

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**TRANSPLANTASYON İLE TEDAVİ EDİLEN
HEPATOSELLÜLER KARSİNOM
OLGULARINDA ANJİOGENEZ,
LENFANJİOGENEZ VE VASKÜLER
TAKLİTÇİLİĞİN PROGNOZU
BELİRLEMEDEKİ ROLÜ**

GÜLEN GÜL NİFLİOĞLU

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Özgül SAĞOL

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2012KB.SAG.030 sayı ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzun ve zorlu yollardan geçerek yol aldığım hekimlik hayatımda, bir basamak daha ilerlediğime inandığım asistan hekimlik eğitimimin sonuna geldim. Mesleğimin ayrıntılarını öğrenmek ve hastalarımın zarar vermeden faydalı olmak için önümde aşmam gereken birçok engel olduğunun farkında olarak;

Uzmanlık eğitimim süresince hem hekimlik mesleğine hem de hayata yaklaşımlarıyla bilgi ve deneyimlerini paylaştığım, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda hizmet veren, Dekan hocamız Prof. Dr. Tülay CANDA, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Erdener ÖZER ve değerli hocalarım Prof. Dr. Kutsal YÖRÜKOĞLU, Prof. Dr. Meral KOYUNCUOĞLU, Prof. Dr. Sülen SARIOĞLU, Prof. Dr. Özgül SAĞOL, Prof. Dr. Banu LEBE, Prof. Dr. Burçin TUNA, Prof. Dr. Sermin ÖZKAL, Prof. Dr. Çağnur ULUKUŞ, Doç. Dr. Duygu GÜREL, Doç. Dr. Merih GÜRAY DURAK ve Doç. Dr. Mehtat ÜNLÜ'ye,

Kendileri ile çalışmaktan onur duyduğum, tecrübelerinden yararlanma şansına eriştiğim, saygıdeğer emekli hocalarım Prof. Dr. Şerafettin CANDA, Prof. Dr. Uğur PABUÇCUOĞLU ve Prof. Dr. Aydanur KARGI'ya,

Uzmanlık eğitim sürecime ve hayatıma yepyeni bakış açıları katmamama vesile olan, gece-gündüz demeden bana yol gösteren, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu derin hoşgörü ve sabırdan dolayı Prof. Dr. Tarık TİHAN'a,

Birlikte çalıştığımız süre boyunca ve her zorda kaldığımda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Dr. Ayça ERŞEN'e,

Tezimin hazırlanma sürecinde, desteklerinden ötürü tez danışmanım Prof. Dr. Özgül SAĞOL'a, hastaların klinik takiplerine ulaşmak konusunda inanılmaz destek gösteren ve çok kıymetli verilerini benimle paylaşan Dr. Aylin BACAKOĞLU'na ve verilerimin değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a,

Asistanlık sürecimde makroskopi salonunda unutulmayacak anıları, mutluluk ve üzüntümü paylaştığım, en huysuz günlerimde bile nazımı çeken kendilerinden çok şey öğrendiğim, tanımaktan gurur ve mutluluk duyduğum, çok değerli makroskopi teknisyenlerimiz Serkan Aydınoğlu ve Mert Demir Kırmızı ve Kamuran Elmas'a,

Tez sürecimde bana destek olan, uzmanlık eğitimim süresince benden güler yüzlerini ve kocaman kucaklaşmalarını hiçbir zaman esirgemeyen zaman zaman başlarını çok ağrıttığım teknisyenlerimiz Ayşen ÇAYAN, Nalan OKAY’a,

Asistanlık hayatım boyunca bana moral ve destek veren başta Yahya Tufan Orhan olmak üzere tüm teknisyenlerimize ve tüm sekretelerlerimize,

4,5 yıl boyunca birlikte çalıştığım, yanlarında olamadığım zamanlarda bile beni yalnız bırakmayan, sadece dört duvar olan bir odaya hayat katan, iyi ve kötü her günümde yanımda olan ve bundan sonrada olacağına inandığım her biri gökkuşağının ayrı bir rengi olan çok sevdiğim asistan arkadaşlarıma,

Bu günlere gelene kadar yanımda ve arkamda olan, her zaman sundukları koşulsuz destekleriyle kendi ayaklarımın üzerinde durabilmemi sağlayan canım annem Şule Özkan ve canım babam Yaşar Gül’e, babaannem Neziha Gül’e,

Yıllar ve yollara rağmen hayatımın (şimdilik) son 7 yılını birlikte geçirdiğim, birlikte onca sınavlar aştığım, tüm sıkıntılarımı paylaşan ve her zaman bana destek olan canım dostum, sevgili eşim Dr. Mehmet Özgür Niflioğlu’na

Sonsuz teşekkür ederim.

Gülen GÜL NİFLİOĞLU

İzmir-2013

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	VI
ŞEKİL LİSTESİ	VI
RESİM LİSTESİ	VII
KISALTMALAR	VIII
ÖZET	X
İNGİLİZCE ÖZET	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Hepatosellüler Karsinom	1
1.1.1. Tanım ve epidemiyoloji	1
1.1.2. Cinsiyet ve yaşa göre dağılım	2
1.1.3. Risk faktörleri	2
1.1.4. Hepatosellüler karsinomun klinik ve radyolojik özellikleri	5
1.1.5. Hepatosellüler karsinomda makroskopik bulgular	6
1.1.6. Hepatosellüler karsinomun mikroskopik bulguları	6
1.1.7. Hepatosellüler karsinomda mikroskopik paternler	7
1.1.8. Hepatosellüler karsinomun alt türleri	8
1.1.9. Hepatosellüler karsinom tanısında kullanılan immunhistokimyasal belirleyiciler	9
1.1.10. Tümör yayılımı	10
1.1.11. Hepatosellüler karsinomda tümör derecelendirmesi	10
1.1.12. Hepatosellüler karsinomda evreleme	11
1.1.13. Tedavi ve prognoz	15

1.2. Neovaskularizasyon/ Anjiogenez	17
1.2.1. Hepatosellüler Karsinomda Anjiogenez	19
1.2.3. Vasküler taklitçilik	21
1.2.4. Lenfanjiogenezis.....	25
1.2.4.1. Karaciğerin normal lenfatik yapısı.....	25
1.2.4.2. Patolojik süreçlerde karaciğerin lenfatik yapısı	25
2. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3. SONUÇLAR	30
3.1. Olguların klinik bulguları	30
3.2. Olguların patolojik bulguları	32
3.3. Vaskularizasyon parametreleri ile ilgili bulgular	34
3.3.1. Vaskülojenik taklitçilik	34
3.3.2. CD34 ile gösterilen anjiogenez	38
3.3.3. CD105 ile gösterilen anjiogenez	39
3.3.4. D2-40 ile gösterilen lenfanjiogenez.....	39
4. TARTIŞMA	41
5. SONUÇLAR	49
6. KAYNAKLAR.....	51

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Hepatosellüler karsinom patolojik TNM evresi

Tablo 2. Barselona Klinik Karaciğer Kanseri Evrelendirme Sistemi

Tablo 3. Child-Pugh skorlama sistemi

Tablo 4. Görüntü analizi programı (3D Histech- Histoquant) ile hesaplanan parametreler

Tablo 5. Hastaların klinik bulguları

Tablo 6. Altmış olgunun patolojik bulguları

Tablo 7. Tübüler tipte VT ile klinikopatolojik parametrelerin karşılaştırılması

Tablo 8. Matriks paterni tipinde VT varlığı ile klinikopatolojik parametrelerin ilişkisi

Tablo 9. Vasküler belirleyicilerin görüntü analizi ölçüm sonuçlarının ortalama $\pm$ standart sapma değerleri

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Barselona evreleme sistemine göre tedavi algoritması

Şekil 2. Vaskülogenez ve anjiogenezin şematik görünümü

Şekil 3. Anjiojenik Switch

Şekil 4. Melanomda sıvı ileten ekstrasellüler matriks ağı

Şekil 5. Tüm olgularımızın sağ kalım eğrisi

RESİM LİSTESİ

- Resim 1:** Yazılım programında ölçüm yapılacak ilgili alanın tarafımızdan işaretlenmesi ve program tarafından ölçüm yapılan alanın seçilmesi.
- Resim 2:** Tübüler tip VT HE, CD34 negatif, Laminin negatif
- Resim 3:** Matriks paterni tipinde VT HE, CD34 negatif, Laminin pozitif
- Resim 4:** Değişken derecelerdeki CD34 pozitiflikleri
- Resim 5:** D2-40 negatifliği, stromal pozitiflik ve intratümöral pozitiflik

KISALTMALAR

HSK	: Hepatosellüler karsinom
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
SEER	: Surveillance, Epidemiology and End Results
HBV	: Hepatit B
HCV	: Hepatit C
HDV	: Hepatit D
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
AFP	: Alfa- fetoprotein
USG	: Ultrasonografi
BT	: Bilgisayarlı tomografi
MR	: Manyetik rezonans
FLK	: Fibrolameller karsinom
EBV	: Epstein-Barr virüs
AJCC	: American Joint Committee on Cancer
UICC	: International Union Against Cancer
BCLC	: Barcelona Klinik Karaciğer Kanseri Evrelendirme Sistemi (Barcelona Clinic Liver Cancer)
MELD	: The Model for End-stage Liver Disease
ESM	: Ekstrasellüler matriks
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
vWF	: Von Willebrand faktör
MVD	: Mikrodamar dansitesi
TGF-beta1	: Transforme edici büyüme faktörü beta-1
VT	: Vasküler taklitçilik
MMP	: Matriks metalloproteinazlar
İSB	: İntersitisyel sıvı basıncı

LEH	: Lenfatik endotelyal hücre
HE	: Hematoksilen eozin
Ab	: Antikor
TMA	: Doku dizinleri (Tissue microarray)

ÖZET

TRANSPLANTASYON İLE TEDAVİ EDİLEN HEPATOSELLÜLER KARSİNOM OLGULARINDA ANJİOGENEZ, LENFANJİOGENEZ VE VASKÜLER TAKLİTÇİLİĞİN PROGNOZU BELİRLEMEDEKİ ROLÜ

Dr. Gülen GÜL NİFLİOĞLU

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

gulengulniflioglu@gmail.com

Amaç: Hepatosellüler karsinom (HSK), erişkinlerde en sık görülen primer hepatik malignitedir. Hipervasküler bir tümör olan HSK'un karsinogenez, büyüme ve progresyonunda anjiogenezin belirleyici rolü olduğuna dair veriler bulunmaktadır. Bu çalışmanın temel amacı transplantasyon ile tedavi edilen HSK olgularında, anjiogenezin sayısal olarak saptanması yanı sıra, vasküler taklitçilik (VT) ve lenfanjiogenez gibi damarlanmanın değişik komponentlerini immünohistokimyasal ve morfometrik yöntemler ile araştırmak ve hastaların operasyon sonrası prognozunu belirlemedeki etkilerini sorgulamaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda transplantasyonla tedavi edilen 60 HSK olgusu dahil edildi. İntratümöral anjiogenez, doku dizinlerine (TMA) immünohistokimyasal olarak uygulanan CD34 ve CD105 antikorları ile değerlendirilmiş olup lenfanjiogenezin saptanmasında D2-40 antikoruna kullanıldı. Damarlanma miktarı birim alanda (mm^2) saptanan damarların toplam sayısı ve alanı olarak görüntü analiz programı ile belirlendi. Tübüler tipte VT varlığı hematoxilen eozin (HE) kesitlerde değerlendirildi. Matriks paterni tipindeki VT immünohistokimyasal olarak uygulanan laminin antikoruna ile tespit edildi. Elde edilen morfolojik ve immünohistokimyasal bulguların prognostik faktörlerle ilişkileri ve sağ kalıma etkileri istatistiksel olarak araştırıldı.

Bulgular: 60 olgunun 16'sında tübüler tip VT ve 11'inde matriks paterni tip VT saptanmıştır. HSK'da hem tübüler tipte hem de matriks paterni tipinde VT olduğu gösterilmiştir. Ancak VT varlığı ile prognostik parametreler ve sağ kalım arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmamıştır. Anti-CD34 eksprese eden damarların birim alanda saptanan damar sayısı (NO/FA) ile sağ kalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmuştur. Bu ilişki birim alanda saptanan damar sayısı fazla olan hastalarda sağ kalımın daha uzun olduğu yönündedir. ($p=0,006$) Ancak birim alanda saptanan Anti-CD34 pozitif damar sayısı ile tümör boyutu, tümöral nodül sayısı, patolojik T evresi, tümör derecesi, vasküler invazyon ve hasta yaşı, olguların CHILD ve MELD skorları, hastalık nüksü arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Bununla birlikte CD105 ekspresyonunun, CD34 ekspresyonuna göre daha az yoğunlukta olduğu gözlenmiştir ancak her iki antikorun ölçüm değerlerinde anlamlı bir korrelasyon saptanmamıştır. Anti-D2-40 antikoru hem tümör parankiminde hem de tümör nodüllerini çevreleyen fibröz septalarda lenfatikler izlenmiştir. Bu çalışmada lenfanjiogenez prognostik bir belirleyici olarak değerlendirilmemiştir.

Sonuç: Elde ettiğimiz sonuçlar HSK'larda farklı damarlanma paternlerinin birbirinden farklı mekanizmalarla, bağımsız olarak işlev gördüğünü desteklemiştir. Ancak bu mekanizmaların prognostik faktörlere, sağ kalıma ve tedaviye olan etkisi tek tek değerlendirildiğinde, vaskülarizasyonun artışının, bu hasta popülasyonunda kötü prognostik bir belirteç olduğu kanıtlanamamaktadır. Sadece CD-34 ile gösterilen vaskülarizasyonu yüksek olarak saptanan tümörlerde daha iyi prognoz olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada kullanılan görüntü analiz yönteminin vasküler yapıları efektif olarak seçebildiği görüşünde olmamıza rağmen bu yöntem ideal olmayabilir. Görüntü analiz programı ile literatürde kabul görmüş stereolojik yöntemlerin, TMA kesitleri ve rutin kesitler kullanılarak korrelasyonu önerilebilir. Ancak verilerimiz çalışma için seçilen olguların genellikle erken evrelerde oluşu ve karşılaştırılacak yüksek evrelerde az sayıda olgunun bulunuşundan da etkilenmiş olabilir. Bunun için daha ileri evre ve daha az diferansiye tümörleri de içeren geniş serili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Hepatosellüler karsinom, anjiogenez, lenfanjiogenez, vasküler taklitçilik

ABSTRACT

THE PROGNOSTIC ROLE OF ANGIOGENESIS, LYMPHANGIOGENESIS AND VASCULOGENIC MIMICRY IN HEPATOCELLULAR CARCINOMAS TREATED WITH TRANSPLANTATION

Gulen GUL NIFLIOGLU, MD

Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Department of Pathology

gulengulniflioglu@gmail.com

Aim: Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary hepatic malignancy in adults. There is some data about the decisive role of angiogenesis in carcinogenesis and progression of HCC which is an hypervascular tumor. The aim of this study is; to determine the amount of angiogenesis numerically and to study different vascularization patterns like lymphangiogenesis and vasculogenic mimicry (VM) by morphometric and immunohistochemical methods in tumors and to examine the prognostic role of vascularization in the postoperative outcome of HCC, after transplantation.

Material and Methods: In our study; 60 cases with the HCC which was treated with the transplantation were investigated. Intratumoral angiogenesis was highlighted by anti-CD34 and anti-CD105 antibodies, and lymphangiogenesis was evaluated by anti-D2-40 antibody by using immunohistochemistry in tissue microarray slides. The amount of vessels were identified as area of vessels and number and area of objects per unit (mm²) with image analyze programme. Tubuler type VM was evaluated with hematoxylin and eosin slides. Patterned VM in HCC was identified by the laminin antibody. The morphologic and immunohistochemical study results were analysed statistically to evaluate the relation with prognostic factors and survival.

Results: We found tubular type VM in 16 cases and patterned VM in 11 cases (n=60). We showed both type of VM in HCC. But no significant result could be found statistically between VM presence and the survival and prognostic factors. We found the statistically significant relationship with number of objects per unit in CD34 positive vessel analysis and overall survival. The number of objects per unit in CD34 positive vessel analysis was significantly lower in patients with worse outcome ($p=0,006$). But there is no relation between the number of objects per unit in CD34 positive vessel analysis and tumor size, number of tumor nodules, pathologic T stage, tumor grade, vascular invasion and patients' age, CHILD score, MELD score and recurrence. Besides that, we found the expression of CD105 lower than the CD34 expression but no significant correlation between them. We showed the lymphatics in tumor parenchyma and in fibrous capsule surround the tumor nodules.

Conclusion: Our data supports that there is different and independent vascularization patterns in HCC. But the negative prognostic and therapeutic effects of these mechanisms and increase in vascularity could not be proved. We could only show the increase in vascularization detected by CD34 was related with better prognosis. We think image analysis method used in this study is effective but may not ideal. Image analyze programme and stereological methods need to be correlated within TMA sections and routine slides. But our results were affected by the selection of cases which were mostly in early stage and low recurrent tumor incidence in our series. For this purpose; there is need for the widespread studies having an advance stage and less differentiated tumors.

Key Words: Hepatocellular carcinoma, angiogenesis, lymphangiogenesis, vasculogenic mimicry

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Hepatosellüler Karsinom

1.1.1. Tanım ve epidemiyoloji

Hepatosellüler karsinom (HSK), hepatosit yönünde diferansiasyon gösteren ve erişkinlerde en sık görülen primer hepatik malignitedir [1, 2]. HSK nedeniyle dünyada yılda 250,000 ile 1 milyon arasında ölüm bildirilmiştir. HSK dünyada erkekler arasında en sık beşinci, kadınlar arasında ise en sık sekizinci malignitedir [1].

HSK'un dünyadaki sıklığı, etyolojinin coğrafik dağılıma etkisi, cinsiyet ve yaş gibi spesifik faktörlere göre değişkenlik göstermektedir. HSK gelişimi ile viral enfeksiyonlar, kimyasal ajanlar ve bunun gibi kronik karaciğer hasarı oluşturan nedenler arasındaki birliktelik çok belirgindir ve bu nedenle HSK daha çok kronik karaciğer hastalıklarının son evresinde görülmektedir. Ayrıca bu kuvvetli birliktelik karsinogenetik mekanizmaların anlaşılmasına ışık tutmuştur [1]. HSK'un jeografik bölgelere göre dağılımındaki değişiklik de o bölgede, etiolojide önemli bir etken olan hepatit virüslere maruz kalma durumu ve çevresel faktörlere maruziyete bağlıdır [3]. HSK, Asya'da en sık ikinci, Afrika'da ise en sık dördüncü kanserdir. Dünyada 2002 yılında erkeklerde görülen yeni olgu sayısı 442.119 ve ölüm sayısı 41.688 olup bu ölümlerin %94'ü tanı sonrası ilk yıl içerisinde görülmüştür. Kadınlarda ise dünyada 184.043 yeni olgu vardır ve bunların çoğu doğu Asya bölgelerindedir [2]. Gelişmiş ülkeler; Kuzey ve Güney Amerika, Avrupa'nın büyük kısmı ve Orta Doğu'nun bazı bölgelerinde HSK insidansı düşüktür (yıllık insidans <3/100,000) [4, 5]. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) HSK insidansı Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (National Cancer Institute) yürüttüğü SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) programı sonucuna göre 1998 ve 2000 yılları arasında 4.1/100,000 ve 1970 yılından bu yana kısmi artmış olarak bildirilmiştir. Sonuç olarak, ABD'de yılda yaklaşık 8500 yeni HSK olgusu bildirilmektedir[6].

Gelişmekte olan ülkelerde tümör gelişimi ön planda hepatit B (HBV) ve hepatit C (HCV) virüsleri ile ilişkiliyken, gelişmiş ülkelerde alkol kötüye kullanımı en önemli risk faktörlerindendir [2].

Türkiye’de ise HSK sıklıkla daha ileri yaşlarda ve sirotik karaciğer zemininde gelişmektedir. Uzunalimoğlu ve ark. tarafından yayınlanan toplam 207 hastayı içeren araştırmada Türkiye’de en sık görülen etiolojiler, 1. sırada HBV enfeksiyonu (%56), 2.sırada HCV enfeksiyonu (%23.2) ve 3. sırada ise alkolik karaciğer hastalığı olarak bildirilmiştir [7].

1.1.2. Cinsiyet ve yaşa göre dağılım

Erkeklerde HSK gelişimi, özellikle insidansın yüksek olduğu bölgelerde kadınlara göre daha belirgindir (ortalama 3.7:1). Bu oran, insidansın orta düzeyde olduğu bölgelerde ortalama 2.4:1, ve insidansın daha düşük olduğu bölgelerde daha da azdır. Bunun nedeni tam olarak anlaşılamasa da, viral hepatit taşıyıcılığı durumu, çevresel toksinlere maruziyet ve androjenlerin trofik etkilerine bağlı olabileceği düşünülmektedir [8].

Coğrafi farklılıklar göstermekle birlikte, insidans yaşla birlikte artar. Bununla birlikte hepatosellüler karsinom genç erişkin ve çocuklarda da görülür [1, 2].

1.1.3. Risk faktörleri

HSK gelişiminde önemli risk faktörleri bildirilmiştir. Bunlardan en önemlileri HBV ve HCV ‘ye bağlı kronik hepatitler, alkolik siroz , metabolik hastalıklar ve toksinlerdir. Bununla birlikte, bazı hastalarda herhangi bir risk faktörü olmadan da HSK gelişmektedir. Çevresel toksinlerden aflatoksin ve kontamine su ile alınan mavi-yeşil alg toksini Microcystin’in HSK patogenezinde önemli olduğu bildirilmiştir. Bunların kendi başına tüm dünyada HSK gelişimi üzerine tam katkıları olmasa da bazı bireylerde diğer risk faktörleri mevcudiyeti ile HSK açısından önemli katkıları olduğu düşünülmektedir [4].

Risk faktörleri arasında %85 oranıyla HBV ya da HCV enfeksiyonu HSK’un en önemli nedenidir. Alkole bağlı karaciğer hasarı ise en önemli viral etioloji dışı risk faktörüdür.

HBV: Hepadnavirüs grubundan bir DNA virüsüdür. Virüs hepatit B yüzey antijeninden (HBsAg) oluşan dış zarf, hepatit B kor antijeni (HBcAg), DNA polimeraz/reverse transkriptaz ve viral genomu içeren internal kordan (nükleokapsid) oluşur. Sekiz genotipi ve çok sayıda alt genotipi tanımlanmıştır. Farklı tip ve alt tiplerin coğrafi dağılımı da farklılık göstermekte olup lamivudin ile antiviral tedavi cevabını etkilemektedir [2].

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünyada yaklaşık 350 milyon kişi HBV ile enfektidir. Bu nedenle HBV, Asya, Afrika ve Latin Amerika ülkelerinde HSK'un en sık nedenidir. Kronik HBV enfeksiyonu olan bireylerdeki HSK insidansı enfekte olmayan bireylerden 100 kat fazladır.

Üç mekanizma kronik HBV enfeksiyonunda HSK oluşumuna katkıda bulunabilir. Bunlar HBV enfeksiyonuna bağlı kronik inflamasyonun tetiklediği oksidatif stres faktörleri ve siroza bağlı faktörler, HBV-DNA'sının hepatosit DNA'sına entegre olarak karsinogenezi indüklemesi ve HBV'nin X geni proteininin aktivitesidir. HBV DNA'sı, hepatosit DNA'sının herhangi bir yerine entegre olabilir. Bu entegrasyon DNA'nın düzenleyici genlerinde bozukluklara yol açarak kromozomal instabiliteye yol açabilir. HBV genomunun kodladığı X antijeni, değişik mekanizmalarla malign değişime yol açabilir. X antijeninin hücre çoğalmasını artırdığı, tümör baskılayıcı genlere bağlanarak inaktive ettiği ve DNA onarım mekanizmalarını bozduğu belirtilmektedir [2].

HCV: Tek iplikçili RNA virüsüdür. Farklı coğrafi bölgelerde farklı genetik alt tipleri tanımlanmıştır. HCV hızlı replikasyon ve replikasyon sırasında düzeltme olmaması nedeniyle çok çeşitli genetik değişkenlik gösterir. Bu nedenle eradikasyonu ve tedavi edilmesi güçtür. Profilaktik aşısı bulunmamaktadır. DSÖ'ne göre 180 milyon kişi HCV ile enfektidir ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde bu değerin arttığı bildirilmektedir. Avrupa, Japonya ve ABD'nde HSK'lu olgularda HBV'den daha fazla HCV pozitifliği söz konusudur [2].

HCV, RNA virüsü olması nedeniyle hepatosit DNA'sına bağlanamaz ancak HCV proteinlerinin hepatik karsinogeneizde rolleri olduğu düşünülmektedir. HCV kor proteini apoptoz veya hepatosit proliferasyonunda görevli enzimlere bağlanarak bunların fonksiyonlarına etki edebilir. Yapılan çalışmalarda HCV etkisi ile p53 geninin, tümör nekroz faktörü reseptörü 1' in, Fas sisteminin, nükleer faktör-kappa B ve hücre siklusu düzenleyici proteinlerinin değişikliklere uğradığı belirlenmiştir [9]. HCV ilişkili HSK, tipik olarak

enfeksiyondan 20-30 yıl sonra ve genellikle sirozla birlikte gelişir [1, 2]. HCV enfeksiyonu, yol açtığı immun yanıt ve direkt sitopatik etki ile karaciğer hasarına yol açmaktadır. Nekroz ve rejenerasyon süreci hücrelerde prokarsinojenik etkiyi aktive etmektedir. Onkojenik rolde HCV'nin üç proteini (kor protein, NS3, NS5a) suçlanmaktadır [1].

Hepatit D Virüsü (HDV): HDV, HBV enfeksiyonu varlığında enfeksiyon oluşturan defektif bir RNA virüsüdür. Kronik HDV enfeksiyonunun HSK riskini, HBV'den bağımsız olarak artırıp arttırmadığı bilinmemektedir [2].

Alkol: Alkolün direkt karsinojenik etki gösterdiğine dair çok az kanıt olsa da, ABD ve Kuzey Avrupa ülkelerinde alkol, kronik karaciğer hasarı ve sirozun önde gelen nedenidir. Erkeklerde ağır, kadınlarda ise hafif miktarda alkol tüketimi 2 kat artmış HSK riski ile birliktelik göstermektedir. Diğer etkenlerden birine sahip ve ağır düzeyde alkol tüketen hastalar ise HSK gelişimi açısından en yüksek riske sahiptir [2].

Alkol, alkol dehidrogenaz ve sitokrom P 450 2E1 (CYP2E1) ile asetaldehite metabolize olur. CYP2E1 reaktif oksijen radikalleri üreterek DNA hasarına yol açar. Alkol dehidrogenaz ve CYP2E1'deki polimorfizmler de hepatokarsinogenez riskini artırıyor olabilir. Alkol diğer risk faktörleriyle sinerjistik etki göstererek de HSK insidansını arttırmaktadır [1].

Tütün: Tütün ve HSK arasındaki ilişki son dönemlerde yayınlanmıştır. Alkol ve viral enfeksiyondan bağımsız olarak HSK gelişim riski sigara içme sayısı ve süresi ile ilişkili bulunmuştur [2].

Aflatoksin B1: Aflatoksin B1 (AFB1) aspergillus parasiticus ve aspergillus flavus küflerinden üretilen kuvvetli bir karaciğer karsinojenidir [1, 2]. Aflatoksin, sitokrom P450 ile DNA hasarına yol açan 8,9-ekso-epoksite dönüşmektedir [1]. Diyetle yüksek dozda alımı sonucunda eşlik eden HBV enfeksiyonu da varsa HSK gelişimi 50 kat artmaktadır [2].

Metabolik Hastalıklar: Metabolik hastalıkların bir kısmında HSK gelişebilmektedir. En kuvvetli birliktelik hereditör hemakromatozis, tirozinemi ve alfa-1-antitripsin eksikliğinde bildirilmektedir. Bu hastalarda siroz gelişimini takiben terminal dönemde ortalama %25 oranında HSK gelişmektedir [1]. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı da HSK için bir risk faktörü olarak artan oranda kabul görmektedir [10].

1.1.4. Hepatosellüler karsinomun klinik ve radyolojik özellikleri

Hastaların çoğunda erken dönemde belirgin bir yakınma yoktur. Kompanse sirozlu hastalarda ani gelişen asit, ensefalopati, sarılık, veya varis kanaması gibi karaciğer yetmezliği belirtilerinin ortaya çıkması HSK açısından önemlidir. Sağ üst kadranda belli belirsiz bir karın ağrısı, beraberinde halsizlik, kilo kaybı, erken doyma hissi, veya üst batında ele gelen kitle gibi yakınmalar eşlik edebilir. En sık fizik muayene bulguları hepatomegali, asit, ateş, sarılık ve splenomegalidir [1, 2].

Laboratuvar bulgularında karaciğer enzim yüksekliği ve altta yatan hastalığa bağlı diğer bulgular görülür. Sirozlu HSK hastalarının çoğunda trombositopeni, hipoalbuminemi, hiperbilirubinemi, ve hipoprotrombinemi görülebilir. Hafif anemi ve diüretik kullanımı sonucu elektrolit dengesizliği (hiponatremi, hipokalemi, metabolik alkaloz) görülebilir. Serum aminotransferazlar, alkalen fosfataz ve gammaglutamil transpeptidaz değerleri çoğunlukla anormal olmakla beraber özgün değildirler. Erken evre olgular başta olmak üzere HSK, yüksek alfa- fetoprotein (AFP) seviyeleriyle ilişkili olmayabilir. Ayrıca hafif derece AFP yüksekliği HSK dışı diğer karaciğer hastalıklarında da görülebilir [2]. Serum AFP değerinin sirozlu hastalarda yükselmesi HSK gelişimi açısından önemli olabilir. Yüksek riskli hastalarda serum AFP değerinin >500 ng/ml olması (normal laboratuvar değeri 10-20 ng/ml) HSK açısından kesin tanı olarak kabul edilse de [11], AFP değeri düşük olan hastalarda da tarama amaçlı yapılan incelemeler sonucu HSK tanısı konulabilmektedir [12].

Standart görüntüleme teknikleri ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans (MR) olup, bu teknikler HSK'un tanısı ve evrelendirilmesinde kullanılmaktadır. HSK'un tipik özelliği dinamik BT ya da MR görüntülerinde arteriyel hipervaskülarite göstermesidir [2].

1.1.5. Hepatosellüler karsinomda makroskopik bulgular

Makroskopik özellikler zeminde siroz olup olmasına ve tümör boyutuna bağlı değişkenlik gösterir. Siroz varlığında tümörde fibröz bir yalancı kapsül olabilir. Siroz zemini olmayan olgularda tümör kapsülsüzdür. Tümör tipik olarak çevre parankimden daha yumuşaktır [1, 2]. Tek ya da multifokal olabilir. “Multifokalite” araya giren neoplastik olmayan karaciğer parankimiyle ayrılan tümör nodülleri olarak tanımlanır. Tek nodüllere ana kitle ile devamlılık gösteren nodüller gözlenebilir. Makroskopik görünüm portal ven ya da hepatik ven tutulumuna bağlı oluşan nekroza bağlı olarak da değişkenlik gösterir. Tümörde safra, yağ, glikojen üretiminde makroskopik görünümü değiştirebilir [2].

Çapı iki cm’in altında olan tümörler küçük HSK olarak isimlendirilir [13]. Bu tümörler genellikle kronik karaciğer hastalarının izlemi sırasında fark edilir. Rezektabl oldukları için sağ kalım süreleri daha uzundur. Ancak bu tümörler özellikle karaciğer eksplantlarında kolaylıkla gözden kaçabilir. Bu nedenle spesmenin ince dilimler halinde incelenmesi önemlidir [1].

İki cm üzerindeki HSK’ların makroskopik Eggel sınıflaması aşağıdaki gibidir: [2, 14]

- a. **Nodüler tip:** Keskin sınırlı, tek ya da multipl nodüler tümörlerdir. Tüm karaciğerde dağılmış farklı büyüklüklerde çok sayıda tümör nodülü halinde izlenebilir.
- b. **Masif tip:** Tüm bir lobu kaplayan, sınırları düzensiz tek ve büyük kitle (satellit nodüller içerebilir). Nodüler tip de büyüyerek masif tip haline dönüşebilir.
- c. **Diffüz (infiltratif) tip:** Tüm karaciğerde veya bir lobun tamamında çok sayıda küçük nodüllerin bulunuşudur.

1.1.6. Hepatosellüler karsinomun mikroskopik bulguları

Hepatosellüler karsinom diferansiasyon derecesine göre hepatositlere benzeyen hücrelerden oluşmaktadır [1, 2]. Tümör hücrelerinin nükleus/ sitoplazma oranı genellikle yüksek, nükleer hiperkromazi ve nükleer düzensizlik değişkendir. Nükleol belirginliği gözlenebilir. Tümör hücreleri keskin sınırlı poligonal sitoplazmalara sahiptir. Sitoplazma eozinofilik ve ince granülerdir. Sitoplazmik yağ, glikojen ya da safra birikimi izlenebilir. Tümör içinde diffüz yağlı değişiklik küçük ve erken evre (iki cm’den küçük) tümörlerde daha sıktır. Tümör boyutu arttıkça yağlı değişiklik azalmaktadır. Tümör hücreleri arasında sıklıkla

safrta kanalikl oluşumu vardır. Safrta retimi ise genellikle dilate kanalikül ya da psdoasinilerin lümenlerinde safrta tıkcı şeklinde izlenmektedir. Tümör hücrelerinde glikojen birikimi sitoplazmik berrak hücre değişikliğine neden olur. Bu durumda HSK’u metastatik renal berrak hücreli karsinomdan ayırmak zor olabilmektedir. Klinik ve immunhistokimyasal yöntemlerle bu ayırım yapılabilmektedir. Ayrıca sitoplazma içinde Mallory-Denk cisimleri ve hyalin globüller %20 tümörde bulunur. HbsAg de tümör hücre sitoplazmalarında gözlenebilmektedir. Tümör hücreleri, normal karaciğerdeki hücre dizilimlerine benzer şekilde büyüme gösterirler [1, 2].

Tümör hücreleri arasında endotelle döşeli boşluklar bulunur. Normal karaciğer dokusundaki sinüzoidal endotelyal hücrelerden farklı olarak HSK, ‘‘kapillarizasyon’’ değişikliklerini içerir; bunlar normal kapillerler gibi immunhistokimyasal olarak CD34, faktör 8, subendotelyal laminin, ve tip 4 kollajen pozitifliğidir. HSK’da beslenme parankim içindeki eşleşmemiş olarak adlandırılan arterlerle sağlanır. Yeni oluşan bu arterler, normal karaciğerde olduğu gibi portal alanın bir parçası değildir. Tümör içinde portal alanlar ancak tümör periferinde sıkışmış olarak görülebilir.

Tümör belirgin nükleer şekil, boyut ve boyanma farkı gösteren pleomorfik hücreler içerebilir. Osteoklast benzeri dev hücreleri nadirdir. Genellikle pleomorfik tümör hücreleri kohezyonlarını kaybederler ve belirgin trabeküler yapılanma göstermezler. Sarkomatoid HSK’da ise iğsi hücreler görülmektedir [2].

1.1.7. Hepatosellüler karsinomda mikroskopik paternler

Hepatosellüler karsinom hücrelerin organizasyon biçimine göre farklı paternler oluşturur. Bunlar trabeküler, psdoglandler, kompakt (solid) ve mikst tiplerdir.

1. Trabeküler patern: En sık görülen paternidir. Sıklıkla iyi ya da orta diferansiye HSK’lu olgularda görülür. Farklı kalınlıktaki kordonlar halinde dizilen tümör hücreleri sinüzoid benzeri damarsal boşluklar ile ayrılır [1, 2]. Trabeküller iyi diferansiye tümörlerde daha inceyken, diferansiasyon azaldıkça kalınlaşır. Retikülin histokimyası ya da CD34 gibi immün belirleyiciler trabeküler paternin fark edilmesini kolaylaştırır [2].

2. Psödoglandüler (Asiner) Patern: Genellikle trabeküler patern ile birlikte bulunur. Gland benzeri yapılar tümör hücreleri arasında bulunan modifiye, anormal safra kanaliküllerinden kaynaklanıyor olup “psödogland” ya da “psödoasini” olarak adlandırılır. Bu yapılar sıklıkla tek sıralı tümör hücreleri ile döşelidir. Psödoglandlar, periyodik asit-schiff (PAS) ile pozitif ama müsikarmen ve alsian blue (AB) ile negatif boyanan proteinöz materyal içerebilir [2].

3. Solid Patern: Genişleyen trabeküllerin sinüzoidleri sıkıştırarak kalın hücre tabakaları oluşturduğu paterndir. Damarsal boşluklar yarık benzeri şekilde ve belirsizdir. Bu durum tümöre solid bir görünüm kazandırır. Solid patern az diferansiye tümörlerde daha sıktır [2].

4. Mikst patern: Yukarıdaki tiplerin karışımından oluşan paterndir.

1.1.8. Hepatosellüler karsinomun alt türleri

Fibrolameller karsinom: Fibrolameller karsinom (FLK) klasik HSK’dan klinik, histolojik ve moleküler açıdan farklı olan, çocuk ve genç erişkinlerde görülen ayrı bir karsinomdur. Farklı serilerde FLK’un primer karaciğer kanserleri içerisindeki oranı %0,5-9’dur. Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde sıklığı daha fazladır. Fibrolameller karsinom, sirotik olmayan karaciğerde oluşur, etyoloji ve risk faktörleri bilinmemektedir. Olguların %85’i 35 yaş ve altında olup pik yaşı 25’dir. Olguların 2/3’ünde karaciğerin sol lobu tutulmuştur [2, 15].

Makroskopik olarak sarı-ten renkli, yumuşak ya da sert olabilir. Olguların %75’inde santral skar var olsa da FLK ile fokal nodüler hiperplazi arasında etyolojik bir ilişki yoktur.

Histolojik olarak FLK tipik olarak itici sınırlara sahiptir. Tümör çevresinde sıkışmış benign portal alanlar görülebilir. Geniş eozinofilik sitoplazmalı, iri veziküler nükleuslu ve iri nükleollü büyük poligonal hücrelerden oluşur. Bu sitolojik özellikler ve lameller fibrozis, FLK’un tanımlayıcı özellikleridir [2].

Prognozu sirotik zeminde oluşan klasik HSK’dan daha iyi olup, non sirotik zeminde oluşan klasik HSK ile benzerdir [2, 15].

Skiröz hepatosellüler karsinom: Hepatosellüler karsinomların %5'i, farklı oranlarda atrofik tümör trabekülleri ile birlikte sinüzoid benzeri damarsal boşluklar boyunca belirgin desmoplazi gösteren büyüme paterni ile karakterizedir. Bu tümörlerin çoğu hemen kapsül altında yerleşim gösterir. Multifokal karsinomlarda bazı tümör odakları skiröz büyüme paterni gösterirken bazı tümör odakları klasik paternde olabilir [2].

Andiferansiye karsinom: İmmunhistokimyasal belirleyiciler olmadan ileri yoruma gidilemeyen tümörler olup epitelyal karaciğer tümörlerinin %2'sinden az orandadır [2].

Lenfoepitelyoma benzeri karsinom: Çok sayıda lenfosit içerisinde dağılmış pleomorfik tümör hücrelerinden oluşan nadir bir HSK tipidir. Küçük boyutlu tümör hücreleri fokal sinsityal büyüme paterni gösterme eğilimindedir. Bazı olgularda tümör hücrelerinde Epstein-Barr virüs (EBV) pozitifliği tespit edilmiştir [2, 15].

Sarkomatoid hepatosellüler karsinom: Hepatosellüler karsinom kısmen ya da yaygın olarak malign iğsi hücrelerden oluşabilir. Genellikle iyi örnekleme sonucunda tipik HSK alanları görülebilir [15]. Sarkomatoid değişiklikler tekrarlayan kemoterapiler ve transarteryal kemoembolizasyon durumlarında daha sık görülmektedir [2].

1.1.9. Hepatosellüler karsinom tanısında kullanılan immunhistokimyasal belirleyiciler

Geniş bir antijen ekspresyonuna sahip olan HSK'larda rutin uygulamalarda tanıya yardımcı olan belirleyiciler şunlardır;

I- Hepatositer diferansiyasyon belirleyicileri:

1. Hepatosit export proteinleri: α -1 antitripsin, α -1 antitripsin, AFP , Albumin, Ferritin, karbomoil fosfataz sentetaz-1 (HepPar1)
2. Safra kanalikülünü boyayan belirleyiciler: Poliklonal CEA (kanaliküler boyanma paterni), CD10
3. Sitokeratinler: CK 8, CK18

II- Biliyer diferansiasyon belirleyicileri: CK 7, CK19, Polyklonal CEA (sitoplazmik, apikal boyanma paterni)

III- Sinuzoidlerin kapillerleşmesini gösteren belirleyiciler: CD34, FVIII ilişkili antijen, Laminin, Kollajen tip IV

Ayrıca bir onkofetal protein olan Glypican 3, HSK'ların yaklaşık %75'inde eksprese edilirken displastik ve sirotik nodüller nadir olarak boyanmaktadır. HSK tanısında yararlı olabilecek diğer belirteçler ısı şok protein 70, glutamin sentetaz, anneksin A2 ve arginaz-1'dir. Hiçbiri mükemmel olmadığından birkaç belirtecin kombinasyonunu kullanmak gereklidir [1].

1.1.10. Tümör yayılımı

HSK'lar lenfatik ya da hematojen yolla yayılabilir. Portal venler yoluyla intrahepatik yayılımı sıktır ve bu sıklık tümör boyutuyla artış gösterir. Ana safra yollarına invazyon klinik olarak sık olmamakla birlikte, otopsilerde %5 oranında görülmektedir. Klinik takip çalışmalarına göre, en sık akciğer olmak üzere lenf düğümleri, kemik ve adrenal beze metastaz yapmaktadır [2]. Ayrıca hepatik ven ve devamında inferior vena cava yoluyla sağ atriya ulaşabilir [15].

1.1.11. Hepatosellüler karsinomda tümör derecelendirmesi

Farklı yaklaşımlar bulunmakla birlikte burada Edmondson ve Steiner'in artan nükleer irregularite, hiperkromazi, nükleus/sitoplazma oranı ve azalan hücresel diferansiasyonunu dikkate alan ve tümörlerin 1-4 arasında skorlandığı derecelendirme sistemi üzerinde durulacaktır. Bu sistemde her bir derecedeki tümörlerin özellikleri aşağıdaki gibidir [16, 17]:

Derece 1: Tümör hücreleri ve hiperplastik karaciğer hücreleri arasındaki fark çok azdır. Bu nedenle karsinom tanısı için tümörün farklı alanlarındaki daha agresiv büyüme paternlerinin gösterilmesine dayanır.

Derece 2: Tümör hücreleri normal hepatositlerle belirgin benzerlik gösterir. Normal hepatositlerden daha büyük ve daha hiperkromatiklerdir. Sitoplazma geniş ve asidofiliktir.

Hücre sınırları keskin ve belirgindir. Lümenlerinde safra ya da protein bulunan değişik boyutta psödoasiner yapılar izlenir.

Derece 3: Nükleuslar derece 2'ye göre daha büyük ve hiperpkromatiktir. Nükleus/sitoplazma oranı artmıştır. Sitoplazma granüler ve derece 2'ye göre daha az asidofiliktir. Asinuslar daha azdır. Vasküler yapılar içinde tek hücrelerin görülmesi daha sıktır.

Derece 4: Nükleuslar yoğun hiperkromazi gösterir. Nükleus, hücrenin büyük kısmını kaplar. Sitoplazma değişken derecede var olsa da sıklıkla dardır. Medüller bir büyüme paterni vardır. Trabeküllerin bulunması zordur ve asinuslar nadiren seçilir. Bazı tümörlerde iğsi hücrelerden oluşan alanlar da görülebilir.

1.1.12. Hepatosellüler karsinomda evreleme

“American Joint Committee on Cancer” (AJCC) ve “International Union Against Cancer” (UICC)’in hepatosellüler karsinom için önerdiği TNM evreleme sistemi (Tablo 1) patolojik evrelemede tercih edilen sistemdir. Bununla birlikte birçok klinik seride, tümörün zemininde geliştiği kronik karaciğer hastalığının da dikkate alınarak karaciğerin fonksiyonel kapasitesi ve tümör boyutu gibi parametreleri de içeren klinik evreleme sistemleri kullanılmaktadır. Bu klinik evreleme sistemlerini karşılaştıran çalışmalarda Barselona Klinik Karaciğer Kanseri Evrelendirme Sistemi’nin (BCLC, Barcelona Clinic Liver Cancer) (Tablo 2) tedavi edilebilir olguların seçiminde ve sağkalımın belirlenmesinde diğer sistemlere üstünlüğü vurgulanmaktadır. BCLC evreleme sistemi 4 evreden oluşmakta olup, primer lezyonun büyüklüğü, performans durumu, konstitüsyonel semptomlarının varlığı, vasküler invazyon, ekstrahepatik yayılım ve Okuda evrelemesini içermektedir. BCLC’ya göre erken evre (A) hastaları asemptomatiktirler ve tümör radikal tedaviler açısından uygundur; Ara (intermediate) evre (B) hastaları asemptomatiktirler ve HSK multinodülerdir; ileri (advanced) evre (C) hastaları semptomatiktirler, vasküler invazyon ve/veya ekstrahepatik yayılım mevcuttur. B ve C evresi hastalar cerrahi tedavi açısından uygun olmasalar da, palyatif tedavi veya yeni ajanlarla tedavi (faz II çalışmaları veya kontrollü randomize çalışmalar) yöntemlerinden fayda görebilirler. Evre D hastaları son derece kötü prognozlu olup, ancak semptomatik tedavilerle izlenmelidirler [18].

Sirozlu olgularda karaciğer dokusunun fonksiyonel kapasitesini değerlendirmek amacı ile de skarlama sistemleri geliştirilmiştir. Child-Pugh ve MELD (The Model for End-stage Liver Disease) skarlama sistemleri, bu amaçla en yaygın kullanılan sistemlerdir. Child skoru karaciğer rezervini belirlemede yıllarca güvenilir bir yöntem olarak kullanılmakla birlikte, özofagus varis kanaması ve renal fonksiyonları değerlendirmedeki yetersizliği ve ensefalopati gibi sübjektif kriterler içermesi sorun oluşturmaktadır (Tablo 3). MELD skoru 2002 yılından beri kullanılan, matematiksel bir modeldir. Meld skoru, yetişkin hastalarda hastalığın ağırlığına ilişkin bir değerlendirme puanıdır. Günümüzde transplantasyon yapılabilecek hastaların seçiminde de kullanılmaktadır. MELD skoru hastanın gelecek 3 ayda KC nakline ne kadar ihtiyacı olduğunu gösterir [19, 20]

Tablo 1: Hepatosellüler karsinom patolojik TNM evresi

Primer Tümör (T)			
Tx	Tümörün büyüklüğü değerlendirilememiştir		
T0	Primer tümör kanıtı yok		
T1	Vasküler invazyonu olmayan soliter tümör		
T2	Vasküler invazyonlu soliter tümör veya hiç birisi >5 cm olmayan multipl tümör		
T3	>5 cm olan multipl tümör veya portal veya hepatik venin bir dalını tutan tümör		
T4	Safra kesesi dışındaki çevre organlara direkt uzanımı olan veya visseral peritonu perfor eden tümör		
Bölgesel Lenf Bezleri (N)			
Nx	Bölgesel lenf bezlerinin değerlendirilememesi		
N1	Bölgesel lenf bezi metastazları yok		
N2	Bölgesel lenf bezi metastazları var		
Uzak metastaz (M)			
Mx	Uzak metastaz varlığının değerlendirilememesi		
M0	Uzak metastaz yok		
M1	Uzak metastaz var		
Evre I	T1	N0	M0
Evre II	T2	N0	M0
Evre III A	T3a	N0	M0
Evre III B	T3b	N0	M0
Evre III C	T4	N0	M0
Evre IV A	Herhangi T	N1	M0
Evre IV B	Herhangi T	Herhangi N	M1

Tablo 2: Barselona Klinik Karaciğer Kanseri Evrelendirme Sistemi

	Evre	PST	Tümör Evre	Okuda Evre	Portal HT	Bilirubin	Child-Pugh
A	A1		Tek	I	Yok	Normal	
	A2	0	Tek	I	Var	Normal	
	A3	0	Tek	I	Var	Anormal	
	A4	0	<3 cm 3 tümör	I-II			A-B
B		0	Büyük multinodüler	I-II			A-B
C		1-2	Vasküler invazyon Ekstrahepatik yayılım	I-II			A-B
D		3-4	Herhangi biri	III			C
Evre A: Erken HSK							
Evre B: Ara HSK							
Evre C: İleri HSK							
Evre D: Son Evre HSK							

Tablo 3: Child-Pugh skoru sistemi

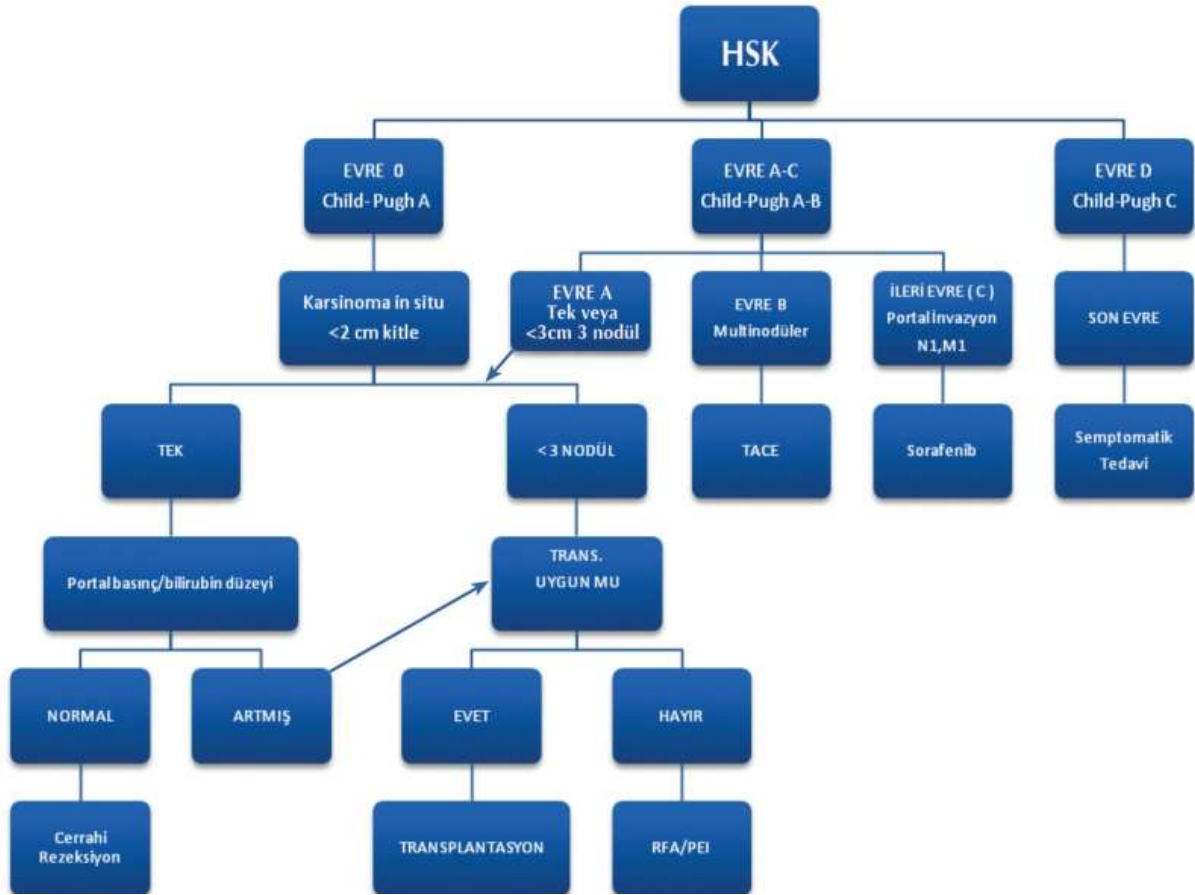
	Verilecek puan		
Parametre	1	2	3
Asit	Yok	Hafif	Orta
Bilirubin (mg/dL)	<2	2-3	>3
Albumin (g/L)	>3.5	2.8-3.5	<2,8
Protrombin zamanı Kontrolün üzerinde saniye	1-3	4-6	>6
ESR	<1.7	1.7-2.3	>2.3
Ensefalopati	Yok	Evre 1-2	Ene 3-4
Total skor: Evre A:5-6, Evre B:7-9, Evre C: 10-15			

1.1.13. Tedavi ve prognoz

HSK'da en etkili tedavi yöntemi cerrahi tedavidir, ancak hastaların çoğunluğu tanı esnasında tümör yayılımı veya altta yatan karaciğer hastalığının ağırlığı nedeniyle cerrahi açısından geç kalmaktadırlar. Cerrahi dışında lokal tedaviler, kemoterapi, radyoterapi, gen ve immunoterapi gibi tedaviler de bulunmaktadır.

Tedavi edilmeyen HSK olgularında medyan sağ kalım 4 ay olup, 5 yıllık sağ kalım oranı ABD'nde %3'dür. Karaciğer yetmezliği ve gastrointestinal kanama en önemli ölüm nedenidir [2,15].

HSK'da uygulanacak tedavi seçenekleri hastalığın evresi ile direkt ilişkilidir. İyi bilinen Barcelona çalışma grubunun önerilerine (Şekil 1) uygun olarak HSK hastaları; erken dönem, ara dönem, ileri dönem ve terminal dönem olarak dört sınıfa ayrılmaktadır [18].



Şekil 1: Barselona evreleme sistemine göre tedavi algoritması

Altta yatan karaciğer hastalığı olmayan ve küçük boyutlu tümörleri olan hastalarda cerrahi rezeksiyon en iyi seçenektir. Cerrahi rezeksiyona uygunluk kriterleri merkezden merkeze değişmekle birlikte genellikle sirotik olmayan karaciğerde periferik yerleşimli 5 cm den küçük soliter lezyonlar cerrahi rezeksiyona uygundur [1, 2]. HSK'da hastalığa eşlik eden siroza bağlı olarak karaciğer rezervinde azalma olması, hastaların bir kısmında cerrahi olanağını kısıtlamaktadır. Cerrahi öncesi hepatik rezervin değerlendirilmesi gerekmektedir. Child-Pugh sınıflandırmasına göre Child A sirozu olan hastalar genel olarak sınırlı hepatik rezeksiyonu tolere edebilmektedir. Child B ve C sirozlu hastalarda ise rezeksiyon yerine uygun vakalarda transplantasyon tercih edilmelidir [21].

Rezeksiyon sonrası sağ kalım ilk 1 yılda ortalama %55-80 iken, üçüncü yılda %42-49, 5. yılda ise %25-39 olarak bildirilmiştir [22]. Uzun süreli sağ kalım nükslerle ilişkili olup 1. yılda hastaların yaklaşık %20'sinde, 5. yılda ise %75'inde nüks saptanmaktadır. Tümörün büyüklüğü, derecesi, sayısı, satellit nodullerin varlığı, vasküler invazyon durumu, cerrahi sınırların durumu ve alfa-fetoprotein düzeyleri nüksün ortaya çıkmasında etkili faktörlerdir [21].

Karaciğer transplantasyonu HSK'da küratif bir tedavi seçeneği olması nedeniyle oldukça önemlidir. Rezeksiyona uygun olmayan hastalarda, ekstrahepatik metastaz ve makrovasküler invazyon olmaması durumunda, boyutu ≤ 5 cm tek bir tümör varlığı ya da ve en büyük boyutu ≤ 3 cm olan en fazla 3 adet tümörün varlığı Milan kriterleri olarak belirlenmiştir [23]. Bu kriterlere uygun hastalarda yapılan transplantasyonlarda 1 yıllık sağ kalım %81 ve 5 yıllık sağ kalım %51'dir [1, 2].

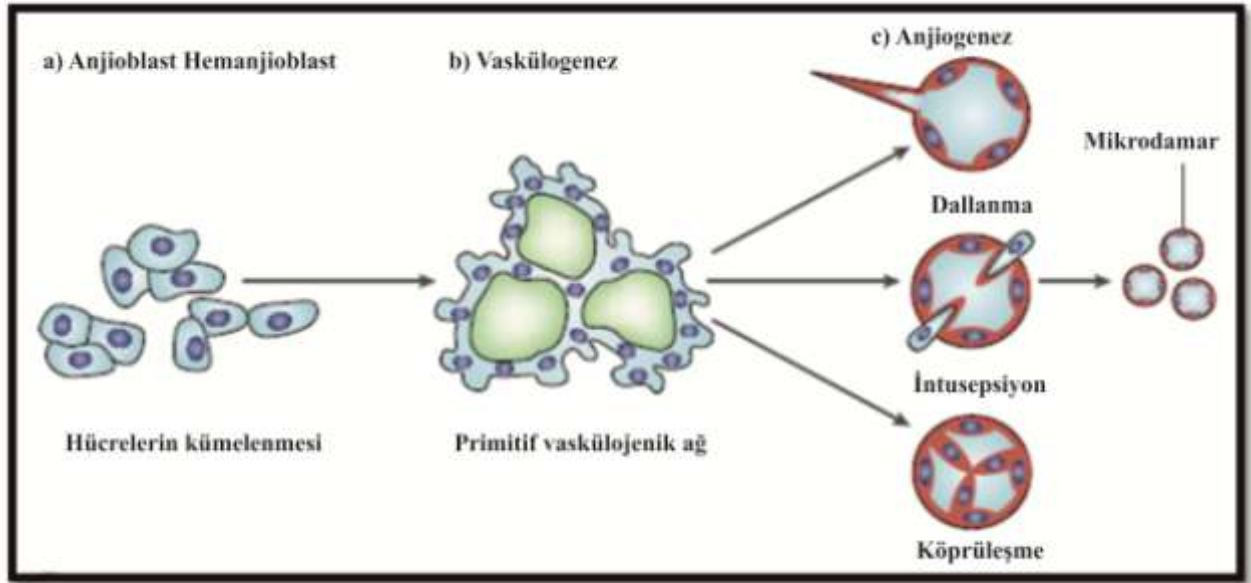
HSK'un nüks riskinin oldukça yüksek olmasından dolayı küratif cerrahi girişimler sonrasında adjuvan tedavi uygulamaları gündeme gelmiştir. Yapılan randomize klinik çalışmalarda sistemik adjuvan kemoterapi, hepatik arter bazlı kemoterapi ya da embolizasyon, immunolojik ajanlar ve radyasyon gibi tedavi yöntemleri denenmiştir. Bu çalışmaların sonuçlarına bakıldığında küratif cerrahi girişimler sonrasında gerek sistemik kemoterapilerin gerekse hepatik artere yönelik girişimlerin toplam ya da hastalıksız sağ kalıma katkısı olmadığı belirtilmiştir [24].

HSK hipervasküler bir tümördür. Bu nedenle HSK için yeni tedavi hedefi angiogenезin inhibe edilmesidir. Antiangiogenik terapiler ile angiogenik faktörler ya da endotelial proliferasyon inhibe edilmekte ve ekstrasellüler matriksin degradasyonu

önlenmektedir. Günümüzde HSK için efektif sistemik bir tedavi bulunmamaktadır. Antianjiyotik terapiler HSK hastalarında deneme aşamasında olmasına rağmen, efektif bir tedavi alternatifi olarak görülmektedir [25].

1.2. Neovaskülarizasyon/ Anjiyogenez

Anjiyogenez, fizyolojik reaksiyonları (yara iyileşmesi, rejenerasyon, iskemik dokuların vaskülarizasyonu ve menstruasyon gibi) ve patolojik olayları (tümör gelişimi- metastaz, diyabetik retinopati ve kronik inflamasyon gibi) etkileyen temel olaydır. Kan damarları embriyolojik gelişim sırasında, “vaskülogenez” ile anjioblast ve hemanjioblastlardan meydana gelmektedir. Erişkinlerdeki kan damar oluşumu, anjiyogenez ya da neovaskülarizasyon olarak adlandırılan ve var olan damarların dallanması ya da kemik iliğindeki endotelial progenitor hücrelerin dahil olduğu bir süreci kapsamaktadır (Şekil 2) [26].



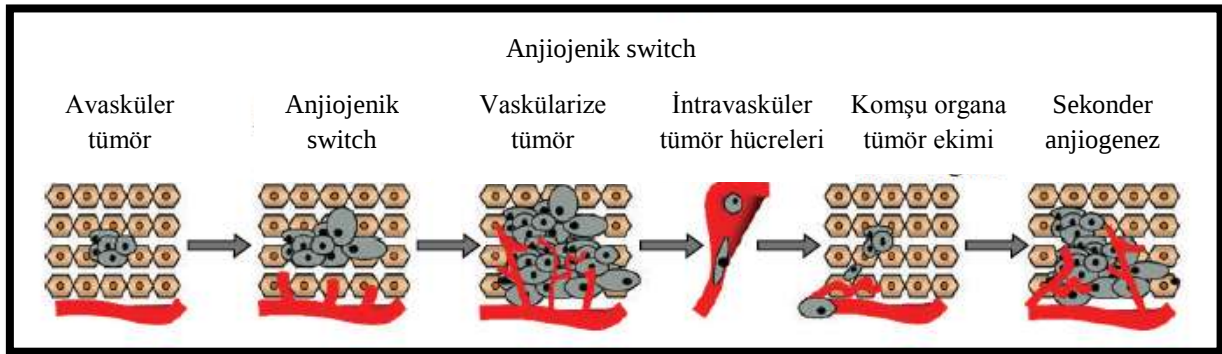
Şekil 2: Vaskülogenez ve anjiyogenezin şematik görünümü [27]

- (a) Endotel hücre prekürsörlerinin toplanması
- (b) Primitif vaskülojenik ağ oluşturma (vaskülogenez)
- (c) Primitif ağların yeniden düzenlenerek mikrodamarların oluşumu

Önceden var olan damarlardan kaynaklanan angiogenezde, vazodilatasyon, var olan damarların geçirgenliğinde artma, ekstrasellüler matriks (ESM) yıkımı ve endotel hücre göçü vardır. Endotelial prekürsör hücrelerden kaynaklanan angiogenezde ise hem vasküler sistemi geliştiren hem de hematopoetik kök hücrelerini oluşturabilen hemanjioblast hücresi prekürsör olarak kullanılır. Günümüzde endotelial prekürsör hücre olarak bilinen anjioblast benzeri hücrelerin erişkin kemik iliğinde toplandığı ve angiogenezi başlatmak üzere dokuya göç edebildiği anlaşılmıştır.

Anjiogenezde pek çok büyüme faktörü aktivite gösterse de vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve anjiopoetinlerin özel bir rolü vardır. VEGF pek çok stromal ve mezenkimal hücreden salgılanır, fakat angiogenezdeki en önemli tirozin kinaz reseptörü olan VEGFR-2 büyük oranda endotel hücrelerine ve prekürsörlerine sınırlıdır. VEGF, endotel hücre prekürsörlerinin kemik iliğinden mobilizasyonunu uyarır, bu hücrelerin angienez bölgelerinde proliferasyon ve diferansiasyonunu artırır. Ayrıca endotel hücrelerinin proliferasyonu ve motilitesini uyararak yeni kapillerlerin tomurcuklanmasını başlatır. Kapiller oluşumuna yol açan olay ne olursa olsun, yeni oluşan damarlar son derece frajildir ve stabilize olmaya ihtiyaç duyarlar. Stabilizasyon ise perisitlerin ve düz kas hücrelerinin toplanmasını ve ESM proteinlerinin depolanmasını gerektirir. Anjiopoetin 1 ve 2, PDGF ve TGF- β stabilizasyon sürecine katılır [26].

Genetik ve epigenetik değişiklikler yanı sıra tümör progresyonundaki en önemli basamaklardan birisi de tümör vaskülarizasyonun uyarıldığı “anjiogenik switch”dir (Şekil 3) [28, 29]



Şekil 3: Anjiogenik Switch: Belli bir boyuta gelinceye kadar proliferen hücreler avasküler tümör nodülü oluştururlar. Anjiogenik switch, tümör büyümesini ve metastazını sağlar. [28]

Bir tümörün büyüebilmesi için yeni damarların oluşturulması şarttır. Hızla büyümekte olan tümör hücreleri için yeterli oksijen ve besin alımı çok önemlidir. Ayrıca angiogenez tümör hücrelerinin dolaşıma katılmasına ve metastaz yapmasına yardımcı olur. Neovaskülarizasyon sürecinde öncelikle var olan damarların bazal membranı parçalanır, ardından endotel hücreleri kapiller lümen oluşturmak için göç ederler [30].

Tümördeki angiogenez fizyolojik angiogenezden belirgin farklılık göstermektedir. Aberan vasküler yapılar, değişken endotel-perisit ilişkisi, anormal kan akışı, artmış geçirgenlik ve gecikmiş matürasyon bu farklılıklardan bir kısmıdır. Bu anormal özellikler, anjiojenik sitokin ve inhibitörlerin orantısız salınımına bağlıdır [29]. Patolojik angiogenezde sıklıkla immatür ve tümör hücrelerinin yayılımını kolaylaştırıcı anormal yapı ve fonksiyonda yeni damarlar oluşmaktadır [28].

1.2.1. Hepatosellüler Karsinomda Angiogenez

HSK'un, karsinogenez, büyüme ve progresyonunda angiogenezin rolü çok kritiktir [31]. İyi bilindiği gibi HSK, sıklıkla HBV ya da HCV enfeksiyonu sonrasında gelişmiş olan fibrozis zemininde ortaya çıkmaktadır. Fibroenez sırasında pek çok büyüme faktörü, sitokin ve metalloproteinazlar gibi anjiojenik olaylar da fazlaca aktiftir. HBV virüsünün X proteini, hipoksi ile uyarılan tranforme edici faktör-1'i uyararak, VEGF gen ekspresyonunu artırır. HSK'da angiogenezde rol alan öncelikli faktör VEGF'dir [32]. VEGF artışı, tümör ilişkili en önemli iki morfolojik değişiklik olan arterializasyon ve sinüzoidal kapillarizasyon artışı ile ilişkilidir [31,32].

Yapılan araştırmalarda hepatosellüler karsinomda angiogenezin farklı moleküler mekanizmalar ile oluştuğu ortaya konmuştur. Bu mekanizmalardan en baskın olanı, yeni damarların, dokuda daha önceden var olan damarlardan tomurcuklanarak oluşmasıdır. Bunun dışında, tümör hücrelerinin mevcut vasküler ağı kullanarak proliferasyonu "vasküler co-option", tümör hücrelerinin vasküler kanallar oluşturarak vasküler yapılar gibi davranması "vasküler taklitçilik", kemik iliği kökenli endotelial progenitör hücrelerin karaciğere göçü ile oluşan angiogenezis ve lenfangiogenezde HSK'da vasküler yapılanmanın farklı mekanizmalarını yansıtmaktadır [32].

Karaciğer temel olarak hepatositler ve endotel hücrelerinden meydana gelmektedir. Bu nedenle neovaskülarizasyonu tanımlayabilmek için, normal sinüzoidleri, sinusoid benzeri

tümör mikrodamarlarından ayıran spesifik belirteçler kullanmak gereklidir. HSK'da endotel belirleyicisi olarak en sık CD34, CD31 ve von Willebrand faktör (vWF) antikorları kullanılmaktadır [25].

Normal karaciğer dokusunda, endotelde anti-CD34 ekspresyonu, portal alandaki damarlara sınırlı olmakla birlikte periportal alanda bir kaç sinüzoidde zayıf bir boyanma görülebilmektedir. HSK'da ise sinüzoid benzeri damarlarda, anti-CD34 antikoruna ile yoğun ve spesifik bir boyanma paterni izlenmektedir [33]. Önceki çalışmalarda endotel belirleyicisi olarak CD34 antikorunun diğer endotel belirleyicilerine (Faktör 8) oranla daha duyarlı ve özgül olduğu gösterilmektedir [33].

Histolojik kesitlerde immunhistokimyasal belirteçler kullanarak sayılan yeni damarların yoğunluğu mikrodamar dansitesi (MVD) olarak adlandırılmaktadır [25]. MVD, direkt olarak tümörlerin anjiojenitesini göstermekte olup pek çok tümörde prognostik önemi araştırılmaktadır [34].

CD34 immunhistokimyasal boyaması ile ölçülen MVD'nin HSK'da da prognostik önem taşıdığına dair veriler vardır [34]. Tanigawa ve arkadaşlarının, 43 HSK olgusunu içeren çalışmalarında CD34 immunhistokimyası kullanılarak tüm tümörlerde sinusoid benzeri damarlar gösterilmiştir. Ancak vWF ile sadece büyük damarlarda boyanma olmuştur. CD34 antikoruna kullanılarak sayılan MVD'nin HSK'da parsiyel rezeksiyon sonrası hasta sağ kalımı için bağımsız prognostik faktör olduğu belirtilmektedir [33]. Yamamoto ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise vWF ile ölçülen MVD, rezeksiyon sonrası hastalıksız sağ kalımı gösteren önemli bir prognostik faktör olarak bildirilmiştir [35]. Endotel belirleyici olarak CD34 antikoruna kullanan diğer iki çalışmada yine yüksek MVD skorunun, 5 cm'den küçük HSK'da kötü prognostik belirteç olduğu belirtilmektedir [36, 37].

El- Assal ve arkadaşlarının, VEGF ve F13a antikorları ile yaptıkları çalışmada, mikrodamarların tümör içinde heterojen olarak dağılmış olduğu ancak yoğunluğun en fazla olduğu noktanın tümörün periferi olduğu belirtilmiştir. Tümör boyutu MVD ile korrelasyon göstermektedir. Bu çalışmada yüksek MVD bulunan tümörlerde intrahepatik rekürrens oranı daha yüksek bulunmuştur [38].

Son yıllarda, vaskülarizasyonun anti-CD105 (Endoglin) ile gösterildiği çalışmalarda, bu antikorun, yeni oluşan endotel hücre belirteci olarak, anti-CD34 'den daha üstün olduğu öne sürülmektedir [25,34]. Endoglin, bir hücre yüzey glikoproteini olup, transforme edici

büyüme faktörü beta-1 (TGF-beta1) ve/veya TGF-beta 3' ün hücreye bağlanmasında rol oynayan bir reseptördür. Endoglin, aktive endotel hücrelerine bağlanır. Birkaç çalışmada CD105'in damar oluşumunda yer aldığı ve birçok tümör tipinde kan damarlarının anormal gelişmesinin güçlü bir belirteci olduğu ifade edilmektedir. Bu nedenle CD105'in tümör dokusundaki özellikle yeni oluşan damarlarda eksprese edildiği belirtilmektedir [39].

Meme kanseri, malign melanom ve kolorektal karsinomda anti-CD105 antikorunun tümör anjiogenezi gösteren iyi bir belirteç olduğu bildirilmektedir. Ayrıca bu çalışmalarda bu antikor ekspresyonunun klinikopatolojik parametrelerle korelasyonu, anti-CD105 Ab' unun diagnostik ve prognostik önemini göstermektedir. Buna karşın Ho ve arkadaşlarının HSK olgularında yaptığı bir çalışmada anti-CD105 Ab' u ile sadece mikrodamarlar boyanmış olup, anti-CD34 Ab ile karşılaştırıldığında belirgin prognostik fark bulunamamıştır [25]. Ancak yapılan az sayıdaki çalışma nedeni ile CD105 antikorunun HSK'daki klinik önemi henüz açık değildir [34].

Anjiogenezin kantitatif olarak hesaplandığı çalışmalarda farklı morfolojik yöntemler kullanılmıştır. Literatür incelendiğinde ise benzer tümör gruplarında anjiogenezin tümör prognozuna etkisi ile ilgili çelişkili sonuçların rapor edildiği gözlenmektedir. Literatürde bu farklılığın sayım yöntemi ile ilgili olabileceği öne sürülmektedir [25]. Bizim çalışmamızda CD34 ve CD105 ile işaretli mikrodamar sayımında görüntü analizi yöntemi kullanılmıştır.

1.2.3. Vasküler taklitçilik

Anjiogenez yüksek dereceli tümörlerde agresif büyüme paternini destekleyen iyi tanımlanmış bir mekanizmadır. Tümör hücreleri anjiogenetik faktörler salgılayarak, endotel hücrelerinin kan damarları oluşturmalarını sağlar. Böylece çoğalmayı ve yayılmayı amaçlar [40, 41].

Maniotis ve arkadaşları, melanom olgularında yaptıkları çalışmaları ile tümör vaskülaritesi hakkında "vasküler taklitçilik" (VT) adı verilen yeni bir biyolojik yol keşfetmişlerdir. Bu vasküler yapılar, anjiogenezin sonucu oluşan damarlardan, endotel içermemek başta olmak üzere çeşitli farklılıklar göstermektedir [42].

VT, tümör hücrelerinin, beslenmek için başvurduğu bir oyundur. Araştırma koşullarında tümör hücrelerinin, farklı hücre tipleri gibi fonksiyon görmesini sağlayan çok büyük bir plastisite yeteneği olduğu bilinmektedir. Vasküler taklitçilikte tümör hücreleri, endotel benzeri hücreler haline gelmekte ve damar fonksiyonu görmektedir [40, 41]. Tümör hücrelerinden oluşan bu damarsal yapılar, büyüme ve metastaz için gerekli kan desteğini sağlarken anjiogenez ile uyarılan faktörlere ihtiyaç duymamaktadır [42].

VT kanallarının oluşumunu üç faktör yönetir bunlar; malign hücrelerin plastisite yeteneği, ekstrasellüler matriksin yeniden düzenlenmesi ve VT kanallar ile konak dokunun damarları arasındaki bağlantının kurulmasıdır [43].

Tümörlerdeki mikro çevre normal dokulardan farklıdır. En önemli fark, tümör içerisinde pek çok bölgenin hipoksik olmasıdır. Yapısal olarak hasarlı damarlar ve tümör hücrelerinin tümör vaskülaritesinden hızlı çoğalması nedeniyle tümör içindeki kanlanma yetersiz olmaktadır [40, 41]. Bu nedenle bazı tümör hücreleri gen ekspresyon programlarını endotelial hücre olma yolunda değiştirirler. Damar benzeri boşlukları döşeyen bu tümör hücreleri matriks metalloproteinazlar (MMP) sekrete ederler. VT oluşturmak için tümör hücreleri ekstrasellüler matriksi indükleyecek vasküler endotelial cadherin ve laminin de eksprese ederler. Hipoksi ve vasküler taklitçilik oluşumu arasındaki ilişki çeşitli tümörlerde çalışılsa da, hepatosellüler karsinomdaki ilişki tam olarak bilinmemektedir. VT oluşumu, tümör anjiogenezinin etkilediği intersitisyel sıvı basıncından (İSB) da etkilenir. İSB, tümörlerde hızlı hücre proliferasyonuna ve tümör mikrosirkülasyonun immatürlüğüne bağlı olarak çoğu zaman yüksektir [42, 43].

VT oluşturan hücrelerin CD31 ve CD 105 immunhistokimyası ile boyanmaması, bu hücrelerin endotele diferansiye olmadığını göstermektedir. Ancak bu yapıların lümeninde eritrosit bulunması kan dolaşımının olduğunun bir kanıtıdır. Vasküler taklitçi damarlar kanama ya da tümör nekrozunun bir sonucu değildir, çünkü çevrelerinde nekroz ya da inflamatuvar hücreler görülmez. Bu hücrelerin, gerçek matür tümör hücrelerinden mi yoksa kanser kök hücrelerinden mi geliştiği halen araştırma konusudur [41].

Vasküler taklitçiliğin iki tipi tanımlanmıştır; **tübüler tip** ve **matriks paterni tip**.

Tübüler tip: Bu tür VT'de, tümör hücreleri ile döşeli, damara benzeyen ancak endotel hücreleri ile döşeli olmayan lümenli yapılar bulunur. Lümene bakan tümör hücreleri direkt olarak kan dolaşımı ile bağlantılıdır ve kolaylıkla kan akımı boyunca ilerleyebilir. Ayrıca bu

tümör hücreleri az diferansiye, yüksek malignite potansiyeli ve plastisite yeteneği olan hücrelerdir. Bu hücreler komşu bağ dokusunu yıkarak, kan damarlarının bazal membranına penetre olabilir. Bu da tümör hücrelerinin hematojen metastazını kolaylaştırır. [43]

Matriks paterni tip: Bu tür VT’de laminin, kollajen Tip IV, kollajen Tip VI ve fibronektinden zengin ekstrasellüler matriks tabakaları, tümör hücre kümelerini çevreleyen halkalar oluşturur. Tümör içinde bu alanlar 3-15 adet tümör hücresini çevreleyen laminin pozitif halkalar ile belirlenebilir. Ekstrasellüler matriks, endotel ile döşeli damarlar ile bağlantılıdır ve sıvı akışını sağlayan bir ağ oluşturur [40, 44]. Ancak bu matriks ağında damar belirteçleri ekspres edilmez [44].

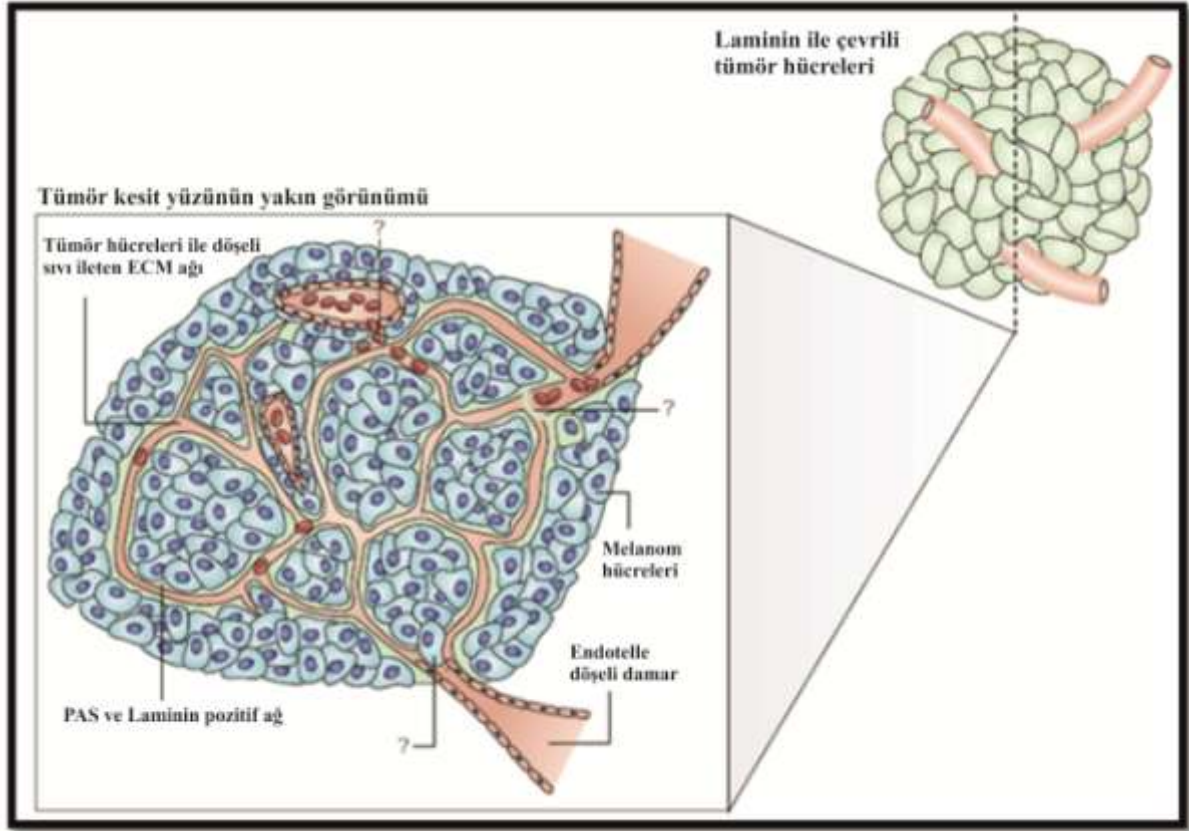
Kutanöz ve üveal melanomlarda yapılan ksenograft çalışmalarında, sıvı iletimini sağlayan ekstrasellüler matriks ağının varlığı gösterilmiştir. Bu ağ matriksten oluşan arklar ve sırt sırta yerleşmiş halkalardan meydana gelmektedir. Endotelle döşeli damarlar ile bu ağ arasında bir bağlantı vardır. İmmunhistokimyasal çalışmalarda sıvı ileten bu ağların fibrinojen içerdiği kanıtlanmıştır. Bu durum, tümör hücrelerinin oluşturduğu kümeler çevresinde plazmanın bulunduğu bir göstergesidir. (Şekil 4) [27]

VT, malign melanom, meme kanseri, prostat kanseri, over kanseri, multipl myelom, ewing sarkomu, osteosarkom, glioblastom, gastrik adenokarsinom, kolorektal kanser ve renal hücreli karsinom gibi pek çok tümörde gözlenmiştir [40, 41, 44] .

Literatürde HSK’da VT’i araştıran çok az sayıda çalışma vardır [40]. VT karaciğerde ilk olarak, 1982 yılında Sell ve Ruoslahti’nin immunfloresan kullanılarak F344 sıçanlarının karaciğerinde laminin dağılımını gösteren çalışmasında gösterilmiştir. Bu çalışmada kan damarları, safra yolları ve düzensiz olarak da sinüzoid bazal membranlarında laminin varlığı tanımlanmıştır. Karsinojenlerle muamele sonucu ise laminin boyanması yeni oluşan duktus benzeri yapılar ve hepatik kök hücreler olarak bilinen oval hücrelerle ilişkili bulunmuştur. Endotelyal belirteçler kullanılarak yapılan iki çalışmada HSK’da vasküler taklitçi tanımlanmıştır. Endotelyal belirteçler ile tübüler tip belirlenebilse de matriks paterni tipi belirlenememektedir. [40, 41] Guzman ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışma ile matriks paterni tip HSK’da ilk defa gösterilmiştir [44].

VT’in varlığı daha agresif tümör biyolojisi, metastaz ve bazı tümörlerde tümör bağlantılı mortalite artışı ile ilişkili bulunmuştur [40-42, 44]. HSK’da da, matriks paterninde

VT varlığının ortotopik karaciğer transplantasyonu sonrası agresif klinik gidiş ile ilişkili olduğu az sayıda olgu içeren bir çalışmada belirtilmiştir [44].



Şekil 4: Melanomda sıvı ileten ekstrasellüler matriks ağı [27]

Melanomda VT, tümör hücreleri ile döşeli sıvı ileten ekstrasellüler matriks ağı olarak tanımlanmaktadır. Laminin pozitif olan bu matriks yeşil renkte, melanoma hücreleri mavi renkte gösterilmektedir. Endotelle döşeli damarlar (pembe renkli) tümör hücrelerince oluşturulan bu ağın hemen yanında yer almaktadır. Tümör damarlanması yeniden biçimlendikçe sızıntılı bir hal almakta ve ekstrasvasküler alanda plazma ve eritrositlerin (kırmızı renkte) birikmesine neden olmaktadır. Ancak sıvı ileten, lamininden zengin bu ağ ile endotelle döşeli damarlar arasındaki ilişki hala araştırılmaktadır. (soru işareti ile belirtilmiş)

1.2.4. Lenfanjiogenezis

Lenfatik kanallar vasküler dolaşım sisteminin bir parçasıdır [32]. Lenfatik sistem, lenfatik damarlar ve lenfoid organlardan oluşmaktadır ve başlıca üç görevi vardır; intersitisyel sıvı fazlasının dolaşıma geri döndürülmesi, immun yanıtın sağlanması ve diyetle alınan yağın karaciğere taşınması [45]. Lenfatik kanallar, lenfatik endotelyal hücreler (LEH'ler) ile döşelidir. Lenfatik kapillerlerin bazal membranı yoktur ve düz kas ile çevrili değildirler. Toplayıcı lenfatik kanalların çevresinde seyrek bir düz kas tabakası vardır [45].

1.2.4.1. Karaciğerin normal lenfatik yapısı

Karaciğer kapsül ve stroması lenfatik yapılardan zengindir [46] Hepatik lenfatikler lokalizasyonlarına göre 3 gruba ayrılır; portal, sublobuler ve süperfisyal (kapsüler) [47]. Kapsülde bulunan lenfatik pleksus, intrahepatik lenfatiklerle çok sayıda anastomoz yapmaktadır. Bu anastomozlar hepatik venöz basıncın arttığı durumlarda önem kazanmaktadır. Kapsüler pleksustan fazla lenf sıvısının eksüdasyonu, proteinden zengin asit sıvısının oluşmasına neden olmaktadır. İntrahepatik lenfatik sistem, portal alandaki hepatik arter dalları ile ilişkili kapaklı bir sistemdir. Hepatik lenf sıvısı, intersitisyel Disse aralıklarında oluşmaktadır. Asinus içinde ise lenfatik kapillerler izlenmemektedir.

Hepatik lenfatiklerin çoğu karaciğeri porta hepatis yolu ile terk ederek hepatik ya da çölyak lenf düğümlerine drene olmaktadır. Diğer önemli drenaj yolları ise, parasternal ve posterior mediasten lenf nodlarına ulaşmaktadır. Karaciğer tüm lenf sıvısı hacminin %15-20'sini ve duktus torasikus akımının %25-50'sini oluşturmaktadır [46, 47].

1.2.4.2. Patolojik süreçlerde karaciğerin lenfatik yapısı

Karaciğerin yapısını diffüz olarak değiştiren, fibrozis ve siroz gibi durumlarda lenf sıvısı akımı artmaktadır. Anjiyografi ve BT incelemelerinde sirozdaki dilate lenfatik damarlar gösterilebilmektedir. Yokomori ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, lenfatik yoğunluğunun karaciğer fibrosis derecesine bağlı olduğu gösterilmiştir [48].

Sirotik karaciğerde lenfatikler sadece stromal septalarda olup parankimal nodüllerde bulunmamaktadır. Buna karşılık HSK'da lenfatikler hem tümör parankiminde hem de intratümöral septalarda bulunmaktadır. Thelen ve arkadaşlarının rezeke edilen HSK

hastalarını içeren çalışmasında tümör ilişkili lenfanjiogenezin HSK'daki neovaskülarizasyon sürecinde rol aldığı gösterilmiştir. Lenfovasküler yoğunluk olarak tanımlanan lenfanjiogenezin, genel sağkalım ile ilişkili olduğu ve hastalısız sağkalımı göstermede bağımsız prognostik bir parametre olduğu belirtilmektedir [49].

Kanser hastalarında, lenfatik kanallar primer tümör sahasından uzaklaşıp uzak organ ya da lenf nodlarına metastaz için bir yol oluşturur [45]. Tümör ilişkili lenfanjiogeneze ilgi son yıllarda gittikçe artmaktadır [49]. Tümör lenfatikleri intratümöral ya da peritümöral olarak bulunabilir. Kan damarlarında olduğu gibi tümör ilişkili lenfatik kanallar sağlıklı dokudaki karşılıklarından yapısal olarak farklıdır [45]. Bu yeni oluşan damarlar destek yapılar içermediklerinden intersitisyel basınç ile kolaylıkla zedelenbilir ve tümör hücrelerinin lenfatik dolaşıma geçmesine imkan sağlayabilir [50].

Tümör lenfanjiogenezi temel olarak var olan lenfatik damarlardan tomurcuklanmaya dayanır. Hipoksik koşullar ve büyümeyi uyaran tümör ortamında, çok sayıda büyüme faktörü salgılanmaktadır. Lenfanjiogenik faktörler olan VEGF-C ve VEGF-D uyarısı ile tümör lenfatik kanalları oluşmaktadır. Ayrıca kanser ve diğer patolojik inflamatuvar süreçlerde prekürsör LEH'ler de lenfatik damar oluşumuna katılırlar [45].

Lenfatik endotellerinin HSK gelişimi sırasında özelleşmiş karaciğer sinuzoid endotelleri olabileceğine dair sınırlı sayıda kanıt bulunmaktadır. Lenfanjiogenezi temel olarak VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 sistemi ile düzenlenir. Ancak HSK'daki lenfanjiogeneze bu sinyal yolağının rolü hakkında fazla bilgi yoktur [32].

Bu çalışmada, yukarıda tarif edilen, tümör beslenmesini, büyümesini ve yayılmasını sağlayan farklı anjiogenetik mekanizmalar, immünohistokimyasal ve morfolometrik olarak, transplantasyonla tedavi edilen hepatosellüler karsinom olgularında araştırılmış ve hastaların postoperatif prognozunu belirlemede kriter olarak kullanılıp kullanılamayacakları sorgulanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza, 2002-2011 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde, siroz zemininde HSK tanısı alan ve karaciğer transplantasyonu ile tedavi edilen 60 olgu dahil edildi. Genel cerrahi transplantasyon polikliniğinde takip edilen bu 60 olgunun total hepatektomisine ait arşiv materyeli retrospektif olarak incelendi. Hastaların poliklinik dosyaları yaş, cinsiyet gibi demografik özellikleri, siroz etyolojisi, serolojik parametreler, klinik tümör ve siroz evresi, nüks durumu ve sağ kalım açısından değerlendirildi.

Klinik takipleri bulunan ve arşivimizde hematoksilen eozin (HE) boyalı kesit ve parafin bloklarına ulaşılan bu 60 olguya ait tüm kesitler, www.cap.org sayfasında bulunan, HSK olgularını değerlendirme protokolünde yer alan kriterlere göre evre ve prognostik özellikler açısından iki patolog (GGN, ÖS) tarafından tekrar değerlendirildi. Değerlendirme sırasında olguda zeminde siroz varlığı ve etiyolojisi, tümörün varlığı (WHO 2010 kriterlerine göre), boyut ve sayısı, tümör derecesi [17], evresi [16], lenfovasküler invazyon ve perinöral invazyon içerip içermediği, varsa lenf düğümlerinin durumu not edildi.

Her olgu tümörün değerlendirilmesi sırasında, tübüler tipte VT varlığı açısından gözden geçirildi. Tümör hücrelerince oluşturulan, içerisinde eritrositler bulunan ancak endotelle döşeli olmayan damar benzeri boşluklar, "tübüler tip VT" açısından pozitif kabul edildi. Bu yapıların endotel ile döşeli olmadığı Anti-CD34 antikoru (Ab) ile karşılaştırılarak konfirme edildi.

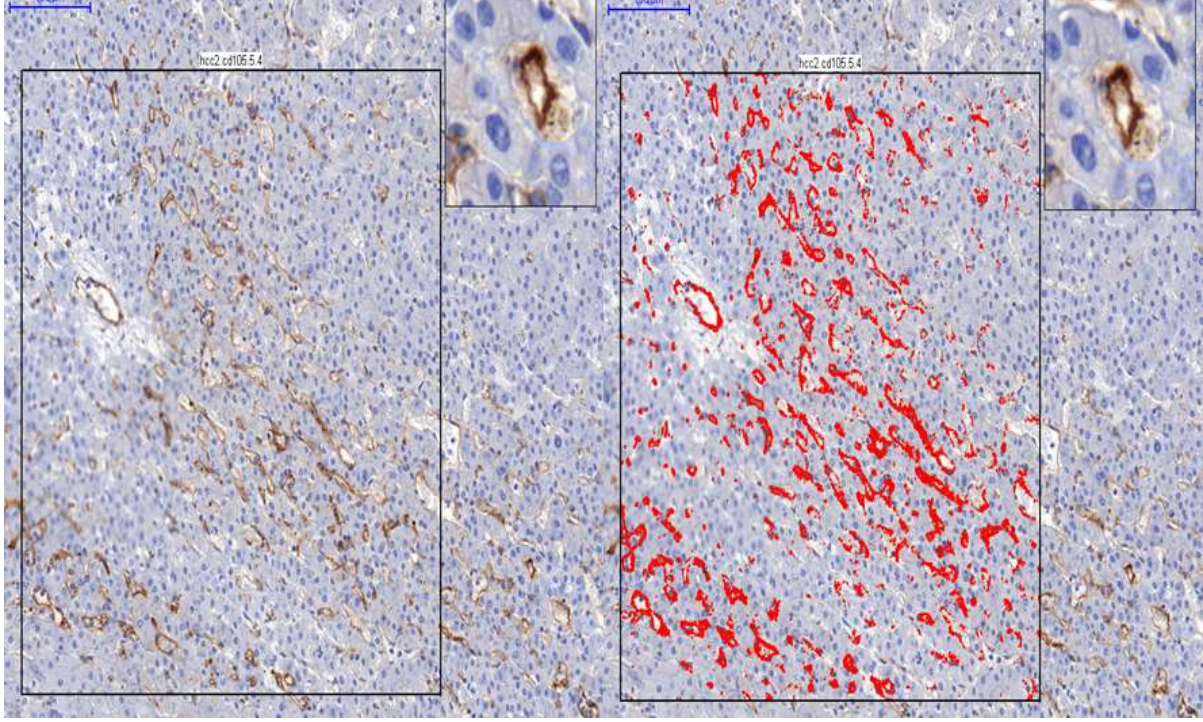
HE boyalı kesitlerin incelenmesi sırasında tümörü en iyi temsil eden kesitler seçildi ve doku dizini (mikroarray) kalıpları için 3 mm çapta alanlar lam üzerinde işaretlendi. İmmunhistokimyasal (İHK'sal) boyamalar için, seçilmiş parafin bloklardan lizinli lamlara 4 mikron kalınlıkta kesitler hazırlandı. Kesitlere Anti-Laminin (Neomarkers, Rabbit Polyclonal Antibody; RB-082-A, dilüsyon 1:50) Ab'u uygulandı. Ayrıca seçilmiş olan bloklarda HE boyalı kesitlerde çizilen ilgili alanlar işaretlenerek, doku bloklarından 3 mm çaplı doku korları alındı (Tissue-Tek® Quick-Ray™ 8018). İHK'sal boyamalar için oluşturulan bu doku dizinlerinden (TMA) 4 mikron kalınlıkta kesitler alındı. TMA kesitlerine Anti-CD34 (Dako, Monoclonal Mouse Anti-Human; IR632 Clone QBEnd 10, predilüe), Anti-CD105 (Novocastra, Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody, dilüsyon 1:50) ve Anti-D2-40 (Invitrogen, Monoclonal Mouse (clone D2-40), dilüsyon 1:50) Ab'ları uygulandı. Tüm

İHK'sal boyamalar Ventana Benchmark XT otomatik boyama makinasında standart prosedür kullanılarak yapıldı.

Anti-CD34, Anti-CD105 ve Anti-D2-40 Ab'ları ile boyanan TMA kesitleri Mirax Midi preperat tarama sistemi ile 20X objektif kullanarak tarandı ve işaretlenmiş damarların miktarı açısından 3D Histech HistoQuant® görüntü analizi programı ile bilgisayar ortamında değerlendirildi. Her bir olguda küçük büyütmede (4X) vasküler yapıların en yoğun boyanma gösterdiği alanlar (hot spot) değerlendirme için işaretlendi. İHK'sal olarak boyalı alanlar programa tanıtıldı ve ölçümler yapıldı. (Resim 1) Programda vaskülarite değerlendirmesinde kullanılan parametreler ve açıklamaları tablo 4'de belirtilmektedir.

Tablo 4: Görüntü analizi programı (3D Histech- Histoquant) ile hesaplanan parametreler

Veri	Formül/Açıklama
FA	mm ² olarak seçilmiş alan (field area in mm ²)
MA	Seçilen objelerin mm ² olarak toplam alanı (mask area in mm ² : Summed area of each detected object)
NO	Saptanan obje sayısı (Number of detected objects: Summed number of each detected object)
NO/FA	mm ² 'de saptanan objelerin toplam sayısı



Resim 1: Yazılım programında ölçüm yapılacak ilgili alanın tarafımızdan işaretlenmesi ve program tarafından ölçüm yapılan alanın seçilmesi.

Anti-Laminin antikorı ile boyanan kesitler iki patolog (GGN, ÖS) tarafından değerlendirildi. Tümör içinde laminin pozitif matriksin çevrelediği 3-15 tümör hücresinden oluşan yapıların bulunduğu olgular “matriks paterni tip VT” açısından pozitif kabul edildi [44]. Bu yapıların endotel ile döşeli olmadığı, pozitif kabul edilen olguların her birine uygulanan Anti-CD34 antikorı ile karşılaştırılarak konfirme edildi. Değerlendirme sonuçları negatif, matriks paterni tipinde VT ve neovasküler yapılarda pozitiflik olarak 3 kategoriye ayrıldı. Görüntü analizi program ile elde edilen vaskularizasyon verileri ile standart prognostik parametreler arasındaki istatistiksel analizler SPSS 15.0 programı (Sperman Korrelasyon testleri ve Mann Whitney U) ile yapıldı. Her bir parametrenin değeri ortalama $\pm$ standart hatası olarak belirtildi Sağ kalım analizi için Kaplan-Meier testi kullanıldı. P değerinin 0,05’den küçük olması ($P < 0.05$) halinde veriler istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi.

3. SONUÇLAR

3.1. Olguların klinik bulguları

2002-2011 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde karaciğer transplantasyonu uygulanan 60 adet HSK olgusunun tanı anındaki yaşları 37 ve 64 arasında değişmekte olup ortalama değeri 51'dir. Olguların 7'si (%12) kadın, 53'ü (%88) erkektir. On beş hasta (%25) siroz nedeni ile transplantasyon yapılmış, patolojik incelemede insidental olarak HSK tanısı almıştır.

Klinik siroz evresi açısından, hastaların 17'si (%28,3) CHİLD A, 25'i (%41,7) CHİLD B ve 17'si (%28,3) CHİLD C'dir. MELD skoru dokuzun altında olan 14 (%23,3), 10-19 olan 43 (%71,6), 20-29 olan iki (%3,3) ve 30-39 olan bir (%1,6) hasta bulunmaktadır.

Siroz etyolojisi açısından bakıldığında hastalardan ikisinin (%3,3) siroz etyolojisi bilinmemektedir. Bu olgularda viral seroloji negatif olup, alkol kullanımı da bulunmamaktadır. Etiyolojisi bilinen olgularda, 27 olguda HBV (%45) pozitifliği, 10 olguda HCV (%16,7) pozitifliği, bir olguda HBV + HCV pozitifliği (%1,7), 16 olguda ise HBV + HDV pozitifliği (%26,7) bulunmaktadır. Üç (%5) olguda sadece alkol kullanımı, HBV pozitif bir olguda (%1,7) ise ek olarak alkol kullanımı da söz konusudur.

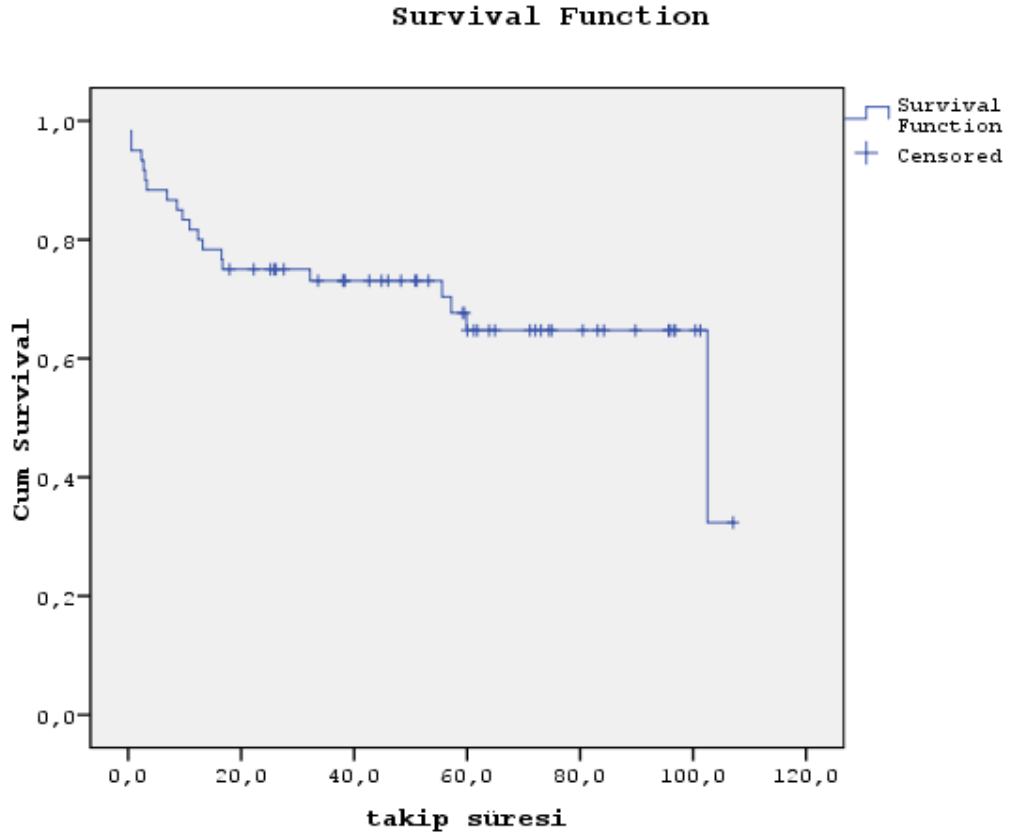
Hastaların 49'una (%81,8) transplantasyon öncesi tümöre yönelik herhangi bir tedavi uygulanmamış olup, üç (%5) hastanın tedavi alıp almadığı bilinmemektedir. Yedi (%11,6) hastada ise transplantasyon öncesi kemoembolizasyon öyküsü bulunmaktadır. Bir (%1,6) hastaya da transplantasyon öncesi rezeksiyon uygulanmıştır.

Hastaların ortalama takip süresi 47,9 aydır (0,4 -107 ay). Bu süre içerisinde nüks olan yedi (%11,6) hasta bulunmaktadır ve bunlardan birisi hastalıkla halen sağdır. Hastalardan 39'u (%65) sağ ve sağlıklıdır, 20'si (%33,3) ölmüştür. Çalışmaya katılan HSK hastalarının sağ kalım analizi Kaplan-Meier testi ile yapılmış ve ortalama yaşam süresi $75,05 \pm 5,74$ ay olarak saptanmıştır.

Olgulara ait CHİLD ve MELD skorları, serolojik parametreler ile sağ kalım bilgileri Tablo 5'de ve sağ kalım eğrisi Şekil 5'de yer almaktadır.

Tablo 5: Hastaların klinik bulguları

	OLGU SAYISI (%)
CHILD	
A	17 (28,3)
B	25 (41,7)
C	17 (28,3)
MELD SKORU	
<9	14 (23,3)
10-19	43 (71,6)
20-29	2 (3,3)
30-39	1 (1,6)
>40	0
SEROLOJİ	
Seroloji negatif	2 (3,3)
HBV	27 (45)
HCV	10 (16,7)
Etanol	3 (5)
HBV + HCV	1 (1,7)
HBV + HDV	16 (26,7)
HBV + Etanol	1 (1,7)
TRANSPLANTASYON ÖNCESİ TEDAVİ	
Kemoembolizasyon	7 (11,6)
Rezeksiyon	1 (1,6)
Bilinmiyor	3 (5)
Uygulanmamış	49 (81,8)
NÜKS	7 (11,6)
HASTANIN SON DURUMU	
Sağlıklı yaşam	39 (65)
Hastalıkla yaşam	1 (1,7)
Ölüm	20 (33,3)
HSK nedeniyle	8 (13,3)
HSK dışı bir nedenle	11 (18,3)
Bilinmiyor	2 (1,7)



Şekil 5: Tüm olgularımızın sağ kalım eğrisi (takip süresi: ay)

3.2. Olguların patolojik bulguları

Histopatolojik olarak yeniden değerlendirilen 60 olguya ait total hepatektomi materyallerinin 28'inde (%46,7) tek tümör nodülü, 32'sinde (%53,3) birden fazla tümör nodülü saptanmıştır. Birden fazla tümörü olan olgularda, tümör sayısı 2 ile 10 arasında değişmekte olup, ortalama sayı 3,7'dir. Tümör boyutu 10 ve 110 mm arasında değişmekte olup, ortalama boyut 32,5 mm'dir. Tümör evreleri açısından bakıldığında olguların 25'i (%41,7) pT1, 31'i (%51,7) pT2, 3'ü (%5) pT3 ve 1'i (%1,7) pT4 olarak değerlendirilmiştir. Dört olgunun (%6,7) tümör derecesi 1, 38'inin (%63,3) 2, 16'sının (%26,7) 3 ve 2'sinin (%3,3) 4'dür. Olguların 46'sında (%76,7) mikro ya da mikrovasküler invazyon bulunmamaktadır. Vasküler invazyon bulunan 14 olgunun (%23,3) 2'sinde makroskopik, diğerlerinde mikroskopik damar invazyonu vardır.

Olguların patolojik bulguları Tablo 6'da yer almaktadır.

Tablo 6: Altmış olgunun patolojik bulguları

	Olgu sayısı (%)
Fokalite	
Tek nodül	28 (46,7)
Birden fazla nodül	32 (53,3)
Tümör boyutu	
≤2 cm	19 (31,7)
3-5 cm	32 (53,3)
>5 cm	9 (15)
Tümör derecesi	
1	4 (6,7)
2	38 (63,3)
3	16 (26,7)
4	2 (3,3)
Patolojik T evresi	
T1	25 (41,7)
T2	31 (51,7)
T3	3 (5)
T4	1 (1,7)
Vasküler invazyon (vi)	
Yok	46 (76,7)
Var	14 (23,3)
Makroskopik vi	2 (3,3)
Mikroskopik vi	12 (20)

3.3. Vaskülarizasyon parametreleri ile ilgili bulgular

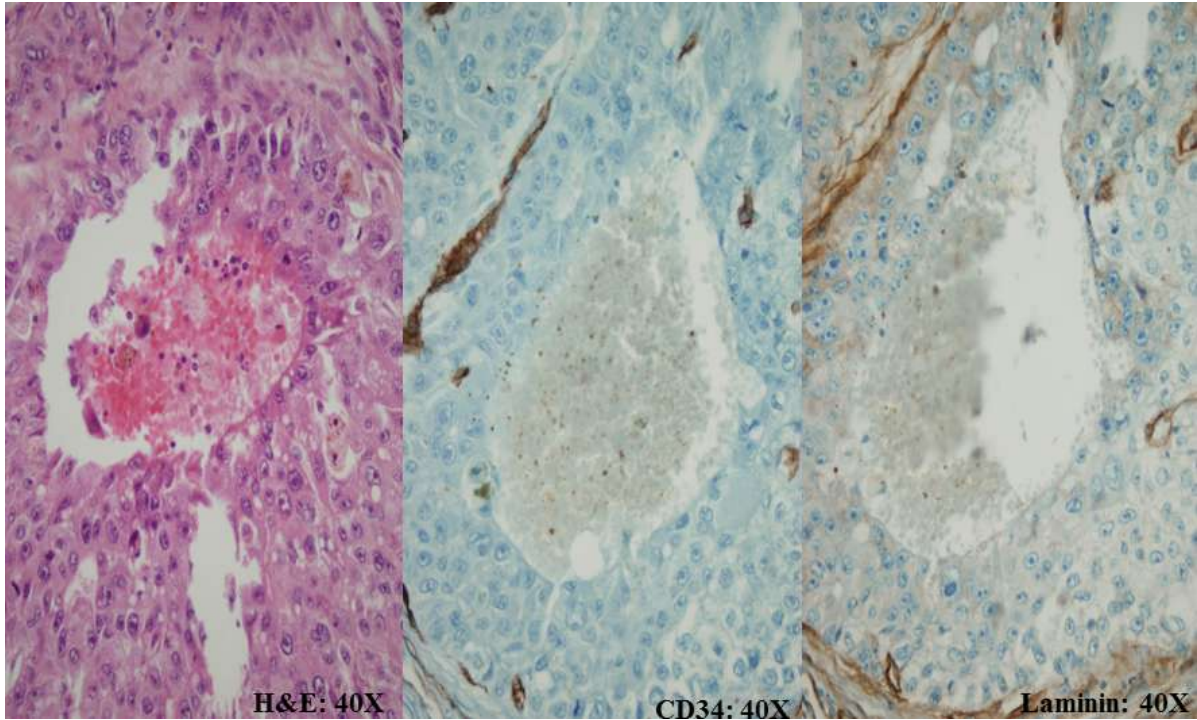
3.3.1. Vaskülojenik taklitçilik

A-Tübüler Tip Vaskülojenik Taklitçilik Varlığı:

Hepatosellüler karsinom kesitlerinde tümör hücrelerince oluşturulan, içerisinde eritrositler bulunan ancak endotelle döşeli olmayan damar benzeri boşluklar “tübüler tip VT” olarak değerlendirildi. Bu yapıların endotel ile döşeli olmadığı Anti-CD34 antikoru ile ve ekstrasellüler matriks içermediği Anti-Laminin antikoru ile karşılaştırılarak konfirme edildi. 60 olgunun 16’sında (%26,7) tübüler tip VT pozitif bulundu. (Resim 2)

Tübüler tip VT varlığı ile patolojik T evresi, tümör derecesi, vasküler invazyon, matriks paterni türünde VT ve nüks, sağ kalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır. Ayrıca Anti-CD34, Anti-CD105 ve Anti-D2-40 antikorumla ile mm² olarak saptanan objelerin toplam alanı ve mm² olarak saptanan objelerin toplam sayısı ile tübüler tip VT arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Tübüler tip VT pozitif ve negatif olguların, histopatolojik parametreler ve sağ kalımla ilgili verileri tablo 7’de yer almaktadır.



Resim 2: Tübüler tip VT HE, CD34 (negatif), Laminin (negatif)

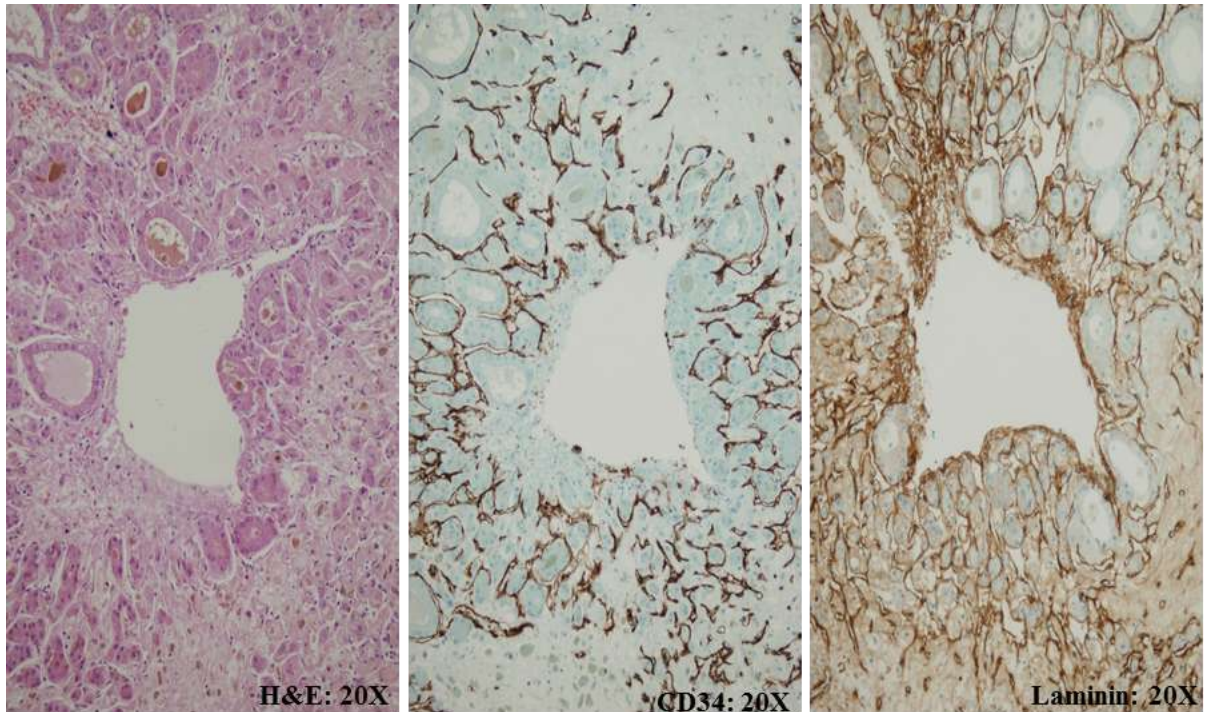
Tablo 7: Tübüler tipte VT ile klinokopatolojik parametrelerin karşılaştırılması

	Tübüler tip VT Pozitif (n=16)	Tübüler tip VT Negatif (n=44)
Son durum		
Yaşayan	9 (%56,3)	31 (%70,4)
Ölen	7 (%43,7)	13 (%29,6)
Nüks	3 (%18,7)	4 (%9)
Patolojik T evresi		
T1	4 (%25)	21 (%47,7)
T2	9 (%56,3)	22 (%50)
T3	2 (%12,5)	1 (%2,3)
T4	1 (%6,3)	0 (%0)
Derece		
1	1 (%6,3)	3 (%6,8)
2	8 (%50)	30 (%68,2)
3	6 (%37,5)	10 (%22,7)
4	1 (%6,3)	1 (%2,3)
Vasküler invazyon (vi)		
Var	4 (%25)	10 (%22,7)
Yok	12 (%75)	34 (%77,3)
Laminin		
Matriks paterni tip VT (-)	1 (%6,3)	10 (%22,7)
Matriks paterni tip VT (+)	15 (%93,7)	34 (%77,3)
CD34 (ortalama ±SS)		
MA	3,9 ±2,1	2,6 ±1,6
NO/FA	494,2 ±616,7	612,9 ±1107,0
CD105 (ortalama ±SS)		
MA	2,5 ±2,0	2,9 ±2,6
NO/FA	824,0 ±728,5	696,0 ±835,8
D2-40 (ortalama ±SS)		
MA	2,4 ±3,3	1,8 ±2,8
NO/FA	171,3 ±339,4	148,3 ±318,2

B- Matriks paterni tipi vaskülojenik taklitçilik varlığı:

Anti-Laminin antikoru ile boyanan kesitler iki patolog (GGN, ÖS) tarafından değerlendirilmiştir. Tümör içinde laminin pozitif matriksin çevrelediği 3-15 tümör hücresinden oluşan alanlar “matriks paterni tip VT” açısından pozitif kabul edilmiştir. Bu alanların tümör içinde fokal olarak yer aldığı gözlenmiştir. Bu yapıların endotel ile döşeli olmadığı, VT pozitifliği olduğu düşünülen tümör kesitlerinin anti-CD34 ile boyanması ve laminin boyalı kesitler ile karşılaştırılması ile konfirme edilmiştir (Resim 3). Altmış olgunun 22’sinde (%36,7) tümör içinde anti-laminin antikoru ile boyanma olmamıştır. On bir olguda (%18,3) matriks paterni tipinde VT saptanmıştır. 27 olguda ise (%45) CD34 ile benzer paternde tümöral damar duvarlarında boyanma olduğu görülmüştür. Matriks paterni tipine VT varlığı ile patolojik T evresi, tümör derecesi, vasküler invazyon, hastalık nüksü ve sağ kalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır. Ayrıca anti-CD34, anti-CD105 ve anti-D2-40 antikoları ile mm² ‘deki vasküler alan (MA) ve mm² deki toplam obje sayısı ile matriks paterni tip VT arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Matriks paterni VT pozitif ve negatif olguların standard histopatolojik parametreler ve sağ kalımla ilgili verileri tablo 8’de yer almaktadır.



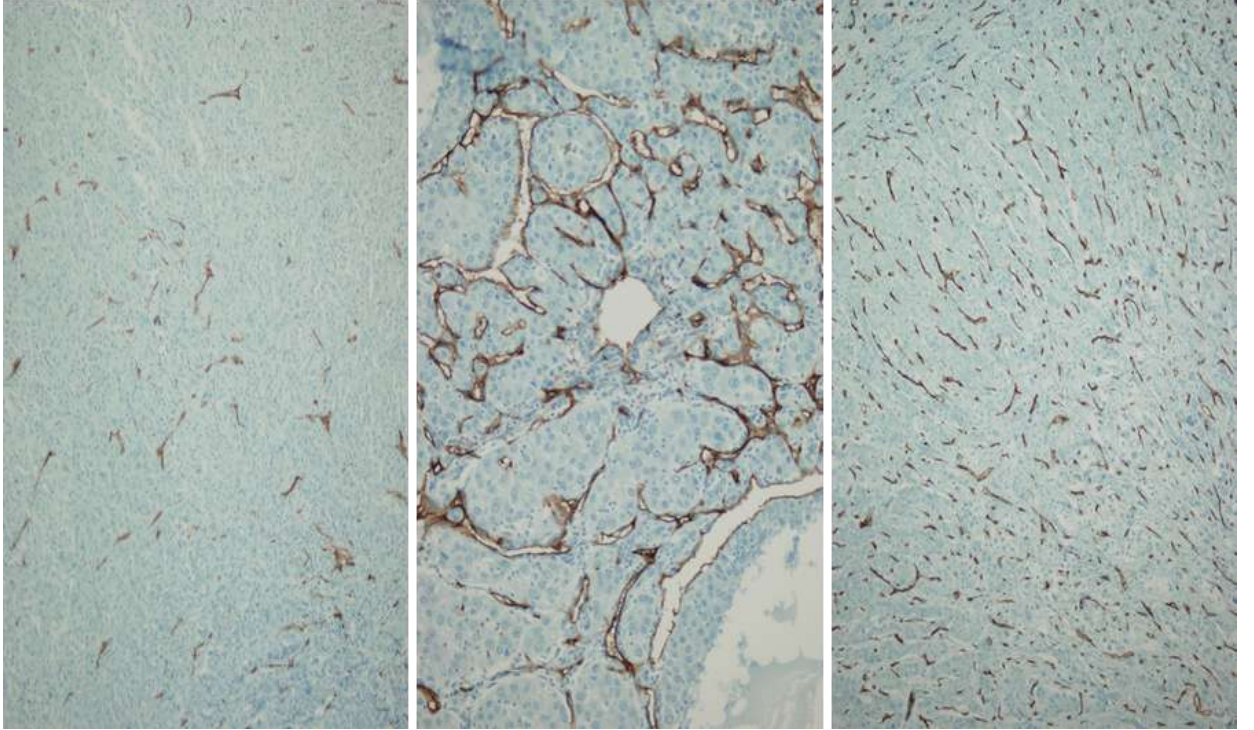
Resim 3: Matriks paterni tipinde VT HE, CD34 (negatif), Laminin (pozitif)

Tablo 8: Matriks paterni tip VT varlığı ile klinikopatolojik parametrelerin ilişkisi

	Matriks paterni tipinde VT (+) (n=11)	Matriks paterni tipinde VT (-) (n=49)
Son durum		
Yaşayan	7 (%63,6)	33 (%67,3)
Ölen	4 (%36,4)	16 (%32,7)
Nüks	1 (%9)	6 (%12,2)
Patolojik T evresi		
T1	5 (%45,5)	20 (%41)
T2	5 (%45,5)	26 (%53)
T3	1 (%9)	2 (%4)
T4	0	1 (%2)
Derece		
1	0	4 (%8,2)
2	7 (%63,6)	31 (%63,3)
3	3 (%27,3)	13 (%26,5)
4	1 (%9,1)	1 (%2)
Vasküler invazyon (vi)		
Var	3 (%27,3)	11 (%22,5)
Yok	8 (%72,7)	38 (%77,5)
Tübüler tipte VT		
Pozitif	1 (%9,1)	15 (%30,6)
Negatif	10 (%90,9)	34 (%69,4)
CD34 (ortalama ±SS)		
MA	2,4 ±1,1	3,1 ±1,9
NO/FA	396,4 ±149,7	622,8 ±1098,1
CD105 (ortalama ±SS)		
MA	2,7 ±2,9	2,8 ±2,4
NO/FA	1042,3 ±1091,1	660,0 ±721,3
D2-40 (ortalama ±SS)		
MA	1,6 ±2,6	2,1 ±3,01
NO/FA	140,8 ±354,3	157,5 ±317,2

3.3.2. CD34 ile gösterilen anjiogenez

TMA kesitlerine uygulanan Anti-CD34 antikoruna ile tümör içindeki damar endotel hücrelerinde pozitif boyanma saptanmıştır. Bu antikorla tüm HSK olgularında sinuzoidal patende ya da izole damarlar şeklinde (n:60; %100), değişen derecelerde pozitiflik bulunmaktadır (Resim 4). Görüntü analizi programı ile CD34 ile işaretlenmiş damar yapıları seçilerek mm²'deki alanı (MA) hesaplandığında, HSK dokularında damarlanmanın en yoğun olduğu alanda vasküler yapıların ortalama alanının mm²'de $4,6 \pm 2,1$ olduğu ölçülmüştür. Anti CD34 pozitifliğinin MA değerleri ile patolojik T evresi, tümör derecesi, vasküler invazyon, hastalık nüksü ve sağ kalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır. Ayrıca olgularda ölçülen anti-CD34 pozitiflik parametreleri ile hasta yaşı, olguların CHİLD ve MELD skorları, tümör boyutu ve tümöral nodül sayısı arasında da istatistiksel anlamlı ilişki yoktur. Buna karşın NO/FA değerleri ile sağkalım arasında negatif bir korrelasyonun bulunduğu saptanmıştır Milimetrekaresinde düşük miktarda obje/damar bulunan olguların daha kısa yaşadığı gözlenmiştir.



Resim 4: Değişken derecelerdeki CD34 pozitiflikleri

3.3.3. CD105 ile gösterilen anjiogenez

Anti-CD105 antikoru ile tüm tümör örneklerinde tümör içi vasküler yapıların endoteli pozitif boyanmıştır. Boyanma değişik düzeylerde olup, genel olarak CD34 boyanmasına göre daha hafif düzeyde ve fokaldır. Görüntü analizi programı ile CD105 ile işaretlenmiş damar yapıları seçilerek mm²deki alanı (MA) hesaplandığında, HSK dokularında damarlanmanın en yoğun olduğu alanda vasküler yapıların ortalama alanının mm²'de $2,8 \pm 2,5$ olduğu ölçülmüştür. Milimetrekaredeki obje sayısı tümörlerde ortalama $730,1 \pm 804,5$ olarak hesaplanmıştır. Anti CD105 boyanma paterni, Anti-CD34'a benzer olmakla birlikte her 2 antikoru boyanma yoğunlukları (MA ve NO/FA değerleri) istatistiksel anlamlı bir korrelasyon göstermemiştir (spearman korrelasyon). Anti CD105 pozitifliğinin MA ve NO/FA değerleri ile patolojik T evresi, tümör derecesi, vasküler invazyon, hastalık nüksü ve sağ kalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır (Mann Whitney U) . Ayrıca olgularda ölçülen anti-CD105 pozitiflik parametreleri ile hasta yaşı, olguların CHİLD ve MELD skorları, tümör boyutu ve tümöral nodül sayısı arasında da istatistiksel anlamlı ilişki yoktur.

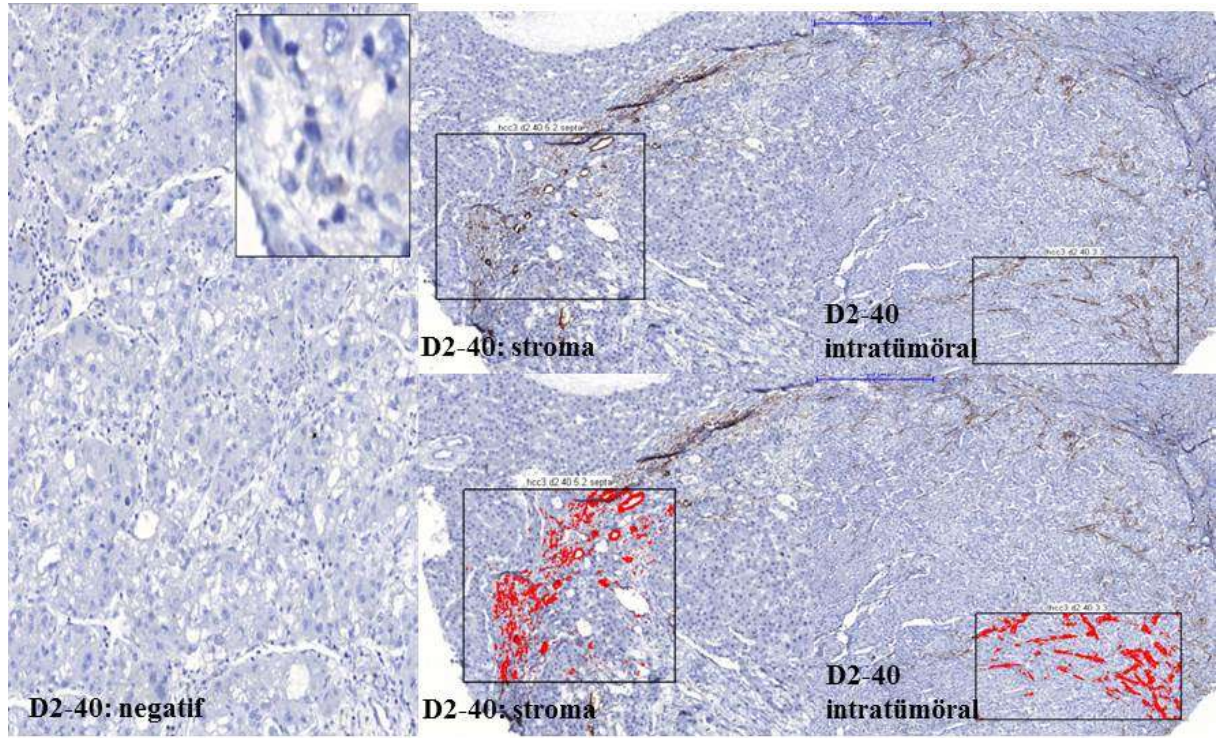
3.3.4. D2-40 ile gösterilen lenfangiogenez

TMA kesitlerine uygulanan Anti-D2-40 antikoru ile 25 (%41,7) olgunun, 10'unda tümör stromasında, 15'inde ise tümör hücreleri arasında izlenen lenfatiklerde pozitif boyanma saptanmıştır (Resim 5). Otuz beş olguda ise (%58,3) intratümöral lenfatiklerin endotelinde pozitif boyanma saptanmamıştır. Görüntü analizi programı ile D2-40 ile işaretlenmiş damar yapıları seçilerek mm²deki alanı (MA) hesaplandığında, HSK dokularında lenfatik damarlanmanın en yoğun olduğu alanda vasküler yapıların ortalama alanının mm²'de $2,4 \pm 2,9$ olduğu ölçülmüştür. Milimetrekaredeki obje sayısı ise tümörlerde ortalama $468,3 \pm 1043,3$ olarak hesaplanmıştır. D2-40 pozitifliğinin MA ve NO/FA değerleri ile patolojik T evresi, tümör derecesi, vasküler invazyon, hastalık nüksü ve sağ kalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır (Mann Whitney U). Ayrıca olgularda ölçülen D2-40 pozitiflik parametreleri ile hasta yaşı, olguların CHİLD ve MELD skorları, tümör boyutu ve tümöral nodül sayısı arasında da istatistiksel anlamlı ilişki yoktur.

Altmış olgunun her 3 vasküler belirleyiciye ait MA ve NO/FA değerlerinin ortalamaları standart sapmaları ile tablo 9'da yer almaktadır.

Tablo 9: Vasküler belirleyicilerin görüntü analizi ölçüm sonuçlarının ortalama $\pm$ standart sapma değerleri

Belirleyici	MA (mm ² 'deki vasküler alan)	NO/FA
CD34	4,6 $\pm$ 2,1	581,3 $\pm$ 996,3
CD105	2,8 $\pm$ 2,5	730,1 $\pm$ 804,5
D2-40	2,4 $\pm$ 2,9	468,3 $\pm$ 1043,3



Resim 5: D2-40 negatifliği, stromal pozitiflik ve intratümöral pozitiflik

4. TARTIŞMA

Intratümöral damar sayısı ile tümör biyolojik davranışı ve hasta sağ kalımı arasındaki ilişki pek çok tümörde araştırılmıştır. Meme, akciğer, prostat kanserlerinde, malign melanomda, santral sinir sistemi tümörlerinde, yüksek intratümöral MVD değerleri, hasta sağ kalımı açısından bağımsız kötü prognostik bir parametre olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte anjiogenez ile sağ kalım arasında bu ilişkinin saptanamadığı çalışmalar da bulunmaktadır [51]. Hepatosellüler karsinom hipervasküler bir tümör olup, son 20 yıldır, tümör ve besleyen damar arasındaki ilişkiyi keserek tümörün büyümesi durdurulmaya çalışılmaktadır. Ligasyon ve embolizasyon gibi çeşitli yöntemler kullanılsa da tümörün anjiogenez kapasitesi ve heterojenitesi nedeniyle bu metodlar her zaman etkili olamamaktadır [34]. Anjiyogenezi düzenleyen moleküler mekanizmalar HCC tedavisinde yeni hedeflerden biridir. Ancak ileri evre kanserde anti anjiogenik tedavilerin tek başına etkinliği kısıtlıdır [25].

Tümör anjiyogenezinin HSK’da prognoz açısından önemli bir faktör olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte diğer tümörler ile karşılaştırıldığında prognoz ile ilişkisini gösteren veriler daha kısıtlıdır. HSK ile yapılan araştırmalarda anjiogenezin farklı moleküler mekanizmalar ile oluştuğu ortaya konmuştur. Bu mekanizmalardan en baskın olanı, yeni damarların, dokuda daha önceden var olan damarlardan tomurcuklanarak oluşmasıdır. Bunun dışında, tümör hücrelerinin vasküler kanallar oluşturarak, lümen içeren yapılar ya da ekstrasellüler matriks oluşturma yolu ile vasküler yapılar gibi davranması yani “vasküler taklitçilik” yanı sıra kemik iliği kökenli endotelial progenitör hücrelerin karaciğere göçü ile oluşan anjiogenezis ve lenfanjiogenezisde HSK’da vasküler yapılanmanın farklı mekanizmalarını yansıtmaktadır [32]. Antianjiogenetik tedavilerin bu kısıtlılığının bir nedeninin de HSK anjiogenezisinin tarif edilen bu komponentlerinin tümüyle hedeflenememesi olabileceği düşünülmektedir. [25].

Hepatosellüler karsinomda anjiogenezin etkinliğini araştıran kısıtlı sayıda çalışma bulunmakla birlikte anjiogenez, VT ve lenfanjiogenez mekanizmalarını birlikte araştıran ve transplantasyon ile tedavi edilecek olguların seçimi ve prognozu üzerindeki etkiyi birlikte araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda TMA kesitler ve görüntü analiz yöntemlerini kullanarak, HSK’da damar ve lenfatik damar sayılarının ve vasküler taklitçilik varlığının transplantasyon ile tedavi edilecek olguların prognozunu belirlemedeki rolü araştırılmıştır.

Tümör anjiogenezisini araştıran çalışmalarda damarların sayısal olarak ifade edilmesinde MVD değerleri kullanılmakta ve bu değerin tümör vaskülarizasyonunu direkt olarak yansıttığı belirtilmektedir. MVD ile damar sayısının ifade edildiği çalışmalarda çelişkili veriler elde edilmesinin nedeninin, sayımda kullanılan farklı yöntemler ve subjektivite olabileceği düşünölmektedir [25, 49]. Meme kanserinde yapılan bir çalışmada, ışık mikroskobunda yoğun damar alanları seçilerek hesaplanan damar sayısı ile prognoz arasında anlamlı ilişki bulunmazken, görüntü analiz yöntemi ile sayılan damar sayısı bağımsız prognostik bir faktör olarak değerlendirilmiştir [36]. Çalışmamızda subjektivite sorununu en aza indirmek ve değerlendirmenin araştırıcı bağımsız olmasını sağlamak için damarların sayısal değerlendirmesinde görüntü analiz programı kullanılmıştır.

Son yıllarda özellikle immunhistokimyasal boyamaların yapıldığı çalışmalarda artan oranda TMA tekniği kullanılmaktadır. HSK'da TMA tekniği ile CD105 ve VEGF ekspresyonunu değerlendiren ilk alışma Yao ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu alışmada, TMA kesitlerinde sayılan damar sayısı ile klasik kesitlerde sayılan damar sayısı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde korrelasyon göstermektedir. Bizim alışmamızda da literatürde bildirilen bu paralellik nedeni ile TMA kesitlerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bununla birlikte Yao ve arkadaşlarının çalışmasında TMA kesitlerinde hesaplanan damar sayısı ile prognoz arasında anlamlı ilişki saptanmazken, doku kesitlerinde hesaplanan yüksek MVD'nin kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu nedenle TMA tekniğinin HSK'daki anjiogenezi değerlendirmede uygun bir yöntem olmayabileceği belirtilmiştir [52]. TMA ve imaj analiz tekniği kullanılarak meme karsinomlarında yapılan bir diğer çalışmada da doku kesitlerinde CD31 ve CD105 kullanılarak ölçölen damar sayıları ile TMA kesitlerindeki sayılar korrelasyon göstermemektedir. Buna neden olarak da TMA'ların hazırlanması sırasında tümör stromasından zengin alanlardan çok, tümör dokusunu en iyi örnekleyen alanların seçilmesi gösterilmiştir [53]. Çalışmamızda, hepatosellöler karsinomun diğer solid tümörlere göre tümör stromasının az olması ve HSK'da bu metodla yapılan çalışma sayısının kısıtlılığını da göz önüne alarak TMA tekniğinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Literatürde HSK'da farklı endotelial belirteçler kullanılarak MVD değerlendirilmeye çalışılmıştır. Yamamoto ve arkadaşlarının, rezeksiyon yapılan 84 HSK olgusunu içeren çalışmasında vWF ile işaretlenen damarların MVD değerinin, rezeksiyon sonrası hastalıksız sağ kalımı gösteren önemli bir prognostik faktör olduğu belirtilmiştir. [35] El- Assal ve

arkadaşlarının, VEGF ve F13a antikorları ile yaptıkları çalışmada ise, mikrodamarların tümör içinde heterojen olarak dağılmış olduğu, ancak yoğunluğun en fazla olduğu noktanın tümörün periferi olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada tümör boyutu MVD ile korrelasyon göstermektedir. Bizim çalışmamızda da tümör periferine yakın, tümörü temsil eden alanlar seçilmiş, ancak tümör boyutu ile damar sayısı arasında korrelasyon saptanmamıştır. El- Assal ve arkadaşlarının çalışmasında Child A skoru bulunan hastalarda MVD, Child B ya da C olan hastalara göre daha düşük değerdendir. Yüksek MVD bulunan tümörlerde intrahepatik rekürrens oranı daha yüksektir. [38] Bizim çalışmamızda tümör nüksü ile damarların gösterilmesinde CD-34 ve CD105 kullanılarak hesaplanan MVD arasında ilişki saptanmamıştır. Bu sonuç nüks eden olgu sayımızın azlığına da bağlı olabilir.

Pek çok anjiogeneze çalışmasında, anti-CD34 antikorunun prognoz açısından diğer vasküler belirteçlere göre daha fazla prediktif bilgi verdiği raporlanmıştır [34]. Tanigawa ve arkadaşlarının, 43 HSK olgusunu içeren çalışmalarında CD34 ve Faktör 8 immunhistokimyası kullanılarak tümörlerde sinuzoid benzeri damarlar gösterilmiştir. Bununla birlikte sadece CD34 antikoru kullanılarak sayılan yüksek MVD değerlerinin HSK rezeksiyonu sonrası hasta sağ kalımı için bağımsız kötü prognostik faktör olduğu belirtilmektedir [33]. Endotel belirleyici olarak CD34 antikoru kullanan iki çalışmada da yine, yüksek MVD skorunun, 5 cm'den küçük HSK'da, rezeksiyon sonrası hastaliksız sağ kalım açısından negatif prognostik etkisi olduğu belirtilmektedir [36, 37].

Bununla birlikte anti-CD34 antikoru ile klinikopatolojik parametreler arasında herhangi prognostik ilişki bulunmayan çalışmalar da mevcuttur [38]. Sun ve arkadaşlarının, rezeksiyon yapılan 78 HSK hastasını içeren çalışmasında, CD34 immunhistokimyası ile değerlendirilen MVD ile tümör boyutu, derecesi ve HBsAg durumu arasında ilişki saptanmamıştır [37]. Bizim çalışmamızda Anti-CD34 eksprese eden damarların mm² 'de saptanan damar sayısı (NO/FA) ile tümör boyutu, tümöral nodül sayısı, patolojik T evresi, tümör derecesi, vasküler invazyon varlığı ve hasta yaşı, olguların CHİLD ve MELD skorları, hastalık nüksü arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmadı. Ancak hasta sağ kalımı ile NO/FA değerleri arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulundu. Bu ilişki mm² 'de saptanan damar sayısı fazla olan hastalarda sağ kalımın daha uzun olduğu yönünde idi (p=0,006).

Literatürde Anti-CD34 antikoru kullanılarak yapılan çalışmalarda CD34 ile ölçülen MVD'nin , rezeksiyon sonrası hastaliksız sağ kalımı gösteren önemli bir prognostik faktör

olduğu raporlanmaktadır [33]. Hasta grubumuz sadece transplantasyon ile tedavi edilen olguları kapsamakta olduğundan nüks olan hasta sayısı azdır. Ayrıca literatürde yüksek MVD skorunun, 5 cm'den küçük HSK'da, rezeksiyon sonrası hastalıksız sağ kalım için kötü prognostik faktör olduğu belirtilmektedir [36, 37]. Bizim çalışmamızda tümör boyutu ile CD34 ile değerlendirilen vasküler parametreler arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Son dönemlerde, anti-CD105'in proliferen olan yeni endotelin belirteci olarak anti-CD34 Ab'undan daha üstün olduğu literatürde belirtilmektedir [25, 34]. Birkaç çalışmada CD105'in damar oluşumunda yer aldığı ve bu şekilde birçok tümör tipinde kan damarlarının anormal gelişmesinin güçlü bir belirteci olduğu ifade edilmektedir [39]. Meme kanseri, malign melanom ve kolorektal karsinomda anti-CD105 antikorunun tümör anjiogenezi gösteren iyi bir belirteç olduğu rapor edilmiştir. Klinikopatolojik parametrelerle korelasyonu da, Anti-CD105 antikorunun diagnostik ve prognostik önemini göstermektedir. Meme kanserinde tanı anında anti-CD105 pozitif damar sayısı daha az olan hastaların kemoterapi yanıtlarının daha iyi olduğuna dair veriler vardır [54]. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında ve kolorektal kanserde anti-CD105 ile ölçülen yüksek MVD değerleri negatif prognostik bir faktör olarak belirtilmiştir [55, 56].

Anti-CD105 antikor ekspresyonunun HSK'daki klinik önemi henüz yeterince araştırılmamıştır. [34] Ho ve arkadaşlarının rezeksiyon uygulanan 86 HSK hastası ile yaptığı çalışmada anti-CD105 Ab'u ile sadece mikrodamarlar boyanmış olup, anti-CD34 Ab ile karşılaştırıldığında belirgin prognostik fark bulunamamıştır. Bu çalışmadaki tüm olgular değişken derecede CD34 boyanması gösterse de CD105 ile boyanmayan olgular vardır. Hem Anti-CD105 antikor, hem de anti-CD34 antikor ile ölçülen daha düşük MVD değerlerinin daha büyük ve vasküler invazyon gösteren tümörlerle ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak bu çalışmada CD105 belirgin prognostik bir gösterge olarak değerlendirilmemiştir [57]. Yu ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise CD105 ekspresyonu sadece tümör içindeki yeni oluşan damarlarda değil, sirotik parankimdeki sinusoidal endotelde de eksprese edilmiştir. Bu nedenle sirozun eşlik ettiği HSK olgularında antianjiyogenik tedavi hedefi açısından CD105'in, uygun bir hedef olmayabileceği yorumu yapılmıştır [58].

Bizim çalışmamızda, CD105 ekspresyonunun, CD34 ekspresyonuna göre daha az yoğunlukta olduğu gözlemlendi ancak her iki antikorun ölçüm değerlerinde anlamlı bir

istatistiksel korrelasyon saptanmadı. Yao ve arkadaşlarının, rezeksiyon yapılan 105 HSK olgusuyla yaptıkları bir başka çalışmada da anjiogenez belirteci olarak CD105'in CD34'den daha değerli olduğu raporlanmıştır. Bu çalışmada CD105 ile ölçülen MVD ortalaması anlamlı olarak daha yüksek olup, 105 olgunun 11'inde CD105 negatiftir [52]. Benzer şekilde bizim olgularımızın %15'inde CD105 ile boyanma saptanmamıştır. Ancak bizim çalışmamızda CD105 ile saptanan MVD değerleri, CD34 ile saptanan değerlere göre daha düşüktür. Bununla birlikte bahsedildiği gibi, her iki antikor ile hesaplanan değerler arasında istatistiksel korrelasyon saptanmamıştır. Sirotik parankimin bulunduğu kesitlerde boyanmanın tümör içindeki damarlara sınırlı olduğu görülmüştür; ancak TMA kesitlerimizde sirotik parankim de içeren alanlar kısıtlıdır. Anti-CD105 eksprese eden damarların mm²'de saptanan damar sayısı ve damar alanı ile tümör boyutu, tümöral nodül sayısı, patolojik T evresi, tümör derecesi, vasküler invazyon ve hasta yaşı, olguların CHİLD ve MELD skorları, hastalık nüksü, sağ kalım arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

VT, pek çok özelliği hala açıklanamamış olan ve pek çok araştırmacı tarafından ilgi çekici görülen, tümör hücreleri için farklı bir kanlanma paternidir. Çalışmalarda vasküler taklitçiliğin varlığı daha agresiv tümör biyolojisi, metastaz ve mortalite artışı ile ilişkili bulunmuştur [40-42, 44]. Yapılan çok sayıda çalışmada hem tübüler tip hem de matriks paterni tipinde VT'nin kanser progresyonu ve kötü klinik gidiş ile ilişkisi gösterilmiştir [41]. VT bulunan malign melanom ve rabdomyosarkom gibi tümörlerde olgularda 5 yıllık sağ kalımın %0'a yakın olduğu belirtilmektedir [43, 42]. Ancak literatürdeki bu verilere karşıt veriler de bulunmaktadır. Kutanoz melanomlarda matriks paterni tip VT ile kliniopatolojik parametreler ve kötü klinik gidiş arasında ilişki olmadığını ifade eden çalışmalar da bulunmaktadır [59]. Ahmadi ve arkadaşlarının prostat adenokarsinomlarında yaptığı çalışmada da VT varlığı ile kliniopatolojik parametreler ve prognoz arasında ilişkili bulunmamıştır [60].

HSK'da yapılan az sayıdaki çalışmada da diğer tümörlere benzer şekilde karşıt sonuçlar bulunmaktadır. Liu ve arkadaşlarının rezeksiyon uygulanan 151 HSK olgusunda yaptığı çalışmada, matriks paterni tipi VT, 151 olgunun 31'inde (%20.5) gösterilmiştir. Bu çalışmada kontrol olarak kullanılan 8 normal karaciğer dokusunda matriks paterni tip VT tespit edilmemiştir. Matriks paterni tip VT, tümör boyutu, vasküler invazyon ve pTNM evresi ile ilişkili bulunmuştur. Matriks paterni tip VT bulunan tümörlerin daha büyük boyutlu, vasküler invazyonu bulunan, yüksek dereceli ve ileri evreli HSK olguları olduğu

belirtilmektedir. Bu çalışmada, genel sağ kalım ve hastalıksız sağ kalım, matriks paterni tipi VT bulunan olgularda belirgin olarak düşüktür [40]. Sun ve arkadaşlarının, rezeksiyon yapılan 97 HSK hastası ile yaptıkları çalışmada, olguların %19'unda tübüler tip VT varlığı raporlanmıştır. Bu çalışmada, VT, yüksek tümör derecesi ve metastaz ile ilişkili bulunmuş ve prognostik bir faktör olarak değerlendirilmiştir [41].

Guzman ve arkadaşlarının, karaciğer transplantasyonu yapılan 20 HSK olgusu ile yaptıkları çalışmada %55 olguda matriks paterni tip VT varlığı raporlanmıştır. Bu çalışmada VT ile EGFR, VEGF ve CD31 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Bu sonuçlar, çalışmada, HSK'da, VT ile endotel ile dōşeli damarlar aracılığı ile kanlanmanın farklı süreçler olduğunun bir kanıtı olarak değerlendirilmiştir. VT-pozitif ve negatif olgular arasında tümör boyutu, derecesi, evresi ve lenfovasküler invazyon olup olmaması açısından korrelasyon bulunmamıştır. Bu çalışmada kısıtlı hasta sayısına rağmen, matriks paterni tipi VT'nin, ortotopik karaciğer transplantasyonu sonrası erken rekürrens ve agresif klinik gidiş ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu bulguların daha geniş hasta serilerinde yapılacak çalışmalarda onaylanması sonucunda VT'nin tespitinin HSK prognozunu gösteren parametreler listesine eklenebileceği ifade edilmektedir [44].

Bizim çalışmamızda ise literatüre benzer oranda, 60 olgunun 16'sında tübüler tip VT ve 11'inde matriks paterni tipinde VT saptanmıştır. Ancak her iki tip VT ile tümör boyutu, tümöral nodül sayısı, patolojik T evresi, tümör derecesi, vasküler invazyon ve hasta yaşı, olguların CHİLD ve MELD skorları, hastalık nüksü, sağ kalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ayrıca CD34 ve CD105 ile ölçülen vasküler değerler ile VT varlığı arasında da ilişki bulunmamıştır.

Guzman ve arkadaşları tarafından VT oluşumu, karaciğer hastalığının nedeninden bağımsız olarak agresif HSK'a karşı hostun hayatta kalma mekanizması olarak yorumlanmaktadır. Ancak VT dual bir etki ile, tümörü bir koza gibi örerek büyümesini ve metastaz yapmasını yavaşlatırken, kemoterapinin de etkinliğini azaltmaktadır [44]. Bizim çalışmamızda genellikle transplantasyon endikasyonu bulunan düşük evre tümörlerde VT'nin prognoza negatif etkisi kanıtlanamamıştır. VT 'nin tümörün geç evrelerinde ve diferansiasyonu daha düşük tümörlerde bu etkiyi gösteriyor olması muhtemeldir ve bizim çalışmamızda ne yüksek dereceli ne de ileri evre tümörler sağlıklı bir yoruma gitmek açısından sayıca yeterli değildir. Yapılan diğer çalışmalarda VT antianjiyogenik tedaviler

açısından en büyük zorluk olarak görünmektedir. Anjiostatin, endostatin gibi bazı antianjiyogenik tedavilerin hepatosellüler karsinomdaki etkisi zayıftır. Bunun bir nedeninin de bu ilaçların VT'lere etki etmemesi olduğu belirtilmektedir. Tedavi protokollerinde hem klasik anjiogeneze hem de VT'lere karşı etkili olan ajanlara ihtiyaç olduğu da literatürde vurgulanmaktadır [41, 43].

Tümör ilişkili lenfanjiogeneze son yıllarda artan bir ilgi söz konusudur [49]. Tümör lenfatikleri intratümöral ya da peritümöral olarak bulunabilir. Kan damarlarında olduğu gibi tümör ilişkili lenfatik kanallar sağlıklı dokudaki karşılıklarından yapısal olarak farklıdır [45]. Bu yeni oluşan damarlar destek yapılar içermediklerinden intersitisyel basınç ile kolaylıkla zedelenebilir ve tümör hücrelerinin lenfatik dolaşıma geçmesine imkan sağlayabilir. [50]

Ozardili ve arkadaşlarının, renal hücreli karsinomlarda yaptıkları bir çalışmada intratümöral lenfatik damar varlığı ile lenf nodu ve uzak metastazlar arasında belirgin korrelasyon bulunmuştur [61]. Wang ve arkadaşlarının, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde yaptıkları çalışmada, yüksek lenfatik mikrodamar sayısı, cerrahi olarak tedavi edilen hastalarda kötü prognostik bir faktör olarak raporlanmıştır [62]. Prostat karsinomlarında yapılan diğer bir çalışmada yüksek sayıda peritümöral lenfatik damar sayısının lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. [63] Kolorektal karsinomlarda ise yüksek MVD, hasta sağ kalımı açısından negatif bir prognostik faktör olarak değerlendirilmektedir [64].

Hepatosellüler karsinomda lenfanjiogenezin prognoz üzerine etkisini araştıran çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Thelen ve arkadaşlarının, rezeksiyon yapılan 60 HSK olgusunda konvansiyonel kesitlere D2-40 Ab uygulayarak yaptıkları çalışmada, sağlıklı dokuda, karaciğer parankimi içinde lenfatik bulunmamakla birlikte stromada az sayıda lenfatik bulunduğu raporlanmaktadır. Sirotik karaciğerde lenfatikler sadece stromal septalarda olup parankimal nodüllerde bulunmamaktadır. Buna karşılık HSK'da lenfatikler hem tümör parankiminde hem de intratümöral septalarda bulunmaktadır. Bu çalışmada tümör ilişkili lenfanjiogenezin HSK'daki neovaskülarizasyon sürecinde rol aldığı gösterilmiştir. Yüksek lenfatik damar sayısı sağ kalım açısından bir dezavantaj olarak yorumlanmıştır. Lenfovasküler yoğunluk olarak tanımlanan lenfanjiogenezin, genel sağkalım ile ilişkili olduğu ve hastalıksız sağkalımı göstermede bağımsız prognostik bir parametre olduğu belirtilmektedir [49].

Çalışmamızda D2-40 ekspresyonu gösteren lenfatik damarlar, hem tümör parankiminde hem de kısıtlı olarak izlenen tumor stromasında saptanmıştır. Olguların 25'inde

D2-40 ile boyanma izlenmemiştir. Anti-D2-40 eksprese eden damarların mm² 'de saptanan damar sayısı ve damar alanı ile tümör boyutu, tümöral nodül sayısı, patolojik T evresi, tümör derecesi, vasküler invazyon ve hasta yaşı, olguların CHİLD ve MELD skorları, hastalık nüksü, sağ kalım arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Ayrıca VT varlığı, CD34 ve CD105 ile ölçülen vasküler değerler ile lenfatik damar sayı ve alanı arasında ilişki bulunmamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen veriler, HSK'larda damarlanma paternlerinin birbirinden farklı mekanizmalarla ve bağımsız olarak işlev gördüğünü desteklemektedir. Ancak bu mekanizmalar tek tek değerlendirildiğinde vaskülarizasyonun artışının, bu hasta popularizasyonunda tümör biyolojisini negatif etkileyen kötü prognostik bir özellik olduğu kanıtlanamamaktadır. Aksine sadece CD-34 ile gösterilen vaskülarizasyonu yüksek olarak saptanan tümörlerde daha iyi prognoz olduğu saptanmıştır. Bu veriler çalışma için seçilen olguların genellikle erken evrelerde oluşu ve karşılaştırılacak yüksek evrelerde az sayıda olgunun bulunuşundan etkilenmiş olabilir. Bu çalışmada kullanılan görüntü analiz yönteminin vasküler yapıları efektif olarak seçebildiği görüşünde olmamıza rağmen tabii ki bu yöntem ideal olmayabilir ve çalışmaların literatürde kabul görmüş stereolojik yöntemler ile de korrelasyonu önerilebilir. Bu çalışmada TMA kullanımı da özellikle lenfanjiogenez değerlendirmesinde verilerin sağlıklı elde edilmesini etkiliyor olabilir. Bu çalışmada HSK'da hem tübüler tipte hem de matriks paterni tipinde VT olduğu gösterilmiştir. Ancak daha ileri evre ve daha az diferansiye tümörlerin çalışma gurubunda yer alması bu morfolojinin tumor biyolojisinde yaptığı farkların ortaya konması açısından önemli olabilir.

5. SONUÇLAR

1. Çalışmaya yaşları 37 ve 64 arasında değişen, 7'si (%12) kadın, 53'ü (%88) erkek, HSK nedeniyle transplant olan toplam 60 hasta dahil edildi.
2. Hastaların büyük çoğunluğu HBV (n: 27; %45) ve HCV (n: 10; %16,7) pozitifdir.
3. Olguların %41,7'si pT1, %51,7'si pT2, %5'i pT3 ve %1,7'si pT4 olup olguların çoğunluğunun tümör derecesi 2'dir.
4. 60 olgunun 16'sında tübüler tip VT ve 11'inde matriks paterni tip VT saptandı. HSK'da hem tübüler tipte hem de matriks paterni tipinde VT olduğu gösterildi. Ancak daha ileri evre ve daha az diferansiye tümörlerin çalışma gurubunda yer alması bu morfolojinin tümör biyolojisinde yaptığı farkların ortaya konması açısından önemli olabilir.
5. Bizim çalışmamızda Anti-CD34 eksprese eden damarların mm²'de saptanan damar sayısı NO/FA ile sağ kalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulundu. mm²'de saptanan damar sayısı fazla olan hastalarda sağ kalımın daha uzun olduğu görüldü (p=0,006). Ancak mm²'de saptanan Anti-CD34 pozitif damar sayısı ile tümör boyutu, tümöral nodül sayısı, patolojik T evresi, tümör derecesi, vasküler invazyon ve hasta yaşı, olguların CHİLD ve MELD skorları, hastalık nüksü arasında anlamlı ilişki bulunmadı.
6. CD105 ekspresyonunun, CD34 ekspresyonuna göre daha az yoğunlukta olduğu gözlemlendi ancak her iki antikorun ölçüm değerlerinde anlamlı bir korrelasyon saptanmadı.
7. Anti-D2-40 antikoruna ile 35 olguda (%58,3) intratümöral lenfatik bulunmadığı görüldü. Yirmi beş (%41,7) olgunun, 10'unda tümör nodüllerini çevreleyen fibröz septalarda, 15'inde ise tümör parankiminde lenfatikler izlendi.
8. Çalışmamız, HSK'da damarlanma paternlerinin birbirinden farklı mekanizmalarla ve bağımsız olarak işlev gördüğünü desteklemektedir. Ancak bu mekanizmalar tek tek değerlendirildiğinde vaskülarizasyonun artışının, bu hasta popülasyonunda tümör biyolojisini negatif etkileyen kötü prognostik bir özellik olduğu kanıtlanamamaktadır. Sadece CD-34 ile gösterilen vaskülarizasyonu yüksek olarak saptanan tümörlerde daha iyi prognoz olduğu saptanmıştır. Bu veriler çalışma için seçilen olguların genellikle erken evrelerde oluşu ve karşılaştırılacak yüksek evrelerde az sayıda olgunun bulunuşundan etkilenmiş olabilir.

9. Bu çalışmada kullanılan görüntü analiz yönteminin vasküler yapıları efektif olarak seçebildiği görüşünde olmamıza rağmen tabii ki bu yöntem ideal olmayabilir ve çalışmaların literatürde kabul grms stereolojik yöntemler ile de korrelasyonu önerilebilir. Bu alışmada TMA kullanımı da özellikle lenfanjiogene兹 değerlendirmesinde verilerin sağlıklı elde edilmesini etkiliyor olabilir.

KAYNAKLAR

1. Burt AD, Portmann BC, Ferrell LD, Tumours and tumour-like lesions of the liver, In: Mac Sween's Pathology of the Liver, Elsevier, Çin 2012. p.773-798
2. Theise ND, Curado MP, Franceschi S, Hytioglou P ve ark. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, Hepatocellular carcinoma In: WHO Classification of Tumours of Digestive System, Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (Eds), IARC, Lyon, 2010. p. 205-216
3. Munoz N, Bosch X. Epidemiology of hepatocellular carcinoma, In: Neoplasms of the liver, Okuda K, Ishak KG (Eds), Springer, Tokyo 1989. p.3
4. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA ve ark. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: A population-based study. Gastroenterology, 2004; 127(5):1372-1380
5. El-Serag HB, Davila JA, Petersen NJ, McGlynn KA. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. Ann Intern Med, 2003; 139(10): 817-823
6. El-Serag HB. Current concepts: Hepatocellular carcinoma. N Engl J Med, 2011; 365(12): 1118-1127
7. Uzunalimoğlu O, Yurdaydin C, Cetinkaya H, Bozkaya H ve ark. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Turkey. Dig Dis Sci, 2011; 46(5): 1022-1028.
8. Okuda, K. Epidemiology of primary liver cancer. In: Primary Liver Cancer in Japan, Tobe, T (Ed), Springer-Verlag, Tokyo 1992. p.3
9. Macdonald GA. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. Clin Liver Dis, 2001; 5(1): 69-85
10. Caldwell SH, Crespo DM, Kang HS, Al-Osaimi AM. Obesity and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology, 2004; 127(5 Suppl 1): S97-S103
11. Wu JT. Serum alpha-fetoprotein and its lectin reactivity in liver diseases: a review. Ann Clin Lab Sci, 1990; 20(2): 98-105
12. Collier J, Sherman M. Screening for hepatocellular carcinoma. Hepatology 1998; 27: 273

13. Wanless IR, Terminology of nodular lesions of the liver. *Hepatology*, 1995; 22: 983-993
14. Satir AA. An update on the pathogenesis and pathology of hepatocellular carcinoma. *Bahrain Medical Bulletin*, 2007; 29(2): 1-8
15. Rosai J. Liver cell tumors and tumorlike conditions. In Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology*, Houston M (Ed), Elsevier, 2004. p. 992-1002
16. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG ve ark. *AJCC Cancer Staging Manual* Springer. 7 ed, Springer, New York, 2009
17. Edmonson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver. *Cancer*, 1954;7: 462-503
18. Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of Hepatocellular Carcinoma: The BCLC Staging Classification. *Semin Liver Dis*, 1999; 19(3): 329-338
19. Kamath PS, Kim WR; Advanced Liver Disease Study Group. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology*, 2007; 45(3): 797-805
20. Venook AP. Regional strategies for managing hepatocellular carcinoma. *Oncology (Williston Park)*, 2000; 14(3): 347-354
21. Yildirim Y, Ozyilkan O, Karakayali H, Haberal M. Hepatosellüler karsinomda tedavi yaklaşımları. *International Journal of Hematology and Oncology*, 2008; 4 (18): 248-253
22. Monden M, Sakon M, Gotoh M, Kanai T ve ark. Selection of therapeutic modalities for hepatocellular carcinoma in patients with multiple hepatic lesions. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1992; 31(Suppl): S38-S44
23. Steinmüller T, Jonas S, Neuhaus P. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003; 17(Suppl 2): 138-144
24. Schwartz JD, Schwartz M, Mandeli J, Sung M. Neoadjuvant and adjuvant therapy for resectable hepatocellular carcinoma: review of the randomised clinical trials. *Lancet Oncol*, 2002; 3(10): 593-603
25. Pang R, Poon RT. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer lett*, 2006; 242(2): 151-167
26. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Mechanisms of angiogenesis. In Robins and Cotran *Pathologic Basis of Disease*. Saunders Elsevier: Philadelphia. 2010, p 99-102

27. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma, *Nat Rev Cancer*, 2003; 3(6): 411-421
28. Paloma SC, Trapero-Marugan M, Chaparro M, Jones EA ve ark. Angiogenesis: from chronic liver inflammation to hepatocellular carcinoma. *J Oncol*, 2010; 2010:272170. doi: 10.1155/2010/272170
29. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 2002; 3(6): 401-410
30. Che N, Zhao XL, Sun T, Zhao XM ve ark. The role of Twist1 in hepatocellular carcinoma angiogenesis: a clinical study. *Hum Pathol*, 2011; 42(6): 840-847
31. Yang ZF, Poon RT. Vascular changes in hepatocellular carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)*, 2008; 291(6): 721-734
32. Chen JA, Shi M, Li JQ, Qian CN. Angiogenesis: multiple masks in hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *Hepatol Int*, 2010; 4(3): 537-547
33. Tanigawa N, Lu C, Mitsui T, Miura S. Quantitation of sinusoid-like vessels in hepatocellular carcinoma: Its clinical and prognostic significance. *Hepatology*, 1997; 26(5): 1216-1223
34. Sun HC, Tang ZY. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: the retrospectives and perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004; 130(6): 307-319
35. Yamamoto A, Dhar DK, El-Assal ON, Igarashi M ve ark. Thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor), microvessel density and clinical outcome in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 1998; 29(2): 290-299
36. Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC ve ark. Tumor Microvessel Density as a Predictor of Recurrence After Resection of Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Study. *J Clin Onco*, 2002; 20(7): 1775-1785
37. Sun HC, Tang ZY, Li XM, Zhou YN ve ark. Microvessel density of hepatocellular carcinoma: its relationship with prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1999; 125(7): 419-426

38. El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M ve ark. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: Possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology*, 1998; 27(6): 1554-1562
39. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*, 2003;17(9): 984-992
40. Liu WB, Xu GL, Jia WD, Li JS ve ark. Prognostic significance and mechanisms of patterned matrix vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol*, 2011; 28(Suppl 1): S228-S238
41. Sun B, Zhang S, Zhang D, Du J ve ark. Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*, 2006;16: 693-698
42. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*, 1999; 155(3): 739-752
43. Zhang S, Zhang D, Sun B. Vasculogenic mimicry: Current status and future prospects. *Cancer lett*, 2007; 254(2): 157-164
44. Guzman G, Cotler SJ, Lin AY, Maniotis AJ ve ark. A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 2007; 131(12): 1776-1781
45. Albrecht I, Christofori G. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer. *Int J Dev Biol*, 2011; 55(4-5): 483-494
46. Suriawinata AA, Thung SN, Liver, In *Histology for Pathologists*, Mills SE (Ed), Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p 686-705
47. Ohtani O, Ohtani Y. Lymph circulation in the liver. *Anat Rec (Hoboken)*, 2008; 291(6): 643-652
48. Yokomori H, Oda M, Kaneko F, Kawachi S ve ark. Lymphatic marker podoplanin/D2-40 in human advanced cirrhotic liver- Re-evaluations of microlymphatic abnormalities. *BMC Gastroenterol*, 2010; 10(131). doi: 10.1186/1471-230X-10-131.

49. Thelen A, Jonas S, Benckert C, Weichert W. Tumor-associated lymphangiogenesis correlates with prognosis after resection of human hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2009; 16(5): 1222-1230
50. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev*, 2006; 25(4): 677-694
51. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol*, 1995; 147(1): 9-19
52. Yao Y, Pan Y, Chen J, Sun X. Endoglin (CD105) Expression in Angiogenesis of Primary Hepatocellular Carcinomas: Analysis using Tissue Microarrays and Comparisons with CD34 and VEGF. *Ann Clin Lab Sci*, 2007; 37(1): 39-48
53. Charpin C, Dales JP, Garcia S, Carpentier S ve ark. Tumor neoangiogenesis by CD31 and CD105 expression evaluation in breast carcinoma tissue microarrays. *Clin Cancer Res*, 2004; 10(17): 5815–5819
54. Beresford MJ, Harris AL, Ah-See M, Daley F ve ark. The relationship of the neo-angiogenic marker, endoglin, with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Br J Cancer*, 2006; 95(12): 1683-1688
55. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y ve ark. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: Comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res*, 2001; 7(11): 3410-3415
56. Li C, Gardy R, Seon BK, Duff SE ve ark. Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *Br J Cancer*, 2003; 88(9): 1424-1431
57. Ho JW, Poon RT, Sun CK, Xue WC ve ark. Clinicopathological and prognostic implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. *World J Gastroenterol*, 2005; 11(2): 176-181
58. Yu D, Zhuang L, Sun X, Chen J ve ark. Particular distribution and expression pattern of endoglin (CD105) in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 2007; 7:122

59. Massi D, Franchi A, Paglierani M, Ketabchi S ve ark. Vasculogenic mimicry has no prognostic significance in pT3 and pT4 cutaneous melanoma. *Hum Pathol*, 2004;35(4): 496-502
60. Ahmadi SA, Moinfar M, Gohari Moghaddam K, Bahadori M. Practical application of angiogenesis and vasculogenic mimicry in prostatic adenocarcinoma. *Arch Iran Med*, 2010; 13(6): 498-503
61. Ozardili I, Guldur ME, Ciftci H, Bitiren M ve ark. Correlation between lymphangiogenesis and clinicopathological parameters in renal cell carcinoma. *Singapore Med J*, 2012; 53(5): 332-335
62. Wang J, Li K, Wang B, Bi J. Lymphatic microvessel density as a prognostic factor in non-small cell lung carcinoma: a meta-analysis of the literature. *Mol Biol Rep*, 2012; 39(5): 5331-5338
63. Zeng Y, Opeskin K, Horvath LG, Sutherland RL ve ark. Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *Prostate*, 2005; 65(3): 222-230
64. Matsumoto K, Nakayama Y, Inoue Y, Minagawa N ve ark. Lymphatic microvessel density is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*, 2007; 50(3): 308-314