerçekleştiren moleküller arasındadır. Aktive lenfositler ile tümör hücrelerinin invazyon, migrasyon, proliferasyon, lenf

nodlarına ulaşarak oradan perifer dokuya yerleşmeleri gibi çok benzer özelliklerinin olması, Seiter ve arkadaşları tarafından CD44'ün fazla miktarda ekspresyonunun, tümör hücrelerinin immün sistem tarafından lenfosit gibi algılanmasına ve kaçarak lenfatik damarlar yoluyla metastaz yapmasına yardım ettiği görüşünün ortaya atılmasına neden olmuştur (104).

2.4 LYVE-1, VEGFR-3, CD44 ve Gastrointestinal Sistem

Tümörleri

LYVE-1 ve VEGFR-3' ün lenfatik endotel reseptörü olmaları dolayısıyla, tümörlerde lenfatik metastaz gelişimi sırasında herhangi bir rollerinin olup-olmadığı önem kazanmaktadır. Mide, kolon ve pankreas kanserleri, lenfatik metastaz yaptıkları en iyi bilinen kanserler arasında yer almaktadırlar. Hastaların prognoz tayininde lenfatik metastazın varlığı, tutulan lenf nodu sayısı, Pozitif Lenf Nodu sayısının/Total Lenf Nodu sayısına oranı önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle lenfatik belirteçlerin tümörlü dokuda herhangi bir yöntemle tesbit edilip, artmış veya azalmış olduklarının gösterilmesi ile, lenfanjiyogenez ve/veya lenfatik metastaza ait bir ipucu elde edilebilir mi, bu bilgiler klinikte tedavi planının çıkarılmasına yardımcı olabilir mi gibi soruları akla getirmektedir.

Bu sorular doğrultusunda gastrointestinal sistem tümörleri ile LYVE-1, VEGFR-3, CD44 reseptörleri arasındaki ilişkiyi göstermek üzere yapılan kantitatif araştırmaların çoğunda, immünohistokimyasal teknik kullanılmasına karşın, gen ekspresyonunun mRNA düzeyinde gösterildiği real-time kantitatif PCR ile yapılan çalışma sayısı çok azdır .

Biz bu araştırmayı planladığımız sırada literatürde 10 adet LYVE-1 ile ilgili yayına ulaşılabilirdi, bunların çoğunluğu molekülün tanımlanması ve hangi dokularda eksprese olduğu ile ilgili çalışmalardı. Gastrointestinal sistem tümörleriyle ilgili ve LYVE-1'in, *Real-Time Quantitative - Polimerase Chain Reaction* (RTQ-PCR) yöntemiyle ölçüldüğü bir tane araştırma bulunuyordu ve kolorektal kanserlerde yapılmıştı. Sonuçta ise tümör dokusunda LYVE-1'in ölçülebilecek değerlerin çok altında olduğu belirtmekteydi (105) Mide ve pankreas kanserlerinde ise ne

immünohistokimyasal ne de RTQ-PCR kullanılarak yapılan çalışma bulunmamaktaydı. Daha sonraki yıllarda ise buna birkaç tane yeni yayın eklendi. Bunlardan bir tanesi kolon kanserlerinde tümörlü dokuda LYVE-1'i İmmünohistokimyasal olarak artmış olarak bulmasına karşın, real-time ile kantitatif ölçüm yaptıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptayamadıklarını belirtmiştir (106). 2007 yılında çıkan makalede çalışma gastroenterik tümörler olarak planlanmış ve LYVE-1'in lenfatik metastaz ve tümör progresyonu ile olan ilişkisine bakılmış, LYVE-1 için yorum getirilemeyerek, daha fazla araştırma yapılması gerekli olduğu belirtilmiştir (107). Aynı çalışma grubunun kolorektal kanser olarak yaptığı çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (108). Aynı yıl bir başka grubun LYVE-1 kullanarak yaptığı immünohistokimya çalışmasında kolorektal kanserlerde lenfatik damar yoğunluğu (LVD) bakılmış ve klinikopatolojik veriler arasında ilişki saptayamamışlardır (109).

LYVE-1 mRNA düzeylerinin, mide kanserlerindeki değişimini gösteren bir araştırmaya tez yazıldığı sırada, literatürde rastlanmamıştır. Pankreas kanserlerinde ise endokrin tümörlerle ilgili yayın bulunmasına karşın, pankreas adeno kanserlerinde yapılmış çalışma yoktur.

VEGFR-3 ile gastrointestinal sistem tümörlerinde yapılan araştırma sayısı LYVE-1'e göre çok daha fazladır. Daha önce tanımlanmış bir molekül olması ve VEGF-C ile VEGF-D reseptörü olarak sinyal iletim yolağında yer alması çalışma sayısının artmasında rol oynamıştır. Vasküler endotel büyüme faktörlerinin bulunduğu çalışmalara dahil edilmiş, bu yolağın inhibisyonu ile lenfatik yayılımın önlenebilirliği üzerinden bazı inhibitör moleküller geliştirilmiştir.

Mide kanserlerinde 2001 yılında VEGFR-3 ile yapılan çalışmada semikantitatif olarak *Reverse Transcriptase-PCR* (RT-PCR) ve immünohistokimya (IHC) ile bakıldığında lenf nodu tutulumuyla birlikte VEGFR-3 ekspresyonunun arttığı (110), 2004 deki çalışmada ise yine RT-PCR bakıldığında, tümör dokusunda VEGFR-3 artışı saptanmıştır (111). Tez planlandıktan sonra yayınlanan çalışmalarda VEGFR-3 mRNA (RTQ-PCR ile) ölçüldüğünde, düzeylerindeki artış metastazla ilişkili bulunmuştur

(112,107). İmmünohistokimya ile yapılmış bir çalışmada ise VEGFR-3 ekspresyonunda ki artış kötü prognoz olarak kabul edilirken (113) diğer bir çalışmada erken mide kanserlerinde anlam taşımadığı ileri mide kanseri vakalarında ise prognostik faktör olabileceği belirtilmiştir (114).

Kolon kanserlerinde VEGFR-3 mRNA ekspresyon düzeylerine bakılan bir çalışmada lenf nodu metastazı ile VEGFR-3 arasında açık bir ilişki kuramadıklarını belirtmişler (115), başka bir çalışmada ise tümörlü dokularda belirgin biçimde ekspresyonun arttığı görülmüştür (105). İmmünohistokimyasal olarak değerlendirilen çalışmalarda ise, bir araştırmada bağımsız prognostik faktör olmadığı söylenirken (116) diğer çalışmada ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (117). Pankreas kanserlerinde ise normal dokuya göre ekspresyon artışı olduğu belirtilmektedir (118).

Kolon kanserinde real-time PCR ile, CD44 geni mRNA düzeyinin ölçüldüğü çalışma sayısı azdır, ya hücre kültürlerinden ya da hayvan deneylerinden elde edilen sonuçları vermektedir(91,92,93,94). Real-time PCR kullanılarak insan kolon kanserlerinde yapılan araştırmalarda, kanserli dokuda CD44 ekspresyon düzeyinin, prognozla olan ilişkisi ise tartışmalıdır (95,96,97).

Mide kanserlerinde CD44'ün immünohistokimyasal olarak kantitatif çalışıldığı birkaç tane araştırma vardır (98,99).

İnsan mide kanserinde, CD44 mRNA düzeyinin kantitatif olarak ölçüldüğü bir tek çalışma vardır ve 2007 yılında yayınlanmıştır (100). CD44'ün pankreas kanseriyle olan ilişkisini göstermek amacıyla yakın zamanda yapılan bir çalışma yoktur, daha önce yapılanlar da immünohistokimya çalışmalarıdır ve kötü prognozla CD44 varlığı arasındaki korelasyona işaret etmektedir (101,102,103).

Sonuçta LYVE-1, VEGFR-3, CD44 gen ekspresyon düzeylerinin, mide, kolon, pankreas kanserlerinde tümörlü dokularda normal dokulara göre artış gösterdiği fakat lenfatik metastazla olan ilişkileri konusunda farklı görüşlerin ortaya çıktığı görülmektedir.

2.5 Tümör Ve Lenfatik Sistem

Metastaz, tümör hücrelerinin primer tümör bölgesinden lenf nodlarına ve uzak organlara yayılmasıdır. Uzak organ yayılımı kan veya lenf damarları yoluyla olmaktadır. Tümör hücreleri, lenf damarları ile önce bölgesel lenf nodlarına ulaşır, oradan uzak lenf nodlarına gider ve daha sonra venöz sisteme geçerek uzak organlara yerleşir.

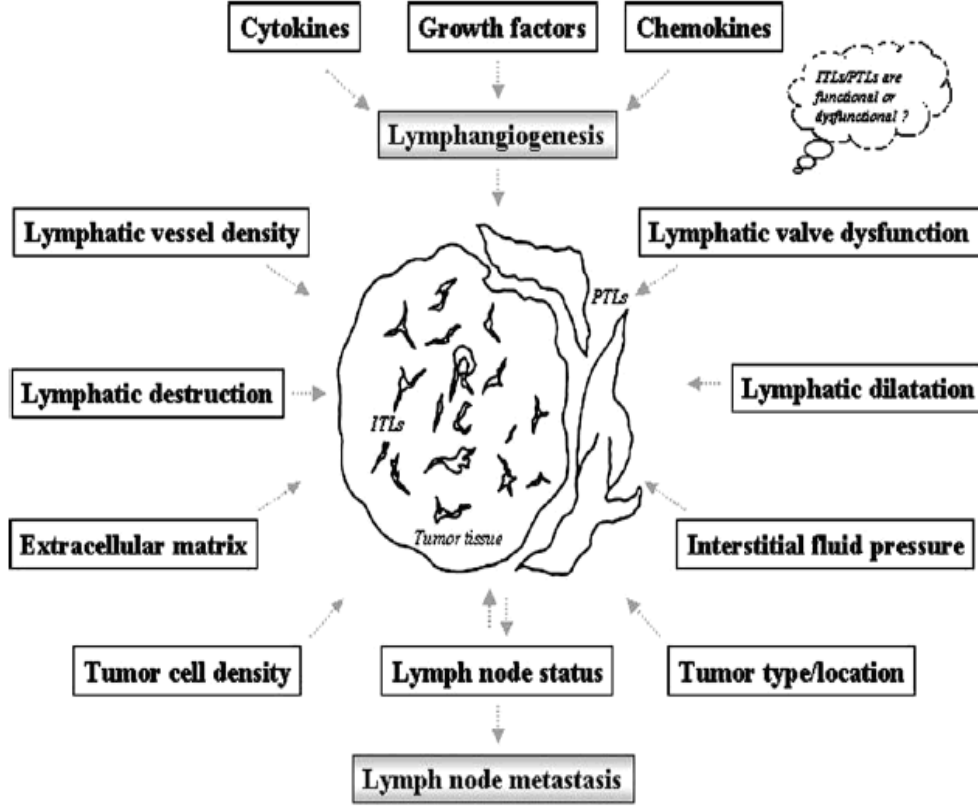
Lenf nodu metastazı, malignitelerde derecelendirme, prognoz ve tedavi biçiminin belirlenmesinde en önemli faktörlerdendir. Lenf nodu metastazlarının klinik özellikleri çok iyi bilinmesine karşın, moleküler mekanizmaları hakkında bilinenler sınırlıdır.

2.5.1 İntratümöral ve Peritümöral Lenf Damarları

Tümör hücreleri lenfatik sisteme ya intratümöral lenfatiklerden ya da tümör çevre dokusunda önceden var olan peritümöral lenfatiklerden geçiş yaparlar (119, 120, 121,122,123). Tümör tarafından üretilen lenfanjiyogenik faktörlerin bazıları, peritümöral lenfatiklerin dilate olmasına bazıları da tümör hücrelerinin lenfatik damar endoteline doğru göç etmesine neden olur (122).

Tümör içi lenfatik damarların varlığı lenfatik metastazla ilişkilidir (28) ancak intratümöral lenfatiklerin fonksiyonel olup olmadığı tartışmalıdır. Mürin fibrosarkomalarında intra tümöral lenfatiklerin fonksiyonunun olmadığı söylenirken diğer bazı çalışmalar bunların işlevsel olduğu ve tümör metastazında önemli rol oynadıklarını vurgulamaktadır (120, 121,124, 125). Intra tümöral lenfatiklerin nonfonksiyonel olmasının nedenlerinden biri lenf damarlarının tümör hücreleri ile tamamen dolarak akışı engellemesi olabilir (123). Buna karşın peritümöral lenfatiklere tümör hücreleri kolaylıkla geçerek lenf nodlarına ulaşabilmektedir (125). İnsan tümörlerinde intra-peritümöral lenfatik damar dansitesinin tümörün invazifliği, lenf nodu metastazı ve prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (28). Ayrıca tümör yayılımının önceden var olan lenfatiklerle ve VEGF-C-D/VEGFR-3 ilişkisinin oluşturduğu intratümöral ve peritümöral lenfatikler yoluyla olduğu görülmektedir. Fakat tümörün davranışlarını ve prognozunu, tümörün büyüklüğü, bulunduğu yer, tipi, tümör hücrelerinin yoğunluğu, lenf nodlarının durumu, lenfatiklerin hasarlı

olup-olmadığı ve lenfatik damarların yoğunluğu ile lenfatik valvlerin işlevselliği, intra-peri tümöral lenf damarlarının birbiriyle etkileşimi, intertisiyel dokudaki sıvı basıncı gibi başka faktörler de etkilemektedir (126) (Şekil 2-7)



Şekil 2-7: Lenfatik metastazı etkileyen faktörler

2.5.2 Tümör lenfanjiyogenezi nasıl başlar ?

Tümör hücrelerinin lenfatikler yoluyla yayılabilmesi için öncelikle lenfanjiyogenezin tümör tarafından uyarılması gereklidir (127,123,67). Bugün için hala lenfanjiyogenezin nasıl başladığı deneysel çalışmalarla gösterilememesine karşın, bilinen gerçek tümör gelişiminin bir aşamasında tümör hücreleri tarafından tetiklenmekte ve yeni lenfatik damarların oluşması sağlanmaktadır (119). Tümör hücrelerinde, genetik değişimlerin arka arkaya birikmesi bazı hemanjiyogenik ve lenfanjiyogenik faktörlerin ekspresyonuna yol açmaktadır (128,129). Örneğin, fare genetik modelinde, multistep fibrosarkoma gelişimi sırasında, doku hiperplastik durumdan malign fibrosarkomaya değiştiği sırada fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF2) sekrete

olmaya başlar. Bunun nedeni bazı genetik mutasyonların birikimidir ve böylece hemanjiyogenez ve aynı zamanda da teorik olarak lenfanjiyogenez başlatılır (130, 131). Normalde p53, FGF2 sekresyonunu inhibe eder fakat mutasyona uğrarsa - ki tümörlerin yaklaşık %50'sinde mutasyona uğrar- bu inhibisyon ortadan kalkar ve FGF2 ekspresyonu artar ve lenfanjiyogenezin başlaması sağlanır (132,133,134). Ayrıca p53'de mutasyon olması, VEGF'lerin ve reseptörleri VEGFR'ların, Platelet- büyüme faktör (PDGF)'leri ve reseptörlerinin (PDGFR) eksprese olmasına yol açarak lenfanjiyogenez sinyallerini başlatır (135).

Diğer bir tümör süpresör gen olan *Von Hippel-Lindau* (VHL) da, lenfanjiyogenik faktör olan PDGF-BB'yi inhibe eder ve VEGFA ekspresyonunu baskılayarak hipoksi uyaran faktör- α (HIF- α)'nın degrade olmasına neden olur. VHL geninin, mutasyona uğrayarak fonksiyonunu yitirmesi bu lenfanjiyogenik faktörlerin eksprese olmasına ve sonuçta oluşan mutasyonlarında metastatik kapasitenin artışına yol açtığı bilinmektedir (136).

Onkogenlerden RAS ve MYC'de oluşan mutasyonlar, VEGF, FGF ve PDGF gibi lenfanjiyogenetik faktörlerin sekresyonunun artmasına sebep olurlar (137). Tümör hücrelerinin heterojen yapı göstermesi VEGF-C, VEGF-D ve anjiyopoetin gibi diğer faktörlerin de ekspresyonuna yol açıyor olabilir (138).

Bütün bu faktörler birlikte tümör lenfanjiyogenezini açan bir anahtar gibi işlev görürler (119).

2.5.3 Tümör Hücrelerinin Lenfatik Damarlara Neden Gereksinimi Vardır?

Kan damarları solit tümörlerin gelişmesi için gerekli olan oksijeni ve besini getirir, metabolik artıkları ise bölgeden uzaklaştırır. Lenfatik damarların ise tümör büyümesine doğrudan bir etkisi yoktur, üstelik bazı solid tümörlerde intratümöral lenfanjiyogenez uyarılmamaktadır. Bu nedenle lenf damarlarının tümörle olan ilişkisi tam olarak bilinmemektedir. Öte yandan tümör gelişimine ve invazyonuna birkaç mekanizma ile katkıda bulunuyor olabilirler (24).

Tümör hücreleri ile LEC ve kan damarı endotel hücreleri (BEC) birbiriyle iletişime geçerler; Kan damarları endotel hücreleri, tümör hücrelerinin çoğalması için EGF, PDGF ve FGF gibi bir takım parakrin büyüme faktörleri eksprese ederken aynı zamanda lenfanjiyogenezi stimüle eden VEGFC, PDGF, FGF gibi büyüme faktörlerini de sekrete ederek tümör lenfajiyogenezinin başlamasına katkıda bulunurlar (128,13). Buna bakarak lenfatik endotel hücrelerinin de tümör büyümesine katkıda bulunan henüz aydınlatılamamış bazı parakrin growth faktörleri salgılayabileceği veya bu faktörlerden bir kısmının hemanjiyogenik faktör olarak rol alıp tümör hemanjiyogenezi artırdığı düşünülebilir (119). Ayrıca LEC ve BEC'den eksprese olan metallo proteinazlar (MMP) ve ürokinaz plazminojen aktivatör (uPA), tümörün çevre dokuda ilerlemesini kolaylaştırarak invazivliğini artırmaktadır (13).

Lenfatik damarlar tümör içindeki interstisiyel basıncı düşürürler; Solid tümörlerde doku organizasyonun normal dokuya göre daha düzensiz olması ve damar yapılarından dokuya sıvı kaçıışı nedeniyle interstisiyel sıvı basıncı artmaktadır. Basıncıdaki bu değişim sonucu kan akışı ve transkapiller transport da etkilenir ve zaten yoğunluğu fazla olan kan damarları daha da sıkışarak tıkanır (139). Sonuçta tümör çevresinde iskemi meydana gelir ve tümör büyümesi durur. Lenfatik damarlar doku aralığında biriken bu sıvıyı alarak hem kan akışının normale dönmesine hem de tümör büyümesine katkıda bulunuyor olabilir. Fakat bu konu hala tartışmalıdır ve yeni çalışmalarla kanıtlanması gereklidir (119).

Lenfatik damarların yapısı tümör hücrelerinin invazyonunu kolaylaştırır; Lenfatik damarlarda, lenfatik endotel hücreleri arası bağın gevşek olması, perisitlerin bulunmaması, bazal membranın devamlılığının olmaması gibi özellikler, tümör hücrelerinin kolayca lenfatik sisteme geçmesini, lenf nodlarına ulaşmasını sağlar. Tümör hücreleri tarafından sekrete edilen VEGF-C gibi büyüme faktörleri de tümör hücrelerinin invazivliğini artırarak transendotelial geçişin artmasına katkıda bulunur. LEC'den eksprese olan CC-tipi kemokin ligand-1 (CCL1) ve tümör

hücrelerinde bulunan CC-tipi kemokin reseptör 8'de (CCR8) bu olaya katılır (130).

2.6 Lenfanjiyogenik Faktörler

Kanser dokusunda lenfanjiyogenezin başlayabilmesi için bazı değişimler olması gerekir. Tümör hücrelerinde, genetik mutasyonlar ile tümör büyümesini ve farklılaşmasını etkileyecek bazı faktörler susturulur, bazıları eksprese olmaya, bazıları da normalden daha fazla sekrete olmaya başlar. Çünkü, tümörü oluşturan hücreler çok heterojendirler, farklı genetik özelliklere sahiplerdir ve buna bağlı olarak da farklı ekspresyon fenotipi gösterirler (140). Ayrıca tümör dokusu içerisinde lenfanjiyogenezin başlamasında önemli rol alan anjiyogenik faktör ve sitokin salgılayabilen birçok kemik iliği kökenli nötrofil, makrofaj ve lenfoid hücre bulunur (141,142). BEC, LEC, vasküler düz kas hücreleri (VSMC) ve fibroblastlar da tümör tarafından aktive edildikten sonra bazı büyüme faktörü ve sitokinleri salgılamaya başlar (143). Tümör hücrelerinin artmış metabolik aktivitesi ve hipoksik mikroçevre, HIF-1 α (*hypoxia inducible factor-1 α*) gibi bazı genlerin eksprese olmasını tetikler ve VEGF-A ekspresyonuna yol açar (143). Bütün bu olaylar sonucunda ortama sekrete edilen büyüme faktörleri lenfanjiyogenezi başlatır ve gelişimini sürdürmesini sağlar.

2.6.1 VEGF Ailesi

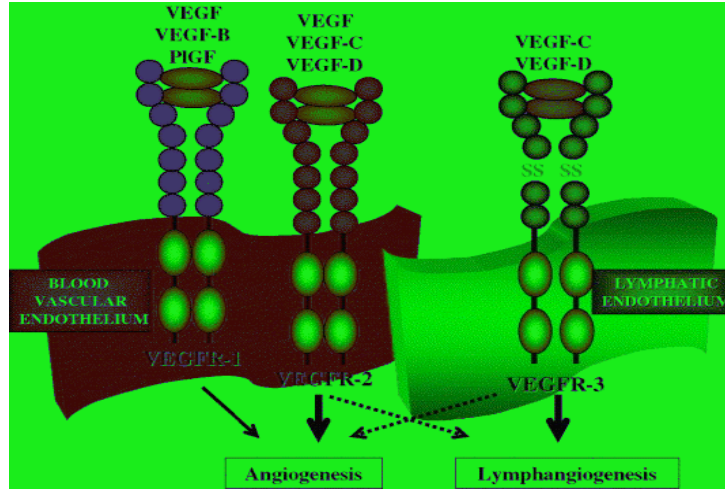
Bu grubun beş tane üyesi bulunmaktadır. VEGF-A, VEGF-B, plasental growth faktör (PIGF), VEGF-C ve VEGF-D (144, 145)

VEGF-A, vasküler permeabiliteyi ve anjiyogenezi artırdığı bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda çeşitli hayvan deneylerinde lenfanjiyogenezi de uyardığı tesbit edilmiştir (146,142). Fare kornea lenfanjiyogeneze modelinde, VEGF-A uygulandığında var olan limbal lenfatik damarlardan filizlenme olduğu (146,147) fare kulağında ise viral vektörle, VEGF-A ekspresyonu başlatıldığında fonksiyonel lenfatik damar ağının geliştiği gözlemlenmiştir (148). Deneysel olarak oluşturulan fibrosarkoma ve deri tümörlerinde VEGF-A'nın aşırı sekresyonunun ise metastaza neden olduğu tesbit edilmiştir (147,149). VEGFR-1, VEGF-A'nın reseptörü olarak

görev yapan bir moleküldür, monosit ve makrofajlarda bulunur ve VEGFA için kemotaktik etki yaratarak bu hücrelerin bölgeye gelmesine ve lenfanjiyogenik sitokinler üreterek burada lenfanjiyogenezin başlamasına neden olur (150). VEGFR-2 ise anjiyogenik sinyal reseptörüdür ve LEC'de bulunur. VEGF-A bunun üzerinden direk olarak lenfatik endotel hücrelerinin büyümesine etki eder ki bu etki invitro çalışmalarda da gösterilmiştir (151, 147,149).

PIGF ve VEGF-B, bu iki büyüme faktörü reseptör olarak VEGFR-1'yi kullanırlar. Fakat direk olarak lenfanjiyogenez uyarmazlar. İnflamatuvar hücreler VEGFR-1 ekspresyonunu potansiyalize eder ve bu hücrelerin kendi bulundukları bölgeye doğru göç etmelerini sağlar yani, lenfanjiyogenez indirek olarak uyarırlar. Bir başka olasılık da VEGFR-1 için VEGF-A ile yarışabilecekleri ve onun lenfanjiyogenez üzerindeki etkilerini modüle ediyor olabilecekleri görüşüdür.. Fakat bu hipotezin kanıtlanması için üzerinde çalışmaların yapılması gereklidir (120).

VEGF-C ve VEGF-D, lenfanjiyogenik etkisi en iyi bilinen ve en potent iki moleküldür. Fizyolojik ve patolojik durumlarda esas rolü VEGF-C ve VEGF-D oynar. Reseptörleri ise LEC spesifik VEGFR-3'dür ve tirozin kinaz ailesindendir. Lenfatik endotel hücreleri üzerinde direk etkili olarak bu hücrelerin proliferasyonunu ve göçünü aktive ederler(21,152,153,154). Embriyonun gelişimi sırasında VEGF-C, VEGF-D/VEGFR3 sinyal sistemi vücuttaki ilk lenfatik damarların oluşumuna katılır (155). Diğer sinyal yolları ile birlikte bu sinyal sistemi kan damarları endotel hücrelerinin, lenfatik endotel hücrelerine diferansiye oluşunu sağlarlar (156,119). Tümör hücrelerinden VEGF-C, VEGF-D'nin ekspresyonu tümör periferinde bazen de tümör içinde lenfatik damar artışına yol açarak bölgesel lenf nodlarına gidişi kolaylaştırır ve bazen de uzak organ yayılımına önayak olur (157). Bazı tümör modellerinde, çeşitli şekillerde VEGFR-3 aktivasyonu inhibe edildiğinde lenfanjiyogenezin ve lenfatik metastazın gerilediği gözlemlenmiştir (158,159). Benzer bulgular VEGF-D antikoru kullanıldığı zaman da izlenmiştir (67).



8

Şekil 2-8: VEGF molekülleri ve görevleri

2.6.2 PDGF Ailesi

Platelet Büyüme Faktörü (*Platelet-derived growth factor*) ailesi dimerik glikoproteinlerden oluşur; PDGF-AA, PDGF-BB homodimer ve PDGF-AB heterodimer ve yeni bulunan PDGF-CC ve PDGF-DD'den oluşur. Reseptörleri tirozin kinaz ailesinden PDGFR- $\alpha\alpha$ ile PDGFR- $\beta\beta$ 'dir ve iki gen tarafından kodlanırlar (160,161). Bütün bu PDGF'ler lenfanjiyogenezi artırmasına rağmen en potent olanı PDGF-BB'dir (162,120). İzole edilmiş LEC ve yeni filizlenen lenfatik damarlarda PDGFR- $\alpha\alpha$ ve PDGFR- $\beta\beta$ 'nin ekprese olduğu ve hücre göçünü artırdığı saptanmıştır. Bu etki imatinib ile ortadan kaldırılabiliyorken, VEGF-C, VEGF-D/VEGFR3 antagonistleri ile aynı sonuç alınamamıştır. Elde edilen bu sonuçlar PDGF'lerin direk lenfanjiyogenetik faktörler olduğunu göstermektedir (162). Fakat diğer growth faktör ve sitokinler üzerinden indirek etkileri de olabilir. Son zamanlarda farelerde yapılan çalışmalarda, murin fibrosarkom hücrelerinde PDGF-BB'nin ekprese olmasının, tümör lenfanjiyogenezi uyardığı, primer tümörün çıkarılmasına karşın yine de aksiller lenf nodu metastazının ortaya çıktığı gösterilmiş ve bunun periferik lenfatiklerle olduğu görüşüne varılmıştır. Bütün bu sonuçlar PDGF-BB'nin direk lenfanjiyogenetik etkisi olarak yorumlanmıştır (162,163). Lenfanjiyomatozisli hastalarda, PDGF-BB ve

reseptörünün aşırı eksprese olmasına karşın diğer growth faktörlerin sekrete olmadığı saptanmıştır. Bu bulgu lenfatik malignite ve metastazlarında PDGF-BB/PDGFR sisteminin rol aldığını destekler niteliktedir (164). PDGF-BB'yi aşırı eksprese eden tümör fare korneasına implante edildiğinde yeni kan damarlarının oluştuğu, aynı zamanda da tümör sınırında, yoğun fakat düzensiz, lenfatik sıvıyı sızdıran yeni lenfatik damarların filizlendiği ve bunların nadiren tümör içine doğru ilerlediği saptanmıştır (162).

Bütün bu bilgilerin ışığında PDGF'lerin üç mekanizmayla tümör gelişimine etki ettiği söylenebilir; 1) lenfatik endotel hücreleri üzerine direk etki ederek hücre göçünü sağlamaları 2) tümör hemanjiyogenezinin ve hematojenik metastazın uyarılması ve 3) tümör lenfanjiyogenezinin ve metastazının uyarılması (119). Bu nedenle PDGF'lerin inhibisyonu kanser tedavisinde ve metastazların inhibisyonunda önemli bir yaklaşım olabilir.

2.6.3 FGF-2

Fibroblast Büyüme Faktörü-2 (*fibroblast growth factor-2*) heparine bağlanan bir proteindir ve çeşitli hücre gruplarında proliferasyonu ve diferansiasyonu uyarır. Fare korneal lenfanjiyogenezis modelinde, FGF2 lenfanjiyogenezi uyarır ve VEGFC ile VEGFD ekspresyonunu artırır. Bunları sekrete eden lökosit, makrofaj, granülosit, ve dendritik hücrelerin bölgeye göç etmelerine neden olur. VEGFR-3 antagonisti kullanıldığı zaman bu etkilerin ortadan kalkması lenfanjiyogeneze indirek olarak rol aldığını düşündürmektedir (165, 21). İnvitro çalışmalarda ise izole edilen LEC hücrelerinde FGF2'nin direk etki ile proliferasyonu, tüp formasyonunu ve hücre göçünü uyardığı gözlemlenmiştir (166,133,167). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise direk lenfanjiyogenik faktör olarak etkili olduğu gösterilmiştir (156). Başka bir ilginç sonuç ise düşük dozlarda tercihan lenfanjiyogenezi uyarırken yüksek dozlarda hemanjiyogenezi uyarmasıdır (166). Bugün için, hayvan modellerinde FGF2'nin tümör lenfanjiyogenezi ve lenfatik metastazla olan ilişkisi gösterilememiştir (21).

2.6.4 Anjiyopoetin

Anjiyopoetinler, endotel hücresi yüzey reseptörü tirozin kinaz, Tie2'nin ligandı. Anjiopoetin-1(Ang-1), reseptör Tie2'yi aktive ederek hemanjiyogenezi regüle eder. Anjiyopoetin-2 (Ang-2) ise aksine Tie-2'yi inaktive eder ve sonuç olarak kan damarlarını regrese ederek, hemanjiyogenezi negatif olarak etkiler (168). Gen inaktivasyon çalışmaları Ang-1'in embriyonik kan damarlarının oluşumu için mutlak gerekli olduğunu, Ang-2 için böyle bir zorunluluk olmadığını ancak postnatal damarların şekillenmesinde önemli olduğunu göstermiştir (169). Ang-2'nin genetik olarak kaybı ise embriyoda lenfatik damarlarda malformasyonlara neden olmaktadır. Bu bulgu Ang-2 nin lenfanjiyogenezdeki rolünü destekler niteliktedir (169). Ayrıca Tie-2'nin lenfatik endotel hücrelerinde eksprese olduğunun gösterilmesi, etkinin direk olarak gerçekleştiğine işaret etmektedir (170,171). Yine bu çalışmada fare kornea modelinde Ang-1'in de lenfanjiyogenezi uyardığı saptanmış fakat bu etkininin indirek olarak LEC'de VEGFR-3'ün ekspresyon düzeyini artırarak olduğu ileri sürülmüştür (171). Bütün bu bilgilere rağmen Ang-1 ve Ang-2 moleküllerinin tümör lenfanjiyogenezi veya metastazında rol aldığına dair hayvan modellerine ait herhangi bir rapor bulunmamaktadır.

2.6.5 HGF

Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF), mezenkimal kökenli birçok hücrede yapılan glikoprotein yapıda bir moleküldür (172,173). HGF karaciğerin oluşumunda görev alan faktörlerden birisidir. Endotelial hücreler gibi birçok önemli epitelyal hücrenin çoğalmasını ve göçünü uyarır bu nedenle, doku tamir mekanizmaları ve tümör yayılımında önemlidir. Lenfanjiyogenik faktörler arasına yeni eklenmiştir ve çeşitli hayvan modellerinde lenfanjiyogenezi yönlendirdiği gösterilmiştir (174,172). Aktivitesi, tirozin kinaz yapısındaki c-met reseptörü (HGF-R) üzerinden gerçekleşir. Deneysel ve klinik çalışmalar c-met ekspresyonu veya mutasyonu ile tümör metastazı arasında ilişki olduğunu göstermektedir (175). Son çalışmalardan bir tanesi c-met'in kültürü yapılmış lenfatik endotel hücrelerinde ve doku tamiri sırasında

yenilenen lenfatik endotelinde eksprese olduğunu göstermiştir. Yine aynı çalışmada VEGFR-3'den bağımsız olarak kültür ortamındaki lenfatik endotel hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve tüp formasyonunu almasını sağladığı görülmüştür (170). İnvivo çalışmalarda ise transjenik farelerde veya deri altına verilerek aşırı sekresyonu sağlandığında lenfanjiyogenik growth faktör gibi davrandığı gösterilmiştir. Bu nedenle HGF tümör lenfanjiyogenezini yönlendiren moleküllerden bir tanesi olabilir (172). Fakat bugün için hayvan kanser modellerinde, tümör lenfanjiyogenezi ve lenf nodu metastazındaki etkilerini gösterecek bir çalışma bulunmamaktadır. Lenf nodu metastazında HGF/c-met ilişkisini açıklığa kavuşturmak çok önemli olabilir (51).

2.6.6 IGF

İnsülin benzeri Büyüme Faktörü (IGF), lenfanjiyogenik aktivite gösteren diğer bir proteindir. IGF-1 ve IGF-2 olmak üzere iki tanedir ve hücre yüzeyinde yer alan reseptörleri de IGF-1R ile IGF-2R olarak adlandırılır. Ayrıca çok sayıda IGF'e bağlanan protein (IGFBP) bulunur. IGF'ün bir çok tümörde eksprese olduğu, tümörün ilerlemesi ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (176). IGF-1 ve IGF-2' nin kültüre LEC' lerin proliferasyonunu ve göçünü etkilediği, IGF-1R ile IGF-2R'nin bu hücrelerde eksprese olduğu ve fare korneasında lenfatik damarların gelişimini artırdığı rapor edilmiştir (177). Aynı zamanda bu etkinin VEGFR-3'ün bloke edilmesiyle ortadan kaldırılamaması bunun direk etki olduğunu gösterir. Bir başka ilginç durum da IGF-1R 'nin Lewis akciğer kanser modelinde VEGF-C ekspresyonunu uyararak lenf nodu metastazına yol açtığına gösterilmesidir (178). Fakat IGF'ün tümör lenfatikleri ve lenf nodu metastazı üzerine olan etkilerinin saptanması için yeni çalışmalara gereksinim vardır (21).

2.7 Mide Kanseri

Mide kanseri, tüm dünyada önde gelen ölüm sebeplerinden biridir. Mide kanserinin insidansının en yüksek olduğu yerler, Japonya, Güney Amerika ve Doğu Avrupa'dır. Japonya'da mide kanseri kadın ve erkekler arasında en sık tanı konulan kanserdir. 2002 yılında ABD'de tahminen 21600 kişide mide kanseri gelişmiş ve 12400 kişi bu hastalıktan ölmüştür. Halen anlaşılamayan sebeplerle ABD'de mide kanseri dramatik olarak azalmıştır. 1950'de ABD'de erkeklerde en sık kanserden ölüm sebebi mide kanseri iken 2000 yılında 7. sıraya gerilemiştir. Hastaların yaklaşık üçte ikisi, tanı konulduğunda 65 yaşın üzerindedir ve 40 yaşından önce bu tanı nadirdir. Hastalık erkeklerde kadınlardan daha sık görülür ve Afrikalı Amerikalılarda, İspanyol Amerikalılarda ve kızıl derililerde, Anglo-Amerikalılara göre daha sık rastlanmaktadır (179-181).

Beş yıllık sağkalım, evre ile çok yakın ilişkili olup % 7 den % 78'e uzanmaktadır. On yıllık genel sağkalım da % 20 dolaylarındadır (182) .

2.7.1 Epidemiyoloji ve risk faktörleri

Mide kanseri epidemiyolojisinde en dramatik değişimlerden biri, lezyonun midedeki yerleşim yerindedir. Geçen 30 yıl içinde, giderek daha proksimal yerleşimli kanserlere doğru bir kayma olmuştur(183,184) ve yapılan araştırmalarda proksimal 1/3 %30, orta 1/3 %14, distal 1/3 %26, tüm mide % 10 ve bilinmeyen %19'dur. Bu kaymayla birlikte distal özofagus kanserlerinde de artış olması ilginçtir (185).

Mide kanserinin sebebi halen bilinmemektedir. Gelişiminde çevresel faktörler suçlanmıştır. Japonlar ve Doğu Avrupalılar gibi yüksek riskli ülkelere ABD gibi düşük riskli bölgelere göç edenlerde, batılı bir diyeti benimsemelerine rağmen yüksek risk sürmekte, fakat ikinci ve üçüncü kuşak için risk, o bölgenin yerli nüfusunun sayılarına düşmektedir (186,187).

Diyet alışkanlıkları ve koruyucular kanser gelişiminde risk faktörleri olarak suçlanmıştır. ABD'de mide kanseri insidansının gerilemesinin sebepleri değişen diyet ve gıda koruma uygulamalarına bağlanmıştır (188). Tuzdan zengin, tutsülenmiş ya da kötü korunmuş gıdalar, nitrat ve nitritler artmış mide kanseri

riski ile ilişkilidirler (188). Aşırı tuzlu yiyeceklerin çok miktarda tüketilmesi, bir mide kanseri risk faktörü olan atrofik gastrite yol açabilir. Nitrat ve nitritler, N-nitroso bileşikler oluşumu sonucu mide kanseri riskini artırırlarsa da yeni epidemiyolojik araştırmalar, nitratlar ve tuzlarla artmış mide kanseri riski arasında bir ilişki gösterememişlerdir. Birçok çalışmada, meyve, sebze ve fiberden zengin diyetin mide kanserine karşı koruyucu olabileceği saptanmış ve bu etkinin C vitamini veya karotenlere bağlı olduğu iddia edilmiştir (189).

Birçok öncü durum mide kanseri riskini artırmaktadır. Bunlar kronik atrofik gastrit, pernisiyöz anemi ve hipersekretuar gastrit, Menetrier hastalığı, benign nedenlerle yapılan parsiyel gastrektomiler ve mide polipleridir. Kronik mide mukoza hasarı teorik olarak intestinal metaplaziye, displaziye ve muhtemel invaziv kansere ilerleyebilecek olayları tetikleyebilmektedir. Atrofik gastrit ve mide kanseri benzer risk faktörlerine sahiptir. Atrofik gastrit, mide kanseri insidansının yüksek olduğu bölgelerde sıktır. Kronik atrofik gastritin iki tipi vardır: Tip A ve Tip B. Tip B kronik atrofik gastritli hastaların yaklaşık % 10'unda 10 - 20 yıl içinde mide kanseri gelişebilmektedir (190).

Pernisiyöz anemili hastalarda mide kanseri riski 2 - 3 kat artmıştır. Birçok olgu bildirimi, Menetrier hastalığı ile mide kanseri arasında bir ilişkiye işaret etmektedir. Parsiyel mide rezeksiyonu geçirmiş hastalar da kalan mide kesiminde mide kanseri gelişimi için artmış risk altındadırlar. Risk zamanla artmakta ve ameliyattan 15–20 yıl sonra belirginleşmektedir. Daha önce konulmuş mide ülseri tanısı, erkek cinsiyet ve Billroth II tipi rekonstrüksiyon kanser gelişim riskini artırmaktadır. Patofizyolojik mekanizmanın aklorhidri, enterogastrik reflü ve bakteriyel aşırı üreme olduğuna inanılmaktadır (191).

Mide polipleri, polipin tipine bağlı olarak prekanseröz lezyonlar ya da midenin başka bir kesimindeki prekanseröz durumun göstergeleri olabilirler. Adenomatöz polipler tübüler, villöz ve tübülovillöz olarak sınıflanırlar. Biyolojik önemleri kolondaki poliplere benzer. Kanser riski polipin boyutuyla artar. İki cm'den daha büyük poliplerin % 40'ında bir karsinom odağı bulunmaktadır. Endoskopik olarak adenom çıkarılan hastalarda % 25 - 33 oranında tekrar polip-

ler oluşacaktır bu nedenle hayat boyu endoskopik takip gereklidir. Hiperplastik poliplerin kansere dönüşmeyecekleri düşünülmele birlikte çok sayıda hiperplastik polip varlığında normal mukozada % 8 oranında kanser gelişme riski söz konusudur. Bu nedenle bu hastalar da endoskopik takibe gereksinim gösterirler. Birçok genetik polipozis sendromunda midede polipler saptanır. Familial polipozis kolinin Gardner varyantında % 35 - 100 hastada distal mide ve duodenumda (sıklıkla çok sayıda) polipler gelişmesi beklenir. Duodenal poliplerin malign dejenerasyon gösterme olasılıkları daha yüksektir (192).

Ayrıca hereditör nonpolipozis kolorektal kanseri (Lynch sendromu) olan hastalarda da mide kanseri riski artmıştır. Artmış mide kanseri riski ile ilgili diğer hereditör durumlar içinde kan grubu A olan insanlar sayılabilir. Birinci derece yakınında mide kanseri öyküsü olan insanlarda mide kanseri riski 2 - 3 kat artmıştır. Yakın zamanda, otozomal dominant geçişli mide kanseri yatkınlığı olan aileler tanımlanmıştır. Nadir olsa da, bu ailelerde E-cadherin mutasyonları saptanmıştır. Mide kanseri sıklıkla 50 yaşın altında ortaya çıkmakta ve seçilmiş hastalarda profilaktik gastrektomi uygun bulunmaktadır (193).

Helicobacter pylori'nin peptik ülser hastalığı patogenezindeki önemi bilinmektedir. Kronik *H. pylori* infeksiyonunun mide kanseri ile ilişkili olduğunu gösteren kuvvetli kanıtlar da mevcuttur.

ABD ve İngiltere'deki ilk çalışmalar, *H. pylori* infeksiyonunun mide kanseri riskini artırdığını göstermiştir (194-195). Yakın zamanda yapılan bir meta-analiz, *H. pylori* infeksiyonunun mide kanseri riskini iki kat artırdığını ve riskin özellikle genç hastalarda yüksek olduğunu, yaşla riskin gerilediğini göstermiştir.(196) İlginç olan nokta, *H. pylori* tarafından oluşturulan duodenal ülserli hastalarda mide kanseri riskinin ortalama popülasyona göre düşük oluşudur. Bu da kanser patogenezinde değişik faktörlerin söz konusu olduğunu gösteren bir bulgudur. Kronik tekrarlayan epitel hasarı birçok dokuda karsinogenezi başlatabilir. *H. pylori* infeksiyonuna bağlı gelişen atrofik gastritin kanser gelişimi için öncü olduğu kabul edilmektedir. *H. pylori*'nin tümör oluşumunu başlatma mekanizmaları ve bu gelişimde eşlik eden kofaktörler henüz ortaya konulabilmiş değildir. Cag

(cytotoxic-associated-gene) pozitif *H. pylori* suşları daha virulandırılar. Cag-pozitif suşlar görülebilir mide hasarı oluştururken cag-negatif suşlar buna yol açmamaktadırlar (197). Cag-pozitif *H. pylori* suşları ile peptik ülser hastalığı ve kanser arasında güçlü bir ilişki mevcuttur.

2.7.2 Patoloji

1997 yılında American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve Union Internationale Contre le Cancer (UICC), mide kanserinde N evrelemesinin yeniden tanımlamıştır. Yeni TNM evreleme sistemi pozitif lenf düğümlerinin, daha önce yapıldığı gibi yerleşimine değil sayısına bakmaktadır. Yeterli evreleme için en az 15 lenf düğümü çıkarılması tavsiye edilmektedir. AJCC tarafından tanımlanmış olan evreleme sistemi Tablo 2-3 'de özetlenmiştir (198,199).

Bu evreleme sistemi metastatik lenf nodlarının sayısına odaklandığı için prognozu daha iyi belirlemekte ve lenf düğümü yerleşimi yöntemine göre tekrarlanabilirlik arz etmektedir. Onbeşten daha fazla lenf düğümü çıkarılması daha doğru evrelemeye yol açmıştır, hem tümör invazyon derecesi (T evresi) hem de lenf düğümü tutulumunun (N evresi) prognostik önemi olduğu gösterilmiştir. Tümör derinliğinin lenf nodu tutulumuyla sıkı bir ilişkisi mevcuttur (200).

Halen histolojik grade ve tipin nasıl raporlanacağı konusu tartışmalıdır. Dünya Sağlık Teşkilatı'nın (WHO) Uluslararası Histolojik Klasifikasyonu (International Histologic Classification) değişik sınıflamaları gözden geçirmiştir. Geleneksel tümör tiplemesi (tübüler ya da müsinöz adenokarsinom, taşlı yüzük hücreli, küçük hücreli veya indifferansiye karsinom), Lauren sınıflaması (intestinal, diffüz) ve Ming sınıflamasının (yayılan, infiltratif) prognoza etkisi olmadığı saptanmıştır. Bazı araştırmacılar tarafından önceleri belirlenen farklılıkların çoğu tümör evrelerindeki farklılıklarla açıklanabilmektedir (201). Yakın zamanda yeni Goseki histolojik sınıflaması ortaya atılmıştır. Goseki sınıflaması, tübüler diferansiyasyon ve müköz niteliğe dayanan bir histolojik derecelemeyi tanımlamıştır. Daha sonra bir grup araştırmacı, yeni Goseki sistemi ile WHO, Lauren ve tümör diferansiyasyon sınıflamalarını karşılaştırmıştır (202). Ayrıca

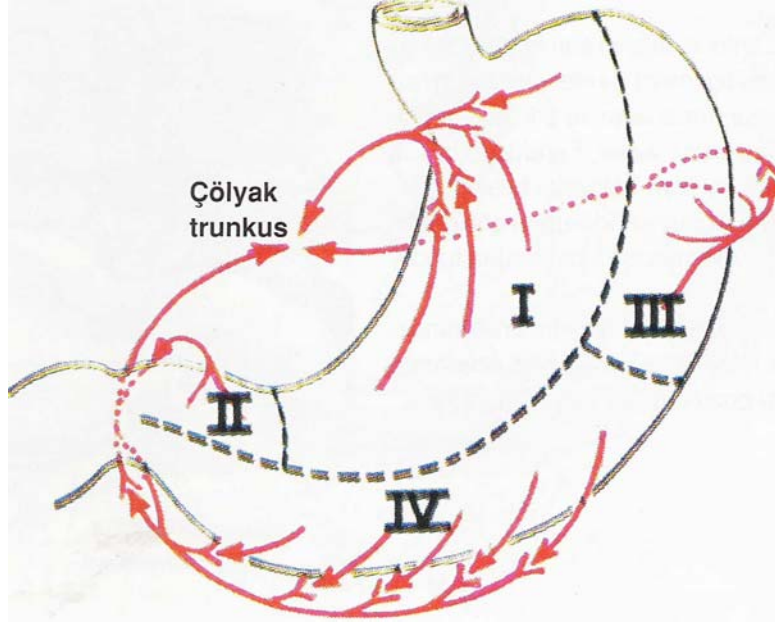
lenfositik ve eozinofilik infiltrasyon varlığının prognostik önemini de araştırmışlardır. Sonuçta sağkalım için en önemli faktörün TNM evresi olduğu belirlenmiştir.

2.7.3 Mide Lenf Kanalları ve Lenf Bezleri

Mukozada başlayan lenfatik damarlar önce submuköz lenfatik ağlarını, sonra adale tabakasını delerek subseröz ağlarını ve serozayı da delerek mide dışı lenf yollarını meydana getirirler. Mide dışı lenf yolları mide arterlerine komşu olarak seyreder. Mide dışı lenfatik kanallar hemen midenin yakın çevresindeki lenf bezlerine, oradan mide arterleri etrafındaki lenf bezlerine, daha sonra çölyak ve en sonunda aort çevresindeki lenf bezlerine ulaşır. Lenfatik akım, aort çevresindeki lenf bezlerinden duktus torasikus yolu ile venöz sisteme taşınır.

Midenin üst kısmı ve kardiyanın submukozal lenf ağı ile özofagusun alt kısmının submukozal lenf ağı arasında yaygın anastomozlar mevcuttur. Buna karşılık antrum ve pilor bölgesindeki submukozal ağ duodenumda devam etmez. Mide proksimal kanserleri submukozal yayılım ile özofagusu tutarken antrum tümörleri duodenuma ilerleyemezler. Duodenumun tutulması, bazen subseröz lenfatik ağ yolu ile gerçekleşebilir (Şekil 2.9).

Midenin lenfatik akımının bölgesel dağılımını anlamak amacıyla mide 4 bölgeye ayrılmaktadır. Kardiya ve korpusun mediyal yarısının lenfatikleri sol gastrik arter çevresindeki lenf bezlerine, antrum ve pilorun küçük kurvatur tarafının lenfatikleri sağ gastrik arter çevresindeki lenf bezlerine, korpusun alt dış yarısının lenfatikleri sağ gastroepiploik lenf bezlerine, korpusun üst kısmı ve fundusun lenf bezleri sol gastroepiploik lenf bezlerine akar. Bu dört grup lenf bezinin akımı çölyak lenf bezlerinde toplanır. Ancak midenin yaygın submukozal lenf ağı nedeniyle midenin herhangi bir yerindeki kanser, hem mide duvarında tümörün uzağına direkt yayılabilir hem de midenin herhangi bir bölgesindeki lenf bezine metastaz yapabilir. Keza submukozaya boya verilerek yapılan çalışmalar boyanın midenin her iki kurvaturuna doğru düzensiz dağıldığını göstermiştir.



Şekil 2-9: Midenin bölgesel lenfatik akımını gösteren şematik çizim (247)

Tablo 2-3 American Joint Committee on Cancer'in Mide Kanseri için Evreleme Sistemi

Primer tümör (T)

T_{is} Tümör in situ

T₁ Tümör lamina propriaya veya submukozaya invaze T₂ Tümör muskularis propriaya ya da subserozaya invaze

T₃ Tümör serozaya invaze

T₄ Tümör çevre yapılara invaze

Bölgesel lenf düğümleri (N)

N₀ Bölgesel lenf düğümü metastazı yok

N₁ 1 - 6 bölgesel lenf düğümü metastazı

N₂ 7 - 15 bölgesel lenf düğümü metastazı

N₃ > 15 bölgesel lenf düğümü metastazı

Uzak metastaz (M)

M₀ Uzak metastaz yok

M₁ Uzak metastaz var

Evre Gruplaması

Evre	T	N	M
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
II	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
IIIB	T3	N2	M0
IV	T4	N1	M0
	T1	N3	M0
	T3	N3	M0
	T4	N2	M0
	T4	N3	M0
	Herhangi T	Herhangi N	M1

R Kategorisi :

Ameliyattan sonra geride kalan, tümörlü doku miktarına göre belirlenir ve hesaplamada PLN/ TLN oranı kullanılır.

R0 rezeksiyon=	Kalıntı tümör yok
R1 rezeksiyon=	Mikroskopik kalıntı tümör
R2 rezeksiyon=	Makroskopik kalıntı tumor

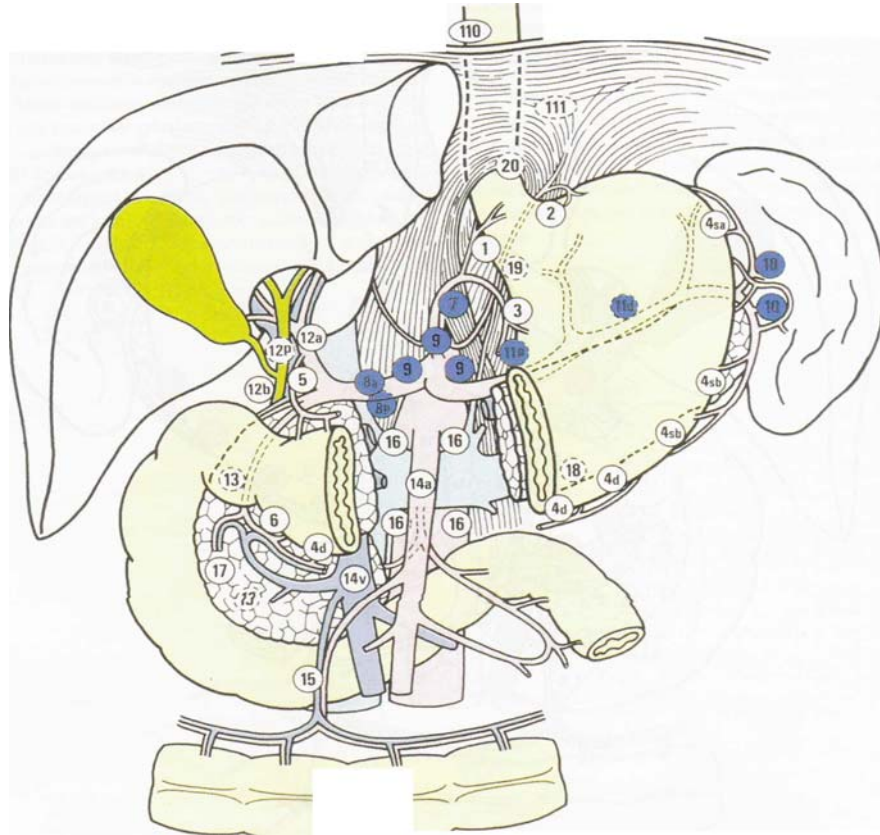
2.7.4 Cerrahi Tedavi

Mide kanserinin cerrahi tedavisi tartışmalı olmaya devam etmektedir. Ameliyatın ilk hedefi tüm tümörün çıkarılması ve geride tümör bırakılmamasıdır. Bu durum R0 rezeksiyon olarak tanımlanmaktadır. R1 rezeksiyonda geride mikroskopik hastalık bırakılmakta, R2 rezeksiyonda ise makroskopik tümör kalmaktadır.

Orta ve distal midenin kanserleri için iki cerrahi seçenek mevcuttur: total gastrektomi veya subtotal (totale yakın) gastrektomi. Rezeksiyon tipinin önemine ek olarak, negatif cerrahi sınırların elde edilmesi de hayati önem taşımaktadır. Araştırmacılar, 6 cm'lik mesafe elde edildiğinde cerrahi sınır pozitifliği riskinin çok az olduğu ya da hiç olmadığını belirtmişlerdir (203). Daha yakın zamandaki bir değerlendirmede, American College of Surgeons 5 yıllık sağkalımın negatif sınırlı hastalarda %35, mikroskopik olarak pozitif sınırlı hastalarda %13 ve makroskopik olarak pozitif olanlarda % 3 olduğunu saptamıştır (183).

Lenfatik diseksiyonun (D) genişliği tartışmalı olmuştur. The Japanese Research Society for Gastric Cancer, lenf düğümlerini anatomik istasyonlara sınıflamıştır (204,205) N1 lenf düğümleri mide çevresinde yerleşmişlerdir ve 1 - 6 no'lu istasyonları içermektedirler. N1 lenf düğümleri, D1 lenfatik diseksiyon sırasında çıkarılmaktadırlar. N2 lenf düğümleri, 7 - 11. istasyonları içermektedir ve mideye giden isimli arterlere eşlik etmekte (ortak hepatik, sol gastrik, çölyak ve splenik arterler) ayrıca dalak hilusunda bulunmaktadırlar; bunlar D2 lenfatik diseksiyon sırasında çıkarılmaktadırlar. N3 düğümleri, 12-16 no'lu istasyonları yani ince barsak mezenter kökü, orta kolik arter çevresi, aort ve retroperiton gibi daha uzak lenf düğümlerini içermektedir. N3 lenf düğümleri Japonya'da çıkarılmakta ancak rutin olarak diseksiyonlara eklenmemektedir. Hangi spesifik lenf düğümü istasyonlarının çıkarılacağı primer tümörün yerleşimine bağlıdır (206).

Genişletilmiş lenfatik diseksiyonun gerekçesi, R0 rezeksiyon sağlamasıdır çünkü tipik bir perigastrik diseksiyonla (D1 lenfatik diseksiyon) ıkarılmayan perigastrik lenf dėđmlerinin de çıkarılması sağlanır. Tüm hastalığın çıkarılmış olması daha iyi sağkalım oranları sağlayacaktır. Bindokuzyz'den fazla sayıdaki lenf dėđm metastaz paternlerinin değerlendirilmesi, en çok metastazın N1 (perigastrik) lenf dėđmlerinde grldėđn ancak özellikle lyak arter çevresindekiler olmak üzere N2 lenf dėđmlerinin tutulmasının da sık olduğunu göstermiştir. Bu analize göre, tüm hastalarda D2 diseksiyon yapılması gerektiği ve aksi halde metastazların atlanabileceği ne srlmştir. Bugün hem Japonya da hem de diğer bir çok ülkede mide kanserli hastaların tedavisinde genişletilmiş lenfadenektomi standart cerrahi yöntem olarak kabul edilmiştir (207-213).



şekil 2-10: Midenin lenf bezleri (perigastrik, perivasküler,diğer) (247)

Tablo 2-4 Midenin Bölgesel Lenf Düğümlerinin Japon Sınıflaması**Perigastrik lenf düğümleri**

1. Sağ perikardiyal
2. Sol perikardiyal
3. Küçük kurvatür
4. Büyük kurvatür
5. Suprapiloric
6. İnfrapiloric

Ekstraperigastrik (Perivasküler) lenf düğümleri

7. Sol gastrik arter
8. Ortak hepatik arter
9. Çölyak arter
10. Dalak hilusu
11. Splenik arter

Diğer lenf düğümleri

12. Hepatoduodenal ligament
13. Retropankreatik
14. Mezenter kökü
15. Orta kolik arter
16. Paraaortik

Tablo 2-5 Mide tümörünün yerleşimine göre lenf düğümü çıkarılması: Mide tümörünün yerine göre lenf düğümlerinin anatomik istasyonları

Lenf Düğümü Grubu	Tüm mide	Alt 1/3	Orta 1/3	Üst 1/3
N1	1-6	3-6	1,3-6	1-4
N2	7-11	1,7-9	2,7-11	5-11
N3	12-14	2, 10-14	12-14	2-14

D1 diseksiyon, N1 lenf düğümlerinin çıkarılması.

D2 diseksiyon, N1 + N2 lenf düğümlerinin çıkarılması.

D3 diseksiyon, N1 + N2 + N3 lenf düğümlerinin çıkarılması.

Siewert ve arkadaşları rezeke edilebilen mide kanserlerinde, lenf düğümü oranı (lymph node ratio) ve lenfatik tutulum durumunun en önemli prognostik faktörler olduğunu saptamışlardır (214). Uzamış sağkalım özellikle pT2N1 ve pT3N0 alt gruplarında, genişletilmiş lenfatik diseksiyon uygulandığında belirgindir. Daha sonra 100 hastada uygulanan sitokeratin boyası ile, % 45 kadar hastanın, tümör evresine uygun olarak mikrometastaz barındırdığı ortaya çıkarılmıştır. Mikrometastatik hastalığın sağkalım üzerine olumsuz etkisi mevcuttur (215).

Birçok cerrah, genişletilmiş lenf diseksiyonunun daha doğru evrelemeye yol açacağını kabul etmektedir. Genişletilmiş lenf diseksiyonu muhtemelen R0 rezeksiyon oranını da yükseltmektedir. Her iki faktör de prognozu belirlemede ve

ameliyatta bölgesel hastalığın kontrolünde rol oynamaktadır.

Erken mide kanserli hastalarda lenfatik yayılım sık değildir. İntramukozal ve submukozal tümörlerde lenfatik metastazlar <% 5 ve % 25'in altında görülürler. Her iki klinik durumda da N2 lenfatik tutulum nadirdir (< % 5) (216,217) Erken mide kanserli hastaların çoğunda D1 diseksiyonla yeterli tedavi sağlanır. N2 yayılım için risk altında olan hastalar, 2 cm 'den büyük submukozal lezyonu olan hastalardır ve bunlarda D2 diseksiyon düşünülebilir (218).

2.8 Kolon Kanseri

Kolon kanseri en sık görülen dördüncü kanserdir ve akciğer kanserinin ardından da kanserden ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alır. Amerikada nüfusun %6'sını etkilemektedir ve her yıl yaklaşık 140000 dolayında yeni olgu tanı almakta ve yaklaşık 56000 kişi kolon kanseri nedeniyle ölmektedir (219). 1997 yılından bu yana hem erkek hem de kadınlardaki insidansda az ancak belirgin bir artış gözlenmektedir. Her iki cins için de ölüm olasılığı azalmakla birlikte, kadınlarda daha düşüktür. Amerikada kadınlarda doğumdan itibaren yaşam boyu kolon kanseri olma riski %5,5 iken erkeklerde bu oran %5,9 dur.

Daha çok ileri yaş grubu hastalığı olarak bilinen kolon-rektum kanserlerinin görülme sıklığı 50 yaşından sonra artar. Ortalama yaş kadınlarda 62, erkeklerde 63 civarındadır. Tüm kolon-rektum kanserlerinin sadece %5'i 40 yaşından önce görülür. Erkeklerde biraz daha fazla olmakla birlikte kadın-erkekler arasında görülme sıklığı açısından fark yoktur.

2.8.1 Etyoloji ve Patogenez

Kolon kanserinin kesin neden ve mekanizmaları bilinmemektedir. Ancak, kolon kanserleri kolonik mukozayı etkileyen genetik ve çevresel faktörlere ikincil olarak gelişir (220).

2.8.2 Genetik Faktörler

Kolon kanserine yakalanma açısından yüksek risk altında olan kişilerin kolonik mukozalarında kriptlerin proliferatif fonksiyonunun artışı söz konusudur. Proliferatif fonksiyonun artışı, kanser gelişiminde belki de ilk olayın kript hücrelerinin büyümesinin regülasyonundaki bozukluk olduğunu düşündürmektedir. Bu hücrelerin büyümesinin kontrolündeki bozukluğun nedeni bilinmemesine rağmen genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduklarına ait kanıtlar vardır. Familial polipozis veya ailesel adenomu olanlarda kolon kanserinin daha sık görüldüğü bilinmektedir. Kalın barsak kanserlerinin %5-10'u ailesel eğilimi olan kişilerde görülür. Bu bulgu genetik eğilimi düşündürmektedir.

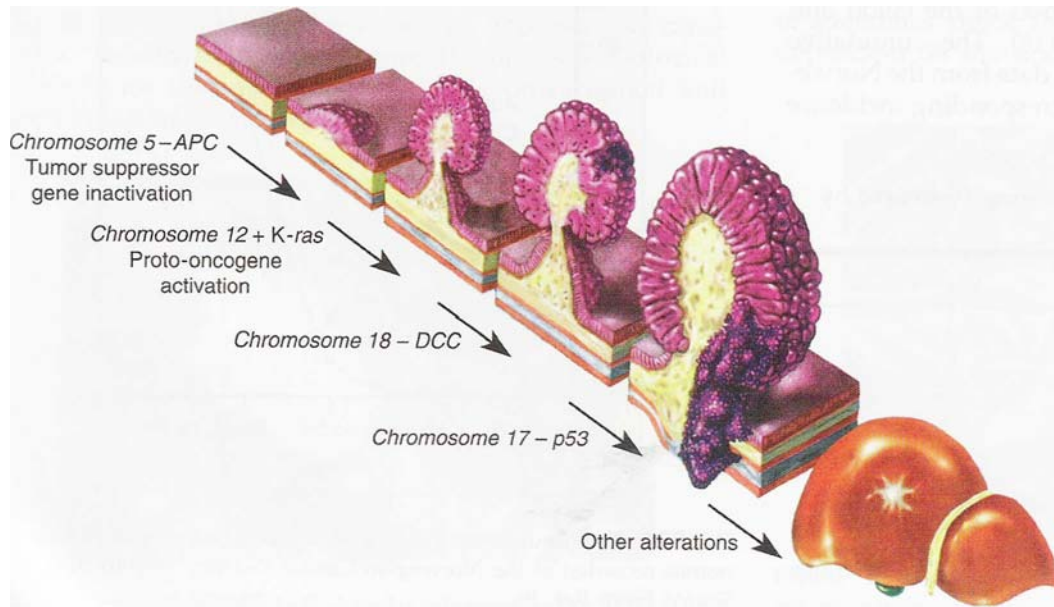
Kript hücrelerindeki bu hiperproliferatif durumun bazı genetik olaylar, yağdan zengin diyet ile beslenme gibi çevresel faktörlerden etkilendiği ileri sürülmektedir. Kript epitel hücrelerindeki bu büyüme sonucu ortaya çıkan poliplerle kanser ilişkisi aşağıda tartışılmıştır (219-222).

2.8.3 Adenom-Kanser Dönüşümü

Bir polipten kanser gelişmesi 8-10 yıl almaktadır. Polip prevelansının kanser prevelansının çok üstünde olması her polibin kanserleşmediğini açıkça ortaya koymaktadır. Bir indeks polipte kümülatif kanser gelişme riski 5 yılda %2.5, 10 yılda %8 ve 20 yılda %24'tür. Poliplerden kanser geliştiğine dair birçok kanıt vardır : Kolorektal kanserli hastalarda senkron polip olma oranı yaklaşık %30'dur; kolon ve rektumda adenom ve adenokarsinom birlikteliği %13-62 aralığında değişen oranlarda bildirilmektedir ; ailesel adenomatöz polipozisli hastalarda tedavi edilmezse mutlaka kanser gelişmektedir ; bunların dışında adenom gelişimi, büyümesi ve malignleşmesi ile ilgili genetik anormallikler saptanmıştır (221).

Uzun süren tartışmalardan ve moleküler genetik araştırmalardan sonra kolorektal kanserin patogenezinde adenom karsinom dönüşümü kuşkuyla yer bırakmayacak biçimde kabul edilmiştir. Alternatif bir yol olarak kolorektal kanserlerin küçük bir kısmında "de novo" kaynak da söz konusudur. Kolorektal kanserlerin büyük çoğunluğu adenomdan kanser gelişmesiyle oluşur. Adenom, tek bir hücrenin epitelyal proliferasyonu ile gelişir ve ardından karsinom gelişimine dek bir dizi gen mutasyonu olur. Kolorektal karsinogenezde ilk adım 5q kromozomundaki *adenomatöz polipozis koli (APK) geninde* oluşan mutasyondur. Tümör baskılayıcı bir gen olan APK geni inaktive olunca etkilenen hücreler çoğalmaya başlar. İkinci faktör deoksiribonükleik asid (DNA) hipometilasyonudur. APK geni inaktivasyonu nedeniyle hiperproliferatif olan CpG dinukleotidleri bir de metilasyon kaybına uğrayınca etkilenen hücreler çoğalır ve adenom oluşur. DNA'nın hipometilasyonu doğrudan bir onkojen olan

K-ras (*Kristen rate sarkoma virus*) aktivasyonu ile ilişkilidir. K-ras displaziye artırarak neoplazi gelişimine yol açar. APC geni mutasyonu olmadan da K-ras mutasyonları oluşabilir. Ancak bu durumda aberran kript odakları meydana gelir. Bunlar maligniteye öncülük etmez. APC gen mutasyonunun üzerine K-ras mutasyonu bindiğinde küçük adenomlar orta adenomlara dönüşür. Orta adenomdan ileri (veya geç) adenom dönüşümü için 18. kromozomun uzun kolunda özel bir genetik değişim gerekir. Bu değişime kolon kanseri delesyonu denir. Bu delesyonun gen haritasındaki yeri 18q21'dir. Bu delesyon ekspresyonunu yitiren hücrelerin mukus üreten hücrelere dönüşme kapasiteleri yok olur. Böylelikle ileri adenom oluşur. İleri adenomdan karsinom gelişmesinde 17p kromozomunun heterozigozitenin yitimi ve 17p' de p53 gen mutasyonu sorumludur. Bu iki kayıpla tümör baskılayıcı gen işlevi yok olur ve baskın onkogenler aktive olarak hücrelerin klonal ekspresyonunu benign karakterden malign karaktere sürükler.



Şekil 2-11: Adenom-Kanser Dönüşümü için Genetik Model (DCC :Deleted in Colon Cancer ; APC : Adenomatöz Poliposis Koli)

Polipozis olmadan da herediter kolon-rektum karsinomu (*Lynch Sendromu*) geliştiği bilinmektedir. Bu herediter non-polipozis kolon-rektum karsinomlarının multipl olma olasılıkları genel popülasyonda görülen diğer kolon-rektum karsinomlarına göre daha yüksektir (%34.5). Sadece kolonik (*Lynch I*) olabildikleri gibi endometrium ve over kanserleri (*Lynch II*) ile birlikte de olabilirler.

Moleküler genetik çalışmalar adenomadan karsinoma dönüşümde erken dönemde ras gen mutasyonu ve 5q kromozomunda allelik delesyon olduğunu göstermiştir. İlerlemiş tümörlerde ise 17p ve 18q kromozomlarında tümör supresör genlerinin kaybı gösterilmiştir. Protoonkojen ras mutasyonunun da kolon karsinomlarının %40-50'sinde olduğu bildirilmektedir. Bu gen lokuslarından birindeki ressesif mutasyon veya çevresel bir faktör etkisi ile anormal proliferatif aktivite kanserli hastaların normal görünümlü kolon mukozasında ortaya çıkabilir. Bu bulgular bazı kişilerde kolon mukozasının kansere genetik eğilimi olduğunu düşündürmektedir. Böyle mukozadan yapılan hücre kültürlerinde DNA sentezinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun yanında kolon-rektum kanserlerin gelişmesinde APC gen mutasyonunun rol oynadığı ileri sürülmektedir (224).

2.8.4 Diyet

Epidemiyolojik çalışmalar diyetteki et, yağ, safra asitleri ve kolesterol'ün kolon karsinogenezisinde önemli rol oynadığını göstermiştir. Diyetle alınan fazla et ve yağın kolonik mikroflorayı etkilediği bunun da karsinogeneziste rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca nitrozaminlerin de etken olduğu ileri sürülmektedir. Et ve yağ tüketimi, yüksek kalorili diyet ile kolon-rektum karsinom insidansı arasında ilişki olduğu gösterilmesine rağmen prospektif çalışmalarda bu ispatlanamamıştır. Ancak lif içeren yiyeceklerden zengin diyetin alınması ile kolon-rektum karsinomunun gelişme şansı arasında ters bir ilişki vardır. Deneysel çalışmalarda kalsiyum, retinoid ve karotenoidler ile selenyum ve

vitamin C'nin kolon-rektum karsinomuna karşı koruyucu oldukları gösterilmesine rağmen bu etkiler insanlarda henüz ispatlanamamıştır. Kolonrektum karsinogenezinde alkolün yeri henüz açıklığa kavuşturulamamıştır.

2.8.5 Diğer Etkenler

Safra asitlerinin barsakta artması ile kolonrektum karsinoma arasındaki ilişkinin gösterilmesinden sonra sekonder safra asiti artışına yol açan kolesistektominin de etken olabileceği ileri sürülmüştür. Turunen ve Kivilaasko bir otopsi çalışmasında kolon-rektum karsinomu olan 304 hastanın 34'ünde (%14.8) kolesistektomi yapılmış olduğunu saptamışlardır(225).

Kolesistektomi dışında üreterosigmoidostomi sonrası da kolon-rektum karsinom insidansının arttığı ileri sürülmüştür. Mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen bu eğilimin idrarın kendisi ve içindeki karsinojenlere bağlı olabileceği ileri sürülmektedir.

İnflamatuvar barsak hastalıklarından özellikle ülseratif kolitis ile kolon-rektum karsinoma arasındaki ilişki bilinmektedir. Daha az diferansiye olan bu karsinomalarda multisentrisite oranı diğer kolon-rektum karsinomalarına göre daha yüksektir ve prognozları daha kötüdür.

Familyal polipozis sendromları, kolon adenomaları ile kolon-rektum karsinomu arasındaki ilişkinin de moleküler düzeyde olduğu ileri sürülmektedir. Ras onkogeni aktivasyonu ve 6,17 ve 18. kromozomlardaki delesyonların etken olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında karsinoma eğilimi olan kolonik mukoza ile adenomalarda ornitin dekarboksilaz enziminin yüksek düzeyde olması ile ras onkogen aktivasyonu arasında da ilişki olduğu ileri sürülmüştür. Ras onkogeni ile transformasyonun peptid büyüme faktörlerinden TGF'yi uyardığı bildirilmiştir. TGF- α 'nın normal kript hücrelerinin kanser hücresine dönüşümünü sağladığı gösterilmiştir. TGF- α 'nın özellikle villöz poliplerde var olduğu bildirilmiştir. TGF- α 'nın dışında insülin büyüme faktörleri (IGF-1 ve IGF-II), transferrin ve gastrin gibi faktörlerin de kolon rektum neoplazilerinin regülasyonunda rolü olduğu

gösterilmiştir. TGF- α 'nın tam aksine TGF- β 'ların kolonik hücrelerin büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır (220).

2.8.6 Patoloji

Kolon-rektum karsinomlarının gelişmesinde klinik olarak üç evre olduğu gösterilmiştir. *Preneoplastik* evrede kolonik mukozada hiperproliferasyon ve displazi; *prekanseröz* evrede sırasıyla tübüler, tubulovillöz adenom ve villöz adenom ve *karsinom* evresinde önce insitu, sonra invazif karsinoma daha sonra da metastaz gelişir.

Bu tümörlerin önemli bir çoğunluğu glandüler epitelden kaynaklanır ve adenokarsinomadır. Makroskopik olarak polipoid, ülseratif veya skiröz (annüler) olabilir. Sağ kolon karsinomları daha çok polipoid, sol kolon tümörleri ise daha çok annüler veya skirözdür. Erken lezyonlar daha çok polipoid nadiren de mukozadan kabarık yassı görünümündedir.

Mikroskopik olarak kolon-rektum karsinomlar iyi, orta veya az derecede diferansiye olabilirler. Bu karsinomaların %10-15 kadarı müsin salgılar. Müsin salgılayan karsinomların prognozları daha kötüdür. Tümörler sıklıkla sırasıyla rektosigmoid bölgede (%55-60), inen kolonda (%10-15), transvers kolonda (%5-10) ve çıkan kolon ve çekumda (%15-20) yerleşir. Kolon-rektum karsinomalarının dağılımı 40 yaşından genç olanlarda benzerlik gösterir. Bu tümörlerin multisentrik olabilme oranları da %5 dolaylarındadır.

2.8.7 Kolon Kanserinde Yayılma Yolları

Kolon-rektum karsinomaları *direk invazyon*, *implantasyon*, *transperitoneal yayılım*, *lenfatik* ve *hematojen* yolla yayılır (226). Kolon-rektum karsinomaları genellikle duvar derinliğine doğru yayılım gösterirler. Kolon duvarında olan yayılımın distale doğru olması çok az olasıdır. Kolonun tam kat tutulumundan sonra komşu organlara direkt invazyon gösterebilirler. Bu tümörlerin implantasyonu da söz konusudur. Tümör hücrelerinin deskuamasyonu olmasına rağmen bu hücrelerin intraluminal tümöre dönüştükleri ispatlanama-

mıştır. Deskuamasyonun anastomoz hattındaki rekürrens yönünden önemi bilinmemektedir. İntraperitoneal implantasyon peritoneal karsinomatозise yol açar.

Kolon-rektum karsinomalarının en sık yayılma yolu *lenfatik* yayılımdır (%25-40). Kolon duvarındaki invazyonu tam kata ulaşmış olan hastaların yaklaşık yarısında lenf bezi metastazı saptanır. Bu yolla önce tümöre en yakın olan parakolik lenf nodlarına ardından sırasıyla diğer lenf nodlarına, epikolik ve inferior mezenterik lenf nodlarına ulaşır. Özellikle anterograd yol tıkalı ise retrograd yayılım da olabilir. Rektal lezyonlarda retrograd lenfatik yayılım söz konusudur.

Hematojen yayılımla karsinom hücrelerinin kan dolaşımına geçtiği %50 oranında saptandığından "no touch" tekniği ile rezeksiyon önerilmiştir.

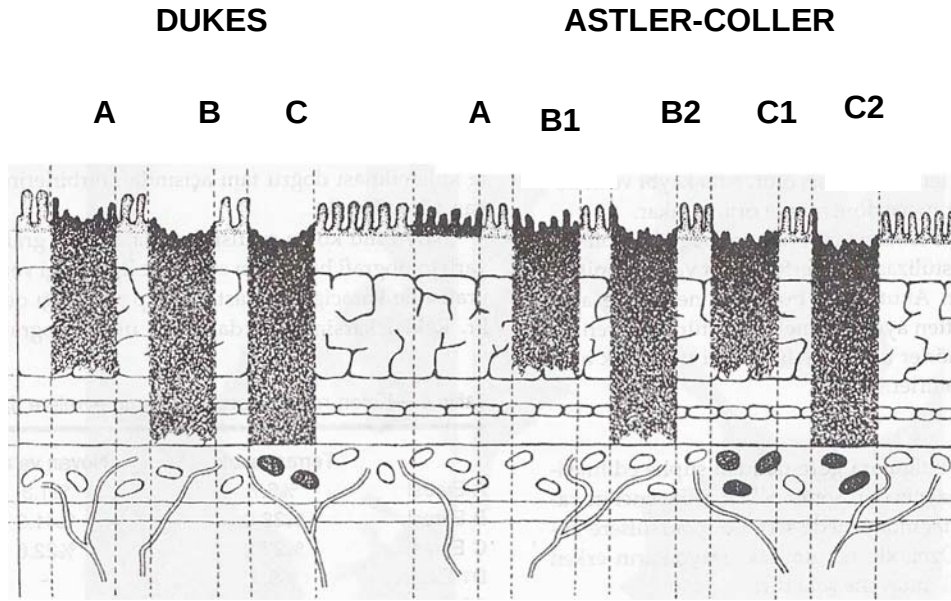
2.8.8 Evrelendirme

Rektal karsinomalar patolojik olarak ilk kez 1932 yılında Dukes tarafından evrelendirilmiş ve daha sonra aynı sistem kolon karsinomaları için de kullanılmıştır. Bu evrelendirme kolon-rektum karsinomalarında prognozu belirleme açısından önemlidir.

Dukes, sınıflandırmasında (Tablo 2-6, Şekil 2-12) önce A, B ve C olmak üzere üç evreye ayrılmış, daha sonra 1958'de C evresi C1 ve C2 olarak ikiye ayrılmıştır. Daha sonra Dukes sınıflandırması yeniden modifiye edilmiştir (*Aster-Coller modifikasyonu*). Buna göre B evresi de B1 ve B2'ye ayrılmıştır (Tablo 2-7, Şekil 2-12). Daha sonra da bu sınıflandırmalara uzak metastaz varlığını göstermek için D evresi eklenmiştir. Terrazas ve arkadaşları orjinal Dukes sınıflandırmasına ekledikleri evreleri D1 (komşu organlara invazyon) ve D2 (uzak metastaz) olarak tanımlamışlardır (227).

Amerikan Birleşik Kanser Komitesi'nin TNM sınıflandırmasına göre ise 4 evre vardır (Tablo 2-8).

Literatürdeki değişik çalışmalara bakıldığında ortalama olarak kolon-
rektum karsinomlarının %15'i Dukes A, %35'i B1 ve %50'si C evresindedir.
Terrazas ve arkadaşlarının çalışmasında D evresi de söz konusu olduğu için
sonuçlar farklıdır (220).



Şekil 2-12: Dukes ve Modifiye-Dukes(Astler-Coller) Sınıflandırması

Tablo 2-6: Dukes sınıflandırması

A Evresi	: Muskularis propria tabakasına kadar invazyon vardır.
B Evresi	: Tüm barsak duvarı tutulumu lenf nodu metastazı yoktur.
C Evresi	: Lenf nodu metastazı vardır. (Barsak duvarı tutulum derinliğine bakılmaz)
	C1: Barsağa komşu lenf nodu metastazı vardır.
	C2: Damarların bağlandığı düzeyde lenf nodu metastazı

Tablo 2-7: Astler-Coller sınıflandırması

A Evresi	: Mukozaya lokalize tümör.
B Evresi	: B1 -Lenf nodu metastazı yok, muskularis propriaya kadar tümör B2 -Lenf nodu metastazı yok, musk. propriayı invaze eden tümör
C Evresi	: C1 -Tüm barsak duvarı tutulumu ile beraber lenf nodu metastazı C2 - Barsak duvarını aşmış lezyon ve lenf nodu metastazı

Evre	T	N	M
I	T1 veya T2	N0	M0
IIa	T3	N0	M0
IIb	T4	N0	M0
IIIa	T1 -T2	N1	M0
IIIb	T3 - T4	N1	M0
IIIc	Herhangi T	N2	M0
IIId	Herhangi T	N3	M0
IIIc	Herhangi T	N4	M0
IV	Herhangi T	Herhangi N	M1

Tablo 2-8: Kolorektal kanserde TNM evrelemesi

2.8.9 Cerrahi tedavi

Kolon kanserinde cerrahi tedavi tümörün yerleşim yerine göre değişiklik göstermesine karşın hedef geride mikroskopik rezidü tümör kalmayacak şekilde küratif rezeksiyon (R0) yapılması olmalıdır. Özellikle T3 tümörü olan hastalarda prognozun çıkarılan ve incelenen lenf nodu sayısına bağlı olduğu gösterilmiştir. T3 tümörde lenf nodu negatif (T3N0) diyebilmek için en azından 13 lenf nodunun incelenmesi gerektiği ileri sürülmüştür (228). Diğer bazı çalışmalarda bu sayı 14-15 olarak ileri sürülmüştür. Çıkarılan lenf nodu ne kadar çok olursa özellikle T3, T4 tümörde evrelemenin de o kadar doğru olacağı gösterilmiştir (229,230).

2.9 Pankreas Kanseri

Pankreatik ve periampüller kanserler bütün gastrointestinal kanserlerin %5'ini oluşturur ve bunların büyük bir çoğunluğu (%80-90) pankreatik duktal

karsinomdur. Bir çok Batı ülkesinde 4.-5. en sık görülen tümörlerdir. İnsidans çoğu ülkede 20. yüzyılın son yarısında artmaya başlamış ve bugün İngiltere’de 100.000 de 10-12 civarındadır. İnsidans yaşla arttığı için yaşlı nüfusun artma eğiliminde olduğu ülkelerde pankreatik kanser de artmaya devam etmektedir. 40 yaşın altında oldukça nadirdir ve % 80’i 60-80 yaş arasındadır. Erkeklerde kadınlardan, zencilerde beyazlardan daha sıktır(231-233). Yapılan bir çalışma erkeklerde daha çok baş kısmında, kadınlarda ise gövde ve kuyrukta lokalize olduğunu göstermiştir (234).

Pankreatik adenokanserin neden veya nedenlerine yönelik yapılan bir çok çalışma ile kafein ya da kahvenin etkili olmadığı sonucun ulaşılmıştır. Sigara ile direk bir ilişki mevcuttur. Kronik pankreatitli hastalarda yaşam boyu risk artmıştır. Alkolün kanserden direk sorumlu olması düşük bir olasılıktır ancak alkole bağlı kronik pankreatit zemininde adenokanser gelişebilir. Herediter pankreatit olanların yaşam boyu riski %40 civarındadır.

2.9.1 Patoloji

Her ne kadar diğer benign ve malign neoplaziler de periampüller bölgede görülse de, pankreatik ve periampüller kanserlerin büyük kısmı adenokarsinom grubuna aittir. Rezeke edilen periampüller adenokarsinomların %50-70’i pankreas başı kanseri, %15-25’i ampüller kanser, %5-10’u biliyer kanser ve %10’u duodenal kanserdir. Pankreas kanserlerinin %70-80’ini duktal adenokanserler oluşturur ve yaklaşık olarak 2/3’ü başta 1/3’ü kuyrukta yerleşir (235,236). Duktal adenokanser varlığında pankreas çevresindeki lenf nodları hemen daima metastatik odak içerir ve 2 cm den küçük tümörler dahi organ dışına yayılmış olabilir (237).

Periampüller kanserlerin bir anatomik ve histolojik sınıflamasını tam olarak yapmak zor olabilir. Rezeke edilen spesmenin dikkatli patolojik incelemesi sonucunda başlangıçtaki klinik tanının değişmesi nadir değildir. Duktal karsinomlar makroskopik olarak genelde kötü sınırlı, soluk, sert bir kitle şeklindedir ve büyümüş lenf nodları ve/veya karaciğerde kitle ile birlikte. Bir

çok duktal karsinom iyi, orta ve kötü diferansiye olarak sınıflanabilir ancak aynı tümörde diferansiasyon derecesi alandan alana değişebilir (235).

2.9.2 Evrelendirme

Son 15 yılda pankreatik kanser için iki evreleme sistemi geliştirilmiştir. Japon hastalar *Japanese Pancreatic Society* evreleme sistemine, Batılı hastalar ise UICC TNM evreleme sistemine göre evrelenmiştir. Biz de TNM sistemini kullanıyoruz. Bu sistem tümörün büyüklüğüne (T), bölgesel lenf nodlarının durumuna (N) ve metastatik hastalık (M) varlığına dayanmaktadır. Bu sistem kolay uygulanabilir ve lenf nodu metastazını en önemli prognostik faktör olarak almaktadır (Tablo 2-9).

Tablo 2-9 Pankreatik karsinom için TNM evrelemesi

Primer tümör (T)

TX Primer tümör değerlendirilemiyor

TO Primer tümör ile ilgili bulgu yok

Tis İn situ karsinom

T1 Tümör pankreasta sınırlı ve en büyük çapı 2 cm veya daha küçük

T2 Tümör pankreasta sınırlı ve en büyük çapı 2 cm'den büyük

T3 Tümör direkt olarak duodenum, safra kanalı veya peripankreatik dokulara yayılmış

T4 Tümör direkt olarak mide, dalak, kolon veya komşu kan damarlarına yayılmış

Bölgesel lenf nodları (N)

NX Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor

NO Bölgesel lenf nodlarına metastaz yok

NI Bölgesel lenf nodu metastazı

pN1a Tek bir bölgesel lenf noduna metastaz

pN1b Multipl bölgesel lenf noduna metastaz

Uzak metastaz (M)

MX Uzak metastaz varlığı değerlendirilemiyor MO Uzak metastaz yok

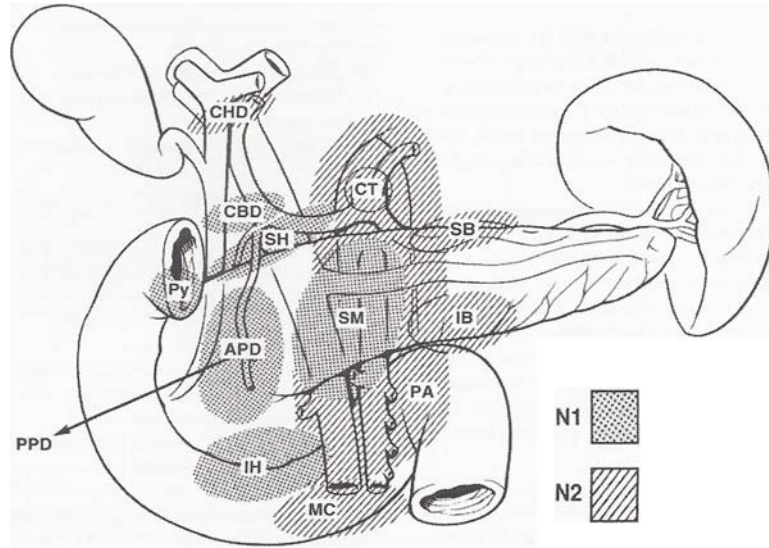
MI Uzak metastaz

Evre gruplaması			
Evre	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-2	N0	M0
II	T3	N0	M0
III	Herhangi bir T	N1	
IVA	T4	Herhangi bir N	
IVB	Herhangi bir T	Herhangi bir N	

Pankreatik ve periampüller tümörün komşu dokulara yayılması hastalığın T evresinin ileri olduğunu gösterir. Artmış lenfatik, venöz ve perinöral invazyon ise kötü prognoz göstergesidir.

2.9.3 Pankreas Kanserinde Lenf Nodları

Pankreatik kanserlerin %56-79'u, duodenal kanserlerin %36-47'si ve ampüller kanserlerin %30-50'si lenf nodu metastazları ile birlikte dir. Ampüller tümörlerde oran daha düşük olmakla birlikte bu tümörler daha çok peripankreatik nodlara(N1) ve nadiren de çöliyak veya superior mezenterik arter solundaki nodlara (N2) metastaz yaparlar. Pankreatik kanserde ise N1 ve N2 lenf nodlarına metastaz daha sıktır (237,238). Lenf nodu metastazı olan duodenal kanserlerde 5 yıllık yaşam %40-50 iken bu oran lenf noduna metastaz yapmış pankreas kanserinde %5'tir (239). İntrapankreatik perinöral invazyon da kötü prognoz habercisidir. Mezenterik nöral pleksusu tutulmuş olgularda da yaşam süresi daha kısadır ve pankreatik kanserli hastaların çoğunda perinöral invazyon vardır ve bu durum yüksek orandaki lokal nüksün bir açıklaması olabilir (240).



Şekil 2-13 Peripankreatik ve bölgesel lenf nodu grupları.

2.9.4 Cerrahi Tedavi

Cerrahi rezeksiyon yalnızca lokal ve bölgesel hastalığı olanlara fayda sağlar. Sistemik metastazları ihtimal dışı bırakmak için ameliyat öncesinde uygun görüntüleme yöntemlerinin kullanılması gerekir. Superior mezenterik, çölyak veya hepatik arterlerin sarıldığına veya superior mezenterik ven-portal ven bileşkesinin tıklandığına dair radyolojik bulgunun olmaması gerekir. Eğer cerrah venöz rezeksiyon ve rekonstruksiyon yapmak için hazırlıklı ise segmenter venöz tutulma (tam tıkanma ve kollateraller yok ise) ameliyat için kontrendikasyon değildir. Standart ameliyat sahasındaki nodal metastazlar (N1 pankreatik nodlar) rezeksiyonu engellemez (236). Amaç geride tümör dokusu bırakmadan rezeksiyon yapmak olmalıdır. Standart tedavi pilor korunarak veya korunmadan pankreatikoduodenektomidir.

3. HASTALAR ve YÖNTEM

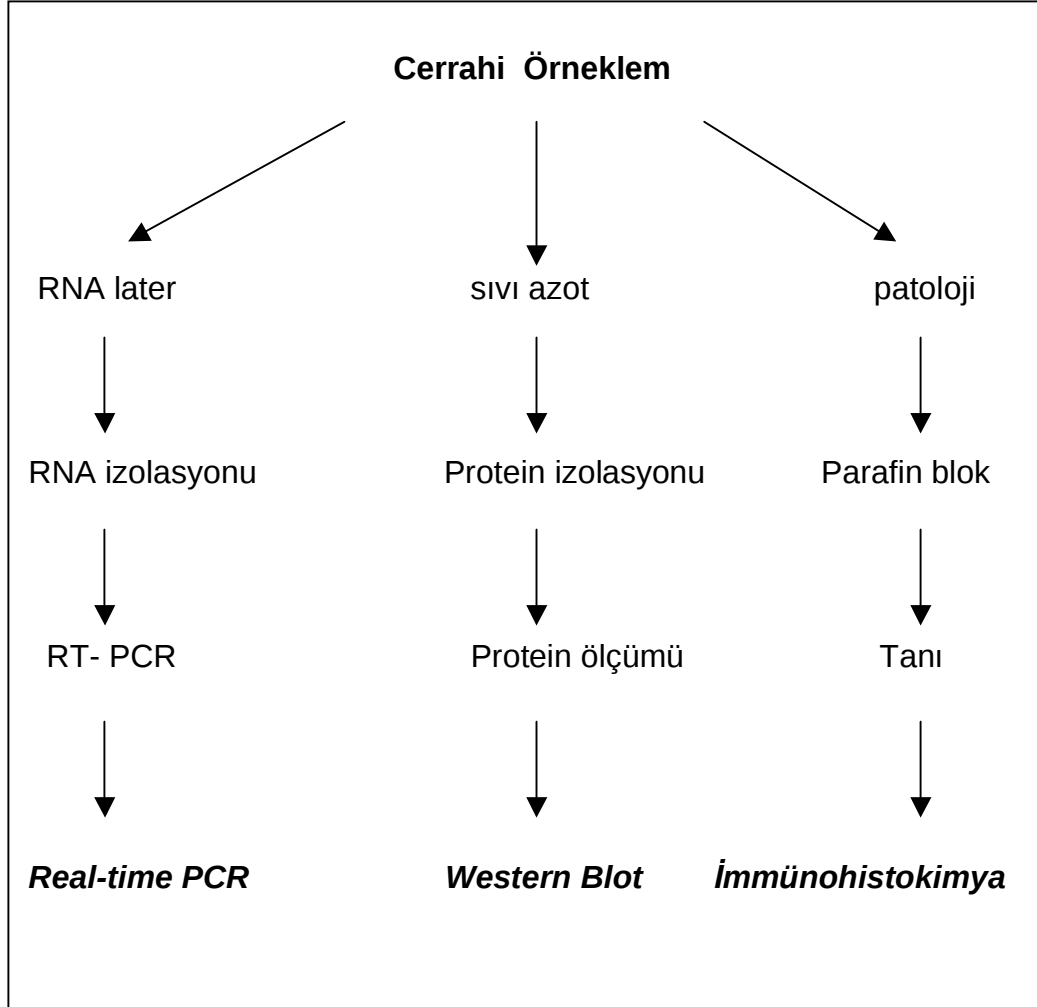
Bu araştırmaya konu olan çalışmalar için gerekli hasta örnekleri, Ankara Numune ve Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastaneleri (EAH) 7. ve 3. Genel Cerrahi Kliniklerinde mide, kolon, pankreas kanseri tanısı ile ameliyatına karar verilen hastalardan alınmıştır. Deneysel çalışmalar ise Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı ve Ankara Numune EAH Patoloji laboratuvarında gerçekleştirildi.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu' nun 17-3-2005 tarih ve TBK 04/12-19 karar sayısı ile tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur.

3.1. Hasta Seçimi ve Hasta Grupları

Ankara Numune EAH ve Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt EAH Genel cerrahi Kliniklerine sindirim sistemi malignitesi ile yatırılan hastalardan mide kanseri nedeniyle D2 α lenf nodu diseksiyonu yapılan yaş ortalaması (median(range)) 58(42-78)yıl olan 39 hasta(9K); kolon kanseri tanısıyla yatırılan ve radikal cerrahi girişim uygulanan yaş ortalaması 57,5(22-76) olan 29 hasta (14K) ve Pankreas adeno kanseri tanısıyla yatırılarak whipple prosedürü uygulanan ortalama yaşı 57 (54-64) yıl olan 14(5K) hasta çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya katılan hastaların tümünden imzalı bilgilendirilmiş onam formları alındı. Ameliyatların tümü aynı cerrahın(MMÖ) kontrolünde mümkünse aynı ekiplerce yapıldı. Hazırlanan protokol uyarınca hastalardan doku örnekleri alındı ve bir kısmı RNA-later içeren eppendorf tüplerde artanı da sıvı azot içeren azot tankında korunarak ileri incelemeler için Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD'na transfer edildi. (Tablo 3-1)

Tablo 3-1: Çalışma Protokolü

3.2-Yöntemler

3.2.1.Cerrahi Örnekleme Yöntemi

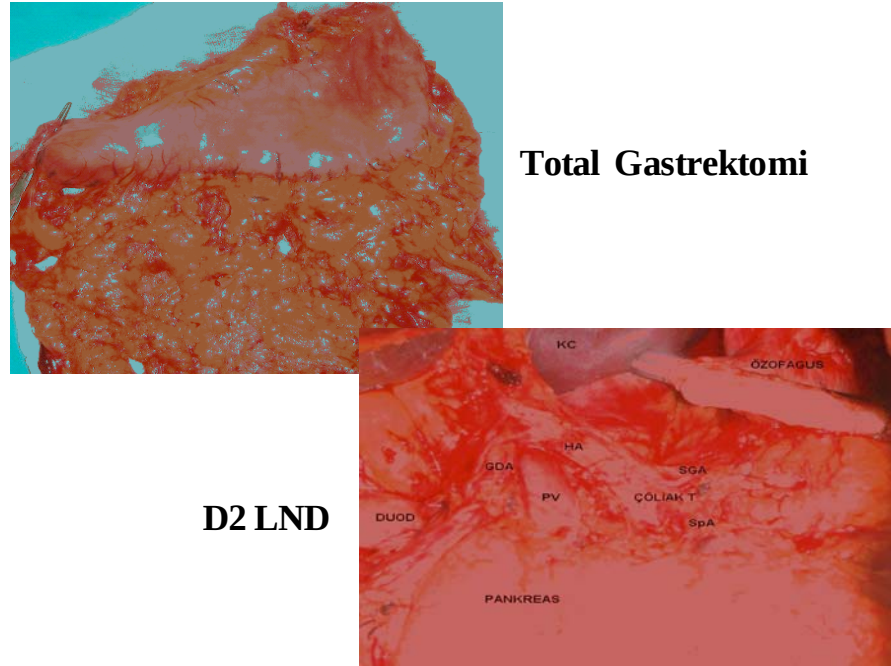
Hastalar ameliyata alındıktan sonra lenf nodları, mide kanserli hastalarda Japon Mide Kanseri Derneği'nin sınıflaması; kolon ve pankreas kanserli hastalarda ise TNM sınıflaması dikkate alınarak örneklenildi. Hangi lenf nodunun örnekleneyeceğine makroskopik olarak karar verildi. Lenf nodlarından, makroskopik olarak tümör içerenler veya boyutu 1cm den daha büyük olanlar örneklenerek $\frac{1}{2}$ si histopatolojik tanı için patolojiye gönderildi. Dokudan kalan $\frac{1}{2}$ ise tekrar ikiye bölünerek bir parçası ($\frac{1}{4}$) RNA izolasyonu

için RNAlater (*Ambion, ABD*) içeren eppendorf tüplere konuldu. Diğer ¼ ise tüplere konularak western-blot deneylerinde kullanılmak üzere sıvı azot içerisinde donduruldu. Daha sonra dokular Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji AD'na transfer edilerek RNAlater içindeki dokular -20°C da sıvı azot içerisindekiler ise -80°C da arşivlendi. Aynı işlemler aynı istasyonda bulunan ve makroskopik olarak normal olduğu düşünülen normal lenf nodları için de tekrarlandı.

Ameliyatta karın açıldıktan sonra ameliyatın akış planına paralel olarak ulaşılabilirlik önceliğine göre, ilk istasyon olarak paraaortik lenf nodlarından (alfa, uzak lenf nodu), ikinci istasyon olarak perivasküler lenf nodlarından (çölyak trunkus çevresi, orta lenf nodu) ve üçüncü olarak da perigastrik lenf nodlarından (yakın lenf nodu) hem tümörlü, hem de normal lenf nodu alınarak örneklem yapıldı. Kolon tümörlerinde bu işlem tümörün yerleşim yerine göre paraaortik (uzak), mezenterik (orta) ve epikolik(yakın) lenf nodları şeklinde tekrarlandı.

Daha sonra ise total veya parsiyel olarak çıkarılmış mide, pankreas ve kolondaki tümör dokusundan ve tümöre uzak normal dokudan örneklem yapılarak lenf nodu için uygulanan arşivleme yöntemi tekrarlandı(Şekil 3.1). Patolojiye giden ve elimizde deneyler için kalan doku örneklerine aynı kod ve numara verilerek kayıt tutuldu:

TD: Tümör dokusu	3-Orta tümörlü lenf nodu
ND: Normal doku	4- Orta normal lenf nodu
1- Uzak tümörlü lenf nodu	5-Uzak tümörlü lenf nodu
2- Uzak normal lenf nodu	6-Uzak normal lenf nodu



Total Gastrektomi

D2 LND

Şekil 3-1: Total gastrektomi-D2 Lenf Nodu Diseksiyonu

3.2.2.Doku Lizisi ve Homojenizasyonu

Dokudan RNA izolasyonu yapabilmek için öncelikle dokunun çok iyi parçalanarak homojenize edilmesi gereklidir. Bu amaçla Mini Bead-Beater 8 (*Biospect, ABD*) doku lizis cihazı kullanıldı. 2,5 ml vidalı tüplerin yarısı 1mm çapında zirkonyum bilyeler (*Biospect, ABD*) ile dolduruldu. Üzerine RNeasy Midi Kit (*Qiagen, ABD*) içinde bulunan lizis buffer ilave edildi. Daha sonra RNAlater içinde saklanan doku tartılarak, bistüri ile çok küçük parçalara ayrıldı ve aynı tüpün içerisine ilave edildi. Mini bead-beater cihazında, homojenizasyon modunda 1dk işlem gördükten sonra, tüpler 5000rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve üstte kalan berrak kısım alınarak 15ml'lik tüpe konuldu. Bu işlem tartılan dokunun gerektirdiği, lizis buffer miktarına göre, 2 veya 3 kez tekrarlandı (firmanın önerisi; 250mg doku için 4ml lizis buffer). En son bilyelerle birlikte doku lizatının hepsi 15ml tüp içinde toplanarak 20°C'de, 5000rpm'de 10dk daha santrifüj edildi. Bundan sonraki bütün santrifüj aşamaları da 20°C' de gerçekleştirildi

3.2.3. RNA İzolasyonu

Santrifüjden sonra tüpdeki sıvının üst kısmında kalan berrak doku lizati başka bir 15ml'lik tüpe aktarıldı ve RNeasy Midi kit üretici firmasının önerdiği talimatlar takip edilerek RNA izolasyonuna devam edildi

- Lizatin üzerine aynı miktarda %70'lik etanol eklendi, iyice çalkalanıp, homojenize hale geldikten sonra kitin içinden çıkan özel tüplere aktarıldı. Membranlı kolonlar içeren bu tüpler 5000 rpm'de 5dk santrifüj edildi, membrandan geçen kısım atıldı.

- Kolona 4 ml 'RPW1 buffer' eklenerek 5000 rpm'de 5dk santrifüj edildi ve aşağıda toplanan kısım atıldı.

- Kolon daha sonra 2,5 ml 'RPE buffer' ile 5000 rpm'de 3dk yıkandı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.

- Sonraki basamakta kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Lizis ettiğimiz doku miktarına göre 'RNase-free' su miktarı önerilere göre ayarlandı ve direk silika-jel membranın üzerine konularak, 5000rpm'de 3dk santrifüj edildi. Tüpün dibinde toplanan RNA alınarak, ependorf tüplere transfer edildi ve kullanılıncaya kadar -80°C 'de saklandı.

3.2.4. RNA Miktarının Ölçülmesi

İzole edilen RNA'nın kalitesi ve miktarı NanoDrop 1000 (*Thermo, ABD*) cihazında UV-spektrofotometrik olarak ölçüldü. 260nm ve 280nm dalga boylarının kullanıldığı bu cihazda, optik dansite (OD) ölçümleri ile RNA saflık derecesi belirlendi. Bunun için A_{260}/A_{280} oranının 1,9-2,0 olması gerekiyordu ve bu özelliği taşıyan RNA örnekleri cDNA (komplementerDNA) elde etmek için kullanıldı. Ölçüm için 1,5µl RNA kullanıldı ve kantitatif değeri, cihaz tarafından ng/µl olarak verildi.

3.2.5. Reverse Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu

Çalışmada kullanacağımız genlerin ekspresyon düzeylerini saptayabilmek için ilk önce reverse transkripsiyon yöntemi ile RNA'lar cDNA'ya çevrildi ve daha sonra bu cDNA'lar real-time PCR yöntemi ile ekponansiyel olarak çoğaltıldı. RT için RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (*Fermentas, ABD*) kullanıldı. Her örnekten 0,8µg RNA alınarak, üretici firmanın önerdiği gibi reaksiyon gerçekleştirildi.

1.aşama:

<u>Bileşen</u>	<u>Miktar</u>
RNA	0,8µg
Oligo(dT) primer	1 µl
ddH ₂ O	12 µl'ye tamamlandı

Hepsi karıştırılarak **70 °C** 'de, **5 dk** inkübe edildi.

2. aşama:

5x Reaksiyon buffer	4 µl
dNTP ((10mM)	2 µl
Ribonükleaz inhibitör(20u/µl)	1 µl

İlave edilerek **37 °C**'de, **5 dk** tutuldu.

3. aşama:

Reverse Transkriptaz	
M-MuLV (200u/ µl)	<u>1µl</u>
Toplam:	20µl

Enzimin ilavesinden sonra **42°C** 'de **60dk**, **70°C** 'de **10dk** tutuldu.

Elde edilen cDNA'lar kullanılıncaya kadar -20°C 'de saklandı.

3.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Real-time PCR'a geçmeden önce geleneksel (conventional) PCR yapılarak, primerlerin çalışıp çalışmadığı test edildi. PCR koşulları tekrarlayan denemelerle belirlendi. Buna göre LYVE-1, GAPDH, CD44, VEGFR-3 genlerinin primerlerine uygun bağlanma (*annealing*) derecesinin 60°C olduğuna karar verildi. PCR bileşeni olarak 10xbuffer, MgCl₂ (*Fermentas, ABD*), dNTP (*MBI Fermentas, ABD*), Taq Polimeraz (*MBI Fermentas, ABD*) ve LYVE-1, VEGFR-3, CD44 genleri için forward(F) ve Reverse(R) primerleri (*Operon, Almanya*), GAPDH için F ve R primerleri(*EurofinsMWG,Almanya*) (242) kullanıldı. PCR için kullanılan bileşenlerin miktarları tablo 3-3' de gösterilmektedir. GAPDH real-time PCR için internal standart olarak kullanılan moleküldür. Genlere özgü primerlerin baz dizilimleri ise tablo3-2' de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: Primer Dizilimleri

Gen	Primer baz dizilimi(5'-3')	Kromozom	PCR ürünü
LYVE-1	F: CCAGTGAGCCGACAGTTTGCAG R: CAGGTATTGTAGAGTAAGGGGATGCC	11p15	184 bp
VEGFR-3	F: ACGGCCTGGTGAGTGGC R: CGTTTGACTCCTCCGTGATG	5q35.3	63bp
CD44	F: GCAACTCCTAGTAGTACAACGGAAGA R: CGATATCCCTCATGCCATCTGA	11p13	80bp
GAPDH	F: GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT R: CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA	12p13	143bp

Tablo 3-3: Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	Miktar
10x buffer	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl
dNTP mix(2mM)	0,5 µl
Primer F (5pmol/µl)	2 µl
Primer R (5pmol/µl)	2 µl
ddH ₂ O	11,5 µl
Taq Polimeraz(5u/µl)	0,5 µl
cDNA(1/5 dilüe)	5 µl
Toplam=	20 µl

PCR ürünü, *thermal cycler* (Bio-Rad, iCycler, ABD) kullanılarak elde edildi.

Cihazda uygulanan PCR koşulları :

İlk Denatürasyon	95 ⁰ C	5dk	
Denatürasyon	95 ⁰ C	30sn	} 40 döngü
Bağlanma(annealing)	60 ⁰ C	30sn	
Uzama (extension)	72 ⁰ C	30sn	
Son uzama	72 ⁰ C	10 dk	

3.2.7. Agaroz Jel Elektrofrez

PCR ürünlerini görüntülemek için %3'lük agaroz jel hazırlandı. Agaroz (Sigma, ABD) 1,5gr tartılarak, 1xTBE (TrisBaseEDTA) tampon çözeltisi 50ml'ye tamamlandı. Daha sonra mikrodalgada 800 W, 2 dk kaynatılarak, agarozun tamamen erimesi sağlandı. Homojen bir görünüm elde edildikten sonra cDNA'lerin ultraviyole(UV) ışığı altında görünür hale gelmesini sağlayacak olan 5mg/ml konsantrasyonundaki etidyum bromür (*Sigma,ABD*) solusyonundan agaroz jele 3µl eklendi.Tarakları ve sınır bantları takılarak hazırlanan jel tabağına, agaroz jel dökülerek soğumaya bırakıldı. Tamamen donduktan sonra tarak ve sınır bantları çıkarılarak elektroferez tankına yerleştirildi. Her PCR ürününden 20µl alınarak, 6x yükleme tamponu (*MBI Fermantas, ABD*) ile karıştırılarak (son konsantrasyonu 1x olacak şekilde) jelde bulunan kuyucuklara yüklendi. DNA'nın büyüklüğünü bp olarak gösteren 50bp DNA ladder (*MBI Fermantas, ABD*) ise boş kuyucuklardan birine yüklendi. PCR ürünleri 110V sabit akımda, 90dk yürütüldü.

Elektroferez işlemi tamamlandıktan sonra amplifiye olan LYVE-1, VEGFR-3, CD44 genleri UV translüminatör (*2011 Macrovue, LKB, ABD*) ile görünür hale getirildikten sonra Polaroid jel-cam fotoğraf makinesi kullanılarak fotoğrafları çekildi.

Solusyonlar :

1xTBE : Tris base 54gr (Sigma, ABD)
 Borik asit 27,5gr (Merck, Almanya)
 0,5M EDTA 20ml (Sigma, ABD) karıştırılarak ddH₂O ile

1lt'ye tamamlanır.

6xDNA ladder :	DNA ladder	1µl
	6x yükleme tamponu	1µl
	ddH ₂ O	4µl

3.2.8. Real-Time PCR

Geleneksel PCR ile primerlerin çalıştıkları test edildikten sonra mRNA ekspresyon düzeylerini ölçmek için tümörlü ve normal dokulardan elde edilen cDNA 'ler ile aynı primerler kullanılarak ,real-time PCR yapıldı. Florasan boya olarak Sybr-green I tercih edildi ve tepkimeler için LightCycler-DNA Master SYBR-Green I (*Roche Diagnostics, Almanya*) kit kullanıldı. PCR reaksiyonun bileşenleri karışıma eklenmeden önce kısa vorteks ve santrifüj aşamalarından geçirildi. Real-time PCR bileşenleri ve miktarları tablo 3-4'de gösterildi.

Tablo 3-4: Real-time PCR reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Miktar
10xSYBR GreenI buffer	2µl
MgCl ₂ (25mM)	2µl
Primer F (2,5pmol/µl)	2µl
Primer F (2,5pmol/µl)	2µl
ddH ₂ O	7µl
cDNA(1/5dilüe)	5µl
Toplam=	20µl

cDNA hariç diğer bileşenler karıştırılarak 100µl 'lık PCR tüplerine 15µl olarak eşit şekilde dağıtıldı. Daha sonra her tüpe bir örneğin cDNA'sı

eklenerek Rotor-Gene Corbet 6000 (ABD) real time PCR cihazına yerleştirildi. Tablo 3-5’de verilen koşullarda analiz edildi. Her örnek çift (double) çalışıldı.

Tablo 3-5: Real-time PCR reaksiyon koşulları

İlk Denatürasyon	95 ⁰ C	5dk	
Denatürasyon	95 ⁰ C	30sn	} 40 döngü
Bağlanma(annealing)	60 ⁰ C	30sn	
Uzama (extension)	72 ⁰ C	30sn	
Kısa denaturasyon	81 ⁰ C	5sn	
Son uzama	72 ⁰ C	10dk	

Ekspresyon düzeyini hesaplamak için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodundan yararlanıldı. Her bir örneğin PCR amplifikasyonu sırasında eksponansiyal faza geçtiği siklus [eşik siklus (Ct)] tespit edilerek $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodundaki formülde yerine konuldu. Her örnekten çift çalışıldığı için Ct değeri olarak ortalamaları alındı. Tümörlü dokudaki (hedef) gen ekspresyon düzeyinin, normal dokuya (kontrol) göre nasıl değişim gösterdiği hesaplandı. Bu kıyaslamalı (relative) kantitatif bir yöntemdir ve hedef dokudaki ekspresyonun normal dokuya göre kaç kat değişim gösterdiğini bize vermektedir (243). House keeping gen olarak GAPDH geni (referans) seçildi ve öncelikle araştırmaya konu genlerin Ct değerleri GAPDH ile normalize edildi (formül 3.2).

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{hedef}} - \Delta Ct_{\text{kontrol}})} \quad (3.2)$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct_{\text{hedef}} - Ct_{\text{referans}}) - (Ct_{\text{kontrol}} - Ct_{\text{Referans}})]}$$

3.2.9 İmmünohistokimyasal Yöntem

Tümörlü ve normal dokulardan elde edilen 4µM kalınlığında parafin kesitler polilizinli lamların üzerine yerleştirilerek deparafinize olmaları için 56°C'de, 12 saat bekletildi.

- Ksilolde 30dk bekletildi.
- %100, %95, %90'lık alkol çözeltilerinde 5'er dakika inkübe edilerek dehidratasyon yapıldı
- Lamlar ddH₂O ile 5dk, PBS ile 2dk yıkandı
- Yanlış pozitifliği önlemek amacıyla %3'lük hidrojen peroksidaz içinde oda sıcaklığında 10dk bekletilerek endojen peroksidaz blokajı yapıldı.
- 1x PBS (pH: 7.6) ile 5dk yıkandı
- 1mM EDTA tamponu (pH:8) içinde 30dk mikrodalga fırında işleminden geçirildi ve oda sıcaklığında soğutuldu. Ardından ddH₂O ile 3 kez yıkandı ve 10dk nonimmün protein bloklama serumunda bırakıldı.
- Primer antikorlar ayrı ayrı çeşitli dilüsyonlarda sulandırılarak, lamların üzerine doku kesitlerini kapatacak şekilde damlatıldı ve antikora göre değişen sürelerde 30 ile 45dk tutuldu.
- Primer antikorla inkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra 2dk 1xPBS ile yıkandı ve PBS vakumla çekildi.
- Sekonder antikorda(*Lab Vision, ABD*)sulandırıldıktan sonra kesitler üzerine uygulandı ve 10dk bu şekilde oda sıcaklığında tutuldu. Üzerinden sekonder antikor vakumla çekildikten sonra 2dk PBS ile yıkandı.
- Sekonder antikorun görünür hale gelebilmesi için streptavidin-biyotin kompleksi ile (*Lab Vision Co, ABD*) 30dk inkübe edildi ve PBS ile 2dk yıkandı.
- Lamlar daha sonra UltraVision Polyvalent HRP-DAB kromojen (*Lab Vision Co, ABD*) ile 10dk inkübe edilerek kahverengi-kırmızı renk dönüşümü sağlandı. ddH₂O ile 5dk yıkandı.
- Hücre çekirdeklerinin boyanması için örneklerin üzeri 150µl Hemotoksilen Mayer boya ile örtüldü ve 5dk bekletildi, distile su ile yıkandı.

-%100, %95, %90'lık alkol çözeltilerinden geçirilerek dehidratasyon yapıldı ve kesitler ksilolde şeffaflaştırıldı.

- Lam ve lamel entellan kullanılarak kapatıldı ve analize geçildi.

Bu yöntemi kullanılarak Santa Cruz.ABD firmasından temin edilen LYVE-1 ,VEGFR-3, CD44 anti-human antikorları kullanıldı fakat yöntem üzerinde oynamalar yapılarak çeşitli defalar boyama sonuç vermeyince antikoru başka bir firmadan almaya karar verdik.Bu sefer Abcam,ABD firmasından anti-human antikorlar getirtildi. Fakat yine çok uzun bir süre uğraşılmasına ve yöntemde çeşitli değişiklikler yapılarak çalışılmasına rağmen sonuç alınamadı. Konvansiyonel yöntemle sonuç alınamayınca bu sefer BOND-Max cihazı (Leica, ABD) kullanılarak Abcam'den alınan antikorlar denendi. Fakat bu antikorlarda sadece LYVE-1 ile çok iyi sonuç alınırken, diğer antikorlar yine çalışmadı. Bunun üzerine VEGFR-3 ve CD44 anti-human antikorları GenTex,ABD'den getirtildi ve Bond-Max'de boyandı. Bu sefer sonuç alındı ve hasta preperatları Polymer Refine Detection Kit (Vision Biosystem, ABD) kullanılarak Bond-Max cihazında boyandı. Tablo 3-6'da protokol verilmiştir.

Tablo 3-6: Bond-Max, IHC protokolü

- 1 30 dakika 60 devede lamlar ısıtılır
- 2 Bond devax solusyonu 72 devede lamlara damlatılır.
- 3 Bond devax solusyonu 72 devede tekrar lamlara damlatılır.
- 4 Bond dewax solusyonu oda sıcaklığında lamlara damlatılır.
- 5 %96 ılık alkol ile oda ısısında 3 kez yıkanır
- 6 Lamlar iki kez Bond wash solusyonundangeçirilir
- 7 Bond wash solusyonu oda ısısında 5 dakika inkübasyon yapılır.
Lamlar Bond Epitop retrieval 1 solusyonundan oda sıcaklığında iki kez
- 8 geçirilir
- 9 Bond Epitop retrieval 1 solusyonu 100 derecede 20 dakika inkübe edilir
Bond Epitop retrieval 1 solusyonu ile oda ısısında 12 dakika inkübasyon
- 10 yapılır.
- 11 Bond wash solusyonu 35 devede lam üzerinden 3 kez geçirilir
- 12 Bond wash solusyonu oda ısında 3 dakika lam üzerinde bırakılır
- 13 Bond wash solusyonu ile oda ısısında iki kez daha yıkanır
- 14 Peroxid blok oda ısında 5 dakika inkübasyon yapılır.
- 15 Bond wash solusyonu oda ısısında 3 kez yıkanır
- 16 Primer antikor ile 34 derecede 30 dakika inkübasyon yapılır.
- 17 Bond wash solusyonu ile oda ısısında lam yıkanır
- 18 Bond wash solusyonu oda ısında 3 dakika lam üzerinde bırakılır
- 19 Bond wash solusyonu oda ısında 5 dakika lam üzerinde bırakılır
- 20 Post Primary antibody oda ısısında 11 dakika inkübasyon yapılır.
- 21 Bond wash solusyonu oda ısısında lam üzerinden geçirilir
- 22 Bond wash solusyonu oda ısında 2 dakika lam üzerinde bırakılır
- 23 Bond wash solusyonu oda ısında 3 dakika lam üzerinde bırakılır
- 24 Polymer solusyonu 11 dakika oda ısısında inkübasyon yapılır.
- 25 Bond wash solusyonu oda ısısında lam üzerinden geçirilir
- 26 Bond wash solusyonu oda ısında 2 dakika lam üzerinde bekletilir
- 27 Distile su içerisinde 2 dakika inkübasyon yapılır.
Mixed DAB refine detection solusyonu ile oda ısısında 1 dakika inkübasyon
- 28 yapılır.
Mixed DAB refine detection solusyonu ile oda ısısında 15 dakika inkübasyon
- 29 yapılır.
- 30 Distile su ile oda ısısında lam yıkanır
- 31 Distile su içerisinde 3 dakika inkübasyon yapılır.
- 32 Distile su içerisinde 6 dakika inkübasyon yapılır.
- 33 DAB enhancer solusyonu ile oda ısında 8 dakika inkübasyon yapılır.
- 34 Distile su ile oda ısısında lam yıkanır
- 35 Distile su içerisinde 4 dakika inkübasyon yapılır.
- 36 Distile su içerisinde 2 dakika inkübasyon yapılır.
- 37 Hematoksilen solusyonu ile oda ısısında 20 dakika inkübasyon yapılır.
- 38 Distile su oda ısısında lam üzerinden geçirilir
- 39 Bond wash solusyonu ile oda ısında 3 dakika inkübasyon yapılır.
- 40 Distile su içerisinde 3 dakika inkübasyon yapılır.
- 41 %96 ılık alkol oda ısısında lam üzerinde 5 dakika bekletilir.
- 42 Xylen 5 dakika oda ısında bekletilir
- 43 Xylen bazlı kapatma maddesi ile kapatılır.

Lenfatik damar sayısını bulabilmek için, boyama işleminden sonra preperatlar, lenfatik ve venöz endotel ayrımı için değerlendirildi. LYVE-1 ve VEGFR-3 ile boyanan ve lümen formasyonu oluşturmuş endoteller bulunarak ,bu yapıların sayısı sonuç olarak verildi. Öncelikle x100 büyütmede tümör ve tümör periferi değerlendirildi. Sonra x40 büyütmede damardan zengin bölgeler gözden geçirilerek, 3 adet “Hot Point” seçildi, lenfatik damar yoğunluğu x200 büyütmede sayılan lenfatik damarların ortalaması olarak verildi (245) CD44 ile boyanmada hücrelerin doku içindeki dağılımı ve tipi hakkında bilgi verildi.

3.2.10 Dokudan Protein İzolasyonu

LYVE-1, VEGFR-3 ve CD44 genlerinin ekspresyon ürünü proteinlerinin, dokudaki varlığını gösterebilmek amacıyla Western Blot yöntemi kullanıldı. Ameliyat sırasında hastaların tümörlü ve normal dokularından alınan örnekler, hemen sıvı azot tankına konularak donduruldu ve arşivlenmek üzere -80°C'ye transfer edildi.

Dokudan protein izolasyonu yapabilmek için RIPA Buffer (*PIERCE, ABD*) kullanıldı. 2,5 ml' lik tüplerin yarısı zirkonyum bilyeler ile dolduruldu ve bu tüplere, her 1ml'sine 10µl protease inhibitor coctail (*Sigma, ABD*) eklenen RIPA lysis buffer ilave edildi. Protein izolasyonundan hemen önce dokular -80°C 'den çıkarıldı, tartıldı ve erimeden bistüri ile çok küçük parçalara ayrılarak RIPA lizis tamponunun bulunduğu tüplere konuldu. 100 mg doku için 1000µl lizis buffer kullanıldı. Mini bead-beater ile 1 dk homojenize edilip, 3 dk 5000 rpm'de santrifüjden sonra süspansiyonun berraklaşmış üst tabakası toplanarak başka bir eppendorf tüpe aktarıldı. Dokunun miktarının gerektirdiği RIPA buffer kadar, bu işlem 1 veya 2 kez daha tekrar edildi ve her seferinde üstte toplanan doku parçalarının bulunmadığı berrak kısım aynı eppendorfa kondu. Parçalama işlemi bu şekilde tamamlandıktan sonra, tüpte biriken berrak lizat tekrar 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve üst kısım toplanarak başka bir eppendorf tüpe aktarıldı. Hemen kullanılmayacak olan örnekler -80°C'de saklandı.

3.2.11 Protein Ölçümü

Protein ölçümü Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-RAD, ABD) ile gerçekleştirildi. Kitin içinde, çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmış (2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml) 7adet Bovine Serum Albumin Standartı ve ölçüm boyası olarak kullanılan 1x dye Reagent bulunmaktadır. Üretici firmanın önerisi doğrultusunda 5 µl standart, 250 µl boya ile çok iyi bir şekilde karıştırılarak oda sıcaklığında 5dk tutuldu. Bütün standart örnekleri ölçüm yapılmadan hemen önce tekrar çok iyi şekilde vortekslendi ve nanodrop cihazının Bradford programında, her örnekten 2,5 µl kullanılarak ölçüm yapıldı ve standart eğri(curve) oluşturuldu. Daha sonra doku örnekleri de aynı şekilde hazırlandı. Ölçüm için 2,5 µl kullanıldı ve nanodrop software'in standart eğriyi referans alarak hesapladığı konsantrasyon not edilerek western blot yönteminde kullanılmak üzere arşivlendi.

3.2.12 Western Blot Yöntemi (WB)

LYVE-1, VEGFR-3, CD44 proteinlerinin dokudaki varlığı elektroforez ve blotlama tekniklerinin yer aldığı Western Blot (241) yöntemi ile gösterildi.

SDS-Poliakrilamid Gel Hazırlanması(SDS-PAGE): Seyrek protein örneklerinin konsantrasyonu ve bant keskinliği artırmak için kesintili SDS-PAGE sistemi kullanıldı. Bizim görmek istediğimiz proteinlerin büyüklüklerine uygun olarak %10'luk ayırma (separating) jeli ve %5'lik yığınlama (stacking) jeli hazırlandı.

Teflon ve camdan oluşan jel plakaları (10x10,5cm) temizlendikten sonra aralarına 0,75cm kalınlığında ayıraç (spacer) yerleştirilerek jel sandiviçi hazırlandı. Dikey konuma getirilerek, Hoefer SE 245 Dual Gel Caster (*GE Healthcare Bio-Sciences, İsveç*), jel hazırlama ünitesine yerleştirildi ve kaçak olmaması için kısıkaçlarla sıkı bir şekilde tutturuldu. Sonra %10'luk ayırma (separating) jeli hazırlandı.

%10 Ayırma Jeli Bileşenleri (8ml):

Su	3144µl
Akrilamid	2666µl
TRIS (1.5 M) pH8,8	2026µl
SDS (%10)	80µl
APS	80µl
TEMED	4µl

Yukarıdaki bileşenler belirtile miktarlarda karıştırıldı. Polimerizasyonu başlatan APS olduğu için jel karışımına TEMED'den sonra, en son ilave edildi ve vakit kaybetmeden jel plakalarının arasına hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterilerek yavaş yavaş, yukarıdan 2cm boşluk kalıncaya kadar döküldü, sızıntı olup olmadığı kontrol edildi. Sızıntı olmadığından emin olununca jelin üst kısmının düzgün olması için 80µl bütanol jelin üzerine yayıldı. 10-15dk jelin donması beklendi, tamamen donduktan sonra bütanol döküldü ve ddH2O ile yıkandı. Üzerine ilave etmek üzere %5 yığınlama jeli hazırlama aşamasına geçildi.

%5 Yığınlama Jeli Bileşenleri (2 ml)

Su	1380µl
Akrilamid	328µl
TRIS (0.5 M) pH 6,8	250µl
SDS (%10)	20µl
APS	20µl
TEMED	2µl

%5' lik jel bileşenleri karıştırıldı ve tarak yerleştirildikten sonra ayırma jelinin üzerine ilave edildi. 15-20 dk tamamen donması için beklendi.

Jel donduktan sonra, elektroforez işlemi için Hoefer SE260 (*GE Healthcare Bio-Sciences,İsveç*) mini-vertikal elektroforez ünitesine yerleştirildi.

Elektroforez: Jele yerleştirilmiş olan tarak çıkarılarak kuyucuklar 1x yürütme(running) tamponu ile yıkanıp temizlendi. Yüklemeden önce yükleme (sample) tamponuna proteinin denatüre olması için 25:1 oranında β -

Mercaptoetanol eklendi. Yüklenen protein örneği 20µg olacak şekilde hesaplandı ve 5:1 oranında örnek tamponu karıştırılarak, 100°C'de 2,5dk kaynatıldı. Daha sonra örnekler jel pipet ucuyla 25µl olarak kuyucuklara yüklendi. Boş bir kuyuya da Blue Prestained MW Marker Mix (*Pierce, ABD*) eklenerek, dikey elektroforez tankı kuyuların seviyesine kadar 1x yürütme tamponu ile dolduruldu ve güç kaynağına (*Amersham Bioscience EPS 301, UK*) bağlanarak elektroforez başlatıldı. Boya yığınlama jelini geçinceye kadar 20mA , 80 V'da yaklaşık 20dk, sonrasında boya jelin en alt ucuna ulaşınca kadar 40 mA ve 110 V'da yaklaşık 120dk yürütüldü.

Transfer: Western blotlama için ıslak transfer yöntemi kullanıldı. Elektroforez işlemi bittikten sonra jel, plakalar ayrılarak ortaya çıkarıldı. Üst tarafta bulunan yığınlama jeli kesilip atıldı ve plakanın üzerine yapışık olan jel 1x transfer tamponu konulmuş bir kabın içinde serbest hale getirilerek daha önce ıslatılan Whatman kurutma kağıdının üzerine taşındı. Transfer kasetinin negatif tarafına 2 adet sünger yerleştirildi, üzerine jel bulunan kurutma kağıdı konuldu. Daha sonra jelin boyutunda kesilmiş ve metanolda 1-2sn ıslatılıp sudan geçirilen PVDF transfer membranı (*Biorad, ABD*) jelin üzerine örtüldü. Arada kalan hava kabarcıkları sıyrılarak çıkarıldı. Üzerine tekrar 1adet kurutma kağıdı, 2 adet sünger konuldu, kaset kapatılarak transfer tankına yerleştirildi (*Amersham SE260, UK*). Tank 1x transfer tamponu ile tamamen dolduruldu ve 200mA'de 60dk tutularak membrana transfer işlemi tamamlandı.

Bloklama: Transfer işlemi tamamlandıktan sonra jel ve membran birbirinden dikkatlice ayrıldı. Antikorların etkisini artırabilmek için membran üzerindeki proteinlerin bloklanması gereklidir. Bunun için yağsız süt tozundan 2,5gr tartıldı ve 50ml PBST solusyonu içinde eritilerek (%5 olacak şekilde) membranın üzerine döküldü. Bu şekilde +4°C'de gece boyunca bekletildi.

İmmün işaretleme : Ertesi gün membran üç kez, 5,10,15 dk süreyle yıkandı. Daha sonra VEGFR-3 için primer antikor (*Santa-Cruz, ABD*) 1:1000 oranında PBST ile sulandırıldı ve membran bu solüsyonun içinde 60dk tutuldu. CD44 antikor (*Abcam, ABD ve Santa-Cruz, ABD*), 1:200 ile 1:1000 arasında, LYVE-1 antikor (*Abcam, ABD ve Santa-Cruz, ABD*) 1:100 ile

1:1000 arasında çeitli oranlarda sulandırıldı. Sonra bu dökülerek, tekrar 5, 10,15 dk PBST ile yıkandı. Sonra proteinleri görünür hale getirebilmek için, primer antikorları tanıyacak 1:1600 oranında sulandırılan HRP-sekonder antikor ile tekrar 60dk inkübe edildi. Süre sonunda tekrar 3 kez yıkanarak film çekimine geçildi

Film Çekimi: Karanlık oda hazırlandıktan sonra membranın üzerindeki fazla solusyon kağıt mendile emdirildi ve bir naylon üzerine konuldu. Membranın üzeri ise, üretici firma talimatına uygun olarak reaktifleri 1/1 oranında karıştırılan ECL Plus Detection Reagent (*Amersham,UK*) ile kaplandı ve 5dk bekletildi. Tekrar fazla sıvı kağıt mendile emdirildi ve membran film kaseti içine yerleştirildi. Üzerine naylon yaprak onunda üzerine film yerleştirilerek kasetin kapağı kapatıldı. Bu şekilde 1,5 ile 5 dk arasında bekletildikten sonra banyo aşamasına geçildi. Devoloper solusyonunda 2 dk , fiksatif solusyonunda da 1dk bekletildi ve çeşme suyunda yıkanarak protein bandları analiz edildi. Developer ve fiksatif solusyonları Radyoloji Kliniğinden temin edildi. Kullanılan diğer kimyasallar Sigma'dan alındı.

Western Blot için Kullanılan Solusyonlar:

Yükleme (Sample) Tamponu

Su	3.75ml
TRIS (pH 6.8)	1.25ml
Gliserol	1.875ml
SDS	2ml
Bromfenolblue	0.625ml

%30 Akrilamid Çözeltisi

Su	100ml
Akrilamid	29.2ml
Bisakrilamid	0.8ml
+4°C'de karanlıkta saklanır	

%10 SDS Çözeltisi

SDS	10gr
ddH ₂ O	100ml

Amonyum Persülfat Çözeltisi %10 (APS)

APS	100mg
ddH ₂ O	1000µl

TRIS (1,5 M) pH 8,8 Çözeltisi

TRIS	18,16gr
ddH ₂ O	100ml
HCl	pH 8,8 oluncaya kadar ilave edilir

TRIS (0,5 M) pH 6,8 Çözeltisi

TRIS 1,5 M, pH 8,8	25ml
ddH ₂ O	75ml
HCl	pH 6,8 oluncaya kadar ilave edilir.

5x Elektroforez Çözeltisi

TRIS Base	15g
Glisin	72g
SDS	5g

Toplam: 1 lt'de çözülür.

5x Transfer Çözeltisi

TRIS	3.625g
Glisin	18.025g

Toplam: 0.5 lt'de çözülür.

PBST Çözeltisi

PBS(100ml suya 1tablet)	10 tablet
Tween-20 (%0.0025)	200µl
ddH2O	1000ml

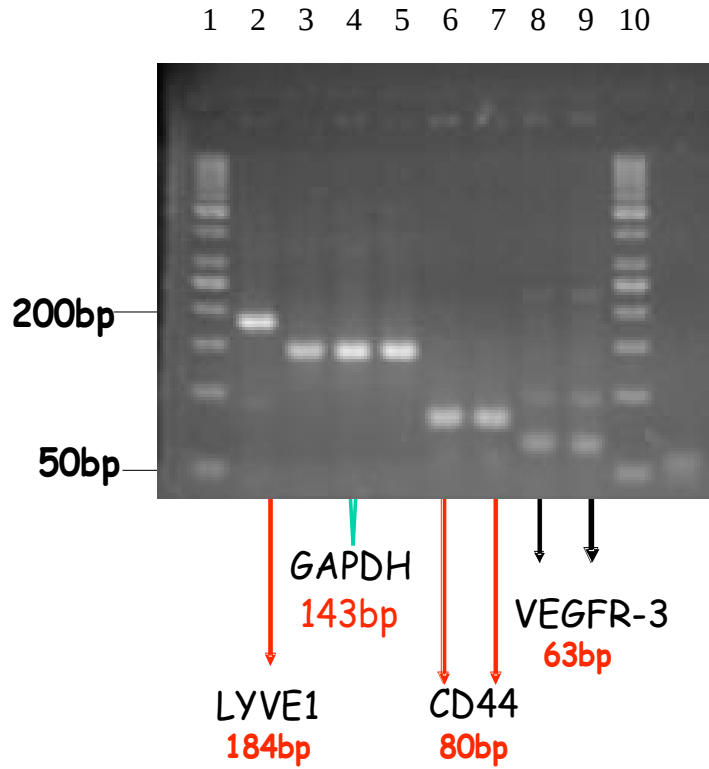
3.3 İstatistik Analiz

Hastalardan ve laboratuvar çalışmalarından elde edilen tüm veriler SPSS 15.0 for Windows programı (*SPSS, Chicago, USA*) kullanılarak analiz edildi. Tanımlayıcı veriler ortanca(range) kullanılarak ifade edildi. Tanımlayıcı veriler ile LYVE1, CD44, VEGFR3 arası ilişki *Fisher Exact Probability test* kullanılarak değerlendirildi. Her üç genin de ekspresyon düzeylerinin dağılımı normal olmadığından değerlendirmede nonparametrik testler kullanıldı. Klinikopatolojik özellikler ve gen ekspresyon düzeyleri arasındaki karşılaştırmalar yerine göre *Mann-Whitney U* ve *Kruskal-Wallis* testleri kullanılarak yapıldı. Klinikopatolojik değişkenler ile LYVE1, CD44 ve VEGFR3 gen ekspresyon düzeyleri arası korelasyon *Spearman Correlation Coefficients* kullanılarak değerlendirildi. P değerinin 0.05 in altında olması ($p<0,05$) durumunda sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 PCR Sonuçları

Geleneksel PCR real-time PCR yöntemine geçmeden önce LYVE-1, VEGFR-3, CD44, GAPDH genleri primerlerinin çalışıp-çalışmadığını test etmek, primerlerin annealing derecelerini, $MgCl_2$ düzeylerinin ne olması gerektiğini optimize edebilmek için yapıldı. Her gen için ayrı yapılarak primerlerin çalıştığı ideal koşullar belirlendi (Şekil 4-1).

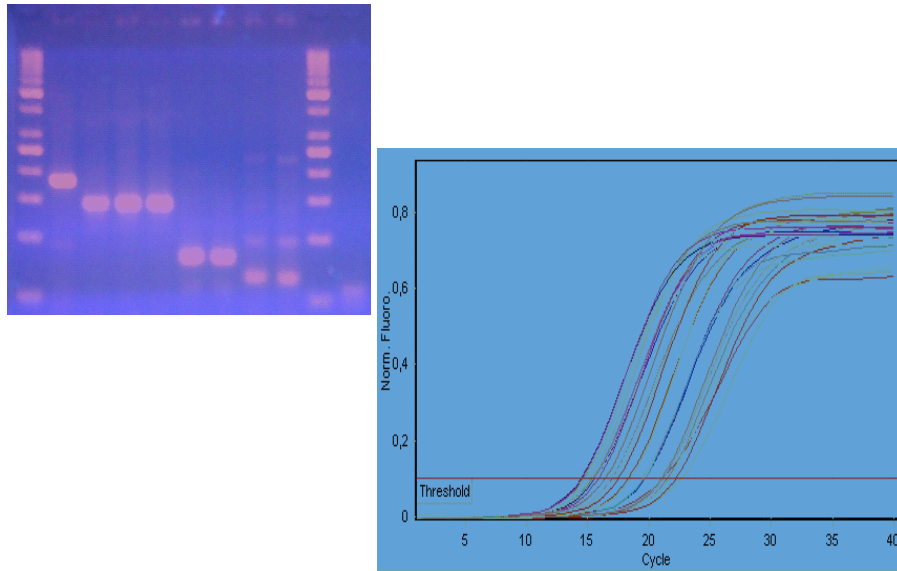


Şekil 4-1: Genlerin PCR ürünleri

Kuyu 1) ladder(50 bp) **2)** mide dokusunda, LYVE-1, **3-4-5)** sırasıyla kolon, mide, pankreas dokusunda GAPDH, **6-7)** sırasıyla mide ve kolonda CD44, **8-9)** sırasıyla mide ve kolonda VEGFR-3, **10)** ladder (50 bp)

4.2 Real Time Kantitatif -RTPCR

Bu çalışmada sindirim sistemi malignitesi ile yatırılan hastalardan mide kanseri nedeniyle D2α lenf nodu diseksiyonu yapılan yaş ortalaması (median(range)) 58(42-78)yıl olan 39 hasta(9K); kolon kanseri tanısıyla yatırılan ve radikal cerrahi girişim uygulanan yaş ortalaması 57,5(22-76) olan 29 hasta (14K) ve pankreas adeno kanseri tanısıyla yatırılarak whipple prosedürü uygulanan ortalama yaşı 57(54-64)yıl olan 14(5K) hasta değerlendirildi. Ancak yapılan işlemler ve ölçümler sırasında kaliteli DNA-RNA elde edilemeyen mide kanserli 6(1K) ve pankreas kanserli 4(2K) hasta çalışma dışı bırakıldı. Sonuçta çalışmalar, mide kanserli 33(8K), kolon kanserli 29(14K) ve pankreas kanserli 10(3K) hasta olmak üzere toplam 72(25K) hastadan alınan örneklerle yapıldı



Şekil 4-2: PCR ve Real-time PCR . Geleneksel PCR ile elde edilen görünümün, aynı örnekler için real-time PCR'da ki görünüşü, Ct değerleri

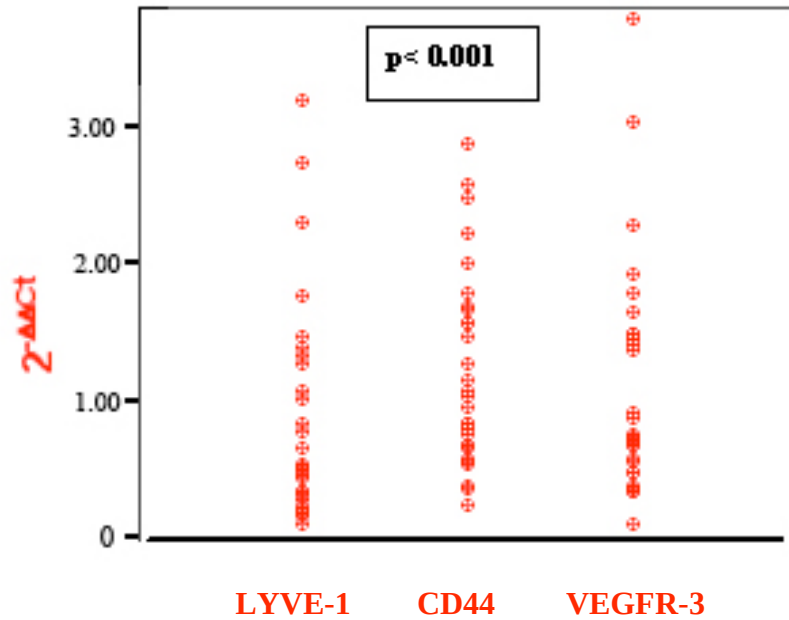
4.2.1 Mide Kanserli Hastalar

Hastalara ait, yaş, cins, tümörün Lauren histolojik tipi, diferansiasyon derecesi, T evresi, stage, lenf nodu tutulumu durumu, pozitif lenf nodlarının sayısı (PLN), çıkarılan total lenf nodlarının sayısı (TLN) ve oran (PLN/TLN), perinöral, nöral ve vasküler invazyon durumu gibi veriler ve dokularda RTQ-PCR sonucunda $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemiyle (243,244) hesaplanan gen ekspresyon düzeyleri SPSS 15.00 for Windows istatistik programı kullanılarak kaydedildi. Kaydedilen bu özelliklere göre LYVE-1, VEGFR-3, CD44 gen ekspresyon düzeyleri Tablo 4-1'de gösterildi.

Tablo 4-1: Mide Kanserli hastaların patolojik özellikleri ve LYVE-1, VEGFR-3 ve CD44 gen ekspresyon düzeyleri

	N	LYVE-1	P	CD44	P	VEGFR-3	P
Lauren Tipi			ns		ns		ns
İntestinal	15	0.76(0.04-2.66)		1.14(0.17-2.80)		1.2(0.02-3.70)	
Diffüz	18	0.81(0.09-3.12)		1.14(0.28-2.51)		0.87(0.26-1.83)	
Diferansiasyon			ns		ns		ns
İyi	14	0.80(0.04-2.66)		1.14(0.17-2.80)		1.23(0.02-3.70)	
Kötü	19	0.78(0.09-3.12)		1.14(0.28-2.51)		0.86(0.26-1.83)	
T Evresi			ns		ns		ns
T2	2	0.54(0.15-0.93)		0.39(0.17-0.60)		0.6	
T3	17	0.69(0.04-2.66)		1.17(0.28-2.80)		0.99(0.02-2.94)	
T4	14	1.0 (0.10-3.12)		1.24(0.47-2.14)		1.0(0.26-3.70)	
Vasküler İnvazyon			ns		ns		ns
Yok	15	0.82(0.15-1.68)		1.80(0.60-2.80)		1.06(0.6-1.57)	
Var	18	0.96(0.1-3.12)		1.07(0.28-2.14)		1.13(0.26-3.70)	
Perinöral İnvazyon			0.02		0.02		ns
Yok	10	0.32(0.10-0.93)		0.57(0.17-0.76)		0.8(0.26-2.21)	
Var	23	1.0 (0.04-3.12)		1.4(0.31-2.80)	ns	1.13(0.02-3.70)	
Nöral İnvazyon			ns				ns
Yok	15	0.78(0.04-3.12)		0.95(0.17-2.8)		0.93(0.02-2.94)	
Var	18	0.84(0.21-2.22)		1.48(0.46-2.51)	ns	1.24(0.4-3.70)	
Lenf Nodu			ns				ns
Negatif	5	0.66(0.15-1.68)		0.74(0.17-1.61)		0.86(0.3-2.21)	
Pozitif	28	0.82(0.04-3.12)		1.22(0.28-2.80)		1.06(0.02-3.70)	
PLN/TLN			0.003		ns		0.05
≤ 0.4	25	0.53(0.04-1.68)		1.06(0.17-2.80)		0.83(0.02-2.21)	
> 0.4	8	2(0.69-3.12)		1.53(0.47-2.4)		1.97(0.28-3.70)	

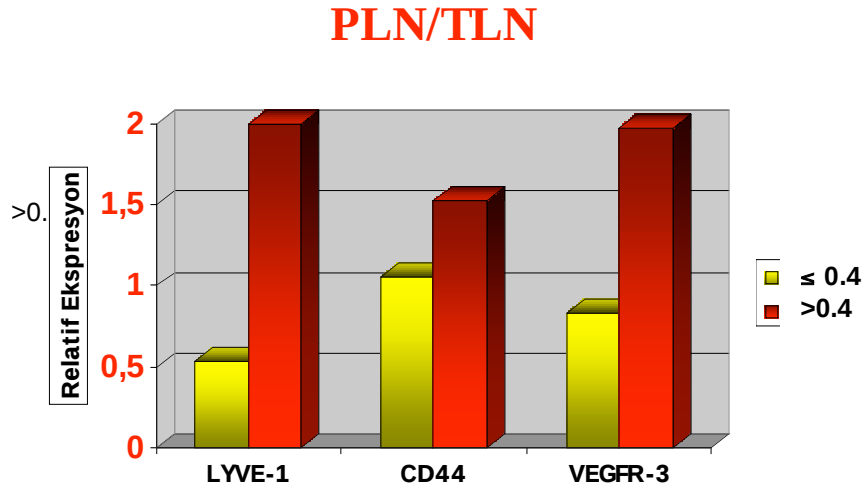
Mide kanserli hastaların tamamında yaş ve cinsten bağımsız olarak her üç genin de ekspresyon düzeylerinin normal dokuda eksprese edildikleri düzeye oranla anlamlı şekilde arttığı saptandı ($p < 0.001$) (Şekil 4-3). Artışlar kendi içlerinde değerlendirildiğinde LYVE1 ve CD44 ekspresyon düzeyleri ve overeksprese edilme durumları arasında doğrusal bir ilişki olduğu görüldü (spearman rank correlation, $p = 0.025$ ve $p = 0.033$).



Şekil 4.3: Mide Kanserli hastalarda normal dokuya oranla LYVE-1, CD44, VEGFR-3 ekspresyon düzeyleri. normal dokuya göre tümörlü dokuda ekspresyon düzeyleri artmıştır ($p < 0,001$).

Hastalar lenf nodu metastazı olanlar [LN(+)] ve lenf nodu metastazı olmayanlar [LN(-)] olarak ayrıldığında her üç genin de ekspresyon düzeylerinin lenf nodu tutulumu olan grupta belirgin şekilde arttığı, ancak artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Bu veriden hareketle pozitif lenf nodlarının (PLN) çıkarılan tüm lenf nodlarına oranına (PLN/TLN) bakıldığında PLN/TLN oranının ≤ 0.20 olduğu hastalarda $PLN/TLN \geq 0.4$

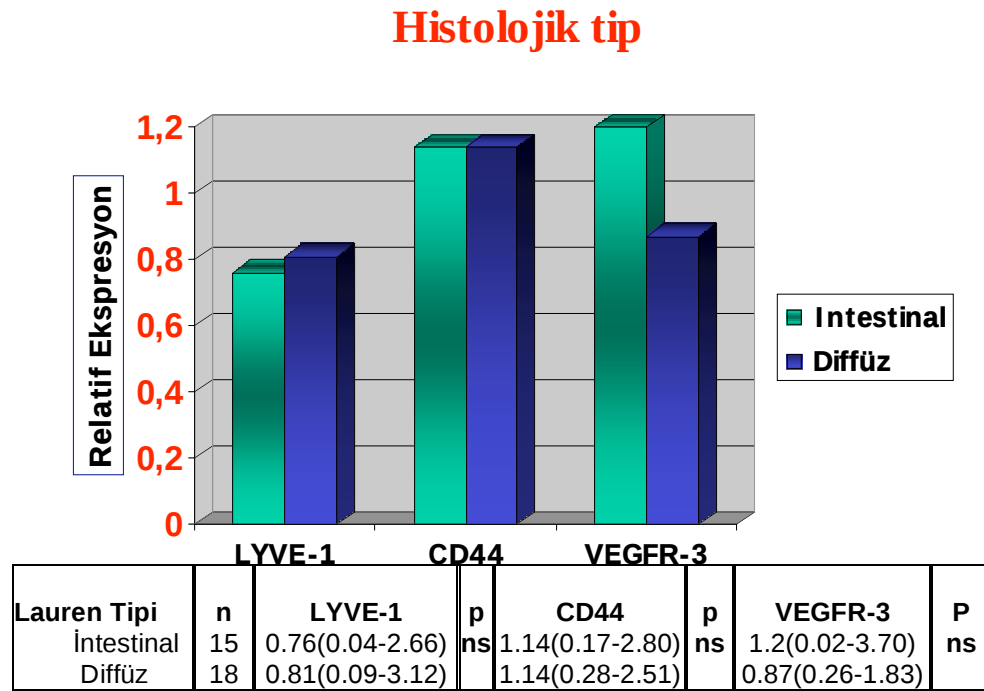
olan hastalara göre oranla LYVE-1, VEGFR-3 ve CD44 gen ekspresyonlarının daha az olduğu ve bununda istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p=0.001$). Yine aynı şekilde hem ekspresyon düzeylerinin hem de overeksprese (aşırı ekspresyon) edilme olasılıklarının, PLN/TLN oranına paralel olarak arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (spearman rank correlation sırasıyla LYVE-1 için $p=0.01$, CD44 için $p=0.036$ ve VEGFR-3 için $p=0.016$). Bu anlamlılık özellikle PLN/TLN oranı ≥ 0.4 olan ve olmayan grupların karşılaştırmasında en belirgindi (Şekil 4-4). PLN/TLN oranı ile tümör volümü ve PLN sayısı arasında da anlamlı korelasyon olduğu saptandı ($p<0.001$). Ayrıca ara istasyonlardan çıkarılan lenf nodlarının gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde primer tümörün eksprese ettiğine paralel bir artış gösterdiği ancak bu artışların anlamlı olmadığı gözlemlendi.



Lenf Nodu	N	LYVE-1	P	CD44	P	VEGFR-3	P
≤ 0.4	25	0.53(0.04-1.68)	0.003	1.06(0.17-2.80)	ns	0.83(0.02-2.21)	0.65
>0.4	8	2(0.69-3.12)		1.53(0.47-2.4)		1.97(0.28-3.70)	

Şekil 4-4: Mide Kanseri hastalarında PLN/TLN oranıyla relatif ekspresyon arasındaki ilişki. PLN/TLN oranı artarken LYVE-1'in ekspresyon düzeyleri de artmaktadır ($p=0.003$).

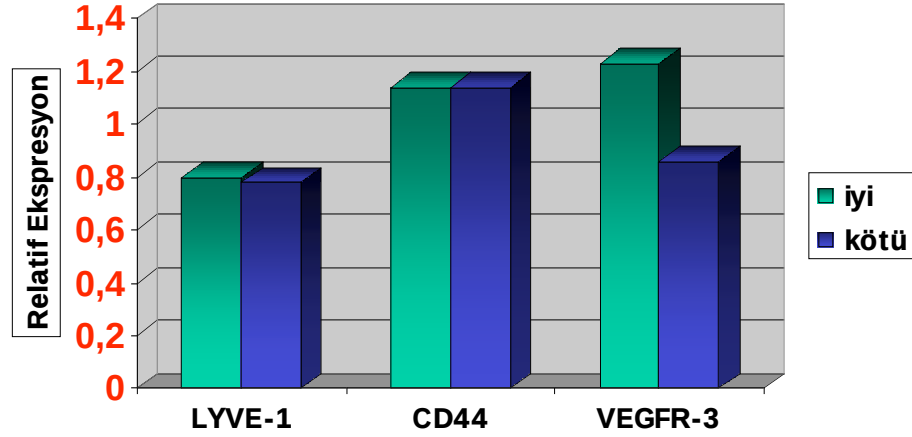
Tümörün Lauren histolojik tipi ile (intestinal veya diffüz) ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiye bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da özellikle LYVE-1 ve CD44 ekspresyonlarının diffüz tipte daha yüksek olduğu saptandı. Histolojik tipte ne genlerin ekspresyon düzeyleri ne de overeksprese edilmeleri arasında bir korelasyon saptanmadı (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: Mide Kanserli hastalarda histolojik tip ile relatif ekspresyon arasındaki ilişki. Tümörün histolojik tipi değiştiğinde genlerin ekspresyon düzeylerinde değişim olmamaktadır.

Tümörün diferansiasyon derecesi ile (iyi veya kötü) her üç geninde ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı (Şekil 4-6).

Diferansiasyon



Diferansiasyon	n	LYVE-1	p	CD44	p	VEGFR-3	p
İyi	14	0.80(0.04-2.66)	ns	1.14(0.17-2.80)	ns	1.23(0.02-3.70)	ns
Kötü	19	0.78(0.09-3.12)		1.14(0.28-2.51)		0.86(0.26-1.83)	

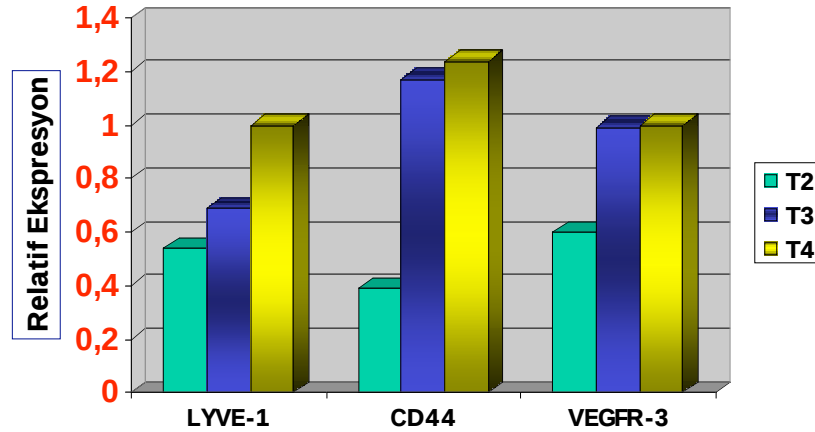
Şekil 4.6: Mide Kanserli hastalarda diferansiasyon ile relatif ekspresyon arasındaki ilişki. Tümörün diferansiyasyonu değiştiğinde gen ekspresyonlarında değişim olmamaktadır.

Tümörün T evresi ile gen ekspresyonları arasındaki ilişkiye bakıldığında ekspresyon düzeylerinin T evresine paralel olarak arttığı, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Her ne kadar erken evredeki hasta sayısı az da olsa T2 ve T4 evresindeki hastaların değerleri karşılaştırıldığında evre arttıkça, ekspresyonlarda da artış olduğu saptandı. Tümörün bu genleri overeksprese etmesi ile T evresi arasında da bir korelasyon olmadığı saptandı (Şekil 4-7).

TNM durumuna göre tümörler evrelendiğinde, LYVE1 ve CD44 düzeylerinin ileri evre hastalarda erken evrelere göre daha yüksek olmasına karşın bu artışların istatistiksel bir anlam taşımadığı saptandı. Öte yandan

evre ile T evresi, lenf nodu metastazı varlığı, pozitif lenf nodu sayısı ve PLN/TLN oranı arasında anlamlı bir korelasyon olduğu görüldü.

T Evresi



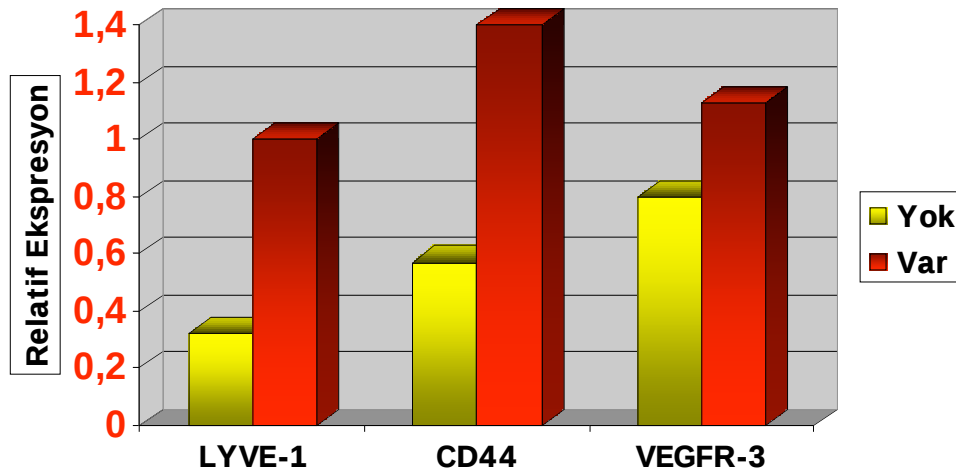
T Evresi	N	LYVE-1	P	CD44	P	VEGFR-3	P
T2	2	0.54(0.15-0.93)	ns	0.39(0.17-0.60)	ns	0.6	ns
T3	17	0.69(0.04-2.66)		1.17(0.28-2.80)		0.99(0.02-2.94)	
T4	14	1.0 (0.10-3.12)		1.24(0.47-2.14)		1.0(0.26-3.70)	

Şekil 4.7: Mide Kanseri hastalarında T evresi ile relatif ekspresyon arasındaki ilişki. Gen ekspresyon düzeyleri ile T evresi arasında korelasyon yoktur.

Nöral invazyon durumuna göre genlerin ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde invazyon varlığında ekspresyon düzeylerinin daha yüksek olduğu ancak bu yüksekliğin istatistiksel bir anlam taşımadığı görüldü. Overekspresyon durumları ile nöral invazyon arasında da bir korelasyon saptanamadı.

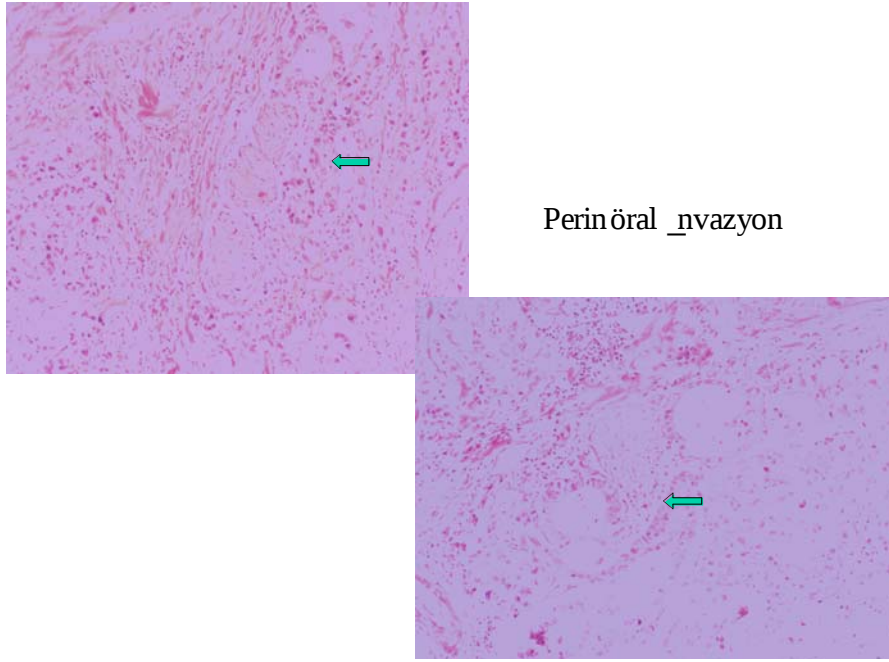
Öte yandan perinöral invazyon varlığı ile LYVE-1, CD44, VEGFR-3 ekspresyon düzeylerinin belirgin bir biçimde arttığı ve bu artışların LYVE1 ve CD44 için istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0.001$). Öte yandan her üç genin de perinöral invazyon varlığında overeksprese edildikleri saptandı. Bu overekspresyon ve perinöral invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olduğu izlendi (Şekil 4-8)

Perinöral _nvazyon



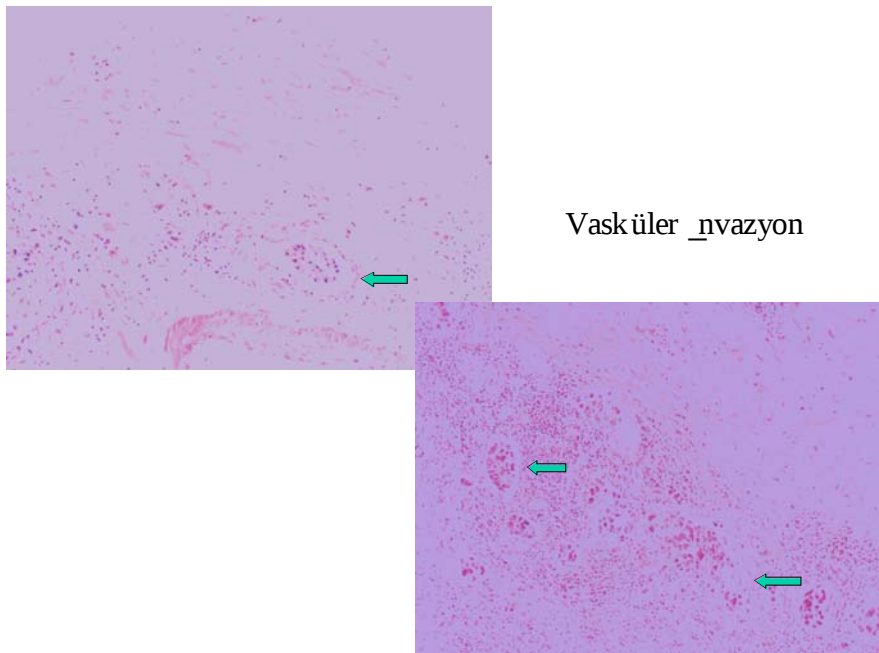
Perinöral İnvazyon	N	LYVE-1	P	CD44	P	VEGFR-3	P
Yok	10	0.32(0.10-0.93)	0.02	0.57(0.17-0.76)	0.02	0.8(0.26-2.21)	ns
Var	23	1.0 (0.04-3.12)		1.40(0.31-2.80)		1.13(0.02-3.70)	

Şekil 4.8 : Mide Kanserli hastalarda perinöral invazyon ile relatif ekspresyon arasındaki ilişki. LYVE-1, CD44 ekspresyonları perinöral invazyon varlığında anlamlı şekilde artmaktadır.



Şekil 4.9: Perinöral invazyon. Sinir çevresinde görülen tümör hücreleri

Vasküler invazyon için bakıldığında genlerin ekspresyon düzeylerinde belirgin artışlar olmakla birlikte bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (Şekil 4.10).

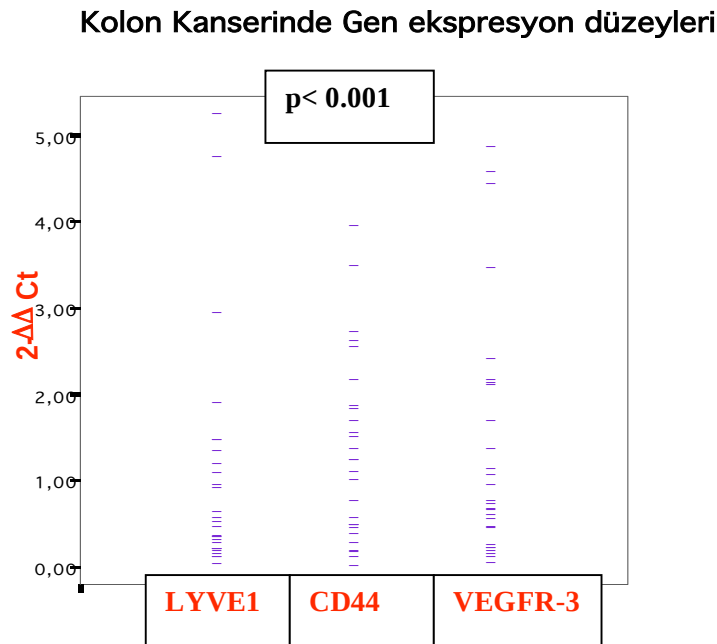


Şekil 4.10: Vasküler invazyon. Damar yapılar içindeki tümör hücreleri.

4.2.2 Kolon Kanserli Hastalar

Kolon kanserli hastalara ait, yaş, cins, tümörün diferansiasyon derecesi, T evresi, Dukes Sınıflaması (Astler Coller Modifikasyonu), lenf nodu tutulumu durumu, pozitif lenf nodlarının sayısı(PLN), çıkarılan lenf nodlarının sayısı(TLN) ve oran(PLN/TLN), perinöral, nöral ve vasküler invazyon durumu gibi veriler ve dokulara yapılan RT-PCR sonucunda $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemiyle (243) hesaplanan gen ekspresyon düzeyleri SPSS 15.00 for Windows istatistik programı kullanılarak kaydedildi. Kaydedilen bu özelliklere göre LYVE-1, VEGFR-3, CD44 gen ekspresyon düzeyleri Şekil 4.11 de gösterildi.

Kolon kanserli hastaların tamamında yaş ve cinsten bağımsız olarak her üç genin de ekspresyon düzeylerinin normal dokuda eksprese edildikleri düzeye oranla anlamlı şekilde arttığı saptandı ($p<0.001$).



KOLON CA	N	LYVE-1	CD44	VEGFR-3
	29	1.017(0.04-5.26)	1.302(0.1-3.97)	1.38(0.05-4.89)

Şekil 4.11 : Kolon kanserli hastalarda tumor dokusunda gen ekspresyon düzeyleri. Tümör dokusunda gen ekspresyon düzeyleri anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$).

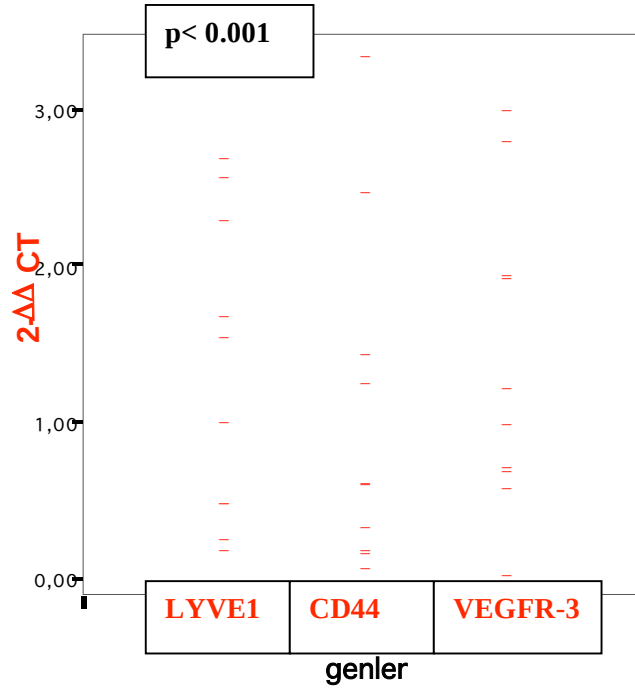
Lenf nodu metastazı olan ve olmayan hastalar karşılaştırıldığında her ne kadar gen ekspresyonlarının arttığı görülse de bu artışlar istatistik olarak anlamlı değildi. Tümörün diferansiasyon derecesi, T evresi, Dukes sınıflaması açısından bakıldığında da ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı. Bu parametrelerle ekspresyon düzeyleri veya over-eksprese edilme durumları arasında da bir korelasyon yoktu. Nöral, perinöral ve vasküler invazyon durumu açısından bakıldığında her üç genin de ekspresyon düzeyleri artmış olarak bulunmasına karşın olan ve olmayan hastalar arasında ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı.

4.2.3 Pankreas Kanserli Hastalar

Pankreas kanserli hastalara ait, yaş, cins, tümörün diferansiasyon derecesi, T evresi, lenf nodu tutulumu, perinöral, nöral ve vasküler invazyon durumu gibi veriler ve dokulara yapılan RT-PCR sonucunda $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemiyle hesaplanan gen ekspresyon düzeyleri SPSS 15.00 for Windows istatistik programı kullanılarak kaydedildi.

Pankreas kanserli hastaların tamamında yaş ve cinsten bağımsız olarak her üç genin de ekspresyon düzeylerinin normal dokuda eksprese edildikleri düzeye oranla anlamlı şekilde arttığı saptandı ($p < 0.001$). Lenf nodu pozitif ve negatif olan hastalardaki gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark yoktu. Ayrıca genlerin overeksprese edilmeleri ile lenf nodu tutulumu arasında bir ilişki saptanamadı. Nöral invazyon olan ve olmayan hastalarda LYVE-1, VEGFR-3 ve CD44 ekspresyon düzeylerine bakıldığında invazyon olan hastalarda her üç genin de ekspresyon düzeylerinin arttığı ancak bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı saptandı. Aynı durum perinöral invazyon için de söz konusuydu.

Pankreas Kanserinde Gen ekspresyon düzeyleri



PANKREAS CA	N	LYVE-1	CD44	VEGFR-3
	10	1.318(0.17-2.70)	1.04(0.06-3.33)	1.38(0.02-2.98)

Şekil 4.12: Pankreas kanserli hastalarda tümör dokusunda gen ekspresyon düzeyleri. Tümör dokusunda gen ekspresyonları anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0,001$).

Vasküler invazyon varlığında her üç genin de ekspresyon düzeyleri belirgin ölçüde artmıştı ancak bu artışlar CD44, VEGFR-3 için anlamlı iken ($p=0.046$ ve $p=0.038$) LYVE-1 de anlamlı bir düzeye ulaşmamıştı. Ayrıca bu artışlarla vasküler invazyon arasında da anlamlı bir korelasyon olduğu görüldü (Spearman's Rank correlation coefficient 0.71, $p=0.02$, ve $p=0.004$).

4.3. İmmunhistokimyasal Analiz

İmmunhistokimyasal değerlendirme teknik nedenlerle mide kanseri olan hastaların sadece 15(3K)'inde yapılabilirdi. Bu değerlendirmede her üç genin de tümörlü dokuda eksprese edildiği saptandı (Şekil 4-13). Tümörün

santralinde ve periferinde LYVE-1 ile boyanan lenfatik damar yoğunluğu (*lymphatic vessel density*) ölçüldüğünde hastaların %13 ünde intratümöral, buna karşın %27'sinde peritümöral boyanma olduğu saptandı. Her ne kadar peritümöral boyanma daha fazla ise de istatistiksel olarak anlamlı değildi Tablo 4-2 (χ^2 test, 2.773, Df=1 p=0.09). Hem tümöral hem de peritümöral boyanma olsun LYVE-1 ile boyanma saptanan hastaların tamamında lenf nodu metastazı pozitif. Öte yandan lenfatik damar yoğunluğu ile lenf nodu metastazı arasında korelasyon saptanamadı (*Spearman rank correlation coefficient*, 0.26, p=0.92).

Tablo 4-2: Primer mide kanserileri içinde LYVE-1 pozitif lenfatik damar varlığı

LYVE-1 pozitif damar	İntraTümöral (%)	Peritümöral (%)
Var	2 (%13)	4(27)
Yok	13	11
Toplam	15(100)	15(100)

Diğer kanserlerin tek başına analiz edilmesi sayısal yetersizlik nedeniyle olanaklı olmadığından her üç kanseri de içine alacak şekilde gastrointestinal kanserlerde LYVE-1 ile boyanan damar durumuna bakıldığında örneklerin çoğunda lenfatik damarların peritümöral olarak yerleştiği, sırasıyla mide kanserinde %27, kolon kanserinde %25 ve pankreas kanserinde %33 peritümöral boyanma saptandı ancak bunun istatistiksel olarak herhangi bir anlam ifade etmediği görüldü (Tablo 4-3).

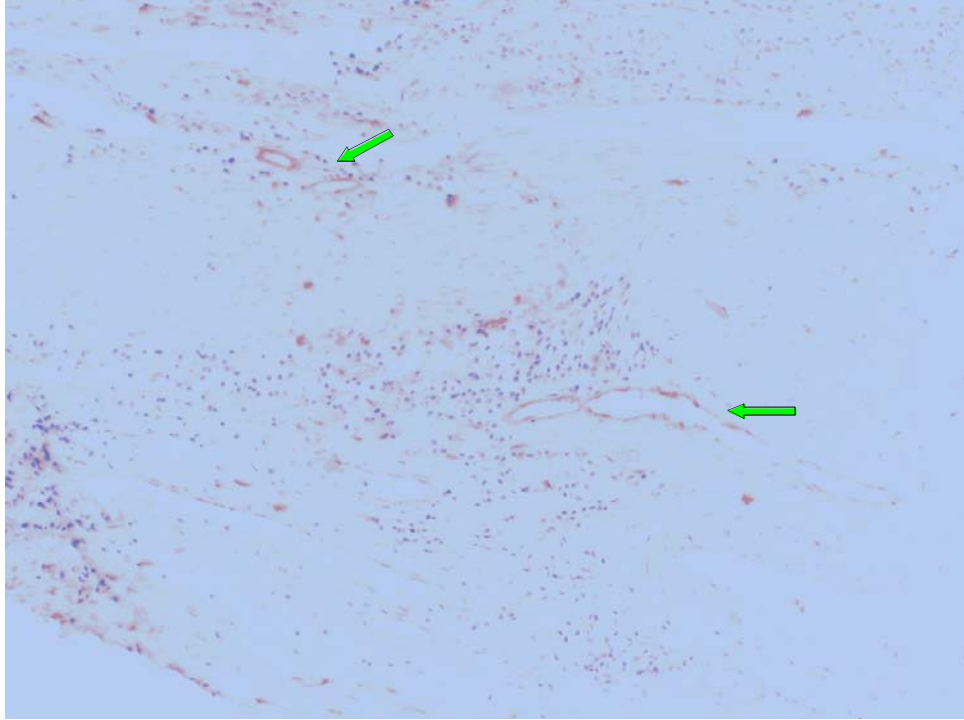
CD44 reseptörünün immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde bütün örneklerde tümör dokusu ve cerrahi sınırdaki CD44 pozitif hücreler net bir şekilde görüldü. Fakat dağılımda ikisi arasında fark vardı, cerrahi sınırdaki CD44+ hücreler diffüz olarak bütün dokuya orantılı bir şekilde dağılmışken, tümör dokusunda bu daha çok fokal odaklar şeklindeydi. Bu fokal odakları oluşturan hücre grubu lenfositlerdi, arada tümör dokusuna yayılmış şekilde makrofaj hücrelerine rastalanmaktaydı.

Tablo 4-3: Gastrointestinal tümörlerde IHC sonuçları

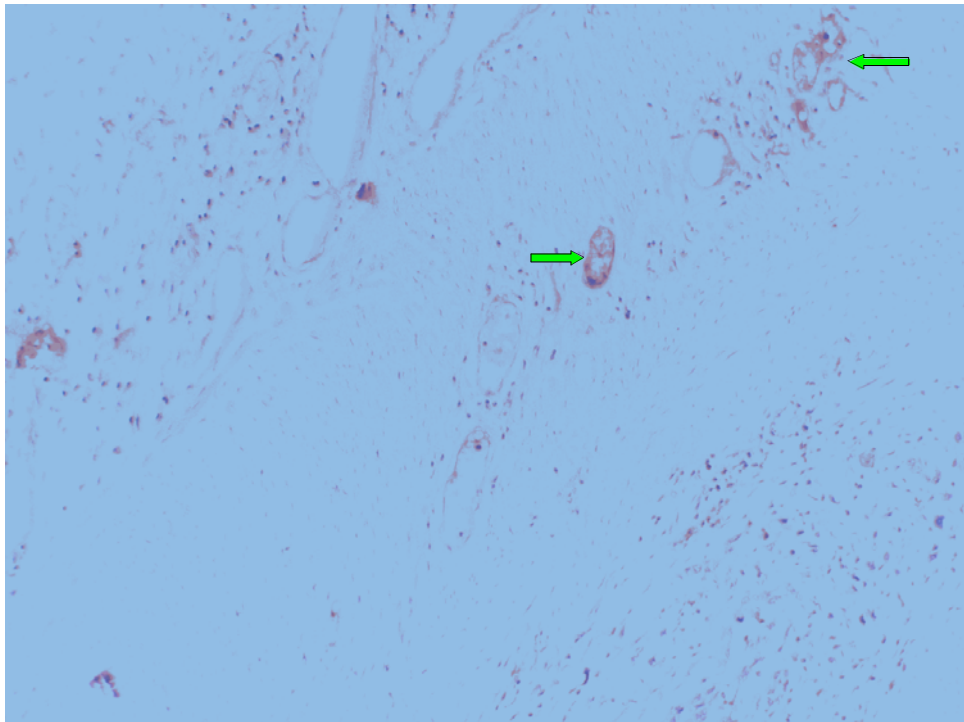
LYVE-1 pozitif damar	İntraTümöral (%)	Peritümöral (%)
Mide Kanseri	15	
Var	2 (%13)	4(27)
Yok	13	11
Kolon Kanseri	8	
Var	0 (0)	2 (25)
Yok	8	6
Pankreas Kanseri	3	
Var	0 (%0)	1(33)
Yok	2	2
Toplam	26(100)	26 (100)

Aynı zamanda tümör hücrelerinin hepsinde olmamakla birlikte, bazılarında CD44 ekspresyonu saptandı. Bu da acaba migrasyona hazırlanan tümör hücrelerinde CD44 reseptörü eksprese olmaya mı başlıyor sorusunu akla getiriyor. Cerrahi sınırdan alınan doku örneklerinde görülen hücre tipi daha çok makrofaj hücreleriydi ve dokuya diffüz bir şekilde yayıldıkları gözlemlendi. Tümör dokusunda ki heterojen dağılım nedeniyle skorlama yapılması mümkün olamadı. Lenfosit hücrelerin fokal odaklarda yoğun bir şekilde bulunması orada immün sistemin devrede olduğunu ve tümör hücrelerini elimine edebilmek için, tümör dokusunun içinde yer yer hala aktivitesini devam ettirdiği görüşünü akla getirmektedir. Bu açıdan bakıldığında tümör dokusunun ne kadar heterojen olduğu bir kez daha görülmüyordu. Dokudan yapılacak, immün sistem aktivitesini değerlendirmeye yönelik çalışmalarda bu göz önünde tutulması gereken önemli konulardan bir tanesi olmalı.

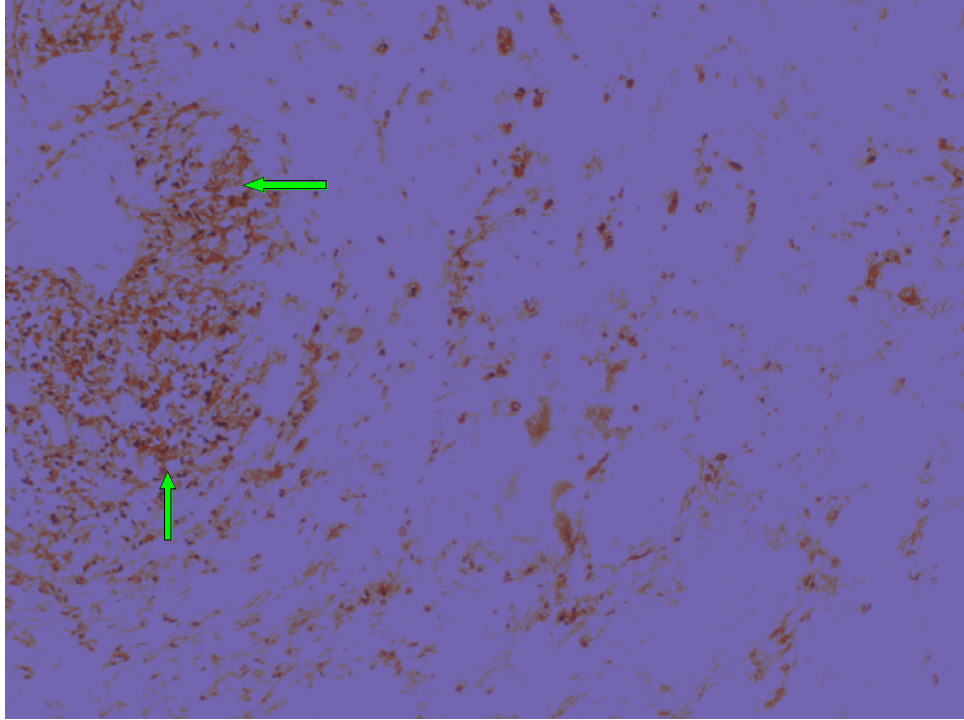
VEGFR-3 ile lenfatik damarlar boyandığında , venöz damarlarında boyandığı görüldü ve ayırım damarların içindeki kan hücrelerinden yapılabiliyordu. Buna bakarak IHC çalışmalarında lenfatik endotel belirteci olarak LYVE-1 antikorunun kullanılması daha uygun görülmektedir. Bu arada LYVE-1 ile boyamada, bazı düzensiz stoplazmalı, yer yer içsi bazı hücrelerle çapraz (cross) reaksiyon verdiği izlendi. Bu nedenle LVD ölçümlerinde hücre değil, lümen sayılarak değerlendirilmesi uygun görüldü.



Şekil 4-13: LYVE-1 pozitif lenfatik damarlar (x100)
Mide tümör dokusu.



Şekil 4-14: VEGFR-3 pozitif lenfatik damarlar (x100)
Mide tümör dokusu.

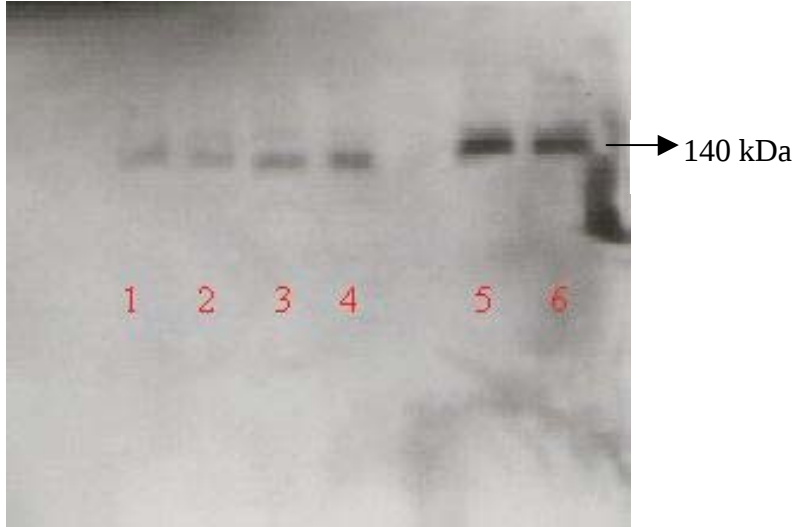


Şekil 4-15: CD44 pozitif lenfoid hücreler ve abortif glandlar(x 100)

Mide tümör dokusunda fofal görünüm veren lenfoid hücreler.

4.4 Western Blot Analizi

Western Blot yöntemi, mide kolon ve pankreas tümörlü hastaların her birinden 5 hasta rastgele olarak seçildi, toplam 15 hasta çalışmaya dahil edildi. Western Blot yapmamızdaki amaç, LYVE-1, VEGFR-3, CD44 genlerinin mRNA varlığı ve ekspresyon düzeyleri hem normal hem tümörlü dokularda gösterildikten sonra bu genlerin, dokuda protein olarak eksprese edilip-edilmediği sorusuna yanıt bulabilmektir. Dokulardan protein izolasyonu yapıldıktan sonrada metot uygulandı. VEGFR-3 rabbit anti-human antikor (Santa Cruz, ABD) 1:1000 sulandırılarak ve HRP-sekonder goat-antirabbit Antikoru (Santa Cruz, ABD) 1:1600 sulandırılarak yapılan deneylerde optimizasyon sağlanarak mide, kolon, pankreas kanseri hastalarının hem tümörlü hemde normal dokularında protein bandları gösterildi. Bu şekilde genin protein olarak da eksprese olduğu gösterilmiş oldu (Şekil 4-16).



Şekil 4-16: VEGFR-3 Western blot sonuçları

- 1 - Pankreas tümör dokusu
- 2 - Pankreas, normal doku
- 3 - Kolon tümör dokusu
- 4 - Kolon, normal doku
- 5 - Mide, tümör dokusu
- 6 - Mide, normal doku

Mide örneklerinde daha yoğun bandlar elde edilirken, en az ekspresyon pankreas dokusunda vardı, kolonda ki ekspresyon düzeyleri ise orta yoğunlukta bandlarla ifade buluyordu.

LYVE-1 rabbit anti-human (Santa Cruz, ABD) ve CD44 mouse anti-human (Santa-Cruz) antikolarıyla yapılan deneylerde, değişik dilüsyonlarda (1:50 ile 1:5000) birçok kez tekrarlanmasına ve kontrol dokusunda da (lenf nodu) çalışılmasına karşın sonuç alınamadı. Bunun üzerine Abcam firmasından yeni antikolar getirildi. Bu antikolarla tekrar çalışmaya başlandı öncelikle kontrol dokusu ile çalışıldı, çeşitli dilüsyonlar kullanılarak tekrarlandı ama bandlar elde edilemedi. Antikoların çalışmadığı düşünülmesine rağmen doku örneklerinde de çalışmalar yapıldı fakat sonuç alınamadı ve bunun üzerine firmayla görüşüldü ve firmaya antikolar iade edildi.

5. TARTIŞMA

Hiyaluronik asit bir ekstrasellüler matriks glikozaminoglikanıdır, yaygın olarak dokularda ve vücut sıvılarında bulunur ve inflamasyonda, lökositlerin ekstrasvazasyonunda, yara iyileşmesinde ve tümör hücrelerinin metastazında etkin rol oynamaktadır (25).

CD44 ayrıntılı olarak tanımlanmış hiyaluronik asit hücre yüzey reseptörlerinden bir tanesidir, epitel ve mezenkim hücreleri ile lenfoid hücrelerin yüzeyinde yüksek oranda eksprese olur ve ayrıca HA homeostazında önemli rol oynar. CD44 ile HA arasındaki yakın ilişki sayesinde epitel yapısı korunabilmekte ve lenfosit ekstrasvazasyonu ile tümör hücrelerinin hematojen yayılımı gerçekleşmektedir.

LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial HA receptor) de bir hiyaluronik asit reseptörüdür ve lenf damarının endotel hücresinde eksprese olur. LYVE-1'nin lenfatik damarların hem iç hem de dış yüzeyinde bulunmasından dolayı lenfositlerin ve diğer benzer hücrelerin lenfatik sisteme geçişinde primer rol oynadığı düşünülmektedir. CD44 sayesinde HA ile etkileşen hücreler, aynı HA' e bağlanan LYVE-1' ler sayesinde lenf akımına karışmakta ve benzer şekilde lenf nodu tarafından da tutulmaktadır. Sadece lenfatik endotele özgü olması sebebiyle LYVE-1, dokularda lenfatik damar varlığını göstermek için bir belirteç olarak kullanılabilir. Diğer bir lenfatik endotel hücre reseptörü olan VEGFR-3'ün ligandı VEGF-C'dir ve lenfanjiyogeneze rol alır. Tümör gelişimi sırasında VEGF-C'nin ekspresyonunun artması, yeni lenf kapillerinin oluşumunu arttırmakta ve bu nedenle de lenf nodu metastazı göstergesi olarak kullanılabileceği kabul edilmektedir. Oysa, lenfatik yollarla tümör metastazı lenfatik damar invazyonu, hücrelerin lenfatik damarlar içine taşınımı, lenf nodu tarafından tutulumu ve burada proliferasyonu gibi birçok basamaktan oluşmaktadır. VEGFR-3 ekspresyon artımı lenfanjiyogenezin bir göstergesi olabilir fakat tek başına lenf nodu metastazını göstermek açısından yetersizdir.

LYVE-1, VEGFR-3 ve CD44 moleküllerinin tanımlanmış olması tümör mikroçevresi ve tümör hücresi-lenfatik endotel hücresi arasındaki ilişkiye yönelik daha fazla bilginin edinilmesine yardımcı olmuştur. Tümör

biyolojisinde elde edilen hızlı gelişmelere rağmen lenfatik invazyon ve lenf nodu metastazının altında yatan moleküler mekanizmalar hala yeterince anlaşılamamıştır.

Çalışmamız, tümör hücrelerinin, lenf nodu metastazlarını göstermede, lenfatiklere özgü bir molekül olan LYVE-1'in belirteç olarak kullanılabilme imkanını araştırmak için planlanmıştır. Böyle bir ilişkinin varlığı, tümör biyolojisine katkıda bulunabileceği gibi tedavinin planlanabilmesinde de yol gösterici olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla lenfatik yayılım yaptığı çok iyi bilinen insan gastrointestinal sistem tümörleri seçilmiştir. Çalışmada kullanılan dokular mide, kolon, pankreas kanseri tanısı ile cerrahi tedavi uygulanan hastalardan ameliyat sırasında alınmıştır.

Normal, tümörlü ve metastatik doku örneklerindeki LYVE-1, CD44 ve VEGFR-3 mRNA düzeylerinin real-time PCR ile relatif kantitatif ölçümleri yapılarak normal dokuya göre değişimleri hesaplanmıştır. Literatürde tümör dokusunda, LYVE-1 ile birlikte CD44 ve VEGFR-3 mRNA düzeylerinin normal dokuya göre değişimini aynı zamanda gösteren bir çalışma bilginiz dahilinde yoktur. Bu çalışma gastrointestinal sistem tümörlerinde hem kantitatif gen ekspresyon düzeyleri, hem immunohistokimyasal analiz ve hem de Western blot tekniğinin bir arada kullanıldığı ilk çalışmadır.

RTQ-PCR ile yaptığımız çalışmada mide, kolon, pankreas kanserlerinde araştırmaya konu olan her üç genin de tümör dokusundaki ekspresyonu, normal dokuya göre anlamlı olarak artmış bulundu.

Mide kanserlerinde LYVE-1, VEGFR-3 ve CD44 düzeyleri lenf nodu metastazı olan hastalarda, lenf nodu metastazı olmayanlara göre artış göstermesine karşın bu bulgu istatistiksel olarak anlam taşımamaktadır. Fakat klinikte prognozu belirlemede önemli faktörlerden olan Pozitif Lenf Nodu Sayısı/Total Lenf Nodu Sayısı (PLN/TLN) oranı ile tümör dokusundaki LYVE-1 düzeyindeki artış karşılaştırıldığında, $PLN/TLN \geq 0,4$ olduğunda tümörlü dokuda LYVE-1'in ekspresyon düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı tespit edildi ($p=0,001$). VEGFR-3 ile arasındaki ilişkiye bakıldığında ise VEGFR-3'ün ekspresyon düzeylerinde ki artış belirgin olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen ama anlamlılık değerine çok

yakın bulundu ($p=0,07$). CD44'de ise PLN/TLN arasında belirgin bir ilişki bulunamadı. Genlerin overeksprese edilme durumları ile PLN/TLN arasındaki ilişkiye bakıldığında, tutulan lenf nodu sayısı arttıkça (özellikle $PLN/TLN \geq 0,4$) LYVE-1, VEGFR-3, CD44 genleri overeksprese olmaktadır ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı idi.

Tümör hücrelerinin lenfatik metastazı bir dizi kompleks aşamadan oluşmaktadır. Tümör hücreleri öncelikle stromal dokuya invaze olur ve burada lenfatik damarlara penetre olduktan sonra lenfatik akımla lenf nodlarına gider ve orada implante olurlar. Bu sırada lenfanjiyogenezin olaya katılması önem kazanmaktadır. Tümör hücrelerinden VEGFC, PDGF, FGF gibi büyüme faktörlerinin sekrete edilmesi VEGFR-3'ün ekspresyonunu artırmakta ve lenfanjiyogenezi başlatarak ardından yeni lenfatik kapillerin oluşumu ile birlikte LYVE-1 sekrete eden hücrelerin sayısında artmaktadır (128). Çalışmamızda da görüldüğü gibi VEGFR-3 ve LYVE-1 ekspresyonlarının artışı lenfanjiyogenezi göstermesi açısından önemlidir çünkü bu durum tümör hücrelerinin lenfatik sisteme daha kolay ulaşılabilirliği anlamına gelir (109). Ölçtüğümüz LYVE-1 ve VEGFR-3 gibi moleküller tümörün davranışı hakkında da bilgi edinmemizi sağlamaktadır çünkü bu moleküllerdeki artış doğrudan lenfatik endotel hücre varlığı ve sayısının arttığına işaret etmektedir.

Lenfatik damarlar sadece tümörün yayılımında değil invazyonunda da rol alır. Lenfatik endotel hücreleri tarafından salınan matriks metalloproteinazları ve ürokinaz plazminojen aktivatör gibi moleküller tümörün çevre dokuda ilerlemesini kolaylaştırarak invazyonu da artırır (13). Ayrıca VEGF-C de, endotel hücrelerini uyarak CCL1 kemokininin sekrete edilmesini uyarır ve bu kemokin tümör hücrelerinden eksprese olan CCR8 ile etkileşime girerek, tümör hücrelerinin lenfatik damarlara doğru hareketlenmesini sağlar (130). Bu etkileşim metastazın önemli basamaklarından biridir. Bu moleküller hem lenfanjiyogeneze oluşan yeni lenfatik kapiller endoteli tarafından hem de, tümör çevresinde önceden beri var olan diğer lenfatik damarların endoteli tarafından da sekrete edilir (24,19). Bu çalışmada ölçülen LYVE-1 ve VEGFR-3 gibi lenfatik belirteçlere ek olarak kullanılan klinikopatolojik (lenfatik

tutulmuş, perinöral-vasküler invazyon gibi) parametreler tümör-invazyon-metastaz oluşum sürecindeki olayları daha net aydınlatabilmek için kullanılmıştır. Gerçekten de bu çalışmada elde edilen veriler bu ilişkiyi gösterir niteliktedir. Mide kanserlerinde ister nöral ister perinöral olsun invazyon varlığında LYVE-1, VEGFR-3 ve CD44 genlerinin, vasküler invazyon varlığında ise VEGFR-3 ve LYVE-1 ekspresyon ve overekspresyon düzeylerinin farkedilir şekilde artışı bu bulguları desteklemektedir. Ancak, bu artışların (özellikle LYVE1 ve CD44) sadece perinöral invazyon varlığında istatistiksel olarak anlamlı bir düzeye ulaşması çalışmada kullanılan örneklem büyüklüğü, gruplar arası heterojenite ve tümörün hastadan hastaya değişebilen davranış farklılıkları ile açıklanabilir.

Tümör hücrelerinden de eksprese edilen CD44 reseptörü HA ile birleşmekte ve hiyalüronik asitin degradasyon için lenfatiklere geçişi sırasında tümör hücrelerinin de lenfatik akıma karışmasına aracılık etmektedir (82). Ayrıca, tümör hücrelerinin aşırı miktarda CD44 eksprese etmesi immün sistem tarafından lenfosit gibi algılanmasına ve immün kaçışın (immun escape) gerçekleşmesine yardımcı olabildiği düşünülmektedir (104). Bu çalışmamızda gösterdiğimiz gibi tüm gastrointestinal tümörlerde normal dokudan daha yüksek oranlarda ekspre edilen CD44 mRNA düzeyleri bu biyolojik sürecin önemli bir göstergesi olabilir.

İnceleyebildiğimiz kadarıyla, literatürde LYVE-1 mRNA düzeylerinin, mide kanserlerindeki değişimini gösteren bir araştırmaya rastlayamadık. Pankreas kanserlerinde ise endokrin tümörlerle ilgili yayın bulunmasına karşın, pankreas adeno kanserlerinde de yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Mide kanserlerinde 2001 yılında VEGFR-3 ile yapılan çalışmada semikantitatif olarak Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) ve IHC ile değerlendirildiğinde VEGFR-3 ekspresyonunun lenf nodu tutulumu varlığında arttığı gösterilmiş (110) ve 2004'deki bir diğer çalışmada ise yine RT-PCR ile tümör dokusunda artış olduğu saptanmıştır(111). Tez planlandıktan sonra yayınlanan çalışmalarda VEGFR-3 mRNA (RTQ-PCR ile) düzeylerindeki artış ve metastaz arasında ilişki bulunmuştur (112,107).

İmmünohistokimyasal boyamalar ile yapılmış bir diğer çalışmada ise VEGFR-3 ekspresyonundaki artış kötü prognoz göstergesi olarak kabul edilirken (113), diğer bir çalışmada erken mide kanserlerinde anlam taşımadığı öte yandan ileri evre mide kanseri vakalarında ise prognostik faktör olduğu belirtilmiştir(114)

Bu çalışmada, mide kanserli hastalarda her üç genin de tümörlü dokuda artan ekspresyon düzeyleri ile kötü prognostik faktör olarak bilinen durumlar arasındaki ilişkilere de bakıldı. Lauren histolojik sınıflamasına göre tümörün intestinal veya diffüz olması, LYVE-1, VEGFR-3, CD44 genlerinin ekspresyonlarındaki artışı değiştirmiyordu. Tümörün iyi veya kötü diferansiye olması ile ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiye bakıldığında da anlamlı bir ilişki saptanamadı. T evresi (T2-T4) ve TNM'ye göre Evre (II-IV) arttıkça, buna paralel olarak LYVE-1, VEGFR-3 ve CD44 ekspresyon düzeyleri de doğrusal bir artış göstermekteydi ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildi.

İnsan mide kanserinde, CD44 gen ekspresyon düzeyinin kantitatif olarak ölçüldüğü bir tek çalışma 2007 yılında yayınlanmıştır(100). CD44'ün pankreas kanseriyle olan ilişkisini göstermek amacıyla yakın zamanda yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır ve daha öncesindekiler immünohistokimyasal çalışmalarıdır ve kötü prognozla CD44 varlığı arasındaki korelasyona işaret etmektedir (101,102,103). Metastazın gerçekleşmesinde, tümör hücreleri ile ekstraselüler matriks ve tümör hücreleri ile endotel hücreleri arasındaki etkileşim çok önemlidir. CD44'de burada rol alan önemli moleküllerden bir tanesidir.

Metastatik lenf nodlarında her üç genin ekspresyon düzeylerine de bakıldı ve özellikle LYVE-1'de daha belirgin olmak üzere VEGFR-3 ve CD44 ekspresyon düzeylerinin tümör dokusundaki ekspresyon düzeylerindeki artışlara paralellik gösterdiği saptandı. Gen ekspresyonlarının birbiri ile olan ilişkilerine bakıldığında ise tümörlü dokuda LYVE-1 artışına paralel olarak CD44 düzeylerinde de anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır

Kolon kanserlerinde benzer parametrelerle incelendiğinde normal dokuya göre tümörlü dokuda ekspresyon düzeylerinin arttığı saptanmıştır.

Kötü prognoz göstergeleri olan lenf nodu tutulumu, PLN/TLN, histoloji, diferansiasyon, T evresi, stage, nöral, perinöral invazyon ve vasküler invazyon kriterleri ile ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, ekspresyon düzeylerinin artma eğiliminde olduğu fakat bunun istatistiksel olarak(bazen anlamlılık değerlerine çok yaklaşmasına rağmen) anlamlı olmadığı görülmüştür. Bu bulgular hastalar alt gruplara bölündüğünde, bu gruplardaki hasta sayılarının az ve dağılımın heterojen olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Daha büyük örneklem grubu seçilerek yapılacak çalışmalar bu sorunu giderebilir.

Kolon kanserlerine mide kanserlerine kıyasla daha erken evrelerde tanı konulmakta, lenf nodu pozitif olan ve olmayan hastalar grup içinde homojen bir dağılım göstermemektedir. Aynı nedenle metastatik lenf nodundan örnek alarak ekspresyon düzeyine baktığımız hasta sayısı azdır ve bu durum metastatik lenf nodundaki ekspresyon düzeyleri hakkında yorum yapabilmemize olanak vermemektedir.

Kolon kanserinde VEGFR-3 mRNA ekspresyon düzeylerine bakılan bir çalışmada lenf nodu metastazı ile VEGFR-3 arasında açık bir ilişki kurulamadığı belirtilmiştir (115). Başka bir çalışmada ise ekspresyonun tümörlü dokularda belirgin biçimde arttığı görülmüştür(105) İmmünohistokimyasal olarak değerlendirilen çalışmalarda ise bulgular oldukça çelişkilidir. Bir çalışmada VEGFR-3'ün bağımsız prognostik faktör olmadığı söylenirken (116) diğer bir çalışmada ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (117). Pankreas kanserlerinde ise normal dokuya göre ekspresyon düzeylerinde artış olduğu belirtilmektedir(118)

Çalışmamızda, pankreas kanserlerinde de tümör dokusunda ekspresyon düzeyleri artmasına rağmen, küçük bir örneklem grubunda çalışılması nedeniyle korelasyon çalışmaları yapılamamıştır. Ayrıca pankreas kanseri vakalarının bir çoğuna ileri evre veya metastaz aşamasında tanı konulması bu hastalardan normal doku örneği alınmasına imkan vermemiştir, palyatif cerrahi tedavi uygulandığından sadece tümörlü dokudan veya metastaz bölgesinden doku alınabilmektedir. Elimizde

kıyaslanacak normal-tümörlü doku olmadığı için de bu hastalar çalışmadan çıkarılmıştır. Hasta sayısını artırma olanağı olabilseydi, LYVE-1, VEGFR-3, CD44 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimin pankreas kanserleri için ne anlama geldiği konusunda yorum yapmak daha kolay olabilirdi kanısındayız.

İmmünohistokimyasal olarak yaptığımız çalışmada amacımız LYVE-1 ve VEGFR-3 antikorları kullanılarak lenfatik damar yoğunluğu hakkında bilgi edinebilmektir ancak çalışmaya başladıktan sonra elimizdeki hasta sayısı ile bu parametreyi değerlendirmenin çok güç olduğunu gördük. Genel görünüm itibarıyla tümör dokusunda ve cerrahi sınırdaki lenfatik damarlar net bir şekilde sayılabiliyordu. Çalışmaya alınan mide kanseri hastalarında, tümör dokusunda lenfatik damarların görüldüğü vaka sayısı %40'dı. Bu lenfatiklerin %27'si peritümöral alanda ve % 13'ü intratümöral bölgede yer alıyordu. Fakat hasta sayısının az olmasından dolayı LVD ile lenf nodu metastazı arasında korelasyon saptanamadı. Kolon ve pankreas kanserleri sayıları yetersiz olduğundan tek başına analiz edilemedi. Gastroenterolojik kaynaklı kanserler olarak hepsi beraber ele alındığında ise peritümöral boyanma %26,9, intratümöral lenfatikler ise %7,7 olarak bulundu fakat bu grupta da lenf nodu metastazı ile aralarında herhangi bir ilişki yoktu. Literatürde de peritümöral ya da intratümöral lenfatiklerin hangisinin fonksiyonel olduğu ve değerlendirilmenin hangisi göz önünde tutularak yapılması gerektiği ile ilgili tartışmalar hala devam etmektedir (28,126). Örneklem grubumuz küçük olmasına rağmen, intratümöral lenfatiklerin küçük, daralmış veya kapanmış bir lümene sahip olmaları, peritümöral lenfatiklerin ise daha geniş lümenlerinin olması peritümöral lenfatiklerin daha fonksiyonel olduğunu ve metastazın gerçekleşmesinde daha etkin rol aldığını düşündürmektedir. Bu bulgular hayvan deneylerinden elde edilen tümör dokusundaki interstisiyel basıncın lenfatiklerin fonksiyonunu engellediği (109) ve fonksiyonel peritümöral lenfatiklerle metastazın gerçekleştiği bulgularını destekler niteliktedir (125,27). Ayrıca normal doku incelendiğinde lenfatik damarların daha çok submukozal bölgede bulunması ve muskularis propriaya doğru uzanması nedeniyle, tümörün bu anatomik bölgeye ulaşması durumunda lenfatik damarlara daha kolay ulaşarak metastaz kabiliyetinin artabileceği

düşünülmektedir. Gerçekten de tümör bu evreye ulaşır geçtiğinde lenfatik metastaz şansı daha yüksektir(109).

Ancak tümörün bu süreçte hangi lenfatikleri kullandığı da önem taşımaktadır. Acaba tümör dokusu santralinde lenfanjiyogenezle oluşan yeni lenfatik kapillerleri mi yoksa peritümöral alanda önceden var olan lenfatik damarları mı kullanarak metastaz yapar? sorusunun yanıtı henüz bir açıklık kazanmamıştır(125). Bu sorunun yanıtı için her üç tümör grubunda da elde ettiğimiz veriler, peritümöral lenfatiklerin bu olayda önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Ancak bugün için peritümöral/tümöral lenfatik yoğunluk, klinikopatolojik özellikler arası ilişkiler ve prognoz üzerine olan etkileri ile ilgili kesin yorumlar yapabilmek mümkün görünmemektedir.

Bu çalışmada gastrointestinal sistem tümörlerinde LYVE-1 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama tekniğinin, VEGFR-3'e göre daha duyarlı ve özgül olduğu söylenebilir. Bu görüş diğer çalışma gruplarının görüşleri de örtüşmektedir (33). VEGFR-3 antikorları lenfatik damarları boyadığı kadar yer yer venöz damarları da boyamakta, venöz- lenfatik ayrımı yapabilmek için kan hücrelerinin varlığı dikkate alınmak zorunda kalınmaktadır. Tek başına immünohistokimya tekniği bunu desteklemeye yetmese de VEGFR-3'ün lenfatik damar belirteci olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

CD44 reseptörünün immünohistokimyasal olarak boyandığı bütün örneklerde tümör dokusu ve cerrahi sınırdaki, CD44 pozitif (CD44+) hücreler net bir şekilde görülmüştür. Ancak reseptörün dağılımında iki bölge arasında farklılık saptanmıştır. Cerrahi sınırdaki CD44+ hücreler diffüz olarak bütün dokuya orantılı bir şekilde dağılmışken, tümör dokusunda bu hücreler daha çok fokal alanlar şeklinde yerleşim göstermiştir. Bu fokal alanları oluşturan hücre grubunun lenfositler olduğu ancak, arada tümör dokusuna yayılmış şekilde makrofaj hücrelerinin de bulunduğu dikkat çekmiştir. Aynı zamanda tümör hücrelerinin hepsinde olmamakla birlikte, bazılarında CD44 ekspresyonu da saptanmış olup bu bulgularımız literatür bilgilerini destekler niteliktedir (89). Tümör hücrelerinde CD44 eksprese edilmeye başlanması hücreyi göçe hazırlayan unsurlardan bir tanesi olabilir.

Cerrahi sınırdan alınan dokularda ise CD44+ makrofaj hücreleri hakim olduğu ve dokuya diffüz bir şekilde yayılmış oldukları görülmüştür. Öte yandan, tümör dokusundaki heterojen dağılım nedeniyle skorlama yapılması mümkün olamamıştır. Lenfositlerin fokal alanlarda yoğun bir şekilde bulunması orada immün sistemin devrede olduğunu ve tümör hücrelerini elimine edebilmek için, tümör dokusunun içinde yer yer aktivitesini devam ettirdiğini düşündürmektedir. Bu açıdan bakıldığında tümörün ne kadar heterojen olduğu bir kez daha anlaşılmaktadır. Bu bulgu özellikle immün sistem aktivitesini değerlendirmeye yönelik dokudan yapılacak çalışmalarda göz önünde tutulması gereken konulardan bir tanesidir.

İmmünohistokimyasal çalışmalarda, 3-4 µ olarak alınan doku kesitlerinden çalışıyor olmamız, tümör dokusunun heterojenitesini düşünecek olursak-, tümörün çok küçük bir kısmını değerlendirmemize olanak sağlamakta dokunun bütünü hakkında ancak öngöründe bulunabilmemize izin vermektedir. Seri halinde doku örneklerinde çalışılması ise hem maliyeti hem de harcanan zamanı çok artırmaktadır. Bu işlem araştırma kapsamında yapılabilir ama rutinde uygulanması çok zor görünmektedir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda, bu tekniği uygulayan kişinin eğitimi ve becerisi de çok önemlidir. Bu nedenle alınan kesit bölgesine ve uygulayan kişiye göre sonuçlar değişebilmektedir.

Western blot ile VEGFR-3 proteinin varlığı hem normal hem de tümörlü dokularda mide, kolon, pankreas kanserlerinde gösterildi. Bu sonuçlar literatürde bulunan çalışmalarla uyumluydu (110). Mide ve pankreas kanserlerinde tümör dokusunda biraz daha koyu (dens) bandlar elde edilirken, kolon kanserlerinde hemen hemen eşit yoğunlukta bandlar görülmüştür.

Literatürde çalışmamıza konu olan genlerle ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bir çalışmada kolorektal kanserler kullanılmış ve birkaç tane lenfatik belirtecin ekspresyon düzeylerine bakılmış ve LYVE-1'in ölçülebilen değerlerin altında olduğu, VEGFR-3'ün ekspresyon düzeylerinin ise arttığı belirtilmiştir (105). Daha sonra yapılan bir çalışmada ise kolon kanserlerinde tümörlü dokuda LYVE-1'in IHC ile artmış olarak bulunmasına

karşın, kantitatif gen ekspresyon düzeyi ölçüldüğünde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanamamıştır (106). Yuanming ve arkadaşlarının 2007 yılındaki çalışmasında gastroenterik tümörler de LYVE-1 ile VEGFR-3 ekspresyon düzeyleri ile lenfatik metastaz ve tümör progresyonu arasındaki ilişkiye bakılmıştır (107). LYVE-1 için daha fazla araştırmaya gereksinim olduğu belirtilirken, lenf nodu metastazı varlığında VEGFR-3 düzeylerinin arttığı saptanmıştır. İmmünohistokimyasal olarak LYVE-1 antikoru kullanılarak yapılan boyamalarda, lenf nodu tutulumu ile LVD'nin artışı arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (107). Ancak, çalışmamızda immünohistokimyasal olarak bu durumu gösteremedik ve kantitatif yöntemle LYVE-1 ekspresyon düzeylerinin lenf nodu tutulumu varlığında özellikle tutulan lenf nodu sayısına paralel bir artış gösterdiğini saptadık. O nedenle onların bu bulgusu bizim kantitatif ölçümlerle elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir. Aynı grubun kolorektal kanserlerde yaptığı çalışmada da LYVE-1 ile lenf nodu pozitifliği arasında bir ilişki gösterilememiştir (108). Aynı yıl bir başka grubun LYVE-1 kullanarak yaptığı immünohistokimyasal çalışmada kolorektal kanserlerde LVD bakılmış ve klinikopatolojik veriler arasında ilişki saptanamamış (109) ve bulgularımız, bu grubun sonuçlarını destekler doğrultudadır.

Kolon kanserinde real-time PCR ile, CD44 geni mRNA düzeyinin ölçüldüğü çalışma sayısı azdır. Çalışmalar ya hücre kültürlerinden ya da hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlara dayanmaktadır (91-94). Real-time PCR kullanılarak insan kolon kanserlerinde yapılan araştırmalarda, kanserli dokuda CD44 ekspresyon düzeyinin, prognozla olan ilişkisi ise tartışmalıdır (95,96,97). Mide kanserlerinde CD44'ün kantitatif çalışıldığı sadece birkaç immünohistokimyasal araştırma vardır (98,99).

Sonuç olarak, gastrointestinal sistem kanserlerinde LYVE-1, CD44 ve VEGFR-3 gen ekspresyonlarının normal dokudaki düzeylerine oranla anlamlı ölçüde arttığı saptandı. Histolojik tip, diferansiasyon ve evre gibi klinikopatolojik kriterler ile gen ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki yokken özellikle mide kanserli hastalarda PLN/TLN oranı ve *perinöral* invazyonla bu artışların ilişkili olduğu görüldü. Mide kanserinde LYVE1 ve

CD44 overekspresyonları ile perinöral invazyon ve lenfatik tutulum arasında; pankreas kanserlerinde ise CD44 ve VGFR3 ile vasküler invazyon arasında anlamlı bir ilişki saptandı. Bu bulgular, bu genlerin gastrointestinal tümörlerde lenfanjiyogenez, invazyon ve lenf nodu metastazı oluşumunda önemli rol oynadıklarını kuvvetle düşündürmektedir.

Bugün için peritümöral/tümöral lenfatik yoğunluk ve klinikopatolojik özellikler arası ilişkiler ve prognoz üzerine olan etkileri ile ilgili kesin yorumlar yapabilmek mümkün görünmemektedir. Ancak, LYVE-1 güvenilir bir lenfatik damar belirteçidir ve immunhistokimyasal olarak kullanıldığında tümöral ve peritümöral lenfatik damar yoğunluğu saptanabilir. Bu bulguların biyolojik önemi ve tedavide kullanılabilirliğini saptamaya yönelik yeni çalışmalara gereksinim vardır.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

- RTQ-PCR ile yaptığımız çalışmada mide, kolon, pankreas kanserlerinde araştırmaya konu olan her üç genin de tümör dokusundaki ekspresyonu, normal dokuya göre anlamlı olarak artmış bulundu.
- Mide kanserlerinde LYVE-1, VEGFR-3 ve CD44 düzeyleri lenf nodu metastazı olan hastalarda, lenf nodu metastazı olmayanlara göre artış göstermesine karşın bu bulgu istatistiksel olarak anlam taşımamaktadır .
- Mide kanserlerinde Pozitif Lenf Nodu Sayısı/Total Lenf Nodu Sayısı (PLN/TLN) oranı ile tümör dokusundaki LYVE-1 düzeyindeki artış karşılaştırıldığında, $PLN/TLN \geq 0.4$ olduğunda tümörlü dokuda LYVE-1'in ekspresyon düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı tespit edildi ($p=0.001$).
- Mide kanserlerinde PLN/TLN ile VEGFR-3 arasındaki ilişkiye bakıldığında ise VEGFR-3'ün ekspresyon düzeylerindeki artış belirgin olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.07$)
- Mide kanserlerinde CD44'de ise PLN/TLN arasında belirgin bir ilişki bulunamadı.
- Mide kanserlerinde genlerin overeksprese edilme durumları ile PLN/TLN arasındaki ilişkiye bakıldığında, tutulan lenf nodu sayısı arttıkça (özellikle $PLN/TLN \geq 0.4$) LYVE-1, VEGFR-3, CD44 genleri overeksprese olmaktaydı ve bu durum istatistiksel olarak anlamlıydı.
- Mide kanserlerinde nöral ve perinöral invazyon varlığında LYVE-1, VGFR3 ve CD44 genlerinin, vasküler invazyon varlığında ise VEGFR-3 ve LYVE-1 ekspresyon ve overekspresyon düzeylerinin farkedilir şekilde arttığı saptandı.
- LYVE1 ve CD44'ün ekspresyon düzeyleri ile perinöral invazyon arasındaki ilişki istatistiksel olarak da anlamlıydı.
- Mide kanserlerinde, Lauren histolojik sınıflamasına göre tümörün intestinal veya diffüz olması, ya da iyi veya kötü diferansiye olması LYVE-1, VEGFR-3, CD44 genlerinin ekspresyonlarındaki artışı değiştirmemektedir.
- Mide kanserlerinde, T evresi(T2-T4) ve TNM'ye göre Evre(II-IV) arttıkça, buna paralel olarak LYVE-1, VEGFR-3 ve CD44 ekspresyon

düzeyleri de doğrusal bir artış göstermektedir ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

- Mide kanserlerinde, metastatik lenf nodlarında her üç genin ekspresyon düzeylerine de bakıldı ve özellikle LYVE-1'de daha belirgin olmak üzere VEGFR-3 ve CD44 ekspresyon düzeylerinin tümör dokusundaki ekspresyon düzeylerindeki artışlara paralellik gösterdiği saptandı.
- Mide kanserlerinde, gen ekspresyonlarının birbiri ile olan ilişkilerine bakıldığında ise tümörlü dokuda LYVE-1 artışına paralel olarak CD44 düzeylerinde de anlamlı bir artış olduğu saptandı.
- Kolon kanserleri de benzer parametrelerle incelendiğinde normal dokuya göre tümörlü dokuda ekspresyon düzeylerinin arttığı saptanmıştır.
- Kolon kanserlerinde, kötü prognoz göstergeleri olan lenf nodu tutulumu, PLN/TLN, histoloji, diferansiasyon, T evresi, stage, nöral, perinöral invazyon ve vasküler invazyon kriterleri ile ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, ekspresyon düzeylerinin artma eğiliminde olduğu fakat bunun istatistiksel olarak (bazen anlamlılık değerlerine çok yaklaşmasına rağmen) anlamlı olmadığı görülmüştür.
- Pankreas kanserlerinde de tümör dokusunda ekspresyon düzeyleri artmasına rağmen, küçük bir örneklem grubunda çalışılması nedeniyle korelasyon çalışmaları yapılamamıştır.
- Pankreas kanseri vakalarının bir çoğuna ileri evre veya metastaz aşamasında tanı konulması bu hastalardan normal doku örneği alınmasına imkan vermemiş, palyatif cerrahi tedavi uygulandığında sadece tümörlü dokudan veya metastaz bölgesinden doku alınabilmiş, bu nedenlerle de örneklem grubu küçük kalmıştır.
- Gen ekspresyon düzeylerinin ölçümünde RTQ-PCR güvenilir bir yöntemdir.
- Çalışmaya alınan mide kanseri hastalarında, tümör dokusunda lenfatik damarların görüldüğü vaka sayısı %40'tır ve bu lenfatiklerin %27'si peritümöral alanda ve % 13'ü intratümöral bölgede yerleşmiştir.
- Mide kanserlerinde, hasta sayısının az olmasından dolayı LVD ile lenf nodu metastazı arasında korelasyon saptanamamıştır.

- Kolon ve pankreas kanserleri sayıları yetersiz olduğundan tek başına immünohistokimyasal olarak analiz edilemedi. Gastroenterolojik kaynaklı kanserler olarak hepsi birlikte ele alındığında ise peritümöral boyanma %26,9, intratümöral lenfatikler ise %7,7 olarak bulundu. Ancak, bu grupta da lenf nodu metastazı ile LVD aralsında herhangi bir ilişki yoktu.
- İmmünohistokimyasal olarak lenfatik damarların tanımlanmasında LYVE-1 iyi bir belirteçtir ve lenfatik endotelini spesifik olarak boyar. Buna karşın VEGFR-3 antikoru ile analiz yapılırken yer yer venöz damarları da boyadığından dikkat edilmelidir.
- İmmünohistokimyasal yöntemin uygulanması sırasında, Bond-Max cihazının kullanılması boyama sorunlarını büyük ölçüde ortadan kaldırarak sonuç alınmasını kolaylaştırmaktadır.
- LYVE-1 antikoru ile yapılan boyamalarda, fibroblast olduğu düşünülen içsi, poligonal hücelerle de çapraz reaksiyon verdiği anumsanmalı ve bu nedenle LVD ölçülürken mutlaka hücrelerin oluşturduğu lümen formu sayılmalıdır.
- Örneklem grubumuz küçük olmasına rağmen, intratümöral lenfatiklerin küçük, daralmış veya kapanmış bir lümene sahip olmaları, peritümöral lenfatiklerin ise daha geniş lümenlerinin olması peritümöral lenfatiklerin daha fonksiyonel olduğunu ve metastazın gerçekleşmesinde daha etkin rol aldığını düşündürmektedir.
- Patoloji preperatlarında normal doku incelendiğinde lenfatik damarların daha çok submukozal bölgede bulunması ve muskularis propriaya doğru uzanması nedeniyle, tümörün bu anatomik bölgeye ulaşması durumunda lenfatik damarlara daha kolay ulaşarak, metastaz kabiliyetinin artabileceği düşünülmektedir.
- CD44 antikoru kullanılarak yapılan IHC'da cerrahi sınırda CD44+ hücreler diffüz olarak bütün dokuya orantılı bir şekilde dağılmışken, tümör dokusunda bu hücreler daha çok fokal alanlar şeklinde yerleşim göstermiştir.
- CD44 ile boyamalarda fokal alanları oluşturan hücre grubunun lenfositler olduğu ancak, arada tümör dokusuna yayılmış şekilde makrofaj hücrelerinin de bulunduğu dikkat çekmiştir.

- IHC boyamalarında, tümör hücrelerinin bazılarında CD44 ekspresyonu da saptanmıştır.
- CD44 ile boyamalarda tümör dokusundaki heterojen dağılım nedeniyle skorlama yapılması mümkün olamamıştır.
- VEGFR-3 proteinin mide, kolon, pankreas kanserlerinde hem normal hem de tümörlü dokularda varlığı Western blot ile gösterildi.

Çalışma sonucunda akla gelen sorulara yanıt olmak üzere;

- Yapılacak hücre kültürü çalışmaları ile VEGFR-3 ve LYVE-1 genlerinin damar yapılarında ne zaman eksprese olmaya başladıkları tespit edilebilir.
- VEGFR-3'ün erişkin yaşamla birlikte kan damarlarında azalan ekspresyonlarının hangi mekanizma ile oluştuğunu göstermeye yönelik araştırmalar tasarlanabilir.
- LYVE-1'in HA döngüsündeki rolünü açıklığa kavuşturmak üzere hücre kültürleri ile çalışma planlanabilir.
- CD44'ün immün sistemle ilişkisini göstermek amacıyla migrasyon testleri yapılabilir.
- Hücre kültür çalışmaları ile LYVE-1, CD44, VEGFR-3'ün hangi sitokin ve kemokinlerden etkilendiği saptanabilir.
- Hayvan deneyleri oluşturularak, tümör gelişimi sırasında bu genlerin susturulması ile tümör gelişimi nasıl etkileniyor araştırılabilir.
- LYVE-1 reseptörünün hangi sinyal iletim sistemlerini kullandığını anlamak amacıyla çalışmalar yapılabilir.
- Taze dokudan elde edilen hücreler ile oluşturulan, hücre kültür ortamında bu genlerin, lenfanjiogenezden sorumlu diğer moleküllerin, immün sistem hücreleri ile arasındaki ilişkiler araştırılabilir.
- Bu üç genin ekspresyonunda, miRNA'ların görevli olup-olmadığını anlamaya yönelik çalışmalar tasarlanabilir.
- Genlerin ekspresyonunda rol oynayan miRNA'ların hangileri olduğu saptanabilir.
- Bu genler ile tümör mikro mikroçevresinde bulunan diğer moleküllerin ilişkilerini saptamaya yönelik hücre kültürü çalışmaları planlanabilir.

- LYVE-1 ve CD44 moleküllerinin aynı moleküle bağlanmalarının başka bir amacının olup-olmadığına yönelik çalışmalar yapılabilir, immun sistemden nasıl etkilendikleri sorgulanabilir.
- İlişkili miRNA'larda herhangi bir mutasyon söz konusu mu araştırılabilir.
- Çalışmamızda ki bulguların biyolojik önemi ve tedavide kullanılabilirliğini saptamaya yönelik yeni çalışmalar yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Witte, MH., ve Witte, CL. (1987). Lymphatics and blood vessels, lymphangiogenesis and hemangiogenesis: from cell biology to clinical medicine. *Lymphology*, 20:257—66.
2. Gerli, R., Solito, R., Weber, E., ve Agliano, M. (2000). Specific adhesion molecules bind anchoring filaments and endothelial cells in human skin initial lymphatics. *Lymphology*, 33:148–57
3. Pipsa, Saharinen ve ark. (2004). Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends in Immunology* Vol. 25 No. 7 July , 387-395
4. Sabin, F.R. (1902). On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am. J. Anat.* 1, 367-391.
5. Oliver, G., Sosa-Pineda, B., Geisendorf, S., Spana, EP., Doe, CQ., ve Gruss, P. (1993). Prox1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mech Dev.* , 44:3-16.
6. Kenta Nakamura, ve ark. (2007). Biomarkers of Lymphatic Function and Disease. *Mol Diag Ther*, 11(4):227-238.
7. Wigle, JT., ve Oliver, G. (1999). Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*, 98 (6): 769-78
8. Makinen, T., Adams, R. H., Bailey, J., ve ark. (2005). PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. *Genes Dev*, 19 (3): 397-410.
9. Oliver, G., ve Detmar, M. (2002). The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev*, 16 (7): 773-83
10. Oliver, G., ve Harvey, N. (2002). A stepwise model of the development of lymphatic vasculature. *Ann N Y Acad Sci*, 979: 159-65

11. Nadjja, E., Tobler, ve ark. (2006). Tumor and lymph node lymphangiogenesis – impact on cancer metastasis. *J. Leukoc. Biol*, 80: 691-696
12. Hong, Y.K., Harvey, N., Noh, Y. H., Schacht, V., Hirakawa, S., Detmar, M., Oliver, G. (2002) Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev. Dyn.* 225, 351-357.
13. Petrova, T.V., Makinen, T., Makela, T.P., ve ark (2002) Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J.*, 21:4593-4599.
14. Leah, N., Cueni, ve ark. (2006). New Insights into the Molecular Control of the Lymphatic Vascular System and its Role in Disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 2167–2177.
15. Wetterwald, A., Hoffstetter, W., Cecchini, M.G., Lanske, B., Wagner, C., Fleisch, H., ve ark. (1996). Characterization and cloning of the e11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone*, 18:125–32
16. Kriehuber, E., Breiteneder-Geleff, S., Groeger, M., Soleiman, A., Schoppmann, S.F., Stingl, G., ve ark. (2001). Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med*, 194:797–808
17. Schacht, V., Ramirez, M.I., Hong, Y.K., Hirakawa, S., Feng, D., Harvey, N., ve ark. (2003). T1alpha/ podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J*, 22:3546–56
18. Ramirez, M.I., Millien, G., Hinds, A., Cao, Y., Seldin, D.C., ve Williams, M.C. (2003). T1alpha, a lung type i cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth. *Dev Biol* 256:61–72
19. Martin-Villar, E., Scholl, F.G., Gamallo, C., Yurrita, M.M., Munoz-Guerra, M., Cruzes, J., ve ark. (2005). Characterization of human

- pa2.26 antigen (t1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*, 113:899–910
20. Schacht, V., Dadras, S.S., Johnson, L.A., Jackson, D.G., Hong, Y.K., ve Detmar, M. (2005). Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 166:913–21
 21. Marc, G., Achen, ve ark. (2006). Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread—New players begin to emerge. *Int. J. Cancer*, 119, 1755–1760
 22. Suneale Banerji, ve ark. (1999) LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-specific Receptor for Hyaluronan. *The Journal of Cell Biology*, Volume 144, Number 4, February 22, 789-801
 23. Prevo, R., Banerji, S., Ferguson, D., Jackson, D.G. (2001) Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem*, 276:19420–30.
 24. Jackson, D.G. (2003). The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends Cardiovasc Med*, 13:1–7.
 25. David, G., Jackson (2004). Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *APMIS*, 112: 526–38,
 26. Skelton, T., Zheng, C., Nocks, A., Stamenkovic, I. (1998). Glycosylation provides both stimulatory and inhibitory effects on cell surface and soluble CD44 binding to hyaluronan. *J Cell Biol*;140:431– 46.
 27. Mandriota, S., ve ark. (2001). Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J*. 20, 672–682
 28. I Van der Auwera, ve ark. (2006). First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *British Journal of Cancer* 95, 1611 – 1625
 29. Carla Mouta Carreira, ve ark. (2001). LYVE-1 Is Not Restricted to the Lymph Vessels: Expression in Normal Liver Blood Sinusoids and

- Down-Regulation in Human Liver Cancer and Cirrhosis. *Cancer Research*, 61, 8079–8084, November 15
30. Nigel, J. P., Beasley, ve ark. (2002). Intratumoral Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Head and Neck Cancer. *Cancer Research* 62, 1315–1320, March 1,
 31. Maula, S.M., Luukkaa, M., Grenman, R., Jackson, D., Jalkanen, S., Ristamaki, R. (2003). Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res* 63, 1920–1926
 32. Oddbjørn Straume, ve ark. (2003). Independent Prognostic Impact of Lymphatic Vessel Density and Presence of Low-Grade Lymphangiogenesis in Cutaneous Melanoma. *Clinical Cancer Research* Vol. 9, 250–256, January
 33. Dadras, S.S., Paul, T., Bertoncini, J., Brown, L.F., Muzikansky, A., Jackson, D.G., Ellwanger, U., Garbe, C., Mihm, M.C., Detmar, M. (2003). Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 162: 1951–1960
 34. Francis, T., Hall, ve ark. (2003). Intratumoral Lymphatics and Lymph Node Metastases in Papillary Thyroid Carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* , 129:716-719
 35. Lutz Trojan, ve ark. (2004). Lymph and Blood Vessel Architecture in Benign and Malignant Prostatic Tissue: Lack of Lymphangiogenesis İn Prostate Carcinoma Assessed with Novel Lymphatic Marker Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor (LYVE-1). *The Journal Of Urology* Vol. 172, 103–107, July
 36. Von Marschall Z, Scholz, A., Stacker, S.A., Achen, M.G., Jackson, D.G., Alves, F., Schirner, M., Haberey, M., Thierauch, K.H., Wiedenmann, B., Rosewicz, S. (2005). Vascular endothelial growth factor-D induces lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in models of ductal pancreatic cancer. *Int J Oncol* 27: 669–679

37. Williams, C.S., Leek, R.D., Robson, A.M., Banerji, S., Prevo, R., Harris, A.L., Jackson, D.G. (2003). Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol* 200: 195–206.
38. Bono, P., Wasenius, V.M., Heikkila, P., Lundin, J., Jackson, D.G., Joensuu, H. (2004). High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 10: 7144– 7149
39. Van Trappen, P.O., Steele, D., Lowe, D.G., Baithun, S., Beasley, N., Thiele, W., Weich, H., Krishnan, J., Shepherd, J.H., Pepper, M.S., Jackson, D.G., Sleeman, J.P., Jacobs, I.J. (2003). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis. *J Pathol* 201: 544–554
40. Ai Fujimoto, M.D., ve ark. (2007). Significance of Lymphatic Invasion on Regional Lymph Node Metastasis in Early Gastric Cancer Using LYVE-1 Immunohistochemical Analysis. *Am J Clin Pathol*, 127:82-88
41. Kenta Nakamura, ve ark. (2007). Biomarkers of Lymphatic Function and Disease. *Mol Diag Ther*, 11(4):227-238.
42. Rubbia-Brandt, L., Terris, B., Giostra, E., Dousset, B., Morel, P., Pepper, M.S. (2004). Lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor-C expression correlate with malignant behavior in human pancreatic endocrine tumors. *Clin Cancer Res* 10: 6919–6928
43. Stessels, F., Van den Eynden, G., Van der Auwera, I., Salgado, R, Van den Heuvel, E., Harris, A.L., Jackson, D.G., Colpaert, C.G., Van Marck, E., Dirix, L.Y., Vermeulen, P.B. (2004). Breast adenocarcinoma liver metastases, in contrast to colorectal cancer liver metastases, display a non-angiogenic growth pattern that preserves the stroma and lacks hypoxia. *Br J Cancer* 90: 1429–1436
44. Maruyama, K., li M., Cursiefen, C., Jackson, D.G., Keino, H., Tomita, M., Van Rooijen, N., Takenaka, H., D'Am1ore, P.A., Stein-Streilein, J.,

- Losordo, D.W., Streilein, J.W. (2005). Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *J Clin Invest* 115:2363– 2372
45. Kerjaschki, D., Huttary, N., Raab, I., Regele, H., Bojarski-Nagy, K., Bartel, G., Krober, S.M., Greinix, H., Rosenmaier, A., Karlhofer, F., Wick, N., Mazal, P.R. (2006). Lymphatic endothelial progenitor cells contribute to de novo lymphangiogenesis in human renal transplants. *Nat Med* 12: 230–234
 46. Weigel, J.A., Raymond, R.C., McGary, C.T., Singh, A., Weigel, P.H. (2003). A blocking antibody to the hyaluronan (HA) receptor for endocytosis (HARE) inhibits HA clearance by perfused liver. *J Biol Chem*, 278:9808–12.
 47. Sabaratnam, S., Levick, J.R. (2003). Molecular sieving of hyaluronan by synovial interstitial matrix and lymphatic capillary endothelium evaluated by lymph analysis in rabbits. *Microvasc Res*, 66:227–36.
 48. Nandi, A., Estess, P., Siegelman, M.H. (2000). Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *J Biol Chem*;275:14939–48.
 49. Ferrara, N., Alitalo, K. (1999). Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 5 (12): 1359-64
 50. Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*; 6(4): 389-95.
 51. Seiji Kato, ve ark. (2006). Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers. *Anatomical Science International* 81, 71-83
 52. Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., ve ark. (1995). Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*;92 (8): 3566-70
 53. Jussila, L., Alitalo, K. (2002). Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev*, 82 (3): 673-700

54. Kukk, E., Lymboussaki, A., Taira, S. *Ve ark.* (1996). VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 122, 3829-37.
55. Dumont, D.J., Jussila, L., Taipale, J., *ve ark.* (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* ;282 (5390): 946-9
56. Makinen, T., Jussila, L., Veikkola, T., Karpanen, T., Kettunen, M.I., Pulkkanen, K.J., *ve ark.* (2001). Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3 *Nat Med*;7: 199-205.
57. Irrthum, A., Karkkainen, M.J., Devriendt, K., Alitalo, K., Vikkula, M. (2000). Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase. *Am J Hum Genet* ;67: 295-301.
58. Karkkainen, M.J., Ferrell, R.E., Lawrence, E.C., Kimak, M.A., Levinson, M.A., McTigue, M.A. (2000). Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphedema. *Nat Genet*; 25:153-9.
59. Karkkainen, M.J., Saaristo, A., Jussila, L., Karila, K.A., Lawrence, E.C., Pajusola, K., *ve ark.* (2001). A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;98:12677-82.
60. Chen, L., Hamrah, P., Cursiefen, C., Zhang, Q., Pytowski, B., Streilein, J.W. (2004). Vascular endothelial growth factor receptor-3 mediates induction of corneal alloimmunity. *Nat Med*;10:13-5.
61. Lymboussaki, A., Partanen, T.A, Olofsson, B., Thomas-Crusells, J., Fletcher, C.D, de Waal RM, Kaipainen, A, Alitalo, K. (1998). Expression of the vascular endothelial growth factor C receptor VEGFR-3 in lymphatic endothelium of the skin and in vascular tumors. *Am J Pathol* 153:395–403.
62. Partanen, T.A., Arola, J., Saaristo, A., *ve ark.* (2000). VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor. VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J* ;14 (13):2087-96.

63. Paavonen, K., Puolakkainen, P., Jussila, L., ve ark (2000). Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol*; 156(5): 1499-504.
64. Karpanen, T., Egeblad, M., Karkkainen, M.J, Kubo, H., Yla-Herttuala, S., Jaattela, M., Alitalo, K. (2001). Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res*; 61:1786-1790.
65. Schoppmann, S.F., Birner, P., Stockl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K., Kerjaschki, D. (2002). Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol*; 161: 947-956.
66. He, Y., Rajantie, I., Pajusola, K., Jeltsch, M., Holopainen, T., Yla-Herttuala, S., Harding, T., Jooss, K., Takahashi, T., Alitalo, K. (2005) Vascular endothelial cell growth factor receptor-3 mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res*; 65: 4739-4746.
67. Stacker, S.A., Caesar, C., Baldwin, M.E, Thornton, G.E., Williams, R.A., Prevo, R., Jackson, D.G., Nishikawa, S., Kubo, H., Achen, M.G. (2001) VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med*; 7: 186-191..
68. Ilse Van der Auwera, ve ark. (2004). Increased Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Inflammatory versus Noninflammatory Breast Cancer by Real-Time Reverse Transcriptase-PCR Gene Expression Quantification. *Clinical Cancer Research* Vol. 10, 7965–7971, December 1,
69. Claudio Scavelli, ve ark. (2004). Lymphatics at the crossroads of angiogenesis and lymphangiogenesis. *J. Anat.* 204, pp433–449
70. Schmelz, M., Moll, R., Kuhn, C., Franke, W.W. (1994). Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells. II. Different types of lymphatic vessels. *Differentiation* 57, 97–117.

71. Kowalczyk, A.P., Navarro, P., Dejana, E., Bornslaeger, E.A., Green, K.J., Kopp, D.S., ve ark. (1998). VE-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: a pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions. *J. Cell Sci.* 111, 3045–3057.
72. Wiley, H.E., Gonzalez, E.B., Maki, W., Wu, M.T., Hwang, S.T. (2001). Expression of cc chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of b16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst* 93:1638–43
73. Hirakawa, S., Detmar, M. (2004). New insights into the biology and pathology of the cutaneous lymphatic system. *J Dermatol Sci* 35:1–8
74. Skobe, M., Detmar, M. (2000). Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J Investig Dermatol Symp Proc* 5:14–9
75. Hirakawa, S., Hong, Y.K, Harvey, N., Schacht, V., Matsuda, K., Libermann, T. Ve ark. (2003). Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol* 162:575–86
76. Laurent, T.C., Fraser, J.R. (1992) Hyaluronan . *FASEB J* ; 6: 2397-2404.
77. Jackson, D.G. (2003). The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends Cardiovasc Med* ;13:1-7.
78. Fraser, J.R., Laurent, T.C. (1989). Turnover and metabolism of hyaluronan. *Ciba Found Symp* ;143:41-53.
79. Weigel, J.A., Raymond, R.C., McGary, C., Singh, A., Weigel, P.H.(2003) A blocking antibody to the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) inhibits hyaluronan clearance by perfused liver. *J Biol Chem* ;278:9808-9812.
80. Iida, N., Bourguignon, L.Y. (1995). New CD44 splice variants associated with human breast cancers. *J Cell Physiol.* ;162:127-133.
81. Legras, S., Günthert, U., Stauder, R., ve ark. (1998). A strong expression of CD44-6v correlates with shorter survival of patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* ;9:3401-3413.

82. Adamia, S., Maxwell, C.A., Pilarski, L.M. (2005). Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic targets in cancer. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* ;5:3-14.
83. Le, Q.T., Chen, E., Salim, A., ve ark. (2006). An evaluation of tumor oxygenation and gene expression in patients with early stage non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res.* 12:1507-1514.
84. Cho, E.Y., Choi, Y., Chae, S.W., ve ark. (2006). Immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in ovarian serous neoplasms. *Pathol Int.* 56:62-70.
85. Watanabe, O., Kinoshita, J., Shimizu, T. (2005). Expression of a CD44 variant and VEGF-C and the implications for lymphatic metastasis and long-term prognosis of human breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res.*;24:75-82.
86. Zavrides, H.N., Zizi-Sermpetzoglou, A., Panousopoulos, D., ve ark. (2005). Prognostic evaluation of CD44 expression in correlation with bcl-2 and p53 in colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol.* 43:31-36.
87. Yoichi, Yamada, ve ark. (2003). CD44 variant exon 6 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Oncology Reports* 10: 1919-1924,
88. Lai, C.H., Shan, Y.S., Sy, E.D., ve ark. (2005). The significance of CD44 expression in gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Hepatogastroenterology.* 52:1071-1076.
89. Balvinder, K., Bloor, Abirami Rajarajan, Karim Jaafary-Haghighat, Edward, W., Odell (2002) Transcription and expression of CD44 variant exons by oro-pharyngeal squamous cell Carcinomas *International Journal Of Oncology* 21: 907-913
90. Jianing Liu, ve ark. (2006). CD44 and Hematologic Malignancies. *Cellular & Molecular Immunology.* 3(5):359-365.
91. Ishida, T. (2000). Immunohistochemical expression of the CD44 variant 6 in colorectal adenocarcinoma. *Surg Today.* 30(1):28-32

92. Yamada, Y., Itano, N., Narimatsu, H., Kudo, T., Morozumi, K., Hirohashi, S., Ochiai, A., Ueda, M., Kimata, K. (2004). Elevated transcript level of hyaluronan synthase1 gene correlates with poor prognosis of human colon cancer. *Clin Exp Metastasis*. 21(1):57-63
93. Barshishat, M., Ariel, A., Cahalon, L., Chowers, Y., Lider, O., Schwartz, B. (2002). TNFalpha and IL-8 regulate the expression and function of CD44 variant proteins in human colon carcinoma cells_ *Clin Exp Metastasis*. 19(4):327-37
94. Lakshman, M., Subramaniam, V., Rubenthiran, U., Jothy, S. (2004). CD44 promotes resistance to apoptosis in human colon cancer cells.. *Exp Mol Patho Aug*;77(1):18-25
95. Yamada, Y.,Naoki, I., Narimatsu, ve ark. (2003) .CD44 variant exon6 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction,*Oncology Reports*,10:1919-1924
96. Yamada, Y., Itano, N., Narimatsu, H., ve ark. (1999). Receptor for hyaluronan-mediated motility and CD44 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction *Jpn J Cancer Res Sep*;90(9):987-92
97. Weg-Remers, S. (1998). Decreased expression of CD44 splicing variants in advanced colorectal carcinomas, *Sep*;34(10):1607-11
98. Gulmann, C., Grace, A., ve ark. (2003). CD44v6: a potential marker of malignant transformation in intestinal metaplasia of the stomach? An immunohistochemical study using tissue microarrays *Sep*;15(9):981-6.
99. Chen, X.Y., Wang, Z.C., ve ark. (2005). Nuclear translocations of beta-catenin and TCF4 in gastric cancers correlate with lymph node metastasis but probably not with CD44 expression. *Hum Pat Dec*;36(12):1294-301
100. Jia-Lin Lee, Mei-Jung Wang ve ark. (2007). Osteopontin promotes integrin activation trough outside –in and inside-out mechanism; OPN-CD44 interaction enhances survival in gastrointestinal cancer cell, *Can Res*,67(5) March1

101. Ringel, J., Jesnowski, R., ve ark. (2001). CD44 in normal human pancreas and pancreatic carcinoma cell lines_ [Teratog Carcinog Mutagen](#);21(1):97-106
102. Gotoda, T., Matsumura, Y., ve ark. (1998) .Expression of CD44 variants and its association with survival in pancreatic cancer. [Oct](#);89(10):1033-40
103. Satoh, K., Shimosegawa, T. (1997). Expression of CD44 in duct cell carcinomas and in intraductal neoplasms of the pancreas_ [Anticancer Res. Jan-Feb](#);17(1A):215-9.
104. Seiter, S., Arch, R., Reber, S., ve ark. (1993). Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. [J Exp Med.](#);177:442-455
105. C., Parr, W.G., Jiang (2003). Quantative analysis of lymphangiogenic markers in human colorectal cancer [İnt J Onko](#)23:533-539
106. F., Gao, Y.M., Lu, ve ark (2006) Expression and quantification of LYVE-1 in human colorectal cancer [Clin Exp Med](#)6:65-71
107. Lu Yuanming, Gao Feng, Tao Lei, and Wang Ying (2007). Quantitative Analysis of Lymphangiogenic Markersin Human Gastroenteric Tumor [Archives of Medical Research](#) 38 106-112
108. Yuanming, L., ve ark. (2007). Expression analysis of lymphangiogenic factors in human colorectal cancer with quantitative RT-PCR [Cancer İnvastigation](#),25:393-396
109. S. E., Duff, M., Jeziorska, S., Kumar, N., Haboubi, D., Sherlock (2007) Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. [Colorectal Disease](#), 9, 793–800
110. Y., Yonemura, S., Fushida, ve ark. (2001). Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 in gastric cancer [Euro J Cancer](#) 37:918-923
111. Liu, X.E., Sun, X.D., Wu, J.M. (2004). Expression and significance of VEGF-C and FLT-4 in gastric cancer_ [World J Gastroenterol](#). Feb 1;10(3):352-5.

112. Kitadai, Y., Kodama, M., Cho, S., ve ark. (2005). Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes *Int J Cancer*. Jun 20;115(3):388-92.
113. Jüttner, S., Wissmann, C., Jöns, T. (2006). Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *Clin Oncol*. Jan 10;24(2):228-40
114. Sung, J.Y., Lee, S., Kim, Y.W., ve ark. (2008). Vascular endothelial growth factor receptor-3 is a favorable prognostic factor in advanced gastric carcinoma. *Oncol Rep*. Apr;19(4):939-44
115. Kawakami, M., Furuhashi, T., Kimura, Y. (2003). Quantification of vascular endothelial growth factor-C and its receptor-3 messenger RNA with real-time quantitative polymerase chain reaction as a predictor of lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Surgery*. Mar;133(3):300-8.
116. White, J.D., Hewett, P.W., Kosuge, D., ve ark. (2002). Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma *Cancer Res*. Mar 15;62(6):1669-75.
117. Simiantonaki, N., Taxeidis, M. (2007). Epithelial expression of VEGF receptors in colorectal carcinomas and their relationship to metastatic status. *AnticancerRes*. Sep-Oct;27(5A):3245-50.
118. Schneider, M., Büchler, P., Giese, N. (2006). Role of lymphangiogenesis and lymphangiogenic factors during pancreatic cancer progression and lymphatic spread. *Int J Oncol*. Apr;28(4):883-
119. Yihai Cao. (2005). Emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nature Reviews Cancer* Volume 5 September
120. Yihai Cao, ve ark. (2007). Tumor-derived lymphangiogenic factors and lymphatic metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 61 534-539
121. Achen, M.G., McColl, B.K., Stacker, S.A. (2005). Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell* ;7:121-7.

122. Alitalo, K., Mohla, S., Ruoslahti, E. (2004). Lymphangiogenesis and cancer: meeting report. *Cancer Res* ;64:9225-9.
123. Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D.G., ve ark. (2001). Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* ;7:192-8
124. Cao, R., Bjorndahl, M.A., Religa, P., ve ark. (2004). PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell*, 6:333-45.
125. Padera, T.P., Kadambi, A., di Tomaso, E., ve ark. (2002) Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*, 296:1883-6.
126. Rui-Cheng, Ji. (2006). Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev* 25:677–694
127. Achen, M.G., McColl, B., K., Stacker, S., A. (2005). Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell* 7, 121-127 .
128. Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl J. Med.* 285, 1182-1186 .
129. Folkman, J. (1995). Seminars in medicine of the beth israel hospital, boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N. Engl J. Med.* 333, 1757-1763 .
130. Kari Alitalo, ve ark. (2004). Lymphangiogenesis and Cancer: Meeting Report. *Cancer Research* 64, 9225–9229, December 15,
131. Kandel, J., ve ark. (1991). Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 66, 1095-1104.
132. Chang, L. K., ve ark. (2004). Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 11658-11663.
133. Kubo, H., ve ark. (2002). Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 8868-8873.

134. Galy, B., Creancier, L., Prado-Lourenco, L., Prats, A. C., Prats, H. (2001). p53 directs conformational change and translation initiation blockade of human fibroblast growth factor 2 mRNA. *Oncogene* 20, 4613-4620.
135. Uramoto, H. Ve ark. (2004). pRb, Myc and p53 are critically involved in SV40 large T antigen repression of PDGF beta-receptor transcription. *J. Cell Sci.* 117, 3855-3865.
136. Sano, T. & Horiguchi, H. (2003). Von Hippel-Lindau disease. *Microsc. Res. Tech.* 60, 159-164
137. Su, W. C. ve ark. (2001). Expression of oncogene products HER2/Neu and Ras and fibrosis- related growth factors bFGF, TGF-beta and PDGF in bile from biliary malignancies and inflammatory disorders. *Dig. Dis. Sci.* 46, 1387-1392
138. Lohela, M., Saaristo, A., Veikkola, T. & Alitalo, K. (2003). Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb. Haemost.* 90, 167-184
139. Heldin, C.H., Rubin, K., Pietras, K. & Ostman, A. (2004). High interstitial fluid pressure- an obstacle in cancer therapy. *Nature Rev. Cancer* 4, 806-813.
140. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*;100:57-70.
141. Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*; 4:540-50.
142. Castano, A.P., Mroz, P., Hamblin, M.R. (2006) Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*, 6:535-45.
143. Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1:27-31.
144. Achen, M.G., Jeltsch, M., Kukk, E., ve ark. (1998). Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A*;95:548-53.

145. Ferrara, N. (2005). The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS*;209-31.
146. Cursiefen, C., Chen, L., Borges, L.P., ve ark. (2004). VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest*;113: 1040-50.
147. Bjorndahl, M.A., Cao, R., Burton, J.B., ve ark. (2005). Vascular endothelial growth factor-a promotes peritumoral lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res*;65:9261-8.
148. Nagy, J.A., Vasile, E, Feng D, ve ark. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med. Dec 2*;196(11):1497-506.
149. Hirakawa, S., Kodama, S., Kunstfeld, R., Kajiya, K., Brown, L.F., Detmar, M. (2005). VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med*;201:1089-99.
150. Cursiefen, C., Cao, J., Chen, L., ve ark. (2004). Inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis after normal-risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*;45:2666-73.
151. Hong, Y. K., Lange-Asschenfeldt, B., Velasco P., ve ark. (2004). VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *FASEB J*;18:1111-3.
152. Joukov, V., Sorsa, T., Kumar, V., Jeltsch, M., Claesson-Welsh, L., Cao, Y., Saksela, O., Kalkkinen, N., Alitalo, K. (1997). Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J*;16:3898–911.
153. Joukov V., Pajusola K., Kaipainen A., ve ark. (1996). A novel vascular endothelial growth factor , VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*;15:290-8.
154. Stacker S. A., Stenvers K., Caesar C., Vitali A., Domagala T., Nice E.,

- Roufail S., Simpson R. J., Moritz R., Karpanen T., Alitalo K., Achen M.G. (1999). Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem*; 274:32127–36.
155. Karkkainen M. J., Haiko P., Sainio K., ve ark. (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*;5:74-80.
 156. Shin J. W., Min M., Larrieu-Lahargue F., ve ark. (2005). Prox1 promotes lineage-specific expression of FGF receptor-3 in lymphatic endothelium: a role for FGF signaling in lymphangiogenesis. *Mol Biol Cell*.
 157. Saharinen P., Tammela T., Karkkainen M. J., Alitalo K. (2004). Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol*;25:387–95.
 158. Lin J., Lalani A. S., Harding T. C., Gonzalez M., Wu W. W., Luan B., Tu G. H., Koprivnikar K., VanRoey M. J., He Y., Alitalo K., Jooss K. (2005). Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor. *Cancer Res*;65:6901–9.
 159. He Y., Kozaki K., Karpanen T., Koshikawa K., Yla-Herttuala S., Takahashi T., Alitalo K. (2002). Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst*;94:819–25.
 160. Pietras K., Sjoblom T., Rubin K., Heldin C-H., Ostman A. (2003). PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell*;3:439–43.
 161. Fredriksson L., Li H. & Eriksson U. (2004). The PDGF family: four gene products from five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev*. 15, 197-204.
 162. Cao R. ve ark. (2004). PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell* 6,333-345.

163. Anan K. Ve ark. (1996). Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer. *Surgery* 119,333-339.
164. Hagendoorn J., Padera T. P., Yock T. I., ve ark. (2006). Platelet-derived growth factor receptor-beta in Gorham's disease. *Nat Clin Pract Oncol*;3:693-7.
165. Kubo H., Cao R., Brakenhielm E., Mäkinen T., Cao Y., Alitalo K. (2002). Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci USA*;99:8868–73.
166. Chang L. K., Garcia-Cardena G., Farnebo F., ve ark. (2004). Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*;101:11658-63.
167. Tille J. C., Nisato, R. & Pepper M. S. (2004). Lymphangiogenesis and tumour metastasis. *Novartis Found. Symp.* 256, 112-131.
168. Thurston G. (2003). Role of angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res*;314:61–8
169. Gale N. W., Thurston G., Hackett S. F., Renard R., Wang Q., McClain J., Martin C., Witte C., Witte M. H., Jackson D., Suri C., Campochiaro P. A., ve ark. (2002). Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by angiopoietin-1. *Dev Cell*;3:411–23.
170. Morisada T., Oike Y., Yamada Y., ve ark. (2005). Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation. *Blood*;105:4649-56.
171. Tammela T., Saaristo A., Lohela M., ve ark. (2005). Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia. *Blood*;105:4642-8.
172. Kajiya K., Hirakawa S., Ma B., Drinnenberg I., Detmar M. (2005). Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *EMBO J*;24:2885–95.

173. Birchmeier C., Birchmeier W., Gherardi E., Vande Woude G. F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*;4:915–25.
174. Cao R., Bjorndahl M. A., Gallego M. I., et al. (2006). Hepatocyte growth factor is a lymphangiogenic factor with an indirect mechanism of action. *Blood*; 107:3531-6..
175. Danilkovitch-Miagkova A., Zbar B. (2002). Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J Clin Invest*;109:863–7.
176. Mita K., Nakahara M., Usui T. (2000). Expression of the insulin-like growth factor system and cancer progression in hormone-treated prostate cancer patients. *Int J Urol*;7:321–9.
177. Bjorndahl M., Cao R., Nissen L. J., Clasper S., Johnson L. A., Xue Y., Zhou Z., Jackson D., Hansen A. J., Cao Y. (2005). Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102:15593–8.
178. Tang Y., Zhang D., Fallavollita L., Brodt P. (2003). Vascular endothelial growth factor C expression and lymph node metastasis are regulated by the type I insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res*;63:1166–71.
179. Fuchs E. S., Mayer R. J. (1995): Gastric carcinoma. *N Engl J Med* 333:32-41,
180. Jemal A., Thomas A., Murray T., (2002). Thun M: Cancer statistics,. *CA Cancer J Clin* 52:23-47
181. Lawrence W. Jr., Menck H. R., Steele G. D. Jr., Winchester D. P. (1995): The National Cancer Data Base report on gastric cancer. *Cancer* 75:1734-1744,
182. Hundahl S. A., Phillips J. L., Menck H. R. (2000): The National Cancer Data Base report on poor survival of U.S. gastric carcinoma patients treated with gastrectomy: Fifth Edition American Joint Committee on Cancer Staging, proximal disease, and the "different disease" hypothesis. *Cancer* 88:921-932,
183. Wanebo H. J., Kennedy B. J., Chmiel J., Steele G. Jr., Winchester D.,

- Osreen R. (1993): Cancer of the stomach: a patient care study by the American College of Surgeons. *Ann Surg* 218:583-592,
184. Salvon-Harman J. C., Cady B., Nikulasson S., Khettry U., Stone M. D., Lavin P. (1994): Shifting proportions of gastric adenocarcinomas. *Arch Surg* 129:381-388,
185. Blot W. J., Devesa S. S., Kneller R. W., Fraumeni J. F. Jr. (1991): Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 265:1287-1289,
186. Staszewski J. (1972): Migrant studies in alimentary tract cancer. *Rec Results Cancer Res* 39:85-97,
187. Kamineni A., Williams M. A., Schwartz S. M., Cook L. S., Weiss N. S. (1999). The incidence of gastric carcinoma in Asian migrants to the United States and their descendants. *Cancer Causes Control* 10:77-83,
188. Ramon J. M., Serra L., Cerdo C., Oromi J. (1993) : Dietary factors and gastric cancer risk: a case-control study in Spain. *Cancer* 71:1731-1735.
189. Gonzalez C. A., Riboli E., Badosa J., Batiste E., Cardona T., Pita S., Sanz J. M., Torrent M., Agudo A. (1994): Nutritional factors and gastric cancer in Spain. *Am J Epidemiol* 139:466-473.
190. Amonio D. A. (1990): Gastric carcinoma and its precursors. *Monogr Pathol* 31:144-180
191. Safatle-Ribeiro A. V., Ribeiro U. Jr., Reynolds J. C. (1998): Gastric Stump cancer: What is the risk? *Dig Dis* 16:159-168.
192. Jida M., Yao T., Iroh H., Watanabe H., Kohrogi N., Shigematsu A., Iwashita A., Fujishima M. (1985): Natural history of fundic gland polyposis in patients with familial adenomatosis coli/Gardner's syndrome. *Gastroenterology* 89:1021-1025.
193. Caldas C., Carneiro F., Lynch H. T., Yokota J., Wiesner G. L., Powell S. M., Lewis F. R., Huntsman D. G., Pharoah P. O., Jankowski J. A., MacLeod P., Vogelsang H., Keller G., Park K. G., Richards F. M., Maher E. R., Gayther S. A., Oliveira C., Grehan N., Wight D., Seruca R., Roviello F., Ponder B. A., Jackson C. E. (1999): Familial gastric

- cancer: overview and guidelines for management. J Med Genet 36:873-880,
194. Nomura A., Stemmermann G. N., Chyou P. H., Kato I., Perez-Perez G. L., Blaser M. J. (1991): *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. N Engl J Med 325: 1132-1136.
 195. Forman D, Newcil DG, Fullerton F, Yamell JW, Stacey AR, Wald N, Sitas F: 1991 Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. BMJ 302:1302-1305,
 195. Parsonnetti Friedman G. D., Vandersteen D. P., Chang Y., Vogelman J. H., Orentreich N., Sibley R. K. (1991): *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 325: 1127-1131.
 196. Huang J. Q., Sridhar S., Chen Y., Hunt R. H. (1998): Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. Gastroenterology 114: 1169-1179,
 197. Marchetti M., Arico B., Burroni D., Figura N., Rappuoli R., Ghiara P. (1995): Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. Science 267:1655-1658,
 198. Fleming I. D., Cooper J. S., Henson D. E., Hutter R. V. P. (1997). Kennedy BJ, Murphy GP, O'Sullivan B, Sobin LH, Yarbrow JW (editors): AJCC Cancer Staging Manual. Fifth edition. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.
 199. Sobin L. H., Wittekind C. H. (1997) (editors): TNM Classification of Malignant Tumours. Fifth edition. New York, J Wiley,
 200. Karpeh M. S., Leon L., Klimsita D., Brennan M. F. (2000): Lymph node staging in gastric cancer: Is location more important than number? An analysis of 1,038 patients. Ann Surg 232:362-371
 201. Watanabe H., Jass J. R., Sobin L. H. (1990): Histological Typing of Oesophageal and Gastric Tumours. Second edition. Berlin. Springer-Verlag.
 202. Songun I., van de Velde C. J., Arends J. W., Blok P., Grond A. J., Offerhaus G. J., Hermans J., van Krieken J. H. (1999): Classification of

- gastric carcinoma using the Goseki system provides prognostic information additional to TNM staging. *Cancer* 85:2114-2118,
203. Bozzetti F., Bonfanti G., Bufalino R., Menotti V., Persano S., Andreola S., Doci R., Gennari L. (1982): Adequacy of margins of resection in gastrectomy for cancer. *Ann Surg* 196:685-690,
 204. Kajitani T. (1981): The general rules for the gastric cancer study in surgery and pathology. Part 1. Clinical classification. *Jpn J Surg* 11:127-139,
 205. Behrns K. E., Dalton R. R., van Heerden J. A., Sarr M. G. (1992): Extended lymph node dissection for gastric cancer: Is it of value? *Surg Clin North Am* 72:433-443,
 206. Maruyama K., Okabayashi K., Kinoshita T. (1987): Progress in gastric cancer surgery in Japan and its limits of radicality. *World J Surg* 11:418-425.
 207. Dent D. M., Madden M. V., Price S. K. (1988): Randomized comparison of R1 and R2 gastrectomy for gastric carcinoma. *Br J Surg* 75:1101-112,
 208. Robetson C. S., Chung S. C., Woods S. D., Griffin S. M., Raimes S. A., Lau J. T., Li A. K. (1994): A prospective randomized trial comparing R1 subtotal gastrectomy with R3 total gastrectomy for antral cancer. *Ann Surg* 220:176-182,
 209. Bonenkamp D., Songun I., Hermans J., Sasako M., Welvaarc K., Plukker J. T., van Elk P., Oberrop H., Gouma D. J., Taae C. W. (1995): Randomised comparison of morbidity after D1 and D2 dissection for gastric cancer in 996 Dutch patients. *Lancet* 345:745-748,
 210. Bonenkamp J. J., Hermans J., Sasako M., van de Velde C. J. (1999): Extended lymph-node dissection for gastric cancer. Dutch Gastric Cancer Group. *N Engl J Med* 340:908-914,
 211. Bunt A. M., Hermans J., Smit V. T., van de Velde C. J., Fleuren G. J., Bruijn J. A. (1995): Surgical/ pathologic-stage migration confounds comparisons of gastric cancer survival rates between Japan and Western countries. *J Clin Oncol* 13:19-25,
 212. Cuschieri A., Fayers P., Fielding J., Craven J., Bancewicz J., Joypaul

- V., Cook P. (1996): Postoperative morbidity and mortality after D1 and D2 resections for gastric cancer: preliminary results of the MRC randomised controlled surgical trial. The Surgical Cooperative Group. *Lancet* 347:995-999,
213. Cuschieri A., Weeden S., Fielding J., Bancewicz J., Craven J, Joypaul V., Sydes M., Fayers P. (1999): Patient survival after D1 and D2 resections for gastric cancer: long-term results of the MRC randomized surgical trial. Surgical Co-operative Group. *Br J Cancer* 79: 1522-1530,
214. Siewert J. R., Bottcher K., Stein H. J., Roder J. D. (1998): Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg* 228:449-461.
215. Siewert J. R., Kestlimeier R., Busch R., Bottcher K., Roder J. D., Muller J., Fellbaum C., Hofler H. (1996): Benefits of D2 lymph node dissection for patients with gastric cancer and pNO and pN1 lymph node metastases. *Br J Surg* 83:1144-1147,
216. Sasako M., McCullough P., Kinoshim T., Maruyama K. (1995): New method of evaluation theapeutic value of lymph node dissection for gastric cancer. *Br J Surg* 82:346-351,
217. Kitamura K., Yamaguchi T., Taniguchi H., Hagiwara A., Sawai K., Takahashi T. (1997): Analysis of lymph node metastasis in early gastric cancer: rationale of limited surgery. *J Surg Oncol* 64:42-47,
218. Tsujitani S., Oka S., Saito H., Kondo A., Ikeguchi M., Maeta M., Kaibara N. (1999): Less invasive surgery for early gastric cancer based on the low probability of lymph node metastasis. *Surgery* 125: 148-154,
219. Gordon P. H. (2007). Malignant Neoplasms of the Colon. In: Gordon PH, Nivatvongs S. (Eds) *Neoplasms of the Colon, Rectum and Anus*. Informa, New York, USA, pp:52-164)
220. Sayek I. (2005). Kolon-Rektum Kanserleri In: Temel Cerrahi. Editör: Sayek İ. Güneş Kitapevi, Ankara. pp: 1243-1250
221. Terzi C., Füzün M. (2004). Kolorektal polipler ve polipozis sendromları. In: Temel Cerrahi, Sayek I (Ed), Güneş Kitapevi, Ankara, pp: 1234-1242

222. Allen J. L. (1995).Molecular Biology of Colorectal Cancer. Perspect Colon Rectal Surg; 8: 181-202)
223. Nivatvongs S. (2007). Benign neoplasms of the colon and rectum. In: Gordon PH, Nivatvongs S (Eds). Neoplasms of the Colon, Rectum and Anus. Informa, New York, USA,.pp:3-32
224. Pennisi E. (1998). How a growth control path takes a wrong turn to cancer. Science; 281:1438- 1441
225. Trunen M. J., Kivilaakso E. O. (1981)Increased risk of colorectal cancer after cholecystectomy. Ann Surg; 194: 639-641
226. Gutman M., Fidler I. J. (1995). Biology of Human colon cancer metastases. World J Surg; 19: 226-234
- 227 .Terrazas J. M., Val-Bernal J. F., Buelta L. (1987). Staging of carcinoma of the colon and rectum. Surg Gynecol Obst; 165:255-259
228. Swanson, R. S., Compton, C. C., Stewart, Ak, ve ark. (2003) The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph node examined. Ann Surg Oncol , 10: 65-71
229. Tepper J. E., O'Connell M. J., Niedzwiecki D. ve ark. (2001). Impact of number of nodes retrieved on outcome in patients with rectal cancer. J Clin Oncol; 19: 157-163).
230. Greene F. L., Stewart A. K., Norton H. J. (2004). New tumor-node-metastasis staging strategy for node positive (stage III) rectal cancer: an analysis. J Clin Oncol; 22: 1778-1784
231. Johnson C. D., Ozmen M. M. (2004). Panlreas kanseri. In: Temel cerrahi, Sayek I(ed), Güneş Kitapevi, Ankara,. pp: 1429-1436
232. Gold E. B. (1995). Etiology and risk factors of pancreatic cancer. Surg Clin North Am; 75(5): 819-843
233. Çökmez A., Aydede H. (1999). Pankreas Kanserinde epidemiyoloji ve risk faktörleri. In: Pankreas Kanseri, Çökmez A(Ed), Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul,.pp:3-20
234. Grieve D. C. (1973). Adenocarcinoma of the pancreas: a review of 100 cases. J Royal Coll Surg Edinb;18:221-226
235. Ekinci N. (1999). Pankreasın Egzokrin Neoplazileri. In: Pankreas

- Kanseri, Çökmez A(Ed). Nobel Tıp Tıp Kitapevi, İstanbul,.pp:23-29
236. Heywood G., Farnell M. B. (2004). Periapillary and pancreatic cancer. In: Mayo Clinic Gastrointestinal Surgery. Kelly K, Sarr MG, Hinder RA(Eds). , Türkçe Çeviri, Erbil Y, Değerli Ü (Eds). Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul,.pp:271-97
237. Nakao A., Harada A., Nonami T. ve ark. (1995). Lymph node metastasis in carcinoma of the head of the pancreas region. Br J Surg; 82: 399-402
238. Shirai Y., Ohtani T., Tsukada K. ve ark. (1997). Patterns of lymphatic spread of carcinoma of the ampulla of vater. Br J Surg; 84: 1012-1016
239. Yeo C. J., Sohn T. A., Cameron J. I. ve ark. (1998). Periapillary adenocarcinoma: analysis of 5-year survivors. Ann Surg; 227: 821-31
240. Nakai T., Koh K., Kawabe T. Ve ark. (1997). Importance of microperineural invasion as a prognostic factor in ampillary carcinoma. Br J Surg; 84: 1399-1401
241. Towbin H.,StaehelinT. Ve Gordan J. (1979). Natl. Acad. Sci.USA,; 76:4350
242. Akyerli C. B., Beksac M., Holko M. ve ark (2005). Expression of IFITM1 in chronic myeloid leukemia patients.Leuk Res. Mar;29(3):283-6.
243. Michael W. (2001). A Mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, Nuc Acids Res, Vol. 29,No:900
244. Kenneth J. Livak, Thomas D. Schmittgen (2001). Analysis of relative Gene Expression data Using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, Methods 25,402-408
245. T. Kato,R. Prevo ve ark. (2005). A quantitative analysis of lymphatic vessels in human breast cancer,based on LYVE-1 immunoreactivity,British J Can, 93,1168-1174
246. David G. Jackson, Remko Prevo ve ark. (2001). LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. TRENDS in Immunology Vol.22.6 June

8. EKLER



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Hacettepe 06100, ANKARA

TIBBİ, CERRAHİ ve İLAÇ ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/265

17.03.2005

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 17.03.2005
 Toplantı No : 2005/3
 Proje No : TBK 04/12 (Görüşme Tarihi: 23.12.2004)
 Karar No : TBK 04/12 – 19

Fakültemiz İç Hastalıkları Anabilim Dalı Onkoloji Ünitesi öğretim üyelerinden Prof.Dr. Emin Kansu'nun sorumlu araştırmacısı olduğu TBK 04/12 kayıt numaralı ve "*Gastrointestinal Sistem Tümörlerinde LYVE-1, VEGFR-3, CD44 Ekspresyon Düzeyleri ve Lenfatik Metastaz Arasındaki İlişki*" konulu proje önerisi kurulumuzda değerlendirilmiş, tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|------------------------------|----------|
| 1. Prof.Dr. E. Rüştü Onur | (Başkan) |
| 2. Prof.Dr. Sema Özer | (Üye) |
| 3. Prof.Dr. M. Emin Şenocak | (Üye) |
| 4. Prof.Dr. Meral Kanbak | (Üye) |
| 5. Prof.Dr. Türkan Eldem | (Üye) |
| 6. Prof.Dr. Gökhan Gedikoğlu | (Üye) |
| 7. Prof.Dr. Erdem Aydın | (Üye) |
| 8. Prof.Dr. Ediz Demirpençe | (Üye) |
| 9. Doç.Dr. Alev Türker | (Üye) |
| 10. Yrd.Doç.Dr. Ümit Yaşar | (Üye) |
| 11. Avukat Serpil Besni | (Üye) |