

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARELERDE DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN KOLON
KANSERİ ÜZERİNE ENDOSTATİN'İN ETKİLERİ**

**Tezi Hazırlayan
Ömür KARACA**

**Tezi Yöneten
Doç. Dr. Harun ÜLGER**

**Anatomi Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Temmuz 2008
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARELERDE DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN KOLON
KANSERİ ÜZERİNE ENDOSTATİN'İN ETKİLERİ**

**Tezi Hazırlayan
Ömür KARACA**

**Tezi Yöneten
Doç. Dr. Harun ÜLGER**

**Anatomi Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBT-06-19 nolu
proje ile desteklenmiştir**

**Temmuz 2008
KAYSERİ**

Doç.Dr.Harun ÜLGER danışmanlığında **Ömür KARACA** tarafından hazırlanan “**Farelerde Deneysel Olarak Oluşturulan Kolon Kanseri üzerine Endostatin’in Etkileri**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Anatomi** Anabilim Dalı’nda **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

.../.../2008

(Tez savunma sınav tarihi yazılacak)

JÜRİ :

İmza

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU

TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalında doktora tezi olarak hazırlanan bu araştırmanın gerçekleşmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Harun ÜLGER'e, bilimsel destek sağlayan Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Özlem CANÖZ'e, çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR'a, Anatomi Anabilim Dalı asistanlarından doktora arkadaşım Arş. Gör. Sayın Tolga ERTEKİN'e, Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyelerimizden Sayın Prof. Dr. Kenan AYCAN'a, Sayın Doç. Dr. Nihat EKİNCİ'ye, Sayın Doç. Dr. Erdoğan UNUR'a ve tüm Anatomi ailesine, Patoloji, Tıbbi Genetik ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı asistanlarına, DEKAM personeline ve özellikle sağladığı imkanlardan dolayı Nevşehir Üniversitesi Sema ve Vefa Küçük Sağlık Yüksekokulu Müdürü Prof.Dr. Nimet KARATAŞ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca desteğini esirgemeyen sevgili AİLEME çok teşekkür ederim.

FARELERDE DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN KOLON KANSERİ ÜZERİNE ENDOSTATİN'İN ETKİLERİ

ÖZET

Solid tümörlerin büyümesinde ve metastazında önemli rolü olan anjiogenezis, mevcut damar yatağından yeni kan damarlarının şekillenmesi şeklinde tanımlanır. Anjiogenezis, insan vücudunda, endojen anjiogenik (bFGF, aFGF, VEGF vs.) ve antianjiogenik (endostatin, angiostatin, interferon vs.) faktörler arasındaki denge ile kontrol edilmektedir. Antianjiogenik faktörlerden biri olan endostatin, anjiogenezisi inhibe ederek tümör büyümesini ve metastaz gelişimini engelleyen doğal bir maddedir. Laboratuvar hayvanlarında deneysel olarak oluşturulan kanserlerde, 10-20 gün aralığında 0.3-20 mg/kg/gün dozlarda, intraperitoneal ya da subkutan yoldan verilen endostatinin antianjiogenik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Çalışmamızda, 20mg/kg dozunda, subkutan yoldan 12 hafta boyunca enjekte edilen DMH ile kolon kanseri indüklenen 30 adet Balb/C türü erkek farelerde, endostatinin anti tümör etkisi araştırıldı. Bu amaçla son DMH dozundan 12 hafta sonra, 7 µg endostatin, 6 hafta boyunca ve her gün subkutan yoldan enjekte edildi. Çalışma sonucunda DMH ve endostatin grubunda %100 tümör geliştiği gözlemlendi. DMH grubunda toplam 77 lezyon görülürken, endostatin grubunda ise toplam 57 lezyon tespit edildi. DMH grubundaki 77 lezyonun %36,3'ü hafif displazi, %22'si şiddetli displazi ve %41,5'si ise karsinom olarak tespit edildi. Endostatin grubunda ise 57 lezyonun %31,5'i hafif displazi, %17,5'i şiddetli displazi ve %50,8'i karsinomdu. Lezyonların kolonda dağılımına bakıldığında, DMH grubunda görülen lezyonların %74'ünün, endostatin grubunda ise %75,4'ünün distal kolonda geliştiği gözlemlendi. Çalışma sonucunda endostatin grubunda, DMH grubuna göre toplam lezyon sayısında bir azalma tespit edildi, fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Anahtar kelimeler: Anjiogenezis, kolon kanseri, 1,2 Dimetilhidrazin (DMH), Endostatin

EFFECTS OF ENDOSTATIN ON EXPERIMENTALLY INDUCED COLON CANCER IN MICE

ABSTRACT

The growth of solid tumors and their metastases is dependent on angiogenesis, the formation of new capillaries from pre-existing vessels. Angiogenesis is regulated by a shift in the balance of endogenous angiogenic (bFGF, aFGF, VEGF vs.) and antiangiogenic factors (endostatin, angiostatin, interferon vs.) in human body. Endostatin, one of the most potent negative regulators of angiogenesis, is naturally occurring inhibitor of angiogenesis capable of inhibiting tumor growth and their metastases. It is reported that Endostatin used between 10-20 days 0.3-20 mg/kg/day doses giving intraperitoneal or subcutan has caused antiangiogenic effect in the experimental cancers carried out on the lab animals. In our study, DMH injected 20mg/kg/week dose by subcutan induces colon cancer on 30 Balb-c male mice during the 12 weeks. 12 weeks after the last DMH dose, 7 µg/day endostatin was injected subcutaneously to seven animals to search its antitumor effect. As a result of our study, it was found out that tumor occurred 100% in the group of DMH-treated mice and endostatin-treated mice. While there are 77 lesions in the group of DMH, there are 57 lesions in the group of endostatin. It was found out that there is 36,3% low displasi, 22% high displasi and 41,5% carcinom of the 77 lesions in the group of DMH. On the other hand there is 31,5% low displasi, 17,5% high displasi and 50,8% carcinom in the group of endostatin. When we have a look the distribution of the lesions in colon, 74% of the lesions of DMH group and 75,4% of the lesions of endostatin group occurred in the distal colon. In the end of our study, we noticed that the number of lesions decreased in the group of endostatin, considering the number of the lesions in the group of DMH. But there was no statistically difference between the mice treated with endostatin and those treated with DMH.

Key Words: Angiogenesis, colon cancer, 1,2 Dimethylhydrazin (DMH), Endostatin

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	I
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. DAMAR GELİŞİMİ	3
2.1.1. Vaskülogenezis	3
2.1.2. Anjiogenezis	5
2.2. ANJİOGENİK FAKTÖRLER.....	7
2.3. ANTİANJİOGENİK FAKTÖRLER.....	8
2.4. TÜMORAL ANJİOGENEZİS	10
2.5. ANJİOGENEZİS VE METASTAZ.....	12
2.6. ANTİANJİOGENİK TEDAVİ.....	13
2.7. ENDOSTATİN.....	14
2.7.1. Endostatinin Terapatik Dozu Ve Uygulama Yöntemleri	15
2.8. KİMYASAL KARSİNOJENLER İLE DENEYSEL KANSER OLUŞTURMA.....	16
2.8.1. Karsinojen Maddeler.....	17

	<u>Sayfa No</u>
2.9. KOLON KANSERİ	19
2.9.1. Kolorektal Kanserlerin Etiyolojisi	19
2.9.2. Kolonun Anatomi Ve Embriyolojisi	20
2.9.3. Kolonun Histolojisi	21
2.9.4. Kolorektal Kanserlerin Patolojisi	23
2.9.5. Kolorektal Polipler	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. DENEYSEL KANSER OLUŞTURMA	29
3.2. KOLONUN ÇIKARILMASI VE HİSTOPATOLOJİK İNCELEME	31
3.3. SWISS ROLL TEKNİĞİ	31
3.4. HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRMA	33
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	34
4. BULGULAR	35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
6. KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO, ŞEKİL, RESİM VE GRAFİK LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 2.1. Bazı anjiogenik faktörler ve etki mekanizmaları	8
Tablo 2.2. Bazı antianjiogenik faktörler ve etki mekanizmaları	10
Tablo 2.3. Hayvan modelinde DMH metabolizması	17
Tablo 2.4. Kolorektal poliplerin histolojik olarak sınıflandırılması	24
Tablo 4.1. Lezyon sayısı ve kolonda dağılımı	44
Tablo 4.2. Ortalama lezyon sayısı.....	47
Tablo 4.3. Hafif displazi, şiddetli displazi ve karsinomun kolonda dağılımı.....	48
Şekil 2.1 Kan damarları gelişiminin birbirini izleyen dönemleri.	4
Şekil 2.2. Anjiogenezis oluşum sürecinin şematik şekli.	6
Şekil 2.3. İnvaziv kansere dönüşüm sırasında pozitif ve negatif yönde etkili olan elemanlar	12
Şekil 2.4. Hiperplastik polip ve adenomların şematik görünümü.....	25
Şekil 2.5. Tübüler ve villoz adenomların (saplı ve sapsız)) şematik görünümü.....	26
Şekil 2.6. Karsinomun şematik görünümü	28
Resim 2.1. Kolonun normal görünümü	21
Resim 3.1. Farenin Karın bölgesinin açılması ve kolonun çıkarılması	32
Resim 3.2. Kolonun petri kabına konulması ve longitudinal olarak kesilerek lümenin açılması.....	32
Resim 3.3. Swiss Roll Tekniği kullanarak bağırsağın bir ağaç çubuğa sarılması	33
Resim 4.1. Farelerin genel görünümü	36
Resim 4.2. DMH grubu bir farede boyun bölgesinde gözlenen şişlik.....	36
Resim 4.3. Distal kolonda gelişen polip şeklindeki tümörler	39
Resim 4.4. Kolonun normal histolojik görünümü	39
Resim 4.5. Distal kolonda görülen hafif displazi.....	40

	<u>Sayfa no</u>
Resim 4.6. Hafif displazi	40
Resim 4.7. Distal kolonda görülen şiddetli displazi	41
Resim 4.8. Şiddetli displazi.....	41
Resim 4.9. Distal kolonda görülen intramukozal karsinom	42
Resim 4.10. İnteramukozal karsinom.....	42
Resim 4.11. Distal kolonda görülen invaziv karsinom.....	43
Resim 4.12. İnvaziv karsinom.....	43
Resim 4.13. Kolonda görülen şiddetli displazi ve lenf nodülü.	46
Resim 4.14. İnvaziv kolon tümöründe görülen heterotopik ossifikasyon alanı	47
Grafik 4.1. Ağırlık analizi.....	37
Grafik 4.2. DMH grubunda görülen adenokarsinomların dağılımı	44
Grafik 4.3. Endostatin grubunda görülen adenokarsinomların dağılımı	45
Grafik 4.4. Hafif displazinin kolonda dağılımı	49
Grafik 4.5. Şiddetli displazinin kolonda dağılımı	49
Grafik 4.6. İnteramukozal karsinomun kolonda dağılımı	50
Grafik 4.7. İnvaziv karsinomun kolonda dağılımı	51

KISALTMALAR

VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
TGF- β	: Transforme edici büyüme faktörü,
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
ECM	: Ekstraselüler matriks
MMPs	: Matriks metalloproteinaz
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
TIMP-1	: Metalloproteinaz doku inhibitörü
VEGFR-2	: Vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü
BFGFR	: Basik fibroblast büyüme faktörü reseptörü
TAF	: Tümör Anjiogenezis Faktör
i.p	: İntraperitoneal
s.c	: Subkutan
DMH	: 1,2 dimetilhidrazine
AOM	: Azoksimetan
MNNG	: N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine
MNU	: N-methyl-N-nitrosourea
rHuE	: Rekombinant İnsan Endostatin
NaHCO ₃	: Sodyum bikarbonat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
HE	: Hematoksilen-Eozin
IL	: Interlökin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Damar gelişimi fizyolojik olarak yara iyileşmesi, kadınlarda menstrüal siklus ve embriyogenez gibi durumlarda görülürken, patolojik olarak ise başta tümörler olmak üzere romatoit artrit, retinopatiler ve psöriazis gibi hastalıklarda görülür. Solid tümörlerin büyümesi ve metastazında önemli rolü olan anjiogenezis, mevcut damar yatağından yeni kan damarlarının şekillenmesi şeklinde tanımlanır. Anjiogenezis vücudumuzda, endojen anjiogenik (bFGF, aFGF, VEGF vs.) ve antianjiogenik (endostatin, anjiostatin, interferon vs.) faktörler arasındaki denge ile kontrol edilmektedir. Bu denge anjiogenik faktörler lehine olduğunda, tümörlerde damarlanma oluşmakta ve böylece tümör hem büyümekte hem de metastaz yapma özelliğini kazanmaktadır. Antianjiogenik faktörlerden biri olan endostatin, anjiogenezisi inhibe ederek tümör büyümesini ve metastaz gelişimini engelleyen doğal bir madde olup 60'dan fazla tümör tipini güçlü şekilde inhibe ettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu tümör tiplerinden biri de kolorektal tümörlerdir. Etyolojisi halen tam olarak anlaşılammış olan kolorektal tümörler, sindirim sistemin en sık rastlanan tümörlerindedir. Tüm kanserlerin %15'ini, sindirim sistemi kanserlerinin ise %75'ini oluştururlar. Bu kanserler endüstrileşmiş toplumlarda daha sık görülmekte ve akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadırlar. Korunmaya ve terapiye yönelik

önlemlere rağmen yaklaşık her yıl 500 bin hasta kolorektal kanser nedeniyle ölmektedir. Yapılan çalışmalarda kanser tedavisinde kullanılan klasik tedavi yöntemlerinin (cerrahi yöntem, kemoterapi ve radyoterapi) yanında son yıllarda üzerinde yoğun olarak çalışılan tedavi yöntemlerinden birisi de antianjiogenik terapi olmuştur. Antianjiogenik terapi, kanser tedavisinde tümör hücrelerini hedef alma yerine tümörün yeni oluşmuş damar ağını hedef alır. Antianjiogenik terapiyi antiproliferatif kemoterapiden ayıran ana hatlar, antianjiogenik tedavinin direkt olarak endotel hücrelerine yönelik olması ve standart kemoterapötiklerle gözlenen yan etkilerin görülmemesi, uzun yıllar boyunca kesilmeksizin kullanılabilmesi ve ilaç direncinin gelişmemesidir.

Bu çalışmada, 1,2 dimetilhidrazin (DMH) verilerek kolon kanseri indüklenen Balb/C türü erkek farelerde bir endojen anjiogenezis inhibitörü olan endostatinin antitümoral etkisinin *in vivo* olarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

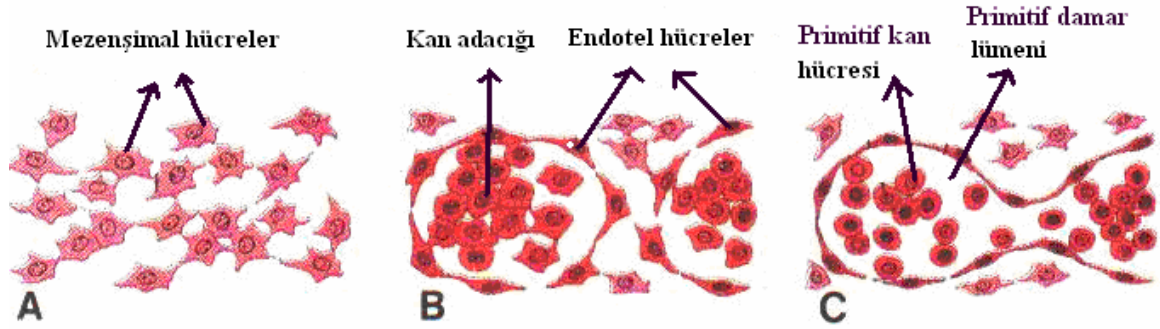
2.1 DAMAR GELİŞİMİ

Kan damarlarının gelişiminin uyarılması çeşitli kimyasal, metabolik ve mekanik faktörler aracılığıyla olmaktadır. Ayrıca kan akışı ve çevre dokuların büyümesindeki değişiklikler de damarlanmayı etkilemektedir (1). Damar gelişimi iki yolla olur. Bunlar vaskülogenezis ve anjiogenezisdir. Vaskülogenezis erken embriyonik dönemde meydana gelirken, anjiogenezis hem embriyoda hem de tüm yaşam boyunca devam eden bir süreç olarak tanımlanmıştır (2,3). Vaskülogenezisde, anjioblast adı verilen endotel hücre öncülleri damar gelişimi ile ilişkilidir. Anjiogenezis ise mevcut damar yatağından tomurcuklanma ile yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Anjiogenezis ve vaskülogenezis her ikisi de yeniden modellenme sürecidir (4).

2.1.1 Vaskülogenezis

Vaskülogenezis, embriyoda mezoderm kaynaklı anjioblastlar ile ilk kan damar ağının oluşmasıdır (5). Kan damarlarının oluşacağı bölgelerde mezenşimal hücreler anjioblast adı verilen hücrelere dönüşürler. Kalbin ve ilk primitif damar ağının gelişmesinde ve embriyonun çevresindeki membranların damarlanmasında vaskülogenezis oldukça önemlidir. Vaskülogenezis ile ilk damar oluşumu ekstraembriyonik bölgede başlar (3). Embriyoda somitler gelişirken, ekstraembriyonik bölgede ise 3. haftanın başlarında vitellus kesesi duvarındaki mezoderm hücreleri, kan hücreleri ve kan damarlarına

farklılaşır. Anjioblastlar kan adacıkları denilen anjiogenik hücre kümeleri oluştururlar. Bu adacıkların merkezindeki hücreler ilkel kan hücrelerine (hemositoblast) farklılaşırken, periferdeki anjioblastlar ise yassılaşıp kan adacıklarını döşeyen ilkel endotel hücrelerini oluştururlar (6,7) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Kan damarları gelişiminin birbirini izleyen dönemleri.

A. Farklılaşmamış mezenşimal hücreler, B. Kan adacıklarının oluşması, C. Primitif kapillerler, Mezenşimal hücrelerin primitif kan hücrelerine ve endotel hücrelerine farklılaşması (6).

Kan adacıkları, endotel hücrelerinin tomurcuklanıp birbirine doğru büyümesiyle (anjiogenezis) kaynaşp, küçük kan damarlarına dönüşürler. Vitellüs kesesine ek olarak koryon plağı, koryon villusları ve bağlantı sapındaki ekstraembriyonik mezoderm içinde de kan hücreleri ve kapillerler gelişmeye başlar (6). Aynı zamanda anjioblastların farklılaşması embriyo içinde de devam eder. Embriyo içindeki kan damarları vaskülogenezis ve anjiogenezis ile şekillenir. Farklılaşan anjioblastlar mezoderm içinde ilk kılcal ağı oluşturur ve daha sonra büyük damarlar (dorsal aorta ve aortik arklar) kaynaşarak yeni büyük damarları oluştururlar (4). Ekstraembriyonik ve intraembriyonik damar gelişimi birbirinden bağımsız olarak gerçekleşir. Daha sonra sürekli tomurcuklanarak büyüyen ekstraembriyonik ve intraembriyonik damarların birbiri ile bağlantı kurması sonucu embriyo ile plasenta damarları birleşmiş olur (6,8). Böylece embriyoda damarlanma süreci gerçekleşir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, kemik iliğinden elde edilen öncü hücrelerin bir araya gelerek yeni kan damar ağı oluşturduğu ve vaskülogenezisin yetişkinlerde de görüldüğü tespit edilmiştir (7). Böylelikle vaskülogenezisin erken embriyogenezle sınırlı olmadığı, sağlıklı ve hasta erişkinlerde, fizyolojik ve patolojik olaylarda da rolünün olabileceği belirtilmiştir.

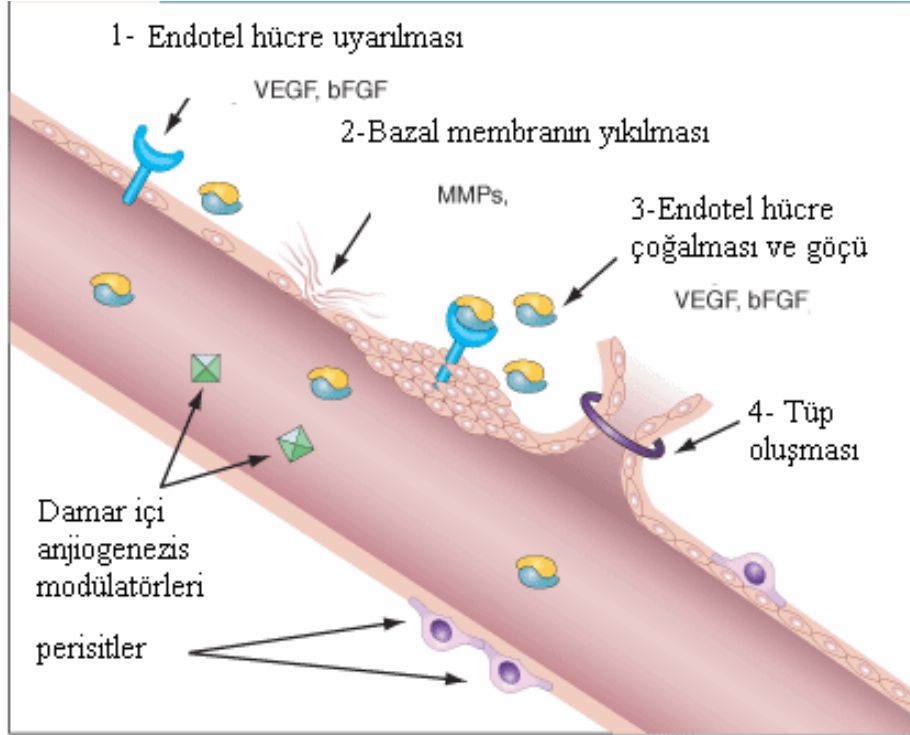
Vaskülogenezisin basamakları:

1. Anjioblastların oluşumu,
2. Anjioblastların bir araya toplanması,
3. Anjioblastların tüp oluşturacak şekilde dizilmesi,
4. Oluşan tüp gibi yapıların kapiller damar ağı şeklini alması,
5. Endotel çoğalması ve lümenin gelişmesi şeklindedir (3).

2.1.2 Anjiogenezis

Anjiogenezis iki farklı mekanizma ile gerçekleşir. Bunlar, tomurcuklanma mekanizması ve damar içi doku yapılanmasıdır. Damar içi doku yapılanması, doku kıvrımlarının damar içine invazyonu sonucu damar lümenin bölünmesi şeklinde tanımlanır. Tomurcuklanma mekanizması ise endotel hücre göçü, çoğalması ve damar lümeni gelişimi gibi basamaklardan oluşur ve mevcut büyük damarlardan tomurcuklanma şeklinde küçük kan damarlarının oluşması olarak tanımlanır (4,5). Anjiogenezis vücutta fizyolojik olarak, yara iyileşmesi, menstrüal siklus ve embriyogenezis gibi durumlarda görülürken, patolojik olarak ise başta tümörler olmak üzere romatoit artrit, retinopatiler ve psöriazis gibi hastalıklarda görülür (9,10). Bunlardan başka serebrovasküler malformasyonlarda da anjiogenik faktörlerin anormal şekilde üretildiği görülmektedir (11).

Yetişkinlerde Görülen Anjiogenezis : Anjiogenezis oluşurken birçok olay basamaklar şeklinde birbirini izler. İlk önce anjiogenezise neden olan bir etken ya da stimulus oluşmakta (örneğin hipoksi ya da iskemi) daha sonra bu etkenden dolayı anjiogenik faktörlerin salınması ve bu faktörlerin bazal membranın parçalanmasına, endotel hücrelerinin aktivasyonuna, adezyonuna, göçüne, çoğalmasına ve tüp oluşumuna neden olması ve en nihayetinde mevcut damar ağından yeni kan damarlarının oluşması şeklinde gerçekleşmektedir. Böylece bu yeni oluşan tüp yapıda, bazal membranın oluşması ve buna perisitlerin de katılmasıyla yeni bir fonksiyonel kapiller oluşumu tamamlanmaktadır (12-18) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Anjiogenezis oluşum sürecinin şematik şekli.

VEGF: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü, bFGF: Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü,
MMPs: Matris metalloproteinaz (12)

Hipoksi ve henüz tam olarak belirlenememiş bazı uyarılar, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), transforme edici büyüme faktörü, (TGF-b), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi anjiogenik faktörlerinin salınmasına neden olurlar. Ekstraselüler matris (ECM) ve matrisi çevreleyen hücrelerden, endotel hücrelerinden, tümör hücrelerinden salınan bu büyüme faktörleri, sitokinler ve bunların reseptörlerinin endotel hücrelerini uyarılmaları sonucunda anjiogenezise neden olan metabolik süreç başlamaktadır (19). Daha sonra bu süreç damar endotelini döşeyen kollajen, laminin gibi glikoproteinlerden ve heparin sülfat gibi proteoglikanlardan oluşan bazal membranın proteolitik yıkımı ile devam eder. Mevcut damarları indüklemek için ekstraselüler matrisin ve bazal membranın parçalanması gerekir. Bu amaç için endotel hücrelerden, tümör hücrelerinden ve inflamatuvar hücrelerden serin proteaz ve matris metalloproteinaz (MMPs) salgılanır (14,17,20). Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen bu proteolitik enzimler, bazal membranın ve ekstraselüler matris bileşenlerinin yıkımına neden olurlar (14,21). ECM'deki proteolitik yıkımı takiben endotel hücreleri yıkılan matris içine göçe başlar

(21). Normalde endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka oluştururlar. Ancak anjiogenezis sırasında çoğalıp yayılma gösterirler. Anjiogenezis sürecinde vasküler hücrelerin yüzeyinde bulunan $\alpha\beta3$ ve $\alpha\beta5$ gibi adezyon molekülleri, uyarılmış endotel hücreler tarafından indüklenir ve hücre - ekstraselüler matriks ve hücre - hücre arasındaki etkileşimde önemli rol oynarlar. Çoğalan endotel hücreleri, integrinler aracılığıyla diğer endotel hücreler ile sıkı bağlantı kurarlar ve böylece tüp oluşumunu gerçekleştirirler (14,22). Daha sonra çoğalma durur, hücreler morfolojilerini değiştirerek bir lümen oluşturacak şekilde birbirlerine sıkıca tutunur. Çoğunlukla perisitlerin ve vasküler düz kas hücrelerin endotele katılması ve yeni bazal membranın sentezlenmesi ile anjiogenezis tamamlanır (23). Kapiller filizlenme oluşuktan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM'de yıkılma ortaya çıkar ve bu sayede daha ileri yayılım mümkün olur. Damar olgunlaştıktan ve uygun anjiogenezis ortaya çıktıktan sonra anjiogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiogenezis inhibitörlerinde artış gözlenir. Böylece endotel hücreleri sessiz bir hale bürünür ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olur (21). Angiogenesis mekanizmasını anlayabilmek için bu sürecin indükleyicilerini (anjiogenik faktörler) ve inhibitörlerini (antianjiogenik faktörler) tanımak gerekir.

2.2 ANJIOGENİK FAKTÖRLER

Anjiogenezisin oluşmasında, ekstraselüler matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden, tümör hücrelerinden, endotel hücrelerinden ve makrofajlardan salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri temel rol oynar (24). Anjiogenik faktörlerden ilk olarak keşfedilen ve yüksek affinite ile heparine bağlanan anjiogenik faktör FGF'dir. Anjiogenezis oluşumunda önemli rolleri olan büyüme faktörlerinden önce FGF, daha sonra VEGF 1980'li yıllarda izole edilmiştir (16). Ancak anjiogenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulan VEGF'dir (25). Tablo 2.1'de bazı anjiogenik faktörler ve etki mekanizmaları verilmiştir.

Tablo 2.1. Bazı anjiogenik faktörler ve etki mekanizmaları

Anjiogenik Madde	Etki Mekanizması	Kaynak
Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)	Endotel hücre çoğalması Permeabilite indükleyici	7, 26 ,27
Fibroblast Büyüme Faktörü (Basic Fibroblast Growth Factor; bFGF / eFGF)	Endotel hücre çoğalması	25, 26
Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor; EGF)	Zayıf endotel hücre çoğalması VEGF salınımını indükleyici	8, 28
Hepatosit Büyüme Faktörü (Hepotocyte Growth Factor / Scatter Factor; HGF/SF)	Endotel hücre çoğalması Anjiogenezi indükleyici	24, 25
Transforme Edici Büyüme Faktörü-B (Transforming Growth Factor;;TGF-b)	Endotel hücre çoğalması Anjiogenezi indükleyici VEGF salınımını indükleyici	29
Tümör Nekroz Faktörü (Tumor Necrosis Factor – a;TNF-a)	Endotel hücre çoğalması Anjiogenezi indükleyici VEGF salınımını indükleyici	26,29
Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (Platelet Derived Growth Factor; PDGF)	Endotel hücre çoğalması Endotel hücre motilite faktörü Anjiogenezi indükleyici	29

2.3 ANTI-ANJİOGENİK FAKTÖRLER

Vücutta her sistemde olduğu gibi anjiogenezin de inhibitörleri mevcuttur. Anjiogenezis, anjiogenik aktivatörlerin ve inhibitörlerin arasındaki dengeye bağlı olarak aktive veya inhibe olmaktadır. Anjiogenik faktörler ile anti-anjiogenik faktörler arasındaki bu denge, tümör dokusu gibi hızla çoğalan hücrelerin bulunduğu ortamda, hücrelerin çoğalması ve yaşam sürelerinin uzaması için temel unsur teşkil eden anjiogenezis lehine bozulmaktadır. Bu süreci anjiogenezis aleyhine çevirmek için değişik teoriler öne sürülmüştür (25,30). Bunlar;

- Anjiogenik faktörlerin inhibisyonu
- Doğal antianjiogenik faktörlerin uygulanması (Endostatin, Anjiostatin vb.)
- Endotel hücrelerinin inaktivasyonu
- Yeni damarların hücre dışı matriks ile etkileşimini bozacak moleküller (matriks metalloproteinaz inhibitörleri) şeklinde özetlenebilir.

A) Anjiogenik faktörlerin inhibisyonu

Tümörler, anjiogenik faktörlerin üretilmesiyle aktive olduklarından, bu faktörlerin ekspresyonunun ya da etkilerinin inhibisyonu, tümör anjiogenezinin baskılanmasında indirek ancak etkili bir yaklaşımdır. Öncelikli hedefler içinde en çok tercih edilenler VEGF ve VEGF reseptörleridir. VEGF'in endotel hücreleri üzerinde bulunan transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması ile tetiklenen sinyal yolu birçok seviyede farklı açılardan inhibe edilerek VEGF'in etkinliği önlenmektedir. SU5416, SU6668, SU11248 gibi antianjiogenik ajanlar bu amaçla kullanılanlardan birkaçıdır (10,25).

B) Doğal anti-anjiogenik faktörler

Anjiogenezin vücutta endojen inhibitörleri vardır ve bazılarının daha etkili oldukları anlaşılmış ve yapıları izole edilmiştir. Bu güçlü inhibitör ajanlardan, trombospondin, anjiostatin, endostatin ve interferonlar gibi birçoğu tedavide kullanılmaktadır (24).

C) Endotel hücrelerinin inaktivasyonu

TNP-470, talidomide, vitaxin gibi antianjiogenik ajanlar, anjiogenezinde önemli olan endotel hücre göçü ve çoğalmasını inhibe etmekte ve apoptozisi uyarmaktadırlar (10,24,25).

D) Ekstraselüler matriksi hedef alan tedaviler

Tümör hücrelerinin invazyon ve metastazında önemli bir aşama olan hücre dışı matriksin yıkımı, endotel hücrelerinin invazyonu ve yeni oluşacak damarlar için ortam sağlanması açısından son derece önemli bir mekanizmadır (25,31). Bu aşamanın bloke edilmesi tümör hücrelerinin invazyon ve metastazını engellediği kadar, endotel hücrelerinin çevre doku ile ilişkisini bozarak göçünü önlemekte ve sonuçta anjiogenezi de inhibe etmektedir. Bu amaçla denenen ilk ajan endojen olarak üretilen ve matriks metalloproteazlar (MMP) için spesifik bir inhibitör olan Metalloproteinaz doku inhibitörü (TIMP-1)'dir (25,32). Diğer bazı antianjiogenik faktörler ise Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Bazı antianjiogenik faktörler ve etki mekanizmaları

Grup	Antianjiogenik Madde	Etki Mekanizması (Hedef reseptörler)	Kaynak
Anjiogenik Faktör İnhibitörleri	SU5416 SU6668 SU11248 PTK787/ZK22854 ZD6474	VEGFR-2 VEGFR-2, bFGFR VEGFR-2, PDGFR VEGFR-1, VEGFR-2 VEGFR-2, EGFR	27, 10, 33
Doğal Anti-anjiogenik İnhibitörleri	IL-12 Trombospondin-1 İnterferonlar Endostatin Angiostatin	VEGF, MMP-9, TIMP-1 VEGF bFGF İntegrin $\alpha 5\beta 1$, Flk-1 İntegrin $\alpha v\beta 3$, ATP sentezi	10, 14
İntegrin Aktivitesinin İnhibitörleri	Vitaxin Medi-552 Cilengitide	İntegrin $\alpha v\beta 3$ Faz I, II İntegrin $\alpha v\beta 3$ Faz I İntegrin $\alpha v\beta 3$	25, 27
MMP İnhibitörleri	TIMP-2 Marimastat BAY 12-9566 Prinomasat	MMP-2, integrin $\alpha 3\beta 1$ MMP MMP MMP-2, MMP-9	24

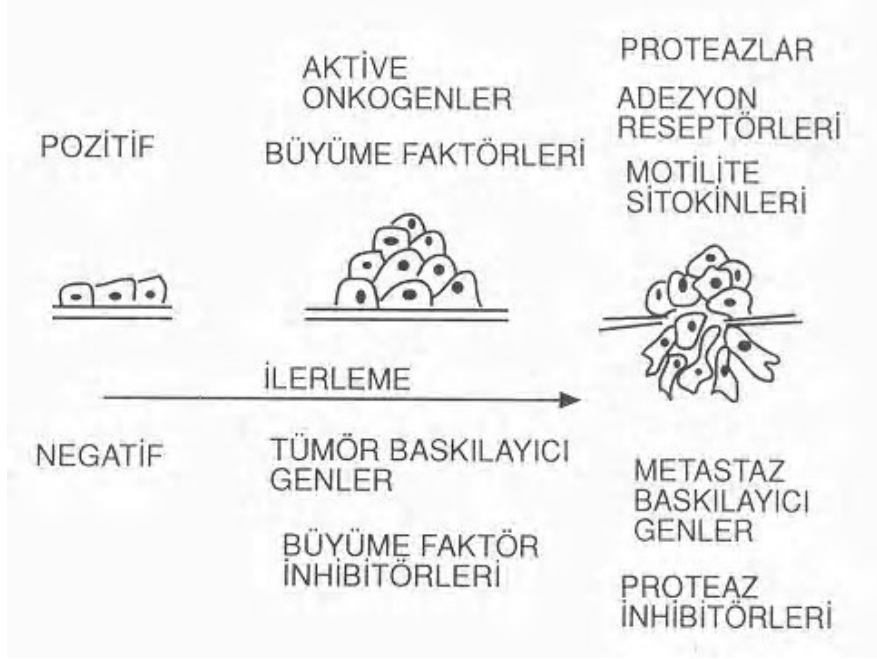
2.4. TÜMORAL (PATOLOJİK) ANJİOGENEZİS

Tümoral anjiogenezis kavramının tarihçesine bakıldığında yaklaşık 100 yıl önce tümör içerisinde yeni damar gelişimlerinden bahsedildiği görülmüştür. Ancak bu dönemde tümör hiperemisi olarak adlandırılan bu durumun tümör metabolitlerine bağlı basit bir dilatasyon olduğu düşünülmüştür. Daha sonraki dönemde tümörün mevcut damarlarla mı beslendiği yoksa yeniden damarlanmanın mı olduğu tartışılmış, yeniden damarlanmayı kabul edenler bile bunun tümör gelişimi için gerekli olmadığını, basit bir reaksiyon olduğunu ileri sürmüşlerdir. 1939 yılında yaralanma sonucunda oluşan yeniden damarlanmanın durduğu ve gerilediği, ancak tümör implantında damar gelişiminin giderek arttığı fark edilmiştir. 1945 yılında yapılan bir çalışmada ise, tümör implantındaki yeni damarların konakçı damarlardan köken aldığı belirtilmiştir (21). 1971 yılında Folkman “tümör gelişimi anjiogenezise bağımlıdır” diyerek mikroskopik tümör kitlesinin, anjiogenezisi başlatabileceğini ve böylece tümoral kitlenin sürekli olarak genişleyip ve metastaz oluşturma imkanına sahip olabileceğini ifade etmiştir (34). Ayrıca anjiogenezisin, tümör hücrelerinden “Tümör Anjiogenezis Faktör (TAF)” adı verilen bir büyüme faktörünün üretilmesine bağlı başlayabileceği belirtilmiştir. TAF yapımını ya da onun biyolojik fonksiyonunu önleyerek ya da yeni oluşan immatür kan damarlarındaki endotel hücrelerini hedef alarak tümör anjiogenezisi ve tümör

büyümesini bloke etmek mümkün olabilir. Bu tip tedavi yaklaşımları başarılı olursa, tümör hücrelerini ortadan kaldıramayacağı fakat tümoral damarlanma engelleneceğinden tümör hücrelerinin çoğalmasının engellenebileceği rapor edilmiştir (34-36).

Tümör gelişimi deneylerinde, eğer ek kan damarları faaliyete geçmezse, tümörlerin difüzyon sayesinde ancak 1-2 mm³ kadar büyüebildikleri; yaklaşık 106 hücreli evreye kadar difüzyonla besin sağlayıp hücre atıkları uzaklaştırılabildikleri tespit edilmiştir. Bu döneme avasküler evre denilmiştir (15,23,24,35). Bu evrede, kanser hücrelerinin çoğalması apoptozis tarafından dengelenir ve tümörler klinik açıdan yıllarca keşfedilmemiş olarak kalabilir. Bu basamak 'tümörün uyku hali' olarak isimlendirilir. Tümörün uyku hali periyodu uzundur ve yeni damarlanma görüldüğünde tümörler (şiddetli displazi) genellikle *in situ* aşamasındadır. Tümörlerin yeni kan damarlarının oluşumunu uyarma eğilimine girme sürecine tümöral anjiogenezis ve bu evreye de vasküler evre ismi verilir. Tümörler, anjiogenezis ile avasküler evredeki sınırlanmış boyutlarının ötesine geçebilirler. Anjiogenik anahtar olarak adlandırılan bir mekanizma ile anjiogenezisin pozitif ve negatif düzenleyicileri arasındaki denge sağlanmaktadır. İnhibitör miktarında azalma ya da aktivatör seviyelerindeki artış ile denge değişebilmekte ve anahtar mekanizma aktive olabilmektedir (10,14,29,37) (Şekil 2.3). Anjiogenik anahtar açıldığında iki yönlü parakrin stimülasyon başlar. Prolifere tümör hücreleri tarafından uyarılan anjiogenik faktörler, endotel hücrelerinin proliferasyonunu stimüle eder ve proliferen olan endotel hücreleri tarafından salgılanan büyüme faktörleri de tümör hücrelerinin proliferasyonunu stimüle eder (10,14,17,30,37). Anjiogenik anahtarın önemli uyarıcıları hipoksi ve/veya genetik mutasyonlardır. Oluşturulan damarlar, infiltre olmaya çalışan immün hücrelere giriş rotası, sistemik dolaşıma metastaz yapmaya çalışan tümör hücrelerine de çıkış rotası sağlar. Anjiogenezis esnasında endotel hücreleri sessiz hallerinden, hızla çoğalan şekle dönüşmekte ve anjiogenezis bloke edildiğinde tümör hücre proliferasyonu devam edebilmektedir. Ancak bu durum yüksek oranda tümör hücre apoptozisi ile dengelenmekte ve böylece tümör kitlesi genişleyememektedir (17,30).

Tümörlerdeki damarlanma süreci karmaşıktır ve her tümör damarlanmada kendine özel özellikler gösterir. Damarlanma; dokunun özelliğine, anjiogenik çevreye, konakçının bağışıklığına ve tümörün derecesine göre değişir (38).



Şekil 2.3. İnvaziv kansere dönüşüm sırasında pozitif ve negatif yönde etkili olan elemanlar. Kontrolsüz proliferasyon sonucu bazı büyüme faktörleri ve aktive olmuş onkogenler artarken, süpresör onkogenlerde azalma meydana gelmesi. İnvazyonu kolaylaştıran gen ürünlerinde artış olurken invazyonu kolaylaştıran proteinlerde kayıp meydana gelmesi (39).

2.5 ANJIOGENEZİS VE METASTAZ

Kanser hastalarında tedavinin yetersiz olmasının en büyük nedeni, tümör invazyonu ve metastazdır. Anjiogenezis, sadece tümörün büyümesi için önemli değil aynı zamanda kötü huylu hücrelerin metastatik yayılımını etkileyen önemli bir süreçtir. Anjiogenezis olmazsa tümör hücreleri nadiren dolaşıma girer (40-43). Metastaz primer tümörün en erken oluşum evresinden itibaren başlar ve zaman içinde tümörün büyümesine paralel olarak artar. Tümörler histolojik tiplerine göre farklı metastaz gücüne sahiptirler. Pek çok epitel kökenli tümörde tümör hücresinin yayılımı, tümörün damarlanmasından kısa bir süre sonra meydana gelmektedir (44). Fazla damarlı tümörlerin, daha az damarlı tümörlere göre metastaz yapma eğilimi daha fazladır. Klinik çalışmalarda elde edilen bu bilgiler, tümörlerdeki anjiogenik faktörler ile metastaz olasılığı arasındaki yeterli korelasyonu gösterir (15).

2.6 ANTİANJİOGENİK TEDAVİ

Tümör damarları sağlıklı dokuların damarlarından farklıdır. Yeni oluşan damarlar, düzensiz, heterojen ve daha kırılabilir bir bazal membrana sahiptir ve dolayısıyla matür damarlara oranla geçirgenlikleri daha fazladır (13). Tümör dokusundaki endotel hücreleri de düzensiz bir organizasyona sahip olup dengesiz yüzey molekülleri salgırlar. Tümör damarlarının bu özellikleri anjiogenezis inhibitörlerinin seçiciliği için bir önem kazanmaktadır (45).

Folkman'ın (1971) yayınından 30 yıl sonra çok sayıda proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler keşfedilmiş ve antianjiogenik tedavi, cerrahi, kemoterapi ve radyoterapiyi sonra dördüncü tedavi modeli olmuştur (46). Tümör büyümesi ve metastazı anjiogenezise bağlı olduğundan, tedavi bu süreci durdurmak üzerine odaklanmıştır. Anjiogenezis mekanizmasının her bir basamağı ayrı ayrı antianjiogenik yaklaşımı içinde barındırır. Antianjiogenik tedavi; tümör hücreleri veya konak hücre tarafından salınan proanjiogenik peptidlerin üretimini veya etkisini inhibe ederek veya tümör içinde anjiogenezis inhibitörlerinin salınımını artırarak direkt endotel hücrelerine odaklanmaktadır. Tümör damarlanmasını özellikle de mikrovasküler damar endotelini hedef alan çalışmalarda, solid tümör hücresi yerine, genetik stabilitelelerinden dolayı direnç geliştirme gücü olmayan endotel hücreleri hedef alınmaktadır (23,46). Yaygın olarak antianjiogenik tedavi, antiproliferatif tedavi olarak kabul edilmesine rağmen antianjiogenik tedavinin apoptozise ve tümör inhibisyonuna yol açabileceği de bildirilmektedir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda anjiogenezis inhibitörleri ile tedavi, antitümör etkisi göstermektedir (18,30). Antianjiogenik yaklaşımların klasik kemoterapötik yaklaşımlara göre çeşitli avantajları vardır. Bunlar;

1. Tümörler, hücre tipi ve malignan özelliklerine bağlı olarak heterojendirler. Bu özellikleri sayesinde kemoterapötik ajanlara direnç gösterirler. Endotel hücreleri ise genetik olarak stabildir ve neoplastik olmadıklarından daha az dirençlidirler.
2. Dolaşımdaki ilaç endotel hücrelerine kolaylıkla ulaşabilirken, klasik sitotoksik ilaçlar, tümör hücrelerine ulaşmak için yüksek stromal interstisyel basıncı aşmak zorundadır.
3. Solid tümörler (özellikle intraserebral tümörler) damarlanma fazından önce klinik belirtiler oluşturmayabilir. Dolayısıyla anjiogenezisin durdurulması klinik belirtileri engellemeye yetecektir.

4. Tümör damarları diğer damarlardan anjiogenik moleküllerin ekspresyonu ile ayırt edilebilir ve bu moleküller tümör damarlarını hedeflemede yüksek seçicilik ortaya konmasını sağlayabilir.
5. Klasik kemoterapötik ajanların başarısı bütün tümör hücrelerinin öldürülmesine bağlıdır. Antianjiogenik ajanlar için bu gerekli değildir; örneğin sadece bazal membran hedef alınarak sekonder endotel hasarı oluşturulabilir veya endotel hücreleri için gerekli büyüme faktörleri inhibe edilerek tümörü besleyen damarlar engellenebilir (14,23,30,35).

Anjiogenezis çalışmalarında önemli bir basamak da anjiostatin ve endostatin gibi endojen anjiogenezis inhibitörlerinin keşfedilmesidir. Bu inhibitörler, endotel hücre çoğalmasını ve göçünü engellerken apoptozisi indükleyici etki gösterir (46).

2.7. ENDOSTATİN

Tümör büyümesinde anjiogenezin öneminin anlaşılması, yeni kan damarlarının oluşmasını inhibe eden faktörlerin araştırılmasına neden olmuştur. Böylelikle antianjiogenik faktörlerin sayısında bir artış meydana gelmiş ve hatta bir kısmı klinik çalışmalarda denenmiştir. Bu faktörlerden bazıları, endojen anjiogenezis inhibitörü olarak adlandırılan ve insan vücudunda bulunan proteinlerden oluşan doğal proteolitik fragmanlardır. Bunlardan biri olan endostatin, 20 kilo dalton moleküler ağırlığa sahip 184 amino asitlik bir peptiddir (23,47). Endostatin ilk olarak aminoasit zinciri analizini yapmak amacıyla tümör taşıyan farelerin idrarından elde edilmiştir (48,49). Daha sonraları ise metastatik özelliği olmayan kemirgen hemanjiotelioma hücrelerinden (EOMA) izole edilmiştir. Böylece ilk olarak *in vitro* kültür ortamında, EOMA hücrelerinden izole edilen bir endojen inhibitördür (15). Damar duvarında, trombositlerde ve dolaşımda olmak üzere insan vücudunda üç farklı yerde ve özellikle de perivasküler bazal membranda bulunan endostatinin, dolaşımdaki plazma seviyesi, ortalama olarak 10-50ng/ml civarındadır (47,50-52).

Endostatinin etki mekanizması tam olarak bilinmediği için, yapılan çalışmalarda değişik mekanizmalar tanımlanmıştır. Bu çalışmalarda, endostatinin, $\alpha 5$ ve αv integrinler, çinko, fibulin, laminin-1 ve tropomiyosin ve VEGF gibi proteinlerle ilişkisinin olduğu gösterilerek apoptoz, hücre göçü ve anjiogenezisdeki etki mekanizması tanımlanmaya çalışılmıştır (11,46,53-57). Yapılan çalışmalarda endostatinin antianjiogenik aktivitesine ek olarak, direk bazı tümör hücrelerini inhibe ettiği de belirtilmiştir (58).

2.7.1 Endostatinin Teropötik Dozu ve Uygulama Yöntemleri

Yapılan çalışmalarda endostatinin etkinliğini araştırmak için *in vitro* ve *in vivo* yöntemler kullanılmıştır. Rekombinant kemirgen ve insan endostatinin, *in vivo* tümör modellerinde tümör büyümesini ihibe ettiği kadar, *in vitro* olarak da endotel hücre çoğalmasını ve hücre göçünü inhibe ettiği ifade edilmiştir. *In vivo* çalışmalarda, laboratuvar hayvanlarında (fare ve sıçan) deneysel olarak oluşturulan kanserlerde, 10 ile 20 gün aralığında 0.3-20 mg/kg/gün dozlarda, i.p ya da s.c yoldan verilen endostatinin antianjiogenik etki gösterdiği rapor edilmiştir (59-62). Ayrıca endostatinin diğer antianjiogenik ajanlarla kombine olarak verilmesinin üzerinde durulduğu gibi (61,63) tek başına 60'dan fazla tümör tipini güçlü şekilde inhibe ettiğini gösterir çalışmalar da bulunmaktadır (49,64). Faz çalışmalarda ise, 15 mg/m² den 600 mg/m² ye varan dozlar güvenli bir şekilde kullanılmış, 250-300 mg/m² ideal doz olarak belirlenmiştir. Ancak faz çalışmalarda, endostatinin bu dozları yeterli antitümöral etki göstermemiştir (52,65). *In vivo* yöntemlerden en çok kullanılan, bazı insan ve hayvan tümörlerinin s.c olarak farelere enjekte edilmesi ve deri altında büyüyen tümörde endostatinin antitümör etkisinin araştırılmasıdır. Bir başka yöntem ise kimyasal karsinojenle indüklenen tümörlerde endostatinin antitümör etkisine bakılmasıdır. Aslında herhangi bir kanser tipini aynen ortaya koyan tümör modelini oluşturmak zordur. Bu amaçla yapılan çalışmalarda değişik tümör modelleri kullanılmıştır (66). Bunlar;

- Kimyasal ve fiziksel karsinojenler ile tümör oluşturma
- Spontan ve transplante edilebilen tümör modelleri
- Tümör xenograft
- Transgenik, nakavt modeller
- İntraperitoneal yolla mikroenkapsüler tümör modelleri.

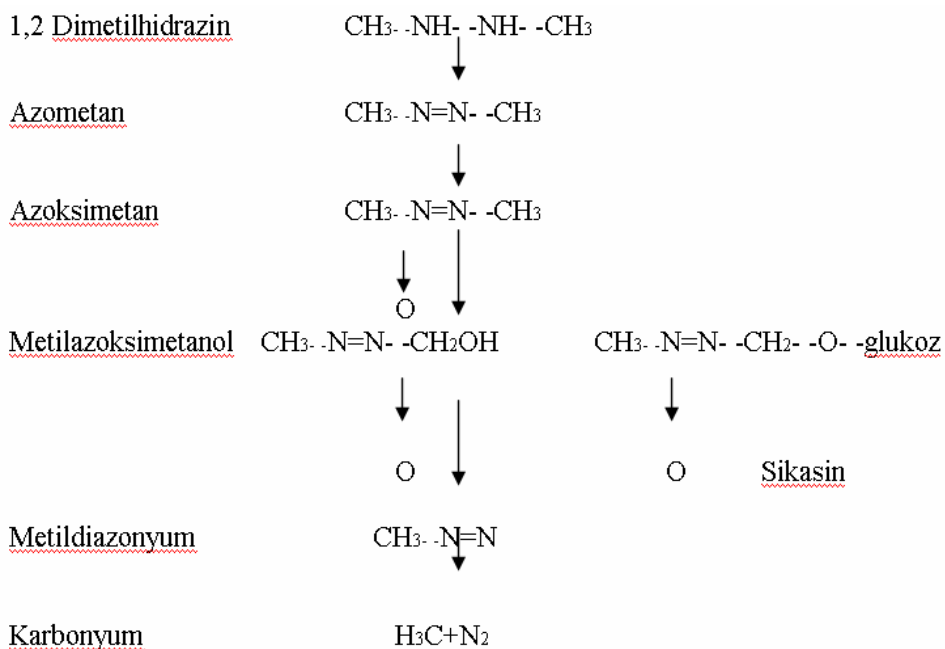
2.8 KİMYASAL KARSİNOJENLER İLE DENEYSEL KANSER OLUŞTURMA

Oluşturulmak istenen tümörün biyolojik özelliklerini ve ilaçların sitotoksik etkilerini istenildiği şekilde gösterecek deney hayvanını seçmek, tümör oluşturma şansını artırmak için en uygun tür, soy, yaş ve cinsiyeti saptayarak işe başlamak bu çalışmalarda önemlidir. Deneysel kanser araştırmalarında, özellikle kimyasal karsinojenler ile spontan tümör oluşturulması veya transplante edilebilen tümörlerin kullanılması ön plana çıkmaktadır (66,67). Deney hayvanlarında bağırsak tümör oluşturulması konusunda ilk deneysel çalışma Lorenz ve Stewart tarafından 1941 yılında yapılmıştır. Bu çalışmada, oral olarak dibenzantresan veya metilkolantren verilen farelerin ince bağırsaklarında multipl tümörlerin geliştiği fakat kolonda tümör gelişmediği belirtilmiştir (68). 1952 yılında Walpole ve ark. sıçanlarda deri altı dimetilaminobifenil enjeksiyonu ile ince bağırsak ve kolonda adenokarsinom oluşturmuşlardır (69). Daha sonraları ise kemirgenlerde, kalın bağırsakta kanser indüklenme modeli Laqueur tarafından 1962 yılında geliştirilmiştir. Bu çalışmada bir bitkisel ürün olan cycasin (methylazoxymethanol glycoside) kemirgenler için potansiyel bir karsinojen olarak tespit edilmiştir (70). Bundan kısa bir süre sonra da ratlarda daha fazla etkili olan 1,2 dimetilhidrazine (DMH), azoksimetan (AOM) gibi kanserojenik maddeler bulunmuştur. Bu iki bileşiğe ilaveten daha sonraki araştırmalarda da genellikle direkt etkili olan N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) ve N-methyl-N-nitrosourea (MNU) gibi iki karsinojen daha kullanılmıştır. Bu kimyasalların tüm kemirgenlerde aktivasyon dereceleri farklıdır ve özellikle ratlarda daha iyi sonuç verirler. Çeşitli rat ırklarında da hassaslık derecelerinde farklılıklar görülür. Sprague-Dawley cinsi ratlar bu karsinojenlere karşı daha çok hassastır. DMH'in DNA'ya bağlanmasında 10 değişik varyasyon, proteinlere bağlanmasında ise 3 çeşit varyasyon gözlenir. Bu durumda kanser indüklemeye denekler arasında ki genetik farklılıklar önemli hale gelmektedir (71). Kolon kanseri indüklemeye sıklıkla kullanılan karsinojenler DMH ve onun metabolitleri olan AOM, MNNG ve MNU'dur (72).

2.8.1 Karsinojen Maddeler

1) 1,2 Dimetilhidrazin (DMH): DMH çevreyi kirleten çok toksik bir kimyasal olup, kolon kanserini indüklemeye yaygın olarak kullanılan ve özellikle de distal kolonda tümör oluşumunu indükleyen bir maddedir (66,73). Bir metil hidrazin türevi olan DMH, organizmada metil radikali salıveren bileşiklere dönüşmek sureti ile etkinlik kazanan bir ajandır. DNA (Deoksiribonükleik asit) moleküllerini metilleyerek mutajenik etki yapan DMH aynı zamanda RNA (Ribonükleik asit) ve dolayısıyla protein sentezini de bozar. DMH ve azoksimetan ile yapılan farmakolojik çalışmalar, bu ajanların gerçek bir karsinojen özelliği kazanabilmeleri için önce metabolik olarak aktive olmaları gerektiğini göstermiştir. Bu madde ile karsinogenezin başlamasındaki esas yol; DMH'nin karaciğerde azoksimetan ve azoksimetanole dönüşmesidir. Azoksimetanol daha sonra glukuronik asitle konjuge olur ve bilier ekskresyona uğrar. Kolon lümeninde glukuronoidler bakteriyal hidrolize uğrarlar ve aktif karsinojen metabolitlere dönüşürler (67). DMH sırasıyla azometan, azoksimetan, metilazoksimetanol, ethane, ve karbonyuma dönüşür. DMH metabolizması boyunca serbest radikaller üretilir. Bu metabolik yıkımın son ürünlerinden olan metildiazonyum iyonu DNA, RNA ve proteinleri metilleme özelliğine sahiptir. Böylelikle karsinogenezis başlatılmış olur (74). (Tablo 2.3)

Tablo 2.3. Hayvan modelinde DMH metabolizması



DMH, karaciğerde protein sentezini, DNA ve RNA sentezini ilk dozdan 6-12 saat sonra gibi kısa bir sürede inhibe eder ve kolondaki hücrelerin ölmesine neden olur. Bu hücrelere verilen zarar ilk 72 saatten sonra onarılmaya çalışılır (75,76). DNA zararının tamir edilmemesi sonucu kolon kanseri oluşur. Hücrelerin kansere dönüşmesi 2 aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada, spesifik genlerin DNA'larına kimyasal karsinojen ile geri dönüşümsüz zarar verilir. Bu süreçten sonra hücreler karsinojenik hücrelere dönüşürler ve daha fazla büyüyemezler. Bundan sonra tümörlerin büyümek için uyarılması gerekmektedir. Bunun için ikinci aşamada, büyüme faktörlerinin salınımı başlar ve tümör latent evreden çıkararak büyümeye başlar (77).

DMH tarafından indüklenen kolon tümörleri, epitelyal orjinli olup ve insan kolon neoplazmalarına benzer histoloji, morfoloji ve anatomik durum sergiler. DMH'ın kullanılmasının diğer büyük bir avantajı ise bu karsinojenin hızlı bir şekilde metabolize olması ve vücuttan temizlenmesidir (78-80). Kolon kanseri gelişme insidansı kullanılan karsinojene, dozuna, uygulama sıklığına, uygulama zamanına ve yoluna bağlıdır. Ayrıca deney hayvanlarının yaşı, cinsiyeti, genetik durumu tümör gelişme insidansını etkilemektedir. DMH'ın oral yoldan ratlara verilmesi sonucu düşük tümör insidansı görülürken (%30), subkutan uygulanmasında %100 tümör, intrarektal uygulanması sonucunda 34 hafta sonra kolonda hiperplazi ve preneoplastik lezyonlar görülür. Kas içi enjeksiyonlarda ise 12 hafta sonra %80 civarında kolon tümörü görüldüğü tespit edilmiştir (72).

2) Azoksimetan: 1,2 dimetilhidrazinden türeyen alkilleyici bir ajandır. 1,2 dimetilhidrazin oksidasyona uğrayarak azometana dönüşür. Sonra bu madde azoksimetana döner. Azoksimetan haftalık subkutan veya intraperitoneal enjeksiyonlar şeklinde kullanılır.

3) Metilazoksimetanol: Metilazoksimetanol, azoksimetanın N-hidroksilasyonu ile oluşan karsinojen bir maddedir. Metilazoksimetanolün yıkımı sonucu ortaya çıkan metildiazonyum DNA, RNA veya proteinleri metilleme özelliğine sahiptir

4) Diğer kanserojen maddeler: N-Metil, N-Nitrozoganidin, metilnitrozoüre ve α -diflorometilornitin deneysel hayvan modellerinde kolonik adenom ve adenokarsinom oluşturmak amacı ile kullanılan diğer karsinojen ajanlardır (67,72).

2.9 KOLON KANSERİ

Kolorektal karsinom gelişmiş ülkelerde ciddi morbidite ve mortaliteye yol açan önemli bir hastalıktır. Kolon kanserinin görülme oranı gittikçe artmaktadır. Görülme sıklığı; erkeklerde bronş ve prostat kanserinden sonra üçüncü sırayı, bayanlarda meme kanserinden sonra ikinci sırayı almaktadır (81). Amerika Birleşik Devletleri'nde en sık görülen üçüncü kanserdir ve kansere bağlı ölümlerde ikinci sırayı almaktadır (82). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre her yıl 945 bin kişi kolorektal kansere yakalanmakta ve yaklaşık 500 bin kişi kolorektal kanser nedeniyle ölmektedir (83).

Ülkemizde kesin veriler olmamasına karşın yapılan çalışmalarda, kolorektal karsinomların kötü huylu tümörler arasında kadınlarda 3. sırayı, erkeklerde ise 8. sırayı aldığı belirlenmiştir. Ölüm nedenleri arasında da aynı sırayı korumaktadır (44,67). Bir insanın yaşam boyunca kolorektal kansere yakalanma olasılığı %5'dir. Kolorektal kanser sıklığı yaş ile artmaktadır (81). 40 yaşında hafif, 50 yaşında daha belirgin bir artma olur ve hastaların %94'ü, 40 yaşların üzerindedir. 65 yaş üzerinde görülme sıklığı, daha genç hastalarda görülme sıklığından yaklaşık 5 kat fazladır (44,84). Böylece hem erkek hem de kadında oldukça sık görülen bir kanser türü olması nedeni ile önemli onkolojik sorunlardan biridir.

2.9.1 Kolorektal Kanserlerin Etiyolojisi

Kolorektal kanserlerin etyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Ancak yüksek proteinli, yağdan zengin az lifli diyetle beslenmek, ileri derecede yaşlanmak, birinci derece akrabasında kolon kanseri bulunması, inflamatuvar bağırsak hastalığı olması, ailesel poliposis sendromu bulunması kişilerde kolon kanseri riskini artırır. Kolorektal kanserin çok ve az görüldüğü toplumlarda kolonda bakteriyal incelemeler yapılmış kimyasal yönden bulunan farklılığın etyolojide önemli olabileceği ileri sürülmüştür. Bağırsak bakterilerinin, inaktif karsinojenik prekürsörleri metobolize ederek aktif karsinojenik maddelere dönüştürdüğü bildirilmiştir. Kısacası etyolojide genetik faktörler ve diyet önemli rol oynamaktadır (44,67,85).

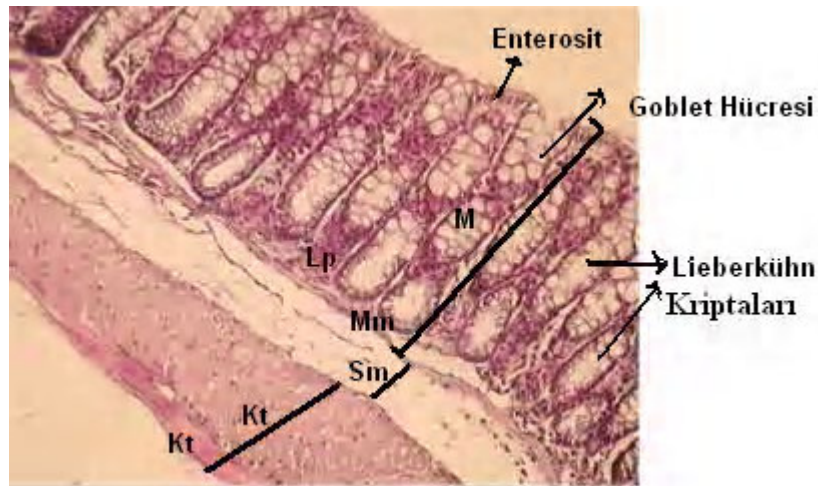
2.9.2 Kolonun Anatomi ve Embriyolojisi

Sindirim kanalı epiteli ve organların parankiması endodermden, bağ dokusu, kasları ve organların kapsülleri splanknik mezodermden köken alır. Sindirim kanalı, gelişiminin başlangıcında kör bir tüp şeklindedir ve foregut (ön bağırsak), midgut (orta bağırsak) ve hindgut (son bağırsak) olmak üzere üç bölümden meydana gelir (6). İnsanlarda ve farelerde kalın bağırsağın embriyolojisi ve anatomisi bazı farklılıklar gösterir. İnsanlarda ortalama hamilelik süresi 280 gün iken farelerde bu süre ortalama 21 gündür. Dolayısıyla bağırsak tüpü, insanlarda, yaklaşık 14 somitlik evrede (4.haftada) embriyonun sefalik kısmında ön bağırsak, kaudal kısmında ise son bağırsak olmak üzere kör bir tüp şeklinde, endodermden gelişirken, farelerde ise 2 somitli embriyoda (10 günlük) gelişmeye başlar. Farelerde ön bağırsağın gelişimi, embriyo 7 günlük olduğunda, embriyonun ön tarafında, kolumnar endodermden derin bir çentik ile başlar ve 11. günde ön bağırsak ve son bağırsak belirginleşir. Ön bağırsaktan özefagus, trakea, akciğerler, karaciğer, safra kesesi, pankreas, mide ve safra kanalının duodenuma açıldığı kısmın proksimal bölümü oluşur. Her iki cinsten orta bağırsak, orta kısımda ve yolk sapı yoluyla yolk kesesi (vitellus kesesi) ile ilişkilidir. Daha sonra bu bağlantı vitellus kesesinin körelmesi ile ortadan kalkar ve dudenumun geri kalan distal kısmı, jejunum, ileum, appendiks vermiformis, çekum, kolon ascendens, kolon transversumun 2/3'lük proksimal kısmı orta bağırsak tarafından oluşturulur. Gelişiminin erken dönemlerinde orta bağırsağın uzaması dorsal mezenterin oluşmasına ve bu oluşumun karın arka duvarına asılmasına neden olur. Bağırsaklar, embriyonun gelişimi süresince uzamaya devam eder ve son pozisyonunu alır. Gelişimin daha sonraki evrelerinde ise son bağırsağın terminal parçası kloakaya açılır ve insanlarda embriyo 7 haftalık olduğunda, farelerde ise embriyo 15 günlük olduğunda ürorektal septum kloakayı önde primitif ürogenital sinüs ve arkada da anorektal kanal adı verilen iki parçaya ayırır. Böylelikle son bağırsaktan mesane, kolon transversumun 1/3'lük distal bölümü, kolon descendens, kolon sigmoideum, rektum ve anal kanalın üst kısmı gelişerek sindirim kanalının gelişimi tamamlanır (6,86-88). Embriyolojik gelişimin tamamlanmasıyla oluşan kalın bağırsaklar, ileumun sonundan anüse kadar uzanır. İnsanlarda kalın bağırsak, ince bağırsağa bir çerçeve oluşturacak şekilde karın boşluğunun sağ yan, üst, sol yan ve pelvis boşluğunda bulunur ve sırasıyla çekum, kolon, rektum ve anal kanal olmak üzere dört bölüme ayrılır. Kalın bağırsağın çekumdan sonraki kısmına kolon denir ve kolon, kolon ascendens (proksimal kolon), kolon transversum (orta kolon), kolon descendens

ve kolon sigmoideum (distal kolon) olmak üzere 4 bölümden meydana gelir (89). Farelerde ise kalın bağırsağın anatomisi biraz farklılık gösterir. Kalın bağırsak çekum, kolon ve rektum olmak üzere üç bölüme ayrılır. Çekum abdominal boşluğun alt kısmında kör bir kese şeklindedir. Lenfatik dokular genelde çekumun alt duvarında toplanır. Farelerde appendiks vermiformis yoktur. Kolon, insanlardaki gibi ince bağırsak etrafında çerçeve oluşturmaz. Kolonun, çekumdan pylor seviyesine kadar olan kısmına kolon ascendens (proksimal kolon), daha sonra gelen kısa bir bölümüne kolon transversum (orta kolon) ve son kısmına ise kolon descendens (distal kolon) denir. Rektum ise retroperitoneal olarak genişir ve kolondan anüse doğru kalın ve kısa bir geçit oluşturur (86,87).

2.9.3 Kolonun Histolojisi

Hem insanlarda hem de farelerde kolon histolojik olarak tunika mukoza, tunika submukoza, tunika muskularis ve en dışta tunika serozadan meydana gelmiştir. Tunika mukoza, lamina epitelyalis, lamina propria ve lamina muskularis mukoza olmak üzere üç tabakadan oluşur (90,91). (Resim 2.1)



Resim 2.1: Kolonun normal görünümü.

M: Mukoza, **Lm:** Lamina Propria **Mm:** Muskularis mukoza, **Sm:** Submukoza, **Kt:** Kas tabakası (içteki sirküler kas tabakası, dıştaki longitudinal kas tabakası).

Tunika Mukoza: Kolon mukozasında çok sayıda düz tübüler bezler (**Lieberkühn kriptaları**) bulunmaktadır. Bu bezler, emici enterositlerden ve goblet hücrelerinden oluşan tek katlı prizmatik yüzey epiteli ile döşelidir. Enterositlerin kısa apikal mikrovillusleri vardır ve bu hücreler su ve iyonların taşınmasına katkıda bulunurlar. Goblet hücreleri en baskın hücre tipidir ve çekumdan sigmoid kolona doğru sayısında artış gözlenir ve bir glikoprotein olan musini salgılamakla görevlidir. Enterosit ve goblet hücrelerinden başka tübüler bezlerin yapısında aralara serpiştirilmiş olarak enteroendokrin hücreler ve Lieberkühn kriptalarının taban kısmında ise kök hücreleri bulunmaktadır (91). Tüm mide-bağırsak kanalının epitel hücreleri sürekli olarak dökülmekte ve kök hücrelerinin mitozuyla oluşan hücreler tarafından yenilenmektedir. Kolon kriptalarında bu kök hücreler, alt 1/3'lük kısma yerleşmişlerdir. Hücreler bu yenileyici bölgelerden olgunlaşma alanına doğru hareket ederler. Bu alanda yapısal ve enzimatik olgunlaşma sonucunda işlevsel hücre topluluğu oluştururlar.

Lamina propria; fibroblastlar, damarlar, sinirler, düz kas ve inflamatuvar hücrelerin gevşek bir kolleksiyonunu içerir. Bol miktarda lenfoid hücreler ve nodüller bulunur. Lenfatikler, lamina propria'nın alt 1/3'lük bölümünde sınırlıdır ve submukoza tabakasına infiltre olabilirler. Lenfoid dokunun oldukça fazla olması, kalın bağırsakta aşırı derecede bir bakteri popülasyonu bulunmasına bağlıdır (92). Lamina propria'da, inflamatuvar hücreler, lenfositler, plazma hücreleri, mast hücreleri, eozinofil ve histiyositler de bulunur (93).

Lamina muskularis mukoza; longitudinal ve sirküler kas liflerinden oluşur. Mukozaya doğru fasiküller şeklinde kas lifleri uzanabilir (94).

Tunika Submukoza: Kan damarları, sinir ve lenf damarları içeren bağ dokusundan oluşur. Lamina propria'nın hücresel içeriği submukozal stromada da yer alır. Bu tabakada Meissner submukozal plexus ve derin submukozal plexus olmak üzere iki nöral plexus bulunur (89,91,93).

Tunika Muskularis: İçte sirküler, dışta longitudinal düzenlenmiş kas hücrelerinden oluşur. Kas tabakasında dışta longitudinal seyreden lifler birleşerek taenia coli'yi oluşturur. Taenia coli kurdaleye benzeyen her biri 1cm eninde, üç adet, uzunlamasına yönlendirilmiş banttandır. Taenia coli ve iç kısımda kalan silindirik kas liflerinin kasılması, kolonda haustra coli olarak adlandırılan cepçiklerin oluşmasına neden olur. Auerbach plexusu iki kas tabakası arasında yer alır (91,93).

Tunika Seroza: Kalın bağırsağı örten peritondur. Çekum, appendiks vermiformis, transvers kolon ve sigmoid kolonu tam olarak sarar (intraperitoneal). Ascendens kolon, descendens kolon ve rektumun bir bölümü ile anal kanal peritonun arkasında kalır (retroperitoneal). Bu tabakada appendiks epiploika olarak adlandırılan ve seyrek olarak bulunan yağ dokusu çıkıntıları vardır. Bu yapılar haustra koli ile birlikte kolonun kendine has bir özelliğini oluşturmaktadır (91,93,94).

2.9.4 KOLOREKTAL KANSERLERİN PATOLOJİSİ

Kolonun malign (kötü huylu) tümörleri mikroskopik olarak adenokarsinom, melanom ve sarkom olarak ayrılır. Fakat kolonun kötü huylu tümörleri denilince akla kolon kanserleri ve adenokarsinomlar (%98) gelmektedir (44,85). Diğer kanserlere daha az rastlanılır. Kolon kanseri gelişimi kolon mukozasında aşırı proliferasyon ve displazi gelişme evresi **preneoplastik evre**; sırayla tübüler, tübülovilloz adenom ve villoz adenom gelişme evresi **prekanseröz evre**; önce *in situ*, sonra invaziv karsinom, daha sonra da metastaz gelişimi ise **karsinom evresi** olarak üç klinik evrede değerlendirilir (95).

2.9.5 Kolorektal Polipler

Kolorektal polipler dokunun lümenine doğru çıkıntı gösteren kitleleridir. Sapsız (Sesil) veya saplı; doğumsal veya edinsel; iyi huylu veya kötü huylu; mukozal, submukozal veya musküler lezyonlar olabilirler. Sıklıkları yaşla birlikte artar. Kalınbağırsaktaki bütün epitelyal poliplerin yaklaşık %90'ını non-neoplastik polipler oluşturur. Polipozis deyimi ise birden fazla polipin kolonda bulunması durumunu ifade eder. Histolojik tanı olmadığı sürece "polip" deyimi makroskopik bir ifadedir ve klinik değeri sınırlıdır. Histolojik sınıflandırmayı **neoplastik** ve **non-neoplastik** ayrımı temelinde yapmak daha aydınlatıcı olmaktadır (85,95). (Tablo 2.4)

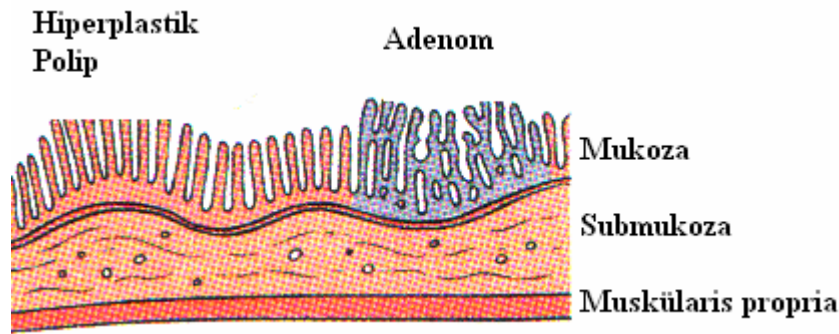
Tablo 2.4. Kolorektal poliplerin histolojik olarak sınıflandırılması

Non-neoplastik mukozal polipler	Hiperplastik polip (metaplastik) Normal epitel (polipoid konfigürasyon) Jüvenil polip (retansiyon polipi) Peutz-Jeghers Enflamatuvar polipler <ul style="list-style-type: none"> • Enflamatuvar barsak hastalığı • Bakteriyel enfeksiyonlar veya amebiyazis • Sistoizomiazis Kolitis kistika (cystica) profunda Pnömatozis kistoides intestinalis Lenfoid polipler (benign ve malign)
Neoplastik mukozal polipler	Benign (Adenom) <ul style="list-style-type: none"> • Tübüler • Tübülovillöz • Villöz Malign (karsinom) <ul style="list-style-type: none"> • Noninvaziv • İn situ • İntramukozal • İnvaziv
Submukozal lezyonlar	Lipomlar Karsinoid tümörler Metastatik neoplaziler Diğer seyrek lezyonlar

NON-NEOPLASTİK MUKOZAL POLİPLER

Hiperplastik polip

Hiperplastik polipler, çoğu mukoza üzerinde çapları 5 mm'den küçük, meme başı benzeri, yarım küre şeklinde düzgün çıkıntılar olarak görülmektedir. Polipler, mukozanın anormal maturasyonu, inflamasyonu ya da yapısal bozukluğu sonucu meydana gelebilirler. Hiperplastik polipler en sık inen kolonda bulunan çok küçük lezyonlardır ve malignite potansiyeline sahip değildirler (85) (Şekil 2.4).



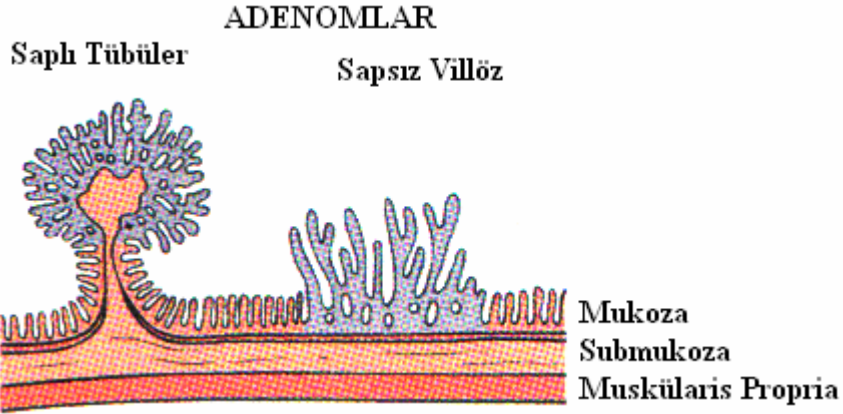
Şekil 2.4. Hiperplastik polip ve adenomların şematik görünümü

NEOPLASTİK MUKOZAL POLİPLER

1- Kolorektal Adenomlar (Prekanseröz (neoplastik) Evre)

Adenomlar genelde saplı küçük tümörlerden, sapsız (sesil) büyük lezyonlara kadar değişen çeşitli yapı ve büyüklüklerde neoplastik poliplerdir. Bütün adenomatöz lezyonlar, epitelyal proliferasyondan *in situ* karsinoma kadar değişen derecelerde displaziden kaynaklanan lezyonlardır. Ayrıca invaziv kolorektal karsinomların tamamının olmasa da, çoğunun daha önceden var olan adenomatöz lezyonlardan kaynaklandığını gösteren çok güçlü kanıtlar vardır (85). Adenomlar; **makroskopik görünümüne** (saplı, sapsız ve flat), **yapısal oranlarına** (tübüler, villöz, tubulovillöz) ve **displazi derecelerine** (hafif, orta, ağır) göre sınıflandırılırlar (88). Esas olarak Adenomatöz polipler, epitelyal karakterleri temel alınarak 3 tipe ayrılmıştır. Bunlar; tubuler adenomlar, villöz adenomlar ve tubulovillöz adenomlardır.

Tübüler Adenomlar: Adenomların çoğu 1-2cm uzunluğunda ince bir sapa ve çilek benzeri başa sahiptir (Şekil 2.5). Nadiren çapı 2,5cm yi geçer. Histolojik olarak, sap normal kolon mukozası ile döşelidir. Fakat baş kısmı, dallanmalar gösteren, hiperkromatik nüveli, yer yer düzensiz müsin sekresyonu yapan ya da yapmayan neoplastik epitelden oluşur. Mukozada intramukozal karsinoma kadar bütün displazi dereceleri ya da sap kısmında submukozaya kadar ilerleyen invaziv karsinom gözlenebilir (85,96).



Şekil 2.5. Tübüler ve villoz adenomların (saplı ve sapsız) şematik görünümü

Villöz Adenomlar: Villöz polipler geniş tabanlı, malignite potansiyeli taşıyan adenomatöz yapıda gastrointestinal lezyonlardır (Şekil 2.5). Genelde sapsız olup çapları 10cm ye kadar ulaşabilir. Kadifemsi ya da karnıbahar benzeri bir yüzeye sahip, çevre mukozadan 1-3cm kadar çıkıntı meydana getiren kitleler şeklindedirler. Displazinin bütün dereceleri gözlenebilir. Bu lezyonların %40'ında invaziv karsinoma rastlanır. Karsinom sıklığı polipin boyutları ile yakından ilişkilidir (85,97).

Tübülovillöz Adenomlar: Tübüler ve villöz bölgelerin karışımından oluşmuşlardır. Displazi derecesi ve intramukozal ya da invaziv karsinom taşıma riski açısından bakıldığında, bu lezyonlar tübüler ve villöz adenomlar arasında orta bir yere sahiptirler (85).

Adenomların %50 kadarı sigmoid kolon ve rektumda görülür. Adenomlar premalign lezyonlardır. Genel olarak kabul edilen bir “adenom-karsinom dönüşümünün” varlığıdır. Bir adenomun malign potansiyeli onun büyüklüğüne, büyüme özelliklerine ve epitel atipisinin derecesine göre değişmektedir. 1cm'nin altındaki adenomlarda kanser sıklığı %1'in altında iken, 1-2cm'lik lezyonlarda %10 ve 2cm'den büyük lezyonlarda %45'in üzerindedir. Ancak düzgün adenomlarda milimetrik boyutlarda bile malignite riski yüksektir. Tübüler adenomlar en sık görülen grup olmalarına rağmen malignite riskleri %5, tübülovillöz grupta %22 ve en az görülen grup olan villöz adenomlarda %40 dolayındadır. Sapsız lezyonların da saplı olanlara göre malignite potansiyeli daha fazladır. Bir adenomun kötü huylu tümöre dönüşmesi en az 5 yıl, ama genellikle 10-15 yıl alır (95).

Displazi derecelerine Göre Adenomların Sınıflandırılması

Nukleustaki büyüme, pleomorfizm, polarite kaybı ve mitotik hücrelerin çoğalımı displazi olarak tariflenmiştir. Hafif, orta ve şiddetli şekilde olabilmektedir. Displastik değişimler belirgin ve epitelin tüm kalınlığını tuttuğu zaman, lezyonlar kanserin ilk preinvaziv evresi olan *karsinoma in situ* adını alır. Bazı araştırmacılara göre şiddetli displazi *karsinoma in situ* ile eşdeğerdedir. Adenomların %70'i hafif, %20-30'u orta ve %10 kadarı da şiddetli derecede displazi gösterirler (98,99).

Hafif Displazi: Düzenli tübüleri, kriptleri ve villusları olan, iğ veya sigara şeklinde uzamış hiperkromatik çekirdekli hücrelerle çevrelenmiş ve düzenli çekirdek zarı olan yapılardır. Kriptlerin lümenine yakın kısmında çok şekilli ve nükleer tabakalaşmayla karakterize epitel proliferasyon alanları gözlenir. Bu alanlar epitelin 1/2 alt yarısında görülmez. Etkilenen kriptlerin taban kısmı normaldir ve proliferasyon alanlarında müköz salgısı görülmez. Fakat mitotik aktivite vardır.

Şiddetli Displazi: Hafif displazide anlatılan özelliklere ilaveten, tabaka yapmış çok şekilli ve hiperkromatik çekirdek, epitelin üst tabakasından lümenine doğru uzanım gösterir. Değişiklikler en az 3 tübül ya da kripte olmaktadır. Bu lezyonlar mukoza içine doğru ve lümenine doğru genişleme gösterirler. Hafif displaziye göre daha derinde bulunurlar. Lamina propria'ya invazyon gözlenmez. Lieberkühn bezlerinin etrafında anormal epitel görülür (96,98,99).

2- Kolorektal Karsinomlar (Karsinom Evresi)

Mikroskopik olarak kolorektal karsinomlar iyi orta veya az derece de diferansiyasyon olabirler. Bu karsinomların %10-15 kadarı müköz salgıya sahiptir. Müköz salgıya sahip karsinomların prognozları daha kötüdür. Tümör hücreleri, kolumnar hücreler, goblet hücreleri ve seyrek olarak endokrin hücrelerden oluşur. Bez lümenleri sıklıkla hücre kalıntıları içerir. Karsinomlar daima inflamatuvar ve desmoplastik reaksiyon oluştururlar. Bu reaksiyon özellikle tümör çevresinde belirgindir. İnflamatuvar hücrelerin büyük bir kısmı T lenfositlerdir, fakat B lenfositler, plazma hücreleri, histiositler ve S-100 protein pozitif dentritik hücreler de görülebilir (85,88).

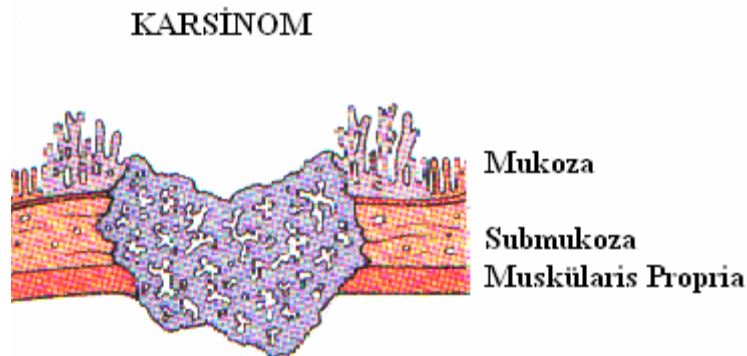
Kolorektal karsinomların kolonda dağılımına bakıldığında, tümörlerin önemli bir kısmı %55-60'ı rektosigmoid bölgeye, %10-15'i inen kolona, %5-10'u transvers kolona, %15-20'si ise çıkan kolon ve çekuma yerleşmiştir. Bütün kolorektal karsinomlar *in situ*

lezyonlardan gelişmelerine rağmen, değişik morfolojik yapılarla sahiptirler. Kolorektal karsinomların makroskopik olarak büyük bir kısmı polipoid veya ülseratif/ infiltratif tiptedir. Polipoid tipte olanlar lümeneye doğru büyüme gösteren, normal kolon mukozasıyla keskin sınırlar oluşturan büyük kitleler şeklinde olup daha çok proksimal kolonda yerleşirler. İnfiltratif olanlar yüzeyden daha az kabarıktır ve santral ülserasyon alanı bulunur. Daha çok distal kolonda izlenir. Mikroskopik olarak bakıldığında ise kolorektal karsinomun tanımlayıcı özelliği muskularis mukozayı aşarak submukozaya girmesidir (85,88,96). Proksimal kolon yerleşimli kitleler çekumun ya da çıkan kolonun bir tarafında duvar boyunca gelişirler ve tıkanma nadir olarak görülür. Distal kolondaki karsinomlar, duvarı çevreleyen lezyonlardır ve bağırsakta halkasal bir konstrüksiyona neden olarak lümeni daraltırlar. Bu halkasal yapının sınırları çıkıntılıdır. Daha sonra yıllar içerisinde direkt olarak bağırsak duvarını geçer ve serozal yüzeyde sert kitleler şeklinde kendini gösterir (44,85,100).

Karsinomların Histolojik Olarak Sınıflandırılması

İntramukozal Karsinom: Lezyonlar mukozada daha geniş yer kaplar ve muskularis mukoza ile birleşirler. Malign karakterli epitel lamina propria'ya invazyon yapmıştır. Muskularis mukozaya invazyon yoktur. Bezlerde de muskularis mukozaya doğru invazyon gözlenmez.

İnvaziv Karsinom: Muskularis mukoza ve submukozaya doğru invazyon görülür. Malign karakterli epitel ve bezler muskularis mukozaya, submukozaya ve daha ötesine invazyon yapmıştır (98,99) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Karsinomun şematik görünümü

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 DENEYSEL KANSER OLUŞTURMA

Bu çalışma, 7 Mart 2006 tarih ve 01/80 sayılı etik kurul kararı ile Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkez'inde (DEKAM) yapıldı. Çalışmada, ağırlıkları 25-30gr arasında değişen, 30 adet, 8 haftalık erkek Balb-c türü fareler kullanıldı. Fareler, araştırma süresince 19-21 °C sabit sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/karanlık dönemlerin bulunduğu özel hazırlanmış, otomatik olarak klimatize edilen odalarda korundu ve normal pellet cinsi yem ile beslendi. Hayvanlar kontrol grubunda 10 fare ve DMH grubunda 20 fare olacak şekilde rastgele iki gruba ayrıldı. Birinci grup fareler kontrol grubunu oluştururken, ikinci grup farelere DMH enjekte edilerek deneysel kolon kanseri oluşturuldu. Deneysel kanser oluşturmada daha önce tarafımızdan yapılan bir çalışmadaki protokol uygulandı (101). Belirtilen çalışmada farelere haftada bir kez 20 mg/kg DMH subkutan yoldan 12 hafta süresince enjekte edildi ve hayvanlar son DMH enjeksiyonundan 6 hafta, 12 hafta, 18 hafta ve 24 hafta sonra sakrifiye edildi. Hayvanlardan alınan doku örneklerinin histopatolojik yönden incelenmesi sonucunda, 6 hafta sonra sakrifiye edilen hayvanların tamamında mukozal displazi gözlenirken hiçbirinde kötü huylu tümöral lezyon gözlenmedi. 12 hafta sonra sakrifiye edilen hayvanların %71.4'ünde, 18 ve 24 hafta sonra sakrifiye edilen hayvanların ise hepsinde (%100) kötü huylu tümöral lezyonlar gözlemlendi. Şiddetli displazinin zamanla azaldığı ve karsinom sayısında ise artış olduğu, zaman içinde

displazinin karsinoma dönüştüğü gözlemlendi. Hafif displazi sayısında ise çok az bir artış gözlemlendi.

Daha önceki yaptığımız çalışmada son DMH dozundan 12 hafta sonra öldürülen farelerin %71,4'ünde karsinom, %85'inde şiddetli displazi gözlenmesi bu dönemin prekanseröz dönem olması açısından önemliydi. Mevcut çalışmamızda, yapılan bu çalışmadan elde edilen verilere göre endostatin uygulama zamanı belirlendi ve endostatin son DMH dozundan 12 hafta sonra enjekte edildi. Yapılan çalışmalarda tümör büyümesinin ilk fazı boyunca endostatin tedavisinin başlaması, antianjiogenik terapi için ideal bir zaman olarak gösterilmiştir. Çünkü endostatin özellikle yeni şekillenen kan damarlarında proliferasyon olmuş endotel hücrelerini inhibe etmektedir (102,103). Yani endostatinin, tümörün büyümek için ihtiyaç hissettiği yeni kan damarı şekillenmesinden hemen önce (progression aşamasında: hiperplastik lezyonların küçük tümörlere dönüşme zamanı) uygulanması onun antianjiogenik ve antitümöral etkisi için oldukça önemlidir (104).

Deney Grupları

Grup 1 (Kontrol grubu): 12 hafta süresince sadece serum fizyolojik enjekte edildi ve 18 hafta sonra hayvanlar öldürüldü (toplam 30 hafta).

Grup 2 (DMH grubu): Bu gruptaki hayvanlara 12 hafta süresince haftada bir kez 20 mg/kg DMH enjekte edildi. Daha sonra 12 hafta boyunca herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı. 12. haftanın sonunda ise hayvanlar, DMH ve endostatin grubu olmak üzere rastgele tekrar iki gruba ayrıldı. Bu süreçten sonra DMH ve kontrol grubundaki hayvanlara 6 hafta boyunca s.c yoldan PBS (fosfat tampon solüsyonu) enjekte edilirken, endostatin grubundaki hayvanlara ise 6 hafta boyunca hergün, 7 µg (mikrogram) Rekombinant İnsan Endostatin (rHuE) s.c yoldan enjekte edildi. Son endostatin dozundan bir gün sonra her iki gruptaki hayvanlar kurban edildi. Böylece DMH ve Endostatin grubundaki hayvanlar son DMH dozundan 18 hafta sonra öldürüldü (toplam 30 hafta).

DMH, her hafta, enjeksiyon zamanından hemen önce taze olarak hazırlandı. Öncelikle DMH, %0.05'lik EDTA'da (etilendiamin tetraasetik asit) çözüldü ve NaHCO₃ (sodyum bikarbonat) ile solüsyonun pH'ı 6.5 olarak ayarlandı. Enjeksiyonlar, s.c yoldan ve farelerin bel omurları seviyesinde sırt bölgesinden rotasyon şeklinde uygulandı. Endostatin de aynı şekilde uygulanmadan hemen önce PBS ile seyreltilerek günlük

olarak hazırlandı. DMH ve endostatin uygulamaları sırasında hayvanları irrite etmemek ve enfeksiyon gelişimini engellemek amacıyla her denek için ayrı bir insülin enjektörü kullanıldı. Deney süresince hayvanlar günlük olarak kontrol edildi ve haftalık kilo takibi yapıldı. Ayrıca genel morfolojik görünümleri (tüy dökülmesi, dışkılama bozuklukları ve anal lezyonlar açısından) makroskobik olarak değerlendirildi.

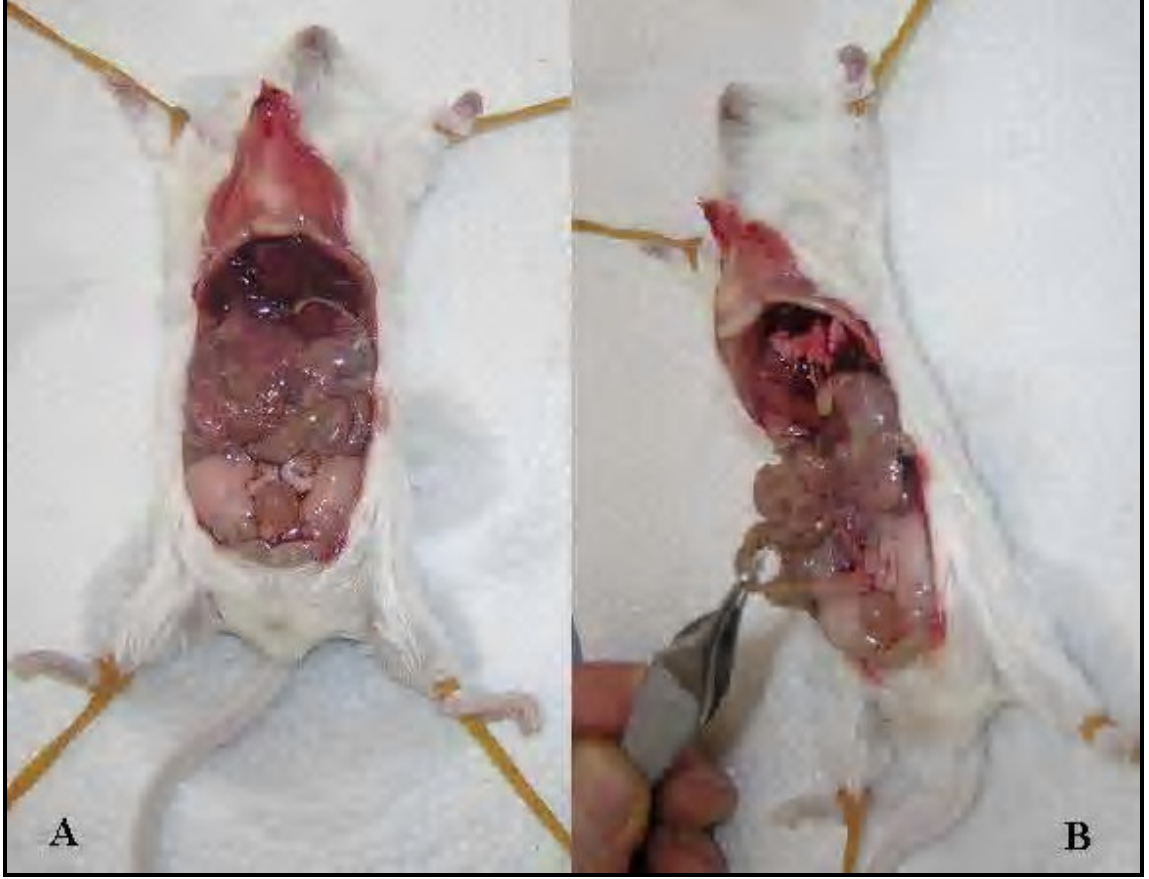
3.2. KOLONUN ÇIKARILMASI VE HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Deney süresinin sonunda, ketamin-xylosine (50mg/kg-15mg/kg) ile genel anestezi uygulanan farelerin (kontrol ve deney grupları) karın bölgesi, anal (pubis) bölgeden göğüs boşluğuna doğru ters V harfi şeklinde eksize edildi. Karın bölgesindeki organların patolojik yönden makroskobik değerlendirmesi yapıldıktan sonra, bu bölgedeki organlar sağ tarafa doğru uzaklaştırılarak kolona ulaşıldı (Resim 3.1). Daha sonra çekum bulunarak bu hizadan itibaren kolon canalis analise kadar ince bir makas yardımı ile diseksiyon edilerek takip edildi. Kolon, dokuya zarar verilmeden çıkarıldı ve PBS içeren bir petri kabına alındı. Daha sonra Swissroll tekniği uygulanarak %10'luk formal içinde tesbit edildi.

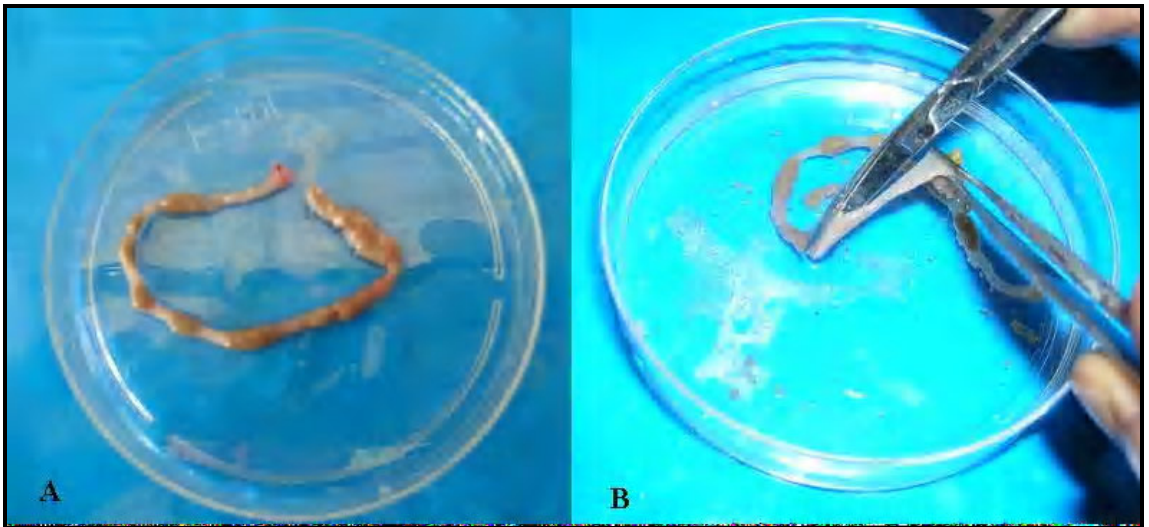
3.3. SWISS ROLL TEKNİĞİ

Bağırsağın histolojik incelenmesi esnasında bazı problemler oluşabilir. Özellikle bağırsak karın boşluğundan çıkarıldıktan sonra longitudinal kasların etkisi ile direkt olarak kısalır ve kısa bir süre sonra bağırsak epiteli değişmeye başlar. Tüm bunlardan dolayı bağırsak lümeninin hızlı bir şekilde temizlenmesi ve bağırsağın fikse edilmesi gerekir. Bunlara ilaveten bağırsak uzun bir organdır ve en iyi bir şekilde longitudinal olarak çalışılır. Bu problemlerin üstesinden gelmek ve bağırsağın çok büyük bir bölümünü taramak için Reilly ve Kirsner tarafından sunulan swiss roll tekniğine uygun (105) bir şekilde dokular hazırlandı (106). Numuneler tampon solüsyonu (PBS) ihtiva eden bir petri kabına konuldu. Daha sonra bağırsak, stereomikroskop altında, uygun bir makas yardımıyla uzunlamasına kesildi ve içeriği serum fizyolojik ile temizlendi (Resim 3.2). Temizleme işleminden sonra kolonun iç yüzü (tunika mukoza) dışa gelecek şekilde kolon steril ince bir ağaç çubuk üzerine sarıldı (Resim 3.3). Sarma işlemi sırasında kolonun kaymamasına ve üst üste gelmesine dikkat edildi. Daha sonra hazırlanan bu swiss roll, %10'luk formalin içinde 4°C'de 48 saat tutularak tesbit edildi. Tespitten sonra bu swiss roll dikkatli bir şekilde ağaç çubuktan uzaklaştırıldı ve rutin histolojik takiplerden sonra parafine gömüldü. Dokulardan 5 µm'lik kalınlığında ve 300

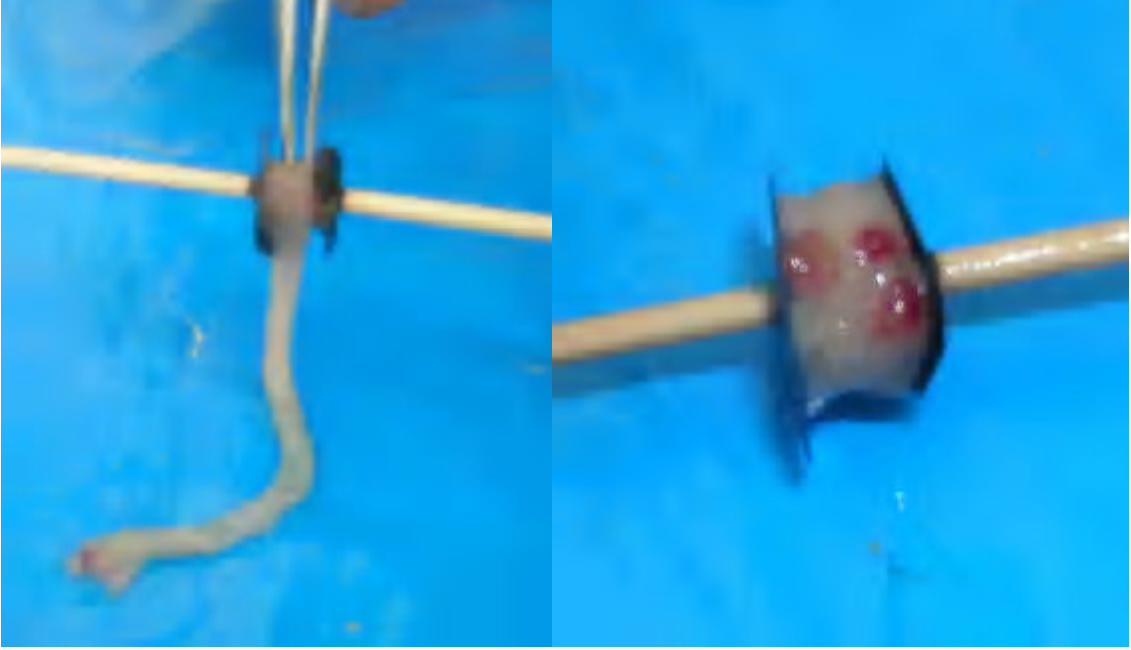
$\mu\text{m}'\text{lik}$ aralıklarla seri kesitler alındı. Daha sonra histolojik kesitler, kanserli alanların tespiti için, rutin histolojik takiplerden geçirildikten sonra hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi.



Resim 3.1. Farenin karın bölgesinin açılması (A) ve kolonun çıkarılması (B)



Resim 3.2. Kolonun petri kabına konulması (A) ve longitudinal olarak kesilerek lümenin açılması (B)



Resim 3.3. Swiss Roll Tekniği kullanarak bağırsağın bir ağağ çubuğa sarılması

Saptanan lezyonlar histopatolojik olarak hafif displazi, Őiddetli displazi ve adenokarsinom olarak sınıflandırıldı. Bu sınıflandırma deneyimli bir patoloji uzmanı tarafından yapıldı ve gruplardaki histopatolojik lezyonların sayısı belirlendi. Lezyonlar belirlenirken kolonun hangi bölgesinde olduğuna dikkat edildi ve bu iŐlem için kolon proksimal, orta ve distal olmak üzere 3 bölgeye ayrıldı. Bu iŐlemde ađađ çubuk etrafındaki tur sayısı dikkate alındı. Genelde toplam tur sayısı 6-7 olarak belirlendi. İlk 3-2.5 tur kolonun proksimal, devam eden 2 -1.5 tur orta, son 1-1.5 tur ise kolonun distal kısmı olarak dűŐünüldü.

3.4. HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRMA

Hafif Displazi: Prekanseroz lezyon olarak displazi, belirli hüresel ve yapısal deđiŐimlerle tanımlanmış dokudaki anormal durumlar olarak tarif edilir. Düzenli tubüleri, kripleri ve villüsları olan, iğ veya sigara Şeklinde uzamış hiperkromatik çekirdekli hücrelerle çevrelenmiş ve düzenli çekirdek zarı olan yapılardır. Displazinin asıl histolojik özelliği olgunlaşmamış hücrelerin sayısında artış ile sonuçlanan aşırı hücre çoğalmasıdır. Etkilenen kriplerin taban kısmı normaldir ve çoğalmış hücrelerde müsin salgısı görülmez (98,99,107).

Şiddetli Displazi: Tabaka yapmış çok şekilli ve hiperkromatik çekirdek, epitelin üst tabakasından lümeneye doğru uzanım gösterir. Hafif displaziye göre daha derinde bulunurlar. Lamina propria'ya invazyon gözlenmez. Lieberkühn bezlerinin etrafında anormal epitel görülür. Ayrıca mukozadaki bezlerde de tomurcuklanma ve dallanma ile beraber yapısal bir düzensizlik gözlenir (96,98,99).

Karsinom: Mikroskopik olarak kolorektal karsinomalar iyi orta veya az derece de diferansiye olabilirler. Bu karsinomların %10-15 kadarı müsin salgılar. Müsin salgılayan karsinomların prognozları daha kötüdür. Tümör hücreleri kolumnar hücreler, goblet hücreleri ve seyrek olarak endokrin hücrelerden oluşur. Çok iyi diferansiye olan karsinomlarda intraglandular papiller katlanmalar mevcuttur. Hücreler belirgin pleomorfizm gösterir. Karakteristik olarak çekirdek aşırı derecede hiperkromatik ve büyüktür. Çekirdek stoplazma oranı normaldeki 1:4 veya 1:6 yerine 1:1'e yaklaşabilir. Mitotik hücrelerde çok sayıda ve atipik özellik gösterir (96,99).

İntramukozal Karsinom: Şiddetli displazi ile benzer değişiklikleri gösterir. Bu benzerliğe ilaveten tümör hücreleri, lamina propria'nın mukozal stromasına invaze olur, ve muskularis mukoza ile birleşirler. Muskularis mukozaya invazyon yoktur. Bezlerde de muskularis mukozaya doğru invazyon gözlenmez (98).

İnvaziv Karsinom: Muskularis mukoza ve submukozaya doğru invazyon görülür. Malign karakterli epitel ve bezler muskularis mukozaya, submukozaya ve daha ötesine invazyon yapmıştır (98,99).

3.5 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

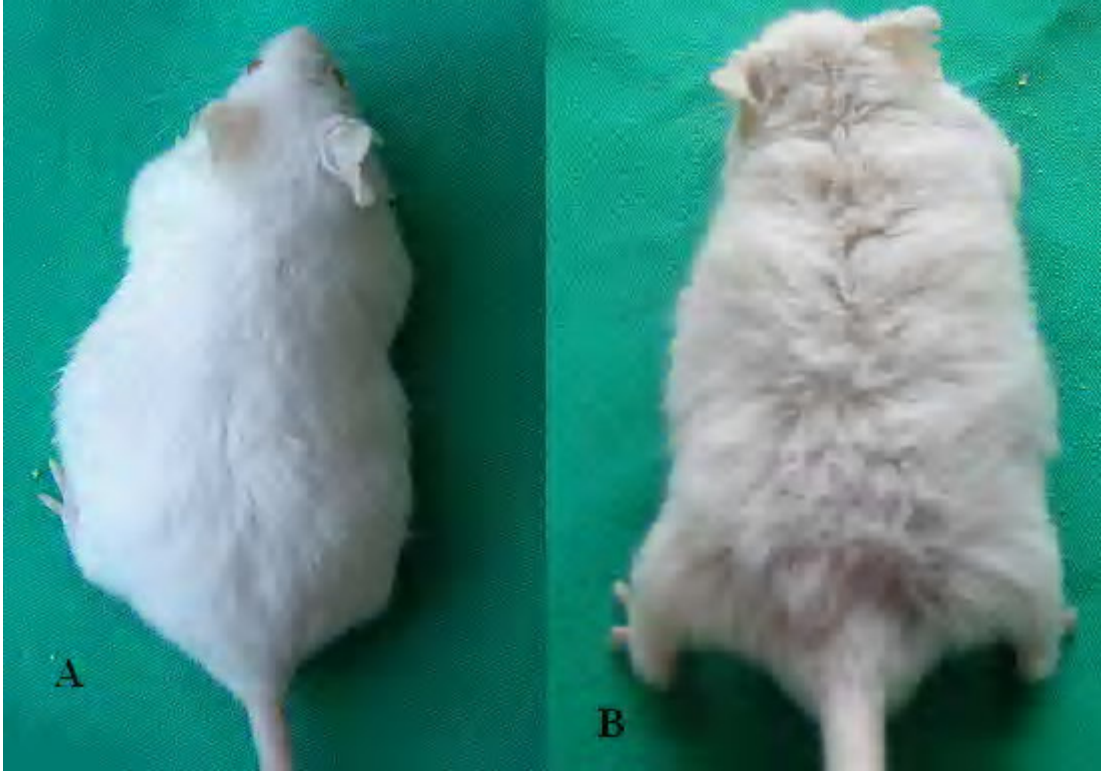
Lezyonların istatistiksel analizi için, SSPS paket programı kullanıldı ve independent samples test, ortalama ve Mann-Whitney-U Testi yapıldı. Ağırlık analizinde ise SİGMA programı kullanıldı ve Anova testi yapıldı.

4. BULGULAR

Yapılan çalışmada, ortalama 25-30 gr ağırlığında, 30 adet Balb-C türü erkek fareler kullanıldı. Bu fareler, 10 tanesi kontrol grubunda ve 20 tanesi DMH grubunda olacak şekilde iki gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki hayvanlara 12 hafta boyunca serum fizyolojik enjekte edilirken, DMH grubundaki hayvanlara 12 hafta süresince haftada bir kez 20 mg/kg DMH enjekte edildi. Bu süreçte kontrol grubunda ki farelerde herhangi bir toksik durum gelişmezken, DMH grubundaki farelerin 6 tanesi, yapılan ilk DMH enjeksiyonundan sonra öldü. Ölümünün DMH'nin toksik etkisinden kaynaklandığı düşünüldü. Böylece çalışmaya kontrol grubunda 10, DMH grubunda ise 14 hayvan olacak şekilde devam edildi. Son DMH dozundan 12 hafta sonra DMH grubundaki hayvanlar, her grupta 7 hayvan olacak şekilde rastgele DMH ve endostatin grubu olarak tekrar iki gruba ayrıldı ve çalışma süresince başka ölen fare olmadı.

Deney süresince yapılan günlük takiplerde, kontrol grubundaki hayvanların genel görünümünde herhangi bir değişiklik gözlenmezken (Resim 4.1), DMH ve endostatin grubunda, özellikle 12 haftalık DMH enjeksiyonundan sonraki dönemde, farelerin anal ve sırt bölgelerindeki tüylerde döküntü ve tüylerin genel görüntüsünde bozukluk (Resim 4.1), nadir olarak kanlı dışkı ve genel olarak hayvanlarda uyuşukluk gözlemlendi. Ayrıca son DMH dozundan yaklaşık 16 hafta sonra, DMH grubundan bir farenin boyun

bölgesinde şişlik tespit edildi (Resim 4.2). Yapılan incelemede bu şişliğin hematom olduğuna karar verildi.



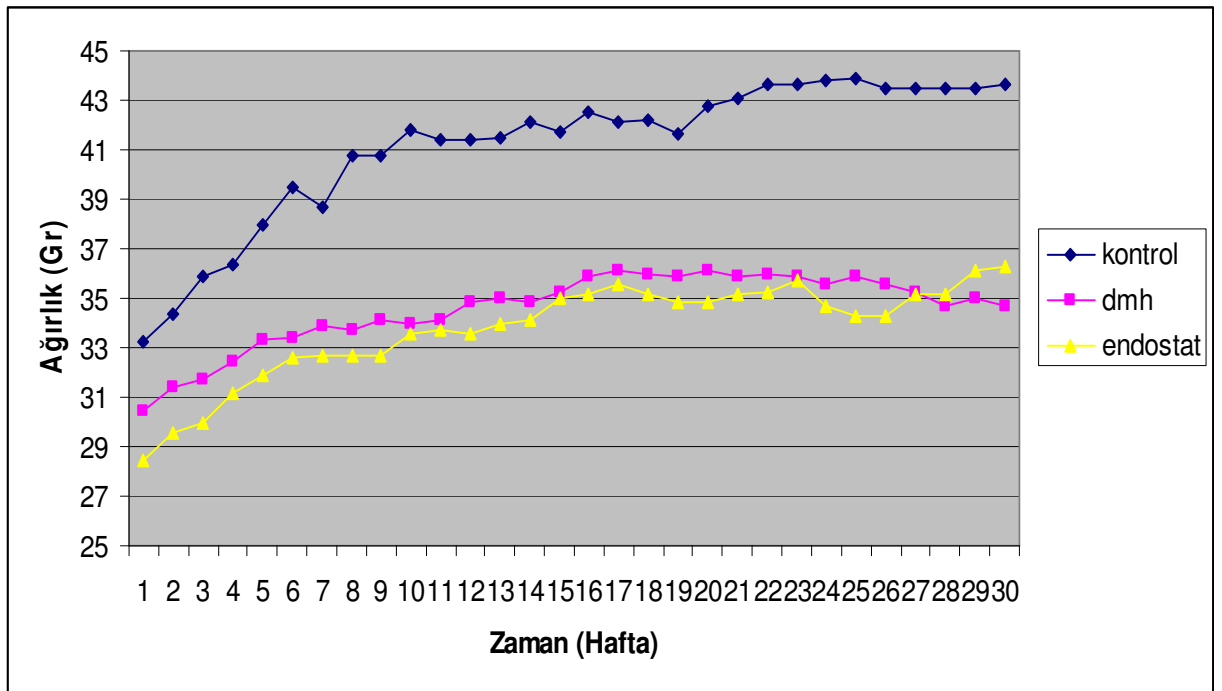
Resim 4.1. Farelerin genel görünümü

A. Kontrol grubu farelerde normal tüy görüntüsü **B:** DMH ve endostatin grubu farelerde dökülmüş ve düzeni bozulmuş tüy görüntüsü



Resim 4.2. DMH grubu bir farede boyun bölgesinde gözlenen şişlik

Yapılan çalışmada, günlük takiplere ek olarak deney süresince (toplam 30 hafta) hayvanların ağırlığı da haftada bir kez ölçüldü. 30 haftalık ağırlık ortalaması kontrol grubundaki hayvanlarda $41,581 \pm 0,7$ gr iken, DMH grubunda $34,567 \pm 0,7$ gr, endostatin grubunda ise $33,790 \pm 0,7$ gr olarak tespit edildi. DMH ve endostatin grubu hayvanların ağırlıklarında istatistiksel bir farklılık görülmedi. Çalışma boyunca her iki gruptaki ağırlık değerleri birbirine paralel seyretti. Sadece son 3 hafta, DMH grubundaki hayvanların ağırlığında azalma gözlenirken, endostatin grubundaki hayvanların ağırlığında ise bir miktar artış gözlemlendi. Yapılan analizde endostatin ve kontrol, DMH ve kontrol grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). DMH ve endostatin grubundaki hayvanlar daha az kilo alırken, kontrol grubunda hayvanların zamanla daha fazla kilo aldığı tespit edildi (Grafik 4.1).



Grafik 4.1. Ağırlık analizi

Deney süresinin bitiminde hayvanlar, ketamin-xylosine (50mg/kg-15mg/kg) anestezi ile öldürüldü. Daha sonra abdominal kavite açıldı ve alınan kalın bağırsak, tampon solüsyonu (PBS) ihtiva eden bir petri kabına konuldu. Çıkarılan kalın bağırsak makroskopik olarak ve steromikroskop altında incelendiğinde, lezyonların genelde distal kolona yerleştiği ve daha çok polip tarzında olduğu gözlemlendi (Resim 4.3).

Mikroskopik değerlendirme için rutin histolojik takip yapıldı ve elde edilen histolojik kesitler ışık mikroskopunda değerlendirildi. Yapılan histopatolojik analizde lezyonlar, hafif displazi, şiddetli displazi ve adenokarsinom olmak üzere üç gruba ayrıldı. Analiz sonucunda, kontrol grubu farelerde herhangi bir lezyon gözlenmezken (Resim 4.4), DMH ve Endostatin grubundaki farelerde %100 hafif displazi (Resim 4.5 ve 4.6), şiddetli displazi (Resim 4.7 ve 4.8) ve adenokarsinom geliştiği tespit edildi. Adenokarsinomlar, invazyon durumuna göre intramukozal (Resim 4.9 ve 4.10) ve invaziv (Resim 4.11 ve 4.12) olmak üzere iki grupta değerlendirildi. Çok az sayıda tunika serozaya invazyon yapmış lezyonlar da tespit edildi.

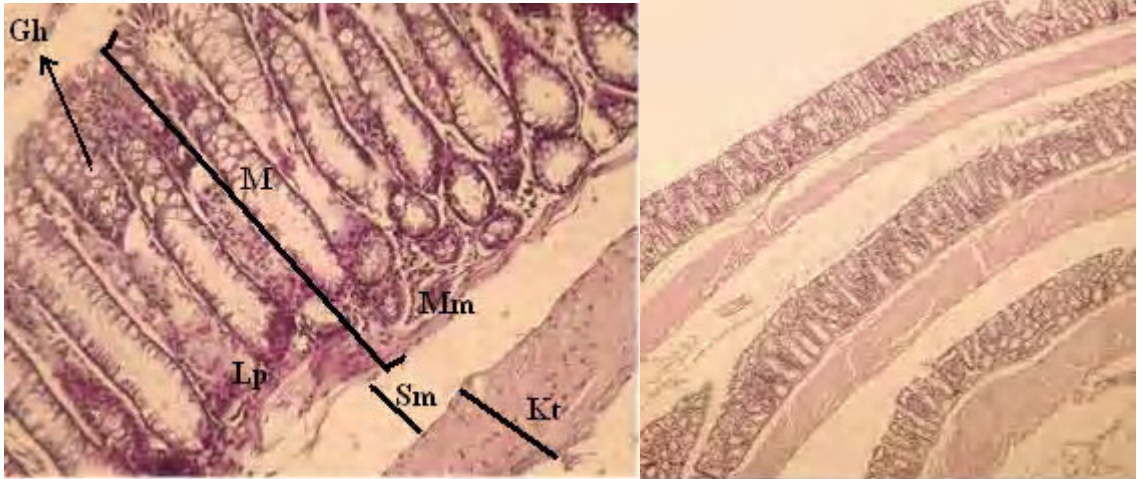
Mukoza ile sınırlı kalan lezyonlara intramukozal karsinom (non invaziv karsinom), tunika muskularise invazyon yapan lezyonlara da invaziv karsinom denildi. Lezyonlar histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, displastik lezyonların nükleuslarının genişlemiş ve hiperkromatik olduğu gözlemlendi. Hücreler artmış ve sigara şeklineydi. Ayrıca artmış nükleus stoplazma oranı tespit edildi. Bezlerde de yapısal düzensizlik ve şekilsizlik mevcuttu. Karsinomlarda ise neoplastik hücrelerde pleomorfizm ve hücre çekirdeklerinin aşırı derecede hiperkromatik ve büyük olduğu gözlemlendi. Çekirdek sitoplazma oranı birbirine yakındı. Mitotik hücreler çok sayıda ve atipik özellik göstermekteydi. İnvaziv tümörler içinde müsin gölcükleri oluşmuştu. Bu gölcüklerin içinde tek tek tümör hücreleri görülüyordu.



Resim 4.3. Distal kolonda gelişen polip şeklindeki tümörler

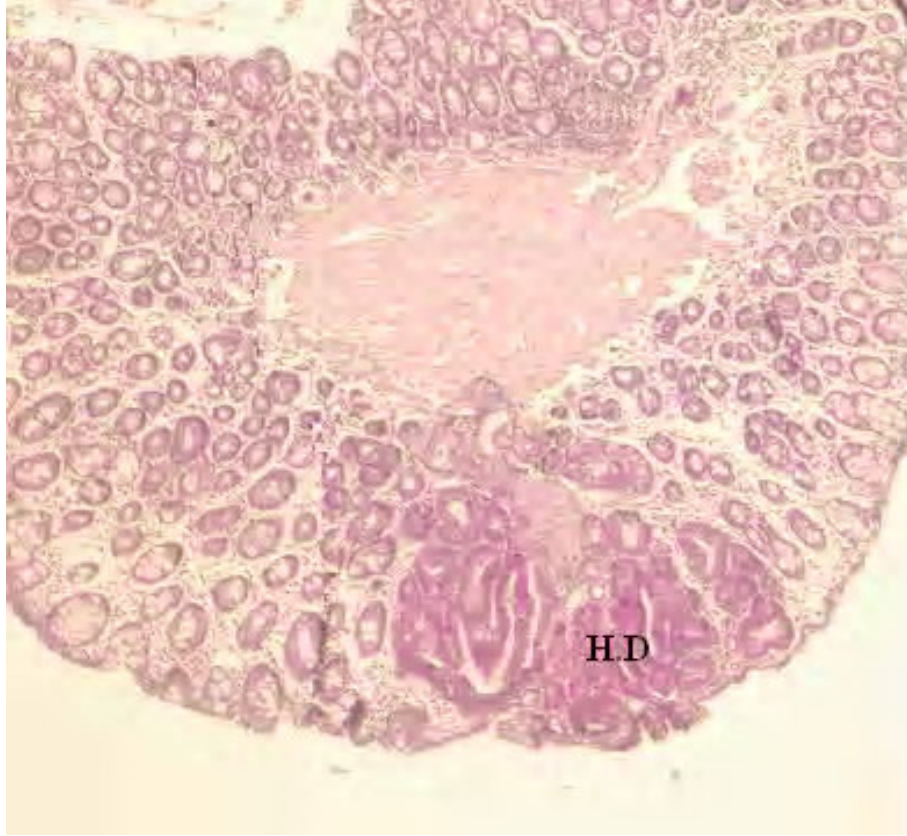
A: Makroskobik görünüm

B: Steromikroskop altındaki görünüm

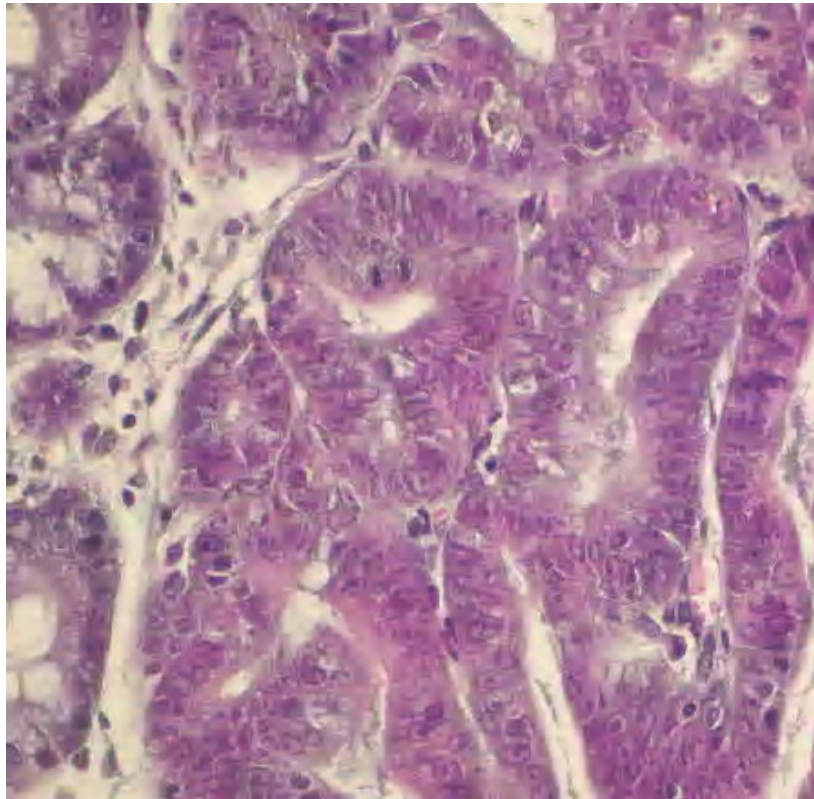


Resim 4.4. Kolonun normal histolojik görünümü

Gh: Goblet Hücresi **M:** Mukoza, **Lp:** Lamina Propria **Mm:** Muskülaris mukoza, **Sm:** Submukoza, **Kt:** Kas tabakası (HEX20,HEX4).



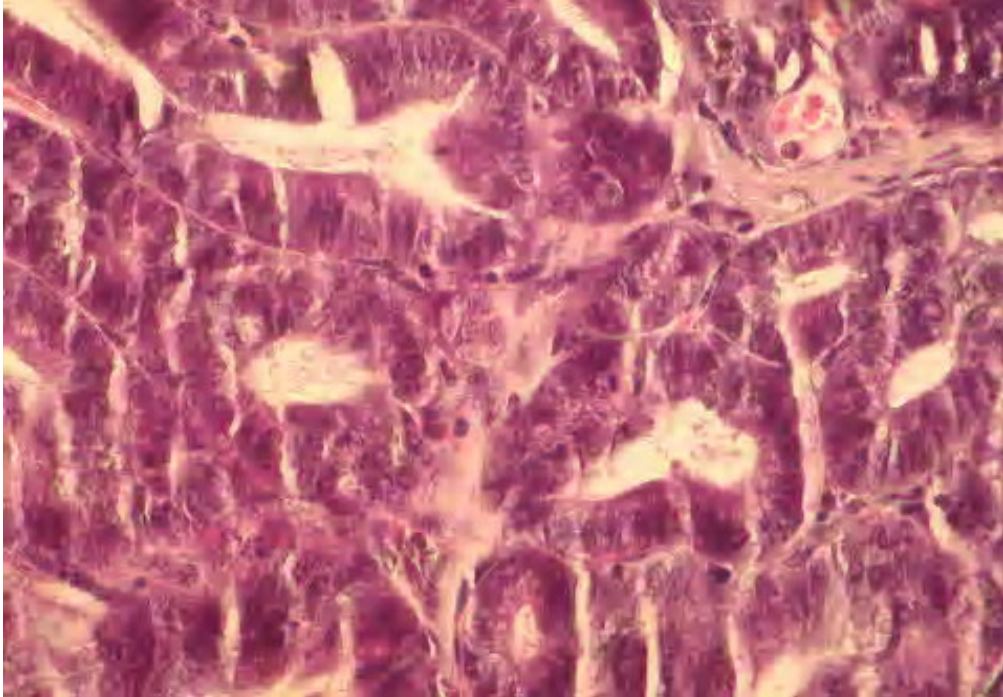
Resim 4.5. Distal kolonda görülen hafif displazi (HD). (HE X 4)



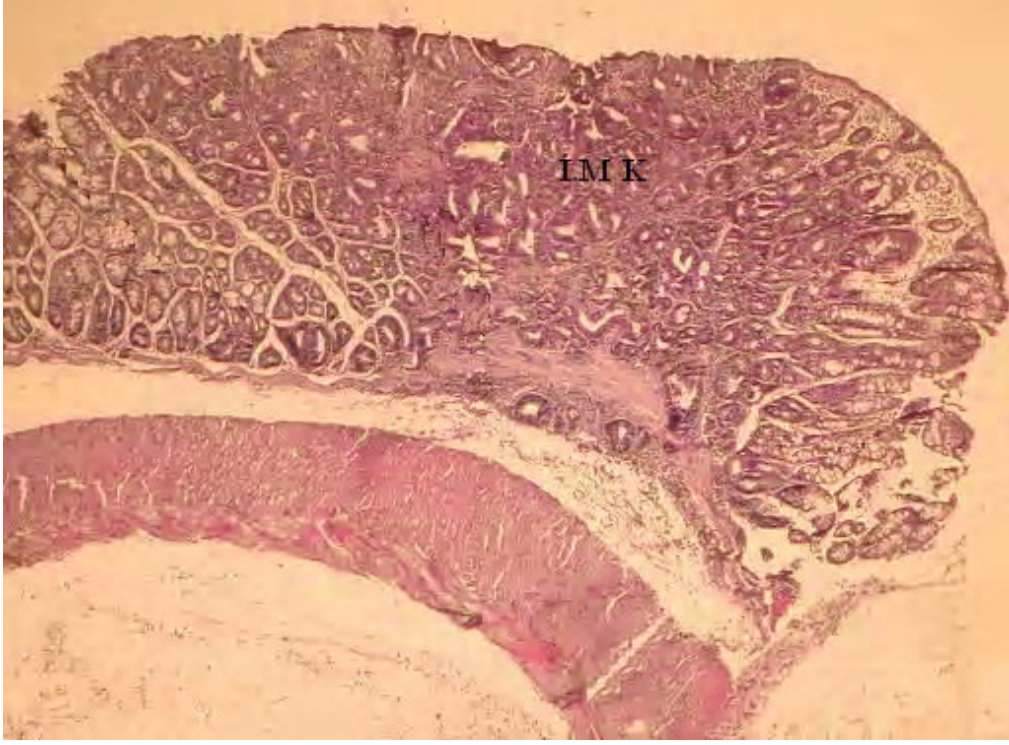
Resim 4.6. Hafif Displazi (HE X 40)



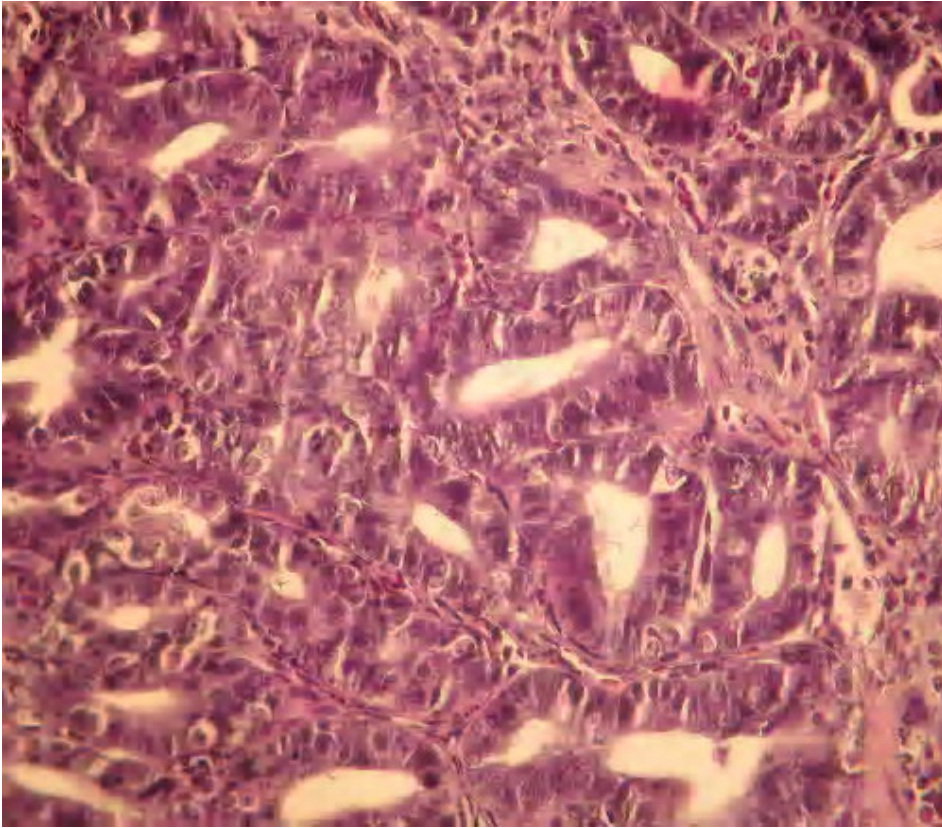
Resim 4.7. Distal kolonda görülen şiddetli displazi (ŞD) (HE X 4).



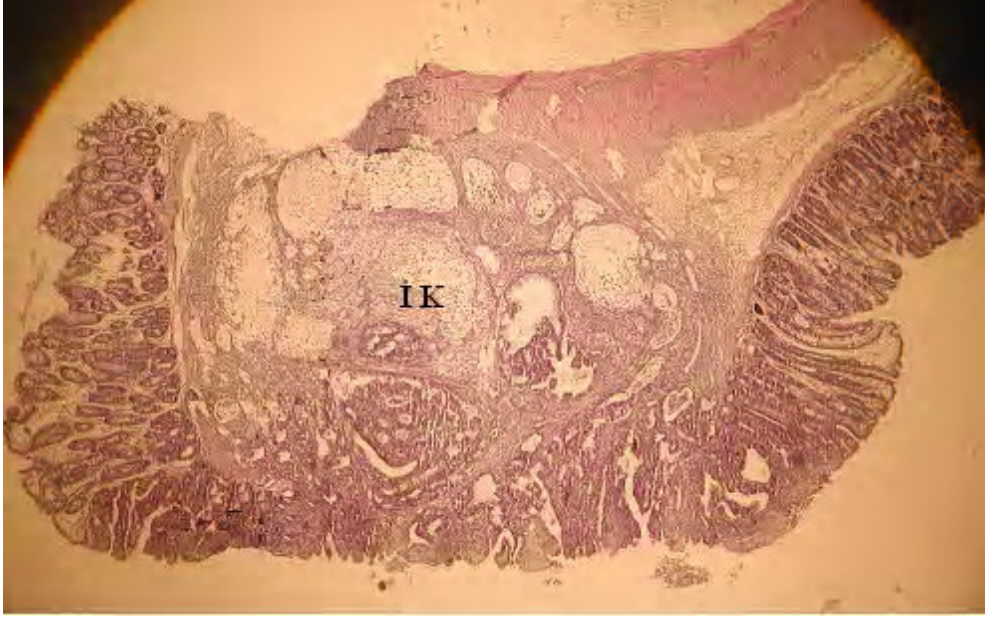
Resim 4.8. Şiddetli displazi (HE X 40).



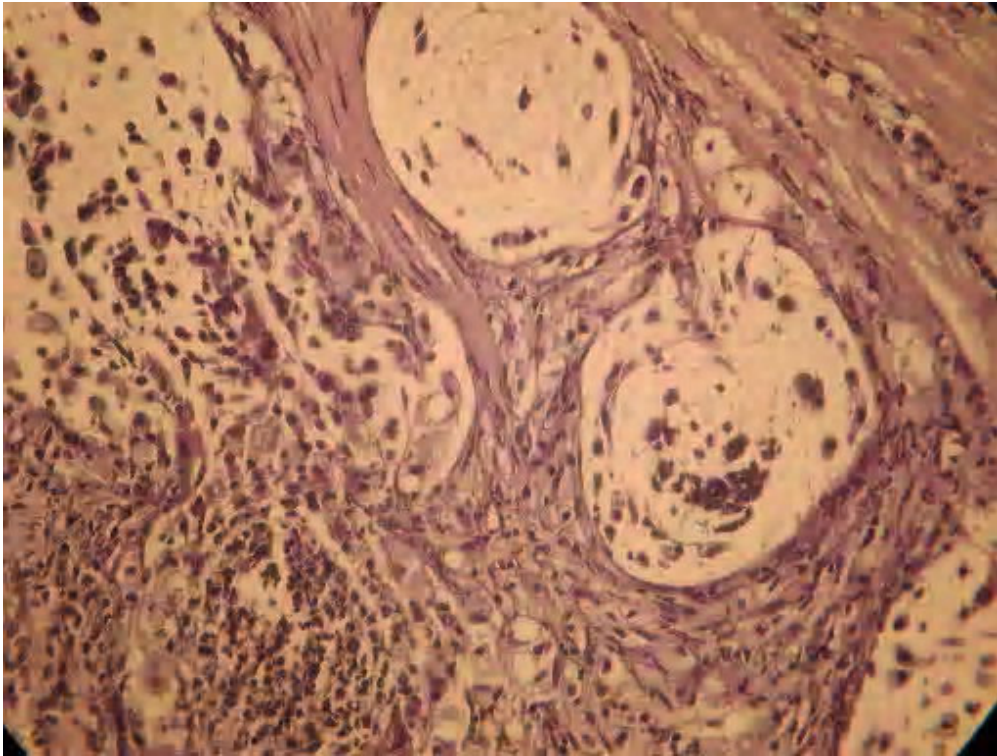
Resim 4.9. Distal kolonda görülen intramukozal karsinom (İ.M K) (HE X 4).



Resim 4.10. İnamukozal karsinom (HE X 40)



Resim 4.11. Distal kolonda görülen invaziv karsinom (İ K) (HE X 4).

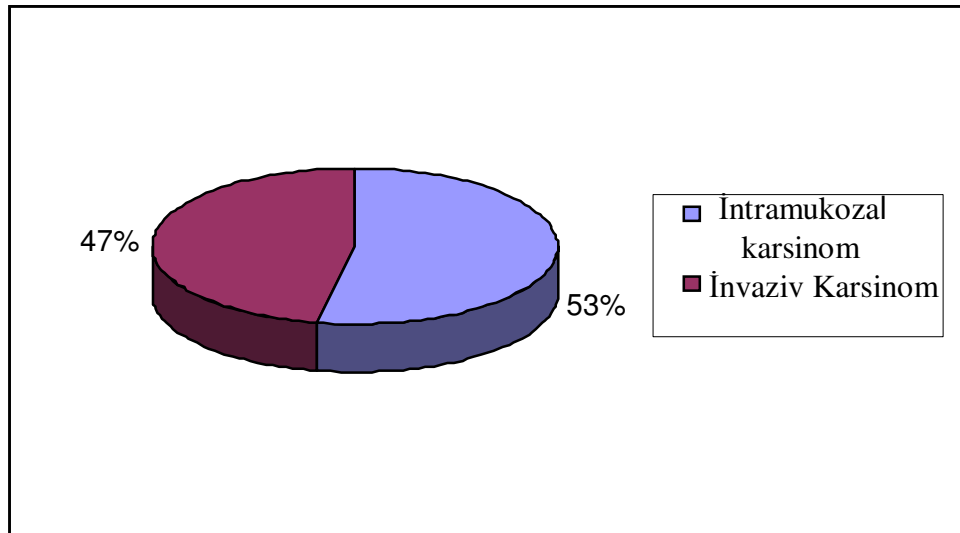


Resim 4.12. İnvaziv karsinom (HE X 40)

Çalışma sonucunda, DMH grubundaki tüm hayvanlarda toplam lezyon sayısı 77 olarak belirlenirken, endostatin grubundaki tüm hayvanlarda ise 57 lezyon olarak belirlendi. DMH grubundaki 77 lezyonun, %36,3'ü (28 lezyon) hafif displazi, %22'si (17 lezyon) şiddetli displazi ve %41,5'i (32 lezyon) adenokarsinom olarak tespit edildi. Adenokarsinomların, %53,1'i intramukozal ve %46,8'i ise invaziv karsinomdu (Tablo 4.1) (Grafik 4.2)

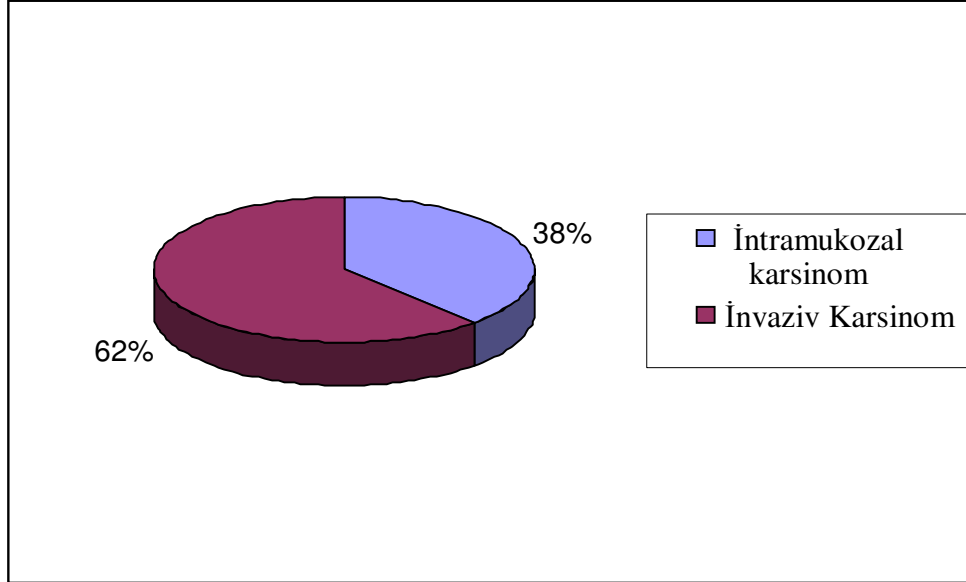
Tablo 4.1. Lezyon sayısı ve kolonda dağılımı

Gruplar	Toplam Lezyon Sayısı	Lezyonların Sınıflandırılması (%)			Kolonda Dağılımı (%)			Adenokarsinom	
		Hafif Displazi	Şiddetli Displazi	Adenokarsinom	Proksimal	Orta	Distal	Intra Mukozal	İnvaziv
DMH grubu	77	28 (%36.3)	17 (%22)	32 (%41.5)	5 (%0.64)	15 (%19.4)	57 (%74)	17 (%53.1)	15 (%46.8)
Endostatin grubu	57	18 (%31.5)	10 (%17.5)	29 (%50.8)	3 (%0.52)	11 (%19.2)	43 (%75.4)	11 (%37.9)	18 (%62)



Grafik 4.2. DMH grubunda görülen adenokarsinomların dağılımı

Endostatin grubunda ise 57 lezyonun, %31,5'i (18 lezyon) hafif displazi, %17,5'i (10 lezyon) şiddetli displazi ve %50,8'i (29 lezyon) karsinomdu. Adenokarsinomların %37,9'u intramukozal ve %62'si invaziv karsinom olarak saptandı (Tablo 4.1)(Grafik 4.3).



Grafik 4.3. Endostatin grubunda görülen adenokarsinomların dağılımı

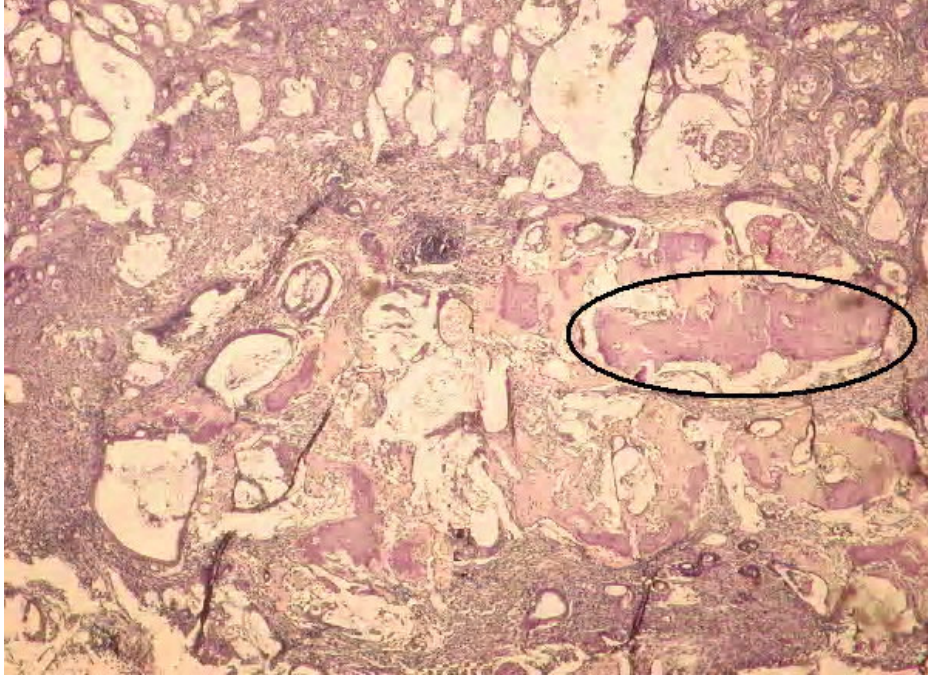
Çalışma sonucunda her iki gruptaki lezyonlar değerlendirildiğinde, hafif displazi, şiddetli displazi ve karsinom görülme açısından önemli bir farklılık olmadığı tespit edildi. Oysaki çalışma sonucunda, endostatin grubunda karsinom sayısının önemli oranda azalması ya da en azından intramukozal karsinomların invaziv karsinoma dönüşümünün azalması beklenmekteydi. Çünkü invazyon sürecine girmiş bir tümörde anjiogenezis başlamış demektir. Aksine çalışmamızda önemli oranda farklılık olmasa da endostatin grubunda invaziv tümör oranı %62, DMH grubunda ise %46,8 olarak tespit edildi. Çalışmamızda şiddetli displazi sayısı diğer lezyonlara göre az olarak tespit edildi fakat bu azalmanın nedeni şiddetli displazi lezyonlarının karsinoma dönüşmesi olarak gözlemlendi. Dolayısıyla bu çalışmada, 7 µg verilen endostatinin, anjiogenezisi inhibe ederek tümör invazyonunu ve sayısını engellemede yetersiz olduğu görüldü. Endostatinin toplam lezyon gelişimini % 25 oranında inhibe ettiği gözlemlense de bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Çalışmamızda lenf nodülleri sayısına ve lenf nodu metastazına bakılmadı fakat lenf nodüllerinin daha çok distal kolonda, ve özellikle de tümörlere yakın veya onların altında yerleşim gösterdiği gözlemlendi (Resim 4.13).



Resim 4.13: Kolonda görülen şiddetli displazi ve lenf nodülü. **Şd:** Şiddetli displazi, **Ln:** Lenf nodülü (HEX4).

Araştırmamızda kolon kanserlerinde nadir olarak görülen bir bulguya rastlandı. DMH grubunda, distal kolonda gelişen invaziv karsinom içinde heterotopik ossifikasyon alanı tespit edildi (Resim 4.14).



Resim 4.14. İnvaziv kolon tümöründe görülen heterotopik ossifikasyon alanı (HEX4)

Her farede görülen ortalama lezyon sayısına bakıldığında ise DMH grubunda 11 lezyon/fare şeklinde görülürken, endostatin grubunda 8 lezyon/fare olarak tespit edildi. Sadece karsinom sayısına bakıldığında, DMH grubunda en fazla karsinom sayısı 8 en az 2, ortalama 4,5 karsinom/fare iken, endostatin grubunda en fazla 7, en az 1 karsinom ve ortalama 4,1 karsinom/fare şeklinde gözlemlendi. Her iki grupta tespit edilen karsinom sayısı, birbirine yakınlık göstermiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Ortalama lezyon sayısı

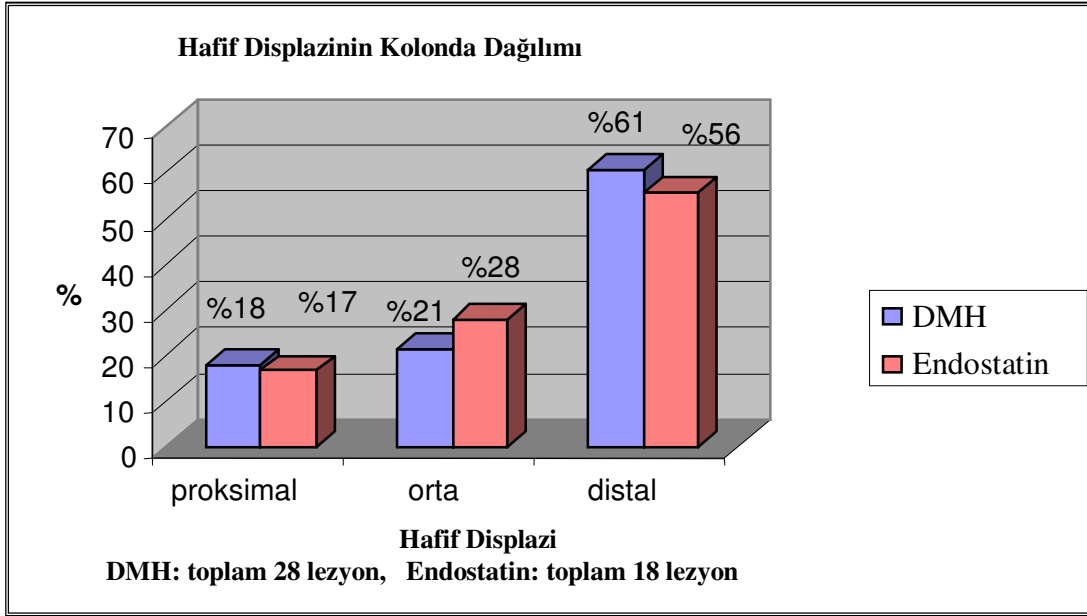
Deney Grupları	Ortalama Lezyon Sayısı / Fare				
	Fare Sayısı	Toplam Lezyon	Hafif Displazi	Şiddetli Displazi	Malign Karsinom
DMH grubu	7	11 ± 4.0	4 ± 1.6	2.4 ± 1.9	4.5 ± 2.4
Endostatin grubu	7	8.1 ± 3.7	2.5 ± 0.9	1.4 ± 0.9	4.1 ± 2.1

Lezyonların kolonda dağılımına bakıldığında, DMH grubunda görülen 77 lezyonun %74'ünün distal kolonda, %19,4'nün orta kolonda ve %0,64'ünün proksimal kolonda geliştiği gözlemlendi. Endostatin grubunda ise 57 lezyonun, %75,4'ünün distal kolonda, %19,2'sinin orta kolonda ve %0,52'sinin proksimal kolonda geliştiği belirlendi. Çalışma sonucunda, lezyonların genel olarak distal kolona yerleştiği ve yine iki grup arasında farklılık olmadığı göze çarpmaktadır. Hafif displazi, şiddetli displazi ve karsinomun tek tek kolonda dağılımına bakıldığında ise sadece hafif displazi'nin proksimal kolonda gözlemlendiği, şiddetli displazi ve karsinomların çoğunlukla distal kolona yerleştiği tespit edildi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Hafif displazi, şiddetli displazi ve karsinomun kolonda dağılımı

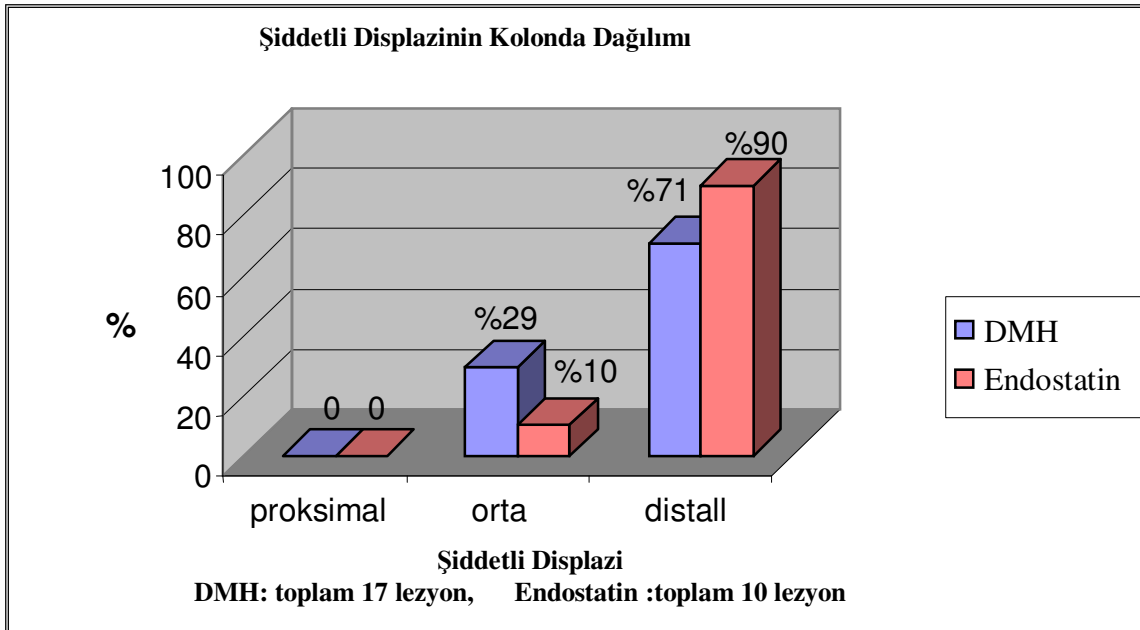
	DMH Grubu				Endostatin Grubu			
	Hafif Displazi	Şiddetli Displazi	İntra Mukozal Karsinom	İnvaziv Karsinom	Hafif Displazi	Şiddetli Displazi	İntra mukozal Karsinom	İnvaziv Karsinom
Proksimal Kolon	5	-	-	-	3	-	-	-
Orta Kolon	6	5	3	1	5	1	2	3
Distal Kolon	17	12	14	14	10	9	9	15
Toplam Lezyon	28	17	17	15	18	10	11	18

Hafif displazi, şiddetli displazi ve adenokarsinomun tek tek kolonda dağılımının yüzdelik oranları ise grafikler ile gösterildi (Grafik 4.4 - 4.7).



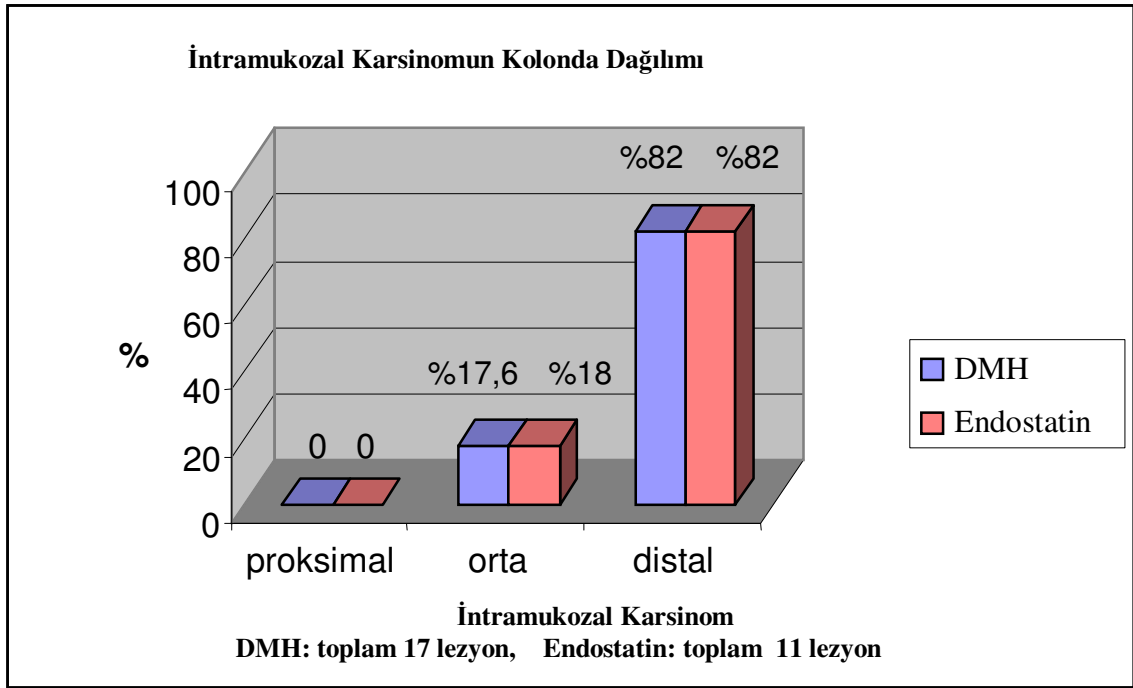
Grafik 4.4. Hafif displazinin kolonda dağılımı

Grafik 4.4 'de görüldüğü gibi hafif displazinin, proksimal ve orta kolonda dağılımı açısından her iki grup arasında bir farklılık gözlenmezken, DMH grubundaki lezyonların endostatin grubuna göre, distal kolonda anlamlı şekilde daha fazla görüldüğü tespit edildi ($p < 0,05$).



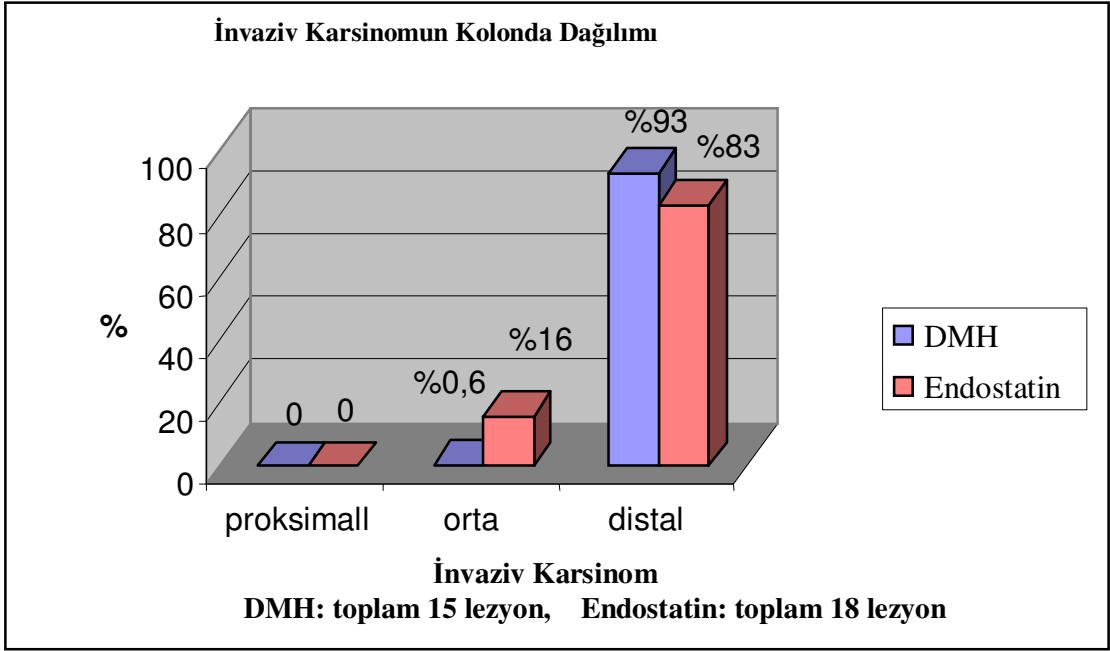
Grafik 4. 5. Şiddetli displazinin kolonda dağılımı

Grafik 4.5’de, şiddetli displazinin proksimal kolonda gelişmediği ve hatta hafif displazi ile kıyaslandığında, orta kolonda görülme oranının da azaldığı gözlemlendi. Lezyonların karsinoma dönüştükçe daha çok distal kolonda görülmeye başladığı tespit edildi. Her iki grup arasında şiddetli displazinin kolonda dağılımı açısından bir farklılık gözlemlenmedi. Fakat endostatin grubunda, şiddetli displazinin orta kolonda dağılımının dikkate alınacak değerde azaldığı gözlemlense de bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.



Grafik 4.6. İntramukozal karsinomun kolonda dağılımı

Grafik 4.6’da görüldüğü gibi intramukozal karsinomların proksimal kolonda gelişmediği, çok az orta kolonda geliştiği ve yine en çok distal kolonda dağılım gösterdiği tespit edildi. Ayrıca her iki grupta lezyonların kolonda dağılım oranı birbirine çok yakın olarak gözlemlendi.



Grafik 4.7. İnvaziv karsinomun kolonda dağılımı

Grafik 4.7'ye bakıldığında ise invaziv karsinomların çoğunlukla distal kolonda gözlendiği, proksimal kolonda hiç görülmediği ve orta kolonda da intramukozal lezyonlara göre daha az oranda görüldüğü tespit edildi. DMH grubunda, orta kolonda invaziv karsinom görülme oranı ciddi oranda azaldı. Bu sonuçlar, lezyonların displazi aşamasında iken kolonun her tarafında geliştiğini, ancak karsinom aşamasında iken daha çok distal kolona yerleştiğini göstermiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolorektal kanserler, günümüzde hala önemli sağlık problemlerinden biridir. Bu kanserler, endüstrileşmiş toplumlarda daha sık görülmekte ve akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadırlar (107). Etiyolojisinde diyet, sigara, kalıtsal hastalıklar ve stres gibi birçok faktör rol oynamakta ve çevresel faktörler kadar genlerin de etkisinin olduğu belirtilmektedir (108). Crohn hastalığı, ülseratif kolit ve ailesel polipozis gibi hastalığı olan insanlar, kolon kanseri açısından risk altındadır ve başlangıç aşamasında çok iyi takip edilmeleri gerekmektedir (98). Gelişmiş ülkelerde, erkeklerin %10'unun ve kadınların ise %11'inin ölüm nedeni olarak kolon kanserleri gösterilmiştir. Son yıllarda tanı ve tedavide gelişmeler olmasına rağmen, kolorektal kanserlerden dolayı görülen ölüm oranlarında önemli bir azalma olmamıştır. Kemoterapi ile yaşam süresi 12 aydan 18 aya kadar çıkarılmış, fakat kemoterapi ve radyoterapi ile yapılan kombine tedavinin, invaziv tümörlerde pek faydalı olmadığı gözlenmiştir (109). Bunun için kolorektal ve diğer kanser türleri için yeni alternatif tedavi yöntemlerini araştırmak önemli hale gelmiştir Böylece anjiogenezisin, tümörün büyümesi ve metastazında önemli bir basamak olduğunun anlaşıldığı 1970'li yıllardan beri kanser tedavisine yönelik terapötik stratejilerde öncelikli konu antianjiogenik terapi olmuştur. Dolayısıyla yeni kan damarlarının şekillenmesini engelleyen anjiogenezis inhibitörleri ile ilgili

araştırmalar başlatılmış ve çok sayıda antianjiogenik bileşik keşfedilmiştir (46). Bu bileşiklerden bir kısmı, vucut içinde doğal olarak oluşan proteolitik fragmanlar olup endojen anjiogenezis inhibit6rleri olarak isimlendirilmiştir. Endojen anjiogenezis inhibit6r6 olarak ilk keşfedilen anjiostatin daha sonra keşfedilen endostatin ve Thrombospondin-1 bunlardan birkaçıdır (24). Endostatin, y6ksek oranda antit6m6r etki g6steren geniş spekturumlu endojen anjiogenezis inhibit6r6d6r. İnsan gen haritasında bulunan genlerin %12'sinden fazlasında d6zenleyici etki g6stermiştir (49). Endostatinin etki mekanizması tam olarak bilinmese de bazı çalışmalarda, VEGF ve bFGF sinyalizasyonunu bloke ettiği, integrinler ve heparine bağlanarak endotel h6cre çoğalmasını, g66n6 (110) ve adezyonunu (111) inhibe ettiği, damar etrafındaki h6cre iskelet yapısının organizasyonunu bozduğu tespit edilmiştir (64,112). T6m bu 6zelliklerinden dolayı endostatin, dikkat çeken bir antianjiogenik ajan olmuş ve antianjiogenik ve antit6m6r etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda endostatinin antianjiogenik ve antit6m6r etkisini araştırmak için *in vitro* ve *in vivo* y6ntemler kullanılmıştır. *In vitro* alışmalarda genelde h6cre k6lt6r6 yapılmış ve endostatinin, 6zellikle kapiller endotel h6crelerin çoğalmasını ve g66n6 inhibe ettiği, çoğalan endotel h6crelerde de apoptozisi ind6klediği belirtilirken, nonendotelyal h6crelerde ise herhangi bir etki g6stermediği rapor edilmiştir (51,113). *In vivo* alışmalarda ise genellikle insan veya hayvan t6m6rleri, s.c olarak farelere enjekte edilmiş ve deri altında b6y6yen t6m6rde endostatinin antit6m6r etkisi araştırılmıştır. *In vivo* alışmalarda kullanılan bir başka y6ntem ise kimyasal karsinojen ile deney hayvanlarında ind6klenen t6m6rlerde, endostatinin etkisine bakılmasıdır (73).

Kanser araştırmalarında deneysel hayvan modellerinin kullanılması, insanlardaki etiyolojik ve patofizyolojik s6releri anlamak için oldukça 6nemlidir (66,114). Deney hayvanlarında bağırsak t6m6r6 oluşturma çalışmaları 1940'lı yıllarda başlamış ve kolon kanseri ind6klemede sıklıkla DMH ve onun metabolitleri olan azoksimetan, N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin ve N-methyl-N-nitrosourea kullanılmıştır (72). Bu kimyasal ajanlardan DMH, kolon kanserini ind6klemede yaygın olarak kullanılan ve 6zellikle de distal kolonda t6m6r oluşumunu ind6kleyen bir maddedir (78,115,116). DMH g6l6 bir kolon karsinojenidir ve ind6klenen t6m6rler, epitel orjinli olup histolojik, morfolojik ve anatomik olarak insan kolon neoplazmalarına benzemektedir (79,109,117).

Hayvan modellerinde kolorektal kanser gelişme oranı, kullanılan karsinojenin dozuna, uygulama yoluna, uygulama sıklığı ve süresine bağlıdır. Bunlara ilaveten farelerin cinsiyeti, yaşı ve genetik geçmişi de kolorektal kanser gelişme oranını etkileyebilmektedir (71). Genetik farklılıklar ile ilgili farelerde yapılan bir çalışmada, iki farklı karsinojen farklı tür farelere enjekte edilmiş ve fare ırkları arasında Balb/C farelerinin DMH'a karşı cevapta en duyarlı ırk olduğu belirtilmiştir (118). Biz de çalışmamızda DMH ile indüklenen kolon tümörlerinde endostatinin antitümör etkisini araştırmak için 8 haftalık erkek Balb/C fareleri kullandık.

DMH uygulamalarında kolon kanseri indüklemeye farklı deney hayvanları kullanıldığı gibi farklı veriliş yolları da tercih edilmiş ve en çok kullanılan yöntem s.c yol olmuştur. Çünkü DMH'ın oral yoldan ratlara verilmesi sonucu düşük tümör insidansı görülürken (%30), kas içi (i.m) uygulamalarda %80 oranında, s.c uygulamalarda ise %100 oranında tümör geliştiği gözlenmiştir (72). Ratlarda ve farelerde yapılan çalışmalarda, dialkalihidrazin grubu maddeler s.c yoldan verildiğinde gastrointestinal sistem tümör oluşumunun önemli oranda arttığı ifade edilmiştir (76). İntrarektal uygulamalarda ise daha geç bir sürede kolonda hiperplazi ve preneoplastik lezyonlar tespit edilmiştir (72). Ayrıca DMH, oral yoldan verildiği zaman, kolonda tümör gelişimine ek olarak karaciğerde tümör sayısının arttığı gözlenmiştir (76). Biz de çalışmamızda DMH'ı s.c yoldan enjekte ettik.

Yapılan çalışmalarda, kolon kanseri gelişimine ek olarak DMH'ın, hayvanlar üzerinde bazı toksik etkiler gösterdiği de ifade edilmiştir. DMH'ın 20mg/kg olarak verildiği bir çalışmada, ilk 16 hafta boyunca, hayvanların %53'ünün öldüğü rapor edilirken (109) aynı doz verilen başka bir çalışmada, DMH enjeksiyonundan sonra farklı zamanlarda 210 farenin 13 tanesinin öldüğü belirtilmiştir (80) Ayrıca DMH dozuna bağlı anal kist sıklığının arttığı, hayvanların tüylerinin genel görüntüsünün bozulduğu, rektal prolapsus ve kanlı gaita gözlendiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (78,80). Bazı hayvanlarda nefroblastoma ve karaciğerde hemanjiöndotelioma geliştiği de belirtilmiştir (76,119). Tümör oluşumuna bağlı olarak ve DMH'ın tüm bu toksik etkilerinden dolayı DMH enjekte edilen hayvanlarda kilo kaybı da gözlenmektedir. Li ve arkadaşları ratlarda yaptıkları çalışmada, DMH grubundaki hayvanların ağırlığının önemli oranda azaldığını rapor etmişlerdir (73). Bizim çalışmamızda da DMH'ın toksik etkisine bağlı olarak ilk DMH dozundan sonra 20 hayvanın 6 tanesi (%30) öldü. Geriye

kalan hayvanlarda ise anal ve sırt bölgelerindeki tüylerde döküntü, tüylerin genel görüntüsünde bozukluk ve kanlı gaita gözlemlendi. Ayrıca bir farenin boyun kısmında hematom gözlemlendi. Çalışmamızda yukarıdaki literatür bilgilerine benzer şekilde, DMH verilen hayvanların ortalama ağırlıklarında da anlamlı bir azalma görüldü. Fakat kontrol grubuna göre DMH alan hayvanların ağırlığında önemli bir değişiklik olmadığını ifade eden çalışmalar da bulunmaktadır (76,80,119). Tüm bunlara ek olarak çalışmamızda, DMH grubundan bir farede, distal kolonda gelişen invaziv karsinom içinde heterotopik ossifikasyon alanı belirlendi. Heterotopik ossifikasyon, normalde kemikleşmenin gelişmediği dokularda oluşan patolojik yeni kemik dokusu olarak tanımlanmaktadır (120). Kolon tümörlerinde yapılan bir çalışmada da, 50 yaşındaki bir bayan hastada, kolon ascendensde gelişen adenokarsinom içinde heterotopik ossifikasyon alanları tespit edilmiştir. Gastrointestinal tümörlerde bu duruma seyrek rastlanır ve bunun kesin mekanizması bilinmemektedir (121,122).

DMH uygulamalarında kolon kanseri indüklemeye verilen doz da oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda doz ve uygulama süresi çeşitlilik göstermekle birlikte tek doz uygulamalarından ziyade çoklu doz uygulamaları tercih edilmiştir. 6,8-20 mg/kg arasında tek doz DMH enjekte edilen ve DMH enjeksiyonundan sonra değişik sürelerde (11 hafta-2 yıl) bekletilen hayvanlarda, kolonda neoplastik lezyonların gelişmediği ifade edilmiştir (78,119). DMH ile kanser oluşumunda latent periyod (bekleme süresi) yaklaşık olarak 6 aydır (67). Winneker ve arkadaşları ilaç dozunu haftalık 7 mg/kg düşürülmesi ile latent periyodun 1 yıla kadar uzadığını saptamışlardır (123).

Çoklu doz uygulamalarında ise, 5-6 haftalık ve 24-30 gr arası ağırlığındaki farelere, 5-20 hafta aralığında haftada bir kez değişik dozlarda (6,8-20 mg/kg) DMH verilmiş ve son DMH enjeksiyonundan sonra değişik sürelerde (10 hafta-2 yıl) bekletilen deney hayvanlarında farklı oranlarda (%26-%100) kolon tümörlerinin geliştiği, bunların çoğunlukla (%86-98) distal kolona yerleştiği tespit edilmiştir (76-80, 124-127). Başka bir çalışmada ise dişi ve erkek fareler arasında kanser oluşması açısından farklılıklar gözlenmediği ifade edilmiştir (98).

Thulusen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, kolon kanserini indüklemek için 20mg/kg DMH'ı, 12 hafta boyunca, 8 haftalık dişi Balb/C türü farelere haftada bir kez olmak üzere s.c yoldan enjekte etmişler ve son DMH dozundan 12 hafta sonra farelerde %100 kolon kanseri geliştiğini bildirmişlerdir. Gelişen tümör lezyonlarının iyi huylu tübüler

adenom şeklinde olduğu ve histolojik ve klinik açıdan insanlarda görülenlere benzediğini ifade etmişlerdir. Hayvanların %100'ünde küçük tümör, %96'sında orta büyüklükte tümör ve %76'sında ise büyük tümör gözlenmiş ve lezyonların genelde distal kolonda geliştiğini belirtmişlerdir (80). Biz daha önce yaptığımız bir çalışmada, kolon kanserini indüklemek için Balb/C türü 8 haftalık erkek farelere, 12 hafta boyunca haftada bir kez olmak üzere s.c yoldan 20mg/kg DMH enjekte ettik ve son DMH dozundan 18 hafta sonra farelerde %100 kolon kanseri geliştiğini belirledik (101). Sunulan bu çalışmada da aynı şekilde daha önce kolon kanserini indüklemeye uyguladığımız protokol uygulandı ve benzer sonuçlar elde edildi. Çalışmamızda son DMH dozundan 18 hafta sonra hayvanlarda %100 hafif displazi, şiddetli displazi ve karsinom geliştiği ve bu lezyonların %74'ünün distal kolona yerleştiği tespit edildi. Thulusen ve arkadaşları son DMH dozundan 12 hafta sonra, biz ise 18 hafta sonra kolonda %100 tümör oluştuğunu gördük. Hayvan türü, ilacın verilme yolu, DMH dozu ve verilme süresi ile ilgili uygulamalar literatür ile benzerlik göstermektedir.

Jackson ve arkadaşları ise farelere 6,8mg/kg DMH dozunu 1, 5, 10 ve 20 hafta süresince uyguladıktan sonra, fareleri iki yıl boyunca takip etmişler ve toplam 34, 68 ve 136 mg/kg DMH alan hayvanlarda sırasıyla %26, %76 ve %87 oranında kolon tümörlerinin geliştiğini ve tümörlerin 79'unun distal kolonda görüldüğünü rapor etmişlerdir. Onlar ayrıca hayvanların %85'inde birden fazla tümör geliştiğini belirtmişlerdir (78). Biz çalışmamızda toplam 240mg/kg DMH' 12 hafta boyunca enjekte ettik ve %100 oranında kolon tümörü geliştiğini gördük. Ayrıca en az 2 en fazla 8 tümör olmak üzere hayvanların hepsinde birden fazla tümör oluştuğunu belirledik.

Balb/C türü farelerde yapılan başka bir çalışmada, 4 haftalık dişi ve erkek farelere, 14 hafta boyunca ilk 6 hafta 15mg/kg, son 8 hafta 20mg/kg DMH enjekte edilmiş ve hayvanların %46'sında tümör geliştiği gözlenmiştir. Hayvan başına düşen tümör sayısı 2.76 olarak belirlenmiştir (77). Bizim çalışmamızda ise DMH grubunda hayvanların hepsinde tümör gelişti ve ortalama tümör sayısı 4,5 nodül/denek olarak bulundu. Çalışmamızda karsinom oranı daha yüksek bulundu. Wu ve arkadaşlarının (77) çalışmasında ilk 6 hafta boyunca düşük doz DMH kullanılması, tümör sayısının daha az olmasına neden olabilir.

DMH ile indüklenen kolon kanseri gelişim aşamalarını araştırmak için farelerde yapılan bir çalışmada, haftada bir kez uygulanan 20mg/kg DMH enjeksiyonunun 12. haftasında kolon mukoza ve submukozasında inflamatuvar ve dejeneratif değişiklikler gözlenmiştir. Bunlar ödem, kriptlerin dilatasyonu, lökosit infiltrasyonu gibi dejeneratif değişikliklerdir. Daha sonra zamanla kolonda proliferasyon, lokal hiperplastik değişiklikler ve atipilerin oluştuğu belirtilmiş ve bu aşama hiperplazi olarak isimlendirilmiştir. 20. haftada ise %90 oranında hafif ve şiddetli displazi ve intramukozal karsinom lezyonları tespit edilmiştir. Barthold ve arkadaşları hiperplazinin kolon kanserini öncesinde görülen bir lezyon olduğunu ve kanser oluşma zincirindeki aşamaların, displazi, hiperplazi, intramukozal karsinom, invaziv karsinom şeklinde devam ettiğini ifade etmişlerdir (98). Daha önce yaptığımız çalışmada ise, son 20 mg/kg DMH dozundan 12 hafta sonra, hayvanların %100'ünde hafif displazi %85'inde şiddetli displazi ve %71'inde karsinom gözlenirken, 18 hafta sonra %100 karsinom, hafif ve şiddetli displazi geliştiği gözlemlendi. 12 haftalık dönem şiddetli displazinin karsinoma geçiş evresi olarak belirlendi. Sunulan çalışmamızda da son DMH enjeksiyonundan 18 hafta sonra %100 kolon kanseri gelişti. Kolon kanseri gelişiminde ki bu aşamalar endostatin uygulama zamanı açısından önemliydi. Bu çalışmaların ışığında çalışmamızda son DMH enjeksiyonundan 12 hafta sonra hayvanlara endostatin enjekte edildi ve kontrol grubunda %100 tümör görüldüğü dönemde (18 haftalık dönem) hayvanlar sakrifiye edildi.

DMH ile kolon kanseri indüklenmesi sonucu gelişen lezyonlar, histopatolojik olarak değerlendirildiğinde ise, 10 hafta boyunca, 40mg/kg DMH'in ratlara enjekte edildiği bir çalışmada, 40 haftalık süreçte displazi hariç tüm lezyonlarda, zamanla sayı olarak artış ve benign lezyonların zaman içinde malign lezyonlara dönüştüğü gözlenmiştir. Çalışma sonucunda 10 adet ratta, 30. haftada 18 hafif displazi, 7 şiddetli displazi, 28 karsinom (4 intramukozal, 24 invaziv karsinom) olmak üzere toplam 53 lezyon tespit edilmiştir. 35. haftada ise hafif displazi sayısının azaldığı, şiddetli displazinin ve intramukozal karsinomun arttığı ve tümör gelişiminde bir adenom - karsinom zinciri olduğu ifade edilmiştir (99). Bizim daha önce yaptığımız çalışmada, 20 mg/kg DMH verilen 7 hayvanda, 24. haftada 7 hafif displazi, 17 şiddetli displazi ve 12 karsinom gözlemlendi. 30. haftada, 16 hafif displazi, 13 şiddetli displazi ve 30 karsinom olmak üzere toplam 59 lezyon tespit edilirken, 36. haftada 15 hafif displazi, 29 şiddetli displazi ve 23 karsinom olmak üzere toplam 67 lezyon belirlendi (101). Sunulan çalışmada ise, aynı

dozda DMH verilen 7 adet farede, 30. haftada 28 hafif displazi, 17 şiddetli displazi, 32 karsinom (17 intramukozal, 15 invaziv karsinom) olmak üzere toplam 77 lezyon gelişti. Bu çalışmalarda dikkat çeken 30. haftada şiddetli displazinin diğer lezyonlara göre daha az olmasıdır. Çünkü karsinom sayısı arttıkça şiddetli displazi sayısı azalmakta ve lezyonlar karsinoma dönüşmektedir. 30. hafta sonrasında ise hafif displazi hariç diğer lezyonlarda artış olması dikkat çekmektedir. Bu çalışmalarda farklı doz ve hayvan kullanılmasına rağmen elde edilen toplam lezyon sayısı birbirine yakınlık göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda lezyonların kolonda yerleşimine bakıldığında ise intramukozal lezyonların daha çok orta kolonda, şiddetli displazi ve invaziv karsinomların ise daha çok distal kolonda görüldüğü tespit edilmiştir. Proksimal kolonda ise sadece hafif displazi gözlenmiştir. Distal kolonda gelişen lezyonların prognozu daha iyi iken kolonun diğer bölgelerde gelişen lezyonların prognozunun daha kötü olduğu ifade edilmiştir (98,119).

Çalışmamızda da, proksimal kolonda sadece hafif displazinin geliştiği gözlendi. Lezyonların daha çok distal kolona yerleştiği ve hafif displazinin %61'inin, şiddetli displazinin % 71'inin, intramukozal karsinomun % 82'sinin ve invaziv karsinomun ise % 93'ünün distal kolonda geliştiği gözlendi. Ayrıca lezyonların karsinoma dönüştükçe distal kolonda görülme sıklığının arttığı, proksimal kolonda ise daha çok displastik lezyonların görüldüğü tespit edildi. Lezyonların kolonda dağılımı literatür ile benzerlik göstermekte fakat çalışmamızda orta kolonda intramukozal karsinom sayısı daha az oranda bulundu.

Tümörlerin neden daha çok distal kolonda görüldüğüne yönelik çalışmalarda, kök hücrelerinin lokalizasyonunun ve kolonosit hücre göçünün, proksimal ve distal kolonda farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Thurnherr ve arkadaşlarının (76) yaptıkları çalışmaya göre, distal kolon, kolonun diğer bölümlerine göre en geniş kök hücre popülasyonuna sahiptir ve distal kolonda kök hücrelerinin kanser gelişmesinde ki etkisi, onların direk maling hücrelere dönüşmesidir. Dolayısıyla bu bölge tümörlerin en büyük yerleşim yeridir (76,98,116).

Başka bir çalışmada ise DMH'in indüklediği lezyonların kolonda dağılımının, dışkı akışı ile bir bağlantısı olabileceği belirtilmiştir. Yapılan çalışmada transvers kolona yapılan kolostomi ameliyatı sonrasında kolostominin proksimal tarafında tümör sayısının arttığı fakat distal kolonda da tümör olduğu gözlenmiştir (76).

Tüm bunlara ek olarak lenf nodüllerinin daha çok distal kolonda gözlendiği ve tümör dağılımında öncü bir faktör olabileceği belirtilmiştir. Carter ve arkadaşları lenf nodülleri ile tümörler arasında önemli bir korelasyonun olduğunu ifade etmişlerdir. Kanser hastalarından alınan örneklerde kolonik mukozada bulunan mikroskopik adenomların %56'sında, lenf folliküllerinin tümörlerin altında yerleşim gösterdiği gözlenmiştir (127). Bizim çalışmamızda lenf nodülleri sayılmadı fakat yerleşim olarak özellikle distal kolonda ve tümörlere yakın veya onların altında yerleşim gösterdiği gözlendi.

Yapılan çalışmalarda DMH ile indüklenen kolon kanserlerini inhibe etmek için farklı antianjiogenik ajanlar kullanılmıştır. Bu ajanlardan endostatin, farelerde ve insanlarda yapılan çalışmalarda, primer ve metastatik tümör büyümesinde güçlü ve doza bağlı olarak özellikle endotel hücrelerinde inhibe edici özellik göstermiştir (48). Ayrıca endostatin farelerde en az toksik etkiye sahip ilaç olarak tespit edilmiş ve aralıksız olarak 3,5 yıldan fazla her gün uygulanan insanlarda da hiçbir ilaç direnci ve toksik durum gözlenmemiştir (49). Endostatin enjekte edilen hayvanlarda, kilo kaybı, beslenme bozukluğu ve davranış değişikliği gibi belirtiler de gözlenmemiştir (61,128). Bizim çalışmamızda ise endostatin grubunda, DMH grubuna benzer şekilde, hayvanların anal ve sırt bölgelerindeki tüylerde döküntü, tüylerin genel görüntüsünde bozukluk, nadir olarak kanlı dışkı gibi değişiklikler gözlendi. Bu durum endostatin grubundaki hayvanlarda da tümör gelişmesiyle ilişkilendirildi.

Literatürde, endostatine bağlı inhibisyon farklılıklarının, ilacın formülüne, ilacın dozuna ve uygulanma süresine, tümör tipine ve tümör oluşturma yöntemine bağlı olabileceği belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda ilaç formülü olarak genelde *escherichia coli* ve *pichia pastoris* sistem ile üretilen endostatin formlarından bahsedilmiştir. *Pichia pastoris* sistem ile üretilen endostatinin in vitro ve in vivo çalışmalarda etkili olduğu, diğer sistem ile üretilen endostatin proteinlerinin ise daha çabuk yıkıldığı ifade edilmiştir (49). Dolayısıyla biz çalışmamızda *Pichia pastoris*den üretilen insan rekombinant endostatin formunu kullandık.

Yapılan çalışmalarda prostat tümörü, glioblastoma, akciğer adenokarsinoma, folliküler thyroid karsinoma, non-Hodgkin Lenfoma, nöroblastoma gibi tümörleri inhibe etmek için, endostatin, 0.3mg/kg/gün - 20 mg/kg/gün doz aralığında, ve 10-20 günlük sürede, s.c yoldan enjekte edilmiş ve tümör kan akışının ve damarlanmanın azaldığı, tümör büyümesinin %47-%84 oranında yavaşladığı fakat tamamen ortadan kalkmadığı gözlenmiştir (59,61,128-130). Ayrıca endostatin, 10-100 mg/kg doz aralığında uygulandığında, %47'den %91'e kadar tümör inhibisyonu gözlenmiş ve bütün çalışmalarda endostatinin toksik olmadığı ve yara iyileşmesini geciktirmediği vurgulanmıştır (49). Q'Reilly ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada rat akciğer primer tümör hücrelerini deri altına enjekte etmişler ve tümör hacmi 200cm³ olduğunda, 20mg/kg endostatinini 15 gün boyunca enjekte etmişler ve tümör büyümesinin %99 oranında inhibe olduğunu rapor etmişlerdir (48).

Literatürde DMH ile indüklenen tümörlerde endostatinin etkinliğini araştıran çalışmaya çok az rastlanmaktadır. Bu çalışmalardan birini Li ve arkadaşları yapmıştır. Onlar DMH ile indüklenen kolon tümörlerini inhibe etmek için, 1 ml'lik 1x10⁸ endostatin proteinini 12 hafta boyunca, günde 1 kez, gavaj yoluyla vermişler ve her iki grupta kolon tümör insidansında bir değişiklik olmadığını, gruplarda 10'ar adet tümör geliştiğini ve karsinomların kolonda dağılımının çeşitlilik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca hayvanların ortalama vücut ağırlığının hem DMH grubunda hem de endostatin grubunda önemli şekilde azaldığını belirtmişlerdir. Oysaki aynı çalışmada endostatinin verilme süresi 26 hafta daha uzatıldığında, endostatin grubunda toplam tümör sayısı 25, DMH grubunda ise 40 olarak tespit edilmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (73). Çalışmamızda ise endostatin 6 hafta boyunca, günde 7 µg (mikrogram) enjekte edildi ve düşük doz endostatinin DMH ile indüklenen kolon kanserinde antitümör etkisine bakıldı. Endostatin grubunda 29, DMH grubunda ise 32 tümör geliştiği tespit edildi ve karsinom sayısı ile ilgili gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı. Çalışma sonucunda 7 µg endostatinin, terapötik etki için yeterli olmadığı düşünüldü. Çalışmamızda hem DMH, hem de endostatin grubunda ortalama vücut ağırlığının zamanla azaldığı tespit edildi. Bu veriler Li ve arkadaşlarının kısa dönem uyguladığı terapi ile paralellik göstermektedir. Onlar endostatinin uzun süre ve yüksek dozda verilmesi gerektiğini ifade etmişler ve uzun dönem verilen endostatinin antitümör etki gösterdiğini belirtmişlerdir (73). Ayrıca başka çalışmalarda da tümör metastazını ve anjiogenezisi inhibe etmek ve tümörlerin mikroskobik

lezyonlara gerilemesini sağlamak için uzun dönem ve yüksek doz endostatin tedavisinin uygulanmasının gerekli olduğunu vurgulanmıştır (73,59,131).

Endostatinin optimal terapötik dozu bilinmediğinden literatürde farklı endostatin dozları ile yapılan çalışmalara sık rastlanmaktadır. Bunlardan kolon kanserine yönelik bir çalışmada, insan kolon kanseri hücreleri implante edilen fareye, endostatinin 5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg dozları 6 hafta boyunca s.c olarak enjekte edilmiş ve tümör inhibisyon oranları bu sıraya göre %67.9, %84, %90.1 olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda damarlanmanın önemli oranda azaldığı ve peritoneal metastaz ve karaciğer metastazında da doza bağlı azalma görülmüştür. Bu çalışmada endostatin tedavisinde dozun ve verilme süresinin önemi gündeme getirilmiş ve yüksek dozun daha etkili olduğu tespit edilmiştir (60). Bizim çalışmamızda günde 7 µg (yaklaşık 0,3mg/kg) verilen endostatin kolon tümörünü inhibe etmede yeterli olmadı. Toplam lezyon sayısı DMH grubunda 77, endostatin grubunda ise 57 olarak tespit edildi ve %25 oranında tümör inhibisyonu gözlemlendi. Fakat bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bunun sebepleri ise tedavi için kullandığımız endostatinin çok pahalı olması nedeniyle yüksek dozlarının hayvanlara verilememesi, tedavi süresinin kısa tutulması ve hayvan sayısının düşük olmasına bağlayabiliriz. Faz 1 çalışmalarında, endostatinin etkili olabilmesi için plazma seviyesinin 600 ile 700 ng/mL.min olması gerektiği ifade edilmiştir. Bu plazma seviyesine ulaşabilmek için farelerde 50mg/kg, faz çalışmalarında ise 300 - 600mg/m² arasında uygulanan endostatin dozunun terapötik etki için yeterli olduğu belirtilmiştir (52).

Bizim çalışmamızla yaklaşık aynı doz verilen başka bir çalışmada ise tümör oluşturma yöntemlerindeki farklılıklar gündeme getirilmiş ve buna bağlı endostatinin antitümör etkisinde farklı sonuçlar elde edilebileceği ifade edilmiştir. Yapılan çalışmada, gliosarkoma hücreleri, intrakranial ve subkutan olarak ratlara enjekte edilmiş ve hayvanlara 10 gün boyunca her gün 0,3mg/kg endostatin s.c yoldan verilmiştir. Araştırma sonucunda, rekombinant fare endostatinin, s.c tümörün büyümesini, damarlanmasını, kan akışını inhibe ettiği ve apoptozisi de önemli oranda azalttığı gözlemlenmiştir. İntrakranial tümörlerde ise aynı dozda endostatinin aynı oranda etkili olmadığı tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak kafatasında kan akımının hızlı olması ve dolayısıyla bu tümörlerde de kan akımının hızlı olması, endostatin tümör içinde yeterli konsantrasyona ulaşmadan önce tümörün büyümesi ve hayvanların ölmesi neden olarak

gösterilmiştir. Zaten s.c tümörlerde de endostatinin etkisi tedavinin başlamasından sonraki 10. günde ortaya çıkmıştır. Bu bilgiler endostatinin tümör büyümesini azaltmadaki etkisinin başlayabilmesi için önce tümör içinde yeterli konsantrasyona ulaşması gerektiği göstermektedir (129). Bu çalışma ayrıca tümör hücrelerinin kendi dokusu içinde büyümesi ile s.c olarak deri altına enjekte edilmesi ve deri altında büyümesi arasında ki farklılıkları da ortaya koymaktadır. Tümör anjiogenik fenotipleri çevre hücreler tarafından salınan sitokinler ile ayarlanabilir. Bu durumda tümörlerin anjiogenik fenotipleri farklı olabilir. İnsan böbrek kanser hücreleri kendi dokusunda yani böbrekte büyüdüğü zaman b-FGF anjiogenik büyüme faktörünün daha fazla salındığı oysaki aynı hücreler s.c olarak deri altına yerleştirildiğinde böyle olmadığı tespit edilmiştir (59,129). Bu araştırma, aynı doz verilmesine rağmen bizim araştırmamızda endostatinin neden etki etmediğine ışık tutmaktadır. Çünkü bizim çalışmamızda kendi dokusu içinde büyüyen kolon tümörleri kullanıldı.

Endostatinin terapötik etkinliği için dozu kadar verilme yolu ve veriliş sıklığı da önemlidir. Çünkü yapılan faz çalışmalarında endostatinin yarılanma ömrü 10.7 saat olarak bulunmuş ve vücut yüzey alanı ile endostatin kliransı (endostatinin plazmadan temizlenmesi) arasında bir ilişki gösterilmemiştir. Dolayısıyla bu yarılanma ömrü fareler için de kabul edilmiştir (112,113). Yapılan çalışmalarda endostatinin %50 sinin yaklaşık ilk 5 dakikalık bir süreçte dolaşımdan hızlı bir şekilde temizlendiği gösterilmiştir. Sonuç olarak endostatinin yavaş çözünen formu etkinliliğini daha fazla artıracaktır (132). Böylece endostatinin 12 saat arayla uygulanması (bolus) ve yavaş emilebileceği bir yoldan verilmesi gerektiği gündeme gelmiştir. Yavaş emilimi sağlamak için bizim çalışmamızda olduğu gibi, yapılan diğer çalışmalarda da endostatin çoğunlukla s.c yoldan enjekte edilmiştir (59,61,104,128). Oysaki bazı çalışmalarda endostatinin infüzyon şeklinde sürekli verilmesinin daha etkili olduğu gösterilmiştir. Günde iki kez uygulanan enjeksiyonlar ile kıyaslandığında, sürekli intravenöz olarak uygulanan endostatinin, 5 kat daha düşük dozlarda bile yüksek etki gösterdiği tespit edilmiştir (133). Yapılan başka bir çalışmada, nöroblastoma hücreleri s.c olarak enjekte edilen farelere, 10mg/kg/gün endostatin, s.c olarak ve s.c infüzyon pompasıyla ile 10 gün boyunca verilmiş ilk grupta maksimum tümör inhibisyonu %47 iken ikinci grupta ise %61 olarak tespit edilmiştir. Endostatin, s.c infüzyon pompasıyla sürekli verildiğinde tümör ağırlığında, tümör büyümesinin gerilemesinde ve damarlanma sayısında göze çarpıcı bir şekilde azalma gözlenmiştir (62,130). Dolayısıyla düşük

dozda ve günde bir defa s.c yoldan enjekte edilen endostatinin, bizim çalışmamızda antitümör etki göstermemesinin bir başka nedeni infüzyon şeklinde verilmemesi olabilir.

Endostatin uygulamasına yönelik önemli verilerden bir tanesi de uygulama zamanıdır. Endostatin endotel hücre çoğalmasını, göçünü, adezyonunu ve büyüme faktörlerinden VEGF ve bFGF’i inhibe eden antiangiogenik bir ajandır. Dolayısıyla tümörün primer aşamasında verilmesi yani anjiogenezin başlangıç zamanında verilmesi onun terapötik etkinliğini artırmak açısından oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalar, tümörün erken fazı boyunca uygulanan endostatin tedavisinin tümörü tamamen iyileştirmediği ancak tümör sayısını önemli oranda azalttığını göstermektedir (104,113,134,135). Endostatinin verildiği bu dönem prekanseröz aşama olması açısından önemlidir. Anjiogenezis, yeni mikrodamarların meydana gelmesi demektir. Bu durum kapiller damarlardaki endotel hücrelerinin proliferasyonuna bağlıdır. Yara iyileşmesi sırasında olan anjiogenezis bir hafta veya daha fazla sürerken, patolojik anjiogenezis aylar veya yıllar boyunca devam edebilir. Buradan yola çıkarak, antianjiogenezis tedavisinde amaç proliferasyon halindeki küçük damarların büyümesini önleyerek ilk başlangıç hallerinde kalmalarını sağlamaktır (39,135). Tümör ilk fark edildiği zaman endostatin uygulandığında, tedavi edilen ratlarda multiple primer tümörlerin oluşmasının engellendiği görülmüştür. Ayrıca ilk enjeksiyonda yüksek doz verilmesi endostatinin yeterli miktardaki dozunun tümör yatağında toplanmasına neden olarak daha etkili olmasına neden olmaktadır (134). Hatta başka bir çalışmada kemirgen kolorektal kanser hücrelerinden elde edilen karaciğer metastaz hücreleri dalağa enjekte edilmeden 2 saat önce uygulanan endostatin tedavisiyle önemli oranda azaltılmıştır (135). Bizim çalışmamızda da endostatin tümörün prekanseröz aşamasında verildi fakat dozun yetersiz olması ya da başka nedenlerden dolayı tümör sayısında azalma gözlenmedi.

Endostatin ile yapılan klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçlar paralellik göstermemekte ve özellikle faz çalışmalarında endostatinin antitümör etki göstermediği ifade edilmiştir (102,103,136). Hayvan çalışmalarında olduğu gibi faz çalışmalarında da en çok optimal dozu belirlemede zorluklar yaşanmıştır. Endostatinin az etkili olmasının nedeni olarak ise prelinik çalışmalarda genelde tümörlerin deney hayvanlarına enjekte edildiği ve daha sonra antianjiogenik etkiye bakıldığı oysaki insanlarda tümörlerin belki yıllardır var

olduğu ve antianjiogenik terapinin etkili olamayacağı kadar damarlanmanın zaten gelişmiş olabileceği vurgulanmıştır (113,137,138).

Sonuç olarak bir endojen anjiogenezis inhibitörü olan endostatinin vücutta nasıl çalıştığı bilinmediği sürece klinik çalışmaları planlamak zor olacaktır. Bununla birlikte endostatinin etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen uygun doz, zaman ve sürede verilmesi ve buna yönelik çalışmaların yapılması onun terapötik etkinliğinin ortaya konulması açısından oldukça önemli olabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Hacıoğulları M. İnterleukın-12'nin embriyonik vitellüs kesesi damarlanması üzerine etkileri. Yüksek Lisan tezi. Anatomi Anabilim Dalı Erciyes Üniversitesi, Kayseri 2005
2. Ülger H. The Growth Promoting Effects Of Bfgf, Vegf And Pd-Ecgr On Embryonic Development And Yolk Sac Vascularisation. PhD Thesis, department of Human Anatomy and Cell Biology Universty of Nottingham, England 1997
3. Drake C.J. Embryonic and adult vasculogenesis. Birth defects research. 2003;69:73-82
4. Beck L, D'amore P.A. Vascular Development: Cellular and Molecular Regulation. The Faseb journal.1997; 11:365-373
5. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis.Cancer Treat Res. 2004;117:3-32.
6. Sadler T.W. Langman's Medikal Embriyoloji. Altıncı Baskı,1993:69-70
7. Conti C. Vascular Endothelial growth factor: regulation in the Mouse skin carcinogenesis model and use in antiangiogenesis cancer therapy. The oncologist.2002;7(3):4-11
8. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 1996;86:353-364
9. Rosen L. Antiangiogenic Strategies and Agents in Clinical Trials. The Oncologist 2000;5:20-27

10. Wickström S.A, Alitalo K, Keski J. An Endostatin-derived Peptide Interacts with Integrins and regulates Actin Cytoskeleton and Migration of Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2004;279:20178-20185
11. Kılıç T, Yıldırım Ö, Ahın S, Pamir N. Glial Tümörlerin Anjiogenezi. *Angiogenesis of Glial Tumors Türk Nöroşirürji Dergisi*, 2005, 15(1):1-9
12. Hwang JJ. Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Activity by Small Molecules
13. Woodhouse E.C, Rodrigo F. Chuaqui, Lance A. Liotta. General Mechanisms of Metastasis Cancer. *Supplement* 1997; 80:(8) 1529-1537
14. Bloemendal H.J, Logtenberg T, Voest E.E. New Strategies in Anti-vascular Cancer Therapy. *European Journal of Clinical Investigation* 1999;29:802-809
15. Zatterstrom U.K, Felbor U, Fukai N, Olsen B.R. Collagen XVIII/Endostatin Structure And Functional Role İn Angiogenesis. *Cell Structure And Function* 2000;25: 97–101
16. Deveci D. Anjiyojenezis, arteriyojenezis ve vaskülojenezis terimlerinin anlamları ve hipoksik ve/veya iskemik koşullarda anjiyojenezis *Genel Tıp Derg* 2003;13(3):141-151
17. Özçelik T, Ali R, Özkalemkaş F vs. Akut Lösemili Hastalarda Anjiogenezin Değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*.2003;29(2):1-6
18. Ünüvar Ö. Y. Prostat Karsinomlarında Mikrodamar Dansitesi Ve Proliferasyon Hızının Gleason Skor Ve Perinöralinvazyon İle Karşılaştırılması. *Uzmanlık Tezi. İstanbul – 2005*
19. Haroon Z.A, Peters K.G, Greenberg C.S, et all. Angiogenesis and Oxygen transport in solid tumors. *Antiangipgenic agents in cancer therapy*. 1999;3-21
20. Hinsbergh VW, Koolwijk P. Endothelial Sprouting And Angiogenesis: Matrix Metalloproteinases In The Lead. *Cardiovasc Res*. 2007: 12
21. Konukoğlu D, Turhan M.S. Anjiyogenezin Temel Moleküler Mekanizmaları ve Tümör Anjiyogenezi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 2005; 36: 42-48
22. Pepper M.S. Manipulating Angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 1997;17:605-619
23. Kılıç T, Yıldırım Ö, Pamir N. Beyin Tümörlerinde Anti-anjiogenik Yaklaşımlar. *Türk Türk nöroşirürji Dergisi*, 2005, Cilt: 15, Sayı: 1, 10-16
24. Şımızı K, Oku N. Cancar Antiangiogenik terapy. *Biol. Pharm. Bull* 2004;27(5):599-605

25. Güllü İ. Anjiyenez ve antianjiyolitik tedaviler. XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Non-Hodgkin Lenfoma. Mayıs 2004.
26. Hagedorn M, Bikfalvi A. target molecules for antiangiogenic therapy: from basic research to clinical trials . Crit Rev Oncol Hematol 2000;34(2):89-110
27. Mancuso A, Stenberg C. Colorektal cancer and Antiangiogenic therapy: W^hat can be expected in clinical practice? Critical Reviews in Oncology/hematology 2005;55:67-81
28. Friesel R.E. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction The FASEB Journal 1995; (9):919-925
29. Talk KL, Harris A.L. Review. Current Status of Antiangiogenic Factors. British Journal of Haematology 2000;109: 477-489
30. Eichhorn M.E, Strieth S, Dellian M. Anti-vascular Tumor Therapy: Recent Advances, Pitfalls and Clinical perspectives. Drug Resistance Updates 2004;7:125-138
31. Gulu I, Kurdoğlu M, Akalin I. The relation of gelatinase (MMP-2 and-9) expression with distant site metastasis and tumour aggressiveness in colorectal cancer. Br J Cancer. 2000 Jan;82(1):249.
32. Doğan K.A.Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserli Olgularda Radyoterapinin Serum Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Ve Periferik Kan Trombosit Düzeyleri Üzerine Etkisi. Uzmanlık Tezi. 2006
33. Carter SK. Clinical strategy for the development of angiogenesis inhibitors. The oncologist 2000;5(1):51-54
34. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 1971;285:1182-1186.
35. Kerbel, RS. Tumor angiogenesis: past, present and near future. Carcinogenesis. 2000; 21 (3): 505-15
36. Özuysal S. Tumoröral Anjiyenez. Türk Patoloji Dergisi 2001;17: 90-93
37. Saaristo A, Terhi Karpanen and Kari Alitalo. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis Oncogene 2000; 19: 6122 – 6129
38. Furuya M, Nishiyama M, Kasuya Y, et al. Pathophysiology of tumor neovascularization. Vasc healthrisk mang. 2005;1 (14):90-277
39. Ataergin S, Özet A, Arpacı F. Kanser Tedavisinde Anjiyenez İnhibitörlerinin Yeri. T. Klin Tıp Bilimleri 1999, 19:100-105

40. Folkman, J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339:58- 61.
41. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Lu C, Kitaoka A, Matsuyama K, Muraoka R. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 1997 Mar 15;57(6):1043-6.
42. Bicknell R, Harris AL. Mechanisms and therapeutic implications of angiogenesis. *Curr Opin Oncol.* 1996; Jan;8(1):60-5.
43. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* 2001 Feb 1;61(3):253-70.
44. Çiftlikçi A. Kolorektal Kanserlerde Tümör Belirleyicilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İnönü Üniversitesi. 2002
45. Cao Y. Antiangiogenic cancer therapy. *Semin cancer Biol.* 2004;14(2):139-145
46. Abdullahi A, Hlatky L, Huber P.E. Endostatin: The logic of Antiangiogenic Therapy. *Drug Resistance Updates* 2005;8:59-74
47. Hohenester E, Sasaki T, Olsen B, et al. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution. *The EMBO journal* 1998;17:1656-1664
48. Q'Reilly MS, Boehm T, Shing Y et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997;88:277-285
49. Folkman J. Antiangiogenesis in Cancer Therapy- Endostatin and Its Mechanisms of Action. 2005; *Experimental cell research.*
50. Halfter W, Dong S, Schurer B, et al. Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *The journal of biological chemistry.* 1998;273 (39):25404-25412
51. Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, et al. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins. *PNAS* 2003;100:4766-4771
52. Dixelius J, Cross M, Matsumoto T, Welsh L. Endostatin action and intracellular signaling: β -Katenin as a potential target? *Cancer letters* 2003;196:1-12
53. MacDonald N.J, Shivers W.Y, Narum D.L. et al. Endostatin Binds Tropomyosin. *The journal of Biological Chemistry* 2001;276:25190-25196
54. Shichiri M, Hirata Y. Antiangiogenesis Signals by Endostatin. *Faseb J* 2001;15:1044-1053

55. Dixelius J, Cross M, Matsumoto T, et al. Endostatin Regulates Endothelial Cell Adhesion and Cytoskeletal Organization. *Cancer Research* 2002;62: 1944-1947
56. Schuch G, Heymach J.V, Nomi M, et al. Endostatin Inhibits the Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Mobilization of Endothelial Progenitor Cells. *Cancer Research* 2003;63:8345-8350
57. Lush R.M, Rudek M.A, Figg W.D. Review of Three New Agents That Target Angiogenesis, Matrix Metalloproteinases, and Cyclin- Dependent Kinases. *Cancer Control Journal* 2005;6:1-9
58. Schmidt A, Addicks K, Bloch W. Opposite effect of endostatin on different endothelial cells. *Cancer biology and therapy*.2004;3 (11):1162-1166
59. Bertolini F, Fusetti L, Mancuso P, et al. Endostatin, an Antiangiogenic Drug, Induces Tumor Stabilization After Chemotherapy or Anti-CD20 Therapy in a NOD/SCID Mouse Model of Human High-Grade non-Hodgkin Lymphoma. *Blood*. 2000;96(1):282-7
60. Zhang GF, Wang YH, Zhang MA, et al.[Inhibition of Growth and Metastases of Human Colon Cancer Xenograft in Nude Mice by Angiogenesis Inhibitor Endostatin]. 2002;21(1):50-3
61. Abdollahi A, Lipson K.E, Sckell A, et al. Combined Therapy with Direct and Indirect Angiogenesis Inhibition Results in Enhanced Antiangiogenic and Antitumor Effects *cancer Research* 2003;63: 8890-8898
62. Kuroiwa M, Takeuchi T, Lee JH, et al. Continuous Versus Intermittent Administration of Human Endostatin in Xenografted Human Neuroblastoma. *J Pediatr Surg*. 2003;38(10):1499-505
63. Schellens J, Ratain MJ. Endostatin:Are the 2 years up yet?. *Journal of clinical oncology* 2002;20(18): 3758-3760
64. Digtyar AV, Pozdnyakova NV, Feldman NB, et al. Endostatin: current concepts about its biological role and mechanisms of action. *Biochemistry (Mosc)*.2007;72(3):46-235
65. Mundhenke C, Thomas J.P, Wilding G vs. Tissue Examination To Monitor Antiangiogenic Therapy: A Phase I Clinical Trial With Endostatin. *Clinical Cancer Research*. 2001;7:3366-3374
66. Zeybek Ü. Deneysel Kanser Modelleri. Kalıtsal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu 24-25 Eylül 2003 s:283-310

67. Ergenoğlu O.M. 1,2 Dimetilhidrazin ile Kolorektal Kanser Oluşturulan Sıçanlarda Selenyum, Vitamin E ve Levamizolün Etkileri. Uzmanlık Tezi. ukurova niversitesi. 1999
68. Lorenz E, Stewart H.L. İntestinal carcinoma and other lesion in mice following oral administration of 1,2,5,6- dibenzathracene and 2-Omethylcholanthrene. J Natl Cancer Inst,1941;1:17-40
69. Walpole A.L, Williams M, Roberts D.C. The carcinogenic action of 4- aminodiphenyl and 3,2 dimethyl 4-aminodiphenly. Br J Ind Med,1952;9:255-263
70. Laquer G.L, Mickelson O, Whiting M.G, et all. Carcinogenic properties of nuts from cycas circinalis indigenous to Guam. J Natl Cancer Inst, 1963;31:919-923
71. Harris C.C, Autrup H, Stoner G.D et all. Metabolism of dimethylnitrosamine and 1,2-Dimethylhydrazine in cultered human bronchi. Cancer Research 1977;37:2309-2311
72. Heijstek O, Kranenburg I.H.M, Borel Rinkes. Mouse Models of Colorectal Cancer and Liver Metastases. Dig Surg 2005;22:16–25
73. Li Wei, Chong-Bi Li. Effect Of Oral Lactococcus Lactis Containing Endostatin On 1,2 Dimethylhydrazine- İnduced Colon Tumor İn Rats. World Gastroenteral 2005; 11(46): 7242-7247
74. Choudhary G, Hansen H, Donkin S,Kirman C. Toxicological Profile Forhydrazines. Eylül1997.S:71-72
75. Broaddus RR, Wargovich MJ, Castro GA. Early stages of 1,2 dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis suppres immune-regulated Ion transport of Mouse distal colon
76. Thurnherr N, Deschner E.E, Stonehill E.H et all. Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1,2-Dimethylhydrazine. Cancer Research 1973;33:940-945
77. Wu R.Y, Chiang H., Shao B.J, et all. Effects of 2.45-GHz Microwave Radiation and Phorbol Ester1 2-0-Tetradecanoylphorbol-I 3-Acetateon Dimethylhydrazine-Induced Colon Cancer in Mice Bioelectromagnetics 1994:15531-15538
78. Jackson PE, Cooper DP, Connor PJ, et al. The Relationship Between 1,2 Dimethylhydrazine Dose and the İnduction of Colon Tumours: Tumor Development in Female SWR Mice Does Not Require a K-ras Mutational Event. Carcinogenesis 1999; 20:509-513

79. Newell, L.E, Heddle, J.A. The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mutation Research*. 2004; 564: 1-7.
80. Thulesen, J, Hartman, B., et al. Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) accelerates the growth of colonic neoplasms in mice. *Gut*. 2004; 53: 1145-1150.
81. Erturk T, Kaygusuz A, Dağtekin T, Dinçel U, Kınacı E, Çalışkan Y.K. Bir Olgu Nedeniyle Kolonda Senkron Tumor Tanısında Güçlükler. *İstanbul Tıp Dergisi* 2004; 4: 45-48
82. Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, et all. Angiogenesis and Antiangiogenic therapy of colon cancer liver metastasis. *Annals of surgical oncology*.2003;10(7):722-733
83. Ay M.E, Terzioğlu O, Terzi C, Ay Ö.İ. Kolorektal Kanserlerde, p21, p27, p57 Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör Geni (cdki) Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, 2006; 5 (1): 20-25
84. Nursal Z, T, Hamaloğlu E.Yaşlılarda Gastrointestinal Sistem Cerrahisi Geriatri. *Turkish Journal Of Geriatrics* 2 (1): 22-25, 1999
85. Robbins S Kumar V, Cotran R.S,. *Temel Patoloji*. Altıncı baskı. Temmuz 2000. S:505-509
86. Green LE. *Biology of the laboratory Mouse*. 2. baskı 1966
87. Hebel R, Stromberg MW. *Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat*. BioMed yayınevi. Wörthsee.1986:231-252
88. Murtazaoglu M. Kolorektal Adenokarsinomlarda Cd95 Ekspresyonu ile Egfr Amplifikasyonunun Prognostik Önemi Ve diğer Prognostik Parametrelerle İlişkisi. 2005. Uzmanlık tezi
89. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. İkinci Baskı, 1 Cilt, Ankara 1937: 316-323
90. Gartner L, Hiatt J. *Color Textbook of Histology*. 2001:406-409
91. Kierszenbaum A. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş*. Ankara 2006: 438-441
92. Junqueira L, Carneiro J. *Temel Histoloji*. 2006:320-322
93. Öztürk M. Preoperatif Alanin – Glutaminden Zenginleştirilmiş Diyet'in Elektif Kolon Anastomozu Üzerine Etkileri (Deneysel Çalışma). UzmanlıkTezi, Dr.Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul 2004
94. Fawcett D. *Histology*. 11 Baskı, 1986:660-663

95. Alemdaroğlu K, Akçal T, Buğra D, Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları. Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği Dergisi, 2003
96. İnce A.T, Övünç O. Kolon Polipleri ve Kromoendoskopi. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Gastroenterohepatoloji Kliniği, İstanbul, Güncel Gastroenteroloji 2003: 255-265
97. Nivatuong S, Balcos EG, Schottler JL, et al. Surgical Management Of Large Villous Tumors Of The Rectum. Dis Colon Rectum 1973; 16:508-14
98. Barthold S.W, Jonas A.M. Morphogenesis of Early 1,2-Dimethylhydrazine-induced Lesions and Latent period reduction of Colon Carcinogenesis in Mice by a Variant of Citrobacter Freundii. Cancer Research 1977;37:4352-4360
99. Rowlatt C, Cruse J, Barton T et all. Comparison of the significance of three histopathological thresholds of malignancy in experimental colorectal tumours. Gut, 1989;30:845-853
100. Ellidokuz E, Kundak I, Akpınar H ,Okan A, Bektaşer C, Füzün M, Tankurt E, Şimşek I, Gönen Ö. Kolorektal Polip ve Kanser Lokalizasyonu Arasındaki İlişki. Kocatepe Tıp Dergisi (2003), 1, 47-51
101. Karaca Ö, Ertekin T, Canöz Ö, Hacıalioğulları M, Ekinci N, Ülger H. Experimental colon tumorigenesis induced 1,2 dimethylhydrazine in Balb/C mice. 11. National Congress of Anatomy, 26-29 october, 2007, Denizli
102. Jouanneau E, Alberti L, Nejari M, et all. Lack of antitümör activity of recombinanat endostatin in a human neuroblastoma xenograft model. J Neurooncol. 2001;51(1):8-11
103. Schaft D, Seftor R, Seftor E, et all. Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells. Journal of the national cancer institute. 2004;96(19):1473-1477
104. Ding I, Sun ZJ, fenton B, et all. Intratumoral administration of endostatin plasmid inhibits vascular growth and perfusion in MCa-4 murine mammary carcinomas. Cancer research, 2001;61:526-531
105. Reilly RW, Kirsner JB. Runt intestinal disease. Laboratory investigation 1965;14:102-107
106. Moolenbeek C, Rutenberg E.J. The 'Swiss roll': a simple technique for histological studies of the rodent intestine. Laboratory Animals 1981;15: 57-59
107. Çevikbaş U. Robbins Temel Patoloji. İstanbul. 2003; 579

108. Moen C, Groot P.C, Hart A, et all. Fine mapping of colon tumor susceptibility (Scc) genes in the Mouse, different from the genes the known to be somatically mutated in colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*1996;93: 1082-1086
109. Coca S, Enrech S, Garcia V.M, et all. Evaluation of the antitümör activity of interleukin-12in an experimental murine model of colorektal cancer induced by 1,2 dimethylhydrazine (DMH). *Rev Esp Enferm Dıg.* 2005;97(9):619-628
110. Yamaguchi N, Apte B, Lee M, Sasaki T et al. Endostatin İnhibits VEGF-induced Endothelial Cell Migration and Tümör Growth independently of Zinc Binding. *EMBO journal* 1999;18;4414-4423
111. Rehn M, Veikkola T, Valdre E, Nakamura H, et Al. İnteraction of Endostatin with İntegrins İmplicated in Angiogenesis. *Pnas* 2001;98:1024-1029
112. Skovseth K, Veuger M, Sorenson R, Angelis P, Haraldsen G. Endostatin dramatically inhibits endothelial cell migration, vascular morhogenesis, and perivascular cell recruitment in vivo. *Blood* 2005;105:1044-1050
113. Herbst S, Kenneth R Hess, Hai T. Tran et al. Phase I Study Of Recombinant Human Endostatin İn Patients With Advenced Solid Tumors. *Journal Of Clinical Oncology.* 2002;20;3792-3803
114. Yuspa SH, Poirier MC. Chemical carcinogenesisi: from animal models to molecular models in one decade. *Adv cancer res,* 1988;50:25-70
115. Kozoni V, Tsioulians G, Shift S, Rigas B. The effect of lithocholic acid on proliferation and apoptosis during the early stages of colon carcinogenesis: differential effect on apoptosis in the presence of a colon carcinogen. *Carcinogenesis* 2000;21(5):999-1005
116. Ma QY, Williamson KE, Rowlands BJ. Variability of cell proliferation in the proximal and distal colon of normal rats and rats with DMH induced carcinogenesis. *World J gastroenterol,* 2002;8(5):847-852
117. Tucker E, Buda A, Janghara N, et all. Abnormalities of the cadherin-catenin complexin chemically-induced colo-rectal carcinogenesis. *Proceedings of the nutrition sciety,* 2003;62:229-236
118. Karaguchi M, Cook H, Williams ED, Thomas Ga. Differences in susceptibility to colonic stem cell somatic mutation in three strains of mice. *J pathol* 2001;193(4):517-521
119. Wang JG, Wang DF, Bing JV,et all. A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium *World J Gastroenterol* 2004;10(20):2958-2962

120. Yanık B, Yalçın P. Heterotopik Ossifikasyon. Romatizma 2003;18(3):183-190
121. Imai N, Iwai A, Hatakeyama S, Matsuzaki K, Kitagawa Y, et al. Expression of bone morphogenetic proteins in colon carcinoma with heterotopic ossification. *Pathol Int.* 2001;51(8):643-648.
122. Sato Y, Onuma H, Okubo S, Fujikawa K, et al. A case of colon cancer resembling submucosal tumor with ossification. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi.* 2007;104(5):678-683.
123. Winneker RC, Tompkins M, Westenberger P, et al. Morphological studies of chemically induced colon tumors in hamsters. *Exp Mol Pathol*,1977;27:19-34
124. Boffa LC, Diwan BA, Gruss R, et al. Differences in colonic nuclear proteins of two Mouse strains with different susceptibilities to 1,2 DMH-induced carcinogenesis. *Cancer research*, 1980;40:1774-1780
125. LeBlanc A.M, Perdigón G. Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. *Med Sci Monit*, 2004; 10(4):96-104
126. Sun BC, Zhao XL, Zhang SW, et al. Sulindac induces apoptosis and protects against colon carcinoma in mice. *World J gastroenterol*, 2005;11(18):2822-2826
127. Carter JW, Lancaster HK, Hardman E, et al. Distribution of intestine- associated lymphoid tissue, aberrant crypt foci, and tumors in the large bowel of 1,2 DMH-treated mice. *Cancer research*, 1994;54:4304-4307
128. Ye C, Feng C, Wang S, et al. Antiangiogenic and antitumor effects of endostatin on follicular thyroid carcinoma. *Endocrinology* 2002;143(9):3522-3528
129. Sorensen D.R, Read T.A, Porwol T vs. endostatin reduces vascularization, blood flow and growth in a rat gliosarcoma. *Neuro-oncology.* 2002;1-8
130. Kuroiwa M, Ikeda H, Hongo T, et al. Effects of recombinant human endostatin on a human neuroblastoma xenograft. *Int J mol med* 2001;8(4):391-396
131. Boehm T, Folkman J, Browder T, et al. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance *Nature (Lond)*,1997;57:404-407
132. Yokoyama Y, Gren J.E, Sukhatme V.P, et al. Effect of endostatin on spontaneous tumorigenesis of mamary adenocarcinomas in a transgenic Mouse model. *Cancer research* 2000;60:4362-4365

133. Kisker O, Becker CM, Prox D, et al. Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pump improves the efficacy and potency of therapy in a Mouse xenograft tumor model *Cancer Res*, 2001;61:7669-7674
134. Perletti G, Concari P, Giardini R vs. Antitumor Activity Of Endostatin Against Carcinogen-Induced Rat Primary Mammary Tumors. *Cancer Research* 2000;60:1793-1796
135. Velde, A REijerkerk, D bransma vs . Early Endostatin Treatment Inhibits Metastatic Seeding Of Murine Colorectal Cancer Cells In The Liver And Their Adhesion To Endothelial Cells. *British Journal Of Cancer*. 2005;92: 729-735
136. Kulke M.H, Bergsland E.K, Ryan D.P, et al. Phase II study of recombinant human endostatin in patients with advanced neuroendocrine tumors. *Journal of clinical oncology* 2006;24(12):3555-3561
137. Eder JP, Supko JG, Clark JW, et al. Phase I clinical trial of recombinant human endostatin administered as a short intravenous infusion repeated daily. *J Clin Oncol* 2002;20:3772-3784
138. Davis DW, Shen Y, Mullani NA, et al. Quantitative analysis of biomarkers defines an optimal biological dose for recombinant human endostatin in primary human tumors. *Clinical cancer research* 2004;10:33-42

ÖZGEÇMİŞ

20.12.1976 yılında Kütahya'nın Simav ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Simav'da tamamladı. Simav Sağlık Meslek Lisesi'nden mezun olduktan sonra 1995 yılında hemşire olarak Kastamonu Devlet Hastanesinde göreve başladı. Üniversite eğitimini Gazi Üniversitesi Kastamonu Sağlık Yüksekokulunda 1999 yılında tamamladı ve daha sonra Sağlık Bakanlığı'nın açmış olduğu Anestezi ve Reanimasyon kursuna katılarak bir yıl Bursa Devlet Hastanesinde anestezi teknikeri olarak görev yaptı. Kursu başarıyla bitirdikten sonra 2000 yılında Erciyes Üniversitesi Nevşehir Sağlık Yüksekokulu'nda okutman olarak göreve başladı. 2002 yılında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalında yüksek lisansını tamamladı. 2003 yılında öğretim görevlisi ünvanını aldı ve aynı yıl Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalında doktora programına başladı. Halen Nevşehir Sağlık Yüksekokulunda öğretim görevlisi olarak görev yapmaktadır.