

165470

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
İNCİRALTI / İZMİR

PANKREAS ADENOKARSİNOMUNDA ANJİOGENETİK AKTİVİTE

VE COX-2 EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK ÖNEMİ

(61 OLGU)

UZMANLIK TEZİ
DR.SERPİL BAYTEKİN

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Doç. Dr. ÖZGÜL SAĞOL

İZMİR-2005

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	VI
GİRİŞ.....	.1-15
GEREÇ VE YÖNTEM.....	16-19
BULGULAR.....	19-27
TARTIŞMA.....	28-34
SONUÇLAR.....	35-36
ÖZET.....	37
İNGİLİZCE ÖZET.....	38
KAYNAKLAR.....	39-51

ÖNSÖZ

Pankreas malignitelerinin en sık görülen türü pankreas duktal adenokarsinomudur. Pankreas duktal adenokarsinomu gelişmiş ülkelerde kanser ölümleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır.

Pankreas karsinomu fatal seyirli bir tümör türü olup, 5 yıllık sağ kalım oranı % 4'ten azdır. Prognozunun kötü olmasının nedenleri arasında hastalığın semptomlarının spesifik olmaması, başvuru sırasında hastalığın ilerlemiş olması ve efektif operatif olmayan tedavi şekillerinin olmaması bulunur. Cerrahi tedavi şu an için hastanın yaşam süresini uzatmak için uygulanan en etkin yöntemdir. Ancak, potansiyel küratif cerrahi tedavi, pankreas kanserli olguların sadece % 15'inde sağlanabilmektedir. Bununla birlikte cerrahi uygulanan olguların 5 yıllık yaşam olasılıkları % 5-10'u aşmamaktadır. Bu yüzden pankreas kanserli hastaların prognozuna etki edebilecek tümör biyolojik faktörler araştırılmaktadır. Çalışmamızda, bir çok tümörde hedefe yönelik tedavi ve prognozu belirlemeye ışık tutan anjiogenetik aktivite ve son yıllarda araştırmaların yoğunlaştığı tümör hücrelerinde COX-2 ekspresyonu , pankreas adenokarsinomlarında araştırılmaktadır.

Bu çalışmayı tez konusu olarak öneren, tez çalışmamda ve patoloji eğitimim sırasındaki katkılarından dolayı Doç. Dr. Özgül Sağol'a teşekkür ederim. Patoloji eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen değerli öğretim üyelerine; Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aydanur Kargı ile Prof. Dr. M. Şerefettin Canda, Prof. Dr. Tülay Canda, Prof. Dr. Ali Küpelioglu, Prof. Dr. H. Uğur Pabuçcuoglu, Prof. Dr. Kutsal Yörükoğlu, Prof Dr. Meral Koyuncuoğlu , Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu ,Prof Dr Erdener Özer, Doç. Dr. Banu Lebe, Doç. Dr. Sermin Özkal ve Doç. Dr. Burçin Tuna ile Öğr .Gör. Dr. Banu Sis , Öğr .Gör. Dr. Çağnur Ulukuş ve Uzm. Dr. Duygu Gürel'e teşekkür ederim. Uzmanlık eğitimim sırasındaki katkılarından dolayı, değerli araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve Patoloji Anabilim Dalı'nın tüm laboratuvar çalışanları ve personeline de teşekkürlerimi sunarım.

GİRİŞ

Pankreas kanseri en sık görülen insan neoplazmları arasındadır. Genellikle 60-80 yaşları arasında ve erkeklerde kadınlara oranla 2 kat daha sıklıkla görülür. Abdomende kolorektal karsinomlardan sonra ikinci sıklıkta gelir. Pankreas duktal adenokarsinomu tüm pankreas karsinomlarının %80'ini oluşturur (1). Duktal adenokarsinomların nadir görülen diğer varyantları olan müsinöz non-kistik karsinom (%1-3), adenoskuamöz karsinom (%3-4) ve indiferansiye(anaplastik) karsinom (%2-7) da ele alındığında, pankreatik tümörlerin %90'ını duktal adenokarsinom ve varyantlarının oluşturduğu dikkati çeker. Pankreasın diğer tümörleri %8-10 arasında sıklıkta görülürler. Bunlar arasında seröz kistadenom %1, müsinöz kistik tümör %2, intraduktal papiller müsinöz tümör %1, pankreatoblastom %0.5'ten az, solid-psödopapiller tümör %1 ve endokrin tümörler %2 oranında gözlenir.

SINIFLANDIRMA

İnsan pankreasında, tümörlerin köken aldığı üç ana hücre tipi bulunmaktadır. Bunlardan duktal ve asiner hücreler glandın ekzokrin komponentini oluşturur. Ayrıca endokrin hücre komponenti bulunur. Pankreas tümörleri, Dünya Sağlık Örgütünün 2000 yılında tekrar düzenlediği sınıflamada , öncelikle primer ve sekonder tümörler daha sonra ekzokrin ve endokrin tümörler olmak üzere ikiye ayrılırlar (2). Bu çalışmada konu edilecek ekzokrin pankreas tümörleri biyolojik davranışlarına göre benign, borderline ve malign gruplar altında toplanmıştır (Tablo I).

Tablo I. Pankreas tümörlerinin histolojik sınıflandırması (DSÖ-2000)

I- Primer Tümörler

A- Ekzokrin pankreas tümörleri

1- Benign

Seröz kistadenom

Müsinöz kistadenom

İntraduktal papiller-müsinöz neoplazi (Benign)

Matür kistik teratom

2- Borderline

Müsinöz Kistadenom (borderline ya da orta derecede displazi)

İntraduktal papiller müsinöz neoplazi (Borderline ya da orta derecede displazi)

Solid pseudopapiller tümör

3- Malign

Duktal adenokarsinom

Müsinöz non-kistik karsinom

Taşlı yüzük hücreli karsinom

Adenoskuamöz karsinom

İndiferansiye karsinom

-Osteoklastları içeren dev hücreli tümör

-Anaplastik karsinom

Mikst duktal-endokrin karsinom

Seröz kistadenokarsinom

Müsinöz kistadenokarsinom

İntraduktal papiller-müsinöz karsinom

Asiner hücreli karsinom

-Asiner hücreli kistadenokarsinom

-Mikst asiner –endokrin karsinom

Pankreatoblastom

Solid psödopapiller karsinom

Diğer karsinomlar

B- Endokrin pankreas tümörleri

II-Sekonder tümörler

ETYOLOJİ ve PATOGENEZ

Diğer gastrointestinal sistem kanserlerinin aksine pankreas kanseri etyolojisi ile ilgili bilgiler çok yetersizdir. Pankreas karsinomlarının etyopatogenezinde çeşitli faktörler öne sürülmektedir. Bunlar arasında sigara kullanımı çevresel etmenler arasında en etkin olanı olarak kabul edilmekte ve tümör riskini 2 kat arttırdığı bildirilmektedir. Pankreatit ve diabet de riski arttıran faktörlerden olmakla birlikte, herediter pankreatit dışında pankreatitin prekanseröz olduğu kanıtlanmamıştır.

Bunlar dışında geçirilmiş gastrik cerrahi, allerjik hastalıklar, tonsillektomi, kimyasal ajanlara maruz kalma, radyasyonla karşılaşma, alkol, kahve ve çay tüketimi ve dietle yağ ve et alımının etkileri bildirilmektedir. Ayrıca pankreas kanserinin familial türleri bildirilmekte ve pankreas kanserine predispozisyon hazırlayan familial sendromlar öne sürülmektedir.

Pankreas adenokarsinomunda multipl genlerde moleküler değişiklikler tanımlanmaktadır. %80-90 olguda K-ras onkogeninde nokta mutasyonu ile aktivasyon saptanmıştır. Hücre siklusu kontrolünde önemli rolü olan p16 geni pankreatik karsinomda en sık inaktive edilen(%95) tümör supresör genidir. DPC4 (SMAD-4) ve p53 tümör supresör geni inaktivasyonu da %55-70 oranında saptanır. Tümör supresör genleri olan p16 ve p53'ün inaktivasyonu bildirilmiştir. Ayrıca AKT-2 geni, MYB geni , AIB-1 geni , BRCA-2, MKK4, TGF- β -R1 ve RB-1 genleri de daha düşük oranlarda değişikliğe uğramaktadır (3, 4).

Son yıllarda pankreas adenokarsinomundaki moleküler değişiklikler ile ilgili veri birikimleri ışığında pankreas kanserinde duktus epitelinde izlenen değişikliklerle kanser oluşumu arasında ilişki saptanmış ve bir progresyon modeli öne sürülmüştür. 1996 Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasında skuamöz metaplazi, müsinoz hücre hiperplazisi, duktal papiller hiperplazi, adenomatoid duktal hiperplazi ve duktus displazisi adı altında incelenen duktal epitelyum değişikliklerinin, pankreas kanserinde gözlenen gen değişikliklerini içerdikleri saptanmış ve 2000 yılı sınıflamasında bu lezyonlar için Pankreatik İntraepitelial Neoplazi terminolojisi kullanılmıştır. Bu kapsamda duktus epitelinde müsinoz değişiklikten insitu karsinoma dek varan değişiklikler tanımlanmıştır (2).

MAKROSKOPİK VE HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Pankreas duktal adenokarsinomlarının %60-70'i glandın baş bölgesini, %5-10'u gövdeyi, %10-15'i ise kuyruk kısmını ve %10-15'i ise glandı diffüz olarak tutmaktadır. Tümör çapı 1.5 ile 10 cm arasında değişmektedir. Makroskopik olarak çoğu iyi sınırlı olmayan sert kitle şeklindedir. Kesit yüzü sarı beyaz renkli ve çevre pankreas dokusundan farklı görünümündedir. Hemoraji ve nekroz nadirdir ancak mikrokistik alanlar içerebilir. İki santim altındaki tümörleri makroskopik olarak ayırdetmek güç olabilir.

Duktal adenokarsinomlar dünya sağlık örgütünün önerdiği şekilde iyi ,orta, az ve indiferansiye tümörler şeklinde derecelendirilirler. Tümörlerin çoğu orta ya da iyi diferansiye tümörlerdir. İyi diferansiye tümörler büyük duktus benzeri yapılar ve orta boyda neoplastik bezler içerirken orta derecede diferansiye tümörler orta boyda duktus benzeri yapılar ve değişik boyut ve şekillerde neoplastik tübüler yapıları içerir. Az diferansiye tümörlerde küçük ve irregüler neoplastik bezler bulunmaktadır. İyi diferansiye tümörlerde neoplastik bezleri döşeyen tümör hücreleri müsin üreten büyük yuvarlak, oval nükleuslu, belirgin nükleer membrana sahip olup, normal duktus hücrelerinde bulunmayan belirgin nükleoller içermektedir. Mitotik aktivite düşüktür ve belirgin dezmoplastik stromal yanıt vardır. Orta derecede diferansiye tümörlerde büyük duktus benzeri yapılar daha azdır. İyi diferansiye tümörlerle karşılaştırıldığında hücresel atipi derecesi daha fazladır. Tümör hücre nükleusları değişik şekil ve boyutlardadır. Mitotik figürler daha sıktır. Müsin üretimi azalmıştır. Az diferansiye tümörler küçük irregüler bezler ve solid tümör yuvaları içerir. Genellikle stromal yanıt azdır ancak inflamatuvar hücreler, nekroz ve hemoraji odakları bulunur. Neoplastik hücrelerde atipi belirgindir ve genellikle müsin üretimi azdır. Garip nükleuslu hücreler vardır ve mitotik aktivite yüksektir. İndiferansiye tümörlerde ise tümör hücresinin diferansiyasyon yönü anlaşılabilir (2).

Pankreas duktal adenokarsinomları histokimyasal olarak başlıca asit müsin ile, fokal olarak da nötral müsin ile boyanır. İmmunhistokimyasal olarak M1, CEA, CA19-9, DuPan 2, Span1, CA125 ve TAG72 ile pozitif, Vimentin ile negatif boyanır (1).

PATOLOJİK EVRE

Pankreas karsinomları AJCC/ UICC TNM (5) sınıflamasına göre evrelenir (Tablo II).

Tablo II. UICC Evrelendirmesi

PRİMER TÜMÖR (T)

pTX Primer tümör değerlendirilemedi

pT0 Primer tümör yok

pTis Karsinoma insitu

pT1 Tümörün en büyük çapı 2 cm ve daha altında, pankreasa sınırlı

pT2 Tümörün en büyük çapı 2 cm'den daha büyük, pankreasa sınırlı

pT3 Tümör pankreas dışına uzanmıştır, çöliak aks ya da superior mezenterik arter tutulmamıştır.

pT4 Tümör çöliak aks ya da superior mezenterik arteri tutmuştur.

BÖLGESEL LENF DÜĞÜMLERİ (N)

pNX Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemedi

pN0 Bölgesel lenf düğümü metastazı yok

pN1 Bölgesel lenf düğümü metastazı var

N1a Tek bölgesel lenf düğümü tutulumu

N1b Birden fazla bölgesel lenf düğümü tutulumu

UZAK METASTAZ (M)

pMX Uzak metastaz varlığı değerlendirilemedi

pM0 Uzak metastaz yok

pM1 Uzak metastaz var

Klinik Evre

Evre 0 Tis

Evre IA T1 N0 M0

IB T2 N0 M0

Evre IIA T3 N0 M0

Evre IIB T1 N1 M0

T2 N1 M0

T3 N1 M0

Evre III T4 Herhangibir N M0

Evre IV Herhangi bir T Herhangibir N M1

PROGNOSTİK FAKTÖRLER

Pankreas duktal adenokarsinomunun prognozu gelişmiş cerrahi tekniklere rağmen kötüdür. Cerrahi sonrası 1 yıllık yaşam %20 iken 5 yıllık yaşam oranı sadece %5'tir (6). Hastaların sadece %20'si başlangıçta opere edilebilir. Bu tümörde uygulanan pankreatikoduodenektominin amacı lokal ve rejyonel rekürrens oranını azaltmak ve sağ kalımı arttırmaktır. Japon yazarlara göre 5 yıllık sağ kalım %27.4'tür (7). Verona'dan (İtalya) bildirilen oran ise 3 yıllık %32'dir (8). Lokal tümör rekürrens oranı makroskopik olarak küratif rezeksiyon sonrası hala %89 olarak bildirilmektedir (9). Tümörün yerleşim yeri, boyutu, derecesi, evresi, perinöral invazyon ve damar invazyonu, bu tümörlerde prognozu belirleyen faktörler arasındadır.

Pankreasın kuyruk veya gövdesindeki tümörler, geç semptom verdiklerinden, tanı konulduğunda, baş kısmındaki tümörlere göre daha ileri evrededir. Kuyruk ve gövde kısmındaki tümörler ekstrapankreatik organlara yayılma ve metastaz yapma eğilimindedir. Boyut olarak 3 cm'nin altındaki tümörlerde sağ kalım oranı (17-29 ay) daha büyük boyuttaki ve/veya bölgesel lenf nodu tutulumu olan tümörlerden (6-15 ay) daha fazladır. İki santimin altındaki tümörler (küçük karsinomlar) tüm rezeke edilebilir tümörlerin %10'unu oluşturur. Bunların prognozu sanıldığı gibi iyi değildir. Çünkü olguların %40-75'inde peripankreatik doku ve bölgesel lenf nodu tutulumu saptanmıştır (10).

Pankreasta sınırlı olan tümörlerde rezeksiyon sonrasında rezidüel tümör izlenmemiştir ve bu hastaların cerrahi sonrası prognozları çok iyidir. Peripankreatik dokuya örneğin retroperitoneal bölgeye yayılım portal venöz sistem tutulumu olsun ya da olmasın en önemli prognostik faktördür. Pankreasta sınırlı küçük tümör, tek lenf nodu tutulumu olsun ya da olmasın iyi prognoza sahip bulunmuştur (10).

Derece 1 tümörler, derece 2 ve derece 3 tümörlerden daha düşük evrede bulunmuşlardır. Bundan başka ortalama yaşam, tümör derecesi, mitotik indeks ve hücrel atipi ile ilişkilidir (11-13).

Bu standart parametreler dışında çok sayıda moleküler değişiklik prognostik belirleyici olarak araştırılmaktadır. Nükleer morfolometrik parametreler, prognozun belirlenmesinde yardımcı faktörler olarak bildirilmektedir.

PANKREATİK KARSİNOGENEZ

Pankreatik karsinogenez bir çok basamaktan oluşmaktadır. Hanahan ve Weinberg (14) karsinogenezde hücre fizyolojisinde 6 önemli değişiklik olduğunu bildirmişlerdir:

- 1) Apoptozdan kaçma
- 2) Büyüme sinyallerinde yeterlilik
- 3) Antitümör sinyallerine cevapsızlık
- 4) Anjiogenezin sürdürülmesi
- 5) Sınırlı çoğalma potansiyeli
- 6) Doku invazyonu ve metastaz

APOPTOZİS

Apoptozis karsinogenezde önemli bir basamaktır ve antiapoptotik proteinler karsinogenezin erken basamağında artmış oranda eksprese edilirler. Apoptozisin düzenlenmesi apoptozu inhibe eden ve uyaran genlerin kontrolündedir. Bu genlerdeki mutasyonlar diğer tümörlerde olduğu gibi pankreas tümörlerinde de tarif edilmiştir. p53 geni apoptozu uyaran en önemli tümör supresör gen olup, pankreatik karsinom patogenezinde önemli rol oynar. Pankreatik adenokarsinomda olguların %65'inde p53 mutasyonları bildirilmektedir. Ancak bu mutasyonun sağkalıma etkisi ile ilgili literatürde çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Buna karşın Wild-type p53 ekspresyonunun az diferansiye pankreatik adenokarsinom hücrelerinde apoptozu arttırdığı bildirilmiştir.

Bcl-2, Bax ve son zamanlarda tanımlanan Survivin geni gibi genler apoptoz inhibisyonunda rol oynar ve pankreas adenokarsinomu biolojisine etkileri araştırılmaktadır. İmmünohistokimyasal olarak pankreatik karsinomda p53 pozitif ve Bcl-2 negatif boyanma paterninin hem histolojik derecede hem de klinik evrede önemli olduğu rapor edilmektedir (15).

ANJİOGENEZ:

Anjiogenez önceden var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Vaskülogenez ise embriyonik gelişim sırasında angioblastlar ya da hemangioblastlar gibi mezodermal prekürsörler tarafından gerçekleştirilen bir olaydır. Tümör anjiogenezi, anjiogenez ve vaskülogenezin kombinasyonu olarak gerçekleşir. Homeostazda pro-anjiogenik moleküller anti-anjiogenik moleküllerle denge halindedir. Pro-anjiogenik moleküllerin aktivitesi anti-anjiogenik moleküllerin aktivitesini geçtiği zaman yeni kan damarları oluşur. Pro-anjiogenik faktörler yapısal olarak eksprese edilebilirler ancak bunların ekspresyonu hipoksi, düşük pH, sitokinler, büyüme faktörleri, tümör boyutunda artış, aktive onkogenler, sinyal transdüksiyon yolları veya tümör supresör gen kaybı gibi stimuluslarla artar. Anjiogenez; tümör hücreleri, ekstrasellüler hücreler, stroma hücreleri ve inflamatuvar hücreler gibi çeşitli hücrelerce salgılanan maddelerce uyarılır (16).

Birçok anjiogenetik faktör bildirilmiştir: Fibroblast büyüme faktörü (aFGF), Bazik FGF (bFGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) bunlardan bir kısmıdır. İnsan pankreatik karsinom hücrelerinde aFGF ve bFGF'nin aşırı ekspresyonu ve bunun kanser progresyonu ile ilişkisi gösterilmiştir (17,18).

Anjiogenez tümör hücreleri tarafından sekrete edilen ve çok sayıda büyüme faktörü tarafından regüle edilir. Tümör büyümesinde ve metastazda kritik role sahiptir. İntratümöral mikrodamar dansitesi (microvessel density- MVD) meme, kolon, mide ve mesane tümörlerinde anjiogenezi saptamada kullanılan belirleyicidir. İmmünohistokimyasal olarak MVD analizine ek olarak VEGF, FGF-2 ve platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) gibi birkaç anjiogenetik faktör insan tümör spesimenlerinde neovaskülarizasyonu belirlemede kullanılmıştır. Tümör spesimeninde anjiogenezin standart değerlendirilmesinde FVIII-RA, CD-31/PECAM ve CD-34 gibi ekstrasellüler spesifik antikolar kullanılır (19).

Son zamanlarda TNP-470, angiostatin, endostatin, BAI-1(brain-specific angiogenesis inhibitor-1) ve NK-4 gibi potent anjiogenez inhibitörleri ve bunların tümör regresyonuna etkileri çeşitli deneysel hayvan modellerinde malign tümör hücrelerinde araştırılmaktadır (20-24).

ANJIOGENEZ İLE İLİŞKİLİ FAKTÖRLER

Vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor-VEGF) :

VEGF anjiogeneizde önemli predominant stimülatör faktördür. VEGF ailesi VEGF A, B, C, D ve E ile placenta growth factor (PIGF) olmak üzere 6 VEGF molekülünden oluşur. Bu faktörlerin en önemlisi normalde VEGF olarak bilinen VEGF-A' dır (25). VEGF reseptörleri özellikle ekstrasellüler hücrelerde sentez edilen tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. VEGF için 3 farklı reseptör vardır: VEGF-1, VEGF-2 ve VEGF-3. VEGF ailesine ek olarak neuropilin-1 ve neuropilin-2 denilen ko-reseptörler bulunmuştur. VEGF direkt olarak ekstrasellüler mitojen olarak görev yapar. Ayrıca vazodilatör olarak bilinen nitrik oksit üzerinden kan akımını düzenler . Son zamanlarda yapılan çalışmalarda VEGF'ün ekstrasellüler hücreleri apoptozdan koruduğu düşünülmüştür (26).

VEGF'ün ekspresyonu kolon kanseri (27), gastrik kanser (28) ve pankreas kanserini (17,29) de içeren çeşitli kanser türlerinde tümör progresyonu ve kötü klinik gidişle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Hipoksi, pH'ta azalma, büyüme faktörleri, sinyal transdüksiyon yollarının aşırı ekspresyonu ve tümör supresör gen kaybı gibi çeşitli faktörler VEGF' ün ekspresyonun artmasında rol oynar (16).

Trombositten köken alan büyüme faktörü (Platelet derived growth factor-PDGF):

PDGF çeşitli hücre tipleri için bir büyüme faktörü ve vasküler düz kas hücreleri için major mitojen ve kemoatraktandır (30).

PDGF' nin 3 izoformu vardır: PDGF-AA, -AB ve BB. Bu izoformlar farklı reseptörlere bağlanırlar. PDGF-BB vasküler düz kas hücreleri, ekstrasellüler hücreler ve makrofajlar gibi çoğu hücre tipinde bulunan predominant izoformdur (31). Son zamanlarda PDGF ailesi için iki yeni üye daha bulunmuştur: PDGF-CC, PDGF-DD. PDGF reseptörü tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve iki alt türü vardır (α ve β).

PDGF özellikle PDGF-BB VEGF' nin indüksiyonu ile birlikte vasküler düz kas hücrelerinin migrasyonu ve vasküler düz kas hücrelerinin konstrikşiyonuna sekonder kan akımının düzenlenmesi ile angiogenezi modüle eder (32). Ek olarak bFGF ekstrasellüler alanda PDGF'ün kemotaktik etkilerine kofaktör olarak görev yapar (33).

Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor-FGFs): Günümüzde FGF ailesi 20' ye yakın strüktürel olarak heparin bağlayan polipeptidler olarak bilinirler (34). FGF'ün biyolojik etkileri 4 adet tirozin kinaz reseptörü ile ilişkilidir: FGFR-1, -2, -3, -4. FGF'ler anjiogenezin düzenlenmesi, hücreden hücreye adezyon hücre proliferasyonu ve kemotaksis gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir . Ayrıca hücre-hücre ve hücre-stroma ilişkilerinde ve tümör progresyonu ile ilişkili doku onarımında görevlidir (35).

Trombositten köken alan endothelial hücre büyüme faktörü (Platelet derived endothelial cell growth factor-PD-ECGF): Diğer bir anjiogenik faktör olan PD-ECGF çeşitli kanser sistemlerinde değerlendirilmiştir. PD-ECGF'nin ekstrasellüler hücreler için in vitro kemotaktik ve in vivo anjiogenik aktivitesi vardır. PD-ECGF stromal hücreler ve infiltre makrofajlar tarafından üretilir (36).

Anjiopietinler: Anjiopietinler endotele spesifik tirozin kinaz reseptörüne bağlanan anjiogenik bir faktördür. Bilinen 4 adet anjiopietin vardır (Ang-1-Ang-4) (37).

Interleukin-8(IL-8): Bir kemokin olan IL-8 proenflamatuar etkili ve nötrofiller için kemoatraktandır (38). IL-8 monosit ve makrofajlar, dermal fibroblastlar, ekstrasellüler hücreler, mezengial hücreler ve birkaç insan tümör hücre tipinden eksprese edilir. IL-8 ekstrasellüler hücrelerin kemotaksis ve proliferasyonunu indükleyerek anjiogenetik faktör olarak görev yapar. Çoğu hücrede IL-8 granülosit koloni-stimülan faktör, TNF- α , IL-1 β , hipoksi, asidoz ve diğer stres faktörleri gibi spesifik stimuluslara yanıt olarak çeşitli hücreler tarafından eksprese edilir (39).

İntegrinler ve ekstrasellüler matriks (ECM): İntegrinler her biri α ve β olmak üzere 2 transmembran subuniti olan hücre adezyon reseptör ailesindedir (40). Günümüzde 18 α ve 8 β subunit olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda integrinlerin ekstrasellüler matrikse adezyonu sağlayarak ekstrasellüler migrasyon, sağkalım ve proliferasyonda merkezi rol oynadığı bilinmektedir. Bu yüzden integrinlerin sadece anjiogenezin yeni damar oluşumu olan başlangıç aşamasında değil önceden var olan ve yeni yapılanmış damarlanmayı stabilize etmede görevli olduğu bildirilmiştir (41).

Trombospondin (TSP): TSP ilk tanımlanan thrombin aktivasyonuna yanıt olarak trombositlerden salınan yüksek molekül ağırlıklı multifonksiyonel bir glikoproteindir (42). TSP fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri, monositler, makrofajlar ve neoplastik hücrelerden salınır. TSP'nin 5 subtipi (TSP- 1- TSP-5'e) vardır. TSP-1 ve TSP-2 anjiogenezin inhibisyonunda görevlidir (43).

Diğer Anjiogenik Faktörler: Bunlar arasında transforme edici büyüme faktörü $-\alpha$ ve $-\beta$ (TGF- α ve TGF- β), tümör nekroz faktörü (TNF- α), epidermal büyüme faktörü (EGF), anjiogenin, trombospondin, hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve interferonlar α , β ve γ bulunmaktadır (44). VEGF ekspresyonunu artırarak anjiogenezi etkileyen sitokinler arasında ise etki eden insulin like growth factor-I, -II, EGF, HGF, IL-1 ve PDGF bulunur (45).

PANKREAS KANSERİNDE ANJİOGENEZ

Pankreas tümörleri genelde hipovasküler olmalarına karşın kanserin büyüme ve gelişiminde anjiogenez kritik bir rol oynar. İlk yapılan çalışmalarda pankreatik kanser hücrelerinin geniş ölçüde pro-anjiogenik faktörler eksprese ettiği gösterilmiştir (46,47). Örneğin bir pro-angiogenik faktör olarak bilinen anjiogeninin normal pankreasla karşılaştırıldığında artmış olduğu görülmüştür. Serum anjiogenin seviyesinin pankreas kanserli hastalarda normal kişilere göre belirgin olarak yüksek olduğu bulunmuştur. Bu yüzden yüksek serum angiogenin seviyesi veya tümörde artmış angiogenin ekspresyonu olan pankreas kanserli hastalarda bir yıllık yaşam oranının düşük olduğu bildirilmiştir.

Diğer çalışmalar pankreas kanserinin progresyon ve metastazında VEGF ve PDGF üzerinde yoğunlaşmıştır . İnsan pankreatik kanser hücre kültürlerinde ve dokuda PDGF ve VEGF' ün ikisinin birden artmış olmasının artmış mikrodamar dansitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bazı çalışmalar ayrıca pankreatik karsinom spesimeninde PDGF ve/veya VEGF'ün artmış ekspresyonunun, tümörde yüksek derece ve kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir (17). Diğer çalışmalar ise pankreatik tümörlerde damar dansitesinin hastalarda sağkalımın bağımsız belirleyicisi olduğunu göstermektedir (48).

Bununla birlikte diğ er tüm tümör tiplerinde oldu ğ u gibi ç alışmaların hiçbiri tümör agresifliğ i ile damar miktarının ilişkisini kesin olarak gösterememiştir (17).

Pankreatik kanserin büyümesinde önemli angiogenik faktörler arasında VEGF, TGF- α ,EGF, TGF- β , acidic fibroblast factor (aFGF) ve basic fibroblast factor (bFGF) bulunmaktadır (18, 49, 50).

COX-2

Cyclooxygenase (COX) enzimi, araşidonik asitten prostoglandin H₂ sentezinde hız sınırlayıcı adımı katalizleyen enzimdir. Bu enzimin iki izoformu tanımlanmıştır. Cyclooxygenase-1 (COX-1) çoğ u dokuda eksprese edilir ve doku homeostazında önemlidir. Cyclooxygenase-2 (COX-2) çoğ u hücre ve dokuda çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve tümör promotörleri tarafından stimüle edilen indüklenebilen formudur. Yapısal benzerliklerine karşın COX-1 ve COX-2'nin doku biyolojisi ve hastalıklarda farklı rollere sahip oldu ğ u bilinmektedir. Son zamanlarda hücre büyümesi, hücre ölü mü, hücre motilitesi ve kanserde COX-2'nin rolü anlaşılabilmıştir (51).

Spesifik olmayan COX inhibitörleri, non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİD), son zamanlarda geliştirilen COX-2 spesifik inhibitörlerinin, hem hayvan modellerinde hem de kanserli hastaların tedavilerinde tümör progresyon ve insidansını azaltmadaki etkisi gösterilmiştir (52).

Hücre Büyümesinin Kontrolünde COX-2

COX-2'nin vücutta prostaglandin üretimi hem normal hem de tümör hücrelerinde hücre proliferasyonunu ve büyümeyi arttırdığ ı bildirilmiştir. Prostaglandinlerin, Prostaglandin E₂ (PGE₂) ve Prostaglandin I₂ (PGI₂)' yi de içeren birkaç türünün, rat hepatositlerinde hücre proliferasyonunu ve DNA sentezini arttırdığ ı bulunmuştur (53). Prostaglandinin bu görevinin karaciğ er rejenerasyonunda önemli oldu ğ u bilinmektedir. Kolon hasarlı bir fare modelinde PGE₂' nin epitelyal hücre proliferasyonundaki azalmayı önlediğ i bildirilmiştir (54).

COX-2 baş ve boyunun skuamöz hücreli karsinomunda olduğu gibi kolon, meme, akciğer, pankreas ve özefagus kanserinde de artmış olarak eksprese edilir (55-58).

Kanserli dokuda prostaglandinlerin, özellikle PGE2'nin aşırı üretimi tümör hücre büyümesini artırır. COX-2 spesifik inhibitörlerinin, kolon, deri, safra kesesi, özefagus ve pankreas tümör hücrelerinde hücre büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (59).

Apoptozisi önlemede COX-2

COX-2, tümör hücre büyümesini ilerleten diğer bir mekanizma olan apoptozun inhibisyonunda önemli bir role sahiptir. İlk kez NSAID'lerin tavuk embriyo fibroblastlarında apoptozisi önlediği bulunmuştur. Sonraki çalışmalarda COX-2 spesifik NSAID'lerin kolon, gastrik, pankreatik, akciğer kanseri ve glioma hücreleri gibi çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu önlediği elde edilmiştir. COX-2 eksprese eden 15 kolon kanser hücresinde NSAID'in apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (60). Aşırı COX-2 eksprese eden hücrelerde apoptozisin azalması, artmış Bcl-2 ekspresyonu ve azalmış TGF- β 2 reseptör ekspresyonu ile ilişkilidir.

Apoptozu önlemede COX-2'nin rolü 2 mekanizma ile olmaktadır:

- 1) COX-2, prostoglandin üretimini sağlayarak apoptozu önler. İnsan kolon kanser hücrelerinde PGE2 apoptozu inhibe eder ve Bcl-2 ekspresyonunu artırır (61).
- 2) Yüksek konsantrasyondaki araşidonik asit apoptozu artırır. NSAID tedavisinin aynı konsantrasyonda intrasellüler araşidonik asit birikimine yol açarak kolon kanser hücrelerinde apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (62).

Böylece COX-2 anti-apoptotik ürünler, Prostoglandinlerin üretimini ve pro-apoptotik substrat olan araşidonik asitin seviyesini yüksek tutarak apoptozu artırır. COX-2'nin apoptozu önlemedeki rolü tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte en azından 3 mekanizma öne sürülmüştür: (63)

- 1- Bcl-2 ilişkili yol,
- 2- Nitrik oksit yolu,
- 3- Seramid üretimi.

Bcl-2 sellüler fonksiyonlardan biri olan lipit peroksidasyonunu suprese eden antioksidan ve antiapoptotik bir anahtardır. COX inhibitörleriyle tedavide Bcl-2 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (63). Bcl-2 ilişkili yol prostoglandin ve araşidonik asit yoluna benzer.

Farklı bir ekspresyon yolu kullanılarak aynı grupta Dynein hafif zincir ekspresyonunun stimülasyonu ve bunu izleyen nöronal nitrik oksit sentaz aktivitesinin inhibisyonu ile COX-2' nin apoptozu önlediği gösterilmiştir. Prostoglandin E2 üretimi ile birkaç hücre tipinde nitrik oksit sinyalinin inhibisyonu ile programlanmış hücre ölümü önlenmektedir. İntrasellüler serbest araşidonik asit birikiminin küçük bir lipid mesajcısı olan seramidin düzeyini arttırdığı bildirilmiştir. Seramidin efektif bir apoptoz indükleyicisi olduğu bilinmektedir. COX-2 tarafından azaltılan araşidonik asit intrasellüler seramid konsantrasyonunu azaltarak apoptozisi önlemektedir.

Bununla birlikte apoptozise yanıtta seramid düzeyi bir hücre tipinden diğer hücre tipine farklılık göstermektedir. Yukarıdaki mekanizmalara ek olarak COX-2' nin programlanmış hücre ölümünü önlemede teorik olarak Akt-kinaz ilişkili yol ve NFκ yolu gibi pro-proliferatif yollar da bulunmaktadır. Bazı COX2 inhibitörleri NKκ yolunun aktivasyonunu önlemektedir (64).

Hücre Motilitesi ve Adezyonda COX-2

COX inhibitörlerinin tümör hücre migrasyonunu, hücre adezyonunu ve tümör invazivliğini azalttığı in vivo ve in vitro deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Bu etkiler karaciğer, kolon ve meme kanseri gibi çeşitli kanser hücrelerinde bulunmuştur (65-68). Ek olarak rat intestinal epitel hücrelerinde COX-2 aşırı ekspresyonunun ekstrasellüler proteinler olan laminin ve matrigel'e adezyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu biyokimyasal değişiklikler metalloproteinaz-2' nin artmış ekspresyon ve aktivasyonu ve azalmış E-cadherin ekspresyonu ile ilişkilidir (69).

Bununla birlikte COX-2 aşırı eksprese eden hücrelerde hücre invazivliği belirgin olarak artmıştır. Kolorektal karsinom hücrelerinde Fosfatidil inozitol-3-kinaz/Akt kinaz/protein kinazB yolunun son zamanlarda PGE2 ilişkili hücre motilitesini arttırdığı bulunmuştur (70).

COX-2 ve Anjiogenez

COX-2 tümör gelişiminin ve migrasyonun ileri evresinde tümör anjiogenezinde önemli bir yere sahiptir. COX-2 ekspresyonu VEGF üretimini belirgin olarak artırır ve bunu COX-2 spesifik inhibitör NS-398 bloke eder. Buna karşın spesifik olmayan ve spesifik COX-2 inhibitörleri anjiogenezi belirgin biçimde inhibe eder ve MAPK inaktivasyonunu sağlar.

Transmembran sisteminde kolon kanser hücrelerinde artmış COX-2 ekspresyonunun epitelyal hücrelerin endotelial hücrelerin motilitesini ve tübüler yapı formasyonunu arttırdığı ve bunun da COX-2 inhibitörleri tarafından önlendiği gösterilmiştir. Genetik çalışmalar intestinal tümör gelişiminde polipteki stromal COX-2 ekspresyonunun tümör anjiogenezinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (71).

AMAÇ

Bu çalışmada amaç, pankreas başında yerleşimli 61 duktal adenokarsinom olgusunda morfolometrik parametrelerle sayısal olarak saptanan tümör anjiogenezi ve Cox-2 arasındaki ilişkinin ve bu iki parametre ile tümörlerin standart prognostik faktörleri ve hasta sağkalımı arasındaki ilişkinin saptanarak araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada son 8 yılda (1996-2004) Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda pankreas adenokarsinomu tanısı almış ve araştırma için yeterli tümör dokusu bulunan 61 olgu yer almaktadır. Tüm olgulara ait H+E boyalı arşiv preparatları yeniden gözden geçirilmiştir. Hastaların yaşı ve cinsiyeti, tümör boyutu, lokalizasyonu, patoloji rapor kayıtlarından; tümörün histolojik tipi, derecesi, lokal yayılımı, kan, lenf damarı ve perinöral invazyonu ve lenf düğümü metastazına ait bilgiler ise H+E boyalı preparatların yeniden incelenmesiyle elde edilmiştir. Tüm olgular en son TNM patolojik evrelemesine göre yeniden evrelendirilmiştir (5). Sağkalım verilerine klinisyen aracılığı ile ulaşılmıştır. Olgulara ait, tümörü temsil eden, uygun parafin bloklar seçilmiş ve immunhistokimyasal boyama için lizinli lamlara 5 mikronluk kesitler hazırlanmıştır.

İMMÜN DOKUKİMYASAL BOYAMA

Olgulara ait kesitlere, CD31(1:100, DAKO, Denmark) proteinine karşı geliştirilmiş primer poliklonal antikor ve COX-2 (1:50, Novo Castra, UK, 4H12) proteinine karşı geliştirilmiş primer poliklonal antikor kullanılarak streptavidin-biotin- immunperoksidaz yöntemiyle boyama uygulandı.

Kesitler 20 dakika ksilolde bekletilerek deparafinize edildi ve inen alkol serilerinden (%96,%90,%80,%70) geçirilerek rehidrate edildi. Daha sonra %3'lük H₂O₂, 5 dakika uygulanarak endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. CD31 antikorunu uygulanacak kesitler mikrodalga fırında 15 dakika EDTA Buffer solüsyonunda, COX-2 antikorunu uygulanacak kesitler Sitrat Buffer solüsyonunda (0.01 ml/l, pH=6) mikrodalga fırında 3 kez 5'er dakika kaynatıldı ve böylece antijenin açığa çıkması sağlandı. Kesitler 15-20 dakika süreyle oda ısısında soğumaya bırakıldı. Daha sonra izlenen aşamalar aşağıdaki şekilde uygulandı:

- 1) Kesitler üzerine CD31 (Dilüsyon: 1:100) ve COX-2 (Dilüsyon: 1:50) primer antikorları damlatılarak oda ısısında 30 dakika bekletildi.
- 2) Tris Solüsyonunda (pH=7.2) 5 dakika yıkandı.
- 3) Biotinize antikordan damlatıldı ve 10 dakika bekletildi.
- 4) 5 dakika Tris solüsyonunda yıkandı.
- 5) Streptavidin peroksidaz solüsyonu kesitler üzerine damlatılarak 10 dakika bekletildi.
- 6) 5 dakika Tris solüsyonunda yıkandı.
- 7) Kromojen olarak 3,3'-diaminobenzideteraklorür (DAKO, Denmark) solüsyonundan kesitler üzerine damlatıldı, kahverengi renklenme gözlenene dek beklendi, sonra çeşme suyunda yıkandı.
- 8) Tüm kesitler zıt boyanma sağlamak için Mayer'in hematoksilen boyasında 2 dakika süreyle bekletildi.
- 9) Tekrar çeşme suyunda yıkandıktan sonra yükselen alkol serilerinden (%80, %90, %96, izopropil alkol, izopropil alkol+ksilol) geçirilerek ksilolde 20 dakika bekletildi.
- 10) Entellan (Merck) damlatılarak lamelle kapatıldı.

İMMÜN REAKTİVİTENİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Cox-2'nin değerlendirilmesi

İmmun dokü kimyasal derecelendirme için temsil edici tümör alanları seçilerek değerlendirildi. COX-2 proteini için sitoplazmik pozitif boyanmanın yoğunluğu ve dağılımı için 1'den 3'e kadar derece verildi. Buna göre zayıf boyanma derece 1, orta derecede boyanma derece 2, kuvvetli boyanma derece 3 olarak değerlendirildi.

Vasküler yüzey dansitesinin değerlendirilmesi

CD31 antikoru ile işaretlenen mikrodamarlar Barth ve arkadaşlarının çalışmalarında tanımladıkları stereolojik yöntem ile sayısal olarak değerlendirildi (63). Bu çalışmaya göre her olguda, 10 tümör alanı içerisinde vasküler yüzey dansitesi (VSD) ve mikrodamar sayısı (NVES) stereolojik yöntemle değerlendirildi.

Stereolojik ölçümler

Tüm stereolojik ölçümler, bilgisayar ekranında; mikroskoptan, buna monte edilmiş bir CCD kamera ile görüntü aktararak, 10'luk büyütmede uygulanmıştır. Bilgisayar ekranına, görüntünün üzerine süperpoze olacak şekilde, 11 horizontal, 11 vertikal çizgiden oluşan toplam 121 kesişim noktasının bulunduğu bir grid çizilmiş olan asetat monte edilmiştir. Bu ölçüm asetatının boyutu thoma lamı ile hesaplanmıştır: ($L_r=8.074$ mm). Ölçüm sırasında, 10 'luk büyütmede, grid çizgileri ile kesişen mikrodamarlar ve stromaya düşen çizgi kesişim noktalarının sayısı her olgu için 10 tümör alanında hesaplanarak aşağıdaki formüller ile vasküler yüzey dansitesi (VSD) ve mikrodamar sayısı (NVES) hesaplanmıştır.

$$\text{Stroma volümü} = V_v(\text{STR}) = I(\text{STR})/121$$

$$(I(\text{STR})) = \text{pankreatik stroma üzerine denk gelen kesişim noktaları}$$

VSD birim doku hacmine düşen vasküler yüzeye eşittir. Avasküler olan dokunun epitelyal ve lüminal kompartmanları ve bu kompartmanların dokunun değişken miktardaki kısmını oluşturması nedeniyle dokunun stromal kompartmanındaki vasküler yüzey dansitesini 1 ve 2 no'lu denklemlerle hesaplanmıştır:

$$VSD = \Sigma I_n * 2 / L_r * V_v(\text{STR})$$

Yöntemin aynı basamağında ölçülen grid alandaki damarlar (N) sayılmıştır ve stromada mm^2 'ye düşen damar sayısı NVES formülüne göre hesaplanmıştır.

$$NVES = N / V_v(\text{STR})$$

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler SPSS (Scientific Package for Social Sciences) programında yapıldı. İHK'sal ve stereolojik ölçüm sonuçları ile prognostik parametreler arası ilişkiler, Ki-kare, Student T testi, One-Way ANOVA testleri ile değerlendirilmiştir. Anlamlı ilişki gösteren parametrelerin arasındaki ilişki Spearman korelasyon ve Kendall Tau-b korelasyon testleri ile ortaya konmuştur. 0.05'ten küçük olasılık katsayıları istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ($p<0.05$).

Parametrelerin hastaların yaşam sürelerine etkisi Cox regresyon analizi ile test edilmiştir.

BULGULAR

DEMOGRAFİK VE HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Altmış bir olgumuzun 36'sı (%59,1) kadın, 25'i (%40.9) erkektir. Genel yaş ortalaması 62 (41- 78)'dir . Tümör boyutu 1 cm ile 13 cm (ortalama 4.3 :cm, ortanca: 4 cm, standart sapma: 2.08 cm) arasında değişmektedir Tümör lokalizasyonu tüm olgularda pankreas başı bölgesidir. Olgularımızın 56'sı hastanemiz Genel Cerrahi Kliniği'nde Whipple operasyonu olmuş, 5 olgu operasyon sırasında inoperable bulunarak primer tümörü örneklenmiştir. Opere edilebilen 56 olgudan 29 (%56.9)'unda R0 rezeksiyon (Rezeksiyon hattında tümör yok), buna karşın 21 (%41.2)'inde R1(rezeksiyon hattında mikroskopik odakta tümör var) ve 1 (%2)'inde R2 rezeksiyon (rezeksiyon hattında makroskopik olarak görülebilen tümör var) uygulanabilmiştir.

Olgularımızın ortanca yaşam ayı 12.22 ay (minimum: 0, maksimum: 29 ay) dir. Sağkalım verileri bilinen 48 olgudan 9 (%18.8)'u halen sağ olup 39 (%81.3)'u ise yaşamını yitirmiştir. Kalan 13 olgunun yaşam durumları, yeterli klinik bilgiye ulaşamadığından bilinmemektedir. Olgularımızın klinikopatolojik verileri aşağıda özetlenmektedir (Tablo III).

Tablo III.**Olguların klinikopatolojik bulguları****Hasta sayısı (n)**

		Hasta sayısı (n)
Histolojik derecesi	1	17 (%27.9)
	2	33 (%54.1)
	3	11 (%18)
	Toplam	61
T evresi	T1	1 (%1.6)
	T2	10 (%16.4)
	T3	38 (%62.3)
	T4	7 (%11.5)
Toplam	56	
N evresi	N0	20 (%32.8)
	N1	39 (%63.9)
Toplam	59	
M evresi	M0	38 (%62.3)
	M1	23 (%37.7)
Toplam	61	
Klinik Evre	1	1 (%1.6)
	2	3 (%4.9)
	3	10 (%16.4)
	4	19 (%31.1)
	5	4 (%6.6)
	6	24 (%39.3)
Toplam	61	
Perinöral invazyon	+	48 (%84.3)
	-	9 (%15.8)
Toplam	57	
Kan damar invazyonu	+	21 (%35.6)
	-	38 (%64.4)
Toplam	59	
Lenfatik damar invazyonu	+	30 (%50.8)
	-	29 (%49.2)
Toplam	59	

İMMÜN DOKUKİMYASAL VE STEREOLOJİK BULGULAR

COX-2 İMMÜN BOYAMASI

Cox-2 antikoru ile pozitif boyanma saptanan toplam 45 (%73.8) olgudaki boyanma skorları Tablo IV'te özetlenmiştir. Pozitif boyanma izlenen olguların tümünde boyanma sitoplazma ile sınırlıdır.

Tablo IV Cox-2 antikoru ile boyanma skorları

COX	BOYANMA PATERNİ	KİŞİ SAYISI	%
	0	16	26.2
	1	17	27.9
	2	23	37.7
	3	5	8.2
	TOPLAM	61	100

VSD VE NVES DEĞERLERİ

Tümörde CD31 antikoru ile vasküler endotel hücrelerinde sitoplazmik boyanma gösteren mikrodamarlar, duktus ya da tübül formasyonu gösteren tümör hücrelerinin çevresinde ve tümör stromasında gösterilmiştir. Stereolojik ölçüm sonrası hesaplanan VSD ve NVES oranları Tablo V'de gösterilmektedir.

Tablo V Olgularımızda VSD ve NVES değerleri

	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart sapma
VSD	1.19	30.10	6.33	5.11
NVES	8.40	150.80	32.18	25.9

STANDART PROGNOZİK PARAMETRELER ARASINDAKİ İLİŞKİ

Olgularımızın TNM evreleri ve klinik evreleri ile tümör derecesi, boyutu, perinöral, lenfatik ve kan damar invazyonları arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde metastazı olan ve olmayan olgular arasında tümör derecesi açısından anlamlı bir farklılık saptandı ($p=0.023$, ki-kare testi) (Tablo VI). Ancak metastazı olan ve olmayan olgular ile tümör derecesi arasında herhangi bir korelasyon saptanmadı.

Tablo VI Metastaz ve tümör dereceleri arasındaki ilişki

Metastaz	Derece 1	Derece 2	Derece 3	Toplam
0	15	16	7	38
1	2	17	4	23
Toplam	17	33	11	61

Ayrıca metastazı olan ve olmayan gruplar arasında kan damarı invazyonu açısından anlamlı bir farklılık vardı ($p=0.045$, ki-kare testi). Metastazı olan olgularda kan damarı invazyonu daha sıklıkla izlendi (Kendall's tau-b, $R=0.261$, $p=0.047$) (Tablo VII).

Tablo VII Metastaz ve kan damarı invazyonu arasındaki ilişki

Metastaz	Kan damar invazyonu		TOPLAM
	-	+	
M0	28	10	38
M1	10	11	21
Toplam	38	21	59

Bunun dışında diğer prognostik parametrelerin kendi aralarında anlamlı ilişkisi saptanmadı.

İMMÜN DOKUKİMYASAL VE STEREOLOJİK BULGULARIN STANDART PROGNOSTİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ

Olgularda Cox-2 reseptör boyanma oranları ile tümörlerin TNM evresi, tümör boyutu, klinik evresi, perinöral, lenfatik ve kan damarı invazyonu, tümör boyutu ve derecesi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (Ki-kare, $p>0.05$, Spearman korelasyonu).

Anjiogenetik aktivite ile prognostik parametreler arasındaki ilişkiye bakıldığında ,lenf düğümü metastazı olan ve olmayan olgular arasında damar parametreleri (VSD ve NVES) açısından anlamlı bir farklılık vardı (sırası ile, $p=0.013$ ve $p=0.016$, Independent samples T-Test). Lenf düğümü metastazı olan olgularda VSD ve NVES değerleri daha yüksekti (Kendall's tau-b, sırasıyla $R=0.334$, $p=0.02$ ve $R=0.294$, $p=0.07$) (Tablo VIII).

Tablo VIII Lenf düğümü metastazı olan ve olmayan gruplarda VSD ve NVES değerleri

N evresi	Olgu	VSD(Ortalama)	Standart Sapma
0	20	3.94	1.96
1	39	7.22	5.51
0	20	NVES (Ortalama)	
1	39	20.64	10.48
Toplam	59	36.68	27.2

Tümör dereceleri arasında da VSD ve NVES değerleri anlamlı istatistiksel farklılık göstermekte idi ($p= 0.000$, One way Anova). Tümör derecesi arttıkça damar parametrelerinde artış gözlemlendi (Kendall's tau-b, sırasıyla $R=0.40$, $p=0.00$ ve $R=0.406$, $p=0.00$) (Tablo IX).

Tablo IX Tümör dereceleri ile VSD ve NVES değerleri arasındaki ilişki

Derece	Olgu	VSD (ortalama)	Standart sapma
1	17	3,76	1,71
2	33	6,02	3,88
3	11	11,22	8,11
Toplam	61	6,33	5,11
Derece		NVES (ortalama)	
1	17	19,7	8,96
2	33	30,33	19,46
3	11	58,01	40,89
Toplam	61	32,18	25,98

Ayrıca klinik evreler, Evre 1A, 1B ve 2A düşük evre, Evre 2B, 3 ve 4 ise yüksek evreler olarak gruplandırıldığında, yüksek ve düşük evreli tümörler VSD açısından anlamlı farklılık göstermekte idi ($p=0.045$, One way Anova). Yüksek evrelerde vasküler yüzey dansitesi artmış olarak saptandı. (Kendall's tau-b, $R=0.28$, $p=0.01$) (Tablo X).

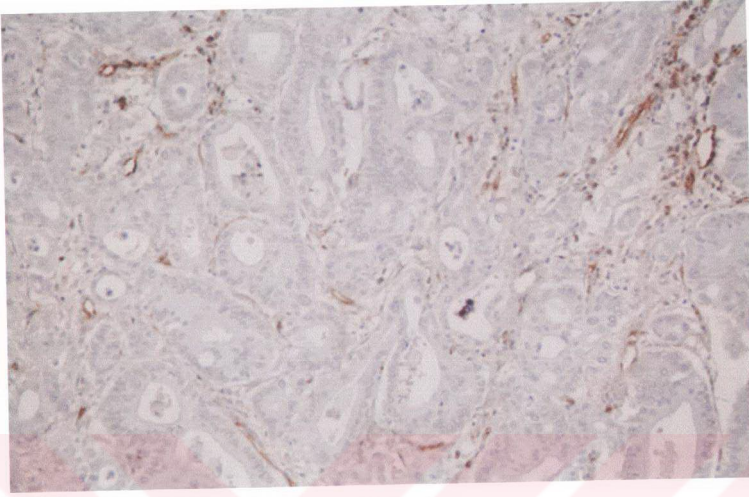
Tablo X Klinik evreler ile VSD arasındaki ilişki

	Evre	Olgu	Ortalama	Standart Sapma.
VSD	1	14	3.93	2.17
	2	47	7.04	5.51

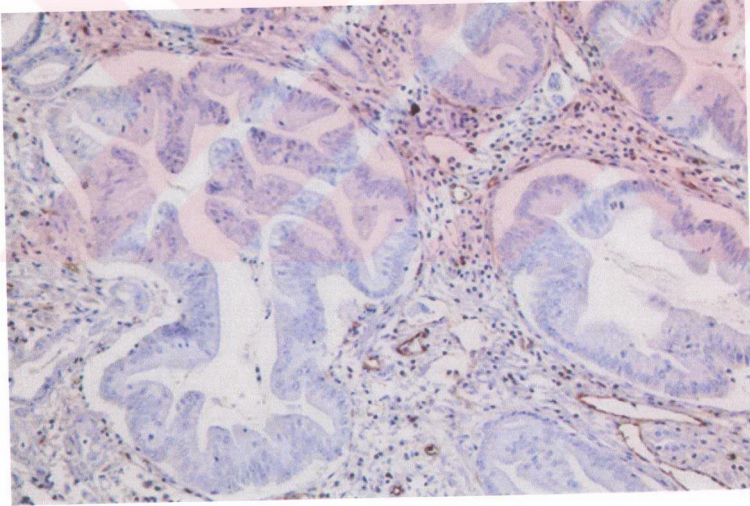
Damar parametreleri ile diğer prognostik parametreler (T ve M evreleri, tümör boyutu, lenfatik, kan damarı, perinöral invazyon ve klinik evre) arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

STANDART PROGNOSTİK PARAMETRELER, İMMÜN DOKUKİMYASAL VE STEREOLOJİK BULGULARIN SAĞKALIM İLE İLİŞKİSİ

Çalışmamızda Cox-2 reseptör boyanma oranları ile damar parametreleri arasında, Cox-2 ile standart prognostik parametreler ve sağkalım arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır (Cox regresyon analizi).

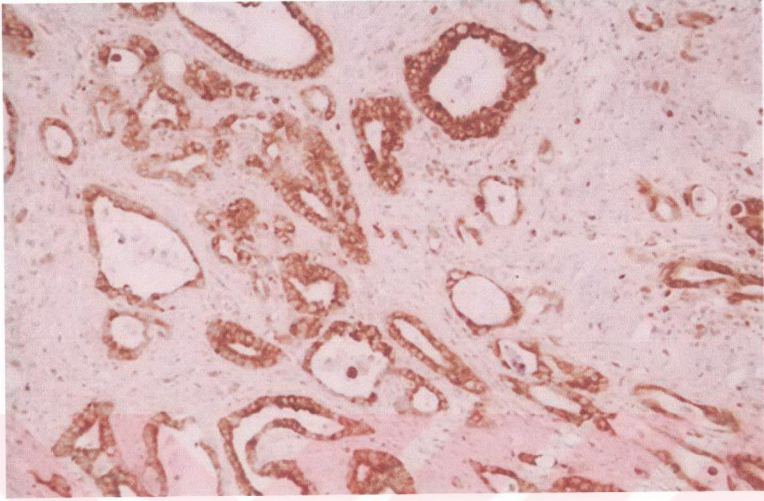


Resim 1



Resim 2

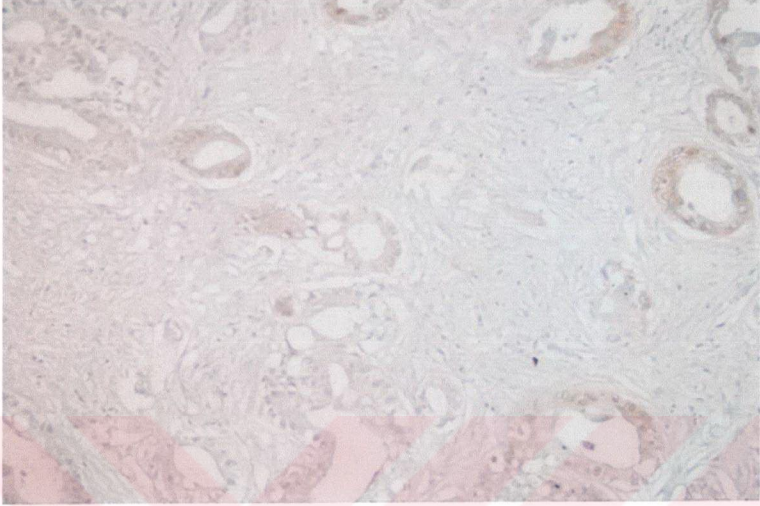
Resim 1 ve 2: Duktal adenokarsinomda CD31 ile pozitif boyananan mikrodamar yapıları.



Resim 3: Duktal adenokarsinomda COX-2 ile şiddetli sitoplazmik boyanma (+++)



Resim 4: Total adenokarsinomda COX-2 ile orta şiddette sitoplazmik boyanma (++)



Resim 5: Duktal adenokarsinomda COX-2 ile zayıf sitoplazmik boyanma (+)

TARTIŞMA

Anjiogenezis, karsinogenezin evrelerinde önemli olduğu bilinen, önceden var olan damarlardan yeni damar oluşumudur. Tümörlerin vaskülarize olmadıkları sürece 1-2 mm çaptan daha öteye gidemedikleri ve hipoksinin, p53 aktivasyonu sonucu tümör hücrelerinin apopitozuna yol açması ile tümör büyümesinin engellendiği öne sürülmektedir. Neovaskülarizasyon tümör büyümesinde çift etkiye sahiptir. Perfüzyon ile besin ve oksijen desteği sağlanırken, bir yandan da yeni oluşan endotel hücreleri IGF, PDGF, GM-CSF ve IL-1 gibi çeşitli polipeptidleri sekrete ederek tümör hücrelerinin büyümesini stimüle eder. Anjiogenez sadece tümör büyümesi için değil tümör metastazı için de gereklidir. Vaskülarizasyon sağlanmadıkça tümör hücreleri metastaz yapamazlar. Bugüne kadar melanom, meme, kolon, akciğer ve prostat gibi çeşitli kanser türlerinde anjiogenez (mikrodamar dansitesi) ile metastaz arasındaki ilişki çalışılmıştır. İn vitro ve in vivo deneysel çalışmalarda artmış anjiogenetik faktör ekspresyonuna bağlı artan anjiogenezin primer tümör büyümesi ve metastaz yapmasını arttırdığı gösterilmiştir (63,72). Tümör anjiogenezinin değerlendirilmesi için tüm vasküler endotelial hücrelere özgü olarak saptanan antikorlar bulunmuştur. Faktör VIII Ag, CD 31, CD 34, CD 36 ya da Ulex europaeus aglutininin-1 bunlar arasında yer alan belirleyicilerdir.

Birçok solid neoplazilerde anjiogenez araştırma konusu olmuş ve tümör progresyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Meme kanserlerinde anjiogenezisin, metastaz yeteneği ile bağıntılı olduğu, tümörün metastatik potansiyelinin belirlenmesi ve antianjiogenik tedavi alacak hastaların seçiminde önemli olduğu gösterilmiştir. Anjiogenezis, invaziv meme karsinomlarında hem uzak metastaz hem de aksiller lenf düğümü metastazının bağımsız bir göstergesi olarak bulunmuştur (73). Renal hücreli karsinomlar, akciğerin küçük hücreli dışı karsinomları, mesane, over, meme karsinomları gibi birçok solid tümörlerde anjiogenezin derecesi ile metastaz olasılığı ve yaşam süresi arasında ilişki bulunduğu saptanmıştır (74-80). Bir çalışmada invaziv prostat kanserlerinde tümör anjiogenezi ile metastaz ilişkili olarak bulunmuştur (73).

Bir başka çalışmada anjiogenezin, radikal prostatektomi materyallerinde evre ile ilişkisi araştırılmış ve patolojik evre ile mikrodamar dansitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır (81).

Weidner ve ark (74) çalışmalarında, meme kanserlerinde, uzak metastazı ve prognozu önceden belirlemede, yaygın tümör damarlanmasının saptanmasının önemini göstermişlerdir. Yörükoğlu ve ark (82) yaptıkları bir çalışmada prostat iğne biyopsileri ile radikal prostatektomi materyallerinde anjiogenetik aktivite ölçümlerini karşılaştırmışlar ve her iki materyaldeki anjiogenez ölçüm değerlerinin korele olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca bu çalışmada anjiogenezin prostat iğne biyopsilerinde evreyi belirleyebileceği sonucuna varmışlardır.

Pankreatik adenokarsinom, cerrahi tedavi ve kemoterapi rejimlerine rağmen yüksek sıklıkta lokal rekürrens ve uzak metastaz yapan agresif karakterli bir tümördür. Anti-anjiogenik ajanların birçok tümörde olduğu gibi pankreas kanserinde de uygulanımına yönelik çalışmalar bazı merkezlerde sürmektedir. Ancak pankreas kanserinde anjiogenezinin prognostik belirleyicilerle ilişkisi literatürde tam olarak aydınlatılamamıştır. Ikeda ve ark (17) pankreatik kanser hastalarında intratümöral mikrodamar dansitesinin bağımsız prognostik faktör olduğunu bulmuşlardır. Öte yandan Ellis ve ark (83) pankreas kanserinde hastalığın yaygınlığı ve damar miktarı arasında ilişki olmadığını bildirmişlerdir. Egawa ve ark (84) ile Kawarada ve ark (85) ise pankreatik adenokarsinomun hematojen yayılımının, tümör büyümesinde önemli rol alan anjiogenezin inhibisyonu ile ortadan kaldırılacağını bildirmişlerdir.

Tümör vaskülarizasyonunun niceliği morfometrik yöntemlerle ölçülen ve her bir kesitte gelişigüzel sayılan mikrodamar sayısına bağlıdır. Kimi araştırmacılar damar sayılarının 'hot spot' adını verdikleri damarlanmanın en yoğun olduğu alanlarda seçilmesi gerektiğini belirtmektedirler. Bununla birlikte bu yöntemler damarların basısı, kıvrımlanmaları gibi çeşitli faktörler ile etkilenmektedir. Ayrıca 'hot spot' denilen maksimum damarlanmanın seçimi, gözlemciye bağlı olduğu için hatalara neden olabilmektedir. Bu gibi nedenlerle üç boyutlu yapıların değerlendirilmesinde kullanılan bir parametre olan VSD(vascular surface density)'nin doğrudan stereolojik yöntemlerle değerlendirilmesiyle bu dezavantajlardan sakınılabileceği bildirilmektedir.

Bizim çalışmamızda da anjiogenez, stereolojik yöntem ile VSD (mm^{-1}) ve NVES (mikrodamar sayısı mm^{-2}) değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. VSD ortalama değerleri 6.33 mm^{-1} (maximum 30.10, minimum 1.19) ve NVES ortalama değerleri 32.18 mm^2 (maximum 150.80, minimum 8.40) tır. Bu çalışmada tümör dereceleri arasında VSD ve NVES değerleri açısından anlamlı istatistiksel farklılık bulunmuştur. Tümör derecesi arttıkça damar parametrelerinde artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca anjiogenetik aktivite ile diğer prognostik parametreler arasındaki ilişkiye bakıldığında, lenf nodu metastazı olan ve olmayan olgular arasında, damar parametreleri (VSD ve NVES) açısından anlamlı bir farklılık saptanmış ve lenf nodu metastazı olan olgularda VSD ve NVES değerleri daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca klinik evreler dikkate alındığında, yüksek ve düşük evreli tümörler ile VSD arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ve yüksek evrelerde vasküler yüzey dansitesi düşük evrelere göre anlamlı olarak fazladır. Tümör içi vasküler ve perinöral invazyon yanı sıra uzak metastaz ile damar parametreleri arasında ilişki yoktur. Bu bulgulara göre, çalışmamız pankreas karsinomlarında, artmış tümör damarlanmasının, yüksek tümör evresi, derecesi ve lenf düğümü metastazı gibi kötü prognozu belirleyen faktörler ile ilişkili olduğu fikrini desteklemektedir. Ancak damar parametreleri ile sağkalım süreleri arasında doğrudan bir ilişki saptanmamıştır. Bu da tümör büyüme ve metastazının kompleks ve çok basamaklı oluşu ve anjiogenezin pankreatik karsinomlu hastaların sağkalımını belirleyen tek basamak olmayışı ile açıklanabilir. Tümör hücrelerinin eksprese ettiği tümör stromasındaki farklı integrin proteinleri ve bunların reseptörleri yanı sıra, büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri gibi etmenler de tümör biyolojisinde önemlidir.

Cyclooxygenase (COX) enzimi, Araşidonik Asitten Prostaglandin H2 sentezinde hız sınırlayıcı adımı katalizleyen enzimdir. Bu enzimin iki izoformu tanımlanmıştır. Cyclooxygenase-1 (COX-1) çoğu dokuda eksprese edilir ve doku homeostazında önemlidir. Cyclooxygenase-2 (COX-2) çoğu hücre ve dokuda çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve tümör promotörleri tarafından stimüle edilen indüklenebilen formudur. Yapısal benzerliklerine karşın COX-1 ve COX-2'nin doku biyolojisi ve hastalıklarda farklı rollere sahip olduğu bilinmektedir.

Son zamanlarda Cox-2'nin hücre büyümesinin kontrolünde, apoptozu önlemede, hücre motilitesi, adezyon, anjiyogenez ve kanser oluşumundaki rolü araştırılmaktadır.

Spesifik olmayan COX inhibitörleri, non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİD), son zamanlarda geliştirilen COX-2 spesifik inhibitörlerinin, hem hayvan modellerinde hem de kanserli hastaların tedavilerinde tümör progresyon ve insidansını azaltmadaki etkisi gösterilmiştir.

Sindirim sisteminde özefagus, kolorektal, karaciğer ve pankreas tümörlerinde ayrıca akciğer, prostat ve meme tümörlerinde yapılan çalışmalarda Cox-2'nin artmış ekspresyonunun tümör oluşumunda önemli rolü olduğu ve Cox-2 mRNA ekspresyonunun artmış olduğu gösterilmiştir. Cox-2'nin bu kanser türlerinde artmış ekspresyonunun hücre-hücre adezyonunu ve apoptozisi önlemede ve anjiyogenezi uyarmada da ve dolayısı ile kanser progresyonunda etkisi olduğu bulunmuştur.

Chen XL ve ark (86) bir çalışmada gastrik adenokarsinomda Cox-2 nin immün dokü kimyasal olarak kanser hücrelerinde dağılımını araştırmış Cox-2 nin tümör hücre sitoplazmasında ve kısmen de nükleusta bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca insan gastrik kanserlerinde artmış Cox-2 ekspresyonunun tümör lokalizasyonu ve lenf nodu metastazi ile doğru ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada Cox-2 ve bcl-2'nin artmış ekspresyonunun korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Tümör çevresi dokuda münöz epitelde, intestinal metaplazi gösteren epitelde, goblet hücrelerinde ayrıca interstisyel makrofajlar ve fibroblastlarda ve endotel hücrelerinde ve birkaç glandüler epitelde düşük yoğunlukta Cox-2 antikoru boyanması saptanmıştır. Ancak boyanmanın kanseröz dokuda parakanseröz dokudan daha fazla olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda (86) tümör gelişiminde Cox-2'nin birçok basamakta önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Bu çalışmada Cox-2'nin PG üretimini arttırdığı, prekanserojenden kanserojene dönüşümü gerçekleştirdiği, hücre adhezyonunu artırıp apoptozu önlediği, tümör anjiyogenezini artırması, immün fonksiyonları ve inflamasyonu regüle ettiği, tümör hücrelerinde invazivliği artırması bulunmuş. Yine bir çalışmada artmış Cox-2 ekspresyonunun artmış bcl-2 ekspresyonuna yol açtığı ve bu sayede apoptozu inhibe ettiği görülmüştür.

Cox-2 proteininin artmış ekspresyonu ile gastrik karsinomlarda lenf düğümü metastazi ve derin invazyon ile anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur (87). Ancak başka bir çalışmada ise mide tümörlerinde, bizim çalışmamızda olduğu gibi, Cox-2 ekspresyonu ile lenf nodu metastazi, vasküler invazyon ve tümör hücre diferansiyasyon derecesi arasında bir korelasyon bulunamamıŐtır (88). Bir başka çalışmada, mide karsinomunda anjiogenez ve artmış PGE2 biyosentezi ile artmış Cox-2 ekspresyonu arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (89).

Y zyirmisekiz kolorektal karsinomlu hastanın, 87'sinde (%67.9) Cox-2'nin artmış ekspresyonunun bulunduğu ve bunun invazyon derinliği, hastalığın evresi, karaciğer ve lenf nodu metastazi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Yine bu çalışmada sonuç olarak Cox-2'nin anjiogenezi düzenlediği ve kanser hücre motilitesi ve kolorektal kanserde invaziv potansiyel ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (90). Bir diğer çalışmada sporadik kolorektal adenomlarda neoplastik epitelyal hücrelerde proliferatif aktivite ve Cox-2 ekspresyonu arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada adenomun progresyonunda ve malign transformasyonunda Cox-2'nin artmış ekspresyonu gösterilmiştir (91). Sakuma ve ark (92) alıŐmasında ise, Cox-2 ekspresyonunun adenomun progresyonu ve hücre proliferasyonu ile ilişkisi olmadığı  ne sürülmektedir.

Özefagus skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinomlarında yapılan bir çalışmada Cox-2 ekspresyonunun apoptoz inhibisyonunda ve tümör progresyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (93). Prostat kanserinde yapılan bir çalışmada ise prostatik kanserde ve benign prostat hiperplazisinde Western Blot yöntemi ile Cox-2'nin artmış ekspresyonu gösterilmiştir (94). Meme kanserinde yapılan bir çalışmada Cox-2 inhibisyonunun kanser tedavisindeki anlamı vurgulanmıŐtır (95). Başka bir çalışmada ise kolorektal kanserli hastalarda Cox-2'nin artmış ekspresyonunun sağkalım ile ilişkili, bağımsız prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (96).

Pankreas kanserinde ise Cox-2'nin rolü ile ilgili bilgiler sınırlıdır ve Cox-2'nin anjiogenez ile ilişkisi ile ilgili çok kısıtlı veri bulunmaktadır. Pankreatik duktal adenokarsinomlarının %57-80'inde Cox-2'nin artmış ekspresyonu bildirilmektedir (97).

Bir çalışmada (98) pankreas patolojilerinde Cox-2'nin ekspresyonu değerlendirilmiştir. Buna göre Cox-2'nin rejeneratif epitelde %20, atipisiz hiperplazide %11.1, hafif atipili hiperplazide %86.4, displazide %75 ve kanseröz lezyonlarda %75 oranında eksprese edildiği bulunmuştur. Tseng ve ark (99) selektif Cox-2 inhibitörlerinin, insan pankreas kanserinde tümör büyümesini yavaşlattığını bulmuşlardır. Molina ve ark (97) pankreatik duktal karsinomlu 21 olgunun 14'ünde (%67) sitoplazmik Cox-2 ekspresyonunu göstermişlerdir. Bu çalışmada pankreas karsinomunda normal pankreasa göre Cox-2 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. İnsan pankreas tümörlerinde ve hücre kültürlerinde, hem selektif hem de nonselektif Cox-2 inhibitörleri ile tümör hücre büyümesinin azaldığı gösterilmiştir.

Tucker ve ark (58) yaptığı bir çalışmada pankreatik kanserde artmış Cox-2 mRNA ve protein miktarı araştırılmıştır. Pankreas kanserli 10 olguda immünohistokimyasal olarak Cox-2 ekspresyonunun boyanma paternleri çalışılmış ve multifokal, tümör hücrelerinde lokalize, orta-güçlü boyanma saptanmıştır. Stromal hücreler ve inflamatuvar hücrelerde boyanma gözlenmemiştir. Boyanma paterni bizim çalışmamızda olduğu gibi predominant olarak granüler ve perinükleer sitoplazmiktir. Ayrıca normal pankreas adacık hücrelerinde de boyanma saptanmıştır. Bu çalışmada Cox-2 ekspresyonu ile artmış PG sentezinin hücre proliferasyonunu ve angiogenezi arttırdığı, malign hücre büyümesini indüklediği ve böylece sağkalımın azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, son zamanlarda geliştirilen selektif Cox-2 inhibitörlerinin pankreas karsinomlu hastalarda kemoterapi ya da radyoterapi ile kombine ya da tek başına kullanımlarının sağaltımda yararlı olabileceği bildirilmiştir. Yine başka bir çalışmada pankreatik tümör gelişiminde ve intraduktal papiller tümör ve duktal adenokarsinomlarda Cox-2 inhibitörlerinin önemli rol oynadığı ve NSAID'lerin pankreatik neoplazileri önlemede kullanılabileceği bildirilmiştir (100). Bizim çalışmamızda tümör hücrelerindeki Cox-2 ekspresyonu ile tümörün biyolojik davranışı ve hasta sağkalımı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamızda elde edilen standart prognostik veriler değerlendirildiğinde, beklendiği gibi, uzak organ metastazı olan ve olmayan gruplar arasında kan damarı invazyonu ve tümör derecesi açısından anlamlı bir farklılık saptanmıştır. Uzak organ metastazı olan olgularda hem kan damarı invazyonu hem de tümör derecesi daha sıklıkla izlenmiştir. Ayrıca, sonuçlarımıza göre, anjiogenetik aktivitenin yüksek evreli tümörlerde ve lenf düğümü metastazı yapmış yüksek dereceli tümörlerde daha belirgin olduğu ortaya konmuştur. Bu grup olgularda antiangiogenetik tedavilerin uygulanması pankreas kanserli olguların tedavisinde yeni ufuklar açabilir. Ancak Cox-2 ekspresyonunun pankreas kanserinin biyolojik davranışına etkisi bu çalışmada gösterilememiştir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada 61 pankreas başı duktal adenokarsinomu olgusunda Cox-2 ve CD31 antikoru ile yaş, cinsiyet, tümör evresi, tümör derecesi, evresi, lenf düğümü metastazı, uzak organ metastazı, perinöral, kan ve lenf damarı invazyonu ve yaşam ayı gibi klinikopatolojik prognostik faktörlerin ilişkisi araştırılmış ve başlıca şu sonuçlar elde edilmiştir:

- 1) Olguların 36'sı kadın, 25'i erkektir. Genel yaş ortalaması 61.8'dir.
- 2) Tümör evresi bilinen 61 olgudan 17 (%27.9)'si evre 1, 33 (%54.1)'ü evre 2, 11 (%18)'i evre 3'tür.
- 3) T evresi bilinen 56 olgudan 1(%1.6)'i T1, 10(%16.4)'u T2, 38(%62.3)'ü T3 ve 7(%11.5)'si T4'tür.
- 4) Lenf düğümü metastazı bilinen 59 olgudan 20(%32.8)'sinde lenf nodu metastazı yok, 39(%63.9)'unda lenf düğümü metastazı vardır.
- 5) Uzak organ metastazı bilinen 61 olgudan 38(%62.3)'inde metastaz yok, 23(%37.7)'ünde ise vardır.
- 6) Evresi bilinen 61 olgudan 1(%1.6)'i evre 1, 3(%4.9)'ü evre 2, 10(%16.4)'ü evre 3, 19(%31.1)'u evre 4, 4(%6.6)'ü evre 5 ve 24(%39.3)'ü evre 6'dır.
- 7) R evresi bilinen 51 olgudan 29 (%56.9)'unda R0, 21 (%41.2)'inde R1 ve 1 (%2)'inde R2'dir.
- 8) Perinöral invazyonu değerlendirilebilen 57 olgudan 9(%15.8)'unda perinöral invazyon yok, 48(%84.3)'inde ise vardır.
- 9) Kan damarı invazyonu değerlendirilebilen 59 olgudan 38(64.4)'inde kan damarı invazyonu yok, 21(%35.6)'inde ise vardır.
- 10) Lenf damarı invazyonu değerlendirilebilen 59 olgudan 29(%49.2)'unda lenf damarı invazyonu yok, 30(%50.8)'ünde ise vardır.
- 11) Cox-2 antikoru ile pozitif boyanan 45 olgudan 17(%27.9)'sinde (+), 23(%37.7)'ünde (++) , 5(%8.2)'inde (+++) boyanma saptanmış olup 16(26.2) olguda boyanma olmamıştır.

12) VSD ortalama değerleri 6.33 mm-1 (maximum 30.10, minimum 1.19) ve NVES ortalama değerleri 32.18 mm-2 (maximum 150.80, minimum 8.40) tır.

13) Olgularımızın TNM evreleri ve klinik stage'i ile tümör derecesi, boyutu, perinöral, lenfatik ve kan damar invazyonları arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde metastazı olan ve olmayan olgular arasında tümör derecesi açısından anlamlı bir farklılık saptandı ($p=0.023$). Ancak tümör derecesi ve metastaz arasında doğru korelasyon saptanmadı.

14) Ayrıca metastazı olan ve olmayan gruplar arasında kan damarı invazyonu açısından anlamlı bir farklılık vardı ($p=0.045$). Metastazı olan olgularda kan damarı invazyonu daha sıklıkla izlendi ($p=0.047$). Bunun dışında diğer parametrelerin kendi aralarında anlamlı ilişki göstermediği saptandı.

15) Olgularda Cox-2 reseptör boyanma oranları ile tümörlerin TNM evresi, tümör boyutu, klinik evresi, perinöral, lenfatik ve kan damarı invazyonu, tümör boyutu ve derecesi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$).

16) Lenf düğümü metastazı olan ve olmayan olgular arasında damar parametreleri (VSD ve NVES) açısından anlamlı bir farklılık vardı (sırası ile, $p=0.013$ ve $p=0.016$). Lenf düğümü metastazı olan olgularda VSD ve NVES değerleri daha yüksekti (sırasıyla $p=0.02$ ve $p=0.07$).

17) Damar parametreleri ile, T ve M evreleri, tümör boyutu, lenfatik, kan damarı, perinöral invazyon ve klinik evre arasında da anlamlı ilişki saptanmadı. Ancak tümör dereceleri arasında VSD ve NVES değerleri anlamlı istatistiksel farklılık göstermekte idi ($p= 0.000$). Tümör derecesi arttıkça damar parametrelerinde artış gözlemlendi (sırasıyla $p=0.00$ ve $p=0.00$).

18) Klinik evreler, Evre 1A, 1B ve 2A düşük evre, Evre 2B, 3 ve 4 ise yüksek evreler olarak gruplandırıldığında , yüksek ve düşük evreli tümörler VSD açısından anlamlı farklılık göstermekte idi ($p=0.045$). Yüksek evrelerde damarlanma artmış olarak saptandı ($p=0.01$).

19) Çalışmamızda Cox-2 reseptör boyanma oranları ve damar parametreleri ve standart prognostik parametrelerin sağkalım ile ilişkisi saptanmamıştır.

ÖZET

Pankreas malignitelerinin en sık görülen türü ekzokrin pankreas tümörleridir ve bunlardan da en sık görüleni pankreatik duktal adenokarsinomdur. Pankreas duktal adenokarsinomlarında prognoza etki eden çok sayıda klinikopatolojik prognostik faktör tanımlanmıştır. Bu faktörlerden ileri yaş, tümör evresinin yüksek oluşu, T evresinin yüksek oluşu uzak organ ve lenf düğümü metastazlarının varlığının kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir. Ancak ek olarak hastaların prognozunu belirleyen tümör biyolojik faktörler de bulunmaktadır. Bu çalışmada yaş, cinsiyet, tümör evresi, tümör derecesi, T evresi, lenf düğümü ve uzak organ metastazları, perinöral, kan ve lenf damar invazyonlarını içeren klinikopatolojik prognostik faktörlerin kendi aralarındaki ilişki ve bu klinikopatolojik parametreler ile anjiogenez ve Cox-2 ilişkisi araştırıldı. Anjiogenezin tümör progresyonunda ve metastazda önemli rol oynadığı ancak tümör metastazında tek başına yeterli olmadığı bilinmektedir. Bizim çalışmamızda damar parametreleri (VSD ve NVES değerleri) ile; T ve M evreleri, tümör boyutu, lenfatik, kan damarı, perinöral invazyon ve klinik evre arasında da anlamlı ilişki saptanmadı. Ancak tümör dereceleri ile damar parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı. Tümör derecesi arttıkça damar parametrelerinde artış olduğu gözlemlendi. Lenf nodu metastazı olan ve olmayan olgular arasında damar parametreleri açısından anlamlı bir farklılık saptandı. Lenf nodu metastazı olan olgularda damar parametreleri daha yüksek olarak bulundu. Ayrıca metastazı olan ve olmayan gruplar arasında kan damarı invazyonu açısından anlamlı bir farklılık bulundu. Metastazı olan olgularda kan damarı invazyonu daha sıklıkla izlendi. Bunun dışında diğer parametrelerin kendi aralarında anlamlı ilişki göstermediği saptandı. Cox-2'nin kolon, mide, meme, beyin, nazofarinks, prostat ve pankreas tümörü gibi birçok tümörde aşırı ekspresyona edildiği bilinmektedir. Cox-2 reseptör boyanma oranları ile tümörlerin TNM evresi, klinik evresi, perinöral, lenfatik ve kan damarı invazyonu, tümör boyutu ve derecesi arasında anlamlı ilişki saptanmadı. Ayrıca Cox-2 ile anjiogenez arasında da anlamlı bir ilişki saptanmadı. Bu çalışmada klinikopatolojik faktörler değerlendirildiğinde Cox-2'nin aşırı ekspresyonunun prognoza etkisi olmadığı düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Cox-2, anjiogenez, prognostik faktörler, pankreatik adenokarsinom

SUMMARY

Exocrine pancreatic tumors are the most common type of pancreatic malignancies and pancreatic ductal adenocarcinoma is the most common type of this group. Many clinicopathologic prognostic factors are described in pancreatic ductal adenocarcinomas. Of these advanced age, progressed tumor stage, progressed T stage, lymph node and distant metastasis are mostly reported to be related with poor prognosis. But additional tumor biological factors are investigated to predict prognosis of these patients. In this study, the relation of clinicopathologic parameters which include age, gender, tumor stage, tumor grade, T stage, lymph node and distant metastasis, perineural, vascular and lymphatic invasion are assessed by each other, than the relation of Cox-2 expression as well as the angiogenetic activity with these prognostic parameters was analysed. It is known that angiogenesis is important although not enough in tumor progression and metastasis. Our findings suggest that T and M stages, tumor size, lymphatic, vascular, perineural invasion and clinical stage are not related with the vascular parameters. There was significant statistical difference between the vascular parameters and tumor grade. That is; vascularity increased with higher tumor grades. A significant difference was found between the cases with lymph node metastasis and non metastatic cases in terms of vascularity. Vascular parameters were found to be higher in lymph node metastatic group. Additionally vascularity was higher in higher stage tumors. There was also a significant difference between the metastatic and non metastatic cases in terms of vascular invasion. Vascular invasion was found more often in metastatic cases. Except this, any relation was not found between the other parameters. It is well known that Cox-2 is overexpressed in tumors like colon, stomach, breast, brain, nasopharynx, prostate and pancreas tumors. In this study, no significant relation was found between Cox-2 receptor staining with clinicopathologic prognostic factors. In this study Cox-2 overexpression as well as tumor vascularity was not related with the prognosis.

Key words: Cox-2, angiogenesis, prognostic factors, pancreatic adenocarcinoma

KAYNAKLAR

1. Cubilla AL, Fitzgerald PJ. Tumors of The exocrine pancreas. Atlas of Tumor Pathology. 2nd Series, Fascicle 19. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC: 1984; 162.
2. Histological typing of endocrine tumours, 2nd edn. WHO International Histological Classification of Tumours. Berlin, Springer 2000.
3. Rosenblum E, Shutte M, Goggins M et al. Tumor suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1781-4.
4. Moore PS, Orlandini S, Zamboni G et al. Pancreatic tumors: molecular pathways implicated in ductal cancer are involved in ampullary but not in exocrine nonductal or endocrin tumorigenesis. *Br J Cancer* 2001; 84: 253-62.
5. Sobin LH, Wittekind CH (eds.) UICC TNM Classification of Malignant Tumors, 6th edition. Wiley-Liss, New York 2002; 52-56.
6. Warshaw AL, Fernandez-Del Castillo C: Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* 1992; 326: 455-465.
7. Nagakawa T, Nagamori M, Futakami F, Tsukioka Y, Kayahara M, Ohta T, Ueno K, Miyazaki I: Results of extensive surgery for pancreatic carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 640-645.
8. Iocono C, Facci E, Bortolasi L, Zamboni G, Scarpa A, Talamini G, Prati G, Nifosi F, Serio G: Intermediate results of extended pancreaticoduodenectomy. Verona experience. *J Gastrointest Surg* 1999, in pres.
9. Sperti C, Pasquali C, Piccoli A, Pedrazzoli S: Recurrence after resection for ductal adenocarcinoma of pancreas. *World J Surg* 1997; 21: 195-200.

10. Cubilla AL, Fitzgerald PJ, Fortner JG. Pancreas cancer-duct cell adenocarcinoma: survival in relation to site, size, stage and type of therapy. *J Surg Oncology* 1978; 10: 465-82.
11. Klöppel G, Lिंगenthal G, von Bülow M, Kern HF. Histological and fine structural features of pancreatic ductal adenocarcinomas in relation to growth and prognosis: studies in xenografted tumours and clinico-histopathological correlation in a series of 75 cases. *Histopathology* 1985; 9: 841-56.
12. Lipponen PK, Eskelinen MJ, Collan Y, Marin S, Alhava E. Volume-corrected mitotic index in human pancreatic cancer. Relation to histologic grade, clinical stage, and prognosis. *Scand J Gastroenterol* 1990; 25: 548-54.
13. Mannel A, van Herden JA, Weiland LH, Ilstrup DM. Factors influencing survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Ann Surg* 1986; 203: 403-7.
14. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
15. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al. Control angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-1584.
16. Fidler LJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994; 79: 185-188.
17. Ikeda N, Adachi M, Taki T, Huang C, Hashida H, Takabayashi A, Sho M, Nakajima Y, Kanehiro H, Hisanaga M, Nakano H, Miyake M. Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 1553-1563.
18. Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Beger HG, Uchida E, Onda M, Kobrin MS, Korc M. Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res* 1993; 53: 5289-5296.

19. Reinmuth N, Alexander A, Syed A, Wenbiao L, Stoeltzing O, Fan F, Takeda A, Akagi M, Ellis L. Biology of angiogenesis in tumors of the gastrointestinal tract. *Microscopy Research and Technique* 2003; 60: 199-207.
20. Kusaka M, Sudo K, Fujita T, et al. Potent anti-angiogenic action of AGM-1470: comparison to fumagillin parent. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 174: 1070-1076.
21. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328.
22. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-285.
23. Nishimori H, Shiratsuchi T, Urano T, et al. A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene* 1997; 15: 2145-2150.
24. Saimura M, Nagai E, Mizumoto K, et al. Tumor suppression through angiogenesis inhibition by SUIT-2 pancreatic cancer cells genetically engineered to secrete NK+. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3243-3249.
25. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947-11954.
26. Nor JE, Christensen J, Money DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Ann J Pathol* 1999; 154: 375-384.

27. Lee JC, Chow NH, Wang ST, Huang SM. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *Eur J Cancer* 2000; 36: 748-753.
28. Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Sowa M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 858-863.
29. Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, Lee JU, Koshihara T, Miyamoto Y, Tsuji S, Nakajima S, Doi R, Imamura M. Expression of two angiogenic factors, vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial growth factor in human pancreatic cancer, and its relationship to angiogenesis. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1439,1447.
30. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cell in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 1207-1210.
31. Crosby JR, Tapan KA, Seifert RA, Bowen Pope DF. Chimera analysis reveals that fibroblasts and endothelial cells require platelet-derived growth factor receptor beta expression for participation in reactive connective tissue formation in adults but not during development. *Am J Pathol* 1999; 154: 1315-1321.
32. Sachinidis A, Locher R, Hppe J, Vetter W. The platelet-derived growth factor isomers, PDGF-AA, PDGF-AB and PDGF-BB, induce contraction of vascular smooth muscle cells by different intracellular mechanism. *FEBS Lett* 1990; 275: 95-98.
33. Bilato C, Pauly RR, Melillo G, Monticone R, Gorelick-Feldman D, Gluzband YA, Sollot SJ, Ziman B, Lakatta EG, Crow MT. Intracellular signaling pathways required for rat vascular smooth muscle cell migration . Interactions between basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 1995; 96: 1905-1915.

34. Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L. Basic Fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:7297-7301.
35. Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes . *Adv Cancer Res* 1992; 59: 115-165.
36. Takahashi Y, Bucana CD, Liu W, Yoneda J, Kitadai Y, Cleary KR, Ellis LM. Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells. *J Natl Cancer Inst* 1996a; 88: 1146-1151.
37. Peters KG. Vascular endothelial growth factor and the angiopoietins:working together to build a beter blood vessel. *Circ Re* 1998; 83: 342-343.
38. Matsushima K, Baldwin ET, Mukaida N. 1992. Interleukin-8 and MCAF:novel leukocyte recruitment and activating cytokines. *Chem Immunol* 51:236-265.
39. Kasahara T, Mukaida n,Yamashita K, Yagisawa H, Akakoshi T, Matsushima K. IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. *Immunology* 1991; 74: 60-67.
40. Hynes RO. Integrins:versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.*Cell* 1992; 69: 11-25.
41. Ivaska J, Heino J. Adhesion receptors and cell invasion:mechanisma of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 16-24.
42. Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW. Isolation and properties of a thrombin sensitive protein of human platelets. *J Biol Chem* 1972; 247: 2723-2731.

43. Tokunaga T, Nakamura M, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Fukushima Y, Hatanaka H, Sadahiro S, Kijima H, Tsuchida T, Yamazaki H, Tamaoki N, Ueyama Y. Thrombospondin 2 expression is correlated with inhibition of angiogenesis and metastasis of colon cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 354-359.
44. Beckner ME. Factors promoting tumor angiogenesis. *Cancer Invest* 1999; 17: 594-623.
45. Ellis LM, Liu W, Fan F, Reinmuth N, Shaheen RM, Jung YD, Ahmad S. Role of angiogenesis inhibitors in cancer treatment. *Oncology (huntingt)* 2001; 15: 39-46.
46. Itakura J, Ishiwata T, Friess H, Fujii H, Matsumoto Y, Buchler MW, Korc M. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1309-1316.
47. Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S, Negri G, Oohara T, Beger HG. Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness. *Cancer Res* 1996; 56: 2703-2706.
48. Karademir S, Somken S, Terzi C, Sagol O, Ozer E, Astarcioglu H, Coker A, Astarcioglu I. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in pancreas cancer. *J Hepatobil Pancreat Surg* 2000;7:489-495.
49. Barton CM, Hall PA, Hughes CM, Gullick WJ, Lemoine NR. Transforming growth factor alpha and epidermal growth in human pancreatic cancer. *J Pathol* 1991; 163: 111-116.
50. Ikeda N, Adachi M, Taki T, Huang H, Takabayashi A, Sho M, Nakajima Y, Kanehiro H, Hisanaga M, Nakano H, Miyake M. Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 1553-1563.

51. Chen YK, Capdevila J, Haris RC. Cytochrome p450 epoxygenase metabolism of arachinonic acid inhibits apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001a; 21: 6322-6331.
52. Subbaramaiah K, Zakim D, Weksler BB, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase: A novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Biol Med* 1997; 216: 201-210.
53. Kimura M, Osumi S, Ogihara M. Stimulation of DNA sththesis and proliferation by prostoglandins in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 2000; 404: 259-271.
54. Tessner TG, Cohn SM, Schloemann S, Stenson WF. Prostaglandins prevent decreased epithelial cell proliferation associated with dextran sodium sulfate injuri in mice. *Gastroenterology* 1998; 115: 874-882.
55. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Terrenbach S, Dubois RN. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183-1188.
56. Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimaki A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 4997-5001.
57. Ratnasinghe D, Tangrea J, Roth MJ, Dawsey S, Hu N, Anver M, Wang QH, Taylor PR. Expression of cyclooxygenase-2 in human squamous cell carcinoma of esophagus: An immunohistochemical survey. *Anticancer Res* 1999; 19: 171-174.
58. Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, Fahey TJ III. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 987-990.

59. Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1997; 99: 2254-2259.
60. Li M, Wu X, Xu XC. Induction of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome c-dependent pathway. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1010-1016.
61. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostoglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 362-366.
62. Surette ME, Winkler JD, Fonteh AN, Chilton FH. Relationship between arachidonate-phospholipid remodeling and apoptosis. *Biochemistry*. 1996; 35: 9187-9196.
63. Barth PJ, Weingartner K, Köhler HH, et al: Assesment of the vascularization in prostatic carcinoma: a morphometric investigation. *Hum Pathol* 1996; 27: 1306-1310.
64. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B By sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994; 265: 956-959.
65. Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, Manak MJ, Patierno SR. Inhibitors of prostoglandin sythesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 2000; 60: 4629-4637.
66. Jiang MC, Liao CF, Lee PH. Aspirin inhibits matrix metalloproteinase-2 activity, increases E-cadherin production, and inhibits in vitro invasion of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 671-677.

67. Rozic JG, Chakraborty C, Lala PK. Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer* 2001; 93: 497-506.
68. Chen WS, Wei SJ, Liu JM, Hsiao M, Kou-Lin J, Yang WK. Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2 selective inhibitor, etodolac. *Int J Cancer* 2001b; 91: 894-899.
69. Tsuji M, Dubois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostoglandin endoperoxidase synthase 2. *Cell* 1995; 83: 493-501.
70. Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 18075-18081.
71. Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawako H, Hori M, DuBois RN. 1998. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93:705-716.
72. Cheng S-Y, Huang H-JS, Nagane M, et al. Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8502-
73. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillet NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 1995; 95: 1789-1797.
74. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastases-correlation in invasive breast carcinoma. *N Eng J Med* 1991; 324: 1-8.

75. Horak ER, Leek R, Leek N, Lejeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris AL. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastasies and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-1124.
76. Weidner N,. Intratumor Microvessel Density as a Prognostic Factor in Cancer. *Am J Pathol* 1995; 117: 9-19.
77. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ. Tumor angiogenesis in advanced ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147: 33-41.
78. Köhler HH, Barth PJ, Siebel A, Gerharz EW, Bittinger A. Quantitative assesment of vascular surface density in renal cell carcinomas. *Br J Urol* 1996; 77: 650-654.
79. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularition to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340: 145-146.
80. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. Two mechanism of basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res* 1997; 147: 33-41.
81. Weidner I, Carroll P, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostat carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143 :401-409.
82. Yörükoğlu K, Sağol Ö, Özkara E, et al. Comparison of microvascularization in diagnostic needle biopsies and radical prostatectomies in prostate carcinoma. *Eur Urol* 1999; 35: 109-112.
83. Ellis LM, Takahashi Y, Fenoglio CJ, Cleary KR, Bucana CD, Evans DB. Vessel counts and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 1998; 34: 337-340.

84. Egawa S, Tsutsumi M, Konishi Y, Kobari M, Matsuno S, Nagasaki K, Futami H, Yamaguchi K. The role of angiogenesis in the tumor growth of Syrian hamster pancreatic cancer cell line HPD-NR. *Gastroenterology* 1995; 108: 1526-1533.
85. Kawarada Y, Ishikura H, Kishimoto T, Saito T, Takahashi T, Kato H, Yoshiki T. Inhibitory effects of the angiogenic agent TNP-470 on establishment and growth of hematogenous metastasis of human pancreatic carcinoma in SCID beige mice in vivo. *Pancreas* 1997; 15: 251-257.
86. Chen XL, Su BS, Sun RQ, Zhang J, Wang YL. Relationship between expression and distribution of cyclooxygenase-2 and bcl-2 in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005 Feb 28; 11(8): 1228-31.
87. Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, Hasegawa K, Iseki H, Tasunozaki H, Ichikawa W, Nihei Z, Sugihara K. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 1876-1881..
88. Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 421-426.
89. Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2000 Jan; 6(1): 135-8.
90. Xiong B, Sun TJ, Hu WD, Cheng FL, Mao M, Zhou YF. Expression of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol.* 2005 Feb 28; 11(8): 1105-8.

91. Sato T, Yoshinaga K, Okabe S, Okawa T, Higuchi M, Enomoto M, Takizowa T, Sugihara K. Cyclooxygenase-2 expression and its relationship with proliferation of colorectal adenomas. *Jpn J Clin Oncol* Dec 1 2003; 33(12): 631-635.
92. Sakuma K, Fujimori T, Hirabayashi K, Terano A. Cyclooxygenase (COX)-2 immunoreactivity and relationship to p53 and Ki-67 expression in colorectal cancer. *J Gastroenterol* 1999; 34: 189-94.
93. Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 198-204.
94. Zang T, Sun F, Li Y. Expression of COX-2 in prostatic cancer and benign prostatic hyperplasia *Zhonghua WaiKe Zazhi* 2001; 39: 702-703.
95. Howe LR, Dannenberg AJ. COX-2 inhibitors for the prevention of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8: 31-43.
96. Soumaoro LT, Uetake H, Higuchi T, Takagi Y, Enomoto M, Sugihara K. Cyclooxygenase-2 expression: A significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer: *Clin Cancer Res* Dec 15; 2004; 10(24): 8465-8471.
97. Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, et al. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 1999; 59: 4356-62.
98. Tsuchida A, Nagakawa Y, Kasuya K, Itoi T, Endo M, Ozawa T, Aoki T, Koyanagi Y. Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in pancreaticobiliary maljunction. *Oncol Rep* 2003 Mar-Apr; 10(2): 339-43.

99. Tseng WW, Deganutti A, Chen MN, Saxton RE, Liu CD. Selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (Vioxx) induces expression of cell arrest genes and slows tumor growth in human pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 2002 Nov-Dec; 6(6): 838-43.
100. Nijima M, Yamaguchi T, Ishihara T, Hara T, Kato K, Kondo F, Saisho H. Immunohistochemical analysis and in situ hybridization of cyclooxygenase-2 expression in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Cancer* 2002 Mar; 94(5): 1565-73.