



T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

ENDOMETRİOİD TİP ENDOMETRİUM ADENOKARSİNOMLARINDA HIF-1 α , VEGF₁₆₅, GLUT-1 EKSPRESYONU VE TÜMÖR İÇİ NEOVASKULARİZASYON: KLİNİKOPATOLOJİK FAKTÖRLER VE PROGNOZ İLE İLİŞKİSİ

Uzmanlık Tezi

Dr. İrem Hicran ÖZBUDAK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. F. Şeyda KARAVELİ

*'Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından
2004.04.0103.014 Proje No ile desteklenmiştir'*

'Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir'

Antalya,2005

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve becerilerinden faydalandığım başta Anabilim Dalımız Başkanı Prof. Dr. M. Akif ÇİFTÇİOĞLU ve tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. F. Şeyda KARAVELİ olmak üzere tüm hocalarıma, tezimin istatistik çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Uzm. Dr. Mehtap TÜRKEY'a, laboratuvar çalışmalarından dolayı Biol. Nuran KELEŞ'e, fotoğrafların basıma hazırlanması aşamasında yardımlarından dolayı Necati SAĞIROĞLU'na, birlikte çalışmaktan zevk aldığım asistan arkadaşlarıma, aileme ve sabrı, desteği nedeniyle eşim Dr. Ömer ÖZBUDAK'a teşekkür ederim.

Dr. İrem Hicran ÖZBUDAK
Antalya, 2005

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iv
1.GİRİŞ	1-5
2.GENEL BİLGİLER	6-24
3.GEREÇ VE YÖNTEM	25-31
4.BULGULAR	32-43
5.TARTIŞMA	44-54
6.SONUÇLAR	55-58
ÖZET	59-62
KAYNAKLAR	63-73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1
GLUT-1	Glukoz Taşıyıcısı-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
FGFs	Fibroblast Growth Factors
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
LPA	Lysophosphatic acid
bHLH	Basic-helix-loop-helix
ARNT	Aryl hydrocarbon nuclear translocator
IGF-2	İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-2
NOS-2	Nitrik Oksit Sentaz-2
VPF	Vasküler Permabilite Faktörü
PlGF	Placenta Growth Factor
VEGFR-1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1
flt-1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor -1
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor -2
KDR/flk-1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor -2
GOG	Gynecologic Oncology Group
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ISGYP	International Society of Gynecological Pathologists
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
HE	Hematoksilen-Eozin
DAB	Diaminobenzidin
MVD	Mikrodamar yoğunluğu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
4.1	Olguların Evrelere Göre Dağılımı	33
4.2	Olguların Grade'lere Göre Dağılımı	34
4.3	Olguların Grade'lerine Göre İzlem Süreleri	34
4.4	Olguların Evrelerine Göre İzlem Süreleri	35
4.5	HIF-1 α ekspresyonu a) x200 b) x400 büyütme	37
4.6	VEGF ekspresyonu x400 büyütme (a,b)	39
4.7	GLUT-1 ekspresyonu a) x100 b) x200 büyütme	41
4.8	Mikrodamar yoğunluğu (CD 34) , x200 büyütme (a,b)	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge		Sayfa
2.1	Endometrial karsinom – 5 yıllık yaşam oranları (Wolfson et al. ve Maneschi et al. çalışma sonuçlarına göre)	8
3.1	Kullanılan antikörlerin özellikleri	26
3.2	HIF-1 α için kullanılan skarlama sistemi	29
3.3	GLUT-1 için kullanılan skarlama sistemi	30
4.1	Olguların Evrelerine Göre HIF-1'in Dağılımı	37
4.2	Olguların Evrelerine Göre VEGF Dağılımı	37
4.3	Olguların Evrelerine Göre GLUT-1 Ekspresyonu Dağılımı	38
4.4	GLUT-1, VEGF, HIF 1 α ve MDY Arasındaki Korelasyon Oranı	39

1.GİRİŞ

Kadın genital sistemin tüm kanserleri içinde " Endometrium Adenokarsinomları " % 45 oranında izlenmektedir. Lokalizasyon ve cinsiyete göre tahmin edilen kanser insidansı grafiğinde % 11 'lik dilimi oluşturmaktadır (1).

Endometrium Adenokarsinomları ;

-Endometrioid (usual) adenokarsinom (glandular ve villoglandular paternleri de içerir),

-Sekretuar adenokarsinom,

-Siliyalı karsinom,

-Skvamöz diferansiyasyon gösteren adenokarsinom (Adenoakantom ve Adenoskuamöz karsinomu da kapsar),

-Özel varyant karsinomlar

*Uterin papiller seröz ,high-grade papiller;

*Berrak hücreli;

*Müsinöz;

*Pür skuamöz hücreli;

*Mikst

*Andiferansiye olmak üzere sınıflanır.

Tüm Endometrium Adenokarsinom olgularının %80'i Endometrioid tiptedir (2).

Yapılan geniş serili araştırmalarda evrelere göre hastaların 5 yıllık ortalama yaşam süreleri ; Evre I'de % 82 ,Evre II'de %65 , Evre III'de % 44 , Evre IV'de %15 olarak bulunmuştur (3).

Endometrium Adenokarsinomlu olguların prognozu histolojik tip, grade, myometrial invazyon derinliği, servikal tutulum, vasküler invazyon, atipik endometrial hiperplazi, hormon reseptör durumları,

DNA ploidi, S-faz fraksiyonu, adneksiyal tutulum, intraperitoneal metastaz, pozitif peritoneal sitoloji, pelvik ve paraaortik lenf düğümü metastazı ile ilişkilidir (4). Bunlar dışında belirlenecek yeni histopatolojik prognostik parametreler tedavinin planlanması aşamasında klinisyene ışık tutacaktır.

Anjiogenez ve hipoksiye hücrel adaptasyon mekanizmaları, tümöral bir lezyonun gelişiminde rol oynayan en önemli faktörlerdendir (5,6,7,8). Neovaskülarizasyonun olmadığı tümöral dokuda , oksijen ve glikoz difüzyonun buna bağlı olarak sınırlandırılması, tümörün birkaç mm'den daha fazla büyümesine olanak vermez(6,9). Ayrıca anjiogenezin, metastaz gelişiminde ve prekürsör lezyonların invaziv tümörlere dönüşümünde rol aldığı da bilinmektedir (10,11,12).

Tümör dokusunda ihtiyacı karşılayacak ölçüde yeni damarlanmanın olmaması , moleküler oksijene ve diğer metabolik değişikliklere erişimde yetersizlik ile sonuçlanmaktadır (13). Bu durum hem kemoterapiye, hem de radyoterapiye direnç gelişimine neden olarak tedavinin başarısızlığı ile sonuçlanmaktadır (14,15,16). Tedavide kullanılan bioredüktif ilaçların aktivasyonu içinde belli miktarda hücrel oksijen basıncına ihtiyaç vardır(17).

Değişik tümör tipleri arasında ve bir tümöral lezyonun kendi içinde inter tümöral ve intra tümöral alanları arasında, oksijenizasyon seviyesi bakımından fark vardır (18). Tüm bu bulgular göz önüne alındığında tümör hipoksisini ve dolayısıyla kanlanma miktarını ölçen doğru, ucuz ve minimal invaziv bir yöntemin geliştirilmesi önemli bir adım olacaktır. Böylece tamamen hastada mevcut olan tümöre spesifik tedavi protokolünün oluşturulmasına ve daha etkili sonuçlar alınmasına katkıda bulunacaktır (10).

İnterensek bir hipoksi belirleyicisi olan HIF-1, hücrel oksijen hemostazında ve adaptasyonunda anahtar faktörlerdendir (19,20,21). HIF-1 ; HIF-1 α ve HIF-1 β olmak üzere 2 subünitten oluşan heterodimerik transkripsiyon faktörüdür (19,22). HIF-1 α oksijence regüle edilen özel subünitidir ve HIF-1'in aktivitesini belirlemektedir. HIF-1 β ise yapısal olarak eksprese edilen ve diğer hücrel süreçlerde rol alan subünitidir(8,21,23,24).

HIF-1 tarafından aktive edilen çok sayıda transkripsiyon gen ürünü bulunmaktadır. Bunlar arasında Eritropoetin, Transferrin, Endotelin-1, İndüklenebilen nitrik oksit sentetaz, Heme oksijenaz 1, VEGF, İnsulin benzeri büyüme faktörü-2, İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayan proteinler 2 ve 3, 13 farklı glukoz taşıyıcısı ve glikolitik enzimler sayılabilir (11,20,25,26). Bu gen ürünleri direkt olarak tümör gelişiminde rol oynamaktadır (8).

HIF-1 α 'nın overekspresyonu hem primer hem metastatik tümörlerde izlenmektedir (11). Birner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, serviks karsinomlarında HIF-1 α 'nın bağımsız bir prognostik olduğu bulunmuştur (12).

Bunlar içinde VEGF bilinen en potent anjiogenetik faktörlerdendir. Hipoksi sonucu VEGF'in transkripsiyonu indüklenir ve mRNA'sı stabilize edilir, böylece hücre içinde ki ekspresyonu artar(13,27). Bu yolla kapiller proliferasyon uyarılır ve dokunun kanlanması, oksijen ihtiyacı ve diğer metabolik gereksinimleri karşılanır (28).

VEGF'in anjiogeneze ve tümör gelişimindeki kritik rolü mesane, meme, gastrik ve diğer malignansilerdeki prognostik anlamı ile ispatlanmıştır (13). Yüzeyel mesane kanserinde artmış VEGF mRNA seviyesi progresyonun erken dönemini ve relapssız dönemin

kısalacağını ifade etmektedir (29). Ayrıca VEGF ekspresyonunun meme tümörlerinde de hasta surveyleri ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur (30). Genel olarak onkogeneizde ve spesifik olarak Endometrium Adenokarsinomlarında önemli rol oynadığı da gösterilmiştir (31).

Diğer bir transkripsiyon gen ürünü , glukoz tranporter ailesinden GLUT-1 'dir. Membrana bağlı glukoz transportunu kolaylaştıran protein ailesi 8 farklı yapıda glukoz tranporter'ını kapsamaktadır. Bu grup içinde GLUT-1 yapısal ve ultrastrüktürel olarak geniş kapsamlı çalışılmış ve en iyi tanımlanmış olanıdır (10). GLUT-1 ekspresyonu HIF-1 stimülasyonu yanısıra oksidatif fosforilasyonun azalması ile de kontrol edilmektedir (32).

GLUT-1 over ekspresyonunun Kolorektal kanserlerde ve Küçük hücreli akciğer karsinomlarında kötü prognoz göstergesi olduğu kanıtlanmıştır (10). Endometrium Adenokarsinomlarında prognoza etkisi çalışmaya açık bir konudur.

Endometrium Adenokarsinomları'nda yüksek mikrodamar yoğunluğunun bağımsız ve kötü bir prognostik faktör olduğu bulunmuştur (33). Bu nedenle yeni oluşan mikrodamar yoğunluğunun belirlenmesi de Endometrium Adenokarsinomlarında prognozün göstergesi olarak klinisyene yardımcı olacaktır.

Bu çalışma, endometrium adenokarsinomlarının endometrioid alt tipinde yapılacaktır. Geniş bir seride, CD 34 ile immünohistokimyasal olarak boyanan vasküler alanlar, küçük damar sayımı yöntemi ile değerlendirilecek ve mikrodamar yoğunluğu belirlenecektir. Endometrioid adenokarsinomlarda HIF-1 α , HIF-1 α ile ilişkili GLUT-1 ve anjiogenik faktör VEGF₁₆₅ ekspresyonu değerlendirilecektir.

Çalışmadaki amacımız, bu kanser tipinde HIF-1 α , GLUT-1 ve VEGF₁₆₅ ekspresyonunun birbirleriyle ve anjiogenezele ilişkisini açıklamak, elde edilen bulguların prognoza etkilerini araştırmak ve gelecekte hastaya spesifik tedavi protokollerinin oluşumuna katkıda bulunmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

Endometrial karsinomlar kadınlarda en sık görülen malignansiler içinde 5. sırada yer almaktadır ve %11'lik bir orana sahiptir. Kadın genital sistemi içinde incelendiğinde en sık izlenen invaziv tümör olup %45'lik bir dilimi oluşturmaktadır. Kansere bağlı kadın ölümlerinin %2'sinden sorumludur.

Endometrial kanser insidansı coğrafyalara göre farklılık göstermektedir. En yüksek oranda Kuzey Amerika ve Avrupa izlenirken, gelişmekte olan ülkelerde ve Japonya'da dört-beş kat daha az sıklıkta görülmektedir.

Endometrial kanser prevalansı, Afrika-Amerikalı kadınlarda beyaz kadınlara göre daha düşüktür. Ancak beyaz kadınların diğer klinikopatolojik ve sosyoekonomik faktörler kontrol altına alındıktan sonra Afrika-Amerikalı kadınlara göre anlamlı survey avantajı bulunduğu da gösterilmiştir (4).

Endometrial karsinomlar içinde en sık görülen tip Endometrioid Adenokarsinom olup, tüm olguların 3/4'ünden fazlasını oluşturmaktadır.

Endometrioid Adenokarsinomun ortalama görülme yaşı 59'dur. Hastaların yaş aralığı iki ile sekizinci onyıllı arasında ve çoğu postmenapozal kadınlardır. Endometrial karsinomların yalnız %1-8'i 40 yaş altındaki kadınlarda görülmektedir (34). Nadiren gebelikte de Endometrioid Adenokarsinom gelişebilir (35).

Endometrial karsinogenezde iki farklı gelişim mekanizması olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Tip I karsinomlar, östrojen etkisi sonucu ortaya çıkan endometrial hiperplaziler sonucunda gelişir ve prototipi Endometrioid Adenokarsinom olarak

bilinmektedir (36). Tip II karsinomlar ise hormon etkisinden ve hiperplaziden bağımsız olarak ortaya çıkmaktadır (37). Bu grup içinde Seröz ve Berrak Hücreli Karsinom yer almaktadır.

Östrojen replasman tedavisi ile endometrial kanser gelişimi arasındaki ilişki pek çok çalışmada gösterilmiştir. İki yıldan fazla süre boyunca progesteron ile karşılanmamış östrojen tedavisi alan kadınlarda, karsinom riskinin iki-üç kat arttığı bulunmuştur (38). Endometrium üzerindeki karşılanmamış östrojen etkisini ortadan kaldıran progesteron hormon replasmanı, oral kontraseptif kullanımı ve sigara kullanımı gibi faktörlerin riski azalttığı gösterilmiştir (39,40). Özellikle postmenapozal kadınlarda yüksek östrojen ve albumine bağlı östradiol seviyelerindeki yükseklik riski artırırken, premenapozal kadınlarda yüksek seviyelerdeki total, serbest ve albumine bağlı östradiolün risk ile ilişkisi bulunamamıştır. Bununla birlikte, hem premenapozal hem de postmenapozal kadınlarda, dolaşımdaki yüksek androstenedion seviyesi bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (41).

Tamoksifen, östrojen reseptörlerine bağlanan, özellikle meme karsinomunun tedavisinde sıklıkla kullanılan bir ajandır. Reprodüktif çağıdaki kadınlar üzerinde antiöstrojenik etkisi varken, postmenapozal kadınlarda östrojenik etki göstermektedir. Tamoksifen ile endometrial karsinom arasındaki ilişki konusunda birbiriyle çelişen, değişik görüşleri savunan çok sayıda çalışma bulunmaktadır (42,43,44).

İyi tanımlanmış diğer bir risk faktörü obesitedir. Obez kişilerde, yağ dokuda androjenlerin aromatzasyonu sonucu açığa çıkan östrojenler ve seks hormonu bağlayan globulin konsantrasyonundaki azalma nedeniyle, endometrial karsinom riski iki-on kat arasında artmaktadır (4).

Diğer risk faktörleri arasında erken menarş, geç menapoz ve nulliparite yer almaktadır (4).

Endometrial karsinomun prognostik faktörleri Gynecologic Oncology Group (GOG)'un yaptığı çalışmaya göre, uterin ve ekstrauterin faktörler olmak üzere iki ana başlık altında toplanmıştır. Uterin faktörler ; histolojik tip, grade, myometrial invazyon derinliği, servikal tutulum, vasküler invazyon, atipik endometrial hiperplazinin varlığı, hormon reseptör durumu, DNA ploidi ve S-faz fraksiyonu olarak sunulmuştur. Ekstrauterin faktörler ; adneksial tutulum, intraperitoneal metastazlar, pozitif peritoneal sitoloji, pelvik ve paraaortik lenf düğümü metastazı olarak belirlenmiştir.

Endometrial kanserlerde prognozu belirleyen en önemli parametre tanı anında hastalığın yaygınlığını ifade eden Evreleme sistemi olarak bilinmektedir. Yapılan geniş serili araştırmalarda evrelere göre hastaların 5 yıllık ortalama yaşam süreleri ; Evre I'de % 82 ,Evre II'de %65 , Evre III'de % 44 , Evre IV'de %15 olarak bulunmuştur (3). İki farklı çalışmadan elde edilen evrelere göre 5 yıllık yaşam oranlarına ait veriler ise Çizelge 2.1'de sunulmuştur (45).

Çizelge 2.1. Endometrial karsinom – 5 yıllık yaşam oranları (Wolfson et al. ve Maneschi et al. çalışma sonuçlarına göre)

Evre I	%90	%93,8	Evre IA
		%95,4	Evre IB
		%75	Evre IC
Evre II	%83		
Evre III	%43		

Diğer prognostik faktörler arasında ; bcl-2 , c-erb-B2, p 53, Siklin A, Ki 67, PCNA, MIB-1, mitoz sayısı, S-faz fraksiyonu, mikrosatellit instabilitesi, PTEN, β -Katenin ve K-ras yanısıra yaş ve sosyoekonomik durum da sayılabilir (4,45).

Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi çok aşamalı, karmaşık bir süreçtir. Onkogenleri, transkripsiyonu düzenleyen mekanizmaları, sinyal moleküllerini, büyüme faktörü ve reseptörlerini, tümör supresör genleri etkileyen değişiklikler sonucunda hücre, çoğalma avantajı sağlayabilir. Bu değişiklikler karsinogenezin temelinde yatan öldürücü olmayan genetik hasar ile oluşmaktadır. Genetik hasar, kalıtım sonucu bulunabileceği gibi, kimyasal maddeler ve radyasyon gibi çevresel ajanlarla veya virüslerin etkisiyle mutasyon sonucu da oluşabilmektedir.

Genetik kanser hipotezi bir tümör kütesinin, genetik hasara uğrayan tek bir öncü hücrenin klonal büyümesi ile oluştuğunu ileri sürmektedir. Bununla birlikte, tümör hücresinin proliferasyonu, hücre kinetiği dışındaki faktörlerden de etkilenmektedir.

Anjiogenez tümöral bir lezyonun gelişiminde rol oynayan en önemli faktörlerdendir (5,6,7,8). Anjiogenez, tümörün etkisiyle daha önceden varolan damar yatağından, yeni kan damarlarının gelişimi (neovaskülarizasyon) olarak tanımlanır. Neovaskülarizasyonun olmadığı durumlarda, tümöral dokunun oksijen ve glikoz difüzyonu buna bağlı olarak sınırlanmaktadır. Bu durumda tümör hücrelerinde apoptoz ve nekroz izlenir. Böylece tümörün birkaç mm³ 'den daha fazla büyümesi engellenmiş olur (6,9). Anjiogenez, tümör büyümesi üzerine diğer olumlu etkisini, yeni oluşan damarlara ait endotel hücreleri yoluyla oluşturmaktadır. Endotel hücrelerinden aktif olarak

salgılanan büyüme faktörleri doğrudan tümör hücrelerini uyararak, tümör kütlesinde artışa neden olurlar.

Anjiogenez, normal durumlarda büyüme, gelişme ve yara iyileşmesi sürecinde izlenen fizyolojik bir olaydır. Tümöral dokuda izlenen neovaskülarizasyon ise patolojik anjiogenez olarak tanımlanmaktadır.

Anjiogenezin regülasyonu pro-anjiogenik moleküller ve anti-anjiogenik moleküllerin dengesine bağlıdır. Tirozin kinaz reseptör ligandlarından VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), FGFs (Fibroblast Growth Factors), PDGF (Platelet-derived Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), LPA (Lysophosphatic acid) in vivo ve in vitro olarak anjiogenik yeteneği olduğu gösterilen faktörler arasında yer almaktadır. İlk tanımlanan anjiogenik inhibitör, endotel hücre proliferasyonunu ve motilitesini düzenleyen, Thrombospondin-1'dir. Daha sonra tanımlanan anjiogenik inhibitör moleküller arasında statinler grubundan Anjiostatin, Endostatin, Canstatin, Tumstatin yer almaktadır (46). Tümöral dokuda izlenen patolojik anjiogenez sıklıkla pro-anjiogenik moleküllerin indüksiyonu sonucu meydana gelir. Fizyolojik ve patolojik stimülatörler, pro-anjiogenik genlerin ekspresyonunu indüklemektedir. Bu stimülatörlerin en etkili ve önemlisi, tümör kütlesinin büyümesi sonucunda ortaya çıkan hipoksidir. Bununla birlikte onkogen aktivasyonu veya tümör supresör gen mutasyonu da anjiogenezi uyarabilen stimülatörler arasında yer alır. Pek çok çalışmada anjiogenik inhibitör moleküllerden Thrombospondin'in, tümör supresör genlerden p53 ile kontrol edildiği gösterilmiştir. Tümör dokusunda izlenen anjiogenik stimulus, tümör hücrelerinden, tümörün stromal hücrelerinden ve tümörü infiltre eden

inflatuar hücrelerden (monosit/ makrofajlar, plateletler, mast hücreleri ve diğer lökositler) açığa çıkmaktadır.

Anjiogenik stimülatörlerin etkisiyle meydana gelen anjiogenik süreç hem tümör dokusunda, hem de fizyolojik şartlar altında normal dokularda, pek çok basamakta benzerlik göstermektedir. Benzerliğin izlendiği basamaklar; Kapiller bazal membranın yıkımı ve lokal ekstrasellüler matriksin yeniden oluşumu, anjiogenik faktörlerle endotel hücrelerinin aktivasyonu ve anjiogenik stimulusa doğru göçü, endotel hücrelerinin proliferasyonu ve diferansiyasyonu şeklinde özetlenebilir.

Bununla birlikte tümöral dokuda yeni oluşan kapiller ağı, normal dokulardaki karşıtlarından pek çok noktada farklı olduğu da gösterilmiştir. Bu farklar arasında ilk göze çarpan tümör damarlanmasındaki şiddetli proliferasyondur. Normal dokudaki endotel hücrelerine göre, solid tümörlerdeki endotel hücrelerinin 50-200 kat daha fazla prolifereldukları gösterilmiştir.

Tümör ilişkili damarlarda izlenen yapısal defektler bir diğer dikkat çekici noktadır. Tümörde yeni oluşan damarlar, anormal dallanmalar ve kör uçla sonlanmalar gösteren ince duvarlı venüller benzeri boşluklar şeklinde izlenir. Bu damarlar, sünizoidler ve arteriovenöz şantlar oluşturmaya eğilimlidirler. Endotel sıralanması inkomplet olup, fenestrasyonlar ve intersellüler bağlantıların kaybı sık görülmektedir. Bazal membran yokluğu sık izlenmekle birlikte bazal membranın temel komponentlerinin yokluğu da genellikle rastlanan bir bulgudur. Tümör damarlarında özellikle perisitlerin ve düz kas hücrelerinin azlığı dikkat çekici bir özelliktir. Bu damarlarda innervasyon izlenmemektedir. Ayrıca damarlar çevresinde fibrozis görülebilir.

Tümör içinde yeni oluşan damarların diğer bir önemli özelliği, lokal kontrol mekanizmalarının olmamasıdır. Bu nedenle, tümörün metabolik ihtiyacına göre, yeni oluşmuş damarlardan beklenen mikro sirkülasyonun düzenlenme kapasitesi yetersiz kalmaktadır. Vasküler düz kasın ve innervasyonun olmaması bu noktada önem taşımaktadır.

Tümör ilişkili yeni damarların perfüzyonu normal doku damarlarında izlenen perfüzyona göre daha az efektifir. Sıklıkla izlenen arteriovenöz şantlarda düşük akım resistansı, yani kan akımının arterlerden venlere doğrudan geçişi, kapiller damarlardaki değişim sistemini engellemektedir. Bu kan akım şekline 'chaotic' akım adı verilmekte ve tümörlerdeki total kan akımının %30'unu oluşturmaktadır. Ayrıca tümör mikro sirkülasyonunda staz periyodları, staz sonrası kan akımının yeniden başlaması ve bazen ters yöne kan akımının olması gibi anormalliklerde görülebilmektedir. Bu fonksiyonel düzensizlik 'regürjitasyon ve intermitant akım' olarak isimlendirilmektedir. Regürjitasyon ve intermitant akım periyodik olarak 2-3 dakikada bir oluşmaktadır ve solunum hareketleri sonucunda da akımda dalgalanma olabileceği deney hayvanlarında gösterilmiştir.

Tümör içinde yeni oluşan damarlarda vasküler permabilitenin artmış olması, kollateral sirkülasyonun olmaması ve intratümöral lenfatik sistemin olmaması nedeniyle kaçak intertisyel sıvı drenajında sorun yaşanmaktadır. Bu durum, yüksek intertisyel basınca neden olarak kan damarlarının kollapsa uğraması ile ve sirkülasyonda stazın gerçekleşmesi ile sonuçlanmaktadır.

Tümör içinde normal bir dokuya kıyasla, yeni damar ağının dağılımında bölgesel farklar görülmektedir. Mikrodamar yoğunluğunun fazla olduğu alanlar yanı sıra damarlanmadan fakir

bölgeler aynı tümör kesitinde izlenebilmektedir. Bu özellikten yola çıkılarak tümör içi neovaskülarizasyonu değerlendirmede 'hot spots' tekniği geliştirilmiştir.

Tümör damarlarıyla ilgili vurgulanması gereken bir diğer önemli özellik, endotel hücre proliferasyonu sonucunda izlenen defektif yeni damarların sıklıkla tümör periferinde lokalize olmalarıdır. Mikrodamar yoğunluğunu inceleyen pek çok tümör çalışmasında, invazyon gösteren tümör kenarındaki mikrodamarların, tümörün iç kısımlarında izlenen damarlara göre 4-10 kat fazla olduğu bulunmuştur. İnvazyon gösteren tümör kenarındaki mikrodamarlar, çevre normal dokudaki matür damarlar ve peritümöral lenfatiklerle iç içe geçmiştir. Bu durum, proliferen olan tümör hücrelerinin metastaz yapmasını ve tümör kütesinin büyümesini kolaylaştırmaktadır (46,47,48).

Anjiogenez, metastazın gelişiminde ve prekürsör lezyonların invaziv tümörlere dönüşümünde (10,11,12) oynadığı vazgeçilmez rol ile, son yıllarda çeşitli tümör tipleri üzerine yapılan çalışmaların odak noktası olmuştur. Meme, akciğer, endometrium, kolorektal, mesane, baş ve boyun tümörleri gibi çeşitli tümör tipleri üzerine yapılmış birçok çalışma sonucunda, mikrodamar yoğunluğu ile hasta yaşam süresi arasında ters bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Endometrium adenokarsinomlarında yüksek mikrodamar yoğunluğunun bağımsız ve kötü bir prognostik faktör olduğu bulunmuştur (33). Bu bilgiler, neovaskülarizasyonun baskılanması ve sonuç olarak tümör büyümesinin önlenmesini sağlayan anti-anjiogenik terapi formundaki tedavilere yeni yaklaşımlar için de önemlidir (46,47,48).

Tedavi basamağında diğer önemli bir nokta, sıklıkla kullanılan bioredüktif ilaçların aktivasyonu için belli miktarda hücresel oksijen

basıncına ihtiyaç duyulmasıdır (49). Eğer, tümör dokusunda ihtiyacı karşılayacak ölçüde yeni damarlanma yoksa , moleküler oksijene ve diğer metabolik değişikliklere erişimde yetersizlik olacaktır (13). Bu durumda, kemoterapiye, immünoterapiye ve radyoterapiye direnç gelişimi izlenecek ve tedavi başarısızlık ile sonuçlanacaktır (7,14,15,16).

Mikrodamar yoğunluğu açısından incelendiğinde, değişik tümör tipleri arasında, ayrıca, intertümöral ve intratümöral alanlar arasında olmak üzere bir tümöral lezyonun kendi içinde, farklılıklar izlenmektedir. Bu durum dolaylı olarak oksijenizasyon seviyesi bakımından da fark yaratmaktadır (18). Tüm bu bulgular göz önüne alındığında, tümör hipoksisini ve dolayısıyla kanlanma miktarını ölçen doğru, ucuz ve minimal invaziv bir yöntemin geliştirilmesi önemli bir adım olacaktır. Böyle bir yöntemin geliştirilmesi, tamamen hastada mevcut olan tümöre spesifik tedavi protokolünün oluşturulmasına ve daha etkili sonuçlar alınmasına katkıda bulunacaktır (10).

Tümör hipoksisini ve dolaylı şekilde kanlanma miktarını ölçen non-invaziv bir yöntem geliştirmek amacıyla son yıllarda HIF-1 (Hypoxia-inducible Factor-1) üzerine çeşitli tümör tiplerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır.

HIF-1 ilk olarak, Semenza et al. tarafından 1992 yılında gerçekleştirilen çalışmada, Hematopoietic Growth Factor Eritropoetin'in oksijenle regüle edilen ekspresyonunda görevli faktör olarak tanımlanmıştır. Daha sonra, bu transkripsiyonel aktivasyon mekanizmasının sadece Eritropoetin üreten hücrelere spesifik olmadığı, tüm memeli hücrelerinde izlenebildiği bulunmuştur. 1995'te Wang et al. tarafından hypoxia-response element (HRE) olarak tanımlanmıştır.

İnterensek bir hipoksi belirleyicisi olan HIF-1, hücrel oksijen hemostazında ve adaptasyonunda rol oynayan anahtar faktörlerdendir (19,20,21).

HIF-1 heterodimerik transkripsiyon faktörü olup, HIF-1 α ve HIF-1 β olmak üzere iki subünitten oluşmaktadır (19,22). Her iki subünit basic-helix-loop-helix (bHLH) - PAS domain içermektedir. bHLH domain, ökaryotik transkripsiyon faktörlerinin bir ailesini tanımlamaktadır. PAS domain ise metazoalara özel bHLH protein ailesinin bir alt grubunu tanımlamakta olup, bu grupta ilk keşfedilen üç proteinin (PER, ARNT ve SIM proteinleri) ilk harflerinden adını almıştır. bHLH -PAS proteinler, çeşitli embriyogenik ve fizyolojik olayların kritik aşamalarını kontrol etmektedirler (24,50).

HIF-1 β subüniti, ilk olarak 1991'de Hoffman et al. tarafından aryl hydrocarbon reseptörü ile dimerizasyonu gösterilerek tanımlanmıştır. Bu nedenle 'aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT)' olarak da bilinmektedir. HIF-1 β , yapısal olarak eksprese edilen ve diğer hücrel süreçlerde de rol alan, HIF-1 dışında çok sayıda bHLH proteinin subüniti olan bir moleküldür (8,21,23,24).

HIF-1 α , HIF-1 için özel bir subünit olup, oksijence regüle edilmektedir. HIF-1'in aktivitesini belirleyen asıl bileşendir. HIF-1 α 'nın ekspresyonu ve buna bağlı transkripsiyonun aktivasyonu, sellüler oksijen konsantrasyonu ile regüle edilmektedir. Posthipoksik durumlarda, HIF-1 α 'nın yarı ömrünün 5 dakikanın altında olduğu hem hücre kültürlerinde hem de in vivo şartlarda gösterilmiştir. Non-hipoksik şartlarda, HIF-1 α 'nın ubiquitinizasyon ve proteazomal yıkıma gittiği bilinmektedir. Bu yıkım mekanizmasının von Hippel - Lindau tümör supresör gen ürünü tarafından regüle edildiği gösterilmiştir. Bu supresör genin inaktive olduğu tümörlerde HIF

aktivasyonu dikkat çekicidir (5). Hipoksik cevapta, HIF-1 α 'nın ubiquitinizasyonunun azalması ve ekspresyonunun artması birlikte izlenir. HIF-1 α ekspresyonunun indüklenmesi kritik bir basamak olup, mRNA ekspresyonunun artışı, protein stabilizasyonu, nükleer lokalizasyon ve transkripsiyonel aktivasyon domaininin aktivasyonunda artış ile meydana gelir (24,51).

Bu güne kadar HIF-1 tarafından aktive edilen yaklaşık 30 adet transkripsiyon gen ürünü bulunmuştur. Tanımlanan gen ürünleri : Adenilat Kinaz-3, α_{1B} -Adrenerjik Reseptör, Adrenomedullin, Aldolaz A, Aldolaz C, Endotelin-1, Enolaz-1, Eritropoetin, Glukoz Taşıyıcısı-1, Glukoz Taşıyıcısı-3, Gliseraldehid Fosfat Dehidrogenaz, Heme Oksijenaz 1, Hekzokinaz-1, Hekzokinaz-2, İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-2 (IGF-2), IGF Bağlayan Protein-1, IGF Faktör Bağlayan Protein-3, Laktat Dehidrogenaz A, Nitrik Oksit Sentaz-2 (NOS-2), p21, p35srj, Fosfofruktokinaz L, Fosfogliserat Kinaz-1, Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1, Piruvat Kinaz M, Transferrin, Transferrin Reseptörü, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), VEGF Reseptör FLT-1' dir (11,20,24,25,26). Bu gen ürünleri direkt olarak tümör gelişiminde rol oynamaktadır (8).

Biyopsi yada otopsi örneklerinde, tümör dokusuna komşu normal alanlarda HIF-1 α 'nın salınımı tespit edilmemiştir. Bununla birlikte, beyin, meme, kolon, akciğer, over ve prostat kanseri gibi çeşitli primer tümörlerin 2/3'ünde ve metastatik tümörlerde HIF-1 α ekspresyonu bulunmuştur (11,24). Zhong et al. tarafından 1999 yılında yayınlanmış bir çalışmada, uterin leiomyom ve meme fibroadenomu gibi benign tümörlerde HIF-1 α ekspresyonu olmamasına karşın, çoğu malign tümörde ekspresyon izlendiği bildirilmiştir. Yine bu çalışmada, tümör dokusu yanında insidental

olarak bulunan, memenin komedo tip duktal karsinoma in situs, kolon adenomu, prostatik intraepitelyal neoplazi gibi erken neoplastik lezyonlarda HIF-1 α ekspresyonu tespit edilmiş ve artmış HIF-1 α ekspresyonunun, tümör progresyonunda erken aşamalarda görülebileceği sonucuna varılmıştır (24). Birner ve arkadaşlarının çalışmasında ise, serviks karsinomlarında HIF-1 α 'nın bağımsız bir prognostik faktör olduğu bulunmuştur (12).

Folkman et al. 1989 yılında yaptıkları hayvan modeli çalışmada, hiperplaziden neoplaziye geçiş sürecinde anjiogenez indüksiyonunu göstermişlerdir. Erken neoplastik lezyonlarda HIF-1 α ekspresyonu, VEGF aracılığıyla ve olası diğer HIF-1 ile regüle edilen anjiogenik faktörler aracılığıyla, vaskülarizasyonu artırmaktadır (24).

HIF-1 ile regüle edilen VEGF, en potent anjiogenik faktörlerden biridir. Hipoksi sonucunda HIF-1 aracılığıyla VEGF'in transkripsiyonu indüklenir. VEGF mRNA'sının stabilizasyonundan sonra hücre içindeki VEGF ekspresyonu artar (13,49). Bu şekilde kapiller proliferasyon uyarılır ve dokunun kanlanması, oksijen ihtiyacı ve diğer metabolik gereksinimleri karşılanır (28).

VEGF fizyolojik ve patolojik anjiogenik süreçte, başlıca düzenleyici faktördür (48,52). Bu molekül ilk olarak Dvorak et al. tarafından, tümör dokusunda yeni oluşan damarlarda geçirgenliği şiddetli şekilde artırdığı için, 'Vasküler Permeabilite Faktörü' (VPF) olarak isimlendirilmiştir. Ferrara et al. ise bu molekülü VEGF olarak adlandırmış, endotel hücre proliferasyonunu ile anjiogenezi selektif olarak stimüle eden mitojenik faktör olarak tanımlamıştır. Connely et al.'ın çalışmasında VPF, vasküler proliferasyonu stimüle etme kapasitesi olan ve endotel hücreleri için mitojen özellikte olan bir

molekül olarak bildirilmiştir. cDNAs zincir analizleri ile VPF ve VEGF'nin aynı molekül oldukları ispatlanmıştır (53).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla VEGF büyüme faktörleri ailesine VEGF'ye ek olarak dört yeni molekül eklenmiştir. Bu faktörler ; PlGF (Placenta Growth Factor), VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D'dir.

VEGF, mRNA'nın alternatif birleşme şekillerine göre dört farklı izoform içerir. Bu izoformlar : VEGF₁₂₁ , VEGF₁₆₅ , VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ ' dir. Beşinci izoform olarak VEGF₁₄₅ , plasental hücrelerde ve kadın genital sistemin karsinom hücrelerinde tanımlanmıştır.

VEGF molekülleri sinyal ileten peptid zinciri içerir ve konvansiyonel yollar aracılığıyla homodimerler şeklinde sekrete edilir. VEGF₁₂₁ , hafif asidik özelliktedir ve en kolay çözünen izoformdur. Heparine bağlanmadan sorumlu temel amino asitleri içermemektedir. VEGF molekülünün matür formu, 45 kda ağırlığında olan VEGF₁₆₅ homodimeridir. VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ temel izoformlar olup, heparine bağlanırken VEGF₁₆₅'den daha fazla afinite gösterirler. VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ 'nın hemen hemen tamamı ekstrasellüler matrikste bulunmaktadır. Ekstrasellüler kompartmanda VEGF molekülünün bir kısmı plazmin aracılığıyla bölünmekte ve 34 kda ağırlığında, ilk 110 adet NH₂-terminal aminoasiti içeren molekül oluşmaktadır. Böylece proteoliz yoluyla, VEGF'nin bioaktif olan küçük fragmanlarının, ekstrasellüler matriks içinde bulunan büyük izoformlardan oluşması sağlanır.

VEGF, iki adet tirozin kinaz reseptörüne yüksek afinite ile bağlanır. Bunlar VEGF Reseptör-1 (VEGFR-1) (*flt-1*) ve VEGF Reseptör-2 (VEGFR-2) (*KDR/flk-1*)' dir. VEGF'nin bağlanması ile

reseptör dimerizasyonu gerçekleşir ve bunu reseptörün otofosforilizasyonu ile sinyal transdüksiyonu izler. VEGFR-1 ile VEGFR-2 arasında anlamlı farklılıklar vardır. Waltenberger et al. tarafından 1994'te yayınlanan çalışmada, VEGF reseptörü içermeyen endotel hücreleri VEGFR-2 ile transfekte edildiğinde, VEGF'ye cevap olarak migrasyon ve proliferasyon göstermektedir. Ancak, aynı endotel hücreleri VEGFR-1 ile transfekte edildiğinde böyle bir cevap oluşmamaktadır. Landgren et al.'ın 1998 'deki yayınlarında ise, PlGF ile indüklenen endotel hücre proliferasyonuna ve plazminojen aktivatör ekspresyonuna VEGFR-1'in aracılık ettiği gösterilmiştir.

Gen knockout deneysel çalışmaları ile anjigenezde VEGFR-1'in ve VEGFR-2'nin kritik rolü ortaya konmuştur. İndiferansiye mezenkimden kan damarlarının de novo gelişim süreci vaskülogenez olarak isimlendirilmektedir ve VEGFR-2 geninde izlenen inaktivasyon vaskülogenezde yetmezliğe neden olmaktadır. VEGFR-2 knockout embriyolar, hemopoetik prekürsörlerini üretme ve kan adalarını oluşturma bakımından yetersizdir. VEGFR-1 genini hedef alan mutasyonlar, endotel hücrelerinin diferansiyasyonunu etkilemezken, gelişen damar sisteminde disorganizasyona neden olur. VEGFR-1 ve VEGFR-2 knockout embriyolar, vasküler anomaliler nedeniyle 8.5-9.5 günler arasında ölürlür. Tek VEGF (VEGF+/-) yada her iki VEGF (VEGF-/-) allel gen defektine sahip embriyolar vaskülogenezde yetmezlik gösterirler ve bu durum embriyoların 10-12. günlerde intrauterin ölümüyle sonuçlanır. Heterozigot embriyolarda (VEGF+/-) vaskülogenik defektin demonstrasyonu, kritik bir VEGF eşiğinin olduğunu, bu eşiğin altında yeni damar oluşumunun yetersiz kaldığını göstermektedir (52).

VEGF hem arterial, venöz ve mikrovasküler endotel hücrelerinin migrasyonunu ve proliferasyonunu, hem de anjiogenezi *in vivo* ve *in vitro* olarak stimüle etmektedir. VEGF tomurcuklanan endotel çevresindeki ekstrasellüler matriksin dengeli yıkımına yardımcı olmaktadır. Bu etkisini urokinaz tipte plazminojen aktivatörünün, doku tipindeki plazminojen aktivatörünün, plazminojen aktivatör inhibitör-1'in ve intertisyel kollojenazın ekspresyonunu indükleyerek oluşturmaktadır. Venüllerin permabilitesini artırarak, anjiogenezi potansiyalize eden Fibrinojen gibi dolaşımdaki proteinlerin damar dışına çıkmasını ve perivasküler alanda depolanmasını kolaylaştırmaktadır. Anjiogenez öncesinde nitrik oksiti indükleme kapasitesi nedeniyle, kan akımının artışı ve vazodilatasyonu gerçekleştirebilmektedir (52,53,54).

VEGF ailesinin üyeleri değişik mekanizmalarla regüle edilmektedirler. VEGF ve VEGF-C mRNA'ları, serum, büyüme faktörleri ve inflamatuvar sitokinler ile artış gösterirken, VEGF-B için bu faktörler etkisiz kalmaktadır. Yine ras onkogeninin amplifikasyonu ve p53 geninin mutant formu, VEGF'nin up-regülasyonu ile sonuçlanırken, VEGF-B ve VEGF-C ekspresyonu üzerine böyle bir etki görülmemektedir. Hipoksi VEGF mRNA ekspresyonunu kuvvetli şekilde indüklerken, bu etkisini VEGF-B, VEGF-C ve PlGF üzerine göstermemektedir. Renal hücreli karsinom hücrelerinde von Hippel - Lindau tümör supresör geninin yokluğu veya inaktif formunun salınımı, VEGF ürünlerinin anormal regülasyonu ile sonuçlanmaktadır. Granüloza-luteal hücrelerden salınan β HCG'nin de VEGF ekspresyonunu indükleyici etkisi bilinmektedir (52).

VEGF mRNA'sı malign insan ve hayvan tümör hücrelerinde büyük oranda yapılmaktadır. Meme, tiroid, akciğer, mide, kolon,

böbrek, mesane, over ve serviks karsinomlarında, anjiosarkomlarda, germ hücreli tümörlerde, santral sinir sistemi tümörlerinde VEGF ekspresyonu gösterilmiştir. Benign tümörler üzerine daha az sayıda çalışma yapılmıştır. Kolonun benign adenomatöz poliplerinde VEGF ekspresyonu değerlendirilmiş ve elde edilen veriler normal kolonik mukozadaki VEGF ekspresyonu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamıştır (55). Ancak benzer çalışma modeli memenin duktal karsinoma in situ alanlarına uygulandığında, tümörün invazyon öncesinde VEGF mRNA'sını yüksek oranda yaptığı gösterilmiştir (56). VEGF'in anjiogenez ve tümör gelişimindeki kritik rolü mesane, meme, gastrik ve diğer malignansilerdeki prognostik anlamı ile ispatlanmıştır (13). Yüzeyel mesane kanserinde artmış VEGF mRNA seviyesi progresyonun erken dönemini ve relapssız dönemin kısılacığını ifade etmektedir (29). Ayrıca VEGF ekspresyonunun meme tümörlerinde de hasta surveyleri ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur (30). Genel olarak onkogeneze ve spesifik olarak Endometrium Adenokarsinomlarında önemli rol oynadığı da gösterilmiştir (31).

Hücre kültürü çalışmalarında, VEGF-B pek çok tümörde eksprese edilirken, VEGF-C'nin sadece sınırlı sayıda prostat, akciğer ve böbrek karsinomunda eksprese edildiği tespit edilmiştir. Salven et al.'ın çalışmasında meme karsinomlarında, lenfomalarda, yassı epitel hücreli karsinomlarda, melanomlarda, sarkomlarda, adenomlarda ve papillomlarda VEGF-B ve VEGF-C'nin farklı tiplerinin eksprese edildiği gösterilmiştir (52).

VEGF diğer önemli non-neoplastik patolojik durumlarda da yüksek oranda eksprese edilmektedir. İskemik myokard dokusunda myositlerde, romatoid artritte izlenen vasküler pannustaki sinovial

hücrelerde, kutanöz yara iyileşmesi, psöriazis ve geçikmiş tip hipersensitivite reaksiyonlarında yer alan keratinositlerde ve makrofaj benzeri hücrelerde VEGF mRNA'sı tespit edilmiştir. Ayrıca birçok fetal doku tarafından, plasentadaki sitotrofoblast ve sinsityotrofoblast tarafından, renal glomerüllerin podositleri, prostatik epitel hücreleri, adrenal korteks ve akciğerin epitel hücreleri tarafından da VEGF eksprese edilmektedir (57,58,59,60).

VEGF ve VEGF- ilişkili moleküllerin ekspresyonunda heterojen bir yapı dikkat çekmektedir. Bu büyüme faktörlerini kontrol eden farklı düzenleyici mekanizmalar nedeniyle, izlenen heterojenite beklenen bir özelliktir.

Önemli bir diğer transkripsiyon gen ürünü, glukoz taşıyıcı ailesinden Na-bağımsız glukoz transportu yapan GLUT-1 'dir. Membrana bağlı glukoz transportunu kolaylaştıran protein ailesi 8 farklı yapıda glukoz taşıyıcısını kapsamaktadır. Bu grup içinde GLUT-1 yapısal ve ultrastrüktürel olarak geniş kapsamlı çalışılmış ve en iyi tanımlanmış olan moleküldür (10).

GLUT-1 ekspresyonu pek çok ajanla ve çok çeşitli durumlarda stimüle edilmektedir. Serum ve büyüme faktörleri, onkojenik transformasyon, kalsiyum iyonoforları ve tiroid hormonu bu ajanlar arasında sayılmaktadır. Eksternal glukoz konsantrasyonunda azalma, hipoksi ve oksidatif fosforilizasyonun inhibisyonu durumlarında da yine GLUT-1 ekspresyonunda artış izlenmektedir (61).

Memeli hücrelerinde GLUT-1'in aracılığı ile gerçekleşen glukozun bazal transportu, pek çok insülin-bağımlı olmayan glukoz transportu kadar iyidir.

GLUT-1 ekspresyonunun ve fonksiyonunun artırılması, birbirinden farklı birkaç mekanizmayla olmaktadır. GLUT-1'in

regölasyonu akut olarak, kronik olarak veya her ikisinin kombinasyonu şeklinde yapılmaktadır. Akut stimulusa cevaben dakikalar içinde hücre içine GLUT-1 aracılı glukoz transportu başlar. Akut cevap olarak öncelikle GLUT-1 taşıyıcılarının aktivasyonu ve GLUT-1'in plazma membranında translokasyonu gerçekleşir. Stimulusun uzun sürmesi halinde GLUT-1 mRNA düzeylerinde artış izlenir. Bu transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel mekanizma sonucunda hücre ve plazma membran GLUT-1 içeriğinde artış meydana gelir. Yukarıda tanımlanmış olan GLUT-1 ekspresyonunu ve fonksiyonunu artıran tüm bu mekanizmalar hipoksi ile harekete geçirilebilmektedir.

Hipoksi intrasellüler 'Heme-protein' oksijen sensörünü yoluyla HIF-1'i aktive etmektedir. Aktive olan HIF-1 ile GLUT-1 geninin transkripsiyonu indüklenir. Bağımsız olarak, azalmış oksijen konsantrasyonu sonucu oksidatif fosforilizasyonun inhibisyonu gerçekleşir ve bu olay sonucu direkt olarak GLUT-1 geninin ekspresyonu stimüle edilir. Ayrıca oksidatif fosforilizasyonun inhibisyonu, GLUT-1'i aktive ederek ve GLUT-1'in translokasyonunu sağlayarak glukoz transportunu artırmaktadır (32,62)

Baş- boyun bölgesinde izlenen kistik yassı epitel hücreli karsinomu, benign kistik skuamöz lezyondan ayırt etmede kullanılabileceğini destekleyen çalışmalar da bulunmaktadır(63). Baş ve boyun yassı epitel hücreli tümörler üzerine yapılmış olan diğer bir çalışmada ise GLUT-1 ekspresyonunun displazik lezyonlarda ve yassı epitel hücreli karsinomlarda arttığı gösterilmiş, baş ve boyun yassı epitel hücreli tümörlerin gelişiminde erken dönemlerde GLUT-1 ekspresyonunun varlığı vurgulanmıştır (64). Kolorektal kanserlerde

kötü prognozun göstergesi olarak kabul edilmekte olup, önümüzdeki dönemlerde tedaviye cevabın göstergesi olarak kullanılabileceği yorumu yapılmaktadır (65). Mesanenin transisyonel hücreli karsinomunda agresif biyolojik potansiyelle ilgili bilgi verdiği gösterilmiştir (66). Akciğer üzerine yapılan çalışmalarda, daha iyi prognoza sahip bronşioalveoler karsinomda diğer tiplere kıyasla daha düşük GLUT-1 ekspresyonunun izlendiği (67) ve küçük hücreli akciğer karsinomlarında GLUT-1 ekspresyonunun kötü prognoz göstergesi olduğu kanıtlanmıştır (10).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya retrospektif olarak, 2000-2005 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda endometriumun 'Endometriotik Adenokarsinom' tanısı konmuş 100 hasta alınmıştır.

Hastaların klinik bilgilerine Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ile fakülte arşivindeki dosyalarından ulaşılmıştır.

Olgular, histerektomi materyalleri yanı sıra lenf düğümü rezeksiyonu da yapılmış, immünohistokimyasal inceleme için yeterli doku örneğine sahip ve klinik takipleri olan hastalar arasından seçilmiştir.

Hastaların rutin takiplerinde abdominopelvik ultrasonografi, normal fizik ve jinekolojik muayene yer almıştır. Nüksü olan olgular tespit edilmiştir.

Hastaların yaşı, tanı tarihleri, son kontrol tarihleri, klinik evreleri ve aldıkları tedavi protokolleri kayıt edilmiştir. Hormon replasman tedavisi veya Tamoksifen alıp almadıkları, aile öyküsü ve beraberinde hipertansiyon, diabetes mellitus gibi ek hastalıkların varlığı gibi risk faktörleri de sorgulanmıştır.

Olgular Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve International Society of Gynecological Pathologists (ISGYP) tarafından modifiye edilmiş histolojik klasifikasyon sistemine göre değerlendirilmiştir. International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Evreleme Sistemine ve WHO'nun Uterin Karsinomların Histopatolojik Klasifikasyonuna göre tümörlere grade verilmiştir.

Hastaların evrenlenmesinde FIGO ve TNM klasifikasyonu kullanılmıştır (4).

Formalinle fikse edilip parafine gömülmüş, 5µ kalınlığında kesilip hematoksilin-eozin (HE) ile boyanmış her bir olguya ait doku örnekleri, tekrar incelendi. Her bir olgudan, tüm boyama prosedürleri ve anjiogenezin değerlendirmesi için, nekroz ve kanama alanı bulundurmayan bir adet demonstratif tümör bloğu seçilmiştir.

Doku örneklerine immünohistokimyasal olarak 'Streptavidin-Biotin Kompleks' yöntemi ile HIF-1α (Novus Biologicals, Clone ESEE 122), VEGF₁₆₅ (Neomarkers, Clone VG1), GLUT-1 (Neomarkers, Rabbit polyclonal antibody) ve CD 34 (Neomarkers, Clone QBEnd/10) uygulandı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Kullanılan antikorların özellikleri

ANTİKOR	KLON NO	KAYNAK	DİLÜSYON
<i>HIF-1α</i>	ESEE 122	Novus Biologicals	1/300
<i>GLUT-1</i>	Rabbit polyclonal antibody	Neomarkers	1/100
<i>VEGF₁₆₅</i>	VG1	Neomarkers	1/300
<i>CD 34</i>	QBEnd/10	Neomarkers	1/100

İmmünohistokimyasal olarak boyanacak dokudan alınan 4µ kalınlığındaki kesitler hazır 'chromalium-gelatin adhesive' ile kaplı lamalar üzerine alındı. 55°C'de etüvde bir gece eritilip, ksilolde iki kere

5'er dakika bırakılarak deparafinize edildi. Daha sonra ksilol ve azalan derecelerde alkollerden geçirilip 1 dakika distile suya alınarak hidrate edildi. Bundan sonra kesitlere antiijenin yeniden kazanılması amacıyla 'Antiijen Retrieval' işlemi uygulandı. Bu işlem, 0.01 M sitrat solüsyonu içinde pH:6.0'da sıvı seviyesi lamaların üzerini kapatacak ve kesitler kurumayacak şekilde 90°C'de 20 dakika mikrodalga fırında kaynatılması ile gerçekleştirildi. Daha sonrada oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı.

Endojen peroksidaz enzim blokasyonu için %3'lük H_2O_2 solüsyonu ile kesitler 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra preparatlar tamponlanmış fosfat solüsyonunda yıkanarak 5 dakika bekletildi. Zemin boyanmasını önlemek amacıyla kesitler 5-10 dakika 'blocking' solüsyonunda bekletildi. Daha sonra preparatlar kurulandı. Primer antikor ile üstleri kaplanan doku kesitleri HIF-1 α , VEGF₁₆₅, GLUT-1 ve CD 34 ile 1 saat inkübe edildi. Kesitler tamponlanmış fosfat solüsyonunda 5 dakika bekletildi. Primer antikor ile enzim taşıyan antikor arası bağlayıcı görev yapan Linking Reagent ile doku kesitleri 15 dakika inkübe edildi. Labelling Reagent streptavidin ile konjuge edilmiş 'horseradish' peroksidaz ile dokular 15 dakika inkübe edildi. Kesitler tamponlanmış fosfat solüsyonunda 5 dakika bekletildi. 'chromogenic substrate' (DAB) ile 5 dakika inkübe edildi. Preparatlara Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve artan derecelerden alkollerden ve ksilolden geçirilip lamelle kapatıldı.

Her 4 boyama için tüm inkübasyon basamakları oda sıcaklığında ve nemli ortamda gerçekleştirildi. Renklendirici olarak Diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Oluşan kahverengi renk reaksiyonu pozitif olarak kabul edilip ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Pozitif kontrol olarak HIF-1 α için invaziv duktal meme karsinomu olgusu, VEGF₁₆₅ için glioblastom olgusu, GLUT-1 için plasenta dokusu ve CD 34 için tonsil dokusu kullanılmıştır.

Negatif kontrol olarak HIF-1 α için normal böbrek parankimi kullanılmıştır. Diğer immünohistokimyasal boyalar, pozitif kontrollere antikor damlatılmadan PBS ile inkübe edilerek yapılmıştır.

İmmünohistokimyasal boyalar ışık mikroskopunda semikantitatif olarak değerlendirildi. HIF-1 α için hem sitoplazmik hem de nükleer boyanma değerlendirdi. Boyanma şiddeti : boyanma yok, zayıf boyanma ve kuvvetli boyanma olarak sınıflanarak ve boyanan tümör hücre %'si hesaba katılarak, HIF-1 α için özel bir gradeleme sistemi kullanıldı. Bu sisteme göre skora; düşük skor ve yüksek skor olarak yapıldı. HIF-1 α immünreaktivitesini değerlendirmek için kullanılan skora sistemi Çizelge 3.2'de verilmiştir (68).

Çizelge 3.2. HIF-1 α için kullanılan skorlama sistemi

HIF-1 α İÇİN REAKTİVİTE	SKOR
Yok	Düşük Skor (Negatif)
Zayıf sitoplazmik boyanma varsa boyanan alanın %'sine bakılmaksızın	Düşük Skor
Kuvvetli sitoplazmik boyanma ancak boyanan hücre miktarı %50'den azsa	Düşük Skor
Sporadik hücrelerde nükleer ekspresyon var ancak %10'dan az hücredeyse	Düşük Skor
Kuvvetli sitoplazmik boyanma var ve %50'den fazla hücredeyse	Yüksek Skor
Nükleer ekspresyon %10'dan fazla hücredeyse	Yüksek Skor

VEGF için pozitif immün reaksiyon gösteren hücrelerin %'desi, her olgu için dokunun büyüklüğüne göre ,4 - 12 alanda x 200 büyütmede değerlendirilmiştir ve bunların ortanca değeri o vaka için kabul edilen VEGF %'desi olmuştur. Tüm vakalar göz önüne alındığında, elde edilen VEGF ortanca değerine göre cut-off noktası tanımlanmıştır. Olgular düşük reaktiviteli veya yüksek reaktiviteli olarak sınıflanmıştır (68).

GLUT-1 için tümör kesitleri x200 büyütmede, üst soldan alt sağ tarafa doğru alan alan değerlendirilmiştir. Her alan 1'den 4'e kadar skorlanmıştır. GLUT-1 immünreaktivitesini değerlendirmek için kullanılan skarlama sistemi Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. GLUT-1 için kullanılan skarlama sistemi

BOYANMA %'si	SKOR
Boyanma yok	0
% 0-5 alanda boyanma	1
% 5-15 alanda boyanma	2
% 15-30 alanda boyanma	3
% 30'dan fazla alanda boyanma	4

Boyanma şiddetindeki varyasyonlar nedeniyle yalnız eşit şiddette boyanmış alanlar değerlendirmeye alınmıştır. Nekroz alanları, stroma, normal epitel ve belirgin kenar boyanmaları kabul edilmemiştir. Tüm alanların ortalama skoru üzerinden istatistik çalışılmıştır (69).

CD 34 ile mikrodamar yoğunluğunun (MVD) değerlendirilmesinde, öncelikle küçük büyütmede (x 50 veya x100'de) kesitler taranmıştır. En yüksek mikrodamar yoğunluğuna sahip 'hot spot' 10 alanda (5 veya 10 dakikalık süre içerisinde) x 200 büyütmede, mikrodamar sayımı yapılmıştır. Damarlar sayılırken

lümen oluşturup oluşturmamalarına bakılmaksızın, tek bir endotel h creti veya k      endotel hücre toplulukları ve lümeni 50  m çapından b      olmayan (8-10 taneden fazla eritrosit içermeyen) damarlar da sayıma dahil edilmiştir. Diğerlerinden tam olarak ayırt edilemedik e, dallanmalı yapılar tek damar olarak sayılmıştır. Bu alanların ortalaması ile elde edilen değer, olgu için MVD değeri olarak kabul edilmiştir (70,71).

İstatistik

İstatistiksel analiz için SPSS 13.0 yazılımı kullanılmıştır.

Parametrik testleri kullanabilmek için FIGO sınıflamasında verilen evreler 3 ana gruba ayrılmıştır. Evre IA, IB, IC grup 1, Evre IIA, IIB grup 2, Evre IIIA, IIIB, IIIC ve IV grup 3 olarak değerlendirilmiştir.

Sayısal verilerin karşılaştırılmasında Varyans analizi ve Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Ayrıca surveyi değerlendirmek için yaşam analizi (Life Tables) kullanılmıştır.

VEGF; GLUT-1, HIF-1 ve mikrodamar yoğunluğu arasında Pearson korelasyon testi yapılmıştır.

Etkenlerin birer birer incelenmesi için Kaplan-Meier sağkalım analizi ile log rank testi yapılmıştır. Sa kalımın çok değişkenli olarak incelenmesi için cox regresyon analizi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen, 2000-2005 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda endometriumun 'Endometriotik Adenokarsinom' tanısı konmuş 100 hastanın yaş ortalaması 57.45 ± 9.08 (min:36- max:76) idi.

İzlenen tümörlerin 3 tanesi (% 3) polip üzerinde gelişmiştir. Endometrial hiperplazi zemininde gelişmiş 6 tane olgu (% 6) saptanmıştır. Bu 6 olgudan 1 tanesi primer meme karsinomu nedeniyle 6 yıl boyunca Tamoksifen tedavisi almıştır.

Endometrioid tip endometrium tümörünün varyantlarından, oksifilik varyant 4 tümörde (% 4) izlenirken, silialı varyant 1 tümör vakasında (% 1) görülmüştür. Olguların 18 tanesinde ise (% 18) yassı epitel hücre diferansiyasyonu izlenmiştir.

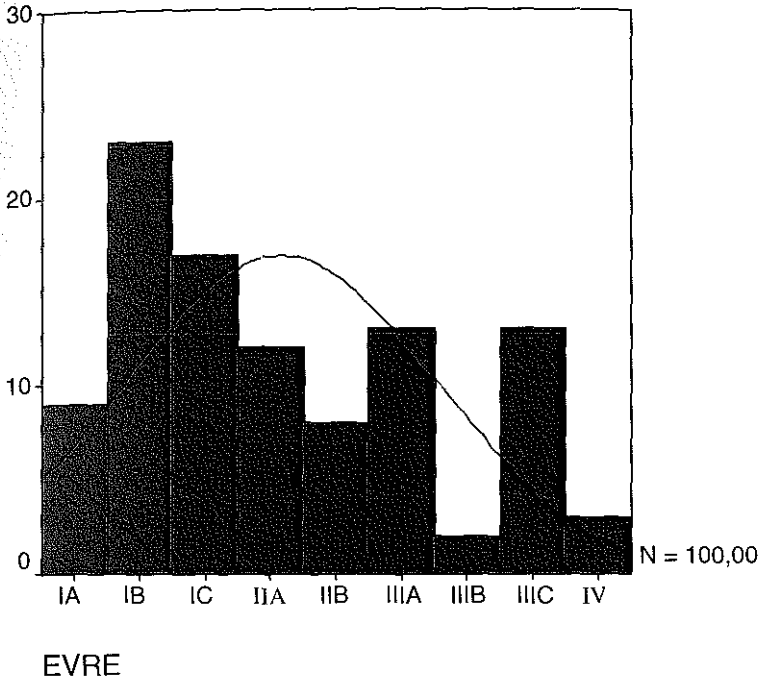
Beraberinde ikinci bir primer tümöre sahip hasta sayısı 7 tanedir (% 7). Bu olguların 1 tanesi malign miks müllerian (% 1) , 1 tanesi overin sklerozing stromal tümörü (% 1) , 3 tanesi overin yüzey epitel tümörlerinden endometrioid adenokarsinom (% 3) , 2 tanesi primer meme karsinomudur (% 2) .

Endometrioid tipte endometrium tümörü yanısıra berrak hücreli endometrium adenokarsinomuna sahip 3 olgu (% 3) ve müsinöz endometrium adenokarsinomuna sahip 1 olgu (% 1) saptanmıştır.

Hastaların FIGO'ya göre, 9 tanesi Evre IA (% 9), 23 tanesi Evre IB (%23), 17 tanesi Evre IC (%17), 12 tanesi Evre IIA(%12), 8 tanesi Evre IIB (%8), 13 tanesi Evre IIIA(%13), 2 tanesi Evre IIIB (%2), 13 tanesi Evre IIIC (%13) ve 3'ü Evre IV (%3) olarak saptanmıştır.

Olguların evrelere göre dağılım grafiği Şekil 4.1’de sunulmuştur.

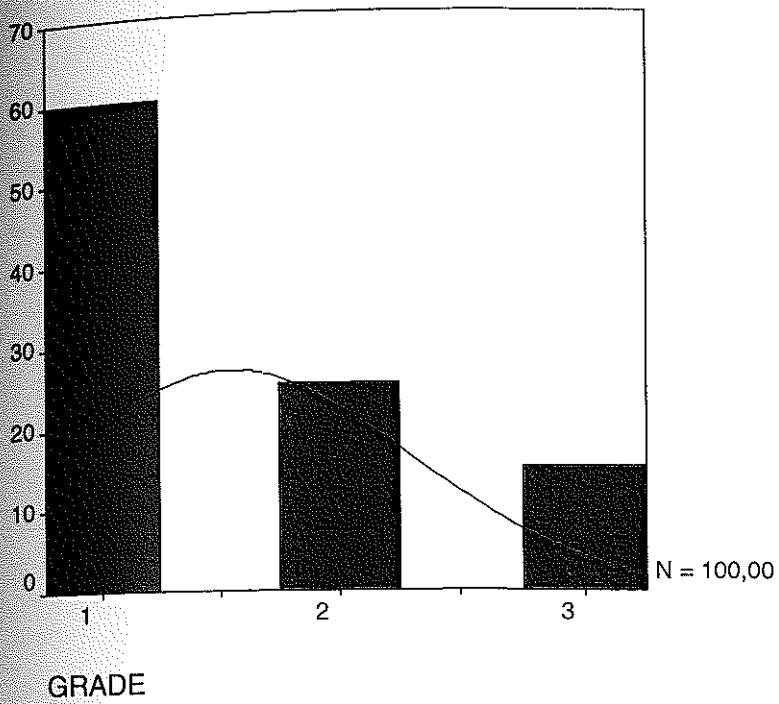
Şekil 4.1: Olguların Evrelere Göre Dağılımı



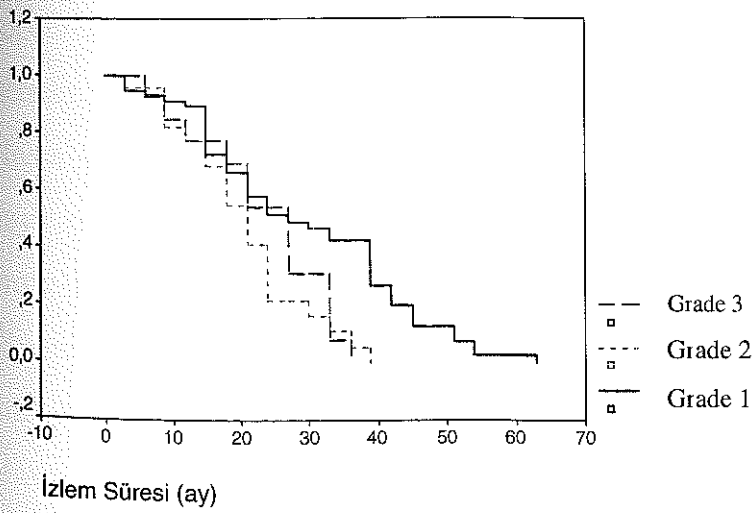
Çalışmaya alınan hasta tümörlerinin 60 tanesi Grade 1 (% 60), 25 tanesi Grade 2 (%25) ve 15 tanesi Grade 3 (% 15)’tür. Olguların tümör grade’ine göre dağılımı Şekil 4.2’de verilmiştir.

Şekil 4.3’de ise olguların gradelerine göre yaşam süreleri verilmiştir. Şekilden de izlendiği gibi en yüksek yaşam süresi ortalama 48.17 ay ile Grade 1’e aittir. Daha sonra ise 33.64 ay ile Grade 2 ve 30.85 ay ile de Grade 3 sıralanmaktadır.

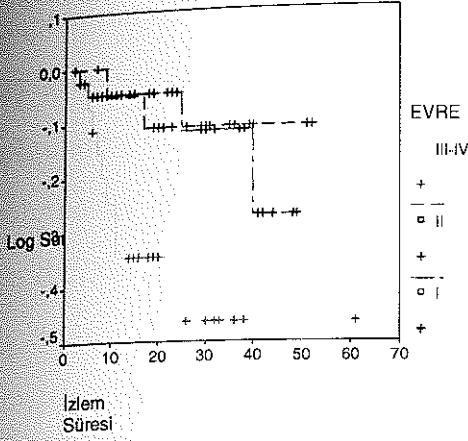
Şekil 4.2: Olguların Grade'lere Göre Dağılımı



Şekil 4.3: Olguların Grade'lerine Göre İzlem Süreleri



Şekil 4.4: Olguların Evrelerine Göre İzlem Süreleri



Olguların evrelerine göre yaşam süreleri Şekil 4.4'de verilmiştir. Evre I'de yaşam olasılığı %91.1, Evre II'de %90.0 ve Evre III-IV'de %70'dir (p:0.012).

Hastaların tümünde ilk olarak cerrahi tedavi uygulanmıştır. Cerrahi tedavi total abdominal histerektomi ve bilateral salpingooferektomi ve pelvik lenf düğümü diseksiyonundan oluşmaktadır.

Hastaların hiçbirisi daha öncede herhangi bir tedavi almamıştır. 12 hastaya kemoterapotik olarak Paklitaksel + Karboplatin protokolü uygulanmıştır (% 12). Olguların 81 tanesine eksternal radyoterapi ve brakiradyoterapi olmak üzere 3 ile 5 seans arası radyoterapi uygulanmıştır.

Hastaların rutin takiplerinde abdominopelvik ultrasonografi, normal fizik ve jinekolojik muayene yer almıştır. Nüksü olan 4 olgu (% 4) tespit edilmiştir.

Sağ kalım süresi ilk tanı ile ölüm arasındaki veya hasta yaşıyorsa ilk teşhisten bugüne kadar geçen süre olarak tanımlanmıştır.

Çalışmamıza dahil edilen olguların en az 2, en fazla 61 ay takip edildiği saptanmıştır. Ortalama izlem süresi 21.56 ± 13.69 aydır.

Yaş grupları arasında sağ kalım süresi karşılaştırıldığında, 45 yaş altı olgularda ortalama sağ kalım süresi 29.70 ± 8.80 ay, 45 yaş ve üzeri olgularda ortalama sağ kalım süresi 22.70 ± 13.86 ay olup, iki grup arasında istatistiksel fark saptanamamıştır ($p: 0.09$).

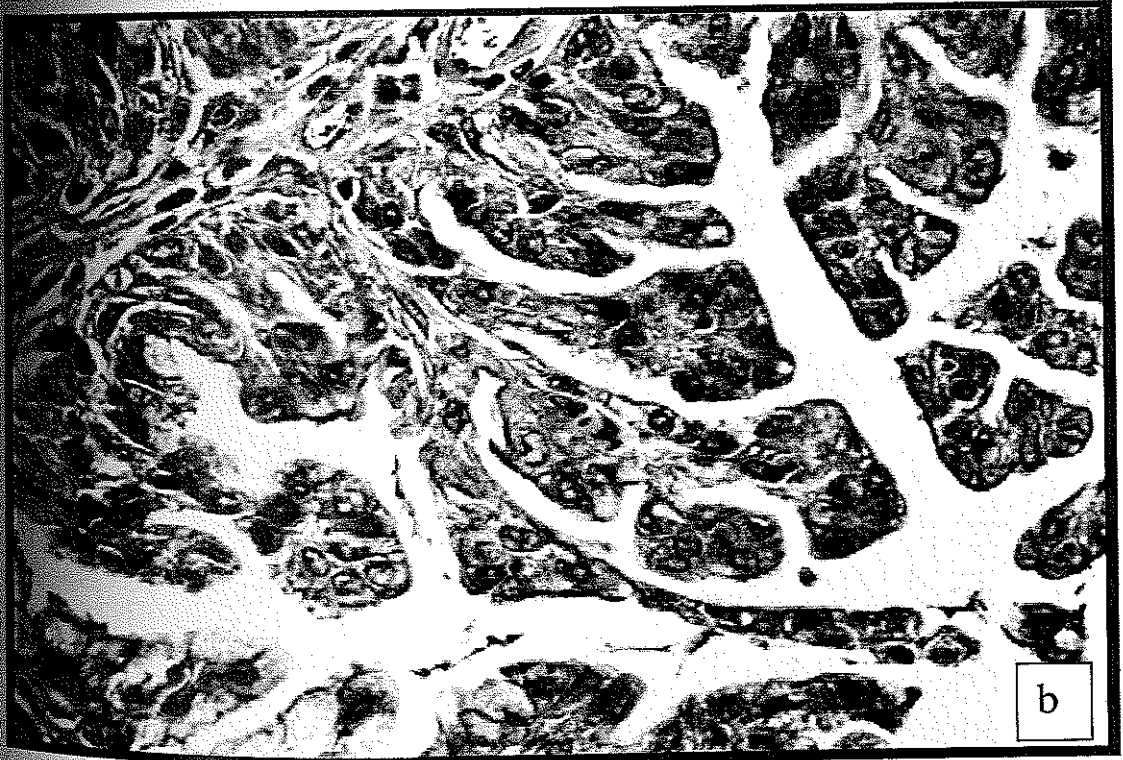
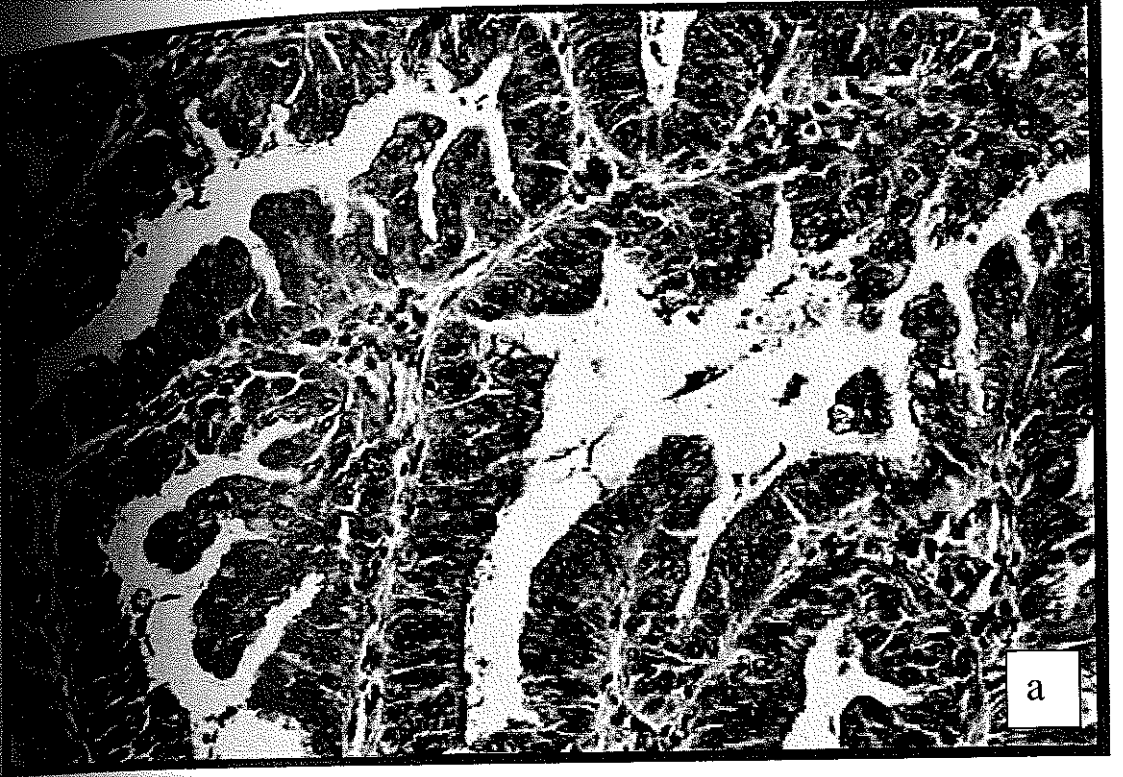
Olguların 15 (% 15) tanesi takip süresi içerisinde kaybedilmiştir. Hastalardan 6 tanesinin ölüm nedeni endometrium tümöründen bağımsız olup myokard infarktüsü, serebrovasküler olay ve kalp yetmezliği gibi tümör dışı nedenlere bağlıdır.

Hastalar aile hikayesi açısından sorgulandığında yalnız 1 olgunun 1. derece yakınında endometrium kanser öyküsü saptanmıştır.

Tüm olguların % 55'i HIF-1 α skorlama sistemine göre düşük skor gösterirken, %45'i yüksek skor göstermiştir(Şekil 4.5).

Evre I olguların %91.8'inde düşük skor saptanırken, % 8.2'sinde yüksek skor saptanmıştır. Evre II olgularda bu oran her iki skor için %50'dir. Evre III ve IV olguların hepsinde yüksek skor saptanmıştır (Çizelge 4.1). Ve olguların evrelerine göre HIF-1 α ekspresyonu arasında istatistiksel olarak fark saptanmıştır ($p: 0.000$).

Şekil 4.5. HIF-1 α ekspresyonu a) x200 b) x400 büyütme



Çizelge 4.1: Olguların Evrelerine Göre HIF-1'in Dağılımı

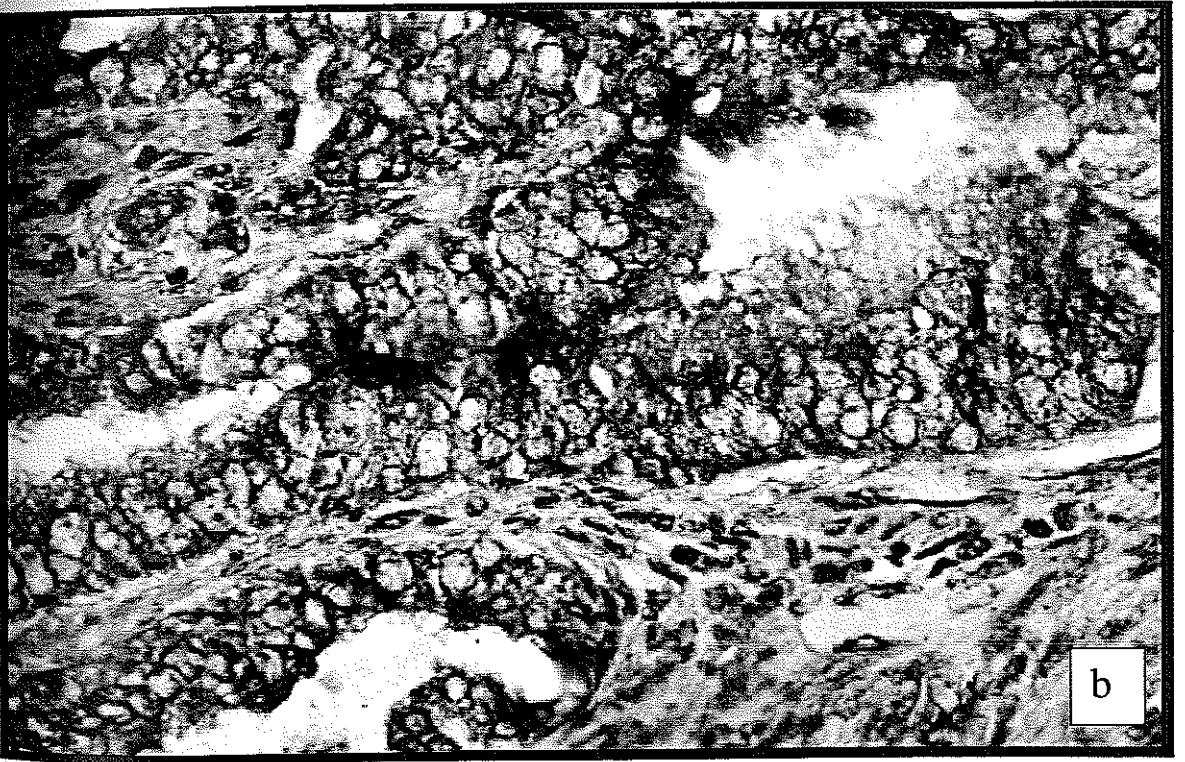
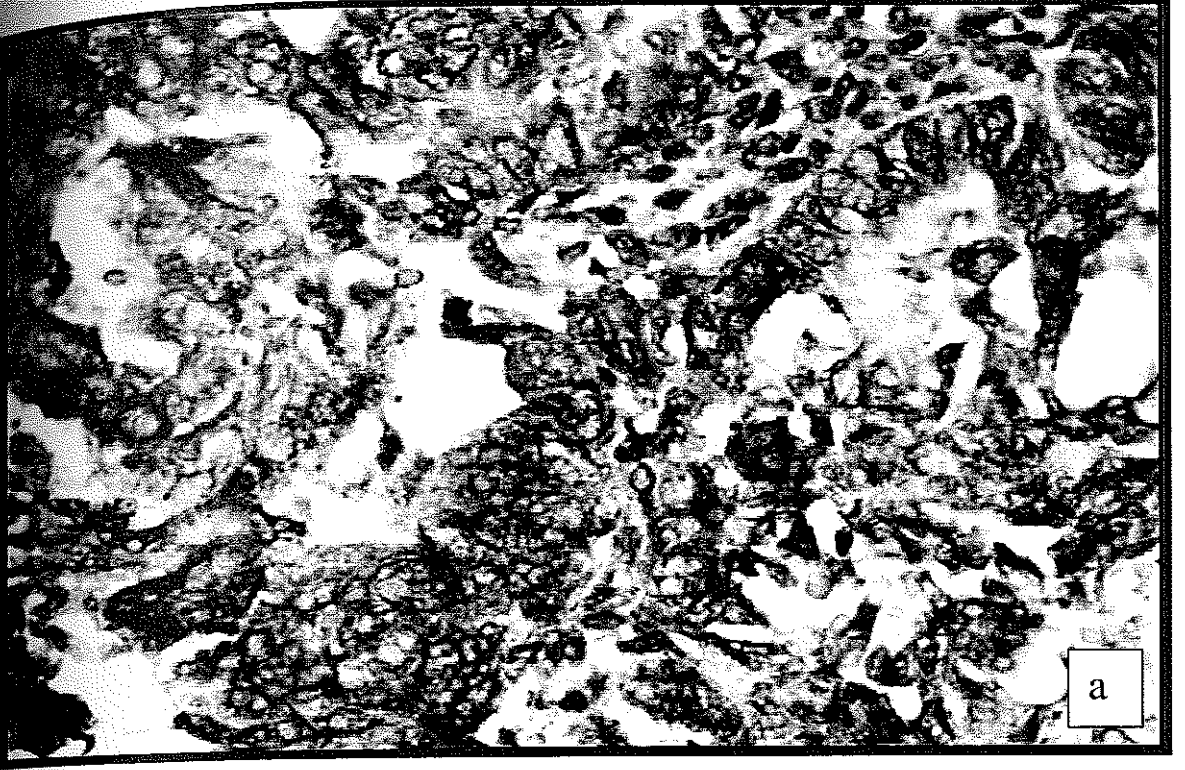
Evre	HIF-1			
	Düşük Skor		Yüksek Skor	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
I	45	91.8	4	8.2
II	10	50.0	10	50.0
III-IV	0	0.0	31	100.0
Toplam	55	55	45	45

Tüm olguların VEGF ekspresyonları immünreaksiyon gösteren tümör alanının oranına göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.6). Bulunan sonuçlarının ortanca değeri ile belirlenen cut-off noktası %38'dir. Buna göre, düşük ve yüksek reaktivite gösteren olgular sınıflanmıştır. Olguların % 64'ü düşük reaktivite gösterirken, %36'sı yüksek reaktivite göstermiştir (Çizelge 4.2). Ve Evre ile VEGF ekspresyonu arasında istatistiksel olarak ilişki saptanmıştır (p:0.000).

Çizelge 4.2: Olguların Evrelerine Göre VEGF Dağılımı

Evre	VEGF			
	Düşük Reaktivite		Yüksek Reaktivite	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
I	47	95.9	2	4.1
II	14	70.0	6	30.0
III-IV	3	9.7	28	90.3
Toplam	64	64	36	36

Şekil 4.6. VEGF ekspresyonu x400 büyütme (a,b)



Çizelge 4.2’de izlendiği gibi Evre I olguların %95.9’unda düşük reaktivite saptanırken, % 4.1’inde yüksek reaktivite saptanmıştır. Evre II olgularda bu oran sırasıyla %70.0’e % 30’dur. Evre III-IV olgularda ise düşük reaktivite gösterenler % 9.7’iken, yüksek reaktivite gösterenler % 90.3’dür.

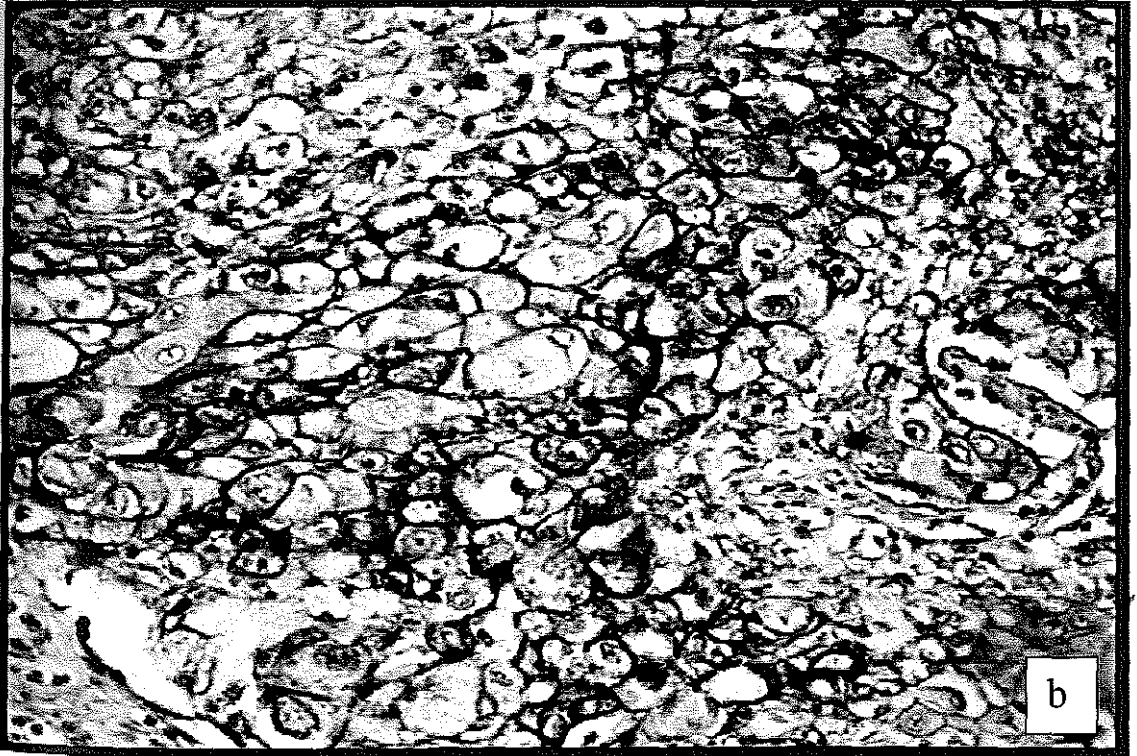
GLUT-1 ekspresyonu özel bir skrolama sistemine göre değerdendirilmiştir (Şekil 4.7). Bu skrolama sistemine göre tüm olguların % 13’ü skor 0, % 26’sı skor 1, % 24’ü skor 2, %20’si skor 3 ve % 17’si skor 4 ekspresyon göstermiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3:Olguların Evrelerine Göre GLUT-1Ekspresyonu Dağılımı

Evre	GLUT-1				
	0	1	2	3	4
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
I	13 (26.5)	26 (53.1)	10 (20.4)	0	0
II	0	0	14 (70.0)	6 (30.0)	0
III-IV	0	0	0	14 (45.2)	17 (54.8)
Toplam	13 (13.0)	26 (26.0)	24 (24.0)	20 (20.0)	17 (17.0)

Evre ile GLUT-1 ekspresyonu istatistiksel olarak fark saptanmış (p:0.000) olup evrelere göre GLUT-1 skor dağılımı Çizelge 4.3’de verilmiştir. Çizelgeden de izlendiği gibi Evre I olguların %26.5’inde skor 0, % 53.1’inde skor 1 ve %20.4’ünde skor 2 saptanmıştır. Evre II skor 0 ve 1’de olgu izlenmemişken skor 2’de 14 (%70.0), skor 3’de 6 (%30.0) olgu saptanmıştır. Evre III ve IV olgularda ise, skor 3’de 14 (%45.2), skor 4’de 17 (%54.8) olgu saptanmıştır.

Şekil 4.7. GLUT-1 ekspresyonu a) x100 b) x200 büyütme



CD 34 ile belirlenen mikrodamar yoğunluğu (MDY) tüm vakalar içinde ortalama 49.88 ± 22.91 olarak bulunmuştur (Şekil 4.8).

Evre I olgularda saptanan ortalama MDY 31.87 ± 7.73 'dür. Evre II olgularda MDY 49.24 ± 7.60 iken Evre III-IV olgularda 78.74 ± 14.48 'dir. Olguların evreleri ile MDY'leri arasında istatistiksel olarak fark saptanmıştır ($p:0.000$).

Olguların grade'leri ile HIF-1 α , GLUT-1, VEGF ekspresyonları ve MDY arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ve p değerleri sırasıyla 0.98, 0.43, 0.52 ve 0.65'dir.

HIF-1 α ile GLUT-1 ekspresyonu arasında %82.9, VEGF ekspresyonu arasında %78.7 ve MDY arasında %78.5 oranında korelasyon saptanmıştır ($p:0.000$)

VEGF ile GLUT-1 ekspresyonu arasında %78.1 ve MDY arasında %85.0 oranında korelasyon saptanmıştır ($p:0.000$).

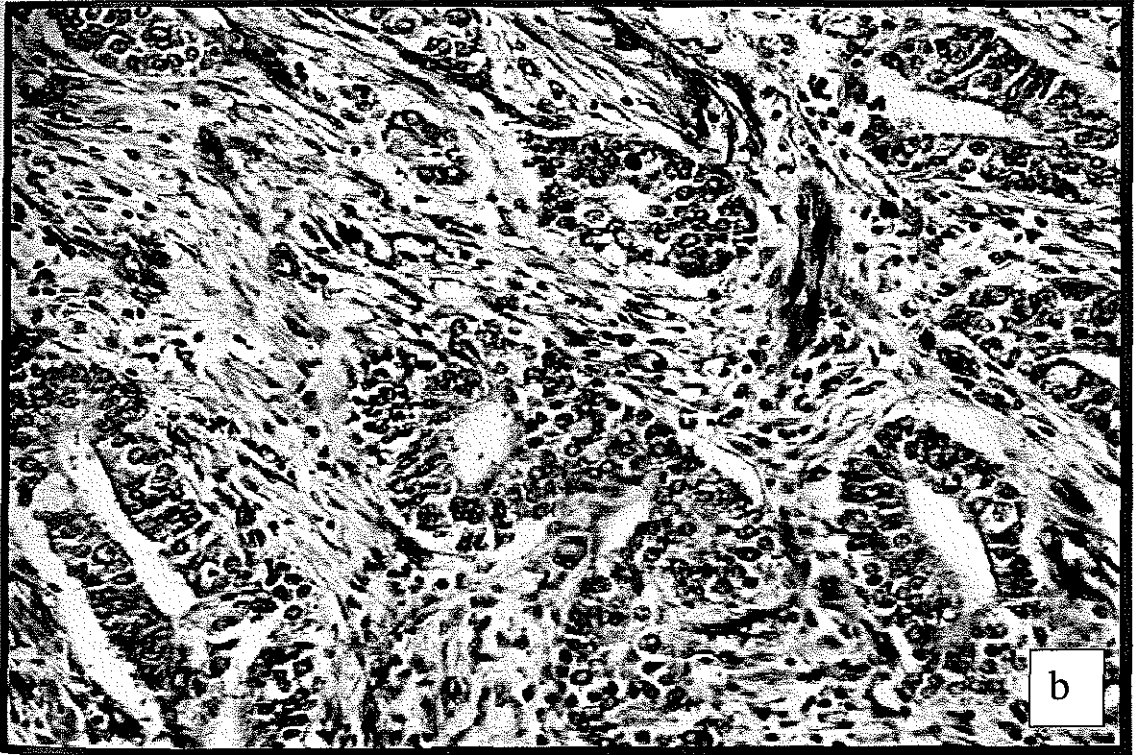
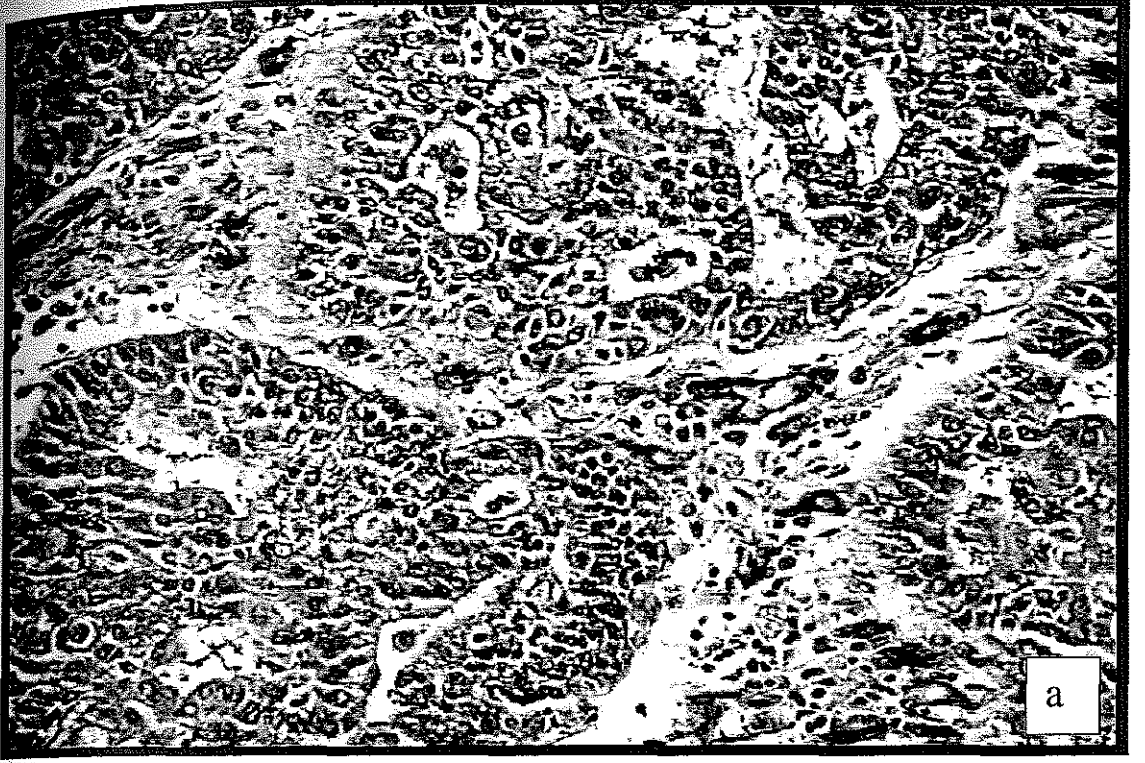
MDY ile GLUT-1 ekspresyonu arasında ise %91.5 oranında korelasyon vardır ($p:0.000$).

Çizelge 4.4 : GLUT-1VEGF HIF 1 α ve MDY Arasındaki Korelasyon Oranı

Correlations					
		glut1	vegf	hif	cd34
glut1	Pearson Correlation	1	,781**	,829**	,915**
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000
	N	100	100	100	100
vegf	Pearson Correlation	,781**	1	,787**	,850**
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,000
	N	100	100	100	100
hif	Pearson Correlation	,829**	,787**	1	,785**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,000
	N	100	100	100	100
cd34	Pearson Correlation	,915**	,850**	,785**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	
	N	100	100	100	100

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Şekil 4.8. Mikrodamar yoğunluğu (CD 34) , x200 büyütme (a,b)



5.TARTIŞMA

Endometrial karsinomlar kadınlarda en sık görülen malignensiler içinde 5. sırada yer almakta ve kadın genital sistemi içinde incelendiğinde en sık izlenen tümör olarak bilinmektedir. Kansere bağlı kadın ölümlerinin %2'sinden sorumludur.

Mevcut tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve yeni tedavi metodlarının bulunması için bu hastalığın iyi tanınması gerekmektedir. Bu nedenle tümör yapısının ortaya konulmasını amaçlayan çalışmalarda, histopatolojik yaklaşım boyutları gün geçtikçe genişlemektedir.

Endometrial karsinomlarda prognozu belirleyen bir çok parametrenin önemi vurgulanmıştır. Hedef; günümüzde mevcut olan, cerrahi tedavi, sistemik kemoterapi ve radyoterapi gibi kullanılan tedavi metodlarına ek, etkili yeni teknikler geliştirmektir. Bu hedefe yönelik olarak en çok irdelenmiş ve popüler olan yeni parametre, anjiogenezdır.

Hastalığın sistemik kontrolü için cerrahi tedaviye eklenen kemoterapi ve radyoterapi için yanıt verecek uygun olguların seçimi en önemli basamaktır. Tedavi sistemlerinin morbidite ve mortalite risklerini minimize edebilmek ve rasyonel sonuçlara ulaşabilmek açısından da yeni prognostik parametrelere ihtiyaç vardır. Günümüzde bu amaca yönelik olarak, daha objektif parametre arayışları halen üzerinde yoğun olarak çalışılan konulardan biridir.

Uzun yıllar, rasyonel bir tedavi şekli belirlemek ve yaşam süresi tahmini için yapılan objektif kriter saptama çalışmaları göstermektedir

tüm parametreler birlikte değerlendirildiğinde , tek tek taşıdıkları değer artmaktadır.

Bu geniş serili çalışmada, endometrium adenokarsinomlarının endometrioid alt tipinde, CD 34 ile immünohistokimyasal olarak boyanan vasküler alanlar, küçük damar sayımı yöntemi ile değerlendirilmiş ve mikrodamar yoğunluğu belirlenmiştir. Endometrioid adenokarsinomlarda HIF-1 α , HIF-1 α ile ilişkili GLUT-1 ve anjiogenik faktör VEGF₁₆₅ ekspresyonu değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, tedavi şeklinin belirlenmesinde önem taşıyan prognostik parametreler ve araştırmamızda kullanılan immünohistokimyasal boyaların sonuçları tüm varyasyonlarda belirlenerek, aralarında ki ilişkinin gücü ve yönü saptanmıştır.

Yaş, endometrial karsinomda önemli bir bağımsız risk faktörüdür. Genç kadınlarda izlenen tümörler genellikle daha düşük grade ve daha az invaziv özelliğe sahiptir. Yapılan bir çalışma, 45 yaşdan daha genç kadınların, 45 yaş veya üzerindeki kadınlara göre daha iyi prognoza sahip olduklarını göstermiştir (72). Başka bir çalışmada ise, tümörün grade ve cerrahi evresinden bağımsız olarak, 50 yaş üzerinde surveyin düştüğü izlenmiş ve sonuçta yaşın anlamlı bir prognostik faktör olduğu vurgulanmıştır (73).

Bizim 100 olguluk serimizde yaş grupları arasında sağ kalım süresi karşılaştırıldığında, 45 yaş altı olgularda ortalama sağ kalım süresi 29.70 $\pm$ 8.80 ay, 45 yaş ve üzeri olgularda ortalama sağ kalım süresi 22.70 $\pm$ 13.86 ay olarak bulunmuştur. Bu iki grup arasında her ne kadar istatistiksel fark saptanamamış olsa da 45 yaş altı olguların nispeten daha uzun sağ kalım süresine sahip oldukları söylenebilir.

Zaino et al. FIGO histolojik gradeleme sisteminin önemini göstermek için klinik Evre I ve okült Evre II olan 600'den fazla hasta üzerinde univaryant analiz yapmışlar ve 5 yıllık yaşam oranlarını Grade 1 hastalarda %94, Grade 2'de %84, Grade 3'de %72 olarak rapor etmişlerdir (74).

Histolojik grade, diğer prognostik faktörlerle (yaş, evre, myometrial invazyon derinliği gibi) korelasyon göstermektedir. Bu nedenle prognostik önemi multivaryant analizlerle değerlendirilmiştir.

Çalışmaların sonucunda histolojik grade'in, tümörün rekürrensini veya surveyi göstermekten çok öncelikle lokal veya dissemine yayılımıla ilgili bilgi verdiği saptanmıştır. Bununla birlikte metastatik tümörü olan vakalarda (Evre III) hastanın surveyi hakkında bilgi verebileceğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (4).

Bizim çalışmamızdaki tümörlerin 60 tanesi Grade 1 (% 60), 25 tanesi Grade 2 (%25) ve 15 tanesi Grade 3 (% 15)'tür. Histolojik grade ile hastaların sağ kalım sürelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında daha önce yayınlanmış çalışmalarla benzer bulgulara ulaşılmıştır. Grade 1 vakaların sağ kalım süreleri, Grade 2 ve Grade 3 vakalara oranla istatistiksel olarak anlamlı yüksektir.

Jinekolojik kanserlerin evrelemesinde FIGO ve TNM standartizasyonu sağlamıştır. Evre, tanı anında hastalığın yaygınlığını ifade etmekte ve endometrial kanserlerde prognozu belirleyen en önemli parametre olarak bilinmektedir. Ayrıca tedavi planı da tümörün evresine göre belirlenmektedir.

Wolfson et al. ve Maneschi et al. çalışma sonuçlarına göre 5 yıllık yaşam oranlarına ait veriler şöyledir ; Evre I'de %90(Evre

IA'da %93,8 , Evre IB'de %95,4 , Evre IC'de %75) ,Evre II'de %83 ve Evre III'de %43'dür.

Bu çalışmada vakaların 9 tanesi Evre IA (% 9), 23 tanesi Evre IB (%23), 17 tanesi Evre IC (%17), 12 tanesi Evre IIA(%12), 8 tanesi Evre IIB (%8), 13 tanesi Evre IIIA(%13), 2 tanesi Evre IIIB (%2), 13 tanesi Evre IIIC (%13) ve 3'ü Evre IV (%3) olup, sağ kalım süreleri ile evreleri arasında anlamlı bir fark bulunmamış olmasına rağmen evre arttıkça hastaların sağ kalım oranı % 70'e düşmektedir.

Bazı çalışmalarda atipik endometrial hiperplazi ve değişik metaplaziler (silialı ve eozinofilik metaplazi gibi) ile birlikte izlenen Endometrioid Adenokarsinomların daha iyi prognoza sahip oldukları gösterilmiştir (45).

Bizim serimizde, endometrial hiperplazi zemininde tümör gelişmiş 6 tane olgu (% 6) saptanmıştır. Bu olgulardan 1 tanesi primer meme karsinomu nedeniyle 6 yıl boyunca Tamoksifen tedavisi almıştır. Ancak istatistiksel değerlendirme sonucunda bizim bulgularımızla, bahsedilen çalışmalardaki sonuca ulaşamamıştır (p:0.71).

Tümöral hücrenin büyümesi, hücre kinetiği dışında çok çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Anjiogenez tümöral bir lezyonun gelişiminde rol oynayan en önemli faktörlerden olup, tümöral dokunun oksijen ve glikoz difüzyonundan sorumludur (5,6,7,8) . Ayrıca yeni oluşan damarlara ait endotel hücreleri yoluyla aktif olarak salgılanan büyüme faktörleri ile tümör hücrelerini uyararak, tümör kütlelerinde artışa da neden olmaktadır. Anjiogenez, metastazın gelişiminde ve prekürsör lezyonların invaziv tümörlere dönüşümünde de rol oynamaktadır (10,11,12) .

Meme, akciğer, kolorektal, mesane, baş ve boyun tümörleri gibi çeşitli tümör tipleri üzerine yapılmış birçok çalışma sonucunda da mikrodamar yoğunluğu ile hasta yaşam süresi arasında ters bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (33).

Endometrium adenokarsinomlarında yüksek mikrodamar yoğunluğunun bağımsız ve kötü bir prognostik faktör olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Kirschner et al. çalışmalarında, yüksek anjiogenik aktivite gösteren ve göstermeyen endometrial karsinomları incelemişlerdir. Sonuç olarak, yüksek anjiogenik aktivite gösteren endometrial karsinomların sınırlı anjiogenez gösteren gruba göre, daha kısa sağ kalım süresine sahip olduklarına dikkat çekmiştir (75).

Kaku et al.'ın çalışmasında ise, Evre I ve Evre II endometrial karsinomlarda mikrodamar yoğunluğunun histolojik grade, myometriyal invazyon ve lenfovasküler tutulum ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (76).

Giatromanolaki et al.'ın bir çalışmasında, Evre I endometrial karsinomların endometrioid alt tipinde, intratümöral anjiogenezin kötü bir prognostik faktör olduğu vurgulanmıştır (1).

Bazı çalışmalarda ise mikrodamar yoğunluğu ve prognoz arasında her zaman pozitif bir korelasyonun olmadığı bulunmuştur. Primer akciğer tümörleri üzerine yayınlanmış olan bir makalede, parankimal hasar belirgin olmadığı ve alveoler paternin korunduğu durumlarda, bu grup tümörlerin anjiogenik paternli tümörlerden daha kötü prognoza sahip oldukları gösterilmiştir (77,78).

Bizim serimizde, endometrial karsinomlar üzerine yapılmış pek çok çalışmada gösterildiği gibi, hastaların evreleri ile mikrodamar yoğunluğu korele bulunmuştur (%89.0 p:0.000). Evrenin bağımsız bir

prognostik gösterge olması nedeniyle, mikrodamar yoğunluğunun da kötü bir prognostik faktör olduğu sonucuna varılabilir.

İnterensek bir hipoksi belirleyicisi olan HIF-1, hücrel oksijen hemostazında ve adaptasyonunda rol oynayan anahtar faktörlerdendir (19,20,21). Tümör hipoksisini ve dolaylı şekilde kanlanma miktarını ölçen non-invaziv bir yöntem geliştirmek amacıyla son yıllarda HIF-1 üzerine çeşitli tümör tiplerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Araştırmalarda HIF-1'in aktivitesini belirleyen asıl bileşen HIF-1 α üzerine yoğunlaşmıştır.

Pek çok primer tümör üzerine yapılan, beyin, meme, kolon, akciğer, over ve prostat kanseri gibi primer tümörlerin incelendiği çalışmada, tümörlerinin 2/3'ünde ve metastatik tümörlerde HIF-1 α ekspresyonu bulunmuştur (11,24)

Zhong et al. tarafından 1999 yılında yayınlanmış bir çalışmada, uterin leiomyom ve meme fibroadenomu gibi benign tümörlerde HIF-1 α ekspresyonu olmamasına karşın, çoğu malign tümörde ekspresyon izlendiği bildirilmiştir. Yine bu çalışmada, tümör dokusu yanında insidental olarak bulunan, memenin komedo tip duktal karsinoma in situ gibi erken neoplastik lezyonlarda HIF-1 α ekspresyonu tespit edilmiş ve artmış HIF-1 α ekspresyonunun, tümör progresyonunda erken aşamalarda görülebileceği sonucuna varılmıştır (24). Benzer sonuca ulaşmış kolon adenomu ve prostatik intraepitelyal neoplazi üzerine yapılmış araştırmalar da bulunmaktadır.

Giatromanolaki et al.'ın çeşitli tümör tipleri üzerine yaptıkları pek çok çalışmada da benzer sonuçlara ulaşılmıştır. HIF-1 α 'nın ekspresyonunun değerlendirildiği bu çalışmalarda, akciğer tümörlerinde % 63 , baş-boyun kanserlerinde % 52 ve endometrial karsinomlarda % 49 oranında HIF-1 α 'nın ekspresyonunda artış tespit

edilmiştir (79,80,81) . Aynı çalışma grubunun HIF-1 üzerine malign melanomlarda yaptığı çalışmada HIF-1 α ekspresyonunun önemini vurgulamaktadır (68).

Ryan et al.'ın çalışmasında ise HIF-1'in doğrudan tümör büyümesi ile ilişkili olduğu, bunu VEGF ekspresyonu üzerine olan etkisinden bağımsız olarak gerçekleştirdiği bulunmuştur (8) .

Birner ve arkadaşlarının bir çalışmasında ise, serviks karsinomlarında HIF-1 α 'nın bağımsız bir kötü prognostik faktör olduğu bulunmuştur (12).

Bizim çalışmamızda, endometrial karsinomlarda HIF-1 α 'nın kötü bir prognostik faktör olduğu sonucuna varılmıştır. Artan evre ve azalan yaşam oranı ile HIF-1 α ekspresyonu arasında pozitif korelasyon (%80.5 p:0.000) bulunmuştur. Evre I tümörlerde HIF-1 α ekspresyonu skora göre düşükken, Evre III ve Evre IV tümörlerde HIF-1 α ekspresyonu yüksek skor almıştır.

Bazı çalışmalarda tümörün diferansiyasyonu ile HIF-1 α ekspresyonunun ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle meme kanserlerinde, kötü diferansiye lezyonların nispeten daha yüksek HIF-1 α ekspresyonu gösterdiği bildirilmiştir (82,83). Ancak bizim bulgularımıza göre endometriyal tümörlerin grade'i ile HIF-1 α ekspresyonu arasında korelasyon yoktur.

HIF-1 ile regüle edilen VEGF, en potent anjiogenik faktörlerden biridir. Kapiller proliferasyon uyararak, dokunun kanlanmasını, oksijen ihtiyacı ve diğer metabolik gereksinimlerini karşılamasını sağlar (28).

VEGF mRNA'sı malign insan ve hayvan tümör hücrelerinde büyük oranda yapılmaktadır. Meme, tiroid, akciğer, mide, kolon,

ciğer, mesane, over ve serviks karsinomlarında, anjiosarkomlarda, tüm hücreli tümörlerde, santral sinir sistemi tümörlerinde VEGF ekspresyonu gösterilmiştir.

Benign tümörler üzerine daha az sayıda çalışma yapılmıştır. Kolonun benign adenomatöz poliplerinde VEGF ekspresyonu değerlendirilmiş ve elde edilen veriler normal kolonik mukozadaki VEGF ekspresyonu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamıştır (55).

Memenin duktal karsinoma in situ alanları üzerine yapılan bir çalışmada, tümörün invazyon öncesinde VEGF mRNA'sını yüksek oranda yaptığı gösterilmiştir (56).

VEGF'in anjiogenez ve tümör gelişimindeki kritik rolü mesane, meme, gastrik ve diğer malignansilerdeki prognostik anlamı ile ispatlanmıştır (13). Yüzeysel mesane kanserinde artmış VEGF mRNA seviyesi progresyonun erken dönemini ve relapssız dönemin kısılacağını ifade etmektedir (29). Ayrıca VEGF ekspresyonunun meme tümörlerinde de hasta surveyleri ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur (30).

VEGF ekspresyonunun spesifik olarak endometrium adenokarsinomlarının onkogenezin ve genel olarak onkogeneizde önemli rol oynadığı da gösterilmiştir (31).

Bizim serimizde, endometrioid tip endometrium adenokarsinom olgularında, cerrahi ve klinik evre ile VEGF ekspresyonu arasında pozitif korelasyon (%76.1 p:0.000) bulunmuştur.

Dikkat çekici bir diğer bulgu, VEGF ekspresyonu ile mikrovasküler yoğunluk arasında % 85'lik bir korelasyonun olmasıdır. VEGF'nin anjiogenezde oynadığı önemli rol nedeniyle elde edilen bu bulgu, beklenen bir sonuçtur. Pek çok çalışma da bu sonucu

desteklemektedir. Kolorektal kanserlerde VEGF ekspresyonu ile anjiogenez ve tümörün evresi arasında kuvvetli korelasyon olduğu bildirilmiştir (84,85).

Erken neoplastik lezyonlarda HIF-1 α ekspresyonunun, VEGF aracılığıyla ve olası diğer HIF-1 ile regüle edilen anjiogenik faktörler aracılığıyla, vaskülarizasyonu artırdığı bulunmuştur (24). Jiang et al.'ın çalışmasında da, kolorektal adenomdan karsinoma geçiş zincirinde HIF-1 α ekspresyonunun arttığı ve bunun artmış VEGF ekspresyonu ve mikrodamar yoğunluğu ile korele olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, VEGF ekspresyonu ve HIF-1 α ekspresyonu arasında % 78,7'lik bir korelasyon bulunmuştur.

HIF-1'in anjiogenezde rol alan VEGF gibi anjiogenik faktörlerle ilişkisi ve pek çok çalışmada gösterilmiş pozitif korelasyonu düşünülürse, HIF-1 ile anjiogenez arasında da benzer korelasyonun bulunması şaşırtıcı olmayacaktır.

Beyin tümörlerinde, over tümörlerinde ve duktal karsinoma in sitularda vasküler yoğunluk ile HIF-1 α ekspresyonu arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir (86). Bizim çalışmamız sonucunda bulduğumuz literatürlerle uyumlu olarak, % 78,5'lik bir pozitif korelasyondur.

GLUT-1, glukoz taşıyıcı ailesinden Na-bağımsız glukoz transportu yapan plazma membranında lokalize bir moleküldür. GLUT-1 ekspresyonu pek çok ajanla ve çok çeşitli durumlarda stimüle edilmektedir. GLUT-1 ekspresyonunu ve fonksiyonunu artıran

tüm mekanizmalar hipoksi ile harekete geçirilebilmektedir. Nitekim hipoksi ile ilişkili olarak hücre içinde ekspresyonu artan HIF-1'in GLUT-1 geninin transkripsiyonunu indüklediği de bilinmektedir.

Yapılan pek çok çalışma ile, hücre membranı üzerinde immünohistokimyasal olarak gösterilen GLUT-1 artışının tümörle ilişkisi araştırılmıştır.

Bu konuyla ilgili olarak özellikle baş-boyun tümörlerinde yoğun araştırmalar yapılmıştır. Weiner et al.'ın çalışmasında baş- boyun bölgesinde izlenen kistik yassı epitel hücreli karsinom ile benign kistik skuamöz lezyonu ayırt etmede GLUT-1'in kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (63). Baş ve boyun yassı epitel hücreli tümörler üzerine yapılmış olan diğer bir çalışmada ise GLUT-1 ekspresyonunun displazik lezyonlarda ve yassı epitel hücreli karsinomlarda arttığı gösterilmiş, baş ve boyun yassı epitel hücreli tümörlerin gelişiminde erken dönemlerde GLUT-1 ekspresyonunun varlığı vurgulanmıştır (64).

Kolorektal kanserler üzerine yapılmış çalışmalarda, GLUT-1'in kötü prognozun göstergesi olarak kabul edilebileceği ve önümüzdeki dönemlerde tedaviye cevabın göstergesi olarak kullanılabileceği yorumu yapılmıştır (65).

Mesaneinin transisyonel hücreli karsinomunda agresif biyolojik potansiyelle ilgili bilgi verdiği gösterilmiştir (66).

Akciğer üzerine yapılan çalışmalarda, daha iyi prognoza sahip bronşioalveoler karsinomda diğer tiplere kıyasla daha düşük GLUT-1 ekspresyonunun izlendiği (67) ve küçük hücreli akciğer karsinomlarında GLUT-1 ekspresyonunun kötü prognoz göstergesi olduğu kanıtlanmıştır (10).

Bizim çalışmamızda da benzer şekilde GLUT-1 ekspresyonu ile evre arasındaki korelasyon oranı %89.5'dir (p:0.000). Ayrıca çalışmamızda, GLUT-1'in VEGF ile (%78), HIF-1 α ile (%82,9) ve mikrodamar yoğunluğu ile (% 91,5) korele olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda, endometrium adenokarsinomlarının endometrioid alt tipinde HIF-1 α , GLUT-1 ve VEGF₁₆₅ ekspresyonunun birbirleriyle, anjiogeneze ve prognozla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

HIF-1 α , çalıştığımız diğer molekülleri mRNA transkripsiyonu üzerinden yada fonksiyonları üzerinden etkilemekte ve anjiogenezi dolaylı olarak uyarmaktadır. Ancak tüm bu faktörlerin iç içe geçtiği ve birbirlerinden bağımsız düşünülmemesi gerektiği unutulmamalıdır.

Endometrium adenokarsinomları üzerine yaptığımız bu çalışmanın, bu tümör tipinde uygulanan cerrahi tedaviye, radyoterapiye ve kemoterapiye ek olarak, hastaya spesifik anti-anjiogenik tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkıda bulunabileceği düşüncesindeyiz.

6.SONUÇLAR

Bu çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı rutin ve immünöhistokimya laboratuvarında yapılmıştır.

Çalışmaya retrospektif olarak, 2000-2005 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda endometriumun 'Endometriotik Adenokarsinom' tanısı konmuş 100 hasta alınmıştır.

Çalışmamızda, Endometrium Adenokarsinomlarının Endometriotik tipinde HIF-1 α , HIF-1 α ilişkili GLUT-1 ve VEGF ekspresyonunun birbirleriyle ve anjiogenezle ilişkisini araştırdık.

Çalışmaya alınan 100 hastanın yaş ortalaması 57.45 ± 9.08 (min:36- max:76) idi.

Hastalar aile hikayesi açısından sorgulandığında yalnız 1 olgunun 1. derece yakınında endometrium kanser öyküsü saptanmıştır.

İzlenen tümörlerin 3 tanesi (% 3) polip üzerinde gelişmiştir. Endometrial hiperplazi zemininde gelişmiş 6 tane olgu (% 6) saptanmıştır.

Endometrioid tip endometrium tümörünün varyantlarından, oksifilik varyant 4 tümörde (% 4) izlenirken, silialı varyant 1 tümör vakasında (% 1) görülmüştür. Olguların 18 tanesinde ise (% 18) yassı epitel hücre diferansiyasyonu izlenmiştir.

Beraberinde ikinci bir primer tümöre sahip hasta sayısı 7 tanedir (% 7). Bu olguların 1 tanesi malign miks müllerian (% 1) , 1 tanesi overin sklerozing stromal tümörü (% 1) , 3 tanesi overin yüzey epitel

tümörlerinden endometrioid adenokarsinom (% 3) , 2 tanesi primer meme karsinomudur (% 2) .

Endometrioid tipte endometrium tümörü yanısıra berrak hücreli endometrium adenokarsinomuna sahip 3 olgu (% 3) ve müsinöz endometrium adenokarsinomuna sahip 1 olgu (% 1) saptanmıştır.

Hastaların FIGO'ya göre, 9 tanesi Evre IA (% 9), 23 tanesi Evre IB (% 23), 17 tanesi Evre IC (% 17), 12 tanesi Evre IIA (% 12), 8 tanesi Evre IIB (% 8), 13 tanesi Evre IIIA (% 13), 2 tanesi Evre IIIB (% 2), 13 tanesi Evre IIIC (% 13) ve 3'ü Evre IV (% 3) olarak saptanmıştır. Evre I'de yaşam olasılığı % 91.1, Evre II'de % 90.0 ve Evre III-IV'de % 70'dir (p:0.012).

Çalışmaya alınan hasta tümörlerinin 60 tanesi Grade 1 (% 60), 25 tanesi Grade 2 (% 25) ve 15 tanesi Grade 3 (% 15)'tür. En yüksek yaşam süresi ortalama 48.17 ay ile Grade 1'e aittir. Daha sonra ise 33.64 ay ile Grade 2 ve 30.85 ay ile de Grade 3 sıralanmaktadır.

Hastaların 12 tanesine kemoterapotik olarak Paklitaksel + Karboplatin protokolü uygulanmış (% 12), 81 tanesine eksternal radyoterapi verilmiştir.

Çalışmamıza dahil edilen olguların en az 2, en fazla 61 ay takip edildiği saptanmıştır. Ortalama takip süresi 21.56 ± 13.69 aydır. Takipler sırasında nüksü olan 4 olgu (% 4) tespit edilmiştir.

Olguların 15 (% 15) tanesi takip süresi içerisinde kaybedilmiştir. Hastalardan 6 tanesinin ölüm nedeni endometrium tümöründen bağımsız olup myokard infarktüsü, serebrovasküler olay ve kalp yetmezliği gibi tümör dışı nedenlere bağlıdır.

Yaş grupları arasında sağ kalım süresi karşılaştırıldığında, 45 yaş altı olgularda ortalama sağ kalım süresi 29.70 ± 8.80 ay, 45 yaş

ve üzeri olgularda ortalama sağ kalım süresi 22.70 ± 13.86 ay olup, iki grup arasında istatistiksel fark saptanamamıştır (p: 0.09).

Tüm olguların % 55'i HIF-1 α skorumasına göre düşük skor gösterirken, %45'i yüksek skor göstermiştir.

Evre I olguların %91.8'inde düşük skor saptanırken, % 8.2'sinde yüksek skor saptanmıştır. Evre II olgularda bu oran her iki skor için %50'dir. Evre III ve IV olguların hepsinde yüksek skor saptanmıştır. Ve olguların evrelerine göre HIF-1 α ekspresyonu arasında istatistiksel olarak fark saptanmıştır (p: 0.000).

Olguların % 64'ü VEGF için düşük reaktivite gösterirken, %36'sı yüksek reaktivite göstermiştir. Ve Evre ile VEGF ekspresyonu arasında istatistiksel olarak ilişki saptanmıştır (p:0.000).

Evre I olguların %95.9'unda düşük reaktivite saptanırken, % 4.1'inde yüksek reaktivite saptanmıştır. Evre II olgularda bu oran sırasıyla %70.0'e % 30'dur. Evre III-IV olgularda ise düşük reaktivite gösterenler % 9.7'iken, yüksek reaktivite gösterenler % 90.3'dür.

GLUT-1 skorumasına göre tüm olguların % 13'ü skor 0, % 26'sı skor 1, % 24'ü skor 2, %20'si skor 3 ve % 17'si skor 4 ekspresyon göstermiştir.

Evre ile GLUT-1 ekspresyonu istatistiksel olarak fark saptanmıştır (p:0.000). Evre I olguların %26.5'inde skor 0, % 53.1'inde skor 1 ve %20.4'ünde skor 2 saptanmıştır. Evre II skor 0 ve 1'de olgu izlenmemişken skor 2'de 14 (%70.0), skor 3'de 6 (%30.0) olgu saptanmıştır. Evre III ve IV olgularda ise, skor 3'de 14 (%45.2), skor 4'de 17 (%54.8) olgu saptanmıştır.

CD 34 ile belirlenen mikrodamar yoğunluğu (MDY) tüm vakalar içinde ortalama 49.88 ± 22.91 olarak bulunmuştur.

Evre I olgularda saptanan ortalama MDY 31.87 ± 7.73 'dür. Evre II olgularda MDY 49.24 ± 7.60 iken Evre III-IV olgularda 78.74 ± 14.48 'dir. Olguların evreleri ile MDY'leri arasında istatistiksel olarak fark saptanmıştır (p:0.000).

Olguların grade'leri ile HIF-1 α , GLUT-1, VEGF ekspresyonları ve MDY arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ve p değerleri sırasıyla 0.98, 0.43, 0.52 ve 0.65'dir.

HIF-1 α ile GLUT-1 ekspresyonu arasında %82.9, VEGF ekspresyonu arasında %78.7 ve MDY arasında %78.5 oranında korelasyon saptanmıştır (p:0.000)

VEGF ile GLUT-1 ekspresyonu arasında %78.1 ve MDY arasında %85.0 oranında korelasyon saptanmıştır (p:0.000).

MDY ile GLUT-1 ekspresyonu arasında ise %91.5 oranında korelasyon vardır (p:0.000).

ÖZET

Kadın genital sistemin tüm kanserleri içinde " Endometrium Adenokarsinomları " % 45 oranında izlenmektedir. Tüm Endometrium Adenokarsinom olgularının %80'i Endometrioid tiptedir .

Endometrium Adenokarsinomlu olguların prognozu histolojik ve klinik parametre ile ilişkilidir. Bunlar dışında belirlenecek yeni histopatolojik prognostik parametreler tedavinin planlanması aşamasında klinisyene ışık tutacaktır.

Anjiogenez ve hipoksiye hücrel adaptasyon mekanizmaları, tümör gelişiminde rol oynayan en önemli faktörlerdendir. Neovaskülarizasyonun olmadığı tümöral dokuda , oksijen ve glikoz difüzyonun sınırlanması, tümörün birkaç mm'den daha fazla büyümesini engeller. Ayrıca metastaz gelişiminde ve prekürsör lezyonların invaziv tümörlere dönüşümünde rol aldığı da bilinmektedir.

Tümörde neovaskülarizasyonun olmaması, oksijene ve diğer metabolitlere erişimde yetersizlik ile sonuçlanır ve bu durum kemoterapiye, radyoterapiye direnç gelişimine neden olur. Bioredüktif ilaçların aktivasyonu için de belli miktarda hücrel oksijen basıncına ihtiyaç vardır.

Tümör hipoksisini ve dolayısıyla kanlanma miktarını ölçen doğru, ucuz ve minimal invaziv bir yöntemin geliştirilmesi hastaya spesifik tedavinin geliştirilmesi için de önemlidir.

Bu çalışmada 100 adet endometriumun Endometriotik tip Adenokarsinomu olgusu kullanılmıştır. Doku örneklerine

immünohistokimyasal olarak 'streptoavidin-biotin-peroksidaz' yöntemi ile HIF-1 α , VEGF₁₆₅, GLUT-1 ve CD 34 uygulanmıştır. HIF-1 α , VEGF₁₆₅, GLUT-1 ekspresyonları değerlendirilirken, CD 34 ile mikrodamar yoğunluğu sayılmıştır.

HIF-1 oksijen hemostazında önemli bir faktördür. 2 subünitten oluşur. HIF-1 α , HIF-1'in aktivitesini belirlemektedir. HIF-1 tarafından aktive edilen çok sayıda transkripsiyon gen ürünü bulunmaktadır.

HIF-1 alfa'nın overekspresyonu hem primer hem metastatik tümörlerde izlenmektedir. Serviks karsinomlarında HIF-1 alfa'nın bağımsız bir prognostik olduğu bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda, endometrial karsinomlarda HIF-1 α 'nın kötü bir prognostik faktör olduğu sonucuna varılmıştır. Artan evre ve azalan yaşam oranı ile HIF-1 α ekspresyonu arasında pozitif korelasyon (%80.5 p:0.000) bulunmuştur.

HIF-1 tarafından aktive edilen VEGF bilinen en potent anjiogenetik faktörlerdendir. Kapiller proliferasyon uyarır ve dokunun kanlanmasını sağlar.

VEGF'in anjiogeneze ve tümör gelişimindeki kritik rolü mesane, meme, gastrik ve diğer malignansilerdeki prognostik anlamı ile ispatlanmıştır. Yüzeyel mesane kanserinde artmış VEGF progresyonun erken dönemini ve relapssız dönemin kısılacağını ifade etmektedir. VEGF ekspresyonunun meme tümörlerinde de hasta surveyleri ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Genel olarak onkogeneze ve spesifik olarak Endometrium Adenokarsinomlarında önemli rol oynadığı da gösterilmiştir.

Bizim serimizde, evre ile VEGF ekspresyonu arasında pozitif korelasyon (%76.1 p:0.000) bulunmuştur. Yine VEGF ekspresyonu ile mikrodamar yoğunluğu arasında % 85'lik bir korelasyon saptanmıştır.

Diğer bir transkripsiyon gen ürünü , glukoz tranporter ailesinden GLUT-1 'dir. GLUT-1 ekspresyonu HIF-1 stimülasyonu yanı sıra oksidatif fosforilasyonun azalması ile de kontrol edilmektedir.

GLUT-1 over ekspresyonunun Kolorektal kanserlerde ve Küçük hücreli akciğer karsinomlarında kötü prognoz göstergesi olduğu kanıtlanmıştır.

Bizim çalışmamızda GLUT-1 ekspresyonu ile evre arasındaki korelasyon oranı %89.5'dir (p:0.000). GLUT-1'in VEGF ile (%78), HIF-1 α ile (%82,9) ve mikrodamar yoğunluğu ile (% 91,5) korele olduğu da bulunmuştur.

En çok çalışılmış konulardan biri anjiogenezdır. Meme, akciğer, kolorektal, mesane, baş ve boyun tümörleri gibi çeşitli tümör tipleri üzerine yapılmış birçok çalışma sonucunda mikrodamar yoğunluğu ile hasta yaşam süresi arasında ters bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Endometrium adenokarsinomlarında yüksek mikrodamar yoğunluğunun bağımsız ve kötü bir prognostik faktör olduğu bilinmektedir.

Bizim çalışmamızda da, hastaların evreleri ile mikrodamar yoğunluğu korele bulunmuştur (%89.0 p:0.000). Evrenin bağımsız bir prognostik gösterge olması nedeniyle, bizim çalışmamızdan da mikrodamar yoğunluğunun kötü bir prognostik faktör olduğu sonucuna varılabilir.

Endometrium adenokarsinomlarının endometrioid alt tipinde HIF-1 α , GLUT-1 ve VEGF₁₆₅ ekspresyonunun birbirleriyle, anjiogeneze ve prognozla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bu faktörlerin kombine kullanımının endometrium adenokarsinomlarında prognozun göstergesi olarak klinisyene yardımcı olabileceği ve ayrıca

bu bilgilerin ışığında gelecekte hastaya spesifik tedavi protokollerinin geliştirilebileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI, Georgoulas V, Gatter KC, Harris AL. Intratumoral angiogenesis: a new prognostic indicator for stage I endometrial adenocarcinomas? *Oncol Res.* 1999; 11(4): 205-12.
2. Hendrickson M.R., Longacre T.A., Kempson R.L. The Uterine Corpus. In: Steinberg SS, Antonioli DA, Carter D, Mills SE, Oberman HA, (eds): *Diagnostic Surgical Pathology*. Third edition. Lippincott-Williams-Wilkins, Philadelphia, pp. 1999:2230-2241
3. Lurain J.R. Uterus kanserleri. İçinde: Berek J.S. (ed): *Novak Jinekoloji*. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1998: S.1090-1091
4. Ronnett B.M., Zaino R.J., Ellenson L.H., Kurman R.J. Endometrial Carcinoma. In: Kurman R.J. (ed): *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. Fifth edition. Springer-Verlag, New York, pp. 2002: 503-521
5. Maxwell P. H., Wiesener M. S., Chang G., Clifford S. C., Vaux E. C., Cockman M. E., Wykoff C. C., Pugh C. W., Maher E. R., Ratcliffe P. J. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature (Lond.)*, 1999; 399: 271-276
6. Dang C. V., Semenza G. L. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.*, 1999; 24: 68-72,
7. Zhong H., De Marzo A. M., Laughner E., Lim M., Hilton D., Zagzag D., Buechler P., Isaacs W. B., Semenza G. L., Simons J. W. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.*, 1999; 59: 5830-5835

8. Ryan H.E., Poloni M., McNulty W., Elson D., Gassmann M., Arbeit J. M., Johnson R.S. Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res.*,2000; 60: 4010-4015
9. Jiang B. H., Agani F., Passaniti A., Semenza G. L. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* 1997; 57: 5328-5335
10. Airley R., Loncaster J., Davidson S., Bromley M., Roberts S., Patterson A., Hunter R., Stratford I., West C. Glucose transporter Glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res* 2001 Apr;7(4):928-34.
11. Laughner E., Taghavi P., Chiles K., Mahon P.C., Semenza G.L. HER2(neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) synthesis: Novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 2001 Jun;21(12):3995-4004.
12. Birner P., Schindl M., Obermair A., Plank C., Breitenecker G., Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4693-4696
13. Jones A., Fujiyama C., Blanche C., Moore J.W., Fuggle S., Cranston D., Bicknell R., Haris A.L. Relation of vascular endothelial growth factor production to expression and regulation of hypoxia-inducible factor-1 α and hypoxia-inducible factor-2 α in human bladder tumors and cell lines. *Clin Cancer Res* 2001 May;7(5):1263-72.

14. Hockel M., Schlenger K., Aral B., Mitze M., Schaffer U., Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1996; 56: 4509-4515
15. Brizel D. M., Dodge R. K., Clough R. W., Dewhurst M. W. Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother. Oncol.* 1999; 53: 113-117
16. Teicher B. Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 1994; 13: 139-168
17. Stratford I. J. Bioreductive drugs in cancer therapy. *Br. J. Radiol.* 1992; 24 (Suppl.): 128-136
18. De Jaeger K., Merlo F. M., Kavanagh M. C., Fyles A. W., Hedley D., Hill R. P. Heterogeneity of tumor oxygen: relationship to tumour necrosis, tumor size, and metastasis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1998; 42: 717-721
19. Birner P., Schindl M., Obermair A., Breitenecker G., Oberhuber G. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in epithelial ovarian tumors. Its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2001 Jun;7(6):1661-8.
20. Semenza G. L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1999; 15: 551-578
21. Jiang B. H., Semenza G. L., Bauer C., Marti H. H. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: C1172-C1180

22. Wang G. L., Jiang B-H., Rue E. A., Semenza G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92: 5510-5514
23. Pugh C. W., O'Rourke J. F., Nagao M., Gleadle J. M., Ratcliffe P. J. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the subunit. *J. Biol. Chem*. 1997; 272: 11205-11214
24. Semenza, G. L. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. 2000; 35:71-103
25. Wenger R. H. Mammalian oxygen sensing, signalling, and gene regulation. *J. Exp. Biol*. 2000; 203: 1253-1263
26. Maxwell P. H., Dachs G. U., Gleadle J. M., Nicholls L. G., Harris A. L., Stratford I. J., Hankinson O., Pugh C. W., Ratcliffe P. J. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 8104-8109
27. Levy N. S., Chung S., Furneaux H., Levy A. P. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J. Biol. Chem*. 1998; 273: 6417-6423
28. Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A, Keshet E. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol*. 1995 Oct;15(10):5363-8.
29. Crew J. P., O'Brien T., Bradburn M., Fuggle S., Cranston D., Harris A. L. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res*. 1997; 57: 5281-5285

30. Linderholm B, Grankvist K, Wilking N, Johansson M, Tavelin B, Henriksson R. Correlation of vascular endothelial growth factor with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18:1423-1431
31. Giatromanolaki A, Sivridis E, Brekken R, Thorpe PE, Anastasiadis P, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI; Tumour and Angiogenesis Research Group. The angiogenic "vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR) receptor" pathway in patients with endometrial carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Cancer*. 2001 Nov 15;92(10):2569-77.
32. Behrooz A, Ismail-Beigi F. Dual control of Glut-1 glucose transporter gene expression by hypoxia and by inhibition of oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 5555-5562
33. Salvesen H.B., Iversen O.E., Akslen L.A. Independent prognostic importance of microvessel density in endometrial carcinoma. *Br. J. Cancer*. 1998; 77:1140-1144
34. Gitsch G, Hanzal E, Jensen D, Hacker NF. Endometrial cancer in premenopausal women 45 years and younger. *Obstet Gynecol.* 1995;85(4):504-8.
35. Hoffman MS, Cavanagh D, Walter TS, Ionata F, Ruffolo EH. Adenocarcinoma of the endometrium and endometrioid carcinoma of the ovary associated with pregnancy. *Gynecol Oncol.* 1989;32(1):82-5.
36. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1983;15(1):10-7.
37. Sherman ME, Sturgeon S, Brinton LA, Potischman N, Kurman RJ, Berman ML et al. Risk factors and hormone levels in patients with

serous and endometrioid uterine carcinomas. *Mod Pathol*. 1997;10(10):963-8.

38. Persson I, Adami HO, Bergkvist L, Lindgren A, Pettersson B, Hoover R et al. Risk of endometrial cancer after treatment with oestrogens alone or in conjunction with progestogens: results of a prospective study. *BMJ*. 1989;298(6667):147-51.

39. Greenblatt RB, Gambrell RD Jr, Stoddard LD. The protective role of progesterone in the prevention of endometrial cancer. *Pathol Res Pract*. 1982;174(3):297-318.

40. Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, Moroni S, Chatenoud L. Smoking and risk of endometrial cancer: results from an Italian case-control study. *Gynecol Oncol*. 1995;56(2):195-9.

41. Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, Siiteri P, Dorgan JF, Swanson CA et al. Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(16):1127-35.

42. Kommoss F, Karck U, Prompeler H, Pfisterer J, Kirkpatrick CJ. Steroid receptor expression in endometria from women treated with tamoxifen. *Gynecol Oncol*. 1998;70(2):188-91.

43. Ingle JN. Tamoxifen and endometrial cancer: new challenges for an "old" drug. *Gynecol Oncol*. 1994;55(2):161-3.

44. Creasman WT. Endometrial cancer: incidence, prognostic factors, diagnosis, and treatment. *Semin Oncol*. 1997;24(1 Suppl 1):S1-140-S1-50.

45. Prat J. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum Pathol*. 2004;35(6):649-62.

46. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):401-10.

47. Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. The vascular network of tumours--what is it not for? *J Pathol.* 2003;201(2):173-80.
48. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6(4):389-95.
49. Levy N.S, Chung S, Furneaux H, Levy AP. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 6417-6423.
50. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* 2000;157(2):411-21.
51. Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8(6):1831-7.
52. Nicosia RF. What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am J Pathol.* 1998;153(1):11-6.
53. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18(1):4-25.
54. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-76.
55. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 1993;53(19):4727-35.
56. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF et al. Expression of vascular permeability factor (vascular

endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol.* 1995;26(1):86-91.

57. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development.* 1992;114(2):521-32.

58. Breier G. Angiogenesis in embryonic development--a review. *Placenta.* 2000;21 Suppl A:S11-5.

59. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995;146(5):1029-39.

60. Jackson MR, Carney EW, Lye SJ, Ritchie JW. Localization of two angiogenic growth factors (PDEC GF and VEGF) in human placentae throughout gestation. *Placenta.* 1994;15(4):341-53.

61. Ismail-Beigi F. Metabolic regulation of glucose transport. *J Membr Biol.* 1993;135(1):1-10. Review.

62. Behrooz A, Ismail-Beigi F. Stimulation of Glucose Transport by Hypoxia: Signals and Mechanisms. *News Physiol Sci.* 1999;14:105-110.

63. Weiner MF, Miranda RN, Bardales RH, Mukunyadzi P, Baker SJ, Korourian S et al. Diagnostic value of GLUT-1 immunoreactivity to distinguish benign from malignant cystic squamous lesions of the head and neck in fine-needle aspiration biopsy material. *Diagn Cytopathol.* 2004;31(5):294-9.

64. Reisser C, Eichhorn K, Herold-Mende C, Born AI, Bannasch P. Expression of facilitative glucose transport proteins during development of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer.* 1999;80(2):194-8.

65. Cooper R, Sarioglu S, Sokmen S, Fuzun M, Kupelioglu A, Valentine H et al. Glucose transporter-1 (GLUT-1): a potential marker of prognosis in rectal carcinoma? *Br J Cancer*. 2003;89(5):870-6.
66. Younes M, Juarez D, Lechago LV, Lerner SP. Glut 1 expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder is associated with poor patient survival. *Anticancer Res*. 2001;21(1B):575-8.
67. Higashi K, Ueda Y, Sakurai A, Wang XM, Xu L, Murakami M et al. Correlation of Glut-1 glucose transporter expression with Eur J Nucl Med. 2000;27(12):1778-85.
68. Giatromanolaki A, Sivridis E, Kouskoukis C, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha are related to vascular endothelial growth factor expression and a poorer prognosis in nodular malignant melanomas of the skin. *Melanoma Res*. 2003;13(5):493-501.
69. Airley RE, Loncaster J, Raleigh JA, Harris AL, Davidson SE, Hunter RD et al. GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding *Int J Cancer*. 2003; 104(1): 85-91.
70. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991; 324(1):1-8.
71. Hansen S, Grabau DA, Rose C, Bak M, Sorensen FB. Angiogenesis in breast cancer: a comparative study of the observer variability of methods for determining microvessel density *Lab Invest*. 1998;78(12):1563-73.
72. Yamazawa K, Seki K, Matsui H, Kihara M, Sekiya S. Prognostic factors in young women with endometrial carcinoma: a report of 20

cases and review of literature. *Int J Gynecol Cancer*. 2000;10(3):212-222.

73. Farley JH, Nycum LR, Birrer MJ, Park RC, Taylor RR. Age-specific survival of women with endometrioid adenocarcinoma of the uterus. *Gynecol Oncol*. 2000;79(1):86-9.

74. Zaino RJ. Pathologic indicators of prognosis in endometrial adenocarcinoma. Selected aspects emphasizing the GOG experience. *Gynecologic Oncology Group Pathol Annu*. 1995;30 (Pt 1):1-28.

75. Kirschner CV, Alanis-Amezcu JM, Martin VG, Luna N, Morgan E, Yang JJ, Yordan EL. Angiogenesis factor in endometrial carcinoma: a new prognostic indicator? *Am J Obstet Gynecol*. 1996;174(6):1879-82; discussion 1882-4.

76. Kaku I, Kamura I, Kinukawa N, Kobayashi H, Sakai K, Tsuruchi N et al. Angiogenesis in endometrial carcinoma. *Cancer*. 1997;80(4):741-7.

77. O'Byrne KJ, Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Cox G, Turley H, et al. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in nonsmall-cell lung cancer. *Br J Cancer* ; 82(8):1427-32. 2000

78. Apolinario RM, van der Valk P, de Jong JS, Deville W, van Ark-Otte J, et al. Prognostic value of the expression of p53, bcl-2, and bax oncoproteins, and neovascularisation in patients with radically resected non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 15:2456-66. 1997

79. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F et al. Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer*. 2001 ;85(6):881-90.

80. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K et al. Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002;53(5):1192-202.
81. Sivridis E, Giatromanolaki A, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI; Tumor and Angiogenesis Research Group Association of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma. *Cancer*. 2002;95(5):1055-63.
82. Buerger H, Otterbach F, Simon R, Schafer KL, Poremba C et al. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol*. 1999;189(4):521-6.
83. van Diest PJ. Ductal carcinoma in situ in breast carcinogenesis. *J Pathol*. 1999;187(4):383-4.
84. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res*. 1995;55(18):3964-8.
85. Kang SM, Maeda K, Onoda N, Chung YS, Nakata B, Nishiguchi Y et al. Combined analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in colorectal carcinoma for determination of tumor vascularity and liver metastasis. *Int J Cancer*. 1997;74(5):502-7.
86. Jiang CQ, Fan LF, Liu ZS, Qian Q, Xia D, Diao LM et al. Expression levels and significance of hypoxia inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor in human colorectal adenocarcinoma. *Chin Med J (Engl)*. 2004;117(10):1541-6.