

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

**ÇOCUKLUK ÇAĞI LENFOMALARINDA SERUM VEGF
LEPTİN, ENDOSTATİN DÜZEYLERİ VE PROGNOSTİK
ÖNEMİ**

ONKOLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ

DR. F.VİSAL OKUR

TEZ DANIŞMANI

PROF.DR. CEYDA KARADENİZ

ANKARA-2006

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2-23
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	24-29
4. BULGULAR.....	30-40
5. TARTIŞMA.....	41-48
6. SONUÇLAR.....	49-50
7. ÖZET.....	51
8. KAYNAKLAR.....	52-61

KISALTMALAR

- VEGF:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
bFGF: Bazik fibroblast büyüme faktörü
HGF: Hepatosit büyüme faktörü
IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PIGF: Plasental büyüme faktörü
EGF: Endotelyal büyüme faktörü
HIF: Hipoksi ile uyarılan faktör
MMR: Matriks metalloproteinaz enzimleri
Hb: Hemoglobin
IL-1 β : İnterlökin-1 β
IL-6: İnterlökin-6
TNF- α : Tümör nekrozis faktör- α
TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü
IFN- γ : İnterferon- γ
RT-PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
HL: Hodgkin lenfoma
NHL: Non-Hodgkin lenfoma
 α -SMA: α - Düz kas aktin

GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi alanlarındaki gelişmeler sayesinde çocukluk çağı kanserlerinde kür oranları %70'lere yükselmiştir. Ancak hala prognostik değeri olan ve tanısal amaçla kullanılabilecek yeni faktörlere ve dirençli olgularda kullanılabilecek yeni tedavilere ihtiyaç vardır.

Tümör gelişimi ve yayılımındaki öneminin anlaşılması angiogenezi tümör biyolojisinin en yoğun çalışılan alanlarından biri haline getirmiştir. Genellikle erişkin hastalarda yapılan bu çalışmalarda angiogenezi uyaran ve önleyen faktörleri düzeyleri ile tümörün yaygınlığı ve hasta sağkalım hızları arasındaki ilişki incelenmiştir. Hem solid tümörlerde hem de hematolojik kanserlerde tümör angiogenezindeki artışın prognozu olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir. Tümör proliferasyon hızı ve vaskülerizasyonunun çok daha yüksek olduğu çocukluk çağı tümörlerinde angiogenezin tümör gelişimindeki rolünü araştıran çalışmaların sayısı ise çok azdır (109,134). Literatürde angiogenezi uyarıcı faktörler olarak özellikle VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktörü), b-FGF (Bazik fibroblast büyüme faktörü), angiopoietin PD-ECGF (Trombosit kaynaklı endotelial hücre büyüme faktörü), TGF- β (Transforme edici büyüme faktörü) ve leptin, önleyici olarak da endostatin angiostatin trombospondin gibi faktörler çalışılmıştır. Tümör angiogenezini tam olarak değerlendirebilmek için angiogenezi uyaran ve önleyen faktörlerin birlikte incelenmesi daha uygun bir yaklaşım gibi gözükmektedir. Ayrıca monoklonal antikorlar kullanılarak VEGF ve b-FGF etkinliğinin önlenmesi ve tümör gelişiminin durdurulması, angiogenezin önleyici tedavilerin araştırılması yolunu açmıştır.

Bu çalışmada, çocukluk çağı lenfomalarında serum VEGF, leptin ve endostatin düzeylerinin tespiti ile angiogenezin değerlendirilmesi ve bu faktörler ile bilinen diğer prognostik faktörler arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Anjiogenez, premaliyn bir lezyonun kansere dönüşümünden metastatik lezyonların gelişimine kadar uzanan tümör gelişim basamaklarının her birinde rol oynamaktadır (62,67,90). Folkman tarafından ilk kez 1971 yılında ortaya atılan yeterli kan dolaşımı olmadığı takdirde solid tümörlerin bir kaç mm³'den daha fazla büyüemeyeceği hipotezi ile anjiogenez alanında başlayan araştırmalarda, tümör gelişiminin anjiogeneze bağımlı olduğu kanıtlanmış ve anjiogenez tümör biyolojisinin en önemli alanlarından biri haline gelmiştir (48). Anjiogenez ile oksijen besinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve proteolitik enzimler dokulara ulaştırılırken koagülasyon sistemi ve fibrinolitik sistemin kontrolünü sağlayan hemostatik faktörler kontrol altında tutulur, tümör hücrelerinin uzak bölgelere erişimi sağlanır (45). Anjiogenez, anjiogenizi uyaran ve önleyen çok sayıda faktör tarafından kontrol edilen, son derece karmaşık ve dinamik bir olaydır. Bir grup tümör hücresinin anjiogenik özellik kazanmasının tümörün maliyn potansiyelinin gelişiminde anahtar rolü oynadığı düşünülmektedir. Bu özellik, anjiogenezi uyaran ve önleyen faktörler arasındaki dengenin uyarıcı faktörler lehine bozulması ile ortaya çıkmaktadır (62).

Büyüyen dokuların artan metabolik ihtiyaçlarının karşılanabilmesi için uyarılan fizyolojik anjiogenez, çok sıkı bir şekilde kontrol edilmekte ve uyarı ortadan kalkınca derhal durdurulduğundan çok sınırlı düzeyde kalmaktadır. Özellikle embriyonal dönemde yoğun olan anjiogenez, postnatal dönemde giderek azalır ve erişkin sağlıklı bir erkekte nadiren anjiogenik aktivite görülür. Erişkin bir kadında ise menstrual siklus (korpus luteum ve endometrium gelişimi) ve gebelik süresince aktif anjiogenez görülür (111,47,118). Ayrıca inflamasyon ve doku rejenerasyonu gereken durumlarda da anjiogenez aktif hale gelir (47,111).

Hemanjiom, proliferatif retinopati gibi çeşitli klinik tablolarda tespit edilebilen patolojik anjiogenez, solid tümörlerin önemli özelliklerinden biridir. Bir solid tümörün besin ve oksijen dağılımının pasif difüzyonla sağlanabildiği bir kaç mm'lik boyuta ulaşmasından sonra kendine ait damar ağı olmazsa büyümesi durur. Ancak tümör içi anjiogenez ile yeterli kan dolaşımı sağlandıktan sonra tümör büyümeye devam edebilir ve metastaz yapabilir. Genel olarak bakıldığında tümör içi kan dolaşımının

ve tümör dokusunda anjiogenizi uyarıcı faktör ekspresyonu artışının pek çok kanser tipinde ileri tümör evresi ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (32).

Anjiogeneze tümör hücreleri ve tümörü infiltre eden makrofaj, fibroblast gibi hücreler tarafından salgılanan endojen anjiogenik faktörler ve endotel hücreleri içerisinde yeralan, bu faktörlerin etkileştiği sinyal iletim yolları ile uyarılır. Ancak tümörlerden anjiogenezi uyarıcı moleküller yanında önleyen moleküller de salgılanmaktadır. Tümör dokusundaki anjiogenik aktivitenin derecesini, yani tümörün büyüme potansiyeli ile yakından ilişkili olan tümörün anjiogenik profilini, bu uyarıcı ve önleyici faktörler arasındaki denge belirler (62,117). Son yıllarda yapılan araştırmalarda, anjiogenizi uyarıcı ve anjiogenizi önleyici faktörlerinin tümör dokusu dışında kanda da tespit edilebileceği ve bu faktörlerin serum düzeyleri ile tümör dokusundaki düzeyleri arasında korelasyon olduğu dolayısı ile tanısal ve prognostik amaçla kullanılabilecekleri gösterilmiştir (113). Ayrıca yüksek anjiogenizi uyarıcı sitokin serum düzeylerinin, yüksek tümör proliferasyon hızı, progresif hastalık ve kısa sağkalım süresi gibi olumsuz klinik parametrelerle korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (82).

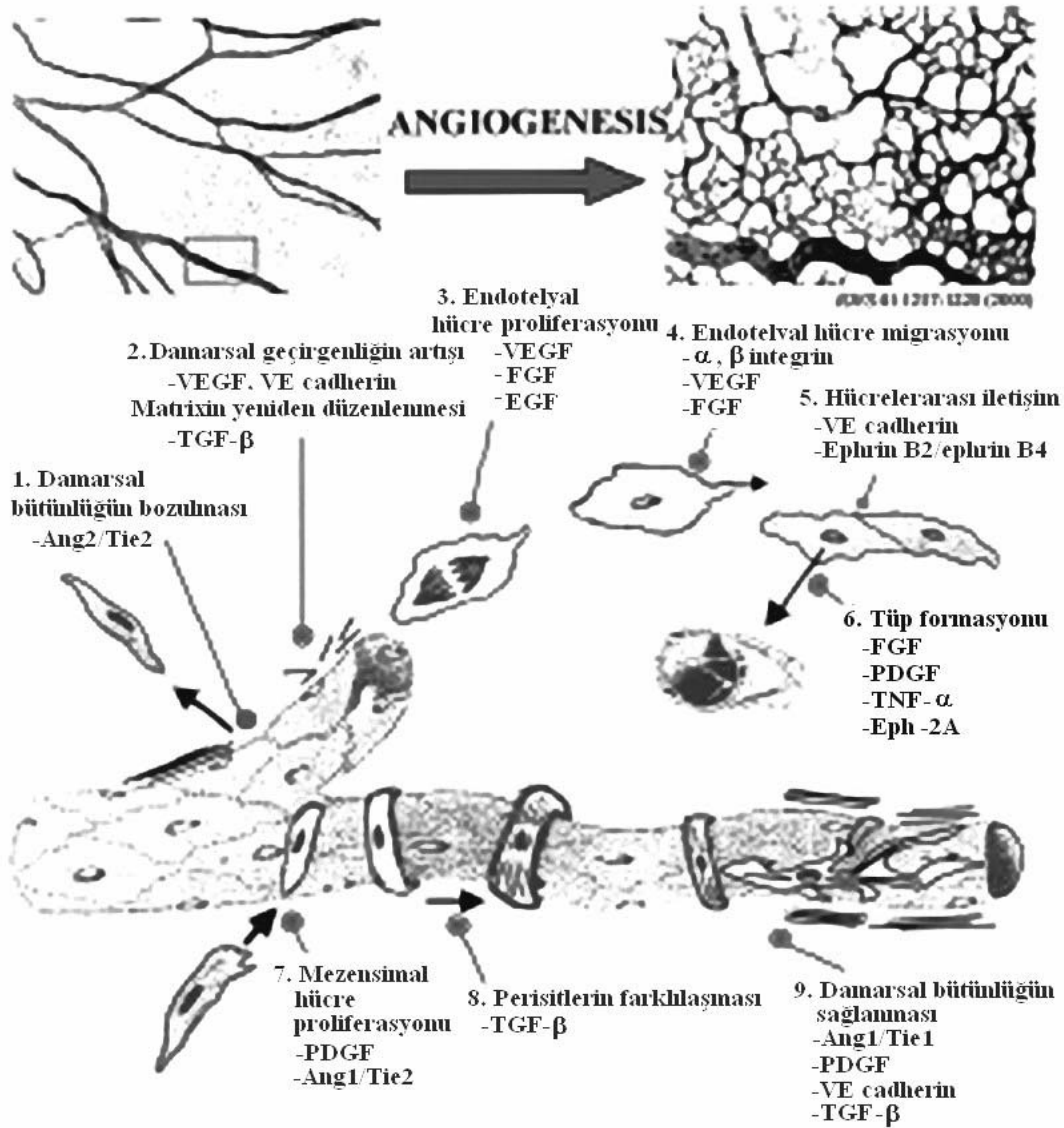
Ancak doku orijini (yumuşak doku ya da epitel), proliferasyon hızı ve vaskülarite gibi pek çok yönden erişkin tümörlerinden farklılık gösteren çocukluk çağı tümörlerinde serum anjiogenik faktör düzeylerinin klinik önemi ile ilgili bilgiler hala sınırlıdır. Nöroblastomlu çocuklarda yüksek tümör vaskülaritesinin prognozu olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (99). Yine beyin tümörlü çocuklarda tümör dokusunda ve beyin omurilik sıvısında yüksek bulunan fibroblastik büyüme faktörü seviyesinin kötü prognoz göstergesi olduğu tespit edilmiştir (14,88). Solid tümörü olan çocuklarda yapılan başka bir çalışmada da hastalarda anjiogenik faktör düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuş ve özellikle metastatik hastalığı olanlarda bu farkın daha belirgin olduğu görülmüştür (134). Son olarak tedavi öncesi serum VEGF düzeyleri yüksek bulunan solid tümörlü çocuklarda etkin tedavi ile VEGF seviyesinin normale döndüğü belirlenmiştir (109). Pediatrik solid tümörlerde serum VEGF, leptin ve endostatin seviyelerine bakılarak birbirleri ile ve diğer prognostik faktörlerle ilişkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya ise literatürde rastlanılmamıştır.

NORMAL ANJİOGENEZ

Vasküler sistem, embriyonal dönemde endotelial hücre öncüsü olan anjioblastlardan vaskülogenez sonucu gelişen primer kapiller ağına farklılaşması ile oluşmaktadır. Vaskülogenezde anjioblastlar çoğalırlar ve primer kapiller ağı oluşturmak için bir araya gelirler. Oluşan bu endotelial hücre ağı, anjiogenez sırasında yeniden şekillendirilip, genişletilerek yeni damarların oluşumu için temel olarak kullanılır. Fizyolojik anjiogenezde yeni damar gelişimi, mural hücrelerin (perisitlerin) vasküler endotelden uzaklaştırılması ve bu yolla damar duvarının bütünlüğünün bozulması ile başlar. Endotelial hücre bazal membranının ve hücre dışı matriksin, matriks metalloproteinazları (MMP) gibi spesifik proteazlar tarafından yeniden şekillendirilmesinden sonra uyarılan stromal hücreler tarafından yeni matriks sentezlenir. Bu matriks içerisinde endotelial hücrelerin migrasyonunu ve proliferasyonunu sağlayan büyüme faktörleri de bulunmaktadır. Daha sonra yeterli sayıya ulaşan endotelial hücreler tüp benzeri yapılar oluştururlar. Bu yapıların perisitler ve vasküler düz kas hücreleri ile sarılmasından sonra yeni oluşan kan damarlarında kan dolaşımı başlar (107) (Şekil1). Fizyolojik koşullar altında anjiogenez, sadece büyüyen ya da yenilenen dokuların artan metabolik ihtiyaçlarının karşılanabilmesi için aktif hale gelmektedir.

TÜMÖR ANJİOGENEZİ

Başlangıç evresindeki bütün tümörler avasküler küçük hücre kümelerinden oluşurlar. Vaskülerizasyon öncesi dönem olarak adlandırılan bu evrede metabolik ihtiyaçların (besin alımı, oksijen alımı, metabolik atıkların uzaklaştırılması) pasif difüzyon ile karşılanabildiği maksimum tümör boyutu birkaç mm³ 'tür. Tümör bu boyuta ulaştıktan sonra tümör hücreleri çoğalmaya devam etmesine rağmen, tümörün büyümesi duraklar. Çünkü bu evrede tümör hücrelerinin çoğalma hızı ile apoptoz hızı birbirine eşittir (45,67). Anjiogenez uyarıcı ve anjiogenez önleyici faktörler arasındaki dengenin, anjiogenik faktörler lehine bozulması ile tümör



Şekil 1. Fizyolojik anjiogenez mekanizmaları. VEGF, vasküler endotelial büyüme faktörü; TGF-β, transforme edici büyüme faktörü; FGF, fibroblast büyüme faktörü; EGF, endotelial büyüme faktörü; Eph-2, efrin-2; TNF-α, tümör nekrozis faktör; PDGF, trombosit kaynaklı büyüme faktörü; Ang-1 ve -2/Tie2, anjiogenezin-1 ve -2/ Tie reseptörü (Şeklin alındığı kaynak: Papetti M, Herman IM. Am J Physiol 282: 947-970, 2002)

hücrelerinden bir kısmı anjiogenik fenotip kazanırlar. Sonuç olarak tümör hızla büyümeye ve yayılmaya başlar (45). Tümör hücrelerinde bu transformasyona neden olan mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak hipoksi sonucu tümör hücrelerinde anjiogenik faktör ekspresyonunun artışının, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin rol aldığı bazı genetik olayların bu transformasyona yolaçabildiği bilinmektedir (25,116,45). Tümör büyümesinin hem erken hem de ileri evrelerinde gelişebilen hipoksi etkisi ile doku içi oksijen konsantrasyonu normal olduğunda birbirlerinden ayrı olan HIF-1'in (hipoksi ile uyarılan faktör-1), α ve β alt üniteleri birbirlerine bağlanırlar. Oluşan transkripsiyon kompleksi, hücre çekirdeğinde anjiogenik faktör gen ekspresyonunun kontrol edildiği bölgeye bağlanarak anjiogenik faktör sentezini uyarır (74,121). Diğer yandan tümör gelişimi sırasında çeşitli onkogenlerin aktivasyonu ile anjiogenizi uyarıcı faktörlerin ekspresyonu artarken (örn: mutant *ras* geni VEGF ve MMP ekspresyonlarında artışa, TIMP ekspresyonunda ise azalmaya neden olur) tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonu ile angiogenizi önleyici faktörlerin ekspresyonu azalmaktadır örn: p53 geninde mutasyon trombospondin ekspresyonunun azalmasına neden olur) (3,25,116). Sonuçta tümörün büyümesi için gerekli olan anjiogenez uyarılır.

Tümör anjiogenezinin başlayabilmesi için tümör hücrelerinden ve tümörü infiltre eden hücrelerden anjiogenizi uyarıcı faktörlerin salgılanması yeterli değildir. Eş zamanlı olarak anjiogenezi önleyici faktörlerin salınımının da azalması gerekmektedir (25). Bu kontrol mekanizması dışında, güçlü mitojenik molekülleri hücre dışı matrikste hapseden perisitlerin, endotelyal hücrelerin büyüme faktörlerine duyarlılığını azaltan hücrel şekil değişikliklerinin ve endotelyal integrinlerin de endotelyal hücre proliferasyonu üzerinde etkileri vardır. Hücre düzeyinde konsantrasyonları artan anjiogenik büyüme faktörlerinin parakrin etkisi ile damar gelişimi başlar. Tümör hücrelerinin proliferasyon hızındaki artışa paralel olarak primer tümörün büyüme hızı da artar ve metastatik lezyonlar gelişir (50).

Ancak tümör dokusunun metabolik ihtiyaçlarının giderilmesini sağlayan bu yeni damarlarda bazı yapısal bozukluklar vardır. Bu damarların çevresinde damar duvarının bütünlüğünü sağlayan yeterli sayıda perisit, düz kas hücresi ve sağlam bir bazal membran bulunmadığından geçirgenlikleri çok yüksektir. Damar duvarında

hem endotelial hücreler hem de tümör hücreleri yer alır ve bu damarların içerisindeki kan akımı düzensizdir (107). Tam olarak olgunlaşmamış olan bu damarlar, α -SMA (α - düz kas aktin) gibi olgunlaşmış kan damarları yüzeyinde bulunan moleküller için spesifik olan monoklonal antikorlar kullanılarak, normal olgunlaşmış kan damarlarından ayırt edilebilir. Tümör içi olgunlaşmamış/olgunlaşmış damar oranı hesaplanarak, olgunlaşmamış kan damarları üzerinde daha etkili olan anjiogenizi önleyici tedavilerin etkinliği değerlendirilebilir (7).

Tümörün büyümesini ve metastaz yapmasını sağlayan tümör içi damar ağı ilginç bir şekilde kemoterapötiklerin tümör dokusuna erişimini azaltmaktadır. Bunun nedeni hızla büyüyen tümör dokusu içerisinde yer alan kan damarlarının artan basınca maruz kalması ve tümör içi lenfatik dolaşımının yetersiz olması sonucu tümör dokusunun perfüzyonunun bozulması ve tümör içerisinde santral nekroz gelişmesidir (50).

ANJİOGENEZ KONTROL MEKANİZMALARI

Anjiogenezin tümör gelişimindeki yeri ve öneminin anlaşılması anjiogenezi kontrol eden mekanizmalarla ilgili araştırmaların artmasına yol açmıştır. Parakrin ya da otokrin yollarla anjiogenezi uyaran çok sayıda faktör tespit edilmiştir. Bu faktörler hem tümör hücreleri, hem de tümör dokusu içinde yer alan makrofaj, fibroblast gibi infiltratif hücreler tarafından salgılanmaktadır (135). Tümör hücrelerinde anjiogenizi uyarıcı faktörlerin ekspresyonunun, sentez ve sekresyonunun artışı ile tümör içi anjiogenezi uyarılır. Tümörün büyüme potansiyeli ile yakından ilişkili olan anjiogenik profili ise anjiogenizi uyaran ve anjiogenizi önleyen faktörler arasında kurulan denge ile belirlenir.

ANJİOGENİZİ UYARAN FAKTÖRLER

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

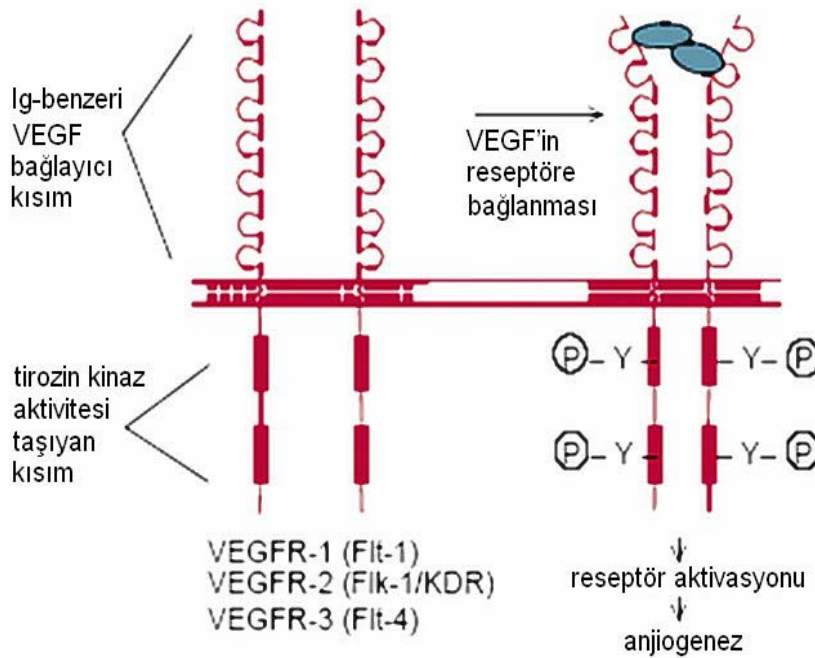
VEGF bilinen en etkili anjiogenizi uyarıcı faktörlerden biridir ve anjiogenezin kontrolünde önemli rol oynar. Anjiogenizi ve lenfanjiogenizi uyarıcı büyüme faktörlerini kodlayan VEGF gen ailesi tarafından altı farklı glikoprotein kodlanmaktadır: VEGF-A,B,C,D,E ve plasental büyüme faktörü-1 (PlGF-1) (40,66). VEGF-A (genellikle VEGF olarak adlandırılır) ilk kez Dvorak ve arkadaşları tarafından tümör hücrelerinden salgılanan vasküler geçirgenliği artırıcı faktör olarak tanımlanmıştır (127). Daha sonra Ferrara ve arkadaşları VEGF-A'yı endotelyal hücrelere spesifik bir mitojen olarak izole etmişlerdir (87).

VEGF; 45-kDa molekül ağırlığında, birden fazla anjiogenizi uyarıcı etkisi olan homodimerik bir glikoproteindir. VEGF-A mRNA'sının farklı kodlanması ile aminoasit içerik ve sayıları farklı olan 5 izoform sentezlenir: VEGF-121,145, 165, 189 ve 206 (66). Kısa amino asit zinciri içeren izoformlar (VEGF-121 ve -145) hücre dışına salgılanıp serumda serbest formda bulunurken, daha uzun amino asit zinciri içeren izoformlar (VEGF-189 ve VEGF-206) hücre dışı matriks içerisinde yer alırlar. Proteolitik enzim reaksiyonları sonrasında aktif hale gelirler (31). Baskın form olan ve pek çok solid tümörde artışı saptanan VEGF-165 ise hem serumda serbest formda hem de hücre dışı matriks proteinlerine bağlı olarak bulunur. Yapılan araştırmalar belirli VEGF izoformlarının doku spesifik olduğunu, vaskülogenezde ve tümör anjiogenezinde etkin rol oynadıklarını göstermiştir (41,42). VEGF embriyonal gelişim süresince aktif olan fizyolojik vaskülogenez yanında, postnatal dönemde yara iyileşmesi, ovülasyon, menstruasyon, kan basıncının regülasyonu ve gebelik gibi pek çok olayda da anjiogenezin kontrolünde etkin rol oynamaktadır (19,43). Ayrıca artirit psöriazis, maküler dejenerasyon, diyabetik retinopati ve tümörler gibi patolojik anjiogenezin görüldüğü durumlarda da VEGF ekspresyonunda artış olduğu tespit edilmiştir (40).

VEGF ailesine dahil olan moleküller farklı reseptörler aracılığı ile anjiogenik etkilerini göstermektedirler. VEGF'nin bağlandığı 3 farklı tirozin kinaz reseptörü tanımlanmıştır. VEGFR-1 (fms benzeri tyrosine kinase; flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) ve VEGFR-3 (Flt-4). Bu reseptörler endotelyal hücrelere özel olmayıp, vasküler düz

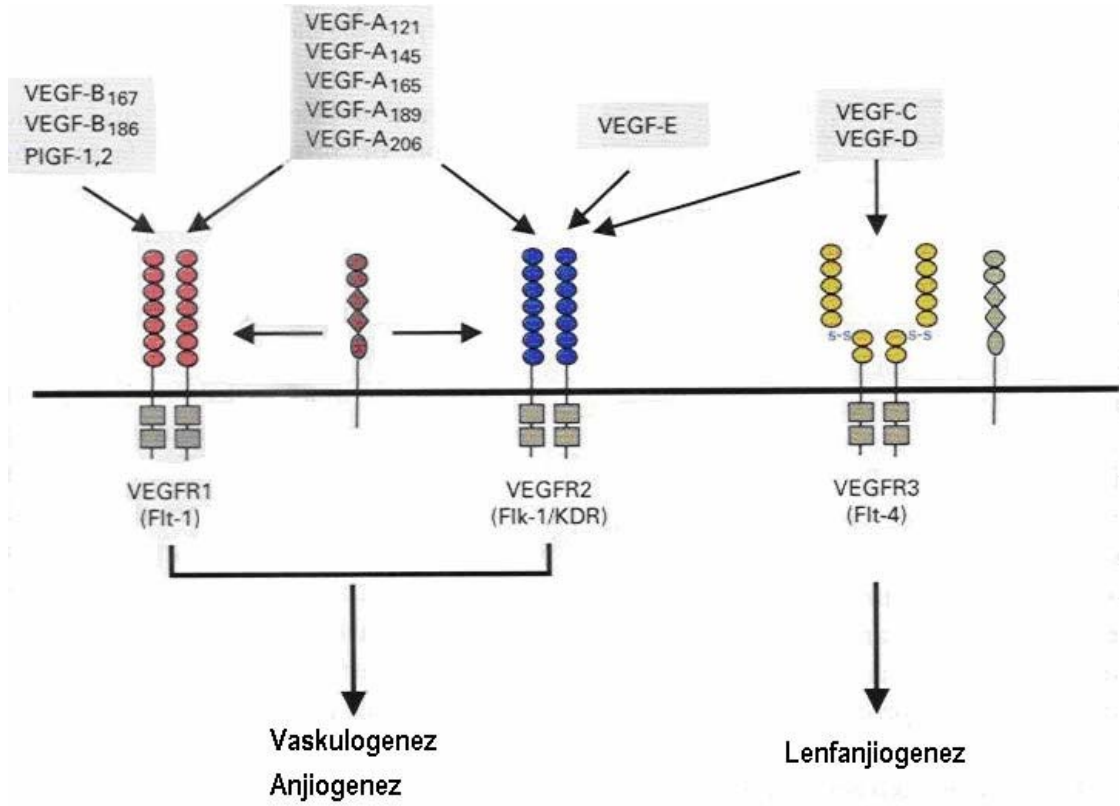
kas hücrelerinde ve monosit/makrofajlarda da bulunmaktadır. VEGF reseptörleri "7-Ig" ya da flt gen ailesine dahil olup, yedi adet hücre dışı immünoglobulin benzeri yapı, bir membranöz kısım ve bir de tirozin kinaz aktivitesi taşıyan hücre içi kısımdan oluşurlar (65,107) (Şekil 2).

VEGFR-1, VEGF bağlama potansiyeli en yüksek olan reseptör olmasına rağmen endotelial hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu uyarıcı etkisi yoktur. Sitoskeletal sistem üzerinde de direkt bir etkisi saptanmamıştır. VEGF bağlama potansiyeli daha düşük olan VEGFR-2 reseptörüne VEGF'nin bağlanması ile endotelial hücrelerde mitogenez, kemotaksis ve şekil değişiklikleri başlar. Bu reseptör özellikle aktif olarak çoğalan endotelial ve hematopoietik öncü hücrelerin membranlarında bulunur (140). VEGFR-3 ise genellikle erişkin lenfatik damar endotelinde yer alır ve lenfanjiogenezin uyarılmasından sorumlu olan VEGF-C ve VEGF-D molekülleri bu reseptöre bağlanır.



Şekil 2. VEGF reseptörlerinin moleküler yapısı. VEGFR-1,-2,-3 vasküler endotelial büyüme faktörünün reseptörleri (Şeklin alındığı kaynak: McMahon G. Oncologist 5(suppl 1): 3-10 2000)

Flt gen ailesi tarafından kodlanmayan ve VEGF bağlayabilen bir başka reseptör ise nörofilindir. Bir nöronal reseptör olan nörofilin-1 normal endotelial hücrelerin yüzeylerinde bulunur ve VEGF-165 ile bağlanarak anjiogenezin uyarılmasında rol oynar. VEGF ailesine dahil olan moleküllerden biri de plasental büyüme faktörüdür (PlGF-1). VEGFR-1 ya da nörofilin-1 reseptörlerine bağlanarak sinerjistik etki ile uyarıcı VEGF sinyalini artırır. VEGF-B endotelial hücreler için mitojenik olup, VEGF-A ile heterodimer oluşturarak, onun anjiogjenik etkisini artırır. VEGFR-2 ve 3 reseptörleri aracılığı ile etkisini gösteren VEGF-C ve VEGF-D molekülleri ise embriyonal ve postnatal dönemde lenfanjiogenezde rol oynamaktadırlar. Parapoks virus ailesinden olan Orf virusu tarafından sentezlenen VEGF-E ise VEGFR-2 reseptörüne bağlanarak anjiogenezin uyarır (107) (Şekil3).



Şekil 3. VEGF izoform-reseptör ilişkisi ve etki mekanizmaları. VEGF-A,-B,-C,-D,-E, vasküler endotelial büyüme faktörleri; VEGFR, vasküler endotelial büyüme faktörünün reseptörleri; PLGF, plasenta büyüme faktörü (Şeklin alındığı kaynak: Hicklin DJ, Ellis LM. J Clin Oncol 23: 1011-102, 2005)

VEGF ekspresyonu lokal doku oksijen konsantrasyonu tarafından kontrol edilir. Hipoksik koşullarda hücre çekirdeğindeki VEGF promotor bölgesine HIF-1 bağlanır. Bu bağlanma sonucu VEGF gen transkripsiyonu ve mRNA stabilitesi artar. VEGF sentezinde artış saptanır (74). Ayrıca çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler de tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonunu artırarak dolaylı yoldan anjiogenezi uyarırlar. Epidermal büyüme faktörünün reseptörleri olan EGFR (ErbB-1) ve HER-2/neu (ErbB-2)'nin bu yolla anjiogenezde rol oynadıkları kolon kanseri, pankreas kanseri, mide kanseri, meme kanseri, glioblastoma multiforme, akciğer kanseri ve böbrek kanseri gibi çeşitli kanser tiplerinde gösterilmiştir (107). Çeşitli kanserlerde artışı saptanan, agresif hastalık ve metastaz gelişimi ile ilişkisi tespit edilen insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü de VEGF ekspresyonunu artırarak anjiogenezi

uyarmaktadır. Hepatosit büyüme faktörü ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü de benzer mekanizma ile anjiogenezi uyatabilmektedirler. Prostaglandinler pek çok biyolojik olaydaki önemli rolleri yanında, VEGF ekspresyonunda artışa neden olarak tümör anjiogenezinde de rol oynarlar. Prostaglandin sentezinde hız sınırlayıcı enzim olan siklooksijenaz-2 aktivitesindeki artışın tümör progresyonu ve tümör anjiogenezindeki artış ile ilişkili olduğu çeşitli solid tümörlerde gösterilmiştir (65).

VEGF anjiogenezin farklı basamaklarında etkili olan çok fonksiyonlu bir faktördür. Endotelial hücre plazma membranının damar lümenine bakan ve dokuya bakan kısımları arasında geçişi sağlayan vesikovasküler organellerin aktivitesini artırarak, endotelial hücrelerin geçirgenliğini artırır. Ayrıca VEGF etkisi ile endotelial hücreler arasındaki bağlantılar gevşer ve hücre membranındaki deliklerin sayısı artar, bu da hücre geçirgenliğindeki artışa katkıda bulunur (65). Artan damar geçirgenliği sayesinde plazma proteinleri damar dışına sızar, endotelial ve stromal hücrelerin migrasyonuna uygun olan hücre dışı matriks sentezi başlar. VEGF'in damar geçirgenliğini artırıcı etkisi ile malign effüzyonlar gelişir. Endotelial hücrelere özel bir mitojen olan VEGF, endotelial hücre proliferasyonunu artırıp, apoptozu önleyerek hücrelerin sağkalımını artırır. Ayrıca VEGF endotelial hücrelerden, plazminojen aktive edici moleküllerin, plazminojen aktivatör inhibitör moleküllerin ve kolajenaz enziminin salınımını uyatarak, dengeli bir proteolitik aktivite ile ekstraselüler matriksin anjiogeneze uygun bir şekilde yeniden düzenlenmesini sağlar (107). VEGF endotelial hücre membranındaki reseptörlerine bağlanarak anjiogenezi uyarırken tümör hücrelerinin membranında bulunan reseptörlerine bağlanarak otokrin mekanizma ile tümörün büyümesine de yol açmaktadır (65).

Fibroblast büyüme faktörü (FGF)

Asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörleri (aFGF, bFGF), 18 ve 25-kDa molekül ağırlığında olan ve normal anjiogeneze önemli rol oynayan polipeptidlerdir. FGF tıpkı VEGF gibi endotelial hücreler için mitojenik etkisi olan güçlü bir anjiogenik faktördür (54). Ancak VEGF'den farklı olarak epitelyal hücreler ve fibroblastlar gibi ektoderm ve mezoderm kökenli hücrelerde de proliferasyonu uyatabildiği için mitojenik etkisi spesifik değildir (58). Tümör hücrelerinden salgılanan ve parakrin yolla endotelial hücre proliferasyonunu uyaran bFGF yanında endotelial hücrelerden

de bFGF salgılanır ve otokrin etki ile endotel hücre proliferasyonuna neden olur (126). bFGF angiogenez uyarımında VEGF ile sinerjistik etki gösterir (4). Kanseri gelişimi sırasında tümörden salgılanan bFGF'nün tümör hücrelerinin anjiogenik fenotipe geçişinde de rol oynadığı gösterilmiştir (71). Ayrıca insan bFGF'ne özel olan monoklonal antikorların tümör gelişimini durdurduğu da tespit edilmiştir (68). Endotelial hücre proliferasyonu ve migrasyonunun uyarılması dışında FGF, endotelial hücrelerden plazminojen aktive edici faktör ve kolajenaz sentezlenmesine ve salgılamasına da yol açarak endotelial hücrelerin üç boyutlu kolajen matrisinde tüp benzeri yapılar oluşturmalarını sağlar. FGF'nün büyük kısmı sitoplazmik ya da hücre dışı matrisle ilgili olarak bulunur ve ancak hücre hasarı durumunda serbest hale gelerek serumda tespit edilebilir. Bu da FGF'nün lokal onarıcı angiogenezde rolü olduğunu göstermektedir.

Trombosit kaynaklı endotelial hücre büyüme faktörü (PD-ECGF)

PD-ECGF'nün VEGF ve bFGF'e göre endotelial hücreler üzerindeki mitojenik etkisi daha az olmakla birlikte, endotelial hücreler üzerinde kemotaktik migrasyonu uyarıcı etkisi vardır. Çok çeşitli tümörlerde ekspresyonu tespit edilen PD-ECGF; makrofaj, stromal hücreler ve glial hücreler gibi normal hücreler tarafından da salgılanmaktadır (52,59). Tümördeki ekspresyonunun hipoksi gibi tümör mikroçevresi ile ilgili faktörler tarafından uyarıldığı bilinmektedir. Ayrıca PD-ECGF yeni oluşan kapiller damarların perisitler tarafından sarılmasını ve perisitlerin proliferasyonunu sağlar. Böylece kapiller damar duvar bütünlüğünün sağlanmasına katkıda bulunur (107).

Anjiopoietinler ve Tie reseptörleri

Anjiopoietinler vasküler endotelial hücreler için spesifik olan Tie-2 reseptörleri aracılığı ile etki gösteren 70-kDa molekül ağırlığında polipeptidlerdir. Endotelial hücreleri çevreleyen mezenseyal hücrelerden salgılanan anjiopoietin-1, yeni oluşan kapiller damarların dallanmasını ve yeniden şekillendirilerek fonksiyonel hale gelmesini sağlar ve damar duvar bütünlüğünün sağlanmasına katkıda bulunur. Anjiopoietin-2 ise Anjiopoietin-1/Tie-2 kompleksinin angiogenez üzerindeki etkisini antagonize ederek damar duvar bütünlüğünün bozulmasına yol açar, yeni oluşan

damarlarda aşırı dallanmaya ve damar ağının yayılmasına engel olur. Ayrıca ortamda VEGF olması durumunda anjiopoietin-2 damar duvar bütünlüğünü bozarak, damar endotelini VEGF'nin uyarıcı etkilerine daha açık hale getirir (107).

Leptin

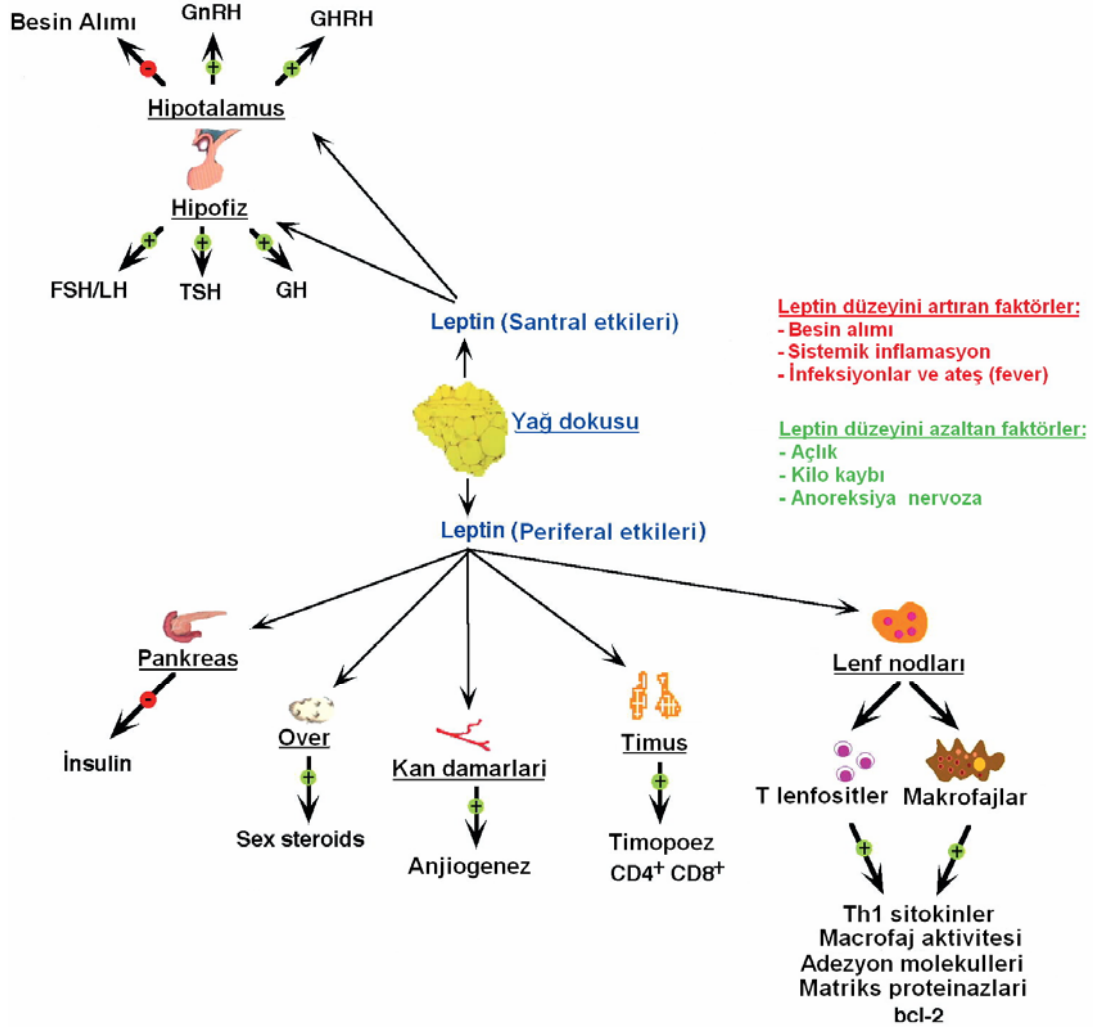
Leptin obezite geni (Ob geni) tarafından kodlanan, adipositler tarafından üretilen 16-kDa molekül ağırlığında bir peptid hormondur. Hipotalamusta nöropeptid-Y sentez ve salınımını engelleyerek gıda alımını azaltır ve enerji tüketimini artırır (128). Vücut ağırlığını düzenleyen en önemli hormonlardan biri olan leptinin lipid metabolizması, hematopoez, pankreatik β hücre fonksiyonu, üreme fonksiyonu, inflamatuvar immün yanıt ve termogenez gibi pek çok farklı fizyolojik olayın kontrolünde de rol oynadığı bilinmektedir (8,23,91). Serum leptin düzeyi ile total vücut yağ kitlesi ve vücut kitle indeksi (VKİ) arasında güçlü bir pozitif korelasyon vardır (137). Dolayısı ile obez insanlarda, sayıları ve boyutları artan adipositlerden salınımının artması nedeni ile serum leptin seviyesi yüksektir. Lipodistrofik durumlarda ise serum leptin seviyesi düşer (77). Serum leptin düzeyi sabit değildir. Kırk beş dakikada bir tekrarlayan pulsatif bir salınım görülür. Ayrıca beslenme düzenine bağlı olarak diüurnal ritm gösteren leptin sekresyonu sonucu serum leptin düzeyi gece en yüksek, öğle ve öğleden sonra ise en düşük seviyesine ulaşır (129). Anorektik hormon olarak da bilinen leptinin salınımı besin alımı ile artarken, açlıkta azalır ve böylece enerji dengesinin korunmasında anahtar rol oynar (1). Obezite önleyici etkisine rağmen obez insanlarda beklenenin aksine serum leptin düzeyinin yüksek olmasının nedeni leptinin beyine transportunda bozukluk ya da hormonun reseptör / reseptör-sonrası düzeyde etkisiz olması sonucu gelişen leptin direncidir. Kilo kaybı ile birlikte serum leptin düzeyi de normale döner. Vücut ağırlığının kontrol edilmesi dışında leptinin kardiovasküler sistem ve renal fonksiyonlar üzerinde de etkileri vardır. Ayrıca leptin çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda bazı organlar üzerinde parakrin yolla etkisini gösteren bir büyüme faktörüdür (131). Hücre proliferasyonu ve farklılaşması, enerji metabolizmasının düzenlenmesi ile ilgili olarak insülin, IGF, büyüme hormonu, glukagon ve glukokortikoidler gibi diğer hormonlarla etkileşim halindedir (53) (Şekil 4)

Serum leptin düzeyi hem çocuklarda hem de erişkinlerde cinsiyete göre farklılık gösterir ve kızlarda daha yüksektir. Bunun nedenide vücut yağ dağılımının cinsiyete göre değişmesi ve erkeklerde yüksek olan testesteronun leptin sentezini inhibe etmesidir. Çocuklarda normal seksüel gelişim için gerekli olan leptinin hipotalamik gonadotropin salgılatıcı hormon salınımını uyararak pubertenin başlamasında rol oynadığı ileri sürülmektedir (131,137).

Leptin tip-I sitokin reseptör ailesinden olan Ob-R reseptörü aracılığı ile etkisini gösterir. JAK/STAT yolağı kullanılarak sinyal iletimi sağlanır (13, 93,128).

Leptin ve Anjiogenez

Leptin esas olarak yağ dokusundan salgılanan bir hormon olmasına rağmen plasenta, kalp, beyin, kemik ve saç folikülleri gibi anjiogenezin aktif olduğu dokularda da sentezlenmektedir. Bu durum leptinin vaskülerizasyonu uyarıcı etkisi olup olmadığı konusunu gündeme getirmiştir (13,18,108). Ayrıca yağ dokusunun gelişimi için adipogenez ile anjiogenez arasında sıkı bir ilişkinin olması gerektiği de bilinmektedir. Dolayısı ile bir endokrin hormon olan leptin, vasküler sistem üzerinde parakrin yolla etki gösteren bir büyüme hormonudur. Leptinin lokal anjiogenezi uyarması ile dolaşıma giren ve hipotalamusa ulaşan leptin miktarı artar. Tokluk hissi gelişir, besin alımı engellenir, lipoliz ve lipid oksidasyonu artar ve kilo kontrolü sağlanmış olur. Yine anjiogenez yolu ile yağ dokusu gibi aktif termogenez bölgelerinde ısı kaybı arttırılarak enerji tüketimi sağlanır (128).



Şekil 4. Leptinin santral ve periferik etkileri (Şeklin alındığı kaynak: <http://www.springerlink.com/media/F016NGUUYH09L4KMEXEJ/Contributions/N/3/G/5/N3G5V6D2H1RCFR3V.pdf>)

Leptinin anjiogenik etkisini ilk kez gösterenler, 1998 yılında in vivo ve in vitro modellerde leptinin anjiogenezi uyardığını tespit eden Sierra-Honigman ve Bouloumie olmuştur (13,128). Bouloumie ve arkadaşları in vitro ortamda leptinin vasküler endotelial hücre proliferasyonunu artırıcı etkisinin VEGF kadar güçlü olduğunu da göstermişlerdir. Ayrıca leptinin apoptozu önleyici bir molekül olan Bcl-2 ekspresyonunu artırarak endotelial hücreler üzerinde apoptozu önleyici etki de gösterdiği kanıtlanmıştır. Anjiogenezin uyarılması sırasında leptin özellikle FGF-2'ye kısmen bağımlı olarak VEGF ve FGF ile sinerjistik etki gösterir (131). Ancak

anjiogenezin uyarılması için leptin JAK/STAT yolağını, VEGF ve FGF ise protein kinaz C/MAPK (mitojen aktive protein kinaz) yolağını kullanırlar (18). Ayrıca leptin anjiogeneizde aktif rol oynayan MMP-2 gibi proteolitik enzimlerin ekspresyonunu ve salınımını da artırır (131). Leptinin çeşitli dokularda büyümeyi ve anjiogenezi uyarıcı etkilerinin olduğunun gösterilmesi araştırmacıları leptin ile karsinogenez arasında bir ilişki olup olmadığını incelemeye yöneltmiştir.

ANJİOGENİZİ ÖNLEYEN FAKTÖRLER

Primer tümörün çıkarılmasından sonra hızla uzak metastazların geliştiğinin gözlenmesi ile primer tümörün anjiogenik faktörler yanında anjiogenezi önleyici faktörlerde salgıladığı ve bu yolla tümörün metastatik yayılımının önlendiği hipotezi ortaya atılmıştır (114). Bunu kanıtlamak için yapılan araştırmalar sonucunda anjiogenezi önleyen çok sayıda faktör bulunmuştur.

Bu moleküllerin büyük bir kısmı hücre dışı matriksin, koagülasyon sisteminin ya da fibrinolitik sistemin bileşenleridirler. Örneğin ilk olarak Folkman ve arkadaşları tarafından, Lewis tipi akciğer karsinomu hücrelerinden izole edilen ve primer tümörün metastatik yayılımını önlediği tespit edilen anjiostatin, 38-kDa molekül ağırlığında bir plazminojen bileşenidir ve kapiller endotelial hücrelerin çoğalmasını etkin bir şekilde önler (105).

Trombospondin-1(TSP-1)'in anjiogenizi önleyici etkisi ise tümör gelişimini uyarıcı ve önleyen genlerin tespit edilmesi için yapılan bir araştırma esnasında farkedilmiştir. Güçlü bir anjiogenezi önleyici molekül olan TSP-1'in ekspresyonu tümör baskılayıcı bir gen olan p53 tarafından kontrol edilmektedir (25,107).

Endostatin

Kollajen tip XVIII'in karboksi terminalinden elde edilen 20-kDa molekül ağırlığında bir bileşeni olan endostatin, ilk olarak O'Reilly ve arkadaşları tarafından fare hemanjiyoendotelial hücrelerinden izole edilmiştir. Endotelial hücrelerin çoğalmasını ve migrasyonunu önler (106). Bu çalışmada rekombinant endostatinin sistemik olarak uygulanması ile anjiogenezi etkili bir şekilde önlenmiş, metastazlar

mikroskobik boyutlarda kalırken, primer tümörün boyutlarında da belirgin bir gerileme olmuştur. Ayrıca uygulama süresince yeni tümör gelişimi olmamış, ilaç direnci ya da toksik etki gözlenmemiştir.

Kollajen tip XVIII bazal membranlarda, hücre dışı matrikste ve özellikle karaciğerde yoğun olarak bulunur. İn vitro ortamlarda elastaz ve L-katepsin gibi proteinazlar aracılığı ile kolajen tip XVIII'den elde edilen endostatinin, in vivo ortamlardaki elde ediliş mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (120).

İnvazif tümörlerden salgılanan kollajenazlar, hücre dışı matriks ve bazal membranlardaki kollajen XVIII'den endostatin elde edilmesini sağlar. Ayrıca VEGF de endostatin sentezinde dolaylı olarak rol oynamaktadır. Tümör hücreleri tarafından sentezlenen ve salgılanan VEGF neoplastik damarların endotelinden tümör matriksine kolajenaz salınımını artırır, böylece tümör içerisindeki endostatin konsantrasyonu artar (11,39). Endotelial hücrelerin proliferasyonunu önleyici direkt etkisi yanında endostatin, VEGF mRNA ekspresyonunu, VEGF sentez ve sekresyonunu azaltarak ya da VEGF KDR/Flk-1 reseptörleri ile etkileşip VEGF sinyal iletimini bozarak da anjiogenezi ve tümör gelişimini önlemektedir (61,73).

ANJİOGENİZİ UYARAN FAKTÖRLERİN TANISAL VE PROGNOSTİK ÖNEMİ

Tümör içi anjiogenik aktiviteyi ve dolayısı ile tümörün büyümesini kontrol eden anjiogenik faktörlerin, farklı kanser tiplerinin gelişimindeki rolleri ve klinik önemleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu faktörlerin tümör dokusundaki ekspresyonu, immünohistokimyasal boyama ve Western blot analizi ile protein düzeyinde ya da PCR ve in-situ hibridizasyon gibi tekniklerle mRNA düzeyinde çalışılabilmektedir. Bu yöntemler tümörün anjiogenik aktivitesinin değerlendirilmesini sağlayan mikrodamar sayımı metoduna alternatiftir. Ancak vasküler endotelial hücre yüzeyinde yer alan faktör VIII (vWF), CD31 ya da CD34 gibi antijenlere spesifik monoklonal antikorlarla, tümör dokusunun immünohistokimyasal boyamasından sonra, damarların yoğun olduğu bölgelerin tespit edilmesi ve bu bölgelerdeki damarların sayılmasına dayanan bu metod ile standardizasyon sağlamak zordur. Çünkü tümör dokusu içerisindeki damar yoğunluğu heterojendir. Ayrıca damar ağının

en yoğun olduğu tümör bölgelerinin belirlenmesi ve damarların sayımı sırasında araştırmacılar arasında farklılık olması kaçınılmazdır (72).

Tümörler tarafından salgılanan anjiogenik faktörlerin büyük kısmı eriyebilir peptidler oldukları için bu faktörlerin serum ya da plazma düzeylerinin ölçümü ile tümörün anjiogenik aktivitesi hakkında bilgi edinilebilir. Bu yöntem, tüm hastalara uygulanabilmesi, tümör doku örneği gerektirmemesi, operasyon öncesi hasta değerlendirilmesine olanak sağlaması ve invazif olmayan, tekrarlanabilen bir yöntem oluşu nedeni ile daha avantajlıdır. Bu nedenle son yıllarda kanserli hastalarda anjiogenik faktörlerin prognostik değerleri araştırılırken, ELİSA yöntemi ile dolaşımdaki faktör düzeylerinin ölçümü tercih edilmektedir (113).

Kanserli hastalarda, dolaşımdaki anjiogenik faktör düzeylerinin incelendiği araştırmalar genellikle bu faktörlerin düzeyleri ile tümörün yaygınlığı ve sağkalım oranları arasında bir ilişki olup olmadığını tespit edebilmek amacı ile yapılmaktadır. Ayrıca anjiogenik faktör düzeylerine bakılarak adjuvan tedavi verilmesi gereken nüks yapma olasılığı yüksek olan riskli hastalar tespit edilebilmektedir. Yine cerrahi öncesi serum anjiogenik faktör düzeylerine bakılarak hastalığın yaygınlığı ile ilgili bilgi edinilebilmekte ve neoadjuvan tedavi alması gereken hastalar belirlenebilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar tedavi sonrası yüksek kalan ya da tekrar yükselen anjiogenik faktör düzeylerine bakılarak tümör nüksünün erken tespit edilebilme olasılığını da gündeme getirmiştir (113). Dirix ve arkadaşları farklı histolojik tiplerde metastatik kanseri olan ve kemoterapi uygulanan hastalarda serum VEGF ve bFGF düzeylerinin; progresif seyir gösterenlerde, tedaviye yanıt veren hastalardan daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (30). Başka bir çalışmada ise tedavi öncesi yüksek olan serum VEGF düzeyinin kötü tedavi yanıtı ile bağlantılı olduğu bulunmuştur (124). Bu sonuçlar serum anjiogenik faktör düzeylerinin tümörün kemoterapiye yanıt verip vermeyeceğinin belirlenmesinde de kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak bütün bu olumlu potansiyel kullanım alanlarına rağmen serum anjiogenik faktör düzeylerinin tümörlerin erken tanısında kullanımları mümkün gözükmemektedir. Çünkü bu faktörler ancak hızla büyüyen yaygın tümörlerde, tespit edilebilir serum düzeylerine ulaşmaktadırlar.

VEGF ve Kanser

Tümör anjiogenezinin kontrolünde önemli rolü olan VEGF'nin serum düzeyinin kanserli hastalarda sağlıklı bireylerdekinden daha yüksek olduğu ilk kez 1994'te Kondo ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (78). Daha sonra Yamamoto ve arkadaşları farklı kanser tiplerinde serum VEGF düzeyi ile tümörün evresi mikrodamar yoğunluğu ve tümör dokusundaki VEGF ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon saptamışlardır (144). Bir başka araştırmada ise farklı histolojik kanser tiplerinde, serum VEGF düzeylerinin, yaygın hastalığı olanlarda lokal hastalığı olanlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (123). Meme, akciğer gastrointestinal sistem, üriner sistem kanserleri, yumuşak doku sarkomları, baş-boyun kanserleri, jinekolojik kanserler ve hematolojik kanserlerde yüksek serum ya da plazma VEGF düzeyi ile ileri tümör evresi ve kötü sağkalım hızı arasında korelasyon tespit edilmiştir (80,89,113). Çocukluk çağı lenfomalarında VEGF'nin tanısal ve prognostik değerinin araştırıldığı çalışmaların sayısı ise oldukça azdır (34,109,134).

Leptin ve kanser

Anjiogenizi uyarıcı etkisi nedeni ile çeşitli kanser tiplerinde, leptin ile tümör gelişimi arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Yüksek serum leptin seviyesinin prostat kanseri gelişme riskini artırdığı ve leptinin anjiogenezi uyararak prostat kanserli hastalarda tümörün büyümesine yol açtığı bildirilmiştir (132). Meme kanseri hücrelerinde leptin reseptörleri tespit edilmiş ve bir çalışmada östrojen reseptörü taşıyan insan meme kanseri hücrelerinde, leptinin büyümeyi uyardığı gözlenmiştir. Ancak meme kanseri ile serum leptin düzeyi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda, hasta ve kontrol vakalarının serum leptin düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (22). Sonuç olarak obezite, meme bezi gelişimi ve meme kanseri gelişim riski arasında bilinen bağlantı sebebi ile, leptin ve/veya leptin reseptör ekspresyonu ile meme kanseri gelişiminin arasındaki bağlantıyı kanıtlayacak yeni araştırmalara ihtiyaç vardır (131). Jinekolojik kanselerde serum leptin düzeyi ile klinik ve patolojik parametreler ve prognoz arasında bir ilişki saptanamamıştır(86). Yüksek yağlı diyetle beslenen bireylerde artan leptin, kolon hücrelerinde proliferasyonu uyararak kolon karsinogenezine katkıda bulunmaktadır (5). Ancak Tessitore ve

arkadaşları kolorektal karsinomlu hastaların serum leptin düzeyleri ile kontroller arasında fark bulamamışlardır (136). Çeşitli myeloid ve lenfoid lösemik hücre dizinlerinde leptin reseptör mRNA'sı tespit edilmiştir (20). Yine nüks yapan AML ve MDS hastalarında leptin reseptör ekspresyonu yeni tanı alanlardan daha yüksek bulunmuştur (79). Ancak leptinin lösemik hastalardaki prognostik değerinin kesin olarak belirlenmesi, leptinin hematopoez ve lökomogenezdeki biyolojik ve patolojik rollerinin açıklığa kavuşturulmasına bağlı gibi gözükmektedir. Lenfomalı çocuk hastalarda serum leptin düzeyinin prognostik değerini ve leptinin diğer klinik ve patolojik faktörlerle ilişkisini inceleyen bir araştırmaya literatürde rastlanmamıştır.

Endostatin ve kanser

Solid tümörlü hastalarda yapılan klinik çalışmalarda meme kanseri, akciğer kanseri, yumuşak doku sarkomu ve renal tümörü olan hastaların serum endostatin düzeyleri kontrol grubundaki bireylerden daha yüksek bulunmuştur (37,39). Akciğer kanseri ve yumuşak doku sarkomlarında serum endostatin düzeyinin prognostik değeri olduğu, vulvar kanserlerde ise prognostik değer taşımadığı tespit edilmiştir (36,133,64). Hodgkin dışı lenfomalı hastalarda ise serum endostatin düzeyinin prognostik değeri olup olmadığını araştıran çalışmaların sonuçları birbirleri ile çelişmektedir. Bertolini ve arkadaşları serum endostatin düzeyinin Hodgkin dışı lenfomalı hastalarda prognostik değeri olmadığını tespit etmişlerdir (10). Bono tarafından yapılan bir çalışmada ise tedavi öncesi serum endostatin düzeyi yüksek olan Hodgkin dışı lenfomalı hastalarda prognoz daha kötü olduğu gösterilmiştir (11).

HODGKİN DIŞI LENFOMALAR

Çocukluk çağında görülen Hodgkin dışı lenfomalar çok hızlı büyüyen agresif tümörler olduğu için, mümkün olan en kısa sürede tanı konulup evreleme yapılması ve tümörün histopatolojik tipine uygun olan tedavinin başlanması gerekmektedir. Nüks yapma riski düşük olan hastalarda, kısa süreli ve daha az toksik olan tedavi protokolleri, yüksek riskli hastalarda ise daha yoğun ve uzun süreli tedavi protokolleri kullanılmaktadır. Bunun içinde tedaviye başlanmadan önce hastaların risk gruplarının belirlenmesi gerekmektedir. Farklı tedavi protokollerinde risk gruplarının belirlenmesi için farklı prognostik faktörler kullanılsa da genel olarak tümörün histolojik tipi indüksiyon tedavisine alınan yanıt, tümörün evresi, serum LDH düzeyi, SSS ya da kemik iliğı tutulumunun olması, cerrahi sonrası rezidü tümör dokusunun kalıp kalmaması gibi faktörler, prognozun belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (17, 95).

Sonuç olarak çocukluk çağı lenfomaları günümüzde tedavi edilebilir bir hastalık grubu olarak kabul edilmektedir. Elde edilen başarılı tedavi sonuçlarının temel sebepleri; gelişen immünohistokimyasal, sitogenetik ve moleküler teknikler ile tümör alt gruplarının ve histolojik tiplerinin doğru olarak tespit edilmesi ve hastaların risk gruplarına uygun tedavi protokolleri ile tedavi edildiğı çok merkezli çalışmaların düzenlenebilmesidir.

HODGKİN LENFOMA

Günümüzde Hodgkin lenfomalı çocukların tedavisinde, çok ajanlı sistemik kemoterapi ve tutulmuş alana düşük doz radyoterapi içeren protokoller kullanılmaktadır. Bu tedavi protokollerinin kullanılması ile 5 yıllık sağkalım oranları %90'nın üzerine çıkmıştır (27). Çocukluk çağı Hodgkin lenfomalarının tedavisinde bugün gelinen noktada amaç, elde edilen yüksek tedavi başarı oranlarını koruyarak tedaviye bağlı gelişen yan etkileri en aza indirebilmektir. Bunun içinde olaysız ve genel sağkalım hızlarını etkileyen prognostik faktörlerin belirlenmesi ve bu faktörler kullanılarak tanımlanacak risk gruplarına göre tedavi yoğunluğunun ve süresinin ayarlanması gerekmektedir.

Risk gruplarının tanımlanması protokoller arasında farklılık gösterse de genel olarak evre I ya da II nodal hastalığı olan, kitlevi hastalığı ve B semptomları bulunmayan olgularda daha iyi bir klinik seyir görülür ve nüks riski düşüktür. B semptomlarının varlığı, kitlevi mediastinal ya da periferik hastalık, ektranodal hastalık ve ileri evre hastalık (evre IIIB ve IV) ise kötü prognoz bulgularıdır ve tümör nüksü açısından yüksek risk taşıyan olguların tespitinde kullanılırlar (28). Yüksek ve düşük riskli olguların belirlenmesi için kullanılan prognostik faktörler genellikle erişkinlerde yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuştur. Bu faktörler kullanılarak geliştirilen ve uygun tedavi seçiminde yol gösterici olan prognostik indekslerin Hodgkin lenfomalı çocuklarda kullanımı uygun olmayabilir (130). Dolayısı ile çocukluk çağı lenfomalarında, mevcut klinik prognostik faktörlerle birlikte kullanılabilecek tümörün proliferasyon ve yayılım potansiyeli, kemoterapi ve apoptoz direnci gibi biyolojik özellikleri hakkında bilgi vererek, risk gruplarının daha doğru bir şekilde tanımlanmasını sağlayacak yeni prognostik faktörlere ihtiyaç vardır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Onkoloji Bilim Dallarında ve Ankara SSK Hastanesi Pediatrik Onkoloji Kliniğinde Ocak 2004- Ekim 2005 tarihleri arasında izlenen, yeni tanı alan veya tanı aldıktan sonra herhangi bir tedavi başlanmadan söz konusu merkezlere gönderilen yaşları 3-15 (ortalama 8.1 ± 3.3) yaş arasında değişen 36 (24 erkek, 12 kız) Hodgkin (n= 15) ve Hodgkin dışı lenfomalı (n= 21) çocuk hasta bu çalışmaya dahil edildi. Lenfoma tanısı her merkezde lenfoma konusunda deneyimli olan patoloğlar tarafından doku örneklerinin morfolojik ve immunohistokimyasal incelenmesi ile konuldu.

Hodgkin lenfomalı hastaların klinik evrelemesi Ann-Arbor evreleme sistemine göre, Hodgkin dışı lenfomalı hastalarinki ise St Jude evreleme sistemine göre yapıldı. Histopatolojik alt gruplar; Hodgkin lenfomalı hastalarda Rye kriterleri, Hodgkin dışı lenfomalı hastalarda ise REAL sınıflama sistemi kullanılarak belirlendi. Hodgkin lenfomalı hastalara hastalığın evresi ve mevcut risk faktörlerine göre belirlenen 4-6 kür dönüşümlü COPP/ABVD ya da sadece ABVD tedavisi ve tutulmuş alana düşük doz radyoterapi (150-180 cGy/fraksiyon, toplam doz 20-25 Gy) uygulandı. Hodgkin dışı lenfomalı hastalar ise bağlı bulundukları merkezde kullanılmakta olan B hücre-BFM 95, B hücre dışı BFM 95, LMB 89 ya da LMT 89 protokollerine uygun olarak tedavi edildiler.

Hodgkin lenfoma tanısı alan 15 hastanın 10'unda (% 66.7) evre I ya da II 5'inde (% 33.3) ise evre III ya da IV hastalık mevcuttu. En sık görülen tümör histojileri karışık hücreli (% 33.3) ve nodüler sklerozan (% 33.3) tiplerdi. On beş hastanın üçünde (%20) B semptomu ve dört (% 26.7) hastada da kitlevi hastalık tespit edildi. Hodgkin lenfomalı hastaların demografik özellikleri ve klinik bilgileri Tablo I'de verildi.

Hodgkin dışı lenfoma tanısı alan 21 hastanın 17'sinde (% 80.9) evre III ya da IV; 4'ünde (% 19.1) ise evre I ya da II hastalık mevcuttu. Lenfoblastik lenfoma (%42.9) ve Burkitt / Burkitt benzeri (% 38.1) lenfomalar en sık görülen tiplerdi. Hodgkin dışı lenfomalı hastalara ait diğer bilgiler Tablo II'de özetlendi.

Tablo I. Hodgkin lenfomalı hastaların özellikleri

	N (%)
Cinsiyet	
Kız	3 (20)
Erkek	12 (80)
Yaş (yıl)	
Ortalama (± SD)	8.4 (± 3.1)
Min-Maks	3 -14
Vücut kütle indeksi	
Ortalama (± SD)	17.2 (± 2.2)
Min-Maks	14.6 – 23.7
B semptomları	
Var	3 (20)
Yok	12 (80)
Kitlevi hastalık	
Var	4 (26.7)
Yok	11 (73.3)
Ekstranodal hastalık	
Var	2 (13.3)
Yok	13 (86.7)
Tümör evresi	
I	1 (6.7)
II	9 (60)
III	3 (20)
IV	2 (13.3)
Tümör histolojisi	
Karışık hücreli	5 (33.3)
Nodüler sklerozan	5 (33.3)
Lenfositten zengin	4 (26.7)
Lenfositten fakir	1 (6.7)
LDH (IU/L)	
≤ 500	5 (33.3)
> 500	10 (66.7)
Sedim (mm/sa)	
≤ 20	8 (53.3)
> 20	7 (46.7)
Albumin (g/dl)	
< 4	1 (6.7)
≥ 4	14 (93.3)
Hemoglobin (g/dl)	
<11	5 (33.3)
≥ 11	10 (66.7)
Beyaz küre sayısı (x 10 ⁹ /L)	
≤ 13,5	11 (73.3)
> 13,5	4 (26.7)
Tedavi	
ABVD + TA-DDRT	7 (46.7)
ABVD/COPP + TA-DDRT	8 (53.3)
Tedavi yanıtı	
Tam yanıt	14 (93.3)
Progresif hastalık	1 (6.7)

ABVD; Adriamisin, bleomisin, vinblastin, dakarbazin, COPP; siklofosamid, vinkristin, prokarbazin prednizon, TA-DDRT; tutulmuş alana düşük doz radyoterapi

Tablo II. Hodgkin Dışı lenfomalı hastaların özellikleri

	N (%)
Cins	
Kız	10 (47.6)
Erkek	11 (52.4)
Yaş	
Ortalama (±SD)	7.9 (± 3.5)
Min-Maks	3 - 14
Vücut kitle indeksi	
Ortalama (±SD)	16 (± 2.6)
Min-Maks	13 - 21
B semptomları	
Var	13 (61.9)
Yok	8 (38.1)
Ekstranodal hastalık	
Var	13 (61.9)
Yok	8 (38.1)
Tümör evresi	
I	1 (4.8)
II	3 (14.3)
III	9 (42.9)
IV	8 (38.1)
Tümör histolojisi	
Burkitt / Burkitt benzeri	8 (38.1)
Lenfoblastik	9 (42.9)
Büyük hücreli	4 (19)
LDH (IU/L)	
≤ 500	7 (33.3)
> 500	14 (66.7)
Tedavi	
BFM 95	3 (14.3)
BFM 95 non-B cell	2 (9.5)
LMB 89	8 (38.1)
LMT 89	8 (38.1)

Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfomalı hastalar, mediastinal/periferik kitleli hastalık ektranodal hastalık, B semptomlarının varlığı ve hemoglobin ($< 11\text{g/dl}$ ve $\geq 11\text{g/dl}$) beyaz küre sayısı ($\leq 13500/\text{mm}^3$ ve $>13500/\text{mm}^3$), eritrosit sedimentasyon hızı ($< 20\text{mm/sa}$ ve $\geq 20\text{mm/sa}$), serum laktat dehidrogenaz (LDH; $\leq 500\text{ IU/L}$ ve $> 500\text{ IU/L}$), serum albumin ($< 4\text{g/dl}$ ve $\geq 4\text{g/dl}$), C- reaktif protein (CRP; $\leq 6\text{ mg/L}$ ve $> 6\text{ mg/L}$) ve CA-125 ($\leq 35\text{ IU/ml}$ ve $> 35\text{ IU/ml}$) düzeylerinde izlenen değişim açısından tanı anında ve tedavi bitiminde değerlendirildi. Prognostik değeri olduğu bilinen bu faktörler ile serum anjiogenik faktör düzeyleri arasındaki ilişki incelendi. Ayrıca tanı anında, hastaların vücut ağırlığı ve boy ölçümleri yapılarak, vücut kitle indeksleri ($\text{VKİ} = \text{Ağırlık (kg)} / \text{Boy}^2 (\text{m})$) formülü ile hesaplandı.

Serum VEGF, leptin ve endostatin düzeylerinin normal değerlerinin belirlenebilmesi için enfeksiyon dışı nedenlerle çocuk polikliniğine başvuran yaşları 3-14 (ortalama 9.4 ± 3.5) yaş arasında değişen 18 (8 erkek, 10 kız) sağlıklı çocuktan kan alındı. Anjiogenik faktör düzeylerinde yanıtıcı artıştan sakınmak için son 1 ay içerisinde enfeksiyon veya cerrahi geçiren çocuklar kontrol grubuna dahil edilmedi.

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubundaki tüm çocukların aileleri GÜTF Etik Kurul Yönergelerine uygun olarak bilgilendirildi ve yazılı onayları alındı.

Hasta ve kontrol grubundaki çocukların herbirinden serum VEGF, leptin ve endostatin düzeylerinin saptanması için periferik venden 5cc kan örneği kuru steril tüplere alındı. Santrifüj öncesi 30 dk kendiliğinden pıhtılaşması beklendikten sonra 1000 cpm hızında 15 dk santrifüj edilip serumları ayrıldı. Serum örnekleri $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de değerlendirme zamanına kadar saklandı. Hasta grubundaki çocuklardan ayrıca tam kan sayımı, CRP, CA-125, eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), serum albumin, ferritin ve laktat dehidrogenaz düzeylerinin belirlenebilmesi için venöz kan örnekleri uygun tüplere alındı. Kan örnekleri tanı anında, her tümörün klinik özelliğine göre tedavi bitiminde remisyon sağlandıktan sonra, ayrıca rutin takipler sırasında nüks saptandığında ilave olarak alındı.

Vücut kitle indeksi (VKİ), vücut ağırlığı(kg) / boy²(m²) formülü ile hesaplandı. Hasta grubunda yer alan çocuklarda sadece tanı anındaki değerlere bakıldı. Kontrol grubundaki çocukların ise VKİ değerleri mevcut değildir.

Kullanılan Laboratuvar Yöntemleri:

Hemoglobin, beyaz küre ve trombosit sayımının belirlenmesi için alınan venöz kan örnekleri Coulter Maxm otomatik ölçüm cihazı ile çalışıldı.

Serum CA-125 düzeyi Immulite-2000 otoanalizörü ile kemilüminisans yöntemi ile çalışıldı. Normal sınır olarak < 35 IU/ml kabul edildi. Serum CRP düzeyi immunonefelometrik yöntem ile çalışıldı ve 0-6 mg/L arasındaki değerler normal olarak kabul edildi. Eritrosit sedimentasyon hızı Wintrobe yöntemi ile çalışıldı ve < 20 mm/sa normal olarak kabul edildi. Serum albumin düzeyi için ise 0-4 gr/dl arasındaki değerler normal olarak kabul edildi.

VEGF: Serum VEGF düzeyleri RayBiotech firmasına ait Human VEGF ELISA kiti kullanılarak, hastanemizin İmmünoloji Bilim Dalı laboratuvarında çalışıldı. Kitin çalışma prensibine uygun şekilde ilk olarak, standartların ya da serum örneklerinin içerdiği VEGF'nin anti-human VEGF antikörlerine bağlanması sağlandı. Sonra ortama biotin-antihuman VEGF antikör konjugatı eklendi. Ardından sırası ile HRP-streptavidin enzim kompleksi ve kolorimetrik ajan eklendi. Son olarak serum örneğindeki VEGF konsantrasyonu ile orantılı olan, ürün optik dansitesi 450 nm'de ölçüldü. Kit tarafından ölçülebilen en düşük serum VEGF konsantrasyonu 4 pg/ml idi. Serum VEGF düzeylerinin, kitin okuma sınırının altında kaldığı olgularda, istatistiksel testlerde, 0 ile alt okuma sınırının (4 pg/ml) orta değeri kullanıldı.

Endostatin: Serum endostatin düzeyleri ELISA tekniği ile hastanemizin İmmünoloji Bilim Dalı laboratuvarında çalışıldı. Cytimmune Sciences firmasına ait Accucyte Human Endostatin markalı kitin çalışma prensibine uygun olarak, her bir örnek içinde yer alan ve endostatin antikoru, biyotinile edilmiş endostatin proteini, serum örneği ya da standart solüsyonu içeren spesifik endostatin kompleksine, goat anti-rabbit human endostatin antikörlerinin bağlanması sağlandı. Örneklerin yıkanmasından sonra streptavidin alkaline fosfataz konjugatının, immobilize olan biyotin-protein konjugatına bağlanması sağlandı. Kolorimetrik ajanın ortama eklenmesinden sonra oluşan ürünün 450 nm de optik dansitesi ölçüldü. Serum ya da standart solüsyon içerisindeki endostatin ile biyotinile edilmiş endostatin proteini endostatin spesifik antikör bölgelerine bağlanma için kompetisyon gösterirler. Serum örneğindeki endostatin konsantrasyonu arttıkça antikör bölgesine bağlanabilen ve

streptavidin alkaline fosfataz konjüгатı kullanılarak optik dansitesi belirlenen biyotinile endostatin konsantrasyonu azalır. Dolayısı ile her bir serum örneğinde tespit edilen endostatin konsantrasyonu endostatin standart eğrisindeki değerlerle karşılaştırıldığında sitokin konsantrasyonu ile optik dansite arasında ters orantı olduğu görülür. Yani serum örneğinin optik dansitesi ne kadar yüksekse, içerdіği sitokin konsantrasyonu o kadar düşüktür. Kit tarafından belirlenebilen en düşük serum endostatin konsantrasyonu 1.95 ng/ml olup, kitin ölçüm aralığı 1.95-500 ng/ml idi. Serum endostatin düzeyleri, kitin okuma sınırının altında kalan olgularda istatistiksel testlerde 0 ile alt okuma sınırının (1.95ng/ml) orta değeri kullanıldı.

Leptin: Serum leptin düzeyleri, çift yönlü radyoimmünometrik assay (IRMA) yöntemi ile çalışan Human leptin IRMA DSL-23100i markalı kit kullanılarak hastanemizin Pediatrik Endokrinoloji laboratuvarında çalışıldı. Sonuçlar LB2111 cihazı ile ng/ml olarak değerlendirildi. Tespit edilebilen en düşük serum leptin konsantrasyonu 0.1ng/ml idi.

İstatistiksel Yöntemler:

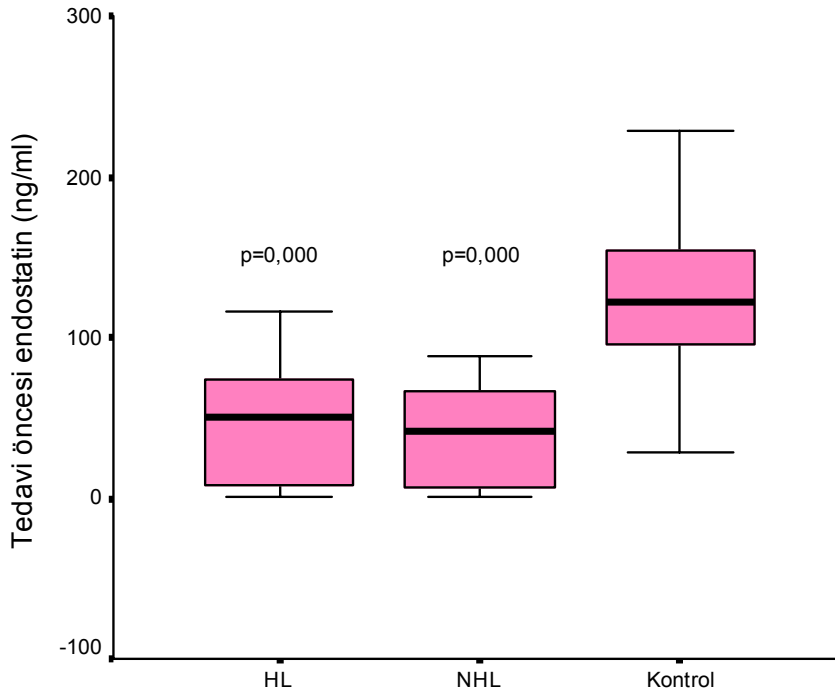
Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata (SH) olarak verildi. Hasta ve kontrol grupları arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde t testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası değerlerin karşılaştırılması için t testi ve Wilcoxon işaretli sıralar testi kullanıldı. Farklı değişkenler arasındaki korelasyonun saptanması için Spearman sıra korelasyonu analizi yapıldı. Cinsiyet ve yaşa göre farklı değişkenler açısından hastalar arasında farklılık olup olmadığının tespiti için ki-kare testi yapıldı. Sağkalım olasılıklarının hesaplanmasında, Kaplan-Meier sağkalım analizi kullanıldı. Hastalar farklı değişkenlere göre gruplandırıldıktan sonra, gruplar arasında sağkalım yönünden farklılık olup olmadığının incelenmesi için Log rank analizi yapıldı. $P < 0.05$ olan tüm değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm veriler SPSS 10.0 bilgisayar programı kullanılarak değerlendirildi.

BULGULAR

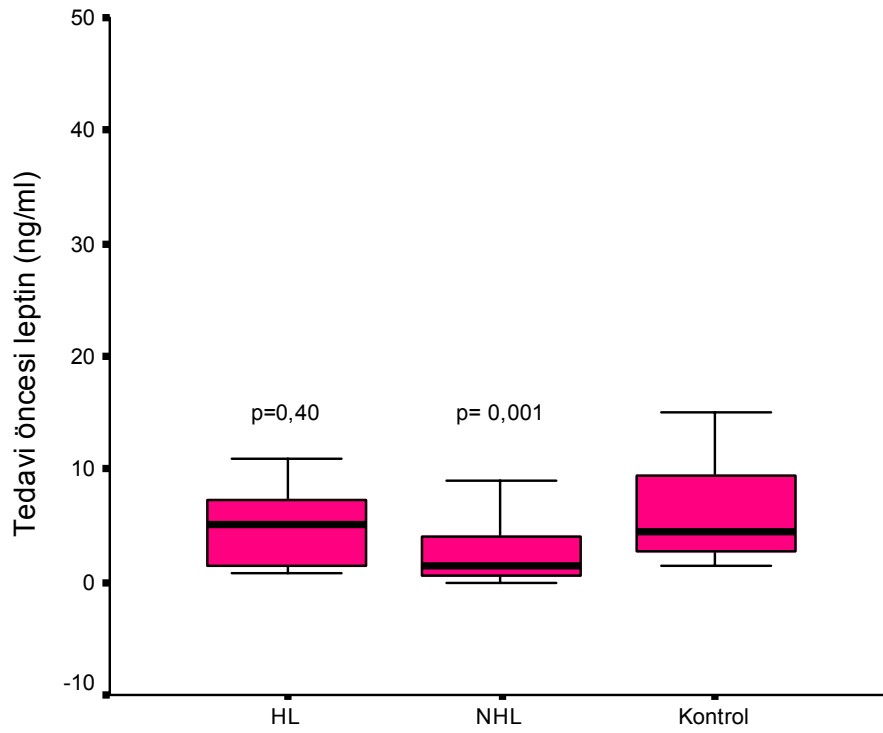
Kontrol grubundaki çocukların tümünde serum VEGF düzeyleri kitin okuma sınırı olan 4pg/ml'in altında bulundu. Ortalama serum endostatin ve leptin düzeyleri ise sırası ile 123.6 ± 13.5 ng/ml ve 6.7 ± 1.2 ng/ml olarak tespit edildi. Hasta grubundaki çocukların tümüne (N= 36) bakıldığında, VEGF konsantrasyonunun kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu görüldü ($p= 0.033$). Serum endostatin ($p= 0.000$) ve leptin ($p= 0.013$) düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşme saptandı (Tablo III).

Tedavi sonrası izlemde kalan ve remisyona giren 33 hastanın tedavi öncesi ve tedavi sonrası serum VEGF ($p= 0.041$), endostatin ($p= 0.047$) ve leptin ($p= 0.012$) düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü (Tablo IV).

Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfomalı hastalar ayrı gruplar olarak incelendiğinde Hodgkin lenfomalı olguların tedavi öncesi serum VEGF düzeylerinin; $< 4\text{pg/ml} - 985.5$ pg/ml (ortalama; 143.2 ± 82.8) aralığında, Hodgkin dışı lenfomalı olgularda ise $<4\text{pg/ml} - 1148.7\text{pg/ml}$ (ortalama; 136.3 ± 67.6) aralığında geniş bir dağılım gösterdiği saptandı. Bu değerler ile kontrol grubundaki sağlıklı çocukların serum VEGF değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu (HL, $p= 0.05$; NHL $p= 0.029$). Her iki hasta grubundaki çocukların tedavi öncesi serum endostatin değerleri kontrol grubuna göre belirgin düzeyde düşüktü ($p= 0.000$ HL ve NHL için). Hodgkin lenfomalı hastaların tedavi öncesi serum leptin düzeyleri ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmazken ($p > 0.05$), Hodgkin dışı lenfomalı hastaların tanı anındaki serum leptin düzeyleri düşük bulundu ($p= 0.001$) (Tablo III, Şekil 5,6).



Şekil 5. Kontrol grubunda ve hastalarda serum endostatin düzeyleri



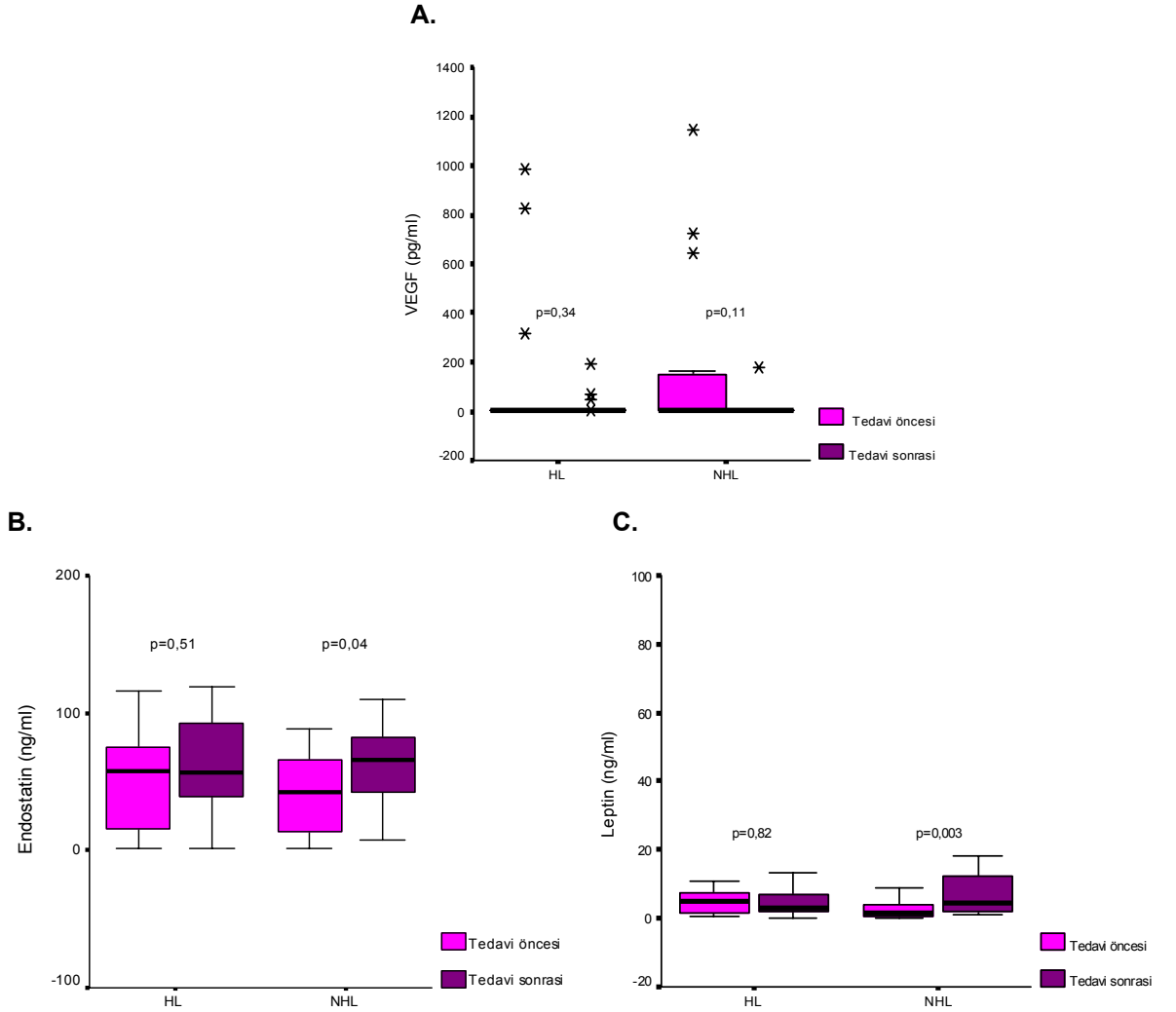
Şekil 6. Kontrol grubunda ve hastalarda serum leptin düzeyleri

Tablo III . Hodgkin / Hodgkin Dışı lenfomalı hastaların ve kontrol grubunun tedavi öncesi serum VEGF, leptin ve endostatin düzeyleri

Değişken	N	Ortanca (min-maks)	Ortalama	SS	SH	Ortalamanın %95 güven aralığı	P değeri
VEGF (pg/ml)							
Tüm hastalar	36	2 (2-1148.7)	139.2	309.9	51.6	(34.3- 244)	0.033*
NHL	21	2 (2-1148.7)	136.3	309.9	67.6	(-4.7- 277.4)	0.029*
HL	15	2 (2- 985.5)	143.2	320.6	82.8	(-34.4- 320.7)	0.05*
Kontrol	18	< 4	< 4				
Endostatin (ng/ml)							
Tüm hastalar	36	48.7 (0.98-116.5)	43.9	34.5	5.8	(30.2- 53.6)	0.000*
NHL	21	41.9 (0,98- 88,5)	38.2	31	6.8	(24- 52.3)	0.000*
HL	15	51 (0.98- 116.6)	47	39.7	10.3	(25- 69)	0.000*
Kontrol	18	121.6 (27.8- 228.6)	123.6	57	13.5	(95.2- 152)	
Leptin (ng/ml)							
Tüm hastalar	36	1.9 (0.02- 41.7)	5.0	8.7	1.5	(2- 7.9)	0.013*
NHL	21	1.4 (0.02- 8.9)	2.5	2.7	0.6	(1.3- 3.8)	0.001*
HL	15	5.0 (0.7- 41.7)	8.5	12.6	3.2	(1.6- 15.5)	0.406
Kontrol	18	4.4 (1.3- 20.2)	6.7	5.2	1.2	(4.1- 9.3)	

VEGF; vasküler endotelial büyüme faktörü, NHL; Hodgkin dışı lenfoma, HL; Hodgkin lenfoma, SS; standart sapma, SH; standart hata.

Tedavi sonrası remisyona giren hastalarda, serum anjiogenik faktör düzeylerindeki değişimler incelendiğinde; Hodgkin lenfomalı hastaların tedavi öncesi ve tedavi sonrası serum VEGF, endostatin ve leptin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p > 0.05$). Ancak VEGF değerlerinin düştüğü ve kontrol grubu ile hasta grubu arasında tedavi öncesi tespit edilen farkın ortadan kalktığı görüldü ($p > 0.05$). Hodgkin dışı lenfomalı hastalarda tedavi öncesi normalden düşük olan serum endostatin ($p = 0.04$) ve leptin ($p = 0.003$) düzeylerinde tedavi sonrası belirgin artış tespit edildi. Serum VEGF düzeyleri ise sağlıklı çocuklardaki normal değerlere düşmesine rağmen, tedavi öncesi değerlerle karşılaştırıldığında, anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo IV, Şekil 7).



Şekil 7. Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfomalı hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası serum VEGF (A), endostatin (B) ve leptin (C) düzeyleri

Tablo IV. Hodgkin/Hodgkin Dışı lenfomalı hastaların ve tüm lenfomalı hastaların tedavi öncesi ve tedavi sonrası serum VEGF, leptin ve endostatin düzeyleri

Değişken	Tedavi öncesi Ortanca (min-maks) Ortalama ($\pm$ SH)	Tedavi sonrası Ortanca (min-maks) Ortalama ($\pm$ SH)	P değeri
VEGF (pg/ml)			
NHL	2 (2 - 1148.7) 136.3 ($\pm$ 67.6)	2 (2 - 178.3) 11.8 ($\pm$ 9.8)	0.116
HL	2 (2- 985.5) 143.2 ($\pm$ 82.8)	2 (0.8 - 189.9) 21.6 ($\pm$ 13.0)	0.345
Tüm hastalar	2 (2 – 1148.7) 151.6 ($\pm$ 55.9)	2 (0.8 – 189.9) 16.2 ($\pm$ 7.9)	0.041*
Endostatin (ng/ml)			
NHL	41.9 (0.9 - 88.6) 38.2 ($\pm$ 6.8)	65.8 (7.7 - 164.8) 68.9 ($\pm$ 9.7)	0.04*
HL	51 (0.9 - 116.6) 47 ($\pm$ 10.3)	56.8 (0.9 - 118.7) 62.2 ($\pm$ 9.9)	0.519
Tüm hastalar	48.6 (0.98 – 116.6) 43.1 ($\pm$ 5.9)	59.7 (1 – 164.8) 65.9 ($\pm$ 6.8)	0.047*
Leptin (ng/ml)			
NHL	1.4 (0.02 - 8.9) 2.5 ($\pm$ 0.6)	4.3 (0.9 - 30.4) 8.3 ($\pm$ 1.9)	0.003*
HL	5.0 (0.7- 41.7) 8.5 ($\pm$ 3.2)	2.8 (0.2 - 78.7) 11,6 ($\pm$ 5.6)	0.826
Tüm hastalar	1.9 (0.02 – 41.7) 5.3 ($\pm$ 1.6)	3.6 (0.2 – 78.6) 9.8 ($\pm$ 2.7)	0.012*

VEGF; vasküler endotelyal büyüme faktörü, NHL; Hodgkin dışı lenfoma, HL; Hodgkin lenfoma, SS; standart sapma, SH; standart hata.

Tümör anjiogenezi, anjiogenizi uyaran ve önleyen faktörler arasında kurulan dengeye bağlı olduğundan lenfomalı hastaların tümünde (N= 36) bu faktörler arasında ilişki olup olmadığı araştırıldı. Tanı anındaki serum VEGF, endostatin ve leptin düzeyleri arasında anlamlı doğrusal bir ilişki tespit edilemedi ($p > 0.05$ Spearman). Tedavi öncesi serum leptin düzeyi ile tanı anındaki yaş ($r = 0.45$ $p = 0.006$) ve vücut kitle indeksi ($r = 0.38$ $p = 0.021$) arasında anlamlı pozitif korelasyon; serum leptin düzeyi ve LDH düzeyi ($r = -0.37$ $p = 0.0027$) arasında ise negatif korelasyon olduğu görüldü. Lenfomalı hastalarda prognostik değeri olduğu bildirilen diğer faktörler (cins tümör evresi, ektranodal hastalık, B semptomu, kitleli hastalık, hemoglobin, beyaz küre sayımı, sedimentasyon hızı, CRP ve CA-125) ile anjiogenik faktörler arasında bir ilişki tespit edilemedi ($p > 0.05$).

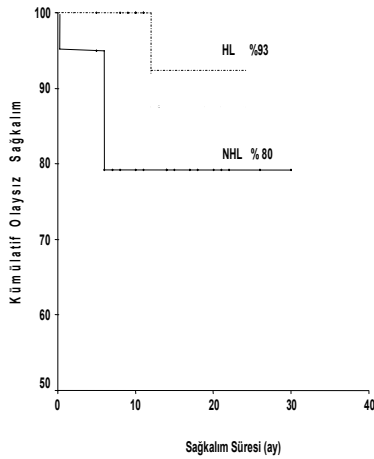
Lenfomalı hastalarda anjiogenik faktör düzeylerinin cinsiyete göre farklılık gösterip göstermediği incelendi. Kız ve erkek hastalarda tanı anındaki ortalama serum VEGF düzeyleri sırası ile 144.35 ± 79.23 pg/ml ve 136.25 ± 68.59 pg/ml idi ($p > 0.05$). Kız hastalarda serum endostatin ve leptin düzeyleri sırası ile 52 ± 9.83 ng/ml ve 8.1 ± 3.79 ng/ml; erkeklerde ise 39.47 ± 7 ng/ml ve 3.27 ± 0.67 ng/ml bulundu. Ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$). Hastaların tanı anındaki yaşlarının da anjiogenik faktörler üzerinde etkisi tespit edilmedi ($p > 0.05$).

Hastalar, tümör evresi (erken evre / ileri evre), B semptomu, ektranodal hastalık, kitleli hastalık ve tümör nüksü durumlarına göre gruplandırıldı ve tanı anındaki anjiogenik faktör düzeylerinin gruplar arası farklılık göstermediği saptandı ($p > 0.05$ Ki-kare testi). Ancak tanı anında ektranodal hastalığı olan çocukların % 66.7'sinde endostatin ve leptin düzeyleri (N= 36, endostatin medyan değeri olan ≥ 48.7 ng/ml ve leptin medyan değeri olan ≥ 1.87 ng/ml normal olarak kabul edildiğinde) düşük bulunurken, ektranodal hastalığı olmayanlarda bu oran % 38.1 idi ($p = 0.09$ Ki kare testi). Yine tanı anındaki serum LDH düzeyi > 500 IU/L olan çocukların serum leptin düzeylerinin belirgin olarak düşük olması da dikkat çekici bulundu ($p = 0.005$ Ki kare testi).

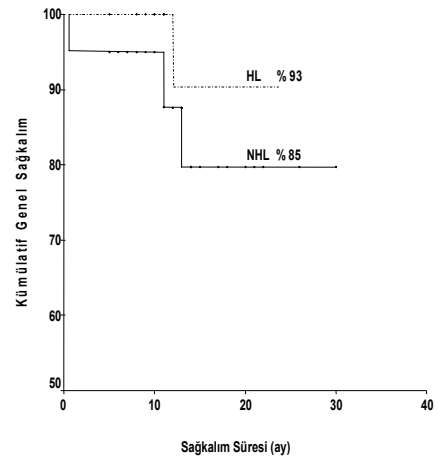
Tüm hasta grubu için medyan takip süresi 12 ay (2-30ay) olup; 2 yıllık nüksüz ve genel sağkalım hızları sırası ile % 85.7 ve % 88.6 olarak bulundu. Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfomalı hastalar ayrı olarak incelendiğinde ise; medyan takip süresi 12

ay (5-24 ay) olan Hodgkin lenfomalı hastaların tümünün bir hasta dışındaki tam remisyona girdiği görüldü. Primer progresif hastalık olarak kabul edilen bu hasta 12 aylık izlem sonunda kaybedildi. Hem nüksüz hemde iki yıllık genel sağkalım hızı % 93.3 idi. Medyan takip süresi 13.5 ay (2-30 ay) olan Hodgkin dışı lenfomalı 21 hastanın 16'sında tedavi sonrası tam remisyon elde edildi. Bir hasta psikososyal nedenlerden dolayı takip dışı bırakıldı. İleri evre büyük B hücreli lenfoma tanısı ile izlenen iki ve lenfoblastik lenfoma tanısı ile izlenen bir hasta tedavi altındayken hastalık nüksü nedeni ile kaybedildi. Evre IV Burkitt lenfoma tanısı alan ve tedavi altındayken erken nüks görülen bir hastanın ise halen tedavisi devam etmektedir. Bu hasta grubu için iki yıllık nüksüz sağkalım oranı % 80, genel sağkalım oranı ise % 85 olarak tespit edildi (Şekil 8).

A.



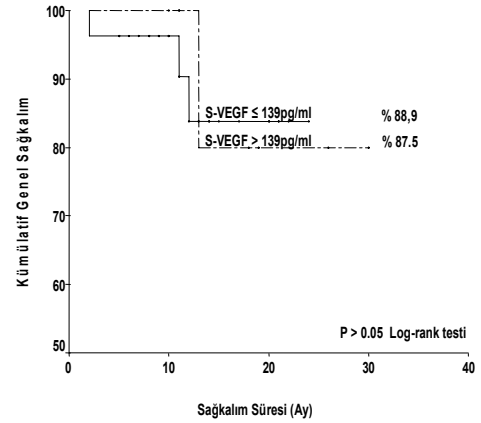
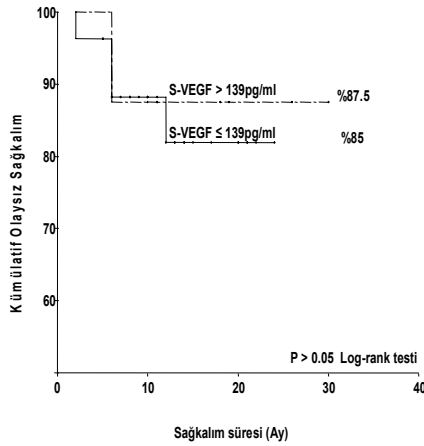
B.



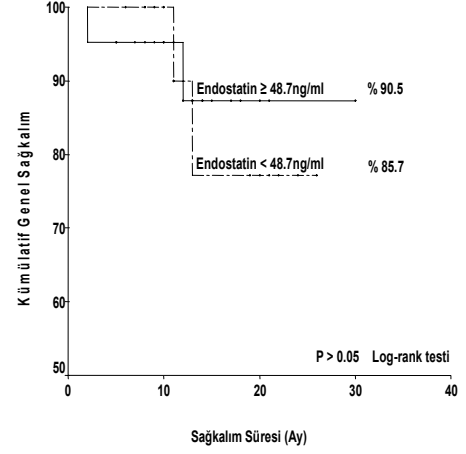
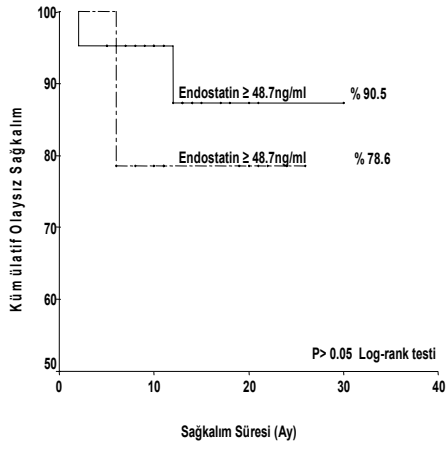
Şekil 8. Hodgkin ve Hodgkin-dışı lenfomalı hastalarda iki yıllık olaysız (A) ve genel sağkalım hızları (B)

Hem tüm lenfomalı hastalarda hem de Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfomalı hastalarda, tedavi öncesi serum anjiogenik faktör düzeylerinin hastaların sağkalımı üzerindeki etkileri de araştırıldı. Bunun için serum VEGF düzeyinin ortalama değeri endostatin ve leptinin ise medyan değerleri sınır olarak kabul edilerek hastalar gruplandırıldı. Lenfomalı tüm hastalarda, tedavi öncesi serum VEGF düzeyi yüksek ($> 139\text{pg/ml}$) ve normal ($\leq 139\text{pg/ml}$) olanların iki yıllık genel (GS) ve olaysız (OS) sağkalım hızları sırası ile %87.5 ve %88.9 ; %87.5 ve %85 olarak bulundu ($p > 0.05$). Tedavi öncesi serum endostatin düzeyi düşük ($< 48.7\text{ng/ml}$) ve normal ($\geq 48.7\text{ng/ml}$) olan hastaların iki yıllık genel ve olaysız sağkalım hızları ise sırası ile % 85.7 ve % 90.5; % 78.6 ve % 90.5 idi ($p > 0.05$). Serum leptin düzeyi düşük ($< 1.87\text{ng/ml}$) olan hastalar ile normal ($\geq 1.87\text{ng/ml}$) olanların genel ve olaysız sağkalım hızları (% 94 ve % 83.3; % 88.2 ve % 83.3) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p > 0.05$) (Şekil 9).

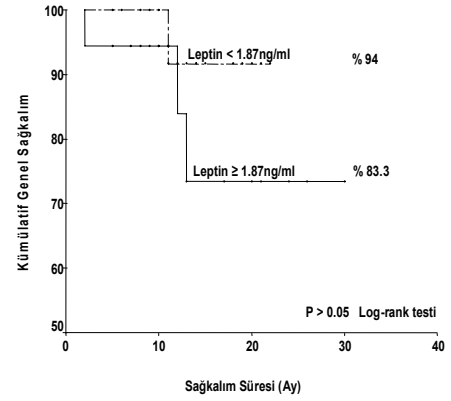
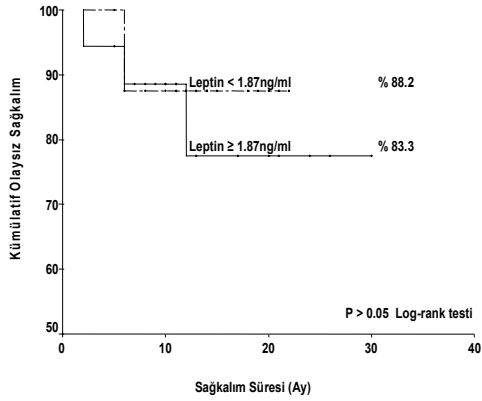
A.



B.



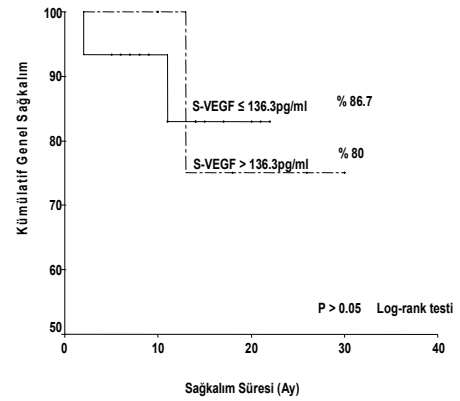
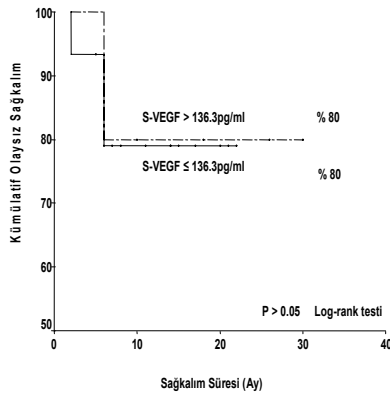
C.



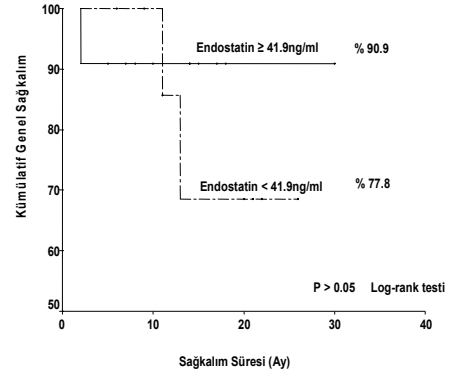
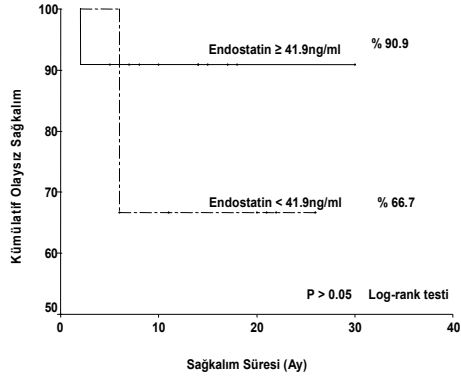
Şekil 9. Lenfomalı tüm hastaların (N=36) tedavi öncesi serum VEGF (A), endostatin (B) ve leptin (C) düzeylerine göre olaysız ve genel sağkalım eğrileri

Hodgkin lenfomalı hastalarda, tedavi öncesi serum VEGF düzeyi yüksek (> 143 pg/ml), endostatin (< 51 ng/ml) ve leptin (< 5 ng/ml) düzeyleri düşük olanlar ile normal olanların iki yıllık genel ve olaysız sağkalım hızları arasında da farklılık saptanmadı (Sırası ile, VEGF; GS % 100 ve % 91.7, OS % 100 ve % 91.7; Endostatin; GS % 100 ve % 87.5, OS % 100 ve % 87.5; Leptin; GS % 85.7 ve % 100, OS % 85.7 ve % 100) ($p > 0.05$). Hodgkin dışı lenfomalı olgularda ise endostatin düzeyi (< 41.87 ng/ml) düşük ve normal olanlarda iki yıllık olaysız sağkalım hızları sırası ile % 66.7 ve % 90.9 olarak tespit edildi. Benzer şekilde iki yıllık genel sağkalım hızlarında endostatin düzeyi düşük olgularda daha düşük bulundu (% 77.8 ve % 90.9). Ancak bu farklılıklar istatistiksel anlamlılık düzeyinde değildi ($p > 0.05$). Bu grupta yeralan hastaların tedavi öncesi serum endostatin ve leptin düzeylerinin sağkalım üzerine belirgin bir etkisi saptanmadı ($p > 0.05$) (Şekil 10).

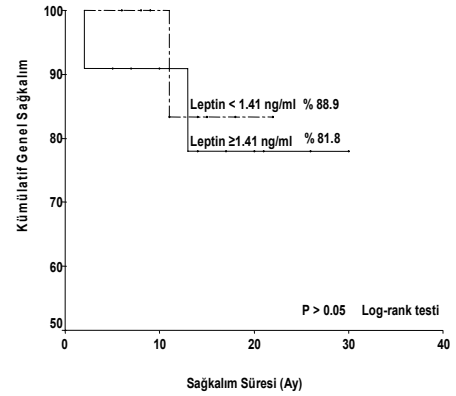
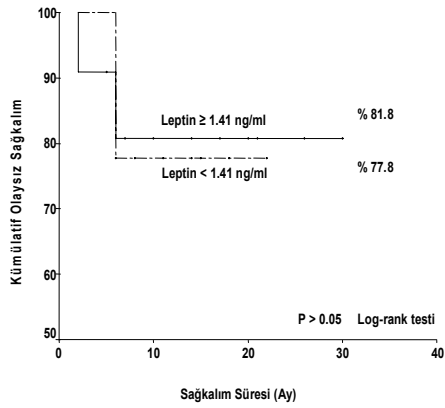
A.



B.



C.



Şekil 10. Non-Hodgkin lenfomalı hastaların tedavi öncesi serum VEGF (A) endostatin (B) ve leptin (C) düzeylerine göre olaysız ve genel sağkalım eğrileri

TARTIŞMA

Tümör gelişimi ve metastatik yayılımında etkili olan temel mekanizmalardan biri olan angiogenez, angiogenizi uyaran ve önleyen faktörler arasındaki dengenin korunması yolu ile kontrol edilir. Tümör oluşumu ile birlikte bu faktörler arasındaki fizyolojik denge, angiogenizi uyaran faktör düzeylerinin artması ve angiogenizi önleyen faktör düzeylerinin azalması sonucunda, angiogenizi uyaran faktörler lehine bozulur (15,51,62). Tümör içi yeni damar gelişimi ile tümör dokusunun artan metabolik ihtiyaçları karşılandığı için tümör gelişimi ve yayılımı hızlanır (47). Angiogenik faktör düzeylerinde tümör gelişimi ile orantılı bir artma olduğu ve bu faktörlerin tümör dokusundaki ekspresyonlarının ya da serum/plazma düzeylerinin belirlenmesi ile tümör prognozu ile ilgili bilgi edinilebileceği araştırmalar sonucu kanıtlanmıştır (76,94). Ayrıca solid tümörlerde olduğu kadar hematolojik kanserlerde de angiogenizin prognozu belirleyen önemli faktörlerden biri olduğunu gösteren çalışmaların sayısı giderek artmaktadır (100,110,115,125).

NHL ve B hücreli kronik lenfositik lösemili erişkin hastalarda tümörün mikro damar yoğunluğu ile histolojik davranış biçimi ve klinik evresi arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (24,75,138). Yine lenfomalı hastalarda kemik iliğindeki angiogenez artışının kötü prognoz bulgusu olduğu bildirilmiştir (100,125,145). Güçlü angiogenik etkiye sahip olan VEGF ve bFGF'ün serum düzeylerindeki artışın tümör prognozu ile ilişkili olduğu Salven ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada gösterilmiştir (124). Ancak Hodgkin lenfoma tanısında ve prognozunun belirlenmesinde angiogenizin rolünü inceleyen çalışma sayısı çok azdır ve genellikle tümör dokusunda angiogenik faktörlerin ekspresyonları incelenmiştir (29,96). Ayrıca tümör angiogenezinin lenfomalardaki yerini inceleyen tüm bu çalışmalar erişkin hastalarda yapılmıştır. Proliferasyon hızları daha yüksek olan ve daha agresif bir seyir gösteren çocukluk çağı lenfomalarının angiogenik potansiyelleri erişkin lenfomalarından daha fazladır. Bu nedenle çocukluk çağı lenfomalarında angiogenizin incelenmesi ile tümör prognozu ile ilgili önemli bilgiler edinilebilir ve angiogenizi önleyici tedavinin pediatrik lenfomaların tedavisinde yeri olup olmadığı tespit edilebilir. Tümörlerin prognozu ile ilgili net ve güvenilir veriler elde edebilmek

için tümörün anjiogenik potansiyelini belirleyen anjiogenizi uyaran ve önleyen faktörlerin birlikte incelenmesi daha uygun bir yaklaşımdır.

Bu çalışmada, Hodgkin lenfomalı (143.2 ± 82.8 pg/ml) ve Non-Hodgkin lenfomalı (136.3 ± 67.6 pg/ml) çocuklarda serum VEGF düzeylerinin, kontrol grubundaki çocuklarda saptanan değerlerden belirgin ölçüde yüksek olduğu görüldü. Tedavi sonrası remisyona giren hastalarda ise serum VEGF düzeylerinin normale döndüğü gözlemlendi. Pavlakoviç ve ark. tarafından solid tümörlü çocuklarda yapılan benzer bir çalışmada da lenfomalı 17 hastanın tanı anında yüksek olan serum VEGF (552 ± 457 pg/ml) düzeylerinde tedavi sonrası anlamlı bir düşme olduğu bildirilmiştir (109). Hodgkin lenfomalı 37 ve Non-Hodgkin lenfomalı 65 erişkin hastada, tedavi öncesi ve tedavi sonrası anjiogenik faktör düzeyleri ile sağkalım hızları arasındaki ilişkiyi inceleyen bir başka araştırmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (56).

Lenfomalarda da diğer bazı kanser tiplerinde olduğu gibi tümör dokusu tarafından VEGF üretilmektedir (32). VEGF üretimini uyaran en önemli faktör büyüyen tümör dokusu içinde gelişen hipoksik ortam olmakla birlikte, lenfoma hücrelerinden salgılanan IL-6, EGF, TGF- β_1 , TNF gibi sitokinlerin de VEGF ekspresyonunu uyarabildiği bilinmektedir (21). Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfomalı hastalarda tümör dokusunda belirgin bir anjiogenik aktivitenin olduğu biopsiler ile gösterilmiştir (31). Doussis-Anagnostopoulou ve ark. Hodgkin lenfomalı 61 erişkin hastanın % 70.6'sında Reed-Stenberg ve Hodgkin hücrelerinde VEGF ekspresyonu olduğunu tespit etmişlerdir (29). NHL'lı hastalarda da tümör dokusunda anjiogenik faktörlerin ekspresyonu tespit edilmiştir (31). Bu çalışmada, lenfomalı çocuklarda tedavi öncesi yüksek olan serum VEGF düzeylerinin, tedavi sonrası düşerek normale dönmüş olması VEGF'in tümör kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Ancak lenfomalı hastalarda tedavi öncesi yüksek olan serum VEGF düzeylerinin kötü prognoz bulgusu olduğunu ve sağkalım hızlarını olumsuz yönde etkilediğini bildiren (10,56,103,122,124) çalışmaların aksine, bizim çalışmamızda tanı anında yüksek olan VEGF düzeyinin tümör prognozu ve hasta sağkalım hızları üzerinde herhangi bir etkisi tespit edilmedi. Bu durum incelenen hasta sayısının az olması, takip süresinin kısa oluşu, çocukluk çağı lenfomalarının tedaviye iyi cevap vermesi, serum VEGF düzeylerinin ölçüm metodlarının farklılığı ya da heterojen ve geniş bir dağılım

gösteren serum VEGF düzeylerinin değerlendirilmesinde farklı istatistiksel yöntemlerin kullanılmış olması ile açıklanabilir.

Besin alımı ve enerji tüketiminin kontrol edilmesinde rol alarak vücut ağırlığının korunmasını sağlayan, yağ dokusu kaynaklı bir hormon olan leptinin, in vitro ve in vivo ortamlarda yeni damar oluşumunu uyarıcı etkisi olduğu ilk kez Sierra-Honigman ve Boulemia tarafından bildirilmiştir (13,128). Bu bulgu leptinin, bir anjiogenik faktör olarak farklı kanser tiplerinde, tümör gelişimi ve yayılımındaki rolünü araştıran çalışmaların başlamasına yol açmıştır (86,132). Ancak literatürde çocukluk çağı tümörlerinde leptinin tümör anjiogenezindeki rolünü inceleyen bir araştırma bulunmamaktadır. Bertolini ve ark. 36 NHL'lı erişkin hastada VEGF, bFGF anjiogenin ve endostatin ile birlikte leptinin tümörün prognozu üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmalarında, tam remisyona giren hastalar ile nüks görülen hastaların serum leptin düzeyleri arasında farklılık tespit etmemişlerdir (10). Bizim çalışmamızda ise kontrol grubundaki sağlıklı çocukların hepsinde serum leptini (6.7 ± 1.2 ng/ml) tespit edilebilir düzeylerde bulundu. Hodgkin lenfomalı hastaların leptin (8.5 ± 3.2 pg/ml) düzeyleri ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık olmamakla birlikte olguların % 81'ni Evre III/IV hastalığı olan çocukların oluşturduğu NHL'lı hastaların serum leptin (2.5 ± 0.6 pg/ml) düzeyleri normalden düşüktü. Tedavi sonrası remisyona giren NHL'lı hastalarda ise bu değerlerin artarak normale (8.3 ± 1.9 pg/ml) döndüğü görüldü. Ayrıca tanı anındaki serum leptin düzeyi ile serum LDH düzeyi arasında anlamlı negatif bir korelasyon saptandı. Bu bulgular aktif tümör proliferasyonu ve tümörün yaygınlığı ile serum leptin düzeylerindeki azalma arasında bir ilişkili olabileceği olasılığını akla getirmektedir. Hematolojik kanserlerde leptinin bir anjiogenik faktör olarak rolünü inceleyen çalışmaların sayısı çok azdır (2,16,69,79). Mevcut çalışmalarda leptinin lösemik hücreler üzerindeki proliferasyonu uyarıcı ve apoptozusu önleyici etkileri nedeni ile genellikle lösemili hastalarda yapılmıştır. Akut lenfoblastik lösemili 38 çocukta tedavi öncesi bakılan plazma leptin (0.92 ± 0.79 ng/ml) düzeyleri kontrol grubundaki (3.01 ± 2.27 pg/ml) çocukların değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı ölçüde düşük bulunmuş, tam remisyona girenlerde ise artarak normale (2.6 ± 2.4 pg/ml) dönmüştür (142). Bu araştırmanın sonuçları bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumludur. Bir başka çalışmada ise lenfoproliferatif hastalığı olan 42 hastanın kemik iliği ve serum leptin düzeyleri incelenmiştir. Kemik

iliği leptin düzeylerinde belirgin bir azalma ve kemik iliği infiltrasyonu ile leptin düzeyleri arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir (55). Akciğer kanserli ve kolorektal kanserli hastalarda da leptin düzeylerinin normalden düşük olduğu bildirilmiştir (92,136). Hastaların % 67'sini erken evre (evre I/II) hastalığı olan çocukların oluşturduğu Hodgkin lenfomalı hasta grubumuzda serum leptin düzeylerinde anlamlı bir değişme gözlenmezken, tüm hasta grubunun % 81'ni ileri evre (evre III/IV) hastalığı olan çocukların oluşturduğu NHL hasta grubumuzda serum leptin düzeylerinin normalden düşük bulunmasının çeşitli nedenleri olabilir. Hematopoetik öncül hücrelerde, eritropoetik, myeloid ve lenfoblastoid kökenli hücrelerde leptin reseptörlerinin bulunduğu ve bu reseptörler aracılığı ile leptinin hematopoezin regülasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (20,102). Ancak lenfositlerde leptin reseptörlerinin ekspresyonunu inceleyen araştırma sayısı çok azdır. Bunlardan biri olan ve yukarıda sözedilen Wex ve ark.'larının akut lenfoblastik lösemili çocuklarda yaptıkları çalışmada, kemik iliği kaynaklı mononükleer hücrelerde RT-PCR ile leptin reseptör geninin ekspresyonu incelenmiştir. Tanı anında olguların % 33'ünde gen ekspresyonu mevcut iken, tam remisyona giren hastalarda bu oran % 71'e yükselmiştir. Sağlıklı çocuklarda ise gen ekspresyonunun % 100 olduğu bildirilmiştir (142). Bu ve benzeri araştırmaların sonuçları lösemik hücre klonunun değil, normal immün sistem hücrelerinin leptin reseptörü taşıdığını kanıtlamaktadır. Lenfomalarda, tümör hücrelerinde leptin reseptörünün ekspresyonu ile ilgili literatür bilgisi henüz mevcut olmamakla birlikte, yukarıda söz edilen araştırmaların sonuçları büyüyen tümör dokusu ile birlikte tümör hücrelerinde bulunan leptin reseptörlerine bağlanan serbest leptin miktarındaki artışın, serum leptin düzeyindeki azalmaya neden olabileceği hipotezini zayıflatmaktadır. Öte yandan tümör tarafından salgılanan IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IFN- γ gibi sitokinlerin, adipositler ve diğer stromal hücrelerde leptin ekspresyonunu baskılayarak , kanserli hastalarda kaşeksi gelişimine neden olduğu bilinmektedir (35,83,84). Bir diğer olasılık ise tümör dokusunun yaygınlığının, leptin salgılayan hücre popülasyonunda azalmaya neden olarak serum leptin konsantrasyonunun düşmesine yol açmış olmasıdır. Bizim çalışmamızda lenfomalı hastaların sadece tanı anındaki vücut kitle indeksleri (VKİ) hesaplanmış olduğundan, VKİ ile serum leptin düzeyi arasında saptanan pozitif korelasyona rağmen, tedavi sonrası leptin düzeylerinde görülen artışın VKİ'deki

değişimle ilişkili olup olmadığı ile ilgili yorum yapmamız mümkün değildir. Lenfomalı hastalarda tedavi protokolünde yeralan kortikosteroidler de serum leptin konsantrasyonunda tedavi sonrası görülen artışa neden olabilirler (104). Hastalarımızda serum leptin düzeylerinin kemoterapi sonrası normale dönmesi ve normal değerlerin üzerinde bir artış saptanmaması bu olasılığı zayıflatmaktadır. Tedavi öncesi NHL'lı hastalarımızda düşük olan serum leptin düzeylerinin, tedavi sonrası artarak normale dönmesinin en olası nedeni; tümör tarafından salgılanan sitokinlerin etkisi ile adipositler başta olmak üzere diğer stromal hücrelerdeki leptin ekspresyonunun baskılanması gibi gözükmemektedir. Serum leptin düzeyinin tümörün prognozu ve sağkalım hızları üzerinde bir etkisinin tespit edilmemiş olması da bu olasılığı güçlendirmektedir.

Sonuç olarak leptin ile tümör gelişimi ve tümör anjiogenezi arasındaki ilişki ancak bu çok fonksiyonlu hormonun metabolizma, nöroendokrin sistem ve immün sistem üzerindeki etkileri tam olarak aydınlatılıp, birlikte değerlendirildiğinde belirlenebilir. Ayrıca lenfomalarda tümör hücrelerinde leptin reseptör gen ekspresyonunun ve tümör tarafından salgılanan sitokinlerin leptin sekresyonu üzerindeki etkilerinin inceleneceği yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.

Tümörlerin anjiogenik potansiyeli, anjiogenizi uyaran ve önleyen faktörler arasındaki etkileşim sonucu belirlendiği için bu çalışmada pediatrik lenfomalı hastalarda, VEGF ve leptin ile birlikte en önemli anjiogenez önleyici faktörlerden biri olan endostatinin tedavi öncesi ve sonrası değerlerine de bakıldı. Diğer araştırmacıların sonuçları ile uyumlu olarak, bu çalışmada kontrol grubundaki sağlıklı çocukların serumunda tespit edilebilir düzeylerde endostatin (123.6 ± 13.5 pg/ml) saptandı (37,39). Bu durum sağlıklı bireylerde endostatinin fizyolojik anjiogenezin sınırlı düzeylerde tutulmasında önemli rolü olan bir faktör olması ile açıklanabilir. Ayrıca fizyolojik kollajen yıkımı sonucu açığa çıkan endostatinde serum endostatin düzeylerindeki artışa katkıda bulunabilir (47,48). Sağlıklı bireylerin serumunda da endostatin saptanabildiği ve çocuklarda normal serum endostatin düzeyleri henüz kesin olarak tanımlanmadığı için hasta grubumuzda tedavi öncesi ve sonrası endostatin değerlerini ölçerek hem endostatinin tümör kaynaklı olup olmadığını hemde tedavi ile birlikte bu faktörün düzeyinin değişip değişmediğini tespit etmeyi amaçladık.

Hem NHL hemde HL'lı hastalarda tanı anındaki serum endostatin düzeyleri normalden düşük (NHL; 38.2 ± 6.8 pg/ml, HL; 47 ± 10.3 pg/ml) bulundu ($p= 0.000$). HL'lı hastaların serum endostatin düzeylerinde tedavi sonrası belirgin bir değişme olmazken, NHL'lı hastaların serum endostatin düzeylerinde anlamlı bir artış tespit edildi. Hodgkin lenfomada endostatinin tümör anjiogenezindeki rolünü inceleyen bir araştırmaya literatürde rastlanılamadı. NHL'lı hastalarda ise bu konuda yapılmış çalışmaların sınırlı sayıda olduğu ve sonuçlarının birbirleri ile uyumlu olmadığı görüldü. Bu çalışmalardan birinde NHL'lı 36 erişkin hastanın serum endostatin düzeyleri incelenmiş ve remisyona giren hastalar ile progresif hastalığı olanların serum endostatin düzeyleri arasında fark olmadığı bildirilmiştir (10). Aynı çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi serum endostatin düzeylerinin sağkalım süresi üzerinde herhangi bir etkisi de tespit edilmemiştir. Kronik lenfositik lösemili, vulvar karsinomlu ve hepatoselüler karsinomlu hastalarda da serum endostatin düzeylerinin kontrol grubundan farklı olmadığı bildirilmiştir (57,64,143). NHL lenfomalı hastalarımızda tanı anında düşük olan serum endostatininin, remisyon ile birlikte artarak normale dönmesi endostatinin tümör kaynaklı olmadığını, aksine tümör tarafından salgılanan faktörler etkisi ile endostatin yapımının baskılandığını düşündürmektedir. Kanserli hastalarda serum endostatininin kaynağı henüz tam olarak açıklanamamaktadır. Bu sitokinin ilk olarak izole edildiği hemanjiendothelioma hücreleri dışında endostatin üreten bir tümör hücresi henüz tanımlanmamıştır (39,106).

İnsanlarda vasküler endotelial hücre bazal membranında ve özellikle karaciğerde yoğun olarak bulunan kollajen XVIII'in hücre dışı ortamda proteazlar tarafından yıkımı sonucu endostatin açığa çıkmaktadır. Gora-Tybor ve ark.'nın, 80 kronik lenfositik lösemili hastanın dahil edildiği çalışmasında ileri evre ya da progresif hastalığı olanlarda, serum endostatin düzeylerinin erken evre hastalığı olanlardan daha düşük olduğunu tespit edilmiştir (57). Yüksek serum VEGF, bFGF ve düşük endostatin düzeyleri saptanan hepatoselüler karsinomlu hastalarda, tümörün anjiogenik skorunun belirgin bir şekilde arttığı ve serum endostatin düzeyi yüksek olanların sağ kalımlarının daha iyi olduğu bildirilmiştir (26). Bu sonuçlar, bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumludur. Özellikle % 81'i yaygın hastalıkla gelen NHL'lı hastalarımızda tümör volümü ve yaygınlığı ile endostatin düzeylerinde görülen

baskılanma arasında bir ilişki olduğu düşünülebilir. Nitekim tedavi sonrasında tümörün ortadan kalkması ile birlikte serum anjiogenik faktör düzeyleri düşerken endostatin düzeyleri artmıştır. Erişkin NHL'lı hastalarda, yüksek endostatin düzeylerinin kötü prognoz bulgusu olduğunu ve ileri evre hastalığı olanlarda serum endostatin düzeylerinin, VEGF ile birlikte artış gösterdiğini bildiren Bono ve ark. çalışmasının aksine, pediatrik NHL'da tümörün anjiogenik potansiyelinin belirlenmesinde, anjiogenizi önleyen faktörlerin baskılanması önemli bir mekanizma gibi gözükmemektedir (11). Bu şekilde anjiostatik denge anjiogenik faktörler lehine bozulmakta ve tümör gelişimi hızlanmaktadır. Yukarıda bahsedilen çalışma farklı histolojik alt gruplar içeren, klinik seyir ve bulguları farklılık gösteren erişkin NHL'lı hastalarda yapılmıştır. Oysa çocukluk çağı NHL'ları daha agresif bir seyir gösterirler proliferasyon hızları ve dolayısı ile anjiogenik potansiyelleri daha yüksektir. Bu yüzden erişkinlerde yapılan çalışmaların sonuçlarının pediatrik hastalarda da geçerli olduğunu kabul etmek doğru bir yaklaşım değildir. Ayrıca söz konusu araştırmada serum endostatin düzeyinde tespit edilen artışın nedeni, tümörde kompensatör olarak arttığı ileri sürülen anjiogenizi önleyici aktivite değil, tümör volümünün ve invazif potansiyelinin artışı olabilir. Tümörün hem lokal hem de metastatik yayılımında tümör dokusu tarafından salgılanan proteinazların rol oynadığı bilinmektedir. Bu enzimler endotelial bazal membranın yapısında yer alan kollajen XVIII'in yıkımına da yol açarak endostatin açığa çıkmasına neden olurlar. Dolaşımda bulunan endostatin benzeri diğer kollajen XVIII yıkım ürünleri ya da endostatinin farklı glikolize formları da serum endostatin konsantrasyonunun artmasına neden olabilirler. Serum endostatin düzeylerinin tespitinde kullanılan mevcut yöntemler ile bu endostatin varyantlarının ayırt edilmesi mümkün değildir. Bu varyantların herbirinin biyolojik aktiviteleri de farklı olabilir (36,70,85). Bu durum NHL, meme kanseri akciğer kanseri mesane kanseri, beyin tümörü, yumuşak doku sarkomu ve renal hücreli karsinomu olan erişkin hastalarda, yüksek serum endostatin düzeyleri ile kötü prognoz arasında tespit edilen ilişkiyi açıklayabilir (11,37,39,60,101,133).

Hodgkin lenfomalı hastalarımızda, serum endostatin düzeylerinde tedavi sonrası görülen artışın anlamlı olmayışı, hasta sayımızın yetersiz olması ve Hodgkin lenfomada serum endostatin düzeylerinde baskılanmaya yol açan farklı mekanizmaların varlığı ile açıklanabilir. Neoplastik transformasyonda rol oynayan

onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonu ile anjiogenizi uyaran genlerin ekspresyonu artarken anjiogenizi önleyen genlerin ekspresyonlarının baskılandığı bilinmektedir (25,63,72,116). Nitekim nöroblastomda mycn onkogeninin ekspresyonunun artması ile endotelial hücre proliferasyonunu önleyen faktörlerin ekspresyonlarının azaldığı, bunun da tümör anjiogenezini başlattığı bildirilmiştir (15,51,99). Hodgkin lenfomada da benzer bir mekanizmanın olup olmadığı araştırılması gereken bir olasılıktır.

Bu çalışmada NHL ve HL'lı çocuklarda serum VEGF düzeyleri artarken endostatin düzeylerinin belirgin olarak baskılandığı tespit edildi. Bu durum pediatrik lenfomalarda, anjiogenizi önleyen faktörlerin baskılanmasının, anjiostatik dengenin anjiogenizi uyaran faktörler lehine bozulmasına neden olarak tümör anjiogenezini başlattığını göstermektedir. Ayrıca Non-Hodgkin lenfomalı hastalarda tanı anında düşük olan endostatin düzeylerinin, remisyon ile birlikte belirgin olarak artması pediatrik NHL'ın tedavisinde anjiogenizi önleyici tedavi şemalarının etkinliğinin araştırılması gerektiğini göstermektedir. Sonuç olarak, çocukluk çağı lenfomalarında anjiogenizi uyaran ve anjiogenizi önleyen faktörlerin serum düzeylerinin tedavi öncesinde ve takiplerde düzenli aralıklarla ölçümü ile tümörün anjiogenik potansiyeli ve yaygınlığı ile ilgili daha güvenilir bilgiler edinilebilir, uygulanan tedavilerin etkinliği değerlendirilebilir ve nüksler erken tespit edilebilir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada yeni tanı alan, 15 Hodgkin lenfomalı ve 21 Non-Hodgkin lenfomalı hastanın tedavi öncesi ve tedavi sonrası serum VEGF, leptin ve endostatin değerleri ölçüldü. Bu faktörler ile bilinen diğer prognostik faktörler arasındaki ilişki araştırıldı.

1. Kontrol grubunda yeralan çocukların tümünde serum VEGF düzeyleri tespit edilebilme düzeyinin altında ($< 4\text{pg/ml}$) bulundu.
2. Lenfomalı hastalarda ($N= 36$), serum VEGF düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek ($p= 0.033$), endostatin ($p= 0.000$) ve leptin ($p= 0.013$) düzeyleri ise düşüktü.
3. Tedavi sonrasında, lenfomalı tüm hastalarda serum VEGF düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşme, endostatin ve leptin düzeylerinde ise artış saptandı ($p< 0.05$).
4. Hodgkin lenfomalı hastalarda, serum VEGF düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek ($p= 0.05$), endostatin düzeyleri ise düşüktü ($p= 0.000$). Serum leptin düzeyleri arasında ise anlamlı bir farklılık yoktu ($p> 0.05$).
5. Non-Hodgkin lenfomalı hastalarda ise kontrol grubunun değerleri ile karşılaştırıldığında serum VEGF düzeylerinde belirgin bir artış, endostatin ve leptin düzeylerinde ise azalma tespit edildi ($p< 0.05$).
6. Hodgkin lenfomalı hastalarda tedavi sonrası serum anjiogenik faktör düzeylerinde anlamlı bir değişim saptanmadı ($p>0.05$).
7. Non-Hodgkin lenfomalı hastalarda, serum endostatin ve leptin düzeylerinde tedavi sonrasında anlamlı bir artış saptandı ($p< 0.05$). Serum VEGF düzeyindeki azalma, istatistiksel anlamlılık düzeyinde değildi.
8. Lenfomalı hastaların ($N= 36$) serum VEGF, endostatin ve leptin düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı.
9. Anjiogenik faktörler ile bilinen diğer prognostik faktörler (yaş, cins, tümör evresi, B semptomları, ektranodal hastalık, Hb, BK, ESR, CRP ve Ca-125) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi.

10. Lenfomalı hastalarda (N= 36), serum leptin düzeyi ile yaş ($r= 0,45$ $p= 0,006$) ve vücut kitle indeksi ($r= 0,38$ $p= 0,021$) arasında pozitif korelasyon, serum leptin ve LDH düzeyleri arasında negatif korelasyon($r=-0,37$ $p=0,027$) saptandı. Serum LDH düzeyi yüksek olan ($>500\text{IU/L}$) hastalarda serum leptin düzeylerinin, normal olanlardan belirgin olarak düşük olması dikkat çekici bulundu ($p=0.005$).
11. Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfomalı hastalarda serum VEGF, endostatin ve leptin düzeylerinin sağkalım hızları üzerinde anlamlı bir etkisi tespit edilmedi.

ÖZET

Yeni tanı alan ve yaşları 3-15 yaş (ort. 8.1 ± 3.3) arasında değişen Hodgkin (n= 15) ve Non-Hodgkin (n= 21) lenfomalı hastaların tedavi öncesi ve sonrası serum VEGF, endostatin ve leptin düzeyleri ölçüldü. Bu faktörlerin düzeylerinde tedavi ile birlikte bir değişim olup olmadığı ve prognostik değerleri incelendi.

Tümörün büyüme ve metastatik yayılım potansiyelinin tespitinde önemli rolü olan tümörün anjiogenik profili, anjiogenizi uyaran ve önleyen faktörler arasındaki etkileşim sonucu belirlendiği için serum VEGF ve leptin düzeyi ile birlikte serum endostatin düzeyi de ölçüldü. Non-Hodgkin ve Hodgkin lenfomalı çocuklarda serum VEGF düzeyinin arttığı, leptin ve endostatin düzeyinin ise belirgin olarak baskılandığı tespit edildi. Hem Hodgkin hem de Non-Hodgkin lenfomalı hastalarda serum endostatin düzeyinin normalden düşük olması nedeni ile pediatrik lenfomalarda tümör anjiogenezi başlatan temel mekanizmalardan birinin anjiogenizi önleyen faktörlerin baskılanması olduğu düşünüldü. Tedavi sonrası remisyona giren HL'lı hastalarda anjiogenik faktör düzeylerinde belirgin bir değişim olmaması olgu sayısının az olmasına ve ileri evre hastalığın az olmasına bağlanabilir. Non-Hodgkin lenfomalı hastalarda ise tedavi sonrası serum VEGF ve leptin düzeylerinin normale döndüğü gözlemlendi. Serum anjiogenik faktör düzeylerinin düzenli aralıklarla ölçümü ile NHL'lı hastalarda tedavi etkinliğinin değerlendirilebileceği sonucuna varıldı. Endostatin düzeylerindeki artış istatistiksel anlamlılık düzeyinde değildi. Serum VEGF endostatin ve leptin düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı. Ve bu faktörlerin sağkalım hızları üzerinde herhangi bir etkileri tespit edilmedi.

Sonuç olarak, çocukluk çağı lenfomalarında anjiogenik faktörlerin prognostik değerlerinin belirlenebilmesi için daha geniş çaplı, prospektif araştırmalara ihtiyaç vardır. Anjiogenizi önleyici tedavilerin pediatrik lenfoma tedavisinde yeri olup olmadığı da bu çalışmaların sonucunda belli olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in neuroendocrine response of fasting. *Nature* 382:250 1996.
2. Alexandrakis MG, Passam FH, Sfiridaki A, Pappa CA, Moschandrea JA, Kandidaki E, Tsirakis G, Kyriakou DS. Serum levels of leptin in multiple myeloma patients and its relation to angiogenic and inflammatory cytokines. *Int J Biol Markers* 19(1): 52-57, 2004.
3. Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA. Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 861-866 1997.
4. Asahara T, Bauters C, Cheng LP. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 92: 365-371,1995 (suppl II).
5. Baile CA, Della-Ferra MA, Martin RJ. Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. *Annu Rev Nutr* 20: 105, 2000.
6. Beckner M.E. Factors promoting tumor angiogenesis. *Cancer Invest* 17(8): 594-623, 1999.
7. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103: 159-165,1999.
8. Bennett B, Solar G, Yuan J. A role of leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol* 6: 1170-1180, 1996.
9. Bertolini F, Fusetti L, Mancuso P, Gobbi A, Corsini C, Ferucci PF, Martinelli G, Pruner G. Endostatin, an antiangiogenic drug, induces tumor stabilization after chemotherapy or anti-CD20 therapy in a NOD/SCID mouse model of human high-grade non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 96: 282-287, 2000.
10. Bertolini F, Paolucci M, Peccatori M, Cinieri S, Agazzi A, Ferruci PF, Cocorocchio E, Goldhirsch A, Martinelli G. Angiogenic growth factors and endostatin in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 106: 504-509, 1999.
11. Bono P, Teerenhovi L, Joensuu H. Elevated serum endostatin is associated with poor outcome in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 97: 2767-75, 2003.
12. Bont E, Fidler V, Meeuwssen T, Scherpen F, Hahlen K, Kamps WA. Vascular endothelial growth factor secretion is an independent prognostic factor for relapse-free survival in pediatric acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 8: 2856-2861, 2002.
13. Bouloumie A, Drexler HCA, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 83: 1059-1066, 1998.
14. Bredel M, Pollack IF, Campbell JW, Hamilton RL. Basic fibroblast growth factor expression as a predictor of prognosis in pediatric high grade gliomas. *Clin Cancer Res* 3: 2157-2164,1997.
15. Breit S, Ashman K, Wilting J, Rossler J, Hatzi E, Fotsis T, Schweigerer L. The N-myc oncogene in human neuroblastoma cells: down-regulation of an

- angiogenesis inhibitor identified as activin A. *Cancer Res* 60: 4596-4601 2001.
16. Bruserud O, Huang TS, Glenjen N, Gjerstein BT, Foss B. Leptin in human acute myelogenous leukemia: studies of in vivo levels and in vitro effects of native functional leukemia blasts. *Haematologica* 87: 584-95, 2002.
 17. Cairo MS, Raetz E, Lim MS, Davenport V, Perkins SL. Childhood and adolescent Non-Hodgkin lymphoma: New insights in biology and critical challenges for the future. *Pediatr Blood Cancer* 45(6): 753-69, 2005.
 18. Cao R, Brakenhielm E, Wahlested C, Thyberg j, Cao Y. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *PNAS* 98(11): 6390-6395, 2001.
 19. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single allele. *Nature* 380: 435-439, 1996.
 20. Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gubur J, Mikhail A, Platika D, Snogross HR. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med* 2: 585-589, 1996.
 21. Cohen T, Nahari D, Cerem LW. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271(2): 736-41, 1996.
 22. Coskun U, Gunel N, Toruner FB, Sancak B, Onuk E, Bayram O, Cengiz O, Yilmaz E, Elbeg S, Ozkan S. Serum leptin, prolactin and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with breast cancer. *Neoplasma* 50(1): 41-46, 2003.
 23. Conway G, Jacobs H. Leptin: a hormone of reproduction. *Human Reprod* 12: 633-635, 1997.
 24. Crivellato E, Nico B, Vacca A. B-cell Non-Hodgkin's lymphoma express heterogenous patterns of neovascularization. *Haematologica* 88: 671-678 2003.
 25. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of trombospodin-1. *Science* 265: 1582-1584 1994.
 26. Dhar DK, Ono T, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi E, Rahman MA, Kohno H, Nagasue N. Serum endostatin predicts tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 95: 2188-95, 2002.
 27. Donaldson S. Pediatric Hodgkin's disease-up, up and beyond. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54(1): 1-8, 2002.
 28. Donaldson S. A discourse: The 2002 Wataru W. Sutow lecture Hodgkin's disease in children-perspectives and progress. *Med Ped Oncol* 40: 73-81 2003.
 29. Doussis-Anagnostopoulou AI, Talks KL, Turley H, Debnam P, Tan DC, Mariatos J, Gorgoulis V, Kittas C, Gatter KC. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed by neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *J Pathol* 197: 677-683, 2002.
 30. Drix LY, Vermeulen PB, Pawinski A, Prove A, Benoy I, De Pooter C, Martin M, Van Oosterom AT. Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera of cancer patients. *Br J Cancer* 76: 238-243, 1997.

31. Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR. Distribution of vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor) in tumors: Concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 174: 1275, 1991.
32. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvasculature hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Path* 146: 1029-1039, 1995.
33. Eggert A, Ikegaki N, Kwiatkowski J, Zhao H, Brodeur GM, Himelstein BP. High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 6: 1900-1908, 2000.
34. El-Houseini M, Abdel-Azim S, El-Desouky GI, Abdel-Hady S, El-Hamad MF, Kamel AM. Clinical significance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in sera of patients with pediatric malignancies. *J Egypt Natl Canc Inst* 16(1): 57-61, 2001.
35. Fawcett RL, Waechter AS, Williams LB. Tumor necrosis factor-alpha inhibits leptin production in subcutaneous and omental adipocytes from morbidly obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 530-535, 2000.
36. Feldman AL, Alexander HR, Yang JC, Linehan WM, Eyler RA, Miller MS, Steinberg SM, Libutti SK. Prospective analysis of circulating endostatin levels in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 95: 1637-43, 2002.
37. Feldman AL, Pak H, Yang JC, Alexander HR, Libutti SK. Serum endostatin levels are elevated in patients with soft tissue sarcoma. *Cancer* 91: 1525-9, 2001.
38. Feldman AL, Alexander R, Barlett DL, Kranda KC, Miller MS, Costouros NG, Choyke PL, Libutti SK. A prospective analysis of plasma endostatin levels in colorectal cancer patients with liver metastasis. *Ann Surg Oncol* 8(9): 741-745, 2001.
39. Feldman AL, Tamarkin L, Paciotti GF, Simpson BW, Linehan WM, Yang JC, Fogler WE, Turner EM, Alexander HR, Libutti SK. Serum endostatin levels are elevated and correlated with serum vascular endothelial growth factor levels in patients with stage IV clear cell renal cancer. *Clin Cancer Res* 6: 4628-4634, 2000.
40. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Nat Med* 9: 669-676, 2003.
41. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 77: 527-543, 1999.
42. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 55: 15-36, 2000.
43. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 32A: 2413-2422, 1996.
44. Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov N, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Geurts-Moespot A, Van Der Kwast th, Sweep CGJ, Klijn JGM. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res* 61(14): 5407-5414, 2001.
45. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 333(26): 1757-1763, 1995.

46. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82(1): 4-6, 1990.
47. Folkman J. Angiogenesis in cancer,vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1(1): 27-31, 1995.
48. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339: 58-61, 1989.
49. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186, 1971.
50. Folkman J: Tumor angiogenesis: The molecular basis of cancer. Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA (eds) W.B. Saunders, Philadelphia 1995, S. 206-32.
51. Fotsis T, Breit S, Lutz W, Rossler J, Hatzl E, Schwab M, Schweigerer L. Down-regulation of endothelial cell growth inhibitors by enhanced MYCN oncogene expression in human neuroblastoma cells. *Eur J Biochem* 263: 757-764, 1999.
52. Fox SB, Moghaddam A, Westwood M. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in normal tissues. *J Pathol* 176: 183-190,1995.
53. Friedman JM. The function of leptin in nutrition, weight and physiology. *Nutr Rev* 60 (10 Pt 2): S1-S14, 2002.
54. Friesel RE, Maciag T. Molecular mechanisms of angiogenesis: Fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB J* 9: 9191-925,1995.
55. Gaja A, Chury Z, Pecan L, Frakova H, Jandakova E, Hejlova N. Bone marrow and peripheral blood leptin levels in lymphoproliferative diseases- relation to the bone marrow fat and infiltration. *Neoplasma* 47: 37-12, 2000.
56. Giles FJ, Vose JM, Do KA, Johnson MM, Manshouri T, Bociek G, Bierman PJ, O'Brien SM, Kantarjian HM, Armitage JO, Albitar M. Clinical relevance of circulating angiogenic factors in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Res* 28: 595-604, 2004.
57. Gora-Tybor J, Jery Z, Robak B. Circulating proangiogenic cytokines and angiogenesis inhibitor endostatin in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mediators Inflamm* 12(3): 167-171, 2003.
58. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schwigerer L. Fibroblast growth factor: structure and biological properties. *J Cell Physiol* (Suppl) 5: 15-26,1987.
59. Griffiths L, Stratford IJ. Platelet-derived endothelial cell growth factor and response to therapy. *Br J Cancer* 76: 689-693,1997.
60. Guan KP, Ye HY, Yan Z, Wang Y, Hou SK. Serum levels of endostatin and matrix metalloproteinase-9 associated with high stage and grade primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 61: 719-723, 2003.
61. Hajitou A, Grignet C, Devy L. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *FASEB J* 16: 1802-1804, 2002.
62. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364, 1996.
63. Harris A.L., Talks K.L. Current status of antiangiogenic factors. *British Journal of Haematology* 109: 477-489, 2000.
64. Hefler R, Tempfer C, Kainz C, Obermair A. Serum concentration of endostatin in patients with vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 74: 151-152, 1999.

65. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23: 1011-102, 2005.
66. Houck K. The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5: 1806-1814, 1991.
67. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1: 149-153, 1995.
68. Hori A, Sasada R, Matsutani E, et al. Suppression of solid tumor growth by immuno-neutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res* 51: 6180-6184, 1991.
69. Iversen P, Drevon C.A, Reseland J.E. Prevention of leptin binding to its receptor suppresses rat leukemic cell growth by inhibiting angiogenesis. *Blood* 100(12): 4123-4128, 2002.
70. John H, Preissner KT, Forssman WG, Standker L. Novel glycosylated forms of human plasma endostatin and circulating endostatin related-fragments of collagen XVIII. *Biochemistry* 38: 10217-24, 1999.
71. Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F. Neovascularization is associated with a switch to the export of Bfgf in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 66: 1095-1104, 1991.
72. Kerbel R.S. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21(3): 505-515, 2000.
73. Kim YM, Hwang S, Pyun BJ. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem* 277: 27872-27879, 2002.
74. Kimura H, Weisz A, Ogura T, Hitomi Y, Kurashimo Y, Hashimoto K, D'Acquisto F, Makuuchi M, Esumi H. Identification of hypoxia-inducible factor1(HIF-1) ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem* 276: 2292-2298, 2000.
75. Kini AR, Kay NE, Peterson LC. Increased bone marrow angiogenesis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 14: 1414-1418, 2000.
76. Kodama J, Seki N, Tokumo K, Hongo A, Miyagi Y, Yoshinouchi M. Vascular endothelial growth factor is implicated in early invasion in cervical cancer. *Eur J Cancer* 35: 485-9, 1999.
77. Kolaczynski JW, Ohannesian HP, Considine RV, Marco CC, Caro JF. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4162, 1996.
78. Kondo S, Asano M, Matsuo K. Vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients. *Biochim Biophys Acta* 1221: 211-214, 1994.
79. Konopleva M, Mikhail A, Estrov Z, Zhao S, Harris D, Sanchez-Williams G, Kornblau SM, Dong J, Kliche KO, Jiang S. Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: proliferative and anti-apoptotic activities. *Blood* 93: 1668-76, 1999.
80. Koomagi R, Zintl F, Sauerbrey A, Volm M. Vascular endothelial growth factor in newly diagnosed and recurrent childhood acute lymphoblastic leukemia as

- measured by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 7: 3381-3384, 2001.
81. Korkolopoulou P, Thymara I, Kavantzias N, Vassilakopoulos TP, Angelapoulou MK, Kokoris SI, Dimitriadou EM, Siakantaris MP, Anargyrou K, Panayiotidis P, Tsenga A, Androulaki A. Angiogenesis in Hodgkin's lymphoma: a morphometric approach in 286 patients with prognostic implications. *Leukemia* 19: 894-900, 2005.
 82. Kuroi K, Toi M. Circulating angiogenesis regulators in cancer patients. *Int J Biol Markers* 16: 5-26, 2001.
 83. Kurzrock R. The role of cytokines in cancer-related fatigue. *Cancer* 92(Suppl): 1684-1688, 2001.
 84. Laharrague P, Truel N, Fontanilles AM, Corberand JX, Penicaud L, Casteill E. Regulation by cytokines of leptin expression in human bone marrow adipocytes. *Horm Metab Res* 32: 381-385, 2000.
 85. Lai R, Estey E, Shen Y, Despa S, Kantarjian H, Beran M, Maushouri T, Quackenbush RC, Keating M, Albitar M. Clinical significance of plasma endostatin in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome. *Cancer* 94: 14-7, 2002.
 86. Lebrecht A, Ludwig E, Huber A, Klein M, Schneeberger C, Tempfer C, Koehl H, Hefler L. Serum vascular endothelial growth factor and serum leptin in patients with cervical cancer. *Gynecol Oncol* 85: 32-35, 2002.
 87. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309, 1989.
 88. Li VW, Folkerth RD, Watanabe H, Yu C, Rupnick M, Barnes P, Scott RM, Black PM, Sallan SE, Folkman J. Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumors. *Lancet* 344: 82-86 1994.
 89. Lin SY, Wang YY, Sheu HH, . Preoperative plasma concentration of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9 are associated with stage progression in papillary thyroid cancer. *Clin Endocrinol* 58: 513-518 2003.
 90. Liotta, Stracke ML. Tumor invasion and metastases: Biochemical mechanisms. *Cancer Treat Res* 40: 223-238, 1998.
 91. Loffreda S, Yang S, Lin H. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 12:57-65, 1998.
 92. Lopez-Soriano J, Carbo N, Tessitore L, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Leptin and tumor growth in rats. *Int J Cancer*, 81: 726-729, 1999.
 93. Lu H, Li C. Leptin: a multifunctional hormone. *Cell research*, 10: 81-92, 2000.
 94. Maeda K, Kang SM, Onoda N, Ogawa M, Kato Y, Sawada T. Vascular endothelial growth factor expression in preoperative biopsy specimens correlates with disease recurrence in patients with early gastric carcinoma. *Cancer* 86: 566-71, 1999.
 95. Magrath IT. Malignant Non-Hodgkin's lymphomas in children. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, 4th edition. Pizzo PA, Poplack DG (eds). Lippincott Williams & Wilkins, 2002, S. 661-705.
 96. Mainou-Fowler T, Angus B, Miller S, Proctor SJ, Taylor PRA, Wood KM. Micro-vessel density and the expression of vascular endothelial growth factor

- (VEGF) and platelet-derived endothelial cell growth factor (PdEGF) in classical Hodgkin's lymphoma (HL). *Leuk Lymphoma* 47(2): 223-230, 2006.
97. Mantovani G, Maccio A, Mura L, Massa E, Mudu MS, Mulas C, Lusso MR, Madeddu C, Dessi A. Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with advanced-stage cancer at different sites. *J Mol Med* 78: 554-561, 2000.
 98. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *The Oncologist* 5(suppl 1): 3-10, 2000.
 99. Meitar D, Crawford SE, Rademaker AW, Cohn SL. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease. N-myc amplification and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 14: 405-414, 1996.
 100. Moehler TM, Neben K, Ho AD, Goldschmidt H. Angiogenesis in hematological malignancies. *Ann Hematol* 80: 695-705, 2001.
 101. Morimoto T, Aoyagi M, Tamaki M, Yoshino Y, Hori H, Duan L, Yano T, Shibata M, Ohno K, Hirakawa K, Yamaguchi N. Increased levels of tissue endostatin in human malignant glioma. *Clin Cancer Res* 8: 2933-2938, 2002.
 102. Nakao T, Hino M, Yamane T, Nishizawa Y, Morii H, Tatsumi N. Expression of leptin receptor in human leukemic blast cells. *Br J Haematol* 102: 740-745, 1998.
 103. Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, Yoshino T, Tamaru J, Nakamura S, Higashihara M, Hirano M. Simultaneous elevation of the serum concentration of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 as independent predictors of prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 68: 91-100, 2002.
 104. Nishiyama M, Makino S, Suemaru S. Glucocorticoid effects on diurnal rhythm of circulating leptin levels. *Horm Res* 54: 69-73, 2000.
 105. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing YI, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao YH, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79: 315-328, 1994.
 106. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88: 277-285, 1997.
 107. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol* 282: 947-970, 2002.
 108. Park HY, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE, Jang Y, Cho SY, Kim HS. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med* 33(2): 95-102, 2001.
 109. Pavlokovic H, Von Schutz V, Rossler J, Koscielniak E, Havers W, Schweigerer L. Quantification of angiogenesis stimulators in children with solid malignancies. *Int J Cancer* 92: 756-760, 2001.
 110. Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 150: 815-821, 1997.
 111. Plate KH, Breier G, Risau W. Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol* 4: 207-18, 1994.

112. Poon RTP, Ho JWY, Tong CSW, Lau C, Ng IOL, Fan ST. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 91: 1354-1360, 2004.
113. Poon R, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 19(14): 1202-1225, 2001.
114. Prehn RT. The inhibition of tumor growth by tumor mass. *Cancer Res* 51:2-4 1991
115. Pruneri G, Bertolini F, Soligo D. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer* 81: 1398-1401, 1999.
116. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS. Mutant ras oncogenes upregulates VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition tumor angiogenesis. *Cancer Res* 55: 4575-4580 1995.
117. Ramanujan S, Koenig GC, Padera TP, Stoll BR, Jain RK. Local imbalance of proangiogenic antiangiogenic factors: a potential mechanism of focal necrosis and dormancy in tumors. *Cancer Res* 60: 1442-1448, 2000.
118. Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA. Angiogenesis in female reproductive system. *FASEB J* 6: 886-892, 1992.
119. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Fanelli M, Roncali L, Dammacco F. Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. An immunohistochemical and ultrastructural study. *Eur J Haematol* 56: 45-53 1996.
120. Saarela J, Rehn M, Oikarinen A, Autio-Harmainen H, Pihlajaniemi T. The short and long forms of Type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans. *Am J Pathol* 153: 611-626, 1998.
121. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox induced changes. *J Biol Chem* 272: 22642-22647, 1997.
122. Salven P, Teerenhovi L, Joensuu H. A high pretreatment serum vascular endothelial growth factor concentration is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90(8): 3167-3172, 1997.
123. Salven P, Maenpaa H, Orpana A, Alitalo K, Joensuu H. Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin Cancer Res* 3: 647-651, 1997.
124. Salven P, Orpana A, Teerenhovi L, Joensuu H. Simultaneous elevation in the serum concentration of the angiogenic growth factors VEGF and bFGF is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin's lymphoma: a single-institution study of 200 patients. *Blood* 96(12): 3712-3718, 2000.
125. Salven P. Angiogenesis in lymphoproliferative disorders. *Acta Haematol* 106: 184-9, 2001.
126. Schwigerer L, Neufeld G, Friedman J. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 325: 257-259, 1987.

127. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985 1983.
128. Sierra-Honigsmann M.R, Nath A.K, Murakami C, Garcia-Cardena G Papapetropoulos A, Sessa WS, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB Polverini PJ, Flores-Riveros JR. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281: 1683-1686, 1998.
129. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML. Nocturnal rise of leptin in lean, obese and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* 97: 1344 1996.
130. Smith RS, Chen Q, Hudson M, Link MP, Kun L, Weinstein H, Billett A, Marcus KJ, Tarbell NJ, Donaldson SS. Prognostic factors for children with Hodgkin's disease treated with combined-modality therapy. *J Clin Oncol* 21(10): 2026-2033, 2003.
131. Somasundar P., McFadden D., Hileman SM, Vona-Davis L. Leptin is a growth factor in cancer. *J Surg Res* 116: 337-349, 2004.
132. Stattin P, Soderberg S, Hallmans G, Bylund A, Kaaks R, Stenman UH, Bergh A, Olsson T. Leptin is associated with increased prostate cancer risk: a nested case-referent study. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1341-1345, 2001.
133. Suzuki M, Iizasa T, Ko E, Baba M, Saitoh Y, Shibuya K. Serum endostatin correlates with progression and prognosis of non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 35: 29-34, 2001.
134. Tabone MD, Landman-Parker J, Arcil B, Coudert MC, Gerota I, Benbunan M, Leverger G, Dosquet C. Are basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor prognostic indicators in pediatric patients with malignant solid tumors? *Clin Cancer Res* 7: 538-543, 2001.
135. Takahashi Y, Bucana CD, Liu W. Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: Role of infiltrating cells. *J Natl Cancer Inst* 88: 1146-1151, 1996.
136. Tessitore L, Vizio B, Jenkins O, De Stefano I, Ritossa C, Argiles JM Benedetto C, Mussa A. Leptin expression in colorectal and breast cancer patients. *Int J Mol Med* 5: 421-426, 2000.
137. Thomas T, Burguera B, Melton L, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL Khosla S. Relationship of serum leptin levels with body composition and sex steroid and insulin levels in men and women. *Metabolism* 49(10): 1278-84 2000.
138. Vacca A, Ribatti D, Ruco L, Giacchetta F, Nico B, Quadamatteo F, Ria R Iurlaro M, Dammacco F. Angiogenesis extent and macrophage density increase simultaneously with pathological progression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer* 79 (5/6): 965-970, 1999.
139. Vacca A, Ribatti D, Presta M. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of multiple myeloma. *Blood* 93: 3064-3073, 1999.
140. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269: 26988-26995, 1994.

- 141.** Werther K, Christensen IJ, Brunner N, Nielsen HJ. Soluble vascular endothelial growth factor levels in patients with primary colorectal carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 26: 657-662, 2000.
- 142.** Wex H, Ponelis E, Wex T, Dressendorfer R, Mittler U, Vorwerk P. Plasma leptin receptor expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol* 76: 446-452, 2002.
- 143.** Yagamata M, Shiratori Y, Dan Y, Shiina S, Takayama T, Maruuchi M. Serum endostatin levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol* 11: 761-762, 2000.
- 144.** Yamamoto Y, Toi M, Kondo S. Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 2: 821-826, 1996.
- 145.** Yang R, Han ZC. Angiogenesis in hematological malignancies and its clinical implications. *Int J Hematol* 75: 246-56, 2002.