

138 456

SUNUŞ

Bu tez doktora yapmam konusunda beni teşvik eden Prof. Dr. Nijad Bilge, doktora eğitimim süresince her zaman yanımda olan Prof. Dr. Faruk Aykan, tezin metodolojisinde büyük yardımlarını gördüğüm Prof. Dr. Öner Doğan, doktora eğitimim süresince her zaman büyük yardımını gördüğüm Prof. Dr. Nejad Dalay, tezin hazırlanması sırasında beni destekleyen çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Fulya Yaman Ağaoğlu, Prof. Dr. Emin Darendeliler ve yazımı aşamasında onlardan çaldığım zamanı özveriyle karşılayan eşim Şiirsel ve kızım Okyanus Pera'nın ortak ürünüdür.

Kendilerine müteşekkirim.

Dr. Yavuz Dizdar

İstanbul, 31.08.2003

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı
Onkolojik Biyoloji ve İmmünoloji Bilim Dalı
Danışman öğretim üyesi: Prof. Dr. Faruk Aykan

**Kolon kanserinde COX-2 ekspresyonunun histopatolojik
parametrelerle korelasyonu ve tedavideki prognostik önemi**

Doktora Tezi

Dr. Yavuz Dizdar

İstanbul - 2003

İÇİNDEKİLER

I.1. Giriş.....	3
I.2. Prostaglandinler ve kolorektal kanser ilişkisi.....	4
I.3. Prostaglandinlerin sentezi.....	9
I.4. COX-2'nin karsinogeneze katkısı ile ilgili kanıtlar.....	14
I.5. COX-2'nin kansere katkısı ile ilgili mekanizmalar.....	16
II. Tezin amacı ve bilimsel dayanağı.....	20
II.1. Hastalar ve yöntem	20
II.2. Mikroskopik inceleme.....	21
III.Bulgular.....	22
III.1.Hastalar ve klinik özellikleri.....	23
III.2. COX-2 immünopozitivitesi.....	23
III.3. İstatistiksel değerlendirme sonuçları.....	31
IV. Tartışma	34
V. Sonuç.....	40
Özet.....	41
Kaynaklar.....	43

I.1. Giriş

Kolorektal kanser endüstrileşmiş ülkelerde başta gelen kanser mortalitesi nedenlerindendir. Vakaların çoğuna ileri evrede tanı konduğu için sağkalım oranları düşüktür. Buna karşılık kolorektal kanserler genellikle bir öncü lezyon olan adenomdan uzun süre içinde geliştikleri için önlenilebilen bir hastalık grubudur. Kolorektal kanserlerin tanı yaşı ortalama 62'dir, ancak risk 50-75 yaşlar arasında değişir ve ileri yaşlarda belirgin yükselir. Genellikle ırk ve cinsiyet farkı görülmezken, rektum kanserleri beyaz ırkta daha fazla görülür.

Bugüne dek kolorektal kanser etyopatogenezinde rol oynadığı ileri sürülen etkenler kolonun prekanseröz hastalıkları (polipler, ailevi polipozis sendromları, iltihabi bağırsak hastalıkları), diyet ve endojen-eksojen karsinogenlerdir. Diyet, özellikle de diyetdeki lif içeriği ile kolorektal kanser arasındaki ilişki belirsizdir. Yakın zamanlı çalışmaların çoğu diyetdeki lifin kolorektal kanser riskini eskiden düşünüldüğü oranda azaltmayabileceğini göstermektedir. Kolorektal kanser vakalarının %15-30'a varan oranları kalıtsal faktörlere bağlı olabilir. Bir ya da iki akrabası etkilenen bireyler orta dereceli kolorektal kanser riski taşımaktadır (kolorektal kansere bağlı ampirik yaşam boyu mortalite oranı yaklaşık %10) ve vakaların %2-3'ü yüksek penetrasyon gösteren otozomal dominant mutasyonlar taşıdığı için kolorektal kanser açısından yüksek risk grubuna giren bireylerden oluşmaktadır. İnsan adenomatöz polipozis (APC) genindeki mutasyonlar, pubertede kolonda ortaya çıkan ve tedavi edilmediğinde kolon kanserine dönüşen çok sayıda poliple karakterize olan familial adenomatöz polipozise (FAP) neden olmaktadır. APC geni kolon kanserinde "gatekeeper" gen olarak tanımlanan bir tümör baskılayıcı gendir. FAP hastalarında rastlanan %100 oranındaki mutasyonun yanı sıra sporadik kolon ve intestinal kanserli hastaların %80'inden fazlasında APC geni mutasyonuna rastlanmaktadır (1).

Kolorektal kanser insidansındaki çarpıcı coğrafi farklılıklar ve göçmenlerdeki hastalık riskinde oluşan değişiklikler kolorektal kanser riskinde önemli bir çevresel bileşen olduğunu düşündürmektedir. En önemli risk faktörlerinin bazıları (örneğin;

yaş ve aile öyküsü) değiştirilemeyen etkenlerdir. Diyetle ilişkili faktörler kolorektal kanser riskinde en önemli belirleyici etken görünmektedir. Diyet, hastalıktaki coğrafi değişkenliği de açıklamada yardımcıdır. Kırmızı et ve doymuş yağdan zengin diyet riski artırmaktadır. Sebze, meyve, lif, folat ve kalsiyum ise koruyucu rol oynayabilir. Obezite, özellikle de abdominal obezite ve yapılı olma riski faktörü olabilir. Fiziksel aktivitenin kolorektal kanser riskini azalttığı defalarca gösterilmiştir. Postmenopoze dönemde hormon replasman tedavisi de koruyucu olabilir. Düzenli aspirin ve nonsteroid antienflamatuar ilaç (NSAEİ) kullanımının kolorektal kanser riskini anlamlı derecede azalttığına dair yeni veriler bildirilmektedir. Bu ilaçların yararlı etkilerinin yanı sıra istenmeyen etkileri de olduğu unutulmamalıdır. Ayrıca uygun doz ve zamanlama da bilinmemektedir. Kolorektal kanser riskini azaltmaya yönelik önerilerde bulunmak için yeterli bilgi mevcuttur. Kırmızı et ve yağ tüketiminin azaltılması, sebze, meyve ve hububat tüketiminin artırılması, obezitenin önüne geçilmesi, düzenli bir fiziksel aktivite programının uygulanması koruyucu önlemlerdir. Bu yaşam tarzı değişikliklerinin Batı ülkelerinde çok daha önemli bir mortalite nedeni olan kardiyovasküler hastalık riskini de azaltması bir şanstır (2).

Yüksek riskli bireyler izleminden fayda görebilir. Kolorektal kanser insidansı ve mortalitesinin endoskopik polipektomi ve erken kanser tanısı ile azaltılabileceğine yönelik kanıtlar giderek artmaktadır. Randomize çalışmalar, genel popülasyonda (ortalama risk) yapılan feçeste gizli kan testinin kolorektal kansere bağlı mortaliteyi %15-33 oranında azalttığını göstermektedir. Genel popülasyonda fleksibil sigmoidoskopi ve kolonoskopi ile taramanın etkinliğini araştıran randomize çalışmaların uzun süreli sonuçları beklenmektedir. Yüksek riskli bireyleri hedef almak kolorektal kanser yükünü azaltmada etkili ve verimli bir yol olabilir. Kolorektal kanser için orta ve yüksek risk grubuna giren bireylerin kolonoskopi ile izlenmesi önerilmektedir (3).

1.2. Prostaglandinler ve kolorektal kanser ilişkisi

1970'li yıllarda prostaglandinlerin omurgalılarıdaki karsinogenezle ilişkili olduğunun anlaşılmasından kısa bir süre sonra familial adenomatöz polipozisli hastaları

kapsayan alışmalar, NSAİİ'lerin bu prekanseröz lezyonların sayısını ve büyüklüğünü azaltabildiğini göstermiştir. 1980'lerin sonlarında, çeşitli endikasyonlarla uzun süreli aminosalisilik asit kullanımının kolon kanserine ve diğerk bölgelerdeki malignitelere karşı koruyucu etki gösterdiğine dair epidemiyolojik kanıtlar elde edilmiştir. Selektif olmayan siklooksijenaz inhibitörlerinin (geleneksel NSAİİ'ler) kullanıldığı kontrollü çalışmaların yürütölmesi gastrointestinal ve renal yan etkiler nedeniyle güçleşmiştir. Yakın zamanda bu istenmeyen etkilere neden olmaksızın ağrı ve enflamasyonda kullanılabilen selektif COX-2 reseptör antagositleri geliştirilmiştir. Hayvan modellerinde COX-2 inhibitörlerinin kolon neoplazilerini ve/veya temsili belirteçlerini azaltabildiğı gösterilmiştir (4).

Gözleme dayalı çalışmalar spesifik nonsteroid antienflamatuvar ilaçların (NSAİİ) ve farklı kullanım paternlerinin (kullanım süresi ve doz) kolorektal kanser insidansı üzerindeki etkisine ilişkin sınırlı bilgi vermiştir. NSAİİ'lerin kullanım paternlerinin (kullanım süresi, doz ve spesifik ilaç) kolorektal kanser insidansına etkisini araştıran çalışma popölasyon tabanlı retrospektif bir kohort çalışmasında, 65 yaş ve üzerindeki 104217 hastayı kapsayan çalışmada beş yıl içinde en az 48 ay süreyle aspirin dışı NSAİİ kullananlarda kolon kanseri açısından göreceli risk oranı, NSAİİ kullanmayanlara göre 0.49 bulunmuştur. Kümülatif kullanımın 12 ayı açtığı hastalar arasında son yıl içinde NSAİİ kullananlarda (yakın zamanlı NSAİİ kullananlar) göreceli risk 0.61, yakın zamanlı NSAİİ kullanmayanlarda ise 0.76 bulunmuştur. Sağ taraflı lezyonlarda koruyucu etkinin daha belirgin olduğı saptanmıştır. Kümülatif kullanımın 12 ayı açtığı yakın zamanlı NSAİİ kullananlarda göreceli risk rektal kanser için 0.81, sol taraflı kolon kanseri için 0.77, sağ taraflı kolon kanseri için 0.48 bulunmuştur. Sonuç olarak, yaşlı popölasyonda uzun süreli aspirin dışı NSAİİ kullanımının kolon kanseri riskini yaklaşık yarı yarıya azalttığı belirlenmiştir (5).

Bir diğerk vaka-kontrol çalışmasında, doza ve kullanım süresine göre kolorektal adenokarsinom hız oranları hesaplanmıştır. Çalışmaya 3844 kolon kanseri ve 1971 rektum kanseri hastası dahil edilmiştir. Kolon kanseri için tanıdan önceki 6 ay süresince NSAİİ kullanımındaki artışın, hız oranında anlamlı bir azalma eğilimi ile

ilişkili olduğu belirlenmiştir. Her iki kanser için de tanıdan 11-15 yıl önce NSAİİ kullanmanın, hız oranındaki azalma eğilimi ile ilişkili olduğu saptanmıştır. İlaça en fazla maruz kalan grupta kolon kanseri için hız oranı 0.57, rektum kanseri için 0.26'dır. Diğer dönemlerde ilaç kullanımıyla koruma arasında ilişki bulunmamıştır (6).

Bir diğer çalışmada son 20 yıl içinde NSAİİ'ler dahil olmak üzere ilaç kullanımı bir vaka-kontrol çalışması planlanarak, 184 vaka ve eşleştirilmiş hastane ve popülasyon kontrollerinde değerlendirilmiştir. Beş yıldan uzun süreyle NSAİİ kullanımının her iki kontrol grubuna göre azalmış riskle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Göreceli risk hastane kontrolleriyle karşılaştırıldığında 0.20, popülasyon kontrolleriyle karşılaştırıldığında 0.21 bulunmuştur. Bu çalışmadan elde edilen veriler de beş yıldan uzun süreli NSAİİ kullanımının kolorektal kanser gelişimine karşı koruyucu etki gösterdiği hipotezini desteklemektedir (7).

Bir diğer analiz, anne-baba ya da kardeşteki kolorektal kanserle ilgili aile öyküsünün, NSAİİ kullanımı ile kolorektal kanser riski arasındaki ters ilişkiyi etkileyip etkilemediğini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Kolorektal kanserle ilgili iki vaka-kontrol çalışmasına ait veriler kullanılmıştır. Bu çalışmalardan hastane tabanlı olanı primer kolorektal kanserli 1526 hasta, 4192 kanserli kontrol ve 6036 kanseri olmayan kontrol içermektedir. Popülasyon tabanlı çalışmada ise 1201 kolorektal kanser hastası ve 1201 popülasyon kontrolü bulunmaktadır. NSAİİ kullanımına ve kolorektal kanser açısından mevcut risk faktörlerine ilişkin veriler yapılan görüşmelerle toplanmıştır. Her iki çalışmada da bir önceki yıla kadar düzenli NSAİİ kullananlarda aile öyküsüne bakılmaksızın olasılık (odds) oranlarında azalma olduğu belirlenmiştir. Hastane tabanlı çalışmada olasılık oranı aile öyküsü olanlarda 0.4, olmayanlarda 0.5 bulunmuştur. Popülasyon tabanlı çalışmada karşılık gelen olasılık oranları sırasıyla 0.5 ve 0.7'dir. Bu veriler, düzenli NSAİİ kullanımının aile öyküsü olan kişilerde de kolorektal kanser riskini azalttığını göstermektedir (8).

Kronik NSAİİ kullanımı ile kolorektal kanser riskinde azalma arasında bir ilişki bulunmaktadır. Ancak NSAİİ'ler ile kolorektal adenom arasındaki ilişkiye dair daha

az veri vardır. Yapılan bu popülasyon tabanlı kohort çalışmasında aspirin ve diğer Bir diğer çalışmada 40-79 yaş arasında, başlangıçta kolorektal adenom ya da başka bir kanser taşımayan 943903 kişi üç yıl süreyle izlenmiştir. 1864 vakada kolorektal adenom saptanmıştır. NSAİİ kullanmayanlarla karşılaştırıldığında, aspirin dışı NSAİİ'leri uzun süre (bir ya da daha uzun süre) kullananlarda kolorektal adenom gelişme riskinin %40 oranında daha az olduğu belirlenmiştir. Uzun süreli NSAİİ kullanımı, uygulamanın bırakılmasından bir yıl sonra dahi riskte azalma ile ilişkili bulunmuştur. NSAİİ'lerin çoğunun riskte azalma ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Günde 300 mg uzun süreli aspirin kullananlarda kolorektal adenom gelişme riskinin azaldığı, ancak günde 75 mg ve 150 mg aspirin dozlarının azalmış risk ile belirgin bir ilişki göstermediği saptanmıştır (9).

Bu çalışmalara NSAİİ'lerin kolorektal kanser riskinde azalma ile ilişkili olduğunu göstermekle birlikte aspirin dışı NSAİİ'lerin her birinin etkisi hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. 40-79 yaş arasında, başlangıçta kolorektal adenom ya da başka bir kanser taşımayan 943903 kişi üç yıl süreyle izlendiği bir başka araştırmada 2002 kolorektal kanser vakası saptanmıştır. Kolorektal kanser riskinin aspirin dışı NSAİİ kullananlarda azaldığı ve bu azalmanın 6 aylık sürekli kullanımı takiben belirgin hale geldiği saptanmıştır. Riskteki azalma, NSAİİ kullanımına son verilmesinden bir yıl sonra tamamen ortadan kalkmıştır. Günde 300 mg uzun süreli aspirin kullananlarda kolorektal kanser gelişme riskinin azaldığı belirlenmiştir. Ancak günde 75 mg ve 150 mg aspirin dozlarının kolorektal kanser riskinde azalma ile ilişkili olmadığı saptanmıştır. Bu veriler, aspirin dışı NSAİİ'lerin sürekli kullanımının kolorektal kansere karşı önemli koruyucu etki gösterdiği görüşünü desteklemekte ve günde en az 300 mg dozunda kullanılan aspirinin de riskte benzer bir azalmaya yol açtığına işaret etmektedir (10).

Klinik verilerin temkinli yorumu, kolon kanseri gelişimi açısından bireylerde predispozisyon oluşturan belirli risk faktörlerinin etkilerinin azaltılması için seçilmiş dozlarda belirli NSAİİ'lerin kullanılmasında yarar/risk oranı konusunda şüpheye yer vermektedir. Yine de ortaya çıkan genel tablo mekanistik hipoteze tercih edilebilir. Bu görüş kolon kanseri hayvan modellerinde NSAİİ'lerin farmakolojisi tarafından

desteklenmektedir. Kimyasal karsinojenlere maruz bırakılan kemirgenlerde çoklu NSAİİ kullanımı ile kolon tümörlerinin gelişimi önlenmiş ya da başlangıcı belirgin ölçüde yavaşlatılmıştır. Bu çalışmalardan hiç birinde kolon karsinogeneze katkıda bulunan iki izoenzimden hangisi olduğu ya da ikisinin birden mi katkısının olduğu gösterilememiştir.

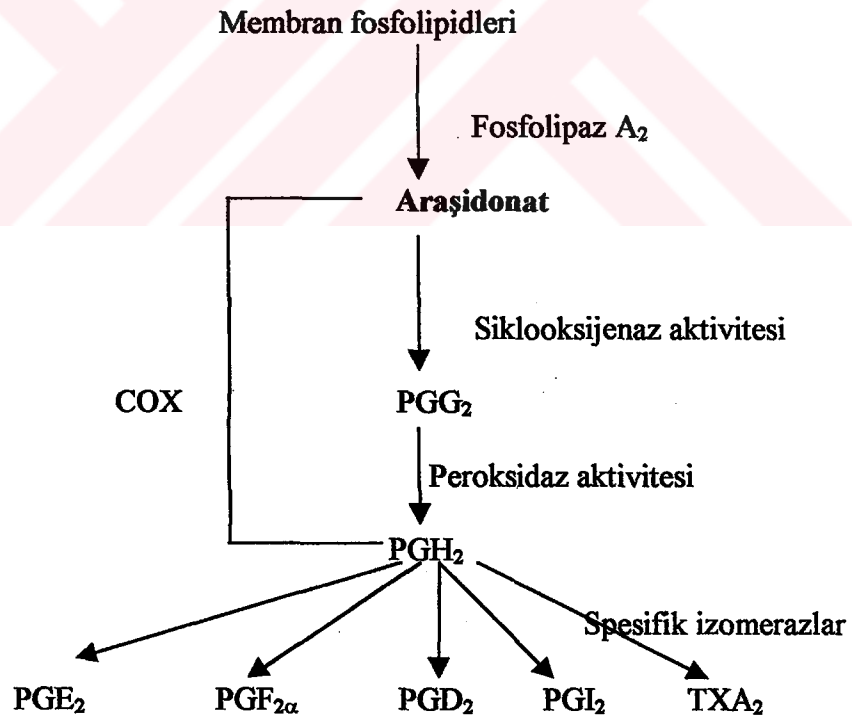
Yine de kanser için düşük-orta risk grubunda bulunan bireylerde kanser gelişimini önlemeye yönelik olarak ilaçların klinik kullanımını destekleyecek yeterli bilgi bulunmaktadır. NSAİİ'lerin sağlıklı popülasyonda yaygın ve uzun süreli kullanımı, peptik ülser hastalığı gibi potansiyel toksik etkiler nedeniyle terk edilmiştir. Ancak siklooksijenaz tip 2'nin (COX-2) selektif inhibisyonunun kanser prevansiyonunda etkili bir strateji olabileceği düşünülmektedir. Selektif COX-2 inhibitörlerinin deneysel sistemlerde tümör oluşumunu engelleyen etkisi saptanmıştır. Dahası kontrollü endoskopik çalışmalar, selektif COX-2 inhibitörlerinin üst gastrointestinal sistem mukozasında, klasik NSAİİ'lere göre daha az hasar oluşturduğunu göstermektedir.

Bu verilerden yola çıkılarak son on yıl içerisinde yapılan çalışmalar COX enziminin kanserin önlenmesinde terapötik bir hedef oluşturabileceğini düşündürmüştür. Epidemiyolojik çalışmalar steroid olmayan antienflamatuar ilaçların (NSAEİ) kolorektal kanser de dahil olmak üzere birçok malign hastalığın gelişmesi riskinde azalma ile ilişkili olduğunu göstermiştir. NSAİİ'lerin hayvanlarda tümör oluşumunu engellemesi de önemli bir noktadır. NSAİİ'lerin COX enzimini inhibe etmesi, COX aktivitesinin ürünü olan prostaglandinlerin karsinogeneze önemli katkıda bulunduğunu düşündürmüştür. Örneğin; COX kökenli prostaglandinlerin anjiyogenezde rolü vardır. COX'un indüklenebilir formu olan COX-2'nin selektif inhibitörlerinin yakın geçmişte geliştirilmesi bir diğer önemli ilerlemedir. Selektif COX-2 inhibitörleri geleneksel NSAİİ'lere göre daha az istenmeyen etkiye neden olmaktadır. Selektif COX-2 inhibitörlerinin geliştirilmiş güvenlik profili, bu ilaçların düşük-orta kanser riski taşıyan bireylerde uzun süreli kullanımını gerçekçi kılmaktadır (11).

I.3. Prostaglandinlerin sentezi

20 karbonlu çoklu doymamış bir yağ asidi olan araşidonik asit membran fosfolipitlerinin 2-pozisyonuna bağlı bir ester olarak bulunur. Prostaglandin sentezindeki ilk basamak fosfolipitlerin, fosfolipaz A₂ tarafından katalize edilen bir reaksiyonla serbest araşidonata dönüştürülmesidir. Bir sonraki aşama, COX tarafından katalizlenen anahtar reaksiyonla moleküler oksijenin araşidonik asit yapısına sokulmasıyla kararsız bir ara bileşik olan prostaglandin G₂'nin üretilmesidir. PGG₂ COX'un peroksidaz aktivitesi ile hızla PGH₂'ye çevrilir. Daha sonra spesifik izomerazlar PGH₂'yi farklı prostaglandinlere ve tromboksanlara çevirir. PGH₂'den köken alan her ürünün kendine özgü biyolojik etkinlikleri vardır (Şekil 1).

Şekil 1. Prostaglandinlerin sentezi



COX enziminin COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. İki form birçok açıdan birbirinden farklılık göstermektedir. COX-1 dokuların çoğunda sürekli

eksprese edilerek mide mukozasının korunması ve renal kan akımının düzenlenmesi gibi normal fizyolojik işlevleri kontrol eden prostaglandinlerin üretiminde aracılık eder. Öte yandan COX-2 proenflamatuvar ve mitojenik uyaranlar tarafından indüklenerek, enflamasyonlu ve neoplastik dokularda prostaglandinlerin sentezini artırır. COX-2'nin indüklenebilirliği, COX-2 geninin 5'-flanking bölgesinde yer alan NF- κ B, NF-IL6 ve CRE bölgeleri gibi cis-acting elemanların varlığı ile kısmen açıklanabilir. COX-2 mRNA'sının artmış stabilitesinin de COX-2 indüksiyonuna katkısı olabilir.

COX-1 ve COX-2'nin X ışınları kromatografisiyle incelenmesi, bu enzimlerin 3 boyutlu yapısının ve ilaçların etki mekanizmalarının anlaşılmasını sağlamıştır. Her iki enzim de birbirine oldukça benzer uzun ince bir kanal yapısına sahiptir. Bu kanal lipofilik özellik gösterir ve araşidonik asitin prostaglandinlere ve tromboksanlara dönüştürülme reaksiyonlarının başlamasını sağlar. Buna karşılık iki enzim arasında bazı anahtar rol oynayabilecek farklılıklar bulunmaktadır. COX-1'in aminoasit dizisinde 120. sıradaki izolösünün yerini COX-2'de daha küçük bir aminoasit olan valin almakta, bu değişiklik enzimde "yan cep" olarak adlandırılan bir yapının ortaya çıkmasına yol açmaktadır. İşte COX-2 seçiciliğinden sorumlu mekanizmanın da bu yan cep olduğu tahmin edilmektedir. COX-1 ve COX-2 proteinlerinin aktif bölgelerinin birbirine çok benzer olmasına karşın COX-2'nin selektif inhibisyonu sağlanabilir. COX-1'deki izolösünün, COX-2'nin NSAİİ'ye bağlanan bölgesindeki valin ile süstitisyonu, COX-2'deki merkezi aktif kanalın kenarında kullanılmayan hacimli geniş bir aktif alan yaratır. Bu ek alana bağlanmak üzere tasarlanan bileşikler potent ve selektif COX-2 inhibitörleridir (12). COX-1 ve COX-2'nin başlıca özellikleri Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1. COX-1 ve COX-2'nin temel özellikleri

Özellik	COX-1	COX-2
Ekspresyon	Konstitütif	İndüklenebilir
Protein büyüklüğü	SDS-PAGE'de yaklaşık 72 kDa'luk tek bant	SDS-PAGE'de molekül ağırlığı 72 kDa ve 74 kDa olan iki bant
Gen büyüklüğü	22 kb	8.3 kb
İnsandaki kromozom no	9	1
mRNA büyüklüğü	2.7 kb	4.5 kb; AU'dan zengin bölgeler içerir
Yerleşim	Endoplazmik retikulum, çekirdek zarı	Endoplazmik retikulum, çekirdek zarı
Hücre ve doku ekspresyonu	Trombositler, mide, böbrek, kolon, dokuların çoğu	Beyin ve böbreğin bazı bölümleri, aktifleşmiş makrofajlar, enflamasyon sırasında sinoviyositler, malign epitelyal hücreler, sitokinler (örneğin TNF α , interlökin 1 β), büyüme faktörleri (örneğin EGF) veya tümör promotörleri (örneğin safra asitleri) ile uyarılmadan sonra hücre ve dokuların çoğunda eksprese olur.

Yakın zamanda yapılan bir dizi çalışma COX-2 enziminin bir dizi kanser türünde eksprese edildiğini ortaya koymuştur. COX-2 kolorektal adenomlar ve adenokanserler, mide kanseri, Barrett özofagusu ve özofagus kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, hepatoselüler kanser, mesane kanseri, pankreas kanseri, over kanseri, endometrium kanseri, serviks displazisi ve

kanseri ve baş-boyun bölgesi displazilerinde yüksek düzeyde eksprese edilmektedir (Tablo 2) (13).

Tablo 2. COX-2'nin insanda aşırı eksprese olduğu çeşitli malign ve premalign lezyonlar:

Kolorektal adenomlar ve kanser

Gastrik intestinal metaplazi ve kanser

Barrett özofagusu ve özofagus kanseri

Kronik hepatit ve hepatosellüler karsinom

Pankreas kanseri

Oral lökoplaki ve baş-boyun kanserleri

Atipik adenomatöz hiperplazi ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri

In situ duktal karsinom ve meme kanseri

Prostatik intraepitelyal neoplazi ve kanser

Mesane displazisi ve kanser

Servikal displazi ve kanser

Endometriyum kanseri

Aktinik keratoz ve cilt kanseri

Gliyom

COX-2 ve kolon kanserine uzanan yolakla ilgili bu geniş kapsamlı kanıtlara ek olarak birçok grup COX-2'nin diğer epitelyal kanserlerdeki potansiyel rolünü araştırmışlardır. Bu çalışmalarda COX-2'nin meme, baş boyun, akciğer, pankreas ve mide kanserlerinde rol oynayabileceğine ilişkin ilginç ipuçları elde edilmiştir (14). Kanser gelişim basamaklarında COX-2 indüksiyonu ile enflamasyonun ana bileşeni olarak oynadığı rol arasında bir bağlantı var mıdır? Güncel dogma COX-2'nin enflamasyona katılan prostaglandinlerin oluşumundaki majör yolağı oluşturduğunu düşündürmektedir. Seçici COX-2 inhibitörleri ile ilgili klinik deneyim de bu görüşü kuvvetle desteklemektedir. Klinikte kullanılan dozlarda COX-1 üzerinde herhangi bir etki göstermeyen bu ilaçlar enflamasyonu baskılayıcı etki açısından seçici olmayan NSAİE'lere eşdeğerdir. Bütün bunlara dayanarak, COX-2'nin enflamasyonda görev

alan prostaglandinlerin oluşumunda majör rolü oynadığını ve bu anahtar enzimin enflamasyon ile kanser arasında genel bir bağlantı olabileceğini düşündürmektedir.

Ülseratif kolit gibi kronik enflamasyon ile ilişkili hastalıklar birçok kanser türü açısından risk faktörüdür. Persistan ülseratif koliti olan hastalarda kolon kanseri insidansı beklenenin 5-7 katı yüksektir ve 35-40 yıl süren kolitte kolon kanseri gelişmesi ile ilgili mutlak risk %20-35 arasında değişmektedir. Sporadik kanserlerle karşılaştırıldığında, ülseratif kolit ile ilişkili kolon kanseri en kötü pronozu sahiptir (15). Ailesel adenomatöz polipozis, kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser ve ülseratif koliti içeren bilinen üç yüksek riskli grup içinde görülen kolon kanserleri arasında en düşük 5-yıllık sağkalım oranı (<%40) ülseratif kolit grubundadır. Ülseratif kolit, neoplazinin kısmen persistan, lokal enflamasyonun sonucu olarak geliştiğini öne süren hipotez ile uyumlu olacak şekilde diğer kanser türleri riskini artırmaz. Ayrıca displazisi olmayan hastaların %50'sinin mukozasında mikrosatellit instabilitesinin ortaya çıkması genomik bütünlükteki kümülatif bozulmanın enflamasyona eşlik ettiğini ve transformasyondan önce gerçekleştiğini düşündürmektedir. Bekleneceği üzere, böylesine güçlü bir enflamasyon ortamında COX-2 ekspresyonu yüksektir. Bu durumda COX-2 inhibisyonunun karsinom gelişme riskini azaltıp azaltmadığının belirlenmesi çok önemlidir (16, 17).

Kronik enflamatuvar hastalıkların diğer birçok kanser türünün gelişme riskini artırdığını destekleyen veriler, kolit ile kolon kanseri arasındaki bağlantıyı ortaya koyan veriler kadar kesin değildir. Örneğin; vaka kontrollü çalışmalar kronik pankreatitin pankreas kanseri açısından risk faktörü olduğunu ve kronik pankreatiti olan hastaların %10'unda rezeke edilen, morfolojik olarak normal pankreas dokusunda mutant p53 allellerinin bulunduğunu göstermektedir. Bu veriler, pankreas kanseri progresyonunun moleküler genetiği ile uyumludur (18). Ancak popülasyon temelli çalışmalar kronik pankreatitli hastalarda pankreas kanseri riskinin beklentilerin tersine zaman içinde azaldığını düşündürmektedir (19).

Astımlı hastalardaki kanser insidansı ile ilgili çalışmalar da bilgi vericidir. Astımlı 78.000 hastayı kapsayan bir çalışmada, hem kadınlarda hem de erkeklerde lokal ve

kronik enflamasyonun katkısıyla uyumlu biçimde akciğer kanseri riskinin anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir (20). 31000 hastayı içeren bir diğer çalışmada erkeklerde akciğer kanserine bağlı ölümlerde anlamlı artış olduğu bildirilmiştir. Sigara alışkanlığına göre düzeltmenin yapıldığı bu çalışmada, astım açısından uyum göstermeyen ikizler arasındaki risk oranlarının bütün çalışma popülasyonundaki oranlarla eşleştiği görülmüştür (21). 64000 astımlı hastayı kapsayan bir başka çalışmada akciğer kanseri ve endokrin kanserler dışındaki kanser tiplerinin çoğu açısından riskin daha düşük olduğu bildirilmiştir (22). Bu sonuç, astımın solunum sistemi dışındaki belirli bazı organlarda ‘koruyucu’ rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Astımın ‘koruyucu’ etkisi, astımlı hastalarda sigara içme alışkanlığının daha az olmasına atfedilebilir. Bütün dünyadaki astımlı hastaların, astımın havayolunun enflamatuvar bir hastalığı olduğu gerçeğine dayanan tedavi yöntemlerinin kabul edilmesinden önce uzun süreli persistan akciğer enflamasyonuna maruz kalmış olması gerçeği dikkat çekicidir.

Partikül ile indüklenen akciğer kanseri modelleri de enflamasyonun endojen mutasyon kaynağı olduğu görüşü ile uyumludur. Enflamasyonla karsinogenez arasında bağlantı kuran diğer temsili örnekler arasında eozinofilik veya iritanla indüklenmiş sistiti olan kişilerde gelişen mesane kanseri, cilt kanseri, verrüköz karsinom, over kanseri ve Barret özofagusu sayılabilir. Yaşam boyu gerçekleşen over döngüsü sayısı ile over kanseri riski arasındaki bağlantı kısmen endokrinolojik de olsa, bir açıdan ovülasyona eşlik eden granülositik enflamasyona atfedilebilir. Over döngülerinin sayısı ile over kanserindeki mutant p53 tümör baskılayıcılarının ekspresyonu arasında kantitatif bir ilişki bulunmaktadır. Kronik endometriyozisi ya da pelvik enflamatuvar hastalığı olan kadınlarda over kanseri riskinin de anlamlı derecede arttığı bildirilmektedir (23).

I.4. COX-2’nin karsinogeneze katkısı ile ilgili kanıtlar

Artmış COX-2 miktarları sıklıkla hem premalign dokularda hem de malign tümörlerde bulunur. Bu bulgu, COX-2’nin bilinen indükleyicileri olan onkogenlerin, büyüme faktörlerinin ve tümör promotörlerinin etkilerini yansıtmaktadır. Dahası

wild-type p53 COX-2 transkripsiyonunu baskılamak, mutant p53 böyle bir etki göstermemektedir. Bu farklılık, p53 durumunun da COX-2 ekspresyonunun belirleyicilerinden biri olabileceği ihtimalini ortaya çıkarmaktadır. Mutant p53 taşıyan mide kanserlerinde, wild-type p53 taşıyanlara göre daha fazla miktarda COX-2 bulunmuş olması da bu görüşü desteklemektedir (24, 25).

COX-2'nin mekanistik olarak kanser gelişimi ile bağlantılı olduğunu öne sürmek için, COX-2'nin tümörlerde aşırı eksprese olduğuna ilişkin yeterince kanıt bulunmaktadır. COX-2 aşırı ekspresyonu ile karsinogenez arasındaki neden sonuç ilişkisini destekleyen en spesifik veriler genetik çalışmalarda elde edilmiştir. Yakın zamanda meme bezlerinde COX-2 genini aşırı eksprese eden transgenik fareler üretilmiştir. Multipar dişilerde yüksek sıklıkta fokal meme bezi hiperplazisi, displazi ve metastatik tümörlere transformasyon izlenmiştir (26). Bu gözlemler COX-2 ekspresyonunda artışın tümör oluşumunu indüklemeye yeterli olduğu görüşünü desteklemektedir. Başka bir çalışmada insan familial adenomatöz polipozisi için kullanılan bir model olan Apc⁷¹⁶ farelerde COX-2 geninin etkisiz hale getirilmesinin intestinal polip sayısını azalttığı ve polipleri küçülttüğü gösterilmiştir. Bu etki gen-doz etkisine bağlıdır. Yani COX-2 geni taşımayan farelerde intestinal polip sayısı %86 oranında azalırken, COX-2 geninin tek kopyasının işlev dışı bırakılması polip sayısında %66 oranında azalma ile sonuçlanmıştır. COX-2 yetersizliği diğer tümörlerin de oluşumuna karşı koruyucu etki göstermektedir (27). COX-2 geni taşımayan farelerde kimyasal yolla indüklenen cilt papillomlarının kontrol farelerdekine göre %75 oranında az görüldüğü belirlenmiştir. COX-1 geninin devre dışı bırakılmasının da intestinal tümörlere ve cilt tümörlerine karşı koruyucu etki göstermesi tümör oluşumunda arşidonik asit metabolizmasının ne denli önemli olduğunun altını çizmektedir (28).

Farmakolojik kanıtlar da COX-2'nin tümör oluşumu açısından önemini desteklemektedir. Selekoksisib ve rofekoksib gibi selektif COX-2 inhibitörleri hayvanlarda intestinal tümörlerin yanı sıra cilt, meme, akciğer, mesane ve dil tümörlerinin oluşumunu azaltmaktadır. Selektif COX-2 inhibitörleri tümör oluşumunu engellemenin yanı sıra baş-boyun tümörlerinin, kolorektal tümörlerin,

mide, akciğer, meme ve prostat tümörlerinin büyümesini baskılamaktadır. COX-2 inhibitörlerinin tümör oluşumunu COX'tan bağımsız mekanizmalar aracılığıyla inhibe edebileceğine dair kanıtlar da elde edilmiştir. Bir selektif COX-2 inhibitörünün yüksek konsantrasyonları COX-2 eksprese etmeyen hücrelerde büyümeyi inhibe edebilmektedir. Ancak NSAİİ'lerin COX'tan bağımsız antineoplastik etkilerinin fizyolojik açıdan önemi sorgulanmıştır. Çünkü in vitro çalışmalarda kullanılan ilaç konsantrasyonları çok yüksektir. Genetik ve farmakolojik veriler birlikte değerlendirildiğinde, kanser prevansiyonunda COX-2'nin moleküler bir hedef olabileceğini düşündürmektedir (29).

1.5. COX-2'nin kansere katkısı ile ilgili mekanizmalar

COX-2 karsinogenezde önem taşıyan birçok işlemi etkilediği için çekici bir terapötik hedeftir. Bu işlemler arasında ksenobiyotik metabolizma, anjiyogenez, apoptozis, enflamasyon, immünosüpresyon ve invaziflik yer almaktadır.

Ksenobiyotik metabolizma: COX, hem siklooksijenaz hem de peroksidaz etkinliği gösteren çift işlevli bir enzimdir. Siklooksijenaz aktivitesi araşidonik asidi PGG₂'ye oksitler. Peroksidaz aktivitesi ise PGG₂'yi PGH₂'ye dönüştürür. PGH₂ benzo[a]piren gibi prokarsinojenlerin karsinojenlere dönüşümünü de katalizler. Karaciğerde bu tür oksidatif reaksiyonlar temel olarak P450 sistemi tarafından katalizlenir. Ancak karaciğer dışındaki birçok dokuda, örneğin kolonda, P450'ler ve monooksijenazlar düşük konsantrasyonlarda bulunur. Bu durumda ksenobiyotiklerin önemli miktarı COX'un peroksidaz aktivitesi ile mutajenlere kooksitlenebilir. Bu aktivite özellikle akciğer, oral kavite ve mesane gibi tütündeki karsinojenlere maruz kalan organlarla ilişkili olabilir (30, 31).

Mutajenlerin sentezini katalizlemenin yanı sıra COX-2 prokarsinojenler tarafından indüklenebilir. Örneğin; tütün dumanında ve ızgara yiyeceklerde bulunan bir polisiklik aromatik hidrokarbon olana benzo[a]piren COX-2'nin transkripsiyonunu uyarabilir. COX-2 ise benzo[a]piren-7,8-diolün DNA'ya bağlanan benzo[a]piren-7,8-diol-9,10-epokside dönüşümünü katalizler (32). Bu bulgular COX-2'nin

benzo[a]piren aracılı indüksiyonunun, molekülün benzo[a]piren-7,8-diol-9,10-epokside dönüşümünü kolaylaştırarak, belirli bir dozdaki benzo(a)pirenin tümör inisiyasyonundaki etkisini amplifiye edebileceği olasılığını ortaya çıkarmaktadır. Bu mekanizmanın önemi bilinmemekle birlikte, COX-2 inhibisyonunun tütün dumanı ve diğer benzo[a]piren kaynakları ile ilişkili kanserlerin önlenmesinde yararlı olabileceğini düşündürmektedir (33).

Anjiyogenez: Tümörlerin büyümesi kanlanmaya bağımlıdır. Tümör hücreleri anjiyogenezi uyaran vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörleri salgılayarak büyümelerini garanti altına alırlar. COX-2 karsinogenezde bu açıdan da önem taşımaktadır. COX-2'nin kolon kanseri hücrelerinde aşırı ekspresyonu vasküler büyüme faktörlerinin üretimini, endotelyal hücrelerin kollajen matriksten göçünü ve kapiller benzeri ağların oluşumunu in vitro artırmaktadır (34, 35). Yakın zamanlı bir çalışma COX-2'nin anjiyogenezdeki önemini göstermiştir. Tümör büyümesi COX2(-/-) farelerde, wild-type ya da COX1(-/-) farelere göre azalmıştır. Tümörlerdeki damar yoğunluğu COX2(-/-) farelerde wild-type farelere göre daha düşük bulunmuştur. Dahası genetik ablasyon ya da COX-2'nin farmakolojik inhibisyonu VEGF'nin üretiminde azalmaya neden olmuştur. Bu durum COX2(-/-) farelerde tümör büyümesindeki azalmayı açıklayabilir (36).

Apoptozis: Bir hücre popülasyonunun büyüklüğü, hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasındaki dengeye bağımlıdır. Apoptoziste azalma premalign ve malign neoplazmlarda gözlenmiştir (37). Apoptozisi düzenleyen pek çok faktörden biri olan BCL 2 düzeyleri ile apoptozis arasında ters bir ilişki vardır. Aşırı COX-2 ekspresyonu yapmak üzere geliştirilen sıçan intestinal epitelyal hücrelerinde artmış BCL 2 düzeyleri saptanır ve bu hücreler apoptozise dirençlidirler (38). Bir NSAİİ olan sulindak sülfidin uygulanması COX-2 aşırı ekspresyonunun neden olduğu apoptozise direnci tersine çevirmiştir (39). COX-2 aşırı ekspresyonunun meme kanserine yol açtığı gösterilmiştir. Meme tümörü dokusunda BAX ve BCL x₁ gibi proapoptotik proteinlerin miktarında azalma, antiapoptotik bir protein olan BCL 2'nin miktarında artma saptanmıştır. Bu veriler COX-2 ekspresyonu ile programlanmış hücre ölümünün inhibisyonu arasında açık bir nedensel ilişki

olduğunu göstermektedir. Olasılıkla COX-2'nin up-regülasyonu anormal hücrelerin sağkalımını uzatarak tümör oluşumu riskini artıran sekansiyel genetik değişikliklerin birikimi lehine etki göstermektedir (40).

Enflamasyon ve immün baskılanma: Kronik enflamasyonun epitelyal karsinogenez için bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Enflamasyonun kendisi kısmen COX-2'nin sitokin aracılı indüksiyonu yoluyla protaglandin sentezini artırır. Bu nedenle yukarıdaki veriler kronik enflamasyon ile karsinogenez arasında COX-2 aşırı ekspresyonu yoluyla bir neden sonuç ilişkisi olduğunu göstermekte, kronik enflamasyonun kanser riskini artırmasını açıklayabilecek mantıksal bir mekanizmanın varlığını düşündürmektedir.

Tümörlerin büyümesi tipik olarak immün baskılanma ile ilişkilidir. Tümör hücrelerinden salınan koloni uyarıcı faktörler monositleri ve makrofajları PGE₂ sentezlemek üzere aktive ederler. PGE₂ ise immün düzenleyici lenfokinlerin üretimini, T ve B hücre proliferasyonunu, doğal katil hücrelerin sitotoksik aktivitesini inhibe etmektedir (41). PGE₂ ayrıca tümör nekroz faktör α 'nın üretimini inhibe ederek, immün baskılayıcı etkisi olan interlökin 10'un üretimini indüklemektedir (42). COX-2'nin selektif inhibisyonunun in vivo koşullarda interlökin 10 ile interlökin 12 arasındaki dengeyi sağlayarak antitümör etkinlik gösterdiğine inanılmaktadır. COX-2 inhibitörleri tümör aracılı immün baskılanmanın modülasyonunu ve azalmasını sağlar (43).

İnvaziflik: COX-2 insan kanser hücrelerinin invazif özelliklerinin modülasyonunda önem taşımaktadır. Kanser hücre soylarında COX-2 aşırı eksprese edildiğinde, prostaglandin üretimi artmakta ve hücreler daha invazif hale gelmektedir. Yapılan bir çalışmada, artmış invazifliğin hem membran metalloproteinaz 2 ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (44). Bu enzim bazal membranın kollajen matriksini parçalayarak tümör hücrelerinin invazif ve hareketli bir fenotipe kavuşmasını uyarmaktadır. Bir diğer çalışmada, COX-2 aşırı ekspresyonunun, hiyaluronat için hücre yüzey reseptörü olan CD44'ün miktarında artış ile ilişkili olduğu ve CD44'ün spesifik blokajının tümör hücre invazyonunda anlamlı azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (45).



II. Tezin amacı ve bilimsel dayanağı

COX-2 ve kanser gelişimi arasındaki ilişkinin mekanizmaları henüz araştırma aşamasındadır. COX-2'nin kanser gelişimi üzerine olan uyarıcı etkisinin gösterilmesine karşılık, ülkemizde kolon kanseri vakalarında COX-2 ekspresyonu ve histokimyasal parametreler arasındaki ilişki henüz yeterince araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı kolorektal kanserlerde COX-2 ekspresyonunun kantitatif değeri ve histokimyasal parametreler arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

II.1. Hastalar ve yöntem

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü'ne 1998 yılında başvurmuş kolorektal kanserli hastalar arşiv kayıtlarından belirlenerek dosyaları retrospektif olarak incelendi. Bu hasta grubu içerisinde İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda opere edilmiş ve patolojik materyalleri İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda (İTF Patoloji AbD) incelenmiş olanlar çalışma kapsamına alındı. Hastanın cinsiyeti, yaşı, karsinoembriyonik antijen (CEA), CA 19-9 değerleri, tümörün histolojik tipi, diferansiyasyon derecesi (az, orta, iyi), T, N, M evresi değerlendirmeye alındı.

Hastaların tümörlerine ait lamalar Patoloji Anabilim Dalı arşivinden çıkarılarak histokimyasal değerlendirme yapıldı. Histokimyasal değerlendirmede tümörde ülserasyon, nekroz, dezmoplazi, vasküler, lenfatik, perinöral invazyon varlığı ve lenfoid infiltrasyon 1-3 arasında derecelendirilerek kaydedildi.

Lamlar içerisinde immünohistokimyasal inceleme için uygun olan tümör dokusunu içerenlerin parafin blokları doku arşivinden çıkarılarak 3-5 mikronluk kesitler elde edildi ve poli-L-lizin kaplı lamalar üzerine alındı.

1. Deparafinizasyon için ksilen içerisinde iki kez 5 dakika ve ardından 5'er dakika sürelerle sırasıyla %100, %90 ve %80 etanol içerisinde bekletildi. Daha sonra akan su altında 2 dakika yıkandı ve ardından distile su içerisinde 5 dakika bekletildi (rehidrasyon).

2. Antijen “retrieval” sitrat tamponu ve mikrodalga fırında olmak üzere iki ayrı aşamada gerçekleştirildi. Lamlar içerisinde kaynamakta olan sitrat tamponu (pH 6) bulunan düdüklü tencere içerisine yerleştirildi. Tencere kapatılarak buhar valfindan tamamen buhar çıkana kadar yaklaşık 5 dakika ısıtılmaya devam edildi. Daha sonra basınç valfi kapatıldı ve 2 dakika daha ısıtılmaya devam edildi. Daha sonra 20 dakika süre ile oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı, daha sonra kapak açılarak lamlar içerisinde sitrat tamponu bulunan plastik preparat kavanozlarına kondu. Kavanoz mikrodalga fırında 2 defa 5 dakika süreyle 600 Watt ısınladı. Kavanoz ve preparatlar oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Daha sonra preparatlar “phosphate buffer saline” çözeltisine alındı.

3. Lamlar daha sonra COX-2 monoklonal antikorunun (Takara, Kod no M160, Klon no CX229, Japonya) 2.5 ug/ml 1/20’lik çözeltisi ile oda sıcaklığında bir gece inkübe edildi. Daha sonra lamlar 5 dakika PBS ile yıkandı. Ardından biotinli sekonder antikor (LabVision, Katalog no Tm-125-HC, Fremont, CA, ABD) ile 20 dakika inkübe edildi ve yeniden PBS 5 dakika iki kez yıkandı.

4. Lamlar streptavidin HRP (LabVision, Katalog no Tm-125-HC, Fremont, CA, ABD) ile 20 dakika süre ile inkübe edildi. Ardından yeniden PBS ile 5 dakika iki kez yıkandı.

5. AEC kromojen sistemi (LabVision, Katalog no Tm-125-HA, Fremont, CA, ABD) ile 10 dakika renklendirme yapıldı ve 2 kez distile su ile yıkandı. Daha sonra Mayer hematoksilen ile 3 dakika süreyle zıt boyama yapıldı. Lamlar daha sonra glisin jel bazlı kapatma maddesi kullanılarak lam ile kapatıldı. Antijen “retrieval” dışındaki tüm işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

II.2. Mikroskopik inceleme

Mikroskopik inceleme Olympus marka BX50 mikroskop ile 10X/22 oküler kullanılarak yapıldı. Pozitif endojen kontrol olarak kesitlerdeki normal mukoza,

iltihap hücreleri ve stromal hücreler kullanıldı. Tümör hücrelerindeki immünoreaktivite yaygınlık derecesi ve reaksiyon şiddeti açısından incelendi. Yaygınlık derecesi için boyanan tümör hücre alanlarının yüzdesi göz önüne alındı. Buna göre; 0= hiç boyanma yok, 1= <%10 boyanma, 2= %10-29 boyanma, 3= %30-60 boyanma, 4= >%60 boyanma olarak değerlendirili. Reaksiyon şiddeti için enflamatuvar hücrelerdeki renk şiddeti kriter alındı. Bu hücreler düzeyindeki boyanma 2, daha yoğun boyanma 3, daha hafif boyanma 1 olarak kabul edildi.

Hastaların cinsi, T, N, M evreleri, klinik verileri, vasküler, lenfatik, perinöral tümör invazyonları ve lenfoid infiltrasyon Pearson ki-kare testi ile; yaş, CEA, CA 19-9, nekroz ve dezmoplazi değerleri ise Mann Whitney-U ile analiz edildi. Pearson ki kare testinde gruplar içerisinde sıklığı düşük olan parametreler diğer parametrelerle birleştirilerek gruplandı. İstatistiksel değerlendirmede SPSS (sürüm 7.5) istatistik programı kullanıldı.

Çalışmada İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Patoloji Bilim Dalı ve İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nın olanaklarından yararlanıldı. Gerekli malzeme araştırmacı tarafından temin edildi.

III.Bulgular

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü arşiv kayıtlarından 1998 yılında kolorektal kanser tanısıyla başvurmuş 116 hasta olduğu belirlendi. Bu hastaların arşivden 80'inin dosyalarına ulaşılabildi. Seksen dosya patolojik değerlendirmelerine göre tarandı. Hastaların 29'unun patolojik değerlendirmesinin İTF Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldığı saptandı. İTF Patoloji Anabilim Dalı arşivinde yapılan incelemede ise bu hastaların 23'inin bloklarına ulaşılabildi. İmmünohistokimyasal değerlendirme bu 23 hastanın klinik verileri değerlendirme kapsamına alındı.

III.1.Hastalar ve klinik özellikleri

Hastaların 17'si (%58.6) erkek, 12'si kadındı (%41.4). Medyan yaş 56 olarak bulundu (35-75). Bütün vakaların tanısı adenokarsinomdu. İki (%6.9) hastada iyi diferansiye, 23 (%79.3) orta derecede diferansiye ve 4 (%13.8) az diferansiye karsinom saptandı. Hastaların 22'sinin CEA ve CA19-9 değerlerine ulaşılabilirdi. CEA değeri ortalama 14.16 (0.1-255), CA 19-9 değeri ortalama 128.7 (0.0-1000) bulundu.

III.2. COX-2 immünopozitivitesi

Bütün vakalarda COX-2 tümör hücrelerinde yaygın boyanma görüldü. Bazı stromal hücrelerde, endotelyal hücrelerde ve kolonun normal mukozasında boyanma görülmekle birlikte, kanser dokusuna komşu normal mukozada zayıf boyanma saptandı.

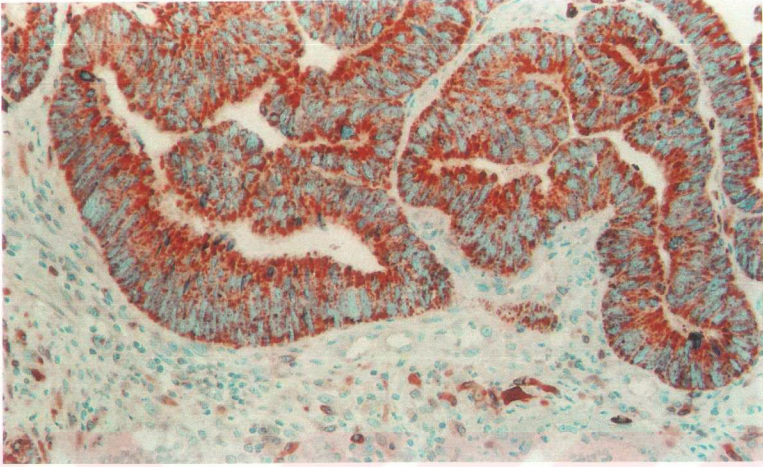
COX-2 immünoreaktivitesinin yaygınlığı vakaların üçünde %30-60, 20'sinde ise %60'ın üzerinde saptandı. Boyanmanın şiddeti vakaların birinde enflamatuvar hücrelerden daha zayıf, 10'ünde eşdeğer ve 12'sinde daha şiddetli bulundu. COX-2 immünopozitivitesi normal mukoza dokusunda apikal yüzeyde saptanırken, tümör dokusunda hem bazal bölgelerde hem de apikalde yoğunlaşmaktaydı. Parafin blokların seçiminde özellikle ülser bulunan örnekler çalışma kapsamına alınmamış olmakla birlikte, inceleme yapılan lamlarda ülser olan bölgelerde de şiddetli boyanma saptandı. Yine doku içerisinde enflamatuvar hücre infiltrasyonu olan bölgelerde boyanma şiddeti daha yüksek bulundu (Tablo 3 ve 4, Resim 1-12).

Tablo 3. COX-2 boyanma yaygınlığı

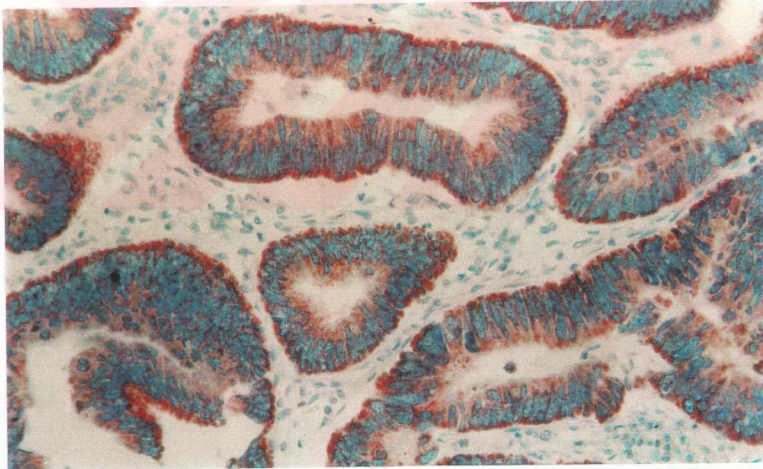
	N	%
1-2	0	0
3	3	10,3
4	20	69,0
Total	23	79,3

Tablo 4. COX-2 boyanma şiddeti

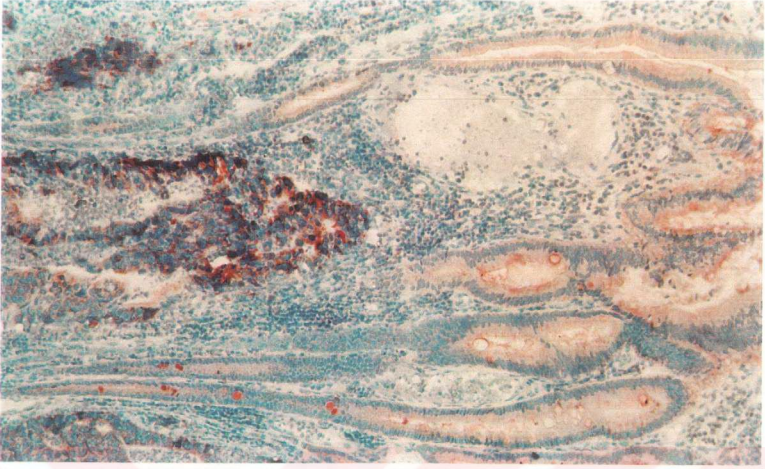
	N	%
1	1	3,4
2	10	34,5
3	12	41,4
Total	23	79,3



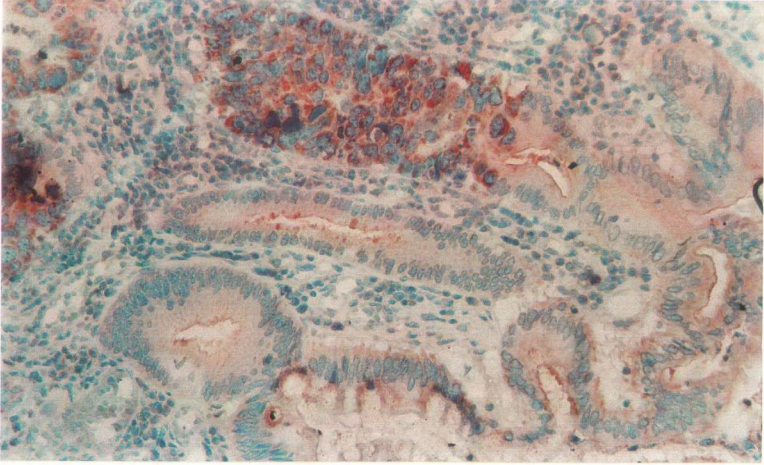
Resim 1. Neoplastik epitel hücre stromalarının hem bazal hem de apikal bölgelerinde ve stromadaki enflamatuar hücrelerde kuvvetli COX-2 immünoreaktivitesi (İTF Patoloji AbD Protokol no 16737-98, AEC kromojen, 200 büyütme).



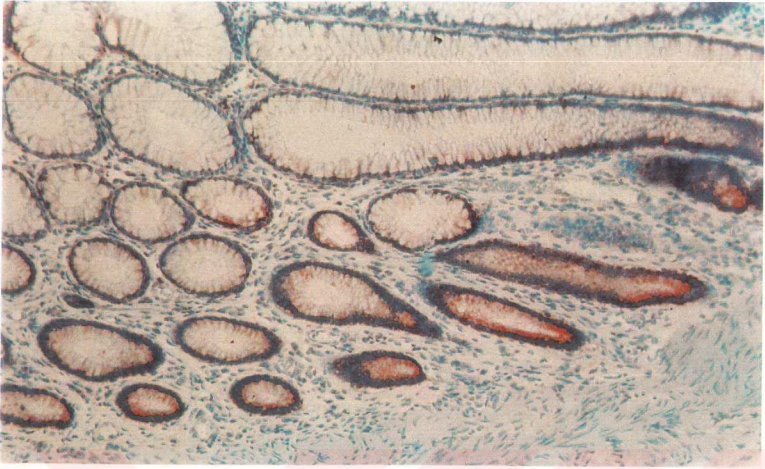
Resim 2. Neoplastik epitel hücre stromalarının ön planda bazal bölgelerine lokalize orta-kuvvetli derecede COX-2 immünoreaktivitesi (İTF Patoloji AbD Protokol no 18093-98, AEC kromojen, 200 büyütme).



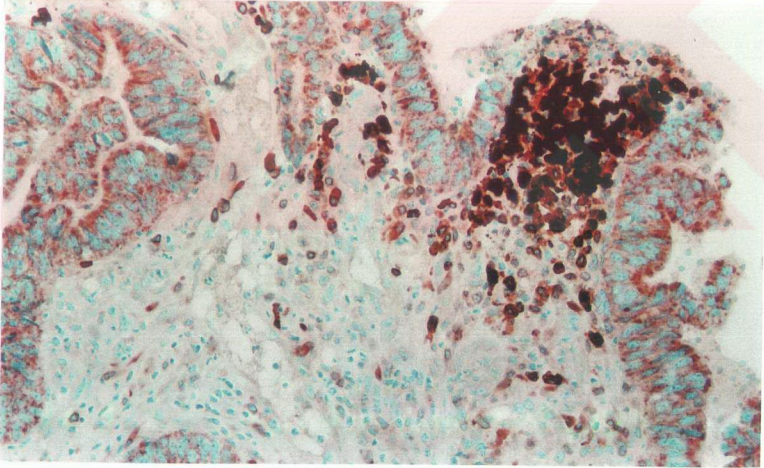
Resim 3. Neoplastik guddesel yapılarda kuvvetli, normal mukozal guddelerde zayıf COX-2 immünoaktivitesi (İTF Patoloji AbD Protokol no 11811-98, AEC kromojen, 100 büyütme).



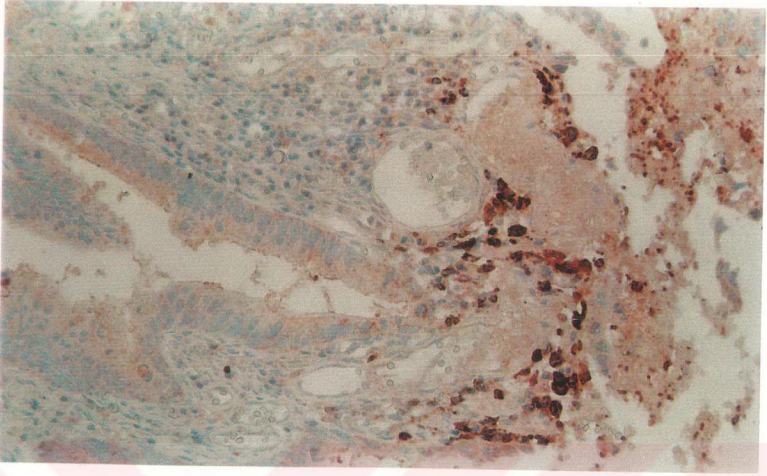
Resim 4. Neoplastik guddesel yapılarda kuvvetli, normal mukozal guddelerde zayıf ve apikal lokalizasyonlu COX-2 immünoaktivitesi (İTF Patoloji AbD Protokol no 11811-98, AEC kromojen, 200 büyütme).



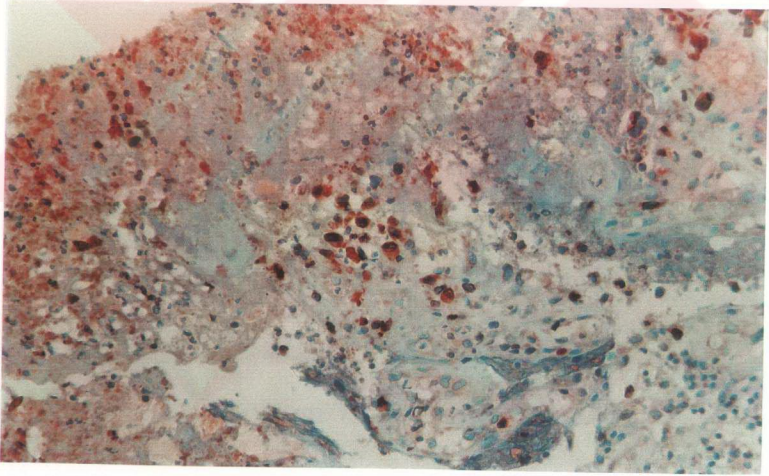
Resim 5. Normal bağırsak mukopa guddelerinde zayıf supranükleer-apikal COX-2 immünoreaktivitesi (İTF Patoloji AbD Protokol no 18093-98, AEC kromojen, 100 büyütme).



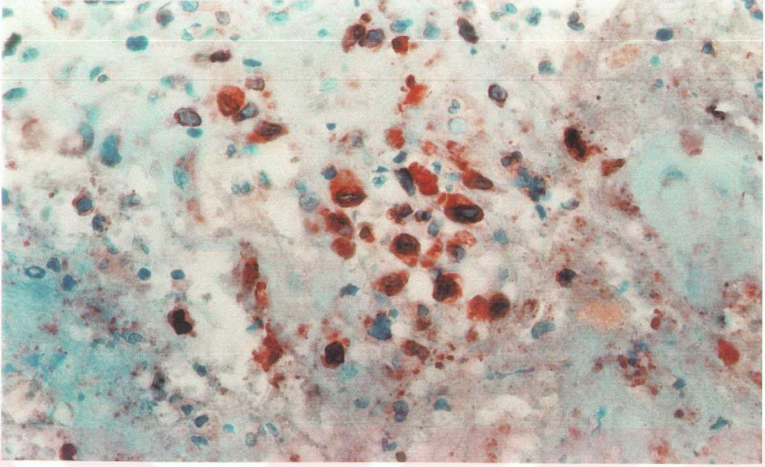
Resim 6. Neoplastik guddesel epitel hücrelerinde orta, erezyon alanı zeminindeki enflamatuar hücrelerde kuvvetli derecede COX-2 immünoreaktivitesi (İTF Patoloji AbD Protokol no 16737-98, AEC kromojen, 200 büyütme).



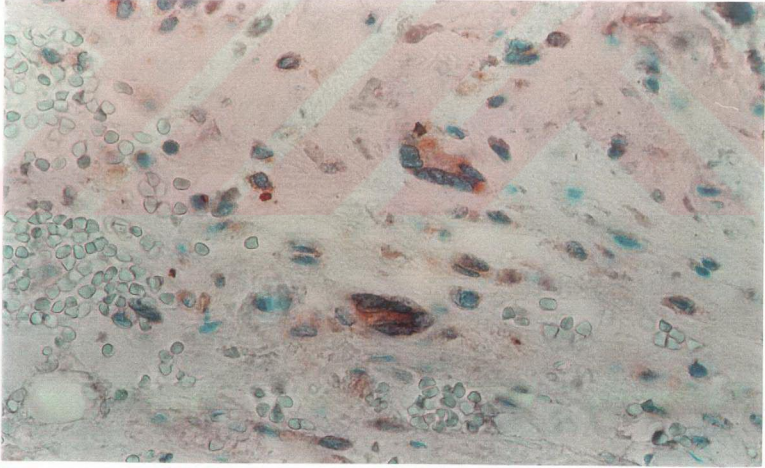
Resim 7. Ülserasyon zeminindeki enflamatuar hücrelerde kuvvettli, neoplastik guddesel epitel hücrelerinde zayıf derecede COX-2 immünoreaktivitesi (İTF Patoloji AbD Protokol no 11321-98, AEC kromojen, 200 büyütme).



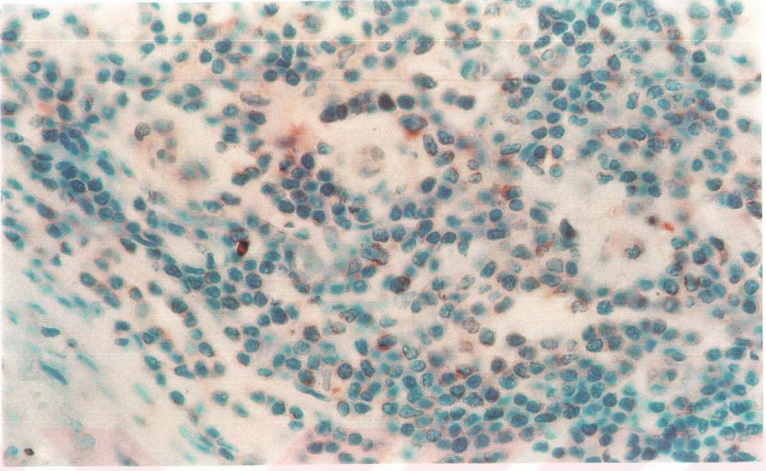
Resim 8. Ülser yüzeyindeki enflamatuar hücrelerde kuvvetli derecede COX-2 immünoreaktivitesi (İTF Patoloji AbD Protokol no 23130-98, AEC kromojen, 200 büyütme).



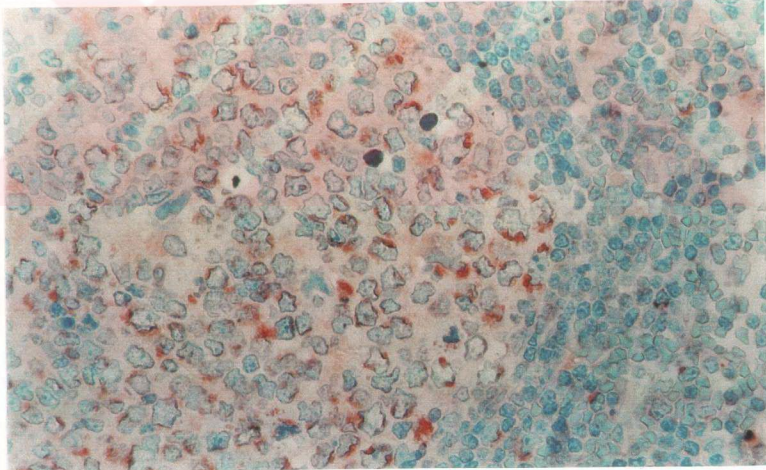
Resim 9. Aynı hücrelerin daha büyük büyütme ile görüntüsü (İTF Patoloji AbD Protokol no 23130-98, AEC kromojen, 400 büyütme).



Resim 10. Serozada kronik iltihabi reaksiyon içinde yer alan yabancı cisim dev hücresi tipindeki histiositik dev hücrelerde orta şiddette COX-2 immünoreaktivitesi (İTF Patoloji AbD Protokol no 23130-98, AEC kromojen, 400 büyütme).



Resim 11. Bağırsak duvarındaki kronik iltihabi infiltrasyonda fokal zayıf COX-2 immünoreaktivitesi (ITF Patoloji AbD Protokol no 23130-98, AEC kromojen, 400 büyütme).



Resim 12. Serozadaki lenf nodüllerinden birindeki sekonder lenfoid folikülde sentroblastik hücrelerde kuvvetli COX-2 immünoreaktivitesi (ITF Patoloji AbD Protokol no 18622-98, AEC kromojen, 400 büyütme).

III.3. İstatistiksel değerlendirme sonuçları

İstatistiksel değerlendirme sonuçları aşağıda görülmektedir. Hiçbir parametre için anlamlı ilişki gösterilemedi (Tablo 5-13).

Tablo 5. COX-2 şiddeti ve cinsiyet

			CINS		Total	P = 0.381
			1,00	2,00		
K-2 şiddeti	2,00	Sayı	8	2	10	
		COX-2 şiddetindeki %	80,0%	20,0%	100,0%	
	3,00	Sayı	7	5	12	
		COX-2 şiddetindeki %	58,3%	41,7%	100,0%	
Total		Sayı	15	7	22	
		COX-2 şiddetindeki %	68,2%	31,8%	100,0%	

Tablo 6. COX-2 şiddeti ve T evresi

			T		Total	P=1.00
			3,00	4,00		
K-2 şiddeti	2,00	Sayı	7	2	9	
		COX-2 şiddetindeki %	77,8%	22,2%	100,0%	
	3,00	Sayı	10	2	12	
		COX-2 şiddetindeki %	83,3%	16,7%	100,0%	
Total		Sayı	17	4	21	
		COX-2 şiddetindeki %	81,0%	19,0%	100,0%	

Tablo 7. COX-2 şiddeti ve N evresi

			N		Total	P=0.659
			,00	1,00		
K-2 şiddeti	2,00	Sayı	2	7	9	
		COX-2 şiddetindeki %	22,2%	77,8%	100,0%	
	3,00	Sayı	4	8	12	
		COX-2 şiddetindeki %	33,3%	66,7%	100,0%	
Total		Sayı	6	15	21	
		COX-2 şiddetindeki %	28,6%	71,4%	100,0%	

Tablo 8. COX-2 şiddeti ve M evresi

			M		Total	P=1.00
			,00	1,00		
K-2 şiddeti	2,00	Sayı	6	4	10	
		COX-2 şiddetindeki %	60,0%	40,0%	100,0%	
	3,00	Sayı	8	4	12	
		COX-2 şiddetindeki %	66,7%	33,3%	100,0%	
Total		Sayı	14	8	22	
		COX-2 şiddetindeki %	63,6%	36,4%	100,0%	

Tablo 9. COX-2 şiddeti ve lenfatik invazyon

			LENF		Total	P=1.00
			,00	1,00		
K-2 şiddeti	2,00	Sayı	2	7	9	
		COX-2 şiddetindeki %	22,2%	77,8%	100,0%	
	3,00	Sayı	2	9	11	
		COX-2 şiddetindeki %	18,2%	81,8%	100,0%	
Total		Sayı	4	16	20	
		COX-2 şiddetindeki %	20,0%	80,0%	100,0%	

Tablo 10. COX-2 şiddeti ve vasküler invazyon

			VASK		Total	P=1.00
			,00	1,00		
K-2 şiddeti	2,00	Sayı	2	7	9	
		COX-2 şiddetindeki %	22,2%	77,8%	100,0%	
	3,00	Sayı	3	8	11	
		COX-2 şiddetindeki %	27,3%	72,7%	100,0%	
Total		Sayı	5	15	20	
		COX-2 şiddetindeki %	25,0%	75,0%	100,0%	

Tablo 11. COX-2 şiddeti ve perinöral invazyon

			PERINOR		Total	P=1.00
			,00	1,00		
K-2 şiddeti	2,00	Sayı	3	6	9	
		COX-2 şiddetindeki %	33,3%	66,7%	100,0%	
	3,00	Sayı	4	7	11	
		COX-2 şiddetindeki %	36,4%	63,6%	100,0%	
Total		Sayı	7	13	20	
		COX-2 şiddetindeki %	35,0%	65,0%	100,0%	

Tablo 12. COX- şiddeti ve lenfoid infiltrasyon

			LENFOID		Total	P=0.566
			1,00	2,00		
K-2 şiddeti	2,00	Sayı	7	2	9	
		COX-2 şiddetindeki %	77,8%	22,2%	100,0%	
	3,00	Sayı	10	1	11	
		COX-2 şiddetindeki %	90,9%	9,1%	100,0%	
Total		Sayı	17	3	20	
		COX-2 şiddetindeki %	85,0%	15,0%	100,0%	

Tablo 13. COX-2 şiddetinin yaş, nekroz, dezmoplazi, CEA ve CA 19-9 ile ilişkisi

(Mann-Whitney testi)

	Yaş	Nekroz	Dezmoplazi	CEA	CA19-9
Mann-Whitney U	42,500	41,000	43,500	28,000	28,000
Z	-1,155	-,734	-,500	-,218	-,217
Kesin anlamlılık	,254(a)	,552(a)	,656(a)	,875(a)	,875(a)

IV. Tartışma

İmmünohistokimyasal yöntemler ilk tanımlanmaları ve tanı amaçlı kullanılmalarından bu yana önemli gelişmeler kaydetmiştir. Başlangıçta poliklonal antikörlerin kullanılması nedeniyle ortaya çıkan çapraz reaksiyonlar, monoklonal antikörlerin uygulama alanının genişmesiyle birlikte azalmıştır. Bu çalışmada kullanılan COX-2 immünohistokimya kiti de monoklonaldır ve bu nedenle hedef dokuda spesifik boyanma elde edilebilmektedir.

Araştırmada kontrol amacıyla preparatlardaki normal mukoza ve enflamasyon hücrelerinin boyanma özellikleri kullanılmıştır. Normal kolon dokusunda COX-2 immünopozitivitesi çok zayıf olarak izlenirken, tümör dokusunda ve enflamasyon hücrelerinde yüksek pozitifite değerlerinin bulunması, boyanmanın COX-2'ye spesifik olduğunu göstermektedir.

Siklooksijenaz-2'nin kolorektal kanser vakalarındaki ekspresyonu ülkemizde ilk defa araştırılmaktadır. Hasta sayısının yüksek olmamasına karşılık bu çalışma diğer çalışmalardan farklı veriler ortaya koymuştur. Birincisi bu çalışmada gösterilen pozitiflik oranı diğer çalışmaların üzerindedir. Tomozowa ve ark.'nın çalışmasına toplam 63 vaka alınmış, bunların 13'ünde yüksek pozitiflik, 50'sinde zayıf pozitiflik bulunmuştur. Bu çalışmanın araştırma yöntemi bizim çalışmamıza benzer olduğundan, karşılaştırma yapılması mümkün olmaktadır. Söz konusu araştırmada yaş, cinsiyet, tümör büyüklüğü, tümör yerleşimi, histolojik tip, invazyon derinliği, lenfatik ve venöz invazyon, lenf nodu metastazı ve evreleme ile COX-2 immünopozitivitesi arasında korelasyon bulunmazken, COX-2 immünoaktivitesinin nüks ve hematogen metastaz açısından anlamlı prognostik değeri olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. COX-2 immünopozitivitesinin hastalıksız ve toplam sağkalımı belirlemede de prognostik değeri olduğu bulunmuştur (46). Bu çalışmadaki hasta sayısının az olması, korelasyon hesaplarının güvenli yapılmasına

olanak vermemektedir. Öte yandan hastaların çoğunun dosya bilgileri kısıtlı olduğundan prognoz ile ilişkinin karşılaştırılması da mümkün olmamaktadır.

COX-2 immünoaktivitesinin şiddeti tümör dokusunda yükselmektedir. Bu bulgu enflamasyon-kanser arasında basamaklı bir dönüşüm olduğuna işaret edebilir. Ancak kronik enflamasyon ile malign transformasyon arasındaki ilişki açık değildir. Kolorektal kanser ve pankreas kanseri gelişiminde enflamasyon ile bir ilişki ileri sürülebilmektedir (2, 18). Safra kanalları ile ilgili kronik enflamatuvar durumların safra kanalı karsinomu gelişimine zemin hazırladığı bilinmektedir.

İmmünohistokimya ile bilgisayarlı tomografi teknikleri kullanılarak epitelyal hücrelerdeki COX-2 protein ekspresyon düzeyleri histopatolojik özellikleriyle bağlantılı olacak şekilde kantitatif olarak karşılaştırıldığında en yüksek COX-2 düzeylerinin safra kanalı karsinomu hücrelerinde, büyük oranda hücre sitoplazmasında bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Kanserli olmayan, inflamatuvar reaksiyon saptanan epitelyal hücrelerde de orta derecede COX-2 protein ekspresyonu gözlenmiştir. Ancak bu hücrelerdeki boyanma yoğunluğu heterojendir. Tersine kanserli olmayan ve inflamatuvar reaksiyon görülmeyen epitelyal kanal hücrelerinde yalnızca dağınık ve zayıf COX-2 protein ekspresyonu saptanmıştır. Ayrıca primer sklerozan kolanjitte, karsinom hücrelerindeki benzer şekilde çok güçlü bir COX-2 protein ekspresyonu gösterilmiştir. Bu veriler COX-2 ekspresyonunun inflamatuvar bölgelerdeki safra kanalı epitelyal hücrelerinde gelişen karsinogenezi ve bu kanserdeki tümör progresyonunu düzenleyebileceğini düşündürmektedir (47). Bu veriler bizim çalışmamızdaki boyanma paterniyle uyumludur ve gastrointestinal kanserlerin gelişiminde benzer aşamalar olabileceğine işaret etmektedir.

Bir başka çalışmada COX-2 ve prostaglandin E₂'nin (PGE₂) endometriyum adenokarsinomundaki olası rolü araştırılmıştır. Farklı gradlardaki adenokarsinom örneklerinde ribonükleaz proteksiyon testi ile COX-2 RNA ekspresyonu doğrulanmıştır. COX-2 ve mikrozomal glutatyona bağımlı prostaglandin E sentaz ekspresyonunun ve PGE₂ sentezinin neoplastik epitelyal hücrelerle endotelial hücrelerde gerçekleştiği belirlenmiştir. PGE₂'nin adenokarsinomlarda otokrin/parakrin etki gösterip göstermediğini saptamak için 2 farklı PGE₂ reseptörü,

EP2 ve EP4 ekspresyonu araştırılmıştır. Farklı diferansiyasyon gradlarındaki bütün adenokarsinomlarda EP2 ve EP4 reseptörlerinin ekspresyonu saptanmıştır ve ekspresyon düzeyi normal sekretuvar fazdaki endometriyumdakinden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Karsinom dokusunda PGE₂'ye yanıt olarak cAMP üretiminin normal sekretuvar fazda endometriyumdakine göre anlamlı derecede fazla olduğu belirlenmiştir (48)

COX-2'nin indüklenebilir formunun ekspresyonunun insan transisyonel hücreli mesane karsinomu gelişimi ile de ilişkili olduğu bilinmektedir. Ancak COX-2 ekspresyonunun klinikopatolojik bulgular ve hasta sağkalımı açısından klinik anlamı bilinmemektedir. Transisyonel hücreli karsinom nedeniyle radikal sistektomi geçirmiş 108 hastadan elde edilen tümör dokularında, klinikopatolojik bulgular bilinmeksizin, immünohistokimyasal yöntemle COX-2 ekspresyonu incelenmiştir. 108 tümörün 34'ünde (%31) COX-2 ekspresyonu saptanmış, buna karşılık 10 normal üroepitelyal örneğin hiç birinde ekspresyon gözlenmemiştir. Tek değişkenli lojistik regresyon analizi COX-2 ekspresyonu ile lokal invazyon, infiltrasyon paterni, lenfatik invazyon ve venöz invazyon arasında anlamlı korelasyon olduğunu göstermiştir. Hem lokal invazyon hem de lenf nodu metastazının bağımsız prognostik faktörler olduğu, ancak COX-2 ekspresyonunun bağımsız prognostik faktör olarak rol oynamadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, COX-2 aşırı ekspresyonunun transisyonel hücreli karsinom gelişiminde ve invazyonda rol oynadığı, ancak hastaların prognozunu etkilemediği saptanmıştır (49).

COX-2'nin karsinogenezdeki yerini saptamaya yönelik çalışmalar ve bizim bulgularımız karsinogenezde sadece prostaglandin senteziyle açıklanamayan, enflamasyonun ötesinde başka mekanizmaların etkili olduğuna işaret etmektedir. Çalışmalar başlatıcı olayın tipik bir 'gate-keeper' geni örneği olan APC'deki mutasyonun COX-2 indüksiyonu ile sonuçlandığını düşündürmektedir. Bu olayın büyük ölçüde COX-2 gen transkripsiyonunda artış aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. COX-2, indüksiyonu takiben araşidonik asit oksidasyonunu katalizleyerek prostaglandinlerin ve karsinogenezi hızlandırabilecek yüksek derecede reaktif bazı yan ürünlerin ortaya çıkmasına yol açar. COX-2 aktivitesinin uyarılması,

hücre içerisindeki reaktif metabolitlerin artışına neden olabilir ve sonraki mutasyonlar için zemin hazırlayabilir. Nitekim bizim çalışmamızda COX-2 immünoreaktivitesinin bütün hücrede yaygın olarak gözlenmesi, hem sitoplazmik hem de nükleer aktivitenin artışına işaret etmektedir. COX-2 katalizinin koruyucu bir ajanı ortadan kaldırarak onkojenik bir ajan/ajanları açığa çıkarması olasıdır (30, 31).

Bu olasılıklardan her ikisinin de deneysel dayanakları vardır. Birçok grup yüksek konsantrasyonlarda serbest arasıdonik asidin apoptozisi, prostaglandin oluşumundan bağımsız olarak promote ettiğini göstermiştir (39, 40). Artmış COX-2 düzeylerinin hücre içi serbest arasıdonik asit düzeylerini azaltarak apoptozisi önlemesi olasıdır. Bu durumda COX-2 katalizi apoptotik sinyali tüketen basit bir işlem gibi gözükmemektedir. İkinci olasılık, COX-2'nin enzimatik etkinliği sonucu oluşan ürünlerin, olasılıkla da prostaglandinlerden birinin hücre büyümesi, apoptozis, anjiyogenez ya da kansere götüren diğer basamaklarda değişikliğe neden olmasıdır. Çeşitli çalışmalarda bu olasılık araştırılmış ve prostaglandinlerin hücre büyümesi ve farklılaşmasını yöneten çoğu hücresel işlemi modüle ettiği ortaya konmuştur. Örneğin; bağırsak epitel hücrelerinde COX-2 indüksiyonu hücrelerin adezyonunu artırmakta ve aynı zamanda belirli apoptotik uyaranlara karşı yanıtı azaltmaktadır (40). COX-2 ile COX-1 anjiyogenez indüksiyonunda eşgüdümlü çalışmakta ve PGE2'nin Bcl-2 protoonkogeninin ekspresyonunu indükleyerek programlanmış hücre ölümünü inhibe etmektedir (37).

COX-2 düzeyinin kolorektal kanserlerde boyut ve invazyon derecesine paralel olarak artması ilginç bir bulgudur (21). Bizim çalışmamızda histopatolojik veriler ve COX-2 boyanma şiddeti arasında bir ilişki gösterilemese de daha geniş vaka serileri bir ilişki varlığına işaret etmektedir. Öte yandan spesifik COX-2 inhibitörü olan rofekoksib uygulamasının Apc^{A716} farelerdeki kolon polipleriyle intestinal poliplerin sayı ve büyüklüğünde doza bağımlı bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Polip sayısında %55 inhibisyona ve >1mm büyüklüğündeki poliplerde %80 inhibisyona yol açan plazma konsantrasyonu insanlarda günde bir kez rofekoksib alınmasıyla sağlanan klinik kararlı durum konsantrasyonuna benzerdir. Hem tedavi uygulanmamış hem de rofekoksib ya da sulindak uygulanan Apc^{A716} farelerdeki

poliplerde COX-1 ve -2 ekspresyonu saptanmıştır. Buna karşılık bütün farelerdeki normal epitelde COX-1 ekspresyonu izlenmiş, ancak COX-2 ekspresyonunun minimal olduğu belirlenmiştir. Rofekoksib ya da sulindak uygulanan farelerdeki poliplerde DNA replikasyon oranlarının daha düşük, proanjyogenik vasküler endotel kökenli büyüme faktörü ekspresyonunun daha az, membrana bağlı β -katenin ekspresyonunun daha fazla olduğu, ancak bu transkripsiyon faktörünün nükleer yerleşiminin değişmediği saptanmıştır. $Apc^{\Delta 716}$ farelerde polipozisin inhibisyonunun gösteren bu çalışma spesifik COX-2 inhibitörü olan rofekoksibin insan intestinal ve kolon kanserlerinde kemoprevantif ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (50).

Tümör oluşumunu promote eden sinyal bir prostaglandinse bu olaylarda nasıl bir sinyal yolağı oluşturduğuna ilişkin çok sayıda açıklama getirilebilir. Hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla etki göstermesi olasıdır ve bu yolak için en olası aday, kolon dokusunda üretilen baskın prostaglandin olan PGE2 reseptör ailesinin bir üyesidir. Diğer bir seçenek, prostaglandinlerin nükleer bir reseptör aracılığıyla işlev görmeleridir. Böylece söz konusu olasılıklar prostaglandinlerin salgılanıp üretildikleri hücredeki ya da komşu hücre üzerindeki yüzey reseptörlerine bağlanarak otokrin veya parakrin etki göstermesi ya da bir nükleer reseptörün 'intrakrin' aktivasyonudur. Bizim çalışmamızda da COX-2 immünoreaktivitesi bütün sitoplazmada yaygın olarak saptanmıştır. Normal hücrelerde sadece apikal bölgede immünoreaktivite gözlenmesi, tümör hücrelerinin yaygın olarak COX-2 etkisine maruz kaldığını göstermektedir. Artmış COX-2'nin 'downstream' etkilerinde medyatör rolü oynayan prostaglandinler olması olasılığının yanı sıra yıkıcı etkileri olan başka ürünlerin bulunması da olasıdır. COX-2 bir oksijenazdır ve ara metabolitler yüksek derecede reaktiftir. Bu ara metabolitlerin ya da diğer ürünlerin makromoleküllerin, örneğin DNA'nın türevlerini meydana getirerek tümör oluşumunu kolaylaştırması olasıdır. Buna ek olarak, COX-2'nin katalizlediği ikinci basamak kofaktöre gereksinim duyan bir redüksiyondur. Birçok bileşik bu kofaktör olarak işlev gördüğü için ko-oksitelebilir. Örneğin, bu reaksiyon östrojeni karsinojenik bir yan ürüne oksitleyebilir. Mekanizma ne olursa olsun, bu çalışmada

COX-2 imm nopozitivitesinin yaygın olduğunun saptanması, bütün tümör dokusunda etkin olduğunu göstermektedir.

eIF4E, yassı epitel hücreli baş boyun kanseri nedeniyle definitif tedavi sonrası yüksek yineleme riski taşıyan bireylerin belirlenmesinde kullanılabilen bir ‘biyomarker’dir. COX-2’nin baş-boyun kökenli displazilerde eksprese olup olmadığı araştırılmıştır. Normal epitel, displazi, tümöre bitişik mukoza ve baş-boyun kanserlerinde immünohistokimyasal yöntemle COX-2 ve eIF4E ekspresyonu araştırılmış, immünohistokimyasal analiz bütün kanserlerde COX-2 ve eIF4E ekspresyonu olduğunu, buna karşılık normal dokularda ekspresyon olmadığını göstermiştir. Displastik epitelde eIF4E ve COX-2 ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon saptanmıştır. Displazi derecesinin artışına paralel olarak her iki moleküler ‘marker’ı da eksprese eden olguların oranının arttığı belirlenmiştir (51).

COX-2 ekspresyonunun wild-type p53 ile ilişkili olabileceği de ileri sürülmüştür. Wild-type p53 COX-2’nin promotör bölgesine in vitro yarışmalı olarak bağlanır ve transkripsiyonunu inhibe eder. Mide kanserinde p53 mutasyonu ile COX-2 ekspresyonu arasındaki ilişki incelenmiştir. On dokuz olguda (%48.7) COX-2 aşırı ekspresyonu izlenmiştir. Bu tümörlerde daha fazla lenf nodu metastazı olduğu ve sağkalımın daha kötü gitme eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. Yanlış anlamlı p53 mutasyonları 20 hastada (%51.3) saptanmış ve p53 mutasyonu görülmeyen t m rlerdekine göre anlamlı derecede güçlü COX-2 ekspresyonu ile ilişkili oldukları belirlenmiştir. Bu sonuçlar mide kanserinde p53 mutasyonu ile COX-2 aşırı ekspresyonu arasında bir bağlantı olabileceğini düşündürmektedir (25).

Selektif COX-2 inhibitörü olan selekoksibin FAP’taki adenomatöz poliplerde regresyon oluşturabilme özelliği yakın zamanlı randomize, çift kör, plasebo kontrollü, FAP’lı 77 hastayı içeren bir çalışmada değerlendirilmiştir. Selekoksib 6 ay süreyle günde iki kez iki dozda (100 mg ve 400 mg) uygulanmıştır. Günde iki kez 400 mg selekoksib uygulanan koldaki kolorektal poliplerde %28, plasebo grubundakilerdeyse %4.5 oranında azalma görülmüştür ($p=0.003$). Benzer şekilde, polip yükü (polip çaplarının toplamı) günde iki kez 400 mg selekoksib alan

hastalarda (%30.7 azalma) plasebo koluna (%4.9 azalma) göre anlamlı derecede azalmıştır ($p=0.001$). Dahası, günde iki kez 400 mg selekoksib kullanan hastaların %53.3'ünde yanıt (polip sayısında en az %25 oranında azalma) alınırken, plasebo alan grupta yanıt oranı %6.7 bulunmuştur ($p=0.003$). Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak selekoksibin FAP'lı hastalarda yardımcı tedavi için kullanılması onaylanmıştır (52, 11). Benzer sonuçlar ülkemizde yapılan bir başka çalışmada da gözlemlenmiştir. Selekoksib kullanan 19 hastanın ikisinde saptanan hiperplastik mide polibi, üçüncü ayın sonunda regrese olmuştur (53).

V. Sonuç

COX-2 geninin yaklaşık 10 yıl önce bulunduğu düşünülürse çok hızlı bir gelişme kaydedilmiştir. COX-2 ile karsinogenez arasındaki bağlantı tanımlanmış olsa da henüz yanıtlanmamış pek çok soru vardır. Selektif COX-2 inhibitörlerinin (rofekoksib ve selekoksib) hem antineoplastik özellikleri hem de mükemmel bir güvenlik profili bulunmaktadır. Bu nedenle bu yeni ajanlar sınıfının kanseri önleme potansiyelinin açıkça tanımlanması önemlidir. Kolorektal adenom prevansiyonu ile ilgili çalışmaların yanı sıra özofagus, oral kavite, cilt ve mesane kanserleri açısından risk altında olan hastalarda yürütülen çalışmalar da önemli bilgi verecektir. Selektif COX-2 inhibitörlerinin serviks, meme, prostat ve karaciğer kanserlerini önlemedeki rolü dikkatle değerlendirilmelidir.

Ülkemiz koşullarında yürütülen bu çalışmada ülkemizdeki kolorektal kanserlerde COX-2 ekspresyonu yüksek bulunmuştur. COX-2'nin pozitif olduğu vakalarda selektif COX-2 inhibitörü ilaçların adjuvan ya da koruma amaçlı kullanılması doğru bir yaklaşım olarak görülmektedir. COX-2 pozitif hastalarda bu ilaçların etkinliğinin saptanması için randomize kontrollü klinik çalışmaların başlatılması rasyonel görülmektedir.

ÖZET

Prostaglandinler pek çok fizyolojik işlevde önemli medyatörlerdir. Enflamasyonun ortaya çıkmasından sorumlu prostaglandinler ve tromboksanlar araşidonik asitten siklooksijenaz (COX) enzimi aracılığı ile sentezlenirler. Son yıllarda yapılan araştırmalar siklooksijenazın en az iki farklı izoformu olduğunu ortaya koymuştur; bu enzimler COX-1 ve enflamasyon sırasında indüklenebilme özelliği gösteren COX-2 olarak adlandırılmaktadır. İndüklenebilir form olan COX-2 daha çok patofizyolojik olaylar sırasında ortaya çıkmakta ve sentezi sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından değiştirilebilmektedir. Yakın zamanda yapılan bir dizi çalışma COX-2 enziminin bir dizi kanser türünde eksprese edildiğini ortaya koymuştur. COX-2'nin selektif inhibisyonu farklı kolorektal karsinogenez modellerinde tümör gelişimini inhibe etmektedir. Bu bulgular sürekli aspirin ya da diğer nonsteroid antienflamatuar ilaç alanlarda kolorektal kanser ve over kanseri riskinin %40-50 düşük olduğunu ortaya koyan önceki epidemiyolojik analizlerle de uyumlu bulunmuştur.

Ülkemizde kolon kanseri vakalarında COX-2 ekspresyonu ve histokimyasal parametreler arasındaki ilişki henüz yeterince araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı kolorektal kanserlerde COX-2 ekspresyonunun kantitatif değeri ve histokimyasal parametreler arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

Hastalar ve yöntem: İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü'ne 1998 yılında başvurmuş kolorektal kanserli hastalar arşiv kayıtlarından belirlenerek dosyaları retrospektif olarak incelendi. Bu hasta grubu içerisinde İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda opere edilmiş ve patolojik materyalleri İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda incelenmiş olanlar çalışma kapsamına alındı. Hastanın cinsiyeti, yaşı, karsinoembriyonik antijen (CEA), CA 19-9 değerleri, tümörün histolojik tipi, diferansiyasyon derecesi (az, orta, iyi), T, N, M evresi değerlendirmeye alındı. Hastaların tümörlerine ait lamlar Patoloji Anabilim Dalı arşivinden çıkarılarak COX-2 immünopozitivitesi incelendi. Tümör hücrelerindeki immünoreaktivite yaygınlık derecesi ve reaksiyon şiddeti açısından incelendi.

Bulgular: İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü arşiv kayıtlarından 1998 yılında kolorektal kanser tanısıyla başvurmuş 116 hasta olduğu belirlendi. Bunlardan 29'unun patolojik değerlendirmesinin İTF Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldığı saptandı Bu hastaların, 23'ünün bloklarına ulaşılabilirdi ve immünohistokimyasal değerlendirme bu 23 hastada gerçekleştirildi. Hastaların 17'si (%58.6) erkek, 12'si kadındı (%41.4). Medyan yaş 56 olarak bulundu (35-75). Bütün vakaların tanısı adenokarsinomdu. İki (%6.9) hastada iyi diferansiye, 23 (%79.3) orta derecede diferansiye ve 4 (%13.8) az diferansiye karsinom saptandı. Hastaların 22'sinin CEA ve CA19-9 değerlerine ulaşılabilirdi. CEA değeri ortalama 14.16 (0.1-255), CA 19-9 değeri ortalama 128.7 (0.0-1000) bulundu.

Bütün vakalarda COX-2 tümör hücrelerinde yaygın boyanma görüldü. Bazı stromal hücrelerde, endotelial hücrelerde ve kolonun normal mukozasında boyanma görülmekle birlikte, kanser dokusuna komşu normal mukozada zayıf boyanma saptandı. COX-2 immünoaktivitesinin yaygınlığı vakaların üçünde %30-60, 20'sinde ise %60'ın üzerinde saptandı. Boyanmanın şiddeti vakaların birinde enflamatuar hücrelerden daha zayıf, 10'ünde eşdeğer ve 12'sinde daha şiddetli bulundu. COX-2 immünopozitivitesi normal mukoza dokusunda apikal yüzeyde saptanırken, tümör dokusunda hem bazal bölgelerde hem de apikalde yoğunlaşmaktaydı.

Tartışma: Ülkemiz koşullarında yürütülen bu çalışmada ülkemizdeki kolorektal kanserlerde COX-2 ekspresyonu yüksek bulunmuştur. COX-2 geninin yaklaşık 10 yıl önce bulunduğu düşünülürse çok hızlı bir gelişme kaydedilmiştir. COX-2'nin pozitif olduğu vakalarda selektif COX-2 inhibitörü ilaçların adjuvan ya da koruma amaçlı kullanılması doğru bir yaklaşım olarak görülmektedir. Selektif COX-2 inhibitörlerinin (rofekoksib ve selekoksib) hem antineoplastik özellikleri hem de mükemmel bir güvenlik profili bulunmaktadır. COX-2'nin pozitif olduğu vakalarda selektif COX-2 inhibitörü ilaçların adjuvan ya da koruma amaçlı kullanılması doğru bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. COX-2 pozitif hastalarda bu ilaçların etkinliğinin saptanması için randomize kontrollü klinik çalışmaların başlatılması rasyonel görülmektedir.

Kaynaklar:

1. Dizdaroğlu F. Kolorektal kanserlerde etyoloji, patogeneze ve patoloji. Sindirim sistemi kanserleri. Biyoloji, patoloji, tanı tedavi. Editörler: Topuz E, Aykan F. İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 1998, sayfa: 373-91.
2. Sandler RS. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. Gastroenterol Clin North Am 1996;25:717-735.
3. Dove-Eldwin I, Thomas HJ. Review article: the prevention of colorectal cancer. Aliment Pharmacol Ther 2001;15:323-336.
4. Stockbrugger RW. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the prevention of colorectal cancer. Eur J Cancer Prev 1999;8 Suppl 1:S21-25.
5. Smalley W, Ray WA, Daugherty J, Griffin MR. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and incidence of colorectal cancer: a population-based study. Arch Intern Med 1999;159:161-166.
6. Collet JP, Sharpe C, Belzile E et al. Colorectal cancer prevention by non-steroidal anti-inflammatory drugs: effects of dosage and timing. Br J Cancer 1999;81:62-68.
7. Breuer-Katschinski B, Nemes K, Rump B et al. Long-term use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of colorectal adenomas. The Colorectal Adenoma Study Group. Digestion 2000;61:129-134.
8. Coogan PF, Rosenberg L, Louik C et al. NSAIDs and risk of colorectal cancer according to presence or absence of family history of the disease. Cancer Causes Control 2000;11:249-255.
9. Garcia Rodriguez LA, Huerta-Alvarez C. Reduced incidence of colorectal adenoma among long-term users of non-steroidal antiinflammatory drugs: a pooled analysis of published studies and a new population-based study. Epidemiology 2000;11:376-381.
10. Garcia-Rodriguez LA, Huerta-Alvarez C. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. Epidemiology 2001;12:88-93.
11. Hawk ET, Viner JL, Anderson WF. Development of cyclooxygenase inhibitors as cancer chemopreventives, in ASCO 2001 Educational Book, pp: 28-37.

12. Williams CW, DuBois RN: Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? *Am J Phys* 1996;270:G393-G400.
13. Dannenberg AJ, Altorki NK, Subbaramaiah K. Selective inhibitors of COX-2: New applications in oncology, in *ASCO 2001 Educational Book*, pp: 21-27.
14. Thun MJ, Henley SJ, Patrono J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: Mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *JNCI* 2002;94:252-266.
15. Lashner BA. Colorectal cancer in ulcerative colitis patients: survival curves and surveillance. *Cleveland Clin J Med* 1994;61:272-275. 13.
16. Giardiello FM, Offerhaus GJA, DuBois RN: The role of nonsteroidal antiinflammatory drugs in colorectal cancer prevention. *Eur J Cancer* 1995;31A:1071-1076.
17. Smalley W, Ray W A, Daugherty J et al: Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and incidence of colorectal cancer: A population-based study. *Arch Int Med* 1999;159:161-169.
18. Howe JR, Conlon KC. The molecular genetics of pancreatic cancer. *Surg Oncol* 1997;6:1-18.
19. Karlson BM, Ekblom A, Josefsson S et al. The risk of pancreatic cancer following pancreatitis an association due to confounding? *Gastroenterology* 1997;113:587-592.
20. Vesterinen E, Pukkala E, Timonen T et al. Cancer incidence among 78.000 asthma patients. *Int J Epidemiol* 1993;22:976-982.
21. Huovinen E, Kaprio J, Vesterinen E et al. Mortality of adults with asthma: a prospective cohort study. *Thorax* 1997;52:49-54.
22. Kallen B, Gunnarskog J, Conradson TB. Cancer risk in asthmatic subjects selected from hospital discharge registry. *Eur Resp J* 1993;6:694-697.
23. Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase and carcinogenesis: minireview. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470:M69-M78.
24. Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by P53. *J Biol Chem* 1999;274:10911-10915.
25. Leung WK, To KF, Lee TL, et al. Association between cyclooxygenase-2 overexpression and missense p53 mutations in gastric cancer. *Br J Cancer* 2001;84:335-339.

26. Liu CH, Chang S-H, Narko K et al. Over-expression of cyclooxygenase (Cox)-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001;276:18563-18569.
27. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL et al. Suppression of intestinal polyposis in APC⁷¹⁶ knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Cell* 1996;87:803-809.
28. Tiano H, Chulada P, Spalding J et al. Effects of cyclooxygenase deficiency on inflammation and papilloma development in mouse skin. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1997;38:257.
29. Dannenberg AJ, Altorki NA, Boyle JO et al. Cyclo-oxygenase-2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2001;2:544-551.
30. Eling TE, Thompson DC, Foureman GL et al. Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annu Pharmacol Toxicol* 1990;30:1-45.
31. Wiese FM, Thompson PA, Kadlubar FF. Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2. *Carcinogenesis* 2001;22:5-10.
32. Plastaras JP, Guengerich FP, Nebert DW. Xenobiotic-metabolizing cytochromes P450 convert prostaglandine endoperoxyde to hydroxyheptadecatrienoic acid and the mutagen, malonydialdehyde. *J Biol Chem* 2000;275:11784-11790.
33. Kelley DJ, Mestre JR, Subbaramaiah K et al. Benzo[a]pyrene upregulates cyclooxygenase-2 gene expression in oral epithelial cells. *Carcinogenesis* 1997;18:795-799.
34. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S. et al: Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-716.
35. Daniel TO, Liu H, Morrow JD, et al: Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2 dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* 1999;59:4574-4577.
36. Williams CS, Tsujii M, Reese J et al. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000;105:1589-1594.
37. Shiff SJ, Koutsos MI, Qiao L et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adeno-carcinoma cells: Effects on cell cycle and apoptosis. *Exp Cell Res* 1996;222:179-188.

38. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxidase synthase-2. *Cell* 1995;83:493-501.
39. Piazza GA, Rahm AL, Kruttsch M et al. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 1995;55:3110-3116.
40. Hanif R, Pittas A, Feng Y et al. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Bioch Pharm* 1996;52:237-245.
41. Balch CM, Dougherty PA, Cloud GA et al. Prostaglandine E2-mediated suppression of cellular immunity in colon cancer patients. *Surgery* 1984;95:71-77.
42. Kambayashi T, Alexander AR, Fong M et al. Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. Colon-26-derived prostaglandin E2 inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10. *J Immunol* 1995;154:3383-3390.
43. Stolina M, Sharma S, Lin Y et al. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 restores antitumor reactivity by altering the balance IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol* 2000;164:361-370.
44. Pan M-R, Chuang L-Y, Hung W-C. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 expression via repression of transcription in lung cancer cells. *FEBS Letters* 2001;25507:1-4.
45. Dohadwala M, Luo J, Zhu L et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion is mediated by CD44. *J Biol Chem* 2001;276:20809-20812.
46. 3. Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E et al. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000;83:324-328.
47. Hayashi N, Yamamoto H, Hiraoka N, et al. Differential expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human bile duct epithelial cells and bile duct neoplasm. *Hepatology* 2001;34:638-650.
48. Jabbour HN, Milne SA, Williams ARW, Boddy SC. Expression of COX-2 and PGE synthase and synthesis of PGE₂ in endometrial adenocarcinoma: a possible

autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors. Br J Cancer 2001;85:1023-1031.

49. Shirahama T, Arima JI, Akiba S, Sakakura C. Relation between cyclooxygenase-2 expression and tumor invasiveness and patient survival in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Cancer 2001;92:188-193.

50. Oshima M, Murai (Hata) N, Kargman S, et al. Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apc^{A716} mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. Cancer Res 2001;61:1733-1740.

51. Nathan CAO, Leskov IL, Lin M, et al. COX-2 Expression in dysplasia of the head and neck. Cancer 2001;92:1888-1895.

52. Kawamori T, Rao CV, Seibprl K. et al: Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor against colon carcinogenesis. Cancer Res 1998;58:409-412..

53. Ada S. Osteoartrit hastalarında selektif COX-2 inhibitörü selekoksibin gastrointestinal yan etkilerinin indometazin ile karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, SSK Okmeydanı Eğitim Hastanesi, IV. İç Hastalıkları Kliniği, İstanbul 2003.