

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

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

**Tezi Hazırlayan
Tolga ERTEKİN**

**Tezi Yöneten
Doç. Dr. Nihat EKİNCİ**

**Anatomi Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Haziran 2008
KAYSERİ**

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

**FARELERDE DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN KOLON
KANSERİ ÜZERİNE ANGIOSTATIN'IN ETKİLERİ**

**Tezi Hazırlayan
Tolga ERTEKİN**

**Tezi Yöneten
Doç. Dr. Nihat EKİNCİ**

**Anatomi Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma fonu tarafından SBT-06-20 nolu proje ile
desteklenmiştir.**

**Haziran 2008
KAYSERİ**

Doç. Dr. Nihat EKİNCİ Danışmanlığında **Tolga ERTEKİN** tarafından hazırlanan: **“Farelerde Deneysel Olarak Oluşturulan Kolon Kanseri Üzerine Angiostatin’in Etkileri”** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Anatomi** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

...../ / 2008

JÜRİ

İmza

Başkan :

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 Dalı'nda doktora tezi olarak hazırlanan bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Nihat EKİNCİ'ye bana göstermiş olduğu her türlü bilimsel destek, sabır ve emekten dolayı Sayın Doç. Dr. Harun ÜLGER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen, bilgilerinden yararlandığım Anatomi Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Kenan AYCAN'a, anabilim dalımız öğretim üyesi Doç Dr. Erdoğan UNUR'a, Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR'a ve Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Özlem CANÖZ'e teşekkür ederim. Ayrıca doktora süresince her zaman benimle beraber olan ve desteklerini esirgemeyen Anatomi Anabilim Dalı asistanlarından Öğr. Gör. Ömür Karaca, Arş Gör. Mehtap Hacıoğulları ve idari personeline ve tezin oluşmasında büyük katkıları olan Histoloji-Embriyoloji, Patoloji ve Tıbbi Genetik Anabilim dallarının asistanlarına, DEKAM çalışanlarına ve ev arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım. Her zaman yanımda olan yardım ve desteğini esirgemeyen sevgili AİLEME çok teşekkür ederim.

FARELERDE DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN KOLON KANSERİ ÜZERİNE ANJİOSTATİN'İN ETKİLERİ

ÖZET

Anjiogenezis tümör büyümesi, metastazı ve invazyonundaki basamaklardan biridir. Antianjiogenik uygulamanın tümör tedavisinde cazip bir yaklaşım olduğu düşünülür. İnsan plazminojeninden elde edilen anjiostatin K1-3 şu ana kadar bilinen en kuvvetli antianjiogenik ajanlardan birisidir. Bununla beraber anjiostatinin kolon kanseri oluşumu üzerinde koruyucu etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. Bu yüzden biz 1,2 dimetilhidrazin indüksiyonu ile oluşturulan kolon tümörünün deneysel fare modelinde anjiostatinin tümör büyümesi üzerinde koruyucu etkisini araştırdık. 8 haftalık Balb-c farelerine 12 hafta süresince haftada bir kez 20 mg/kg 1,2 dimetilhidrazin (DMH) subkutan tarzda uygulandı. Anjiostatin grubunda farelere son DMH injeksiyonundan 6 hafta sonra ilk başta bir kere 20 µg anjiostatin intraperitoneal olarak uygulandı ve daha sonra 48 saatte bir 5 µg anjiostatin 12 hafta boyunca subkutan tarzda verildi. DMH grubuna bu süreçte fosfat tampon solusyonu (PBS) verildi. Hayvanlar son DMH injeksiyonundan 18 hafta sonra öldürüldü. Histopatolojik lezyonlar; hafif displazi, şiddetli displazi ve kötü huylu tümöral lezyon şeklinde sınıflandırıldı. Her iki gruptaki hayvanlarda bu lezyonların geliştiği belirlendi ve hafif displazi, şiddetli displazi ve kötü huylu tümöral lezyonların ortalama sayıları sırasıyla DMH grubunda 2,28±1,79, 3,14±2,67 ve 4,42±2,29 şeklinde ve anjiostatin grubunda ise 2,71±1,38, 2,28±1,49 ve 3,71±2,29 olduğu belirlendi. Anjiostatin grubunu DMH grubu ile karşılaştırdığımızda şiddetli displazi ve kötü huylu tümöral lezyon sayısında bir azalma olmasına rağmen hafif displastik lezyonlar da ise bir artış vardı. Bu azalma ve artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Bizim sonuçlarımıza göre uyguladığımız bu dozlarda anjiostatin çok az koruyucu etkiye sahipti, fakat yüksek dozlar kullanılarak ve sistematik uygulama ile bu etkilerin artırılabilceği söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Fare, 1,2 dimetilhidrazin, kolon kanseri, anjiostatin, anjiogenezis

EFFECTS OF ANGIOSTATIN ON EXPERIMENTALLY INDUCED COLON CANCER IN MICE

ABSTRACT

Angiogenesis is one of the steps in tumor growth, invasion and metastasis. Antiangiogenic therapy is supposed to be an attractive approach for antitumor treatment. Human plasminogen-derived angiostatin K1-3 is one of the most potent antiangiogenic agents currently known. However, it is unclear whether angiostatin has got protective effects on colon cancer formation. So we investigated the protective effects of angiostatin on tumor growth in experimental mouse model of colon tumorigenesis using 1,2-dimethylhydrazine (DMH) induction. Eight weeks old Balb/c mice were treated with subcutaneous DMH solution (20 mg/kg) once weekly throughout a period of 12 weeks. In angiostatin group, 6 weeks after the last DMH injection the animals were firstly treated with angiostatin (20 μ g/Mouse) intraperitoneally and then subcutaneously every 48 hours (5 μ g/Mouse) throughout a period of 12 weeks. During this time, phosphate buffered saline (PBS) was used for DMH group. The animals were killed at the eighteenth week after the last DMH injection. Histopathological lesions were classified as mild dysplasia, severe dysplasi and malign tumoral lesion. Both groups developed these lesions and mean numbers of mild dysplasia, severe dysplasia and malign lesions were 2,28 \pm 1,79, 3.14 \pm 2,67 and 4,42 \pm 2,29 in DMH group and 2,71 \pm 1,38, 2,28 \pm 1,49 ve 3,71 \pm 2,29 in angiostatin group, respectively. Although in angiostatin group, there was a decrease in severe dysplasia and malign tumor lesions number compared with the DMH group, this decrease was not statistically significant ($p > 0.05$). However there was an increase in mild dysplasia but it wasn't significant ($p > 0.05$). Our results show that angiostatin has got little protective effects in these doses but these effects are thought to be increased by using higher doses and systematic administration.

Key words: Mouse, 1,2 dimethylhydrazine, colon cancer, angiostatin, angiogenesis

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	I
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ	IX
KISALTMALAR	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ANJİOGENEZİS	3
2.1.1. Fizyolojik ve Patolojik Anjiogenezis	3
2.1.2. Anjiogenezis'in Basamakları	4
2.1.2.1. Anjiogenik Faktörlerin Salınımı	5
2.1.2.2. Endotel Hücre Morfolojisinde Değişim	5
2.1.2.3. Proteolitik Enzimlerin Salınımı	5
2.1.2.4. Endotel Hücre Göçü ve Kapiller Morfogenez	6
2.1.2.5. Endotel Hücre Çoğalması	6
2.1.2.6. Mikrodamar Farklılaşması	7
2.1.3. Anjiogenik Faktörler	7
2.1.4. Antianjiogenik Faktörler	8
2.1.5. Tümöral Anjiogenezis	9
2.1.6. Anjiogenezis ve Tümör Metastazı	11

	<u>Sayfa No</u>
2.2. ANTİANJİOGENİK TEDAVİ.....	12
2.3. ANJİOSTATİN.....	14
2.3.1. Keşfi	14
2.3.2. Yapısı ve Oluşumu	15
2.3.3. Antianjiogenik ve Anti-tümör Etkileri	17
2.4. KALIN BAĞIRSAK MORFOLOJİSİ.....	19
2.4.1. Anatomisi ve Embriyolojisi.....	19
2.4.2. Histolojik Yapısı.....	21
2.5. KALIN BAĞIRSAĞIN TÜMÖRLERİ	25
2.5.1. Kolon Kanserlerinin Histolojik Sınıflandırılması	25
2.5.2. İyi Huylu Epitelyal Tümörler	26
2.5.2.1. Adenomlar.....	26
2.5.2.1.1. Tübüler Adenom.....	26
2.5.2.1.2. Villöz Adenom	27
2.5.2.1.3. Tübülovillöz Adenom	27
2.5.3. Kötü Huylu Epitelyal Tümörler.....	27
2.5.3.1. Kolorektal Kanser İnsidansı.....	28
2.5.3.2. Etiyolojisi	28
2.5.3.2.1. Diyete Bağlı Faktörler.....	28
2.5.3.2.2 Yaşam Tarzı ile İlgili Faktörler	29
2.5.3.2.3. İlaçlar	29
2.5.3.2.4. Kalıtsal Faktörler.....	29

	<u>Sayfa No</u>
2.5.3.3. Kötü Huylu Epitelyal Tümör Çeşitleri	30
2.5.3.3.1. Adenokarsinom.....	30
2.5.3.3.2. Müsinöz Adenokarsinom.....	30
2.5.3.3.3. Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom.....	30
2.5.3.3.4. Yassı Hücreli Karsinom.....	30
2.5.3.3.5. Adenoskuamöz Karsinom.....	30
2.5.3.3.6. İndiferansiye Karsinom.....	30
2.5.3.3.7. Sınıflandırılmamış Karsinom.....	30
2.5.3.4. Kolorektal Kanserlerin Patolojisi	31
2.5.3.5. Kolorektal Karsinomun Evrelendirilmesi	32
2.6. DİSPLAZİ.....	33
2.7. KİMYASAL MADDELERLE İLE DENEYSSEL KANSER OLUŞTURMA	33
2.7.1. 1.2 Dimetilhidrazin (DMH).....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. DENEYSSEL KANSER OLUŞTURMA VE TEDAVİ PROGRAMI	37
3.2. KOLON'UN ÇIKARILMASI VE HİSTOPATOLOJİK İNCELEME.....	38
3.3. SWİSSROLL TEKNİĞİ	39
3.4. HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRMA	41
4. BULGULAR.....	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	63
6. KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 2.1. Temel Proanjiogenik faktörler	8
Tablo 2.2. Antianjiogenik faktörler	9
Tablo 2.3. Dukes sınıflandırması	32
Tablo 2.4. Hayvan modelinde 1,2 dimetilhidrazin'in metabolizması	34
Tablo 4.1. Gruplardaki ağırlıkların (gr) dağılımları	45
Tablo 4.2. Deney gruplarında belirlenen ortalama histopatolojik lezyonların sayısı	57
Tablo 4.3. Deney gruplarında bulunan hafif displastik lezyonların kolon'daki dağılımı ve istatistiksel değerleri	58
Tablo 4.4. Deney gruplarında bulunan şiddetli displastik lezyonların kolon'daki dağılımı ve istatistiksel değerleri	59
Tablo 4.5. Deney gruplarında kötü huylu tümöral lezyonların kolon'daki dağılımı ve istatistiksel değerleri	60
Tablo 4.6. Deney gruplarında noninvaziv karsinomların kolon'daki dağılımı ve istatistiksel değerleri .	61
Tablo 4.7. Deney gruplarında invaziv karsinomların kolon'daki dağılımı ve istatistiksel değerleri	62
Şekil 2.1. Anjiogenezis'in basamakları	4
Şekil 2.2. Anjiogenezis sürecinde endotel hücrelerinde meydana gelen değişimler	4
Şekil 2.3. Anjiostatin'in yapısal görünüşü	16
Şekil 2.4. Kalın bağırsağın histolojik görünümü	24
Şekil 4.1. Deney gruplarında kötü huylu tümöral lezyonların kolondaki dağılımı	60

	<u>Sayfa no</u>
Resim 3.1. A) Karın bölgesini açılması B) Kolon'un çıkarılması.....	39
Resim 3.2. A) Petri kabına konulmuş kolon parçası, B) Kolon'un longitudinal olarak açılması.....	40
Resim 3.3. A) Swiss roll tekniği uygulanması B) Swiss roll tekniği ile sarılmış bir kolon.....	40
Resim 4.1. A) Kontrol grubu B) Deney grubu farelerinin genel görünümü	44
Resim 4.2. A) Kontrol grubu B) Deney grubu farelerinin anal bölgesinin genel görünümü.....	44
Resim 4.3. DMH deney grubunda kolon açılmadan makroskopik olarak görülen tümöral lezyon	47
Resim 4.4. DMH deney grubunda kolonun distal 1/3'ünde görülen çoklu tümöral lezyonlar	48
Resim 4.5. DMH deney grubunda kolonun distal 1/3'ünde görülen tekli tümöral lezyon	48
Resim 4.6. Anjiostatin deney grubunda kolonun orta 1/3'ünde görülen çoklu tümöral lezyonlar.....	49
Resim 4.7. Anjiostatin deney grubunda kolon'un distal 1/3'ünde görülen çoklu tümöral lezyonlar	49
Resim 4.8. Kontrol grubundaki farelerin kolonunun normal histolojik görünümü.....	51
Resim 4.9. Kolonda görülen hafif displazi.....	52
Resim 4.10. Kolonda görülen şiddetli displazi	53
Resim 4.11. Kolonda görülen noninvaziv adenokarsinom.....	54
Resim 4.12. Kolonda görülen invaziv adenokarsinom.....	55
Resim 4.13. Kolonda görülen invaziv adenokarsinom.....	56
Grafik 4.1. Gruplardaki ağırlıkların 30 hafta süresince dağılımları.....	46

KISALTMALAR

PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
bFGF	: Bazik fibroblast büyüme faktörü
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-1	: Interlökin-1
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitörü tip 1
ECM	: Ekstraselüler matriks
PA	: Plazminojen aktivatörü
uPA	: Urokinaz-tip plazminojen aktivatörü
EH	: Endotel hücresi
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü
TNF α	: Tümör nekroz faktör- α
TIMP	: Metalloproteinaz'ların doku inhibitörleri
MMP	: Matriks metalloproteinaz
TAF	: Tümör anjiogenezis faktörü
3LL	: Lewis lung karsinoması
kD	: Kilo dalton
C	: Karbon
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MME	: Metalloelastaz
GM-CSF	: Granülosit-makrofaj uyaran faktör
HUVEC	: Umblikal veni endotel hücresi
EOMA	: Malign fare hemangioendotheloma
BCE	: İnek kapiller endotel hücresi

BAE	: İnek aort endotel hücresi
FAK	: Fokal adezyon kinaz
NSAİD	: Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç
DMH	: 1,2 Dimetilhidrazin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
rHuAng K1-3	: Rekombinant insan anjiostatin'inin K1-3 formu
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
µm	: Mikrometre
HE	: Hematoksilen-eozin
rPK1-3	: Rekombinant kringler 1-3

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Önemli ve komplike bir süreç olan yeni damar gelişimi, embriyo ve yetişkinlerdeki mevcut damarlardan tomurcuklanma yolu ile olursa anjiogenezis, embriyolarda anjioblastların farklılaşması ile olursa vaskulogenesiz olarak tanımlanmaktadır. Bu damar gelişim süreci yalnızca yara iyileşmesi ve kadınlardaki üreme siklusu gibi fizyolojik koşulların bir bölümü olmayıp aynı zamanda diyabetik retinopati, kronik inflamasyon, romatoid artrit ve tümörler gibi patolojik durumlarda da karşımıza çıkmaktadır. Özellikle tümör büyümesi ve metastazı anjiogenezise dayanır. Eğer ek kan damarları faaliyete geçmezse, tümörler difüzyon sayesinde ancak 1-2 mm³ kadar büyüebilir, bu durum tümörogenesizde anjiogenezisin kritik rolünü ortaya koymaktadır. Anjiogenik anahtar olarak adlandırılan bir mekanizma ile anjiogenezis inhibitör ve aktivatörleri arasındaki denge sağlanmaktadır. İnhibitör konsantrasyonunda azalma ya da aktivatör seviyelerindeki artış ile denge değişebilmekte ve anjiogenik anahtar aktive olabilmektedir. Tümör damarlanmasının başlaması tümör hücreleri için sadece oksijen ve besin tedarik etmez aynı zamanda tümör hücreleri tarafından üretilen artıkların uzaklaştırılmasını sağlar. Bununla birlikte tümör büyümesi ve metastazının engellenmesi için anjiogenezisin inhibisyonunun bir strateji olabileceğinin önerilmesinden günümüze 35 yıl geçmiş olup bu sürede çeşitli antianjiogenik inhibitörlerin kanser tedavisinde kullanımında önemli gelişmeler olmuştur.

Bu çalışmanın amacı Balb-c türü farelerde deneysel olarak oluşturulan kolon kanseri üzerinde bir endojenöz anjiogenezis inhibitörü olan Anjiostatin'in antianjiogenik ve antitümöral etkisini in vivo olarak araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.ANJIOGENEZİS

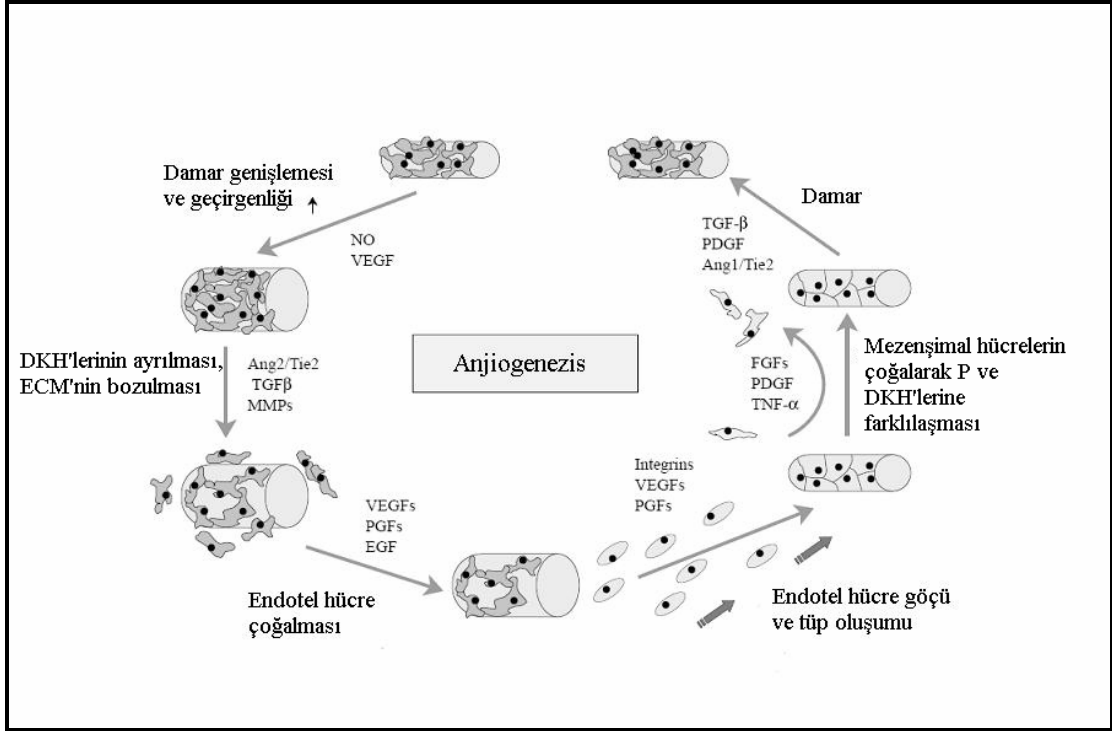
Damar sisteminin gelişimi önemli ve komplike bir süreç olup vaskulogenezis ve anjiogenezisin ortak etkisi sayesinde şekillenir. Primordial damar sistemin gelişimi vaskulogenezis olarak tanımlanır ve ilkel damar ağı oluşturmak üzere pluripotent mezodermal prekürsörlerin (anjioblastların) endotel hücrelerine farklılaşmasını kapsar. Anjiogenezis ise embriyo ve yetişkinlerdeki mevcut damarlardan tomurcuklanma yolu ile yeni kan damarlarının gelişme sürecidir (1-4).

2.1.1. Fizyolojik ve Patolojik Anjiogenezis

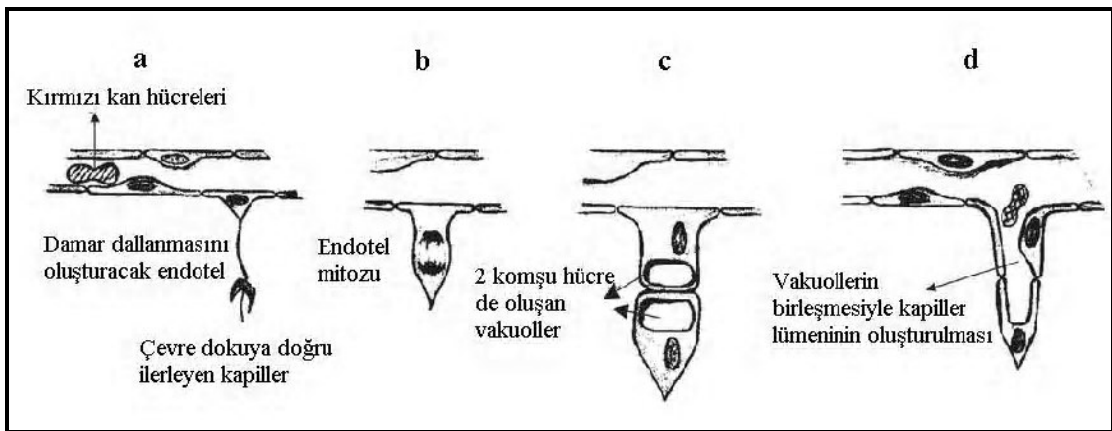
Damar gelişim süreci vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir mekanizma olup, bazı durumlarda patolojik de olabilir. Fizyolojik anjiogenezis; embriyogenez, yara iyileşmesi ve organ hipertrofinde gözlemlenir. Ovülasyon, uterusun menstural siklusu, plasentanın oluşumu da fizyolojik anjiogenezise bağlıdır. Patolojik anjiogenezis ise diyabetik retinopati, ateroskleroz, kronik enflamasyon ve tümör büyümesi ve tümör metastazı gibi birçok hastalıkta karşımıza çıkmakta ve inatçı, devamlı ve düzensiz bir seyir izlemektedir (5-7).

2.1.2 Anjiogenezis'in Basamakları

Anjiogenezis çok iyi bir şekilde düzenlenmiş olağan üstü bir süreçtir. Vasküler ağ ard arda gelen çeşitli basamaklar şeklinde gelişir (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2). Bu basamakları; anjiogenik faktörlerin salınımı, endotel hücre morfolojisinde değişim, proteolitik enzimlerin salınımı, endotel hücre göçü ve kapiller morfogenez, endotel hücre çoğalması ve mikrodamar farklılaşması şeklinde sıralayabiliriz (8,9).



Şekil 2.1. Anjiogenezis'in basamakları. **DKH**: düz kas hücreleri **P**: perisitler **ECM**: ekstraselüler matriks, **NO**: nitrik oksit (10).



Şekil 2.2. Anjiogenezis sürecinde endotel hücrelerinde meydana gelen değişimler (11).

2.1.2.1. Anjiogenik Faktörlerin Salınımı

Kapiller kan damarları, endotel hücrelerinden ve adventisyal hücrelerden oluşmaktadır. Bu iki hücre tipi yeni damarlanmayı oluşturmak (tüpleri, dallanmayı ve tüm kapiller ağı) için tüm genetik bilgiyi taşımaktadır (5). Ortamdaki anjiogenik uyararlardaki artma ve anjiogenezis inhibitörlerindeki azalma şeklindeki değişim, bu hücreleri aktif hale getirmektedir. Anjiogenik faktörlerin salınımını ise hipoksi gibi lokal çevresel faktörleri içeren dış ve iç etkenler sağlamaktadır (8,12). Endotelden salgılanan ve anjiogenezisi etkileyen bazı maddeler ise PDGF (trombosit kaynaklı büyüme faktör), bFGF (bazik fibroblast büyüme faktörü), IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktör), IL-1 (interlökin-1), TGF- β (transforme edici büyüme faktörü beta), PAI-1 (plazminojen aktivatör inhibitör tip 1) dir (Şekil 2.1), (13,14).

2.1.2.2. Endotel Hücre Morfolojisinde Değişim

Endotel, damar duvarının iç yüzünü döşeyen, yassı poligonal hücrelerden yapılmış, tek sıralı devamlı bir epitel tabakasıdır. Dışta ince bir bazal membran üzerine oturur. Endotel hücrelerinin birbiriyle oluşturdukları hücreler arası sınırlar, aradaki temas yüzeyini artıracak şekilde girintili çıkıntılıdır. Bu tek katlı hücre grubu dolaşım kanı ve vasküler duvar dokusu arasında ara birim olarak görev yapar (13,14). Anjiogenezisde endotel hücreler anjiogenik faktörlere cevap olarak kendi morfolojilerini değiştirir. Hücre içi düzeyde endoplazmik retikulum ve Golgi cisminin miktarında bir artış, mitokondrial boyutta ve sayıda değişiklikler olur. Endotel hücrelerin bazal laminaya komşu olan yüzeylerinde parmak benzeri çıkıntılar oluşur ve hücreler arası delikler meydana gelir (Şekil 2.2), (15).

2.1.2.3. Proteolitik Enzimlerin Salınımı

Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerinin yıkımına sebep olur (9). Bu proteolitik enzimler hem tümör hücreleri hem de endotel hücreleri tarafından salgılanan plazminojen aktivatör (PA) ve matriks metalloproteinazları içerir (Şekil 2.1). Geniş spesifiteli proteaz plazminin urokinaz-tip plazminojen aktivatörü (uPA) ile üretimi tüm bu süreç için temeldir, çünkü bu madde ya direkt olarak ya da diğer uyku halindeki enzim sistemlerini aktive ederek birçok matriks bileşenini parçalama yeteneğine sahiptir. Genellikle dinlenme durumundaki endotelden ayrılan uPA bazı anjiogenik faktörler tarafından artırılabilir. uPA tarafından indüklenen

proteoliz, endotel hücrelerinin organizasyonuna ve oryantasyonuna yardım etmek için geçici olarak sınırlı bir tarzda düzenlenir (15,16).

2.1.2.4. Endotel Hücre Göçü ve Kapiller Morfogenez

Alttaki bazal membranın ve ekstraselüler matriksin bozulması endotel hücrelerinin (EH) tomurcukları oluşturmak için post- kapiller ana venüllerden göç etmesine müsaade eder (Şekil 2.1). EH'ler bazal laminaya komşu olan yüzeylerinde parmak benzeri çıkıntıları oluşturur. Endotelyal tomurcuklar, tomurcuğun ucundaki mikrovillilerin birbiri ile birleşmiş ilmikler oluşturmak için kaynaşmalarından önce EH'lerin eklenmesi ile uzatılabilir. Bu süreçlerin kontrolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Fakat EH göçünün hem VEGF (vasküler endotel büyüme faktörü), TNF α (tümör nekroz faktör- α), interlökin-6, interlökin-8, PDGF, FGF'i (fibroblast büyüme faktörü) içeren çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri hem de yüksek yoğunluklu lipoproteinler, metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP), ve vazo aktif hormonlar tarafından ayarlandığı bildirilmektedir. Son çalışmalar göstermiştir ki metastaz ve inflamasyonda önemli olan selektin ve integrin ailelerinin hücre yapışma molekülleri de kapiller şekillenmede önemli rol oynar. In vitro olarak normal kapiller oluşum için E ve P selektin gereklidir ve bu selektinlerin in vivo artışı tümörde yeni damarlanmanın çok aktif olduğu alanda gözlenir. P selektin ayrıca tümör stroma oluşumunu artırarak tümör ilerlemesine katkıda bulunur. Bir takım integrinler de hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri üzerindeki etkileri sayesinde kapiller oluşumda önemli bir yer tutar. In vivo olarak anjiogenezis şiddetli bir şekilde integrin fonksiyonunun durdurulması ile engellenebilir, bu durum yeni damar büyümesinde yapışma moleküllerinin önemini belirtmektedir (10,15-17).

2.1.2.5. Endotel Hücre Çoğalması

Endotelyal tomurcuk oluşumu süresince, tabanda meydana gelen bölünme damarın uzamasını sağlar. Normal dokulardaki endotel hücreleri sakin ve her 7-10 yılda bir bölünür. Hayvan tümörlerinin otoradyografik çalışmaları tümör endotel hücrelerinin 30-40 kat daha hızlı çoğaldığını göstermiştir. Bu bulgular fonksiyonel damarlanmanın kurulmasında önceden var olan endotelin göçünün ve yeniden şekillenmesinin önemini belirtmektedir (15). Bu süreçte en önemli anjiogenik molekül VEGF olup, endotel hücre göçünü, çoğalmasını ve invazyonunu uyarır ve damar geçirgenliğini artırır (Şekil 2.1), (16,18).

2.1.2.6. Mikrodamar Farklılaşması

Endotel hücre çoğalmasından sonra ECM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstraselüler proteoliz mutlaka inhibe edilmelidir. Kapiller filizlenme oluştuktan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM'de yıkılma ortaya çıkar ve bu durumda daha ileri yayılımı mümkün kılar. Endotelin yol alması ve uzaması sırasında hücre içi ve hücreler arası boşluklar meydana gelir ve sonunda bunlardan da damarların oluştuğu lümenler gelişir (Şekil 2.2). Böylece, ekstraselüler matriks proteolizinin birbirini sırayla izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda kapiller oluşur. 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 (9). Arter duvarında endotel altında yer alan kollajen ve elastik lifler ile düz kas hücrelerinin miktarı, dağılım ve düzeni, arterin içinde bulunduğu yerel mekanik koşullara ve arterin iç yüzüne etki yapan hemodinamik faktörlere bağlı olarak değişir (13,14).

2.1.3. Anjiogenik Faktörler

Anjiogenezisin oluşmasında ekstraselüler matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiogenezisde temel rol oynar (9,10). Anjiogenik faktörler arasında bFGF, TGF- β , anjiopoetinler, PDGF ve VEGF'i sayabiliriz (12). Anjiogenik moleküller içerisinde en önemlisi VEGF ve VEGF reseptörleridir. Endotele spesifik bir mitojen olan VEGF, endotel hücre büyümesinde rol alan ve damar geçirgenliğini artıran anjiogenik bir faktördür. VEGF reseptörlerinin aktivasyonu hücre içi sinyal iletimi proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını sağlar (2,19). Anjiogenezis sürecinde kötü huylu hücrelerin ve endotel hücrelerinin bağ dokusuna ve damar duvarına invazyonunu kolaylaştıran ise endopeptidazların bir ailesi olan matriks metalloproteinazlardır (MMP). MMP'ler bazal membranı, ECM'yi parçalar ve ECM'ye bağlı proanjiogenik faktörlerin salınımına da katkıda bulunur (20-22). Anjiogenik faktörlerden bazıları Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Temel Proanjiogenik faktörler

Proanjiogenik faktörler	Kaynaklar
Vasküler endotelial büyüme faktör (VEGF)	2,19
Asidik, bazik fibroblast büyüme faktör (aFGF ve bFGF)	8
Transforme edici büyüme faktör- β (TGF- β)	23, 24
Epidermal büyüme faktör (EGF)	25, 26
Tümör nekroz faktör- α (TNF- α)	10
Trombosit kaynaklı endotel hücre büyüme faktörü (PD-ECGF)	27, 28
İntegrinler	29, 30
Anjiopoetin	10
Granülosit koloni uyaran faktör (GCSF)	10
Hepatosit büyüme faktör (HGF)	31
Granülosit-makrofaj uyaran faktör (GM-CSF)	32
İnterlökin-2, 6, 8 (IL-2, 6, 8)	8
Anjiogenin	33
Proliferin	34
İnsülin benzeri büyüme faktör (IGF-1)	35
Matriks metalloproteinaz	21,22
Plasental büyüme faktörü	36
Prostaglandinler	37
Nitrik oksit	38

2.1.4. Antianjiogenik Faktörler

Geçtiğimiz dönemlerde anjiogenezis basamaklarının aydınlatılması tümör tedavisinde bir çok doğal hedefin üretilmesi ile sonuçlanmıştır. Özellikle VEGF sinyalizasyon yolunun üyeleri tanımlanmıştır. İlginç olarak anjiogenik yolların bir çok inhibitörü mantar, köpek balığı kıkırdağı ve kası, yeşil çay ve sarımsak gibi doğal kaynaklardan endotel hücre kültürü sayesinde keşfedilmiştir. Bir takım in vitro ve in vivo çalışmalar sayesinde bu bileşikler prelinik çalışmalarda denenmektedir. Bugüne kadar 300'ün üzerinde anjiogenezis inhibitörü tanımlanmış (39) olup bunlardan bazıları Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Antianjiogenik faktörler

Antianjiogenik faktör	Kaynaklar
Endostatin	40
Anjiostatin	41
Thrombospondin 1	42
İnterferon- β/α	43
İnterlökin 12	3
Metalloproteinaz'ların doku inhibitörleri (TIMP)	44
Platelet faktör 4	45
Vasostatin	46
2-Methoxyoestradiol	47
Neovastat	48
Marimastat	49
Vitaxin	50
SCH221153	30
Captopril	51
Suramin	52
Linomide	53
Dexamethasone	54
Sflt-1	55
Retinoid	56
Lavendustin A	57

2.1.5. Tümöral Anjiogenezis

Anjiogenezi kontrol eden mekanizmalar tam olarak anlaşılmamasına rağmen, primer tümörün gelişiminde ve metastazında anjiogenezin önemli rolü olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Tümör anjiogenezi ile ilgili çalışmalar 19. yüzyılın ikinci yarısında başlamış olup tümör stromasının ayrı bir kapiller ağa sahip olduğu tespit edilerek tümör damarlanması, tümör içeren organlardaki normal kan damarlarının karmaşık büyüme ile bozulması ve etkilenen damarlarda da spiralleşme ve genişleme gözlemlenmesi şeklinde tanımlanmıştır (58). Anjiogenezis konusundaki asıl gelişimin 1971'de Folkman ile başladığını görüyoruz (59). Folkman tümör gelişimi anjiogenezise bağımlıdır diyerek şu teorileri ileri sürmüştür:

- 1) Primer solid tümörlerin büyük bir çoğunluğunda muhtemelen uzamış avasküler evre vardır ve bu dönemde tümörler maksimum 1-2 mm³ çapa ulaşabilir. Bu büyüklüğe kadar tümör hücreleri gerekli besin ve oksijen ihtiyacını pasif difüzyon ile karşılar.
- 2) Bu mikroskobik tümör kitlesi olgun konakçı damarlarından kendisine doğru yeni kapiller damarların tomurcuklanması ve sonuçta tümöral kitleyi infiltre etmesine yol açan anjiogenezisi başlatabilir.
- 3) Anjiogenezisin tümör hücrelerinden Tümör Anjiogenezis Faktör (TAF) adı verilen bir büyüme faktörünün ektojik olarak yapımına bağlı olduğu ortaya atılmıştır.
- 4) TAF yapımını veya onun biyolojik fonksiyonunu önleyerek ya da yeni oluşan immatür kan damarlarındaki endotel hücrelerini hedef alarak tümör anjiogenezisini ve tümör büyümesini bloke etmek mümkün olabilir.
- 5) Bu tip tedavi yaklaşımları başarılı olursa, tümör hücrelerini tamamen yok etmeyebilir fakat tümör hücrelerinin daha da çoğalmasını engelleyebilir ya da tümörün kan desteği olmaksızın yaşamını sürdürebileceği 1-2 mm'lik boyutlara gerilemesini sağlayabilir (59).

Bundan sonraki yıllarda, tümör damarları yeni çoğalan kapillerdir, anjiogenezis sürecindeki adımlar nelerdir, anjiogenezis nasıl engellenebilir, in vivo olarak tümör hücrelerinden salınan anjiogenik faktörler endotel gelişimin nasıl stimüle eder gibi sorulara cevap aranmıştır.

Tümör ilerlemesinde iki faz ayırt edilir; bunlar prevasküler ve vasküler fazlardır. Prevasküler faz tümör büyümesindeki ilk artış olarak tanımlanır. Bu fazda tümörler nadiren 2-3 mm çaptan daha fazla büyür. Bu fazdaki tümörlerin hücreleri, damarlanmış ve genişlemiş tümörlerdeki kadar hızlı çoğalabilir. Bununla beraber bu dönemde tümörlerdeki hücrelerin çoğalma oranları ölüm oranları ile eşittir. Tümörde damarlanmanın başlaması ile tümör hızlı bir şekilde büyür ve sıklıkla kontrol edilemeyen hacme ulaşır. Tümör içine yeni kan damarlarının infiltrasyonu tümör hücreleri için sadece oksijen ve besin tedarik etmez aynı zamanda tümör hücreleri tarafından üretilen atıkların uzaklaştırılmasını sağlar. Vasküler faz boyunca tümör hücrelerinin çoğalma oranı değişmezken tümör büyümesindeki artış muhtemelen azalmış tümör hücresi apoptozundan kaynaklanır (8,60,61). Tümör anjiogenezisi, tümör hücrelerinden ve tümör stromasındaki konak hücrelerden salınan anjiogenik

moleküllerle düzenlenir (62). Anjiogenik anahtar olarak adlandırılan bir mekanizma ile anjiogenezis inhibitör ve aktivatörleri arasındaki denge sağlanmaktadır (43). İnhibitör miktarında azalma ya da aktivatör seviyelerindeki artış ile denge değişebilmekte ve anahtar mekanizma aktive olabilmektedir. 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 tümör hücrelerinin proliferasyonunu stimüle eder (62). Anjiogenezisin pozitif düzenleyicileri arasında VEGF, bFGF, PDGF ve ayrıca bir kısım değişik anjiogenik moleküller yer almaktadır (Tablo 2.1). Bu anjiogenik moleküller yanında anjiostatin, endostatin gibi bir takım endojen antianjiogenik moleküller de anjiogenezise karışmaktadır (12,43). Bu anjiogenik ve antianjiogenik moleküller arasında denge damarsal bileşenlerin sessiz halde kalmasını yani anjiogenik anahtar olarak tanımlanan bir mekanizmayı sağlamaktadır. Bu denge anjiogenik uyarıların artışı ve anjiogenezis inhibitörlerinin azalışı yönünde değişim gösterdiği zaman anjiogenik anahtar mekanizma aktifleşmekte ve anjiogenezis başlamaktadır (8,63).

2.1.6. Anjiogenezis ve Tümör Metastazı

Yukarıda basamaklarını bahsettiğimiz anjiogenezis tümörün gelişmesi ve büyümesi yanında metastazı için de gereklidir. Yüksek oranda anjiogenik olan hücreler içeren tümörler daha büyük ihtimalle yaygın metastaz yapar. Çünkü hedef dokulara ulaştığında zaten anjiogenik özellik taşır. Bir tümör hücresi başarıyla metastaz yapabilmesi için, damar sistemine girmek, dolaşımında canlı kalabilmek, hedef organın mikrodamarlarında duraklayabilmek, damar sisteminden dışarı çıkabilmek, hedef organda büyüebilmek ve anjiogenezisi indükleyebilmek gibi çeşitli bariyerleri aşabilmelidir (64). Uzaktaki metastazların oluşumundaki ilk iki büyük basamak primer lezyonun tümör hücrelerinin çoğalması ve önceden var olan damarlardan geniş damar ağının oluşturulmasıdır (18). Tümördeki mikrodamar ağının yoğunluğu vasküler pencerenin boyutu hakkında bilgi verir ve muhtemelen bu pencereden tümör hücreleri vücudun uzak bölgelerine yayılmak için geçer. Pencerenin büyük olması dolaşan tümör hücrelerinin sayısının daha fazla olması ve metastazların gelişebilmesi ile ilişkilidir (65). Tümör hücrelerinin primer tümörden ayrılmasında anjiogenezis etkilidir. Nitekim yeni çoğalan kapiller tamamlanmamış bir bazal membrana sahiptir ve bu nedenle kapiller geçirgen bir

özelliğe sahip olup bu durum tümör hücrelerinin dolaşıma girmesini kolaylaştırır (8). Kan damarlarına ve lenf damarlarına giren tümör hücreleri ekstraselüler matrikse invaze olur. İnvazyon süreci hücre-hücre birleşmesindeki azalma, artan hücre hareketliliği ve matriks metalloproteinazlar, kathepsinler ve plazminojen aktivatörleri gibi ECM'yi parçalayan enzimlerin salınımı ile desteklenir. Dolaşıma girdikten sonra tümör hücreleri lökositlerle ve trombositlerle veya her ikisiyle de bir topluluk oluşturur ve bu durum da uzak kapiller yataklarda tümör embolisi oluşturma ihtimalini artırır. Tümör hücreleri daha sonra özel hücre yüzeyi reseptörleri sayesinde bazal membranın glikoproteinlerine bağlanır. Bunları takiben bazı tümör hücreleri, ilk baştaki invazyonu düzenleyen muhtemelen aynı mekanizmalar sayesinde, damar dışına sızarak organ parankimine girme yeteneğine sahip olabilir. Organ parankimindeki daha ileri çoğalma, büyümeyi uyaran ve engelleyen faktörler arasındaki karşılıklı etkileşim tarafından kontrol edilir. Metastazlar makroskopik olarak fark edilebilen lezyonları üretilebilmesi için uygun bir vasküler ağ geliştirmelidir (18). Sonuç olarak anjiogenezis metastatik zincirin hem başında hem de sonunda gereklidir (8).

2.2. ANTİANJİOGENİK TEDAVİ

Batı dünyasında ölüm sebeplerinden ikincisi kanserdir. Teşhis ve tedavisindeki ilerlemelere rağmen hastaların hayatta kalma oranı halen azdır. Bugüne kadar tümör hücreleri kanser tedavisi için ilk hedefti. Bu durum solid tümörlerin bazıları için hastaların hayatta kalma sürelerini uzattı, fakat tedaviye bağlı toksisite ve ilaç direncindeki artış ikisi birden morbidite ve mortalitenin en büyük sebebi olmaya devam etmektedir (39). Tümör büyümesi ve tümör metastazı ile anjiogenezis arasındaki sıkı ilişkinin 1970'li yılların başında Folkman (59) tarafından açıklanması ve ileriki dönemlerde anjiogenezis basamaklarının aydınlatılması, anjiogenezis inhibisyonunun tedavi avantajı sağlayabileceği düşüncesini geliştirmiştir. Bununla birlikte pek çok anti-anjiogenik moleküllerin keşfi başlamıştır. Antianjiogenik tedavi endotel hücrelerine odaklanmış olup dolayısıyla konvansiyonel kemoterapötik yaklaşımlara göre çeşitli avantajlarının bulunduğu belirtilmiştir (15,16,39,58,66). Bu avantajlar;

1) Tümörler hücre tipi ve malign özelliklerine bağlı olarak heterojendir; bu özellikleri sayesinde kemoterapötik ajanlara direnç gösterirler. Endotel hücreler ise homojen olduklarından ve neoplastik olmadıklarından daha az dirençlidir.

2) Dolaşımdaki ilaç endotel hücrelerine kolaylıkla ulaşabilir; konvansiyonel sitotoksik ilaçlar ise tümör hücrelerine ulaşmak için yüksek stromal intersitiyal basıncı aşmak zorundadır.

3) Solid tümörler, özellikle intracerebral tümörler vaskülarizasyon fazından önce klinik semptomlar oluşturmayabilir. Dolayısıyla anjiogenezisin durdurulması klinik semptomları engellemeye yetecektir.

4) Tümör damarları vücuttaki diğer damarlardan anjiogenik moleküllerin ekspresyonu ile ayırt edilebilir; bu moleküller tümör damarlarını hedeflemede yüksek seçicilik ortaya konmasını sağlayabilir.

5) Konvansiyonel kemoterapötik ajanların başarısı bütün tümör hücrelerinin öldürülmesine bağlıdır. Antianjiogenik ajanlar için bu gerekli değildir; sadece bazal membran hedef alınarak sekonder endotel hasar oluşturulabilir veya endotel hücreleri için gerekli büyüme faktörleri inhibe edilerek tümörü besleyen damarlar engellenebilir.

6) Antianjiogenik yaklaşım anjiogenezisin her bir basamağını ayrı ayrı içinde barındırır. Bu durum antianjiogenik tedavinin optimizasyonu için spesifik seçenekler sunar.

7) Tedavi, kan akımını tedarik etmiş olan büyük tümörler üzerinde uygulandığında semptomatik hastalıkların ortaya çıkmasını engelleyerek ve mikrometastazların büyümesinin engellenmesine yardımcı olarak yararlı olabilir.

Genel olarak antianjiogenik tedavi tümörün damarlanmamasını hedef alır. Bu suretle büyümeyi ve metastaz oluşumunu engeller. Fakat antianjiogenik tedavilerin gelişimindeki stratejiler tamamen çeşitli ve farklı olup birçok sayıda antianjiogenik molekül bulunmaktadır (Tablo 2.2), (18). Bununla beraber değişik araştırmacılar tarafından antianjiogenik ajanların çeşitli sınıflandırılması yapılmıştır (6,12,67-69). Etki mekanizmalarına göre anjiogenezis inhibitörleri aşağıdaki şekilde gruplandırılabilir:

- 1) Proanjiogenik faktörler için inhibitörler
- 2) MMP inhibitörleri
- 3) Integrin blocker
- 4) Moleküler hedefli inhibitörler
- 5) Diğer anjiogenik inhibitörler
- 6) Endojenöz anjiogenik inhibitörler

Endotel hücrelerinin aktivasyonu, VEGF, bFGF, PDGF ve benzeri faktörlerin endotel hücreleri üzerinde belirlenen reseptörlerine bağlanması ile başlar. Bu yüzden bu faktörlerin reseptörlerine bağlanmasının engellenmesinin anjiogenezis'i inhibe edeceğine inanılır (6,16). Uyarılan endotel hücreleri göç eder ve ECM'yi istila ederek önceden var olan damarlardan filizlenir. Bu süreçte MMP'ler, tümör hücreleri, stroma hücreleri ve endotel hücreleri tarafından ECM bileşenini parçalamak için üretilir (20-22). Bu durumda MMP inhibisyonu tümör hücrelerinin ve endotel hücrelerinin göçünü ve yayılımını baskılayarak anjiogenezisin engellenmesini sağlar (20). Eğer anjiogenik alanda antianjiogenik faktörler baskın hale gelirse muhtemelen anjiogenezis baskılanabilir. Tüm antikanser tedavilerinin en güvenilir ve en az toksik olanı muhtemelen anjiogenezisin endojenöz inhibitörleridir. Bugüne kadar 15 endojenöz inhibitör keşfedilmiş olup çeşitli klinik denemelerde kullanılmaktadır (69). Bu inhibitörler arasında endostatin (70), thrombospondin-1 (6) ve anjiostatini (41) sayabiliriz ve bu moleküller çeşitli yollarla endotel hücre çoğalması ve göçünü engeller.

2.3. ANJİOSTATİN

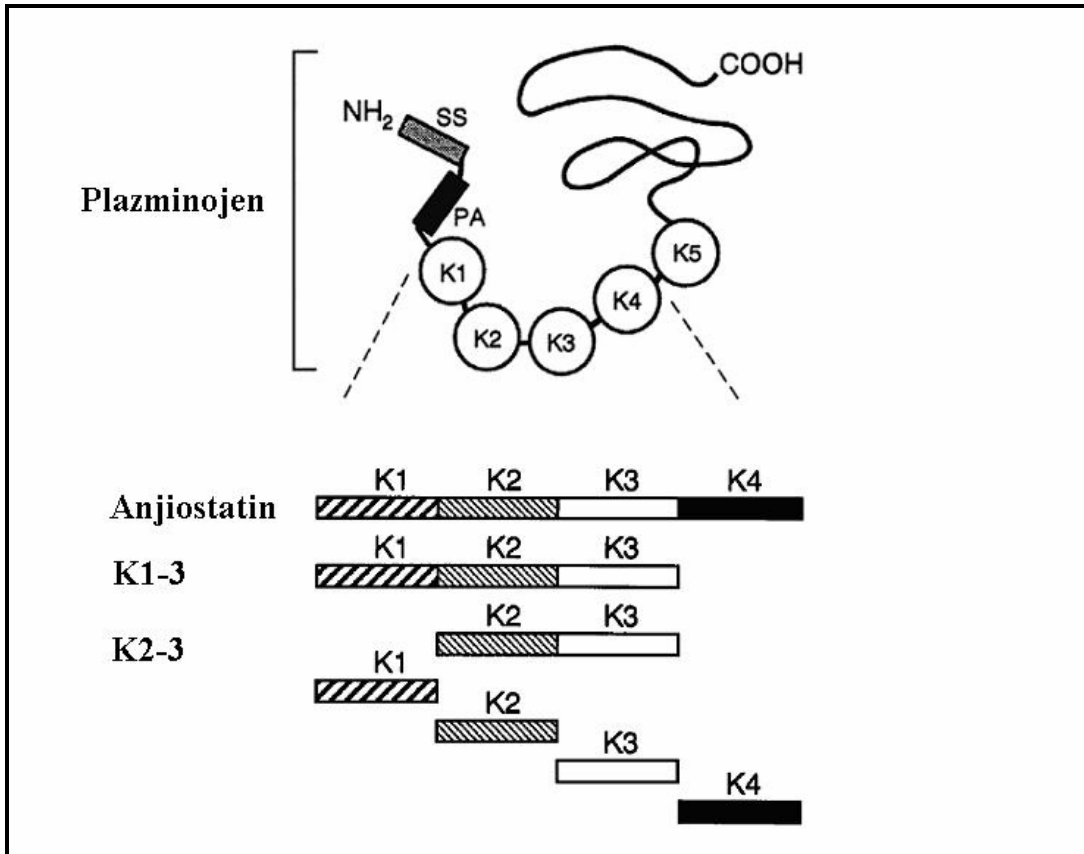
2.3.1. Keşfi

Metastatik tümör büyümesinin primer tümör kitlesi tarafından engellenmesi bazı klinik çalışmalarda incelenmiştir. Göğüs ve kolon karsinomalı hastalarda bir kısım primer tümör kitlesinin cerrahi olarak çıkarılması uzak alanlardaki metastazların hızlı bir şekilde büyümesi ile sonuçlanabilir. Potansiyel tedavi edici antikanser ajan olarak anjiostatini keşfi, subkutan olarak implante edilmiş Lewis Lung (akciğer) karsinomasının (3LL) uzaklaştırılmasını takiben akciğer metastazlarının büyümesindeki artış ile sonuçlanan araştırmadan köken alır. Anjiostatin dolaşımdaki bir anjiogenezis inhibitörü olup 3LL tümörü taşıyan C57BI6/J farelerinin idrar ve serumunda Folkman Laboratuvarı tarafından keşfedilmiştir. Bu keşif primer tümörün bulunuşu, anjiogenezisin dolaşımdaki inhibitörlerini uyarır şeklindeki görüşü hipotez haline getirmiştir. Bu inhibitör, büyüyen primer tümör varlığında dolaşımda çoğalır ve primer tümörün uzaklaştırılmasından sonra dolaşımdan kaybolur. Bu yüzden primer Lewis akciğer karsinomasının kesilip alınması dolaşan anjiostatini azalması ile sonuçlanır ve bu da anjiogenezis ve akciğerdeki mikrometastazların büyümesini hızlandırır (18,41,62,71).

2.3.2. Yapısı ve Oluşumu

3LL tümör taşıyan farelerin hem idrar ve hem de serum örneklerinden elde edilen anjiostatinin mikro analizi, valine amnioasitindeki N-sonlanması ile fare plazminojenin internal parçasına % 98'in üzerinde özdeşlik gösterir. Anjiostatin, plazminojenin kringle alanı olarak bilinen ve disülfid bağları ile bağlanmış beş tane üçlü ilmeğin ilk dördünü içerir (Kringle 1-4), (Şekil 2.3). In vivo olarak anjiostatin, metastazların anjiogenezise bağımlı büyümesi kadar deneysel primer tümör büyümesini de engeller (60,62,72). Kemirgen anjiostatini ile uyumluluk sergileyen ve in vitro olarak insan plazminojenin elastaz proteolizi ile üretilen proteolitik parçalar endotel hücreleri üzerinde inhibitör aktiviteye sahiptir. Başlangıç çalışmalarında elde edilen insan anjiostatini 40, 42 ve 45 kD (kiloDalton) şeklindeki 3 moleküler ağırlık içerir ve her üç molekül de endotel hücre çoğalmasını benzer şekilde inhibe eder. Her üç molekülün de mikroanalizi, aminoasit 97 ve 99'da aynı N-sonlanmasını gösterir ve bileşenlerin C-terminal uzunlukları değişkendir. Bozulmamış plazminojen molekülü aynı kringle yapılarını içermesine rağmen in vivo olarak yeni damarlanma, metastatik tümör büyümesi ve endotel hücre büyümesi inhibisyonu üzerinde inaktiftir. Bu veriler anjiostatinin, plazminojenin kringle yapısından farklı boyutta bir yapı içerebileceğini ifade etmektedir. Aynı zamanda endotelial inhibitör etkinin bozulmamış plazminojende saklandığı düşünülmektedir (62,73). Anjiostatin 3LL tümör büyümesi ile ilişkili olarak in vivo tarzda keşfedilmesine rağmen, tümör hücrelerinin direkt olarak anjiostatini üretmeleri mümkün değildir. Çünkü tümör hücreleri anjiostatin ve plazminojen için gerekli olan mesajcı ribonükleik asit (mRNA) miktarından yoksundur. Anjiostatin in vitro olarak plazminojenin sınırlı elastaz sindirimi sayesinde üretilebilir (62,72). 3LL tümörü taşıyan farelerde anjiostatin'in in vivo olarak üretilmesinden sorumlu olan ara bulucunun tümöre infiltre olan makrofajlar olduğu tespit edilmiştir. Subkutan tümör kesitlerinin immunohistokimyasal boyaması makrofajların infiltrasyonunu göstermiş olup tümör dokularında metalloelastaz (MME) mRNA'nın ekspresyonunun yüksek düzeyleri tespit edilmiştir. Bunun sonucunda anjiostatinin üretilmesi, makrofajlardan kaynaklanan metalloelastolitik aktivite ile direkt olarak ilişkilendirilmiştir (60,62,73). Daha sonra makrofajlardaki metalloelastolitik aktivitenin 3LL tümör hücreleri tarafından salgılanan GM-CSF (Granülosit-makrofaj uyaran faktör) sitokini tarafından artırılabilirdiği tespit edilmiştir. Bunun sonucunda da 3LL tümör hücrelerinin, elastaz aktivitenin üretimini artıran ve bu sayede de anjiostatin üretimini de artıran GM-SCF

salgılamaları sayesinde makrofajlar ile olan bağlantıları belirlenmiştir (62). Tümöre infiltre olan makrofajlardan serbest bırakılan MME'nin tümörlerde anjiostatinden sorumlu tek kaynak olmadığı görülmektedir. Üç insan prostat karsinoma hücre grubunun (PC-3, DU145, ve LN-Cap), plazminojen ve plazminden anjiostatini oluşturan proteolitik aktiviteyi ürettiği belirlenmiştir. Bu hücre gruplarından serbest bırakılan enzimatik aktivite tümöre infiltre olan makrofajlarınkinden bağımsızdır. Proteaz inhibitörleri ile ilgili çalışmalarda serin proteazın anjiostatin üretimi için temel olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.3), (60,62).



Şekil 2.3. Anjiostatin'in yapısal görünüşü (72).

2.3.3. Antianjiogenik ve Anti-tümör Etkileri

Arındırılmış anjiostatin, insan umbilikal veni endotel hücreleri (HUVE), malign fare hemangioendotheloma (EOMA) hücreleri, inek kapiller endotel hücreleri (BCE) ve inek aort endotel hücreleri (BAE) gibi farklı orijinli endotel hücrelerinin çoğalmasını doza bağımlı tarzda inhibe eder. Buna zıt olarak endotel hücre çoğalmasının maksimum inhibisyonunu sağlayan anjiostatin konsantrasyonları 3T3 fibroblastları, inek aort düz kas hücrelerini, insan fetal fibroblastlarını, inek retinal pigment epitel hücrelerini ve 3LL kemirgen Lewis akciğer karsinoma hücrelerini içeren çeşitli normal ve neoplastik nonendotelyal hücre grupları üzerinde inhibitör etkiye sahip değildir. Bu durum ise anjiostatinin özellikle endotel hücre çoğalmasını engellediğini göstermektedir (60,73-75).

Endotel çoğalmasının engellenmesi üzerine insan anjiostatininin daha küçük bileşenleri üzerine yapılan çalışmalar her bir kringel yapısı arasında fonksiyonel farklılıklar olduğunu gösterir. Örneğin rekombinant kringel 1, BCE hücreleri üzerinde kuvvetli bir inhibitör etki sergiler. Rekombinant kringel 2 ve kringel 3’de önemli endotel inhibisyonu gösterir. Buna zıt olarak kringel 4 endotel hücre çoğalması üzerinde etkisiz bir inhibisyon ortaya koyar. Bu veriler göstermektedir ki anjiostatinin endotelyal inhibitör aktivitesi kringel 1, kringel 2 ve kringel 3 tarafından paylaşılmakta olup, muhtemelen bu paylaşımında kringel 4 yer almamaktadır. İkili kringel tertipleri arasında kringel 2-3 bileşeni tek olan kringel 2’ninkine benzer inhibitör aktiviteye sahiptir. Bununla beraber kringel 2-3’e ilişkin olarak, tek kringel 2 ve tek kringel 3 formları ayrı ayrı aynı anda endotel hücrelerine eklendiği zaman inhibisyonda artış gözlenmiştir. Bunun anlamı ise kringel 2-3’ün maksimum inhibitör etkisini elde etmek için kringel 2 ve kringel 3 arasındaki kringeller-arası disülfid köprüsünün açılması gerekmektedir. Homolog alanların değişken lysine bağlanma eğilimlerinden dolayı, lysine bağlanma yeteneği kringel içeren parçaların nispi inhibitör etkileri ile ilişkili değildir (Şekil 2.3), (72).

Chorioallantoic membran incelemelerinde arındırılmış insan anjiostatini ile yapılan deneylerde; anjiostatinin uygulamasından sonra damarlanmanın daha az olduğu bildirilmiştir (76). Önceki çalışmalar göstermiştir ki insan anjiostatininin sistematik uygulanması, farelere transplante edilmiş olan insan ve kemirgen primer tümörlerini

güçlü bir şekilde inhibe etmektedir. Anjiostatin etki derecesi verilen doz miktarıyla bağlantılıdır ve anjiostatin tedavisine ara verildiğinde tümörlerin kendini yenilediği gözlenmiştir. Anjiostatin tedavisi farelerde kilo kaybı ve diğer toksisitelerle sonuçlanmaz. Hatta tedavi programı günde 100 mg/kg'a ulaşırsa ve ayrıca uzun bir tedavi süreci uygulanırsa bile hiç bir toksisite görülmemektedir (73,74,77-80). Toksisitenin olmayışı gösterir ki anjiostatin ile yapılan etkili anti-tümör tedavisi tümörün endotelial bölümünü direkt olarak etkiler ve bu durum tümör büyümesinin kontrol edilmesinde endotel hücre kompartmanının önemini sergilemektedir. Yapılan çalışmalarda anjiostatinin antianjiogenik etki mekanizması altında yatan etkenler aydınlatılmamış olup çıkarılan sonuçlara dayanarak çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. Anjiostatinin çeşitli endotel hücrelerindeki etkisi incelendiğinde, endotel hücre sayısındaki azalma sitotoksik etkiden kaynaklanmaktadır. Sitotoksitenin ise anjiostatin tarafından uyarıldığı ve endotel hücreleri için spesifik olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca anjiostatin hücre siklusu ilerlemesini etkilemeden endotel hücre apoptozunu uyarmaktadır. Anjiostatinin antianjiogenik aktivitesi endotel hücre göçünü engelleme yeteneği kadar endotel hücre apoptozunu uyarma yeteneğinden de kaynaklanabilir ki bu etkiler bozulmuş endotel hücresi ve ekstraselüler matriksin karşılıklı etkileşimlerinin bir sonucudur (60,76). Lucas (1998) yapmış olduğu çalışmada anjiostatinin çoğalan endotel hücrelerinde E selektini artırdığını ve bu durumun da HL-60 promyelocytic leukemia hücrelerinin anjiostatin tarafından muamele edilmiş endoteliuma yapışmasını artırdığını bildirmiştir. Bu etkinin in vivo olarak anjiostatin antitümör aktivitesine katkıda bulunup bulunmadığı tam olarak bilinmemektedir (60).

Anjiostatinin tüm antianjiogenik aktivitesine her bir kringle alanı ayrı ayrı anti-migratör aktiviteleri sayesinde katkıda bulunabilir. Ayrıca FGF, anjiogenin ve VEGF tarafından indüklenen yeni damarlanmada inflamatuvar ilerleme ve lökosit infiltrasyonu önemli rol oynar ve anjiostatin bu süreçleri baskılayabilir (76). Endotel hücre cevaplarının geniş bir spektrumunu anjiostatin tarafından inhibe edilmesine rağmen, büyüme faktörleri tarafından uyarılan sinyal iletimi etkilenmez. Anjiostatin tedavisi, apoptozis ile sonuçlanan ve büyüme faktörlerinden bağımsız olan sinyal iletiminin uyarılmasına kılavuzluk eder. Ayrıca anjiostatin endotel hücrelerinde fokal adezyon kinazın (FAK) aktivitesini uyarır ve artırır, bunun sonucunda hücre göçünün inhibisyonu ve apoptozisde artma meydana gelir. Anjiostatin geçici olarak integrinlerden bağımsız FAK aktivasyonuna sebep olur ki bu durum da VEGF ve FGF-2 tarafından uyarılan

fokal adezyon bağlantılarının düzenli döngüsünü ve endotel hücrelerinin yapışma alanlarının oluşumunu bozar (60,75).

Anjiostatinin primer tümör ve metastatik yayılım üzerinde antitümör etkilerini inceleyen önceki çalışmalarda deneysel olarak farelerde oluşturulan değişik tümörler üzerinde (62,73,77,78,80) yapılan farklı kringle alanlarına sahip anjiostatin uygulamalarının tümörlerin değişik oranlarda inhibisyonu ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Anjiostatinin dozlarındaki artış ile antitümör etkinlik arasında doğru orantılı bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalarda histopatolojik olarak tedavi grubu hayvanlarında tümör mikro damarlanmasının azaldığı tespit edilmiştir. Kolon kanseri ile ilgili çalışmalarda ise (79,81) değişik dozlarda anjiostatin hayvanlara farklı tarzlarda uygulanmış olup kolon tümörünün büyümesinin çeşitli derecelerde engellendiği bildirilmiştir.

Sonuç olarak anjiostatin sistematik olarak verildiğinde tümör gelişimini çok güçlü bir şekilde inhibe ettiği, metastatik ve pimer tümörlerin proliferasyonu ve apoptoz dengelerini sağlayarak tümörleri hareketsiz durumda tuttuğu bildirilmiştir (41,43,67). Anjiostatinin tümör mikrodamarlanmasındaki endotel hücre proliferasyonunu baskılayarak değil; endotel hücrelerinde ve endotel prekürsör hücrelerinde apoptozu indükleyerek aktivitesini ortaya koyduğunu gösteren çalışmalar vardır (82). Ayrıca anjiostatinin endotel migrasyonu, invazyonu ve tüp oluşumunu inhibe ettiği in vitro olarak gösterilmiştir (72,75).

2.4. KALIN BAĞIRSAK MORFOLOJİSİ

2.4.1. Anatomisi ve Embriyolojisi

Farelerin bağırsakları yaklaşık 40 cm uzunluğunda olup ince ve kalın bağırsaktan oluşur. İnce bağırsak duodenum, jejunum ve jejunioileum olmak üzere 3 bölüme ayrılır. Duodenum mideden başlar ve at nalı şeklindedir. Duodenumun devamı olan jejunum ince bağırsağın en uzun bölümüdür. Bu iki bölümü jejunioileum takip eder ve çekumda son bulur. Kalın bağırsağın bir bölümü olan çekum küçük bir çanta şeklinde olup, fossa iliacada abdominal boşluğun sağ alt tarafında bulunur. Kolon ise, çekumdan başlayan çıkan bölüm, daha sonra devamında kısa bir transvers bölüm ve sonunda inen bölüm olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Bağırsağın son bölümü rektum olup kolonun inen parçası ile anüs arasında uzanır (83).

Sindirim sistemi anatomik olarak ağız, sindirim kanalı ve buraya açılan bezlerden oluşur. Sindirim borusunun embriyonal dönemdeki ilk şekli ilkel bağırsak olarak adlandırılır. Bu yapı embriyoda ağız boşluğu ile anüs arasında endodermal bir epitelle döşeli bir kanal biçimindedir (84). Kemirgenlerde bu kanalın gelişimi iki somitli (9-10 gün) evrede başlar (85). Karın bölgesinde sindirim kanalı embriyo dışındaki vitellus kesesi ile bağlantılıdır. İlkel bağırsak embriyonun baş ve kuyruk bölümünde ektodermal kökenli girintilerden membranlarla ayrılmıştır. Embriyonun baş kısmındaki girinti (stomodeum) ilkel ağız boşluğudur. Kuyruk kısmındaki girintiden (proktodeum) anüs gelişir. İlkel bağırsağın ilkel ağız boşluğu ile arasında bukkofarengal membran, proktodeumla son bağırsak arasında kloakal membran yer alır. Bu membranlar daha sonra yırtılır. Başlangıçta oluk şeklindeki ilkel bağırsak gelişme periyodunda boru haline gelir ve vitellus kesesi ile olan bağlantısı vitellus kanalı (duktus omfaloenterikus) ile devam eder. Daha sonra bu kanal da körelir (84).

İlkel bağırsak bulunduğu bölgeler ve kanlanmasına göre bölümlere ayrılarak tarif edilir. Foregut truncus coeliacus, midgut a. mesenterica superior ve hindgut a. mesenterica inferior tarafından kanlanır. Kemirgenlerde foregut ve hindgut 11 günde görünür hale gelir (85).

a) Foregut (baş bağırsak): Foregutun ilk kısmı olan yutak bölümü bukkofarengal membran ile trakea divertikülü arasında yer alır. Bu bölümden yüz ve boyun bölgesinin kemik ve kas yapıları, tiroid, paratiroid, timus ve tonsilla gibi önemli yapılar gelişir. Foregutun geri kalan bölümü trakea divertikülü ile karaciğer divertikülü arasında olup bu bölümden, trakea ve akciğer tomurcukları, özefagus, mide, pankreas, karaciğer, safra yolları ve duodenumun koledok kanalının açıldığı noktaya kadar olan bölümü gelişir (84). Kemirgenlerde ilk karaciğer tüberkülü ve dorsal pankreas 11 günlük evrede görülür ve 12. günde mekik şeklindeki mide sagittal pozisyonudadır. On dokuzuncu günde özefageal epitel keratinizasyonun ilk belirtilerini verir. Yirmi birinci günde özefagus epitelinde silyalı hücreler bulunabilir (85).

b) Midgut (orta bağırsak): Primitif bağırsak halkasını oluşturur ve koledokun duodenuma açıldığı noktanın altında kalan duodenal parçadan, transvers kolonun 2/3 proksimal ve 1/3 distal parçalarının birleşim yerine kadar devam eder. Bu bölümden duodenumun distal kısmı, jejunum, ileum, çekum, apendiks vermiformis, çıkan kolon ve transvers kolonun proksimal 2/3'lük kısmı gelişir (84,86). Kemirgenlerde 19. günde

ince bağırsaklar ana lümendeki çok katlı epitel içinde sekonder lümenin oluşması, yüzeyel epitel hücrelerinin dökülmesi ve mezenşimal büyüme ile villuslu bir yapı kazanır (85).

c) Hindgut (son bağırsak): Transvers kolonun 1/3 distalinden anal kanalın üst kısmına kadar olan sindirim sistemi bölümü arka bağırsaktan gelişir. Son bağırsağın genişleyen distal bölümüne kloaka adı verilir ve bu oluşum kemirgenlerde 11. günde görülmeye başlar. Kloakanın ürorektal membran ile bölünmesiyle, ürogenital sinüs ve anorektal bölüm ortaya çıkar. Bu bölünme süreci kemirgenlerde 12. günde başlar ve 15. günde tamamlanır. Kloakal membranın yırtılması ile de bu iki bölüm dış ortama açılır. Ürogenital sinüsten mesanenin ve uretranın epiteli gelişir (84-86). Kemirgenlerde bağırsakların gelişim sürecinde bağırsak kıvrımları 13. günde geniş umbilikal açıklık boyunca extraembriyonik coelom'a doğru çıkıntı yaparlar (fizyolojik herniasyon) ve bu herniasyon 17. günde gerilemiş gibi gözükür (85).

Sonuç olarak sindirim sisteminin epiteli ve türevlerinin parankimi endodermal; bağ ve kas dokusu ve peritoneal elemanları da mezodermal kaynaklıdır. Bağırsak ve türevleri bağırsak endodermi ile çevresindeki mezodermin karşılıklı etkileşimiyle farklılanırlar (86).

2.4.2. Histolojik Yapısı

Kalın bağırsaklar anatomik olarak çekum, kolon ve rektum adı verilen bölümlerden oluşur. Kolon histolojik olarak 4 tabakaya ayrılır (Şekil 2.4).

1-Tunika mukoza: Lamina epitelyalis, lamina propria ve lamina muskularis mukozadan oluşur. Kalın bağırsakların lümenini çevreleyen mukozada ince bağırsaklarda görülen plikalar ve villuslar bulunmaz. Yüzey epiteli tek katlı prizmatik tipte olup hücrelerinin apikal yüzeyinde mikrovilluslar yer alır. Mukozanın özelliği lümenin düzgün olması ve Lieberkühn kriptaları (intestinal bezleri) içermesidir (84).

a) Lamina epitelyalis: Tek katlı prizmatik epitelden oluşur ve esas görevi olan su emilimi, dışkı oluşturulması ve mukus üretimi için çok uygun bir yapıya sahiptir. Mukus oldukça sulu bir jeldir ve sadece bağırsak yüzeyini kayganlaştırmakla kalmaz, bakteri ve partiküllerin üzerini de örter. Bezleri ve lieberkühn kriptalarını saran bez epiteli emici hücrelerden ve ağırlıklı olarak goblet hücrelerinden, kök hücrelerden ve aralara serpiştirilmiş olan enteroendokrin hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 2.4), (87,88).

Emici hücreler (absorptif hücreler), su ve iyonların bağırsak lümeninden emilip alttaki bağ dokusuna taşınmasını sağlar. Uzun prizmatik hücrelerdir ve her birinin bazal yarısında tek bir oval nukleus bulunur. Apikal yüzeyleri absorpsiyon için özel farklılaşma gösterir ve her bir hücrenin ucunda fırçamsı (çizgili) kenar adı verilen homojen bir tabaka vardır. Elektron mikroskobunda incelendiğinde fırçamsı kenarın yoğun bir mikrovillus tabakasından oluştuğu görülür (87). Mikrovilli yüzeyinde lümeneye doğru glikoprotein-polipeptid kompleksinden oluşan koruyucu bir yüzey tabakası bulunur; glikokaliks denilen bu yapı koruyucu fonksiyonunun yanı sıra sindirimin son aşamasında absorpsiyonu sağlayan bazı enzimler içerir. Sindirim ürünleri çizgili kenar aracılığı ile hücreye girer ve hücrelerin yan alt yüzeylerinden geçiş yaparak epitel altındaki bağ dokusu vasıtasıyla kapillere ulaşırlar (Şekil 2.4), (84,89).

Goblet hücreleri, bağırsak lümeninde yüzey epitelinin emici hücreleri arasında yerleşmiş mukus salgılayan hücrelerdir. Bu hücreler duodenumdan kolona doğru giderek artan sayıda bulunur. Salgı ürünü musinojen teknik işlemler sırasında suda eridiğinden ışık mikroskobunda rutin boyalarla yapılan incelemelerde salgı granüllerinin yeri boşalmış gibi görülür. Goblet hücrelerinin iki ana alanı vardır: (1) epitel yüzeyine salınan geniş mukus granülleri içeren kupa ya da kadeh şeklindeki apikal alan ve (2) bazal laminaya tutunmuş olan ve mukusun protein kısmının oluştuğu kaba yüzeyli endoplazmik retikulumu içeren dar bir bazal alan. Goblet hücrelerinin salgı ürünü ekzositoz ile salınan glikoproteinleri içerir. Epitelin yüzeyinde mukus, epiteli mekanik aşınmaya ve bakteri istilasına karşı kalkan olarak koruyan koruyucu jeli oluşturmak üzere su ile karıştır (Şekil 2.4), (84,88).

Enteroendokrin hücreler sindirim kanalı mukozasında yüzey epitel hücreleri arasında, apikal yüzeyleri yer yer lümeneye uzanan hücrelerdir. Bu hücrelerin salgıları salgı epiteli ve kas gibi dokuları etkiler. Salgıları etkileyeceği hücre membranındaki reseptörlere bağlanarak etkin olurlar. Endokrin ve parakrin fonksiyonlu olan hücrelerin gövdesi yüzey epitel hücrelerinin arasında bazala yakın konumda bulunur ve dar bir apikal sitoplazma ile lümeneye uzanır. Çekirdekleri yuvarlak ve kromatinden yoksundur. Bu tip hücrelerde iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum, Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondriyon bulunur. Sindirim kanalı boyunca değişik tipte madde salgılar. Hücrelerin tipik özelliği bazal sitoplazmada membranla çevrili değişen büyüklük ve sıklıkta granüller içermesidir (Şekil 2.4), (84).

Bağırsaklarda yüzey epitel hücreleri ve kripta hücreleri belirli bir zaman periyodu içinde devamlı olarak **kök hücrelerinin** mitozu ile oluşan hücreler tarafından yenilenmektedir. Bu kök hücreler kalın bağırsak kriptalarının alt 1/3'ünde yerleşmiştir. Hücreler bu yenilenici bölgelerden olgunlaşma alanına doğru hareket ederler. Bu alanda yapısal ve enzimatik olgunlaşma sonucunda diğer hücreleri meydana getirirler (Şekil 2.4), (87).

b) Lamina propria: Gevşek bağ dokusundan oluşan lamina propria lenfoid sisteme ait hücreler ve foliküller içerir. Lenfoid hücre kümeleri ve foliküller çoğunlukla submukozaya kadar uzanır. Lenfoid dokunun oldukça fazla olması kalın bağırsakta aşırı derecede yüksek bir bakteri popülasyonunun bulunmasına bağlıdır. Yüzey epitelinin bazal laminası altında kollajen ve proteoglikan içerikli bir tabaka bulunur. Bu yapı intestinal bezler çevresindeki fibroblastlar tarafından salgılanır, görevi ise epitelden venöz sisteme geçen su ve elektrolitlerin geçişini düzenlemektir (Şekil 2.4), (84,87).

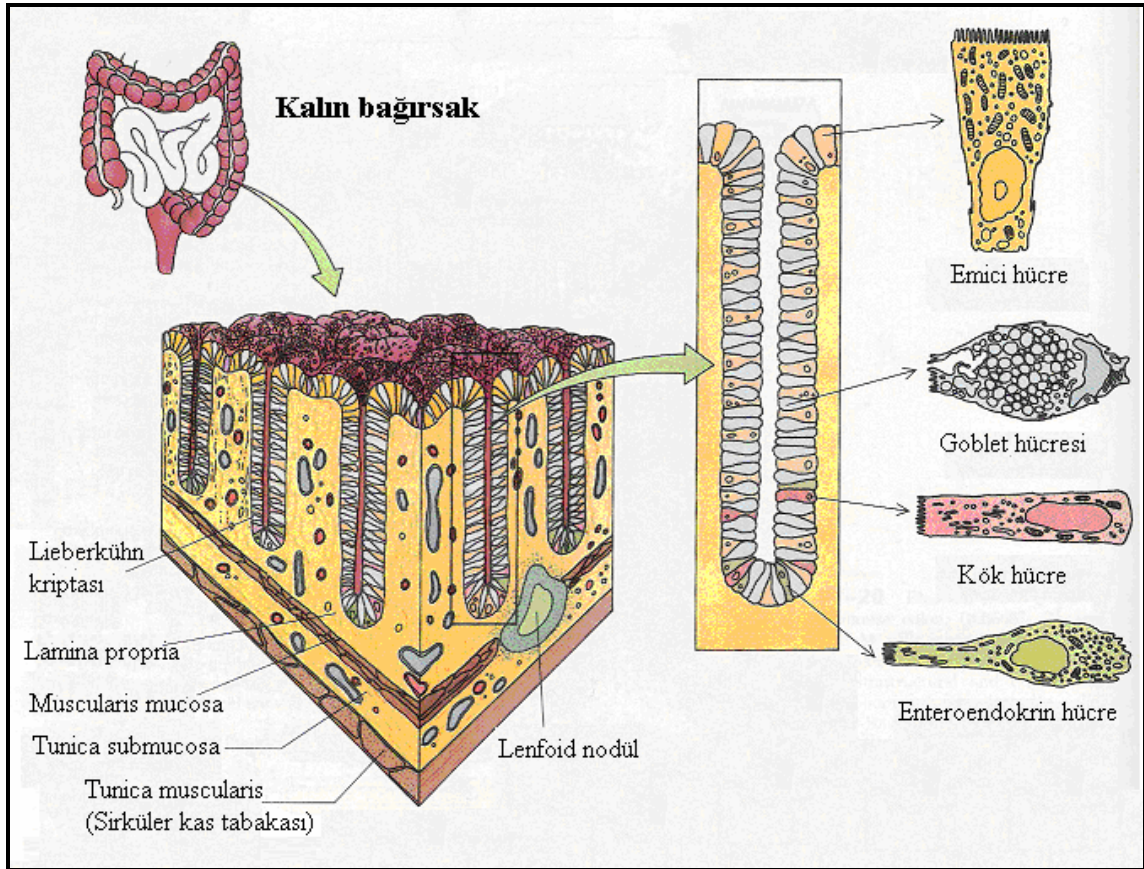
c) Lamina muskularis mukoza: Mukozanın dış katı olup içte sirküler dışta longitudinal düz kas hücrelerinden oluşur. Kasların kontraksiyonları sinir pleksusları tarafından yönetilir ve böylece organdaki içerik karıştırılır ve ileri doğru itilir . Ayrıca bu kasların ritmik kasılmaları mukus salgısının artırılmasını sağlar (Şekil 2.4), (87,90).

2-Tunika submukoza: Çok sayıda kan ve lenf damarları ve submukozal sinir pleksusu (Meissner pleksusu) içeren sıkı bağ dokusundan oluşmuştur. Aynı zamanda lenfoid doku da içerebilir. Bu tabaka yağ hücreleri bakımından oldukça zengindir (Şekil 2.4), (87,91).

3-Tunika muskularis: İki tabakadan oluşmakta olup lümeneye yakın iç tabakada kasların yönü sirküler, dış tabakada ise longitudinaldir. Dış tabaka kalın bağırsağa özgü yapı sergilemekte olup, taenia coli ismi verilen ve üç tipi bulunan kalın uzunlamasına seyreden bant şeklindedir. Taenia coli'lerin ve sirküler kas tabakasının kasılmaları, kolonda haustra olarak adlandırılan cepçikleri oluşturur (88). Kalın bağırsağın iç yüzünde de yarım ay şeklinde kıvrımlar gözlenir. Bunlar plika semilunaris adını alır. Ancak, bu plikalar ince bağırsaktaki plika sirkularis'lerden farklı olarak sabit şekilli olmayıp, longitudinal kasın varlığına tabidir ve iki taenia arasında uzanır. Eğer kas gerginliği önlenirse, bu yarım ay şeklindeki plikalar da kaybolur (91). Sirküler ve longitudinal kas tabakaları arasında otonom sisteme ait sinir pleksusu (Auerbach) bulunur. Meissner ve Auerbach pleksus'larının nöronları, içsel uyarıyı kalın bağırsağın mukozasından ve kas tabakasından alırken, dış uyarıyı merkezi sinir sisteminden

parasempatik (nervus vagus) ve sempatik sinir trunkusları aracılığı ile almaktadır. Kas kasılması iki amaca yönelik yapılır; bunların ilki içeriğin karıştırılması ve hareketlendirilmesi, diğeri ise bağırsağın içeriği ileri doğru atma amacını güder (Şekil 2.4), (88).

4-Tunika seroza: Sindirim kanalında en dış tabakayı oluşturur. Seröz tabaka tek katlı yassı epitel (mezotel) ve altında ince bir bağ dokusundan oluşur. Sindirim kanalının ve bazı organların dışını döşeyen bu tabaka visseral periton olarak adlandırılır. Seröz tabaka kan damarlarından sızan bir sıvıyla organlar arası nemli ve kaygan bir ortam oluşturur (84).



Şekil 2.4. Kalın bağırsağın histolojik görünümü (89).

2.5. KALIN BAĞIRSAĞIN TÜMÖRLERİ

Bağırsak tümörleri tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir. Rektum da dahil olmak üzere kolon, vücuttaki diğer organlardan daha fazla primer neoplazmın kaynak noktasıdır. Kolorektal kanserler ölümcül kanserler arasında, bronkojenik kanserlerden sonra ikinci sırada gelmektedir. Amerikalıların %5'inde kolorektal kanser gelişmekte ve bu kişilerin %40'ı bu hastalıktan ölmektedir. Adenokarsinomlar, kolorektal karsinomların büyük çoğunluğunu, gastrointestinal yoldan kaynaklanan tüm kötü huylu tümörlerin ise % 70'ini oluşturmaktadır (92).

2.5.1. Kolon Kanserlerinin Histolojik Sınıflandırılması

I) Epitelyal Tümörler

A) İyi huylu (benign)

- 1) Adenom a) Tübüler b)Villöz c)Tübülo-villöz
- 2) Polipozis sendromları

B) Kötü huylu (malign)

- 1) Adenokarsinom
- 2) Müsinöz adenokarsinom
- 3) Taşlı yüzük hücreli karsinom
- 4) Yassı hücreli karsinom
- 5) Adenoskuamöz karsinom
- 6) İndiferansiye karsinom
- 7) Sınıflandırılmamış karsinom

II) Karsinoid Tümörler

III) Epitelyal Olmayan Tümörler

IV) Hemopoetik ve Lenfoid Neoplazmalar

V) Sınıflandırılmamış Tümörler

VI) Sekonder Tümörler

VII) Tümör Benzeri Lezyonlar (93).

2.5.2. İyi Huylu Epitelyal Tümörler

Polip ve polipoid lezyonlar içi boş organlarda lümen kabaran, yer kaplayan lezyonlardır. Patolojik açıdan polip iyi huylu ve kötü huylu mukozal gelişimler için kullanılırken, polipoid lezyon olarak tanımlananları iltihabi kitle, hamartom ve submukoza veya kas tabakasından kabaran tümörleri kapsar. Kolorektal polipler alışkanlık olarak iki major grupta kategorize edilir, bunlar (1) nonneoplastik ve (2) neoplastiktir. Bütün epitelyal polipler kolon mukoza bezlerindeki kriptlerin derinindeki hücrelerden kaynaklanır. Normal olarak kolon mukozasındaki hücre bölünmesi kriptin en derin üçte birinde sınırlıdır. Muhtemelen epitelyal polip oluşumunda hücre bölünmesini kontrol eden mekanizma bozulur ve hiperplastik veya neoplastik lezyon oluşumuna yol açar. Böylece kript hücrelerinin hafifçe genişlediği zonda gelişim kontrolündeki bazı kayıpların hiperplastik poliplere yol açtığı ileri sürülür. Tüm kript boyunca kontrolün daha fazla kaybı neoplastik poliiple sonlanır. Nonneoplastik polipler kolon tümörleri sınıflandırılmasında tümör benzeri lezyonlar grubu içinde yer alır. Bunların çoğu mukoza üzerinde küçük, meme başı benzeri, yarım küre şeklinde, düzgün çıkıntılar olarak izlenen hiperplastik poliplerdir. Tek tek görülebilirler fakat genelde çok sayıda olurlar. Histolojik olarak, bu polipler iyi diferansiye goblet hücreleri ya da absorptif epitel hücreleri ile döşeli, dar lamina propria ile birbirlerinden ayrılan çok sayıda kripta içerir. Hiperplastik poliplerin büyük çoğunluğu kötü huylu olma özelliğine (malignite) sahip değildir (92,94).

2.5.2.1. Adenomlar

Adenomlar, genelde saplı küçük tümörlerden, çoğunlukla sapsız büyük lezyonlara kadar değişen çeşitli yapı ve büyüklüklerde neoplastik poliplerdir. Adenomatöz polipler epitelyal karakterleri temel alınarak 3 gruba ayrılmıştır (92).

2.5.2.1.1. Tübüler Adenom

Kolonun herhangi bir bölgesinden kaynaklanabilir. Vakaların yaklaşık yarısında lezyonlar tek tek gözlenirken, geri kalanında ise iki veya daha fazla lezyon bir arada bulunur. Adenomların en küçük olanları sesil olup çapları 0.3 cm'yi geçmez. Daha büyük olan tübüler adenomların çapları ise 2.5 cm'ye ulaşabilir. Bunların bir çoğu 1-2 cm uzunluğunda ince bir sapa ve çilek benzeri başa sahiptir. Histolojik olarak sap normal kolon mukozası ile döşelidir. Fakat baş kısmı, hiperkromatik nükleuslu, yer yer düzensiz, musin sekresyonu yapan ya da yapmayan, yüksek hücreler ile döşeli,

dallanmalar gösteren bezler meydana getiren neoplastik epitelden oluşur. Bazı durumlarda, villöz yapının görüldüğü küçük odaklar mevcuttur. İyi huylu yapıdaki bir lezyonda dallanmalar gösteren bezler lamina propria tarafından birbirinden ayrılmış olup displazinin derecesi düşüktür (92).

2.5.2.1.2. Villöz Adenom

Muskularis mukozaya doğru ilerleyen epitelle örtülü lamina proprianın künt veya parmak benzeri uzantılarından oluşan benign tümördür. Pedinküllü olmaktan ziyade sıklıkla sesildir ve geniş tabana oturur. Kadifemsi ve karnabahar benzeri bir yüzeye sahip olan çevre mukozadan 1-3 cm kadar çıkıntı meydana getiren kitleler şeklindedir. Üzerinde bağırsak villuslarını andıran bir çok çıkıntı vardır. Bu çıkıntılar bir sıra silindirik epitel ile örtülmüştür. Bu hücreler, bağırsağın diğer kısımlarındaki normal mukoza hücrelerine göre daha az mukus salgılar. Bu lezyonlarda displazinin bütün dereceleri görülebilir. Lezyonların %40'ında invaziv karsinoma rastlanır. Karsinom sıklığı polibin boyutları ile yakından ilişkilidir (92,95).

2.5.2.1.3. Tübülovillöz Adenom

Tübüler ve villöz adenom bulgularının kombinasyonunu içerir. Bir sapa sahip olma sıklıkları, boyutları, displazi derecesi ve intramukozal ya da invaziv karsinom taşıma riski açısından bakıldığında, bu lezyonlar tübüler ve vilöz adenomlar arasında ara bir forma sahiptirler. Villöz komponent %20-25'ten fazla ve %50'den azdır. %20-25'den daha az villöz yapı varsa tübüler adenom, % 50'den fazla villöz yapı varsa villöz adenom olarak değerlendirilir. Histolojik görünümü belirgin iyi huylu tübüler adenomdan villöz sahalarda invaziv karsinoma kadar giden geniş bir spektrum arasında değişir (92,94).

2.5.3. Kötü Huylu Epitelyal Tümörler

Kolon kanserleri hem erkek ve hem de kadında oldukça sık görülen bir kanser türü olması nedeni ile önemli onkolojik sorunlardan biridir. Kolon ve rektumun kötü huylu tümörlerinin ortalama %98'i histolojik olarak karsinom özelliğinde yani epitelyal kökenlidir (93,96).

2.5.3.1. Kolorektal Kanser İnsidansı

Kolorektal karsinomaların insidansı 60-70 yaşlarında en yüksek düzeyine ulaşır. Hastaların %20'sinden daha azı 50 yaşın altındadır. Genç bir hastada kolorektal kanser tanısı konulduğunda, bu hastada daha önceden ülseratif kolit veya polipozis sendromlarından birinin varlığından şüphelenilmelidir (92). Kolon kanseri kadınlarda, rektum kanseri ise erkeklerde daha sık görülmektedir. Erkekler kadınlara göre biraz daha fazla yaşa bağlı ölüm oranına sahiptir (96).

Kolorektal kanserlerin görülme sıklığı coğrafi bölgelere göre bir hayli değişiklik göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri , Avusturalya, Yeni Zelanda, İskandinavya ve batı Avrupa'da sık görülürken, Asya ve Afrika ülkelerinde daha az görülmektedir (97).

Kolorektal kanserlerin gelişiminde hastalığın insidansında görülen bölgeler arasındaki farklılıklar coğrafik yatkınlığa işaret ederken, farklı hayat tarzlarının hastalık üzerindeki etkisi çevresel faktörlerin etkinliğini göstermektedir (97).

2.5.3.2. Etiyolojisi

Kolorektal kanserlerin etiyolojisi tam anlamıyla bilinmemekle beraber bazı faktörlerin kolorektal kanser oluşumu ile ilgili olduğu bilinmektedir.

2.5.3.2.1. Diyetle Bağlı Faktörler

Diyetle ilgili en çok dikkati çeken faktörler;

1) emilmeyen bitkisel liflerden fakir içerik, 2) buna karşılık zengin birleşmiş karbonhidrat içeriği 2) yüksek yağ miktarı 4) A, C ve E vitaminleri gibi koruyucu vitaminlerin az tüketimidir. Düşük lif içeriğinin, dışkı hacminin az olmasına, dışkıının bağırsakta kalma süresinin uzamasına ve bağırsaktaki bakteriyel floranın değişmesine yol açtığı öne sürülmektedir. Bakteriler tarafından parçalanan karbonhidratların; potansiyel olarak toksik olan oksidatif ürünleri, dışkı içinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve kolon mukozası daha uzun süreyle bunlara maruz kalır. Dahası yüksek yağ tüketimi karaciğer tarafından kolesterol ve safra asitleri üretimini artırır. Bunlar; intestinal bakteriler tarafından potansiyel karsinojen maddelere dönüştürülebilir. Ayrıca antioksidan vitaminler A, C ve E kemoprotektif ajanlar olarak kullanılabilir. Antioksidanlar reaksiyonlarda oluşan serbest radikalleri inhibe ettikleri için DNA'yı oksidan hasardan koruyabilir (92,98).

2.5.3.2.2 Yaşam Tarzı ile İlgili Faktörler

Vücut yapısını kolorektal kanserle ilişkili olduğu ve şişmanlıkla kolorektal kanser arasında korelasyonun olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Hayvanlarda yapılan çalışmalar kalorik sınırlamanın sıçan ve farelerde tümör oluşumunu azaltabileceğini göstermiştir (99). Sigara kullanımı da kolorektal kanser için bir risk faktörüdür. Yapılan prospektif çalışmalar uzun süre sigara içme ile kolorektal kanser riskini arttığını göstermektedir. Bunlara ilaveten boş zamanlarda yapılan aktivite ve mesleki aktivitenin her ikisi de kolorektal kanser riski açısından önem arz etmektedir. Fiziksel aktivitenin kolorektal kanser için önleyici etkisi kolonik motiliteyi artırmasından dolayıdır. Egzersiz kolon içeriğinin geçiş süresini hızlandırarak intestinal içerikteki potansiyel kanserojenlerin kolon mukozasına temasını azaltmaktadır (98).

2.5.3.2.3. İlaçlar

Aspirin ve diğer nonsteroidal antiinflamatuar ilaçların (NSAİD) kullanımının kolorektal kanser riskini azalttığı bilinmektedir. Bu ilaçların ne tür bir mekanizma ile kanseri engellediği tam olarak anlaşılamamıştır. Bu olayda etkin olabilecek muhtemel mekanizmalardan bazıları, tümör hücrelerinde apoptozun başlatılması ve anjiogenezisin engellenmesi olabilir. Anjiogenezisin siklooksijenaz-2 enziminin inhibe edilmesi yoluyla engellendiği düşünülmektedir. Prostaglandin sentezi yolunda yer alan bu enzim VEGF üretimini hızlandırarak anjiogenezisi sağlamaktadır (92,100).

2.5.3.2.4. Kalıtsal Faktörler

Çevresel faktörlerin yanı sıra kalıtsal faktörlerde kolorektal kanserlerin gelişiminde önemli bir rol oynar. Familial polipozis veya ailesel adenomu olanlarda kanserin daha sık görüldüğü bilinmektedir. Kalın bağırsak kanserlerinin % 5-10'u ailesel eğilimli olan kişilerde görülür. Bu tür kansere yakalanan kişilerin yaklaşık 1/3'ünün birinci derecedeki akrabalarında kanser vardır. Bu bulgu genetik eğilimi göstermektedir (96). Familial adenomatöz polipoziste profilaktik kolektomi yapılmayanların hepsinde kolorektal kanser gelişir. Kolorektal kanser riskinin arttığı diğer bir kalıtsal sendrom da herediter nonpolipoid kolorektal kanserdir (98).

2.5.3.3. Kötü Huylu Epitelyal Tümör Çeşitleri

Kolorektal karsinomaların % 95'i adenokarsinom olup değişik mikroskopik tipler gösterir (95).

2.5.3.3.1. Adenokarsinom

Tübüler, asiner veya papiller yapılar içeren bez epitelinin kötü huylu tümörüdür. Kolon ve rektum karsinomalarının çoğu uniform yapıya sahip olup mukus salgılar. Adenokarsinomda genellikle az sayıda, dağınık paneth ve argentaffin hücreler bulunur .

2.5.3.3.2. Müsinöz Adenokarsinom

Tümörde genellikle makroskopik olarak görülebilen belirgin miktarda müsinin olduğu adenokarsinomdur. İki gelişim manzarası ile karşılaşılabılır. Bezler ve interstisyel aralıkta müsin vardır veya müsinle çevrili hücre grubu ve zincirleri bulunur. Sıklıkla tümör her iki gelişim manzarasını gösterebilir.

2.5.3.3.3. Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom

Mukusla dolu izole taşlı yüzük hücrelerinin belirgin olduğu kötü huylu tümördür.

2.5.3.3.4. Yassı Hücreli Karsinom

Tamamen yassı hücrelerden oluşan kolon tümörü olup çok az görülür.

2.5.3.3.5. Adenoskuamöz Karsinom

Bazı kanserler, özellikle anüse bitişik distal kolondakiler, yassı hücre diferansiyasyon odaklarına sahip olup bu nedenle adenoskuamöz karsinom olarak isimlendirilir.

2.5.3.3.6. İndiferansiye Karsinom

Belirgin bez yapısının bulunmadığı kötü huylu epitelyal tümördür. Mukus salgısı gibi hücre tipini gösteren diğer bulgular yoktur. Muhtemelen nöroendokrin hücrelerden kaynaklanan küçük hücrelerden oluşur. Böyle neoplazmalar değişik hormonal sekretör ürünler salgılar.

2.5.3.3.7. Sınıflandırılmamış Karsinom

Yukarıdaki kategorilerin hiçbirine girmeyen karsinomlar için kullanılır (94).

2.5.3.4. Kolorektal Kanserlerin Patolojisi

Kolon tümörleri denince akla adenomlar ve kolorektal karsinomlar gelir. Karsinomlar çoğunlukla tek başına oluşup sıklıkla kaynaklandıkları adenomatöz lezyonu yok eder. Birden fazla karsinom mevcut ise, bunlar genellikle kolunun değişik bölgelerinde ve birbirlerinden uzakta yerleşir. Bütün karsinomlar in situ lezyonlardan gelişmelerine rağmen, değişik morfolojilere sahiptir. Proksimal kolon yerleşimli tümörler polipoid ve mantarimsı kitleler halinde büyüme eğilimindedir. Distal kolondaki karsinomlar duvarı çevreleyen anüler lezyonlar olup bağırsağı halka şeklinde çevreleyerek lümende daralmaya sebep olur. Neoplazmın bu iki formu da zaman içerisinde direkt olarak bağırsak duvarını geçer ve serozal yüzeyde sert kitleler halinde kendini gösterir (92). Kolorektal karsinomaların gelişimde 3 evre olduğu bildirilir. Bu evreleri şematik olarak şöyle göstermek mümkündür (96).

Preneoplastik evre: Normal mukoza→hiperproliferatif mukoza→displazi

↓

Prekanseroz evre: Tübüler adenom→tübülovillöz adenom→villöz adenom

↓

Karsinom evresi: İn situ karsinom→invaziv karsinom→Metastaz

Histolojik olarak intestinal adenokarsinomlar çok iyi (%25) ile orta (%60) arasında diferansiyasyon sergileyen glandular tümörlerdir. Çok iyi diferansiye olan karsinomalarda intraglandular papiller katlanmalar mevcuttur. Bağırsağın adenokarsinomlarının %15'i az diferansiye veya indiferansiyedir. Bu tümörler sıklıkla genişçe büyüme ve solid nodüler kitleler oluşturur. Büyümenin iki modeli vardır; bunlar genişleme ve infiltrasyondur. Genişleyerek büyüme modeli geniş birbiri ile bağlantılı bezler tarafından oluşturulan nodüler tümör toplanması ile karakterizedir. Bir çok tümörde dallanma gösteren bezler çeşitli sayıda lenfosit hücrelerinin bulunduğu, hücrel fibröz dokunun araya girdiği, gevşek sarılmış bir ağ oluştururlar. İnfiltratif büyüme modeli, çok az şekilde köprüsel bağlar içeren dar tübüler bezler ve bu bezlerin bağırsak duvarına bireysel ve küçük gruplar halinde invazyonu ile karakterizedir. İyi diferansiyeden, tamamen indiferansiye olanlara kadar kolon karsinomları gerçekte anaplastik kitlelerdir. İndiferansiye hücrelerden oluşan kötü huylu neoplazmalara anaplastik adı verilir. Diferansiyasyon kaybı veya anaplazi malignitenin önemli özelliği olarak kabul edilir. Anaplastik hücreler belirgin pleomorfizm gösterir. Karakteristik

olarak çekirdek aşırı derecede hiperkromatik ve büyüktür. Çekirdek sitoplazma oranı 1:1 boyuta yaklaşabilir. Komşularından daha büyük dev hücreler oluşabilir ve dev boyutlu tek çekirdek veya çok sayıda çekirdek içerebilir. Anaplastik çekirdek değişken olup boyut ve şekilleri farklıdır. Kromatin kaba ve kümeli. Çekirdekçik şaşırı boyutta olabilir. Daha önemli olarak mitozlar sıklıkla çok sayıda ve belirgin derecede atıktır, bazen tripolar veya kuadripolar anarşik çoklu demetler şeklinde görülebilir. İntamukozal karsinoma da tümör hücreleri lamina propria'nın mukozal stromasına invaze olur. İnflamatuvar ve dezmoplastik bir reaksiyon olabilir. İnvaziv kanser, tümör hücrelerinin muskularis mukozasının ötesine submukoza'ya invaze oldukları zaman teşhis edilir (92,101).

2.5.3.5. Kolorektal Karsinomunun Evrelendirilmesi

Rektal karsinomalar ilk kez 1932 yılında Dukes tarafından evrelendirilmiş ve daha sonra aynı sistem kolon karsinomaları içinde kullanılmıştır. Bu evlendirme kolorektal karsinomalarda prognozu belirleme açısından önemlidir. Dukes sınıflandırmasını A, B ve C olmak üzere üç evreye ayırmıştır. Daha sonra Dukes sınıflandırılması yeniden modifiye edilmiştir (Aster-Coller modifikasyonu). En sık kullanılan modifiye Dukes sistemi aşağıdaki gibidir (Tablo 2.3), (93,96).

Tablo 2.3. Dukes sınıflandırması

Dukes Tipi	Neoplazmın Yerleşimi
A	Mukoza ile sınırlı.
B	Tüm bağırsak duvarı tutulumu olup lenf nodu metastazı yoktur.
B1	Muskularis propriaya ilerlemiş, fakat duvarı bütünüyle penetre etmemiş ve lenf nodu tutulumu yok.
B2	Tüm duvar infiltrate, lenf nodu tutulumu yok.
C	Lenf nodu metastazı vardır. Bağırsak duvarı tutulum derinliğine bakılmaz.
C1	Duvara sınırlı, lenf nodu tutulumu var.
C2	Duvarın tüm tabakalarını tutmuş, serozaya yayılmış, lenf nodu tutulumu var.
D	Metastaz var.
D1	Komşu organlara invazyon var.
D2	Uzak metastaz var.

2.6. DİSPLAZİ

Genel tanımlamayla displazi basitçe anormal büyüme anlamına gelir. Prekanseroz lezyon olarak displazi belirli hüresel ve yapısal değişimlerle tanımlanmış dokudaki anormal durumlar olarak tarif edilir. Displazi kötü huylu tümöre dönüşüm eğilimindedir. Displazinin asıl histolojik özelliği olgunlaşmamış hücrelerin sayısında artış ile sonuçlanan aşırı hücre çoğalmasdır. Hücreler pleomorfizm, şekil ve boyutlarında farklılıklar, artmış nükleus sitoplazma oranı ve az hüresel farklılaşma sergiler. Yalancı tabakalaşma ve mitoz yaygındır. Fakat dev (iri) nükleuslar ve anormal mitoz yoktur. Mitozlar sıklıkla epitelde anormal yerleşimler gösterir. Displazi terimi açık bir şekilde anormal olan bezler için de atfedilebilir. Bezler tomurcuklanma, dallanma ve toplanma ile beraber yapısal bir düzensizlik gösterir. Şiddetli displazide ise hem yapısal hem de hüresel değişiklikler görülür. Yapısal olarak kript'ler düzensiz dallanma ve tomurcuklanma gösterdikleri gibi delikli veya arka arkaya yapışık örnekler sergiler. Sitolojik olarak nükleus büyük bir oranda genişler. Nükleus kese şeklinde veya yuvarlak olup hiperkromatiktir. Mitotik şekillenme göze çarpar ve bazıları anormaldir. Nekrozis alanları mevcut olabilir ve sitoplazmik musin üretimi yoktur veya azalmıştır.

Displastik değişimler belirgin olup epitelin tüm kalınlığını tuttuğu zaman, lezyon kanserin ilk preinvaziv evresi olan karsinoma in situ adını alır. Displastik değişiklikler sıklıkla kanseroz değişim odaklarına bitişiktir. Adenom'lar tanımlamalarında displazinin çeşitli derecelerini sergiler (92,101).

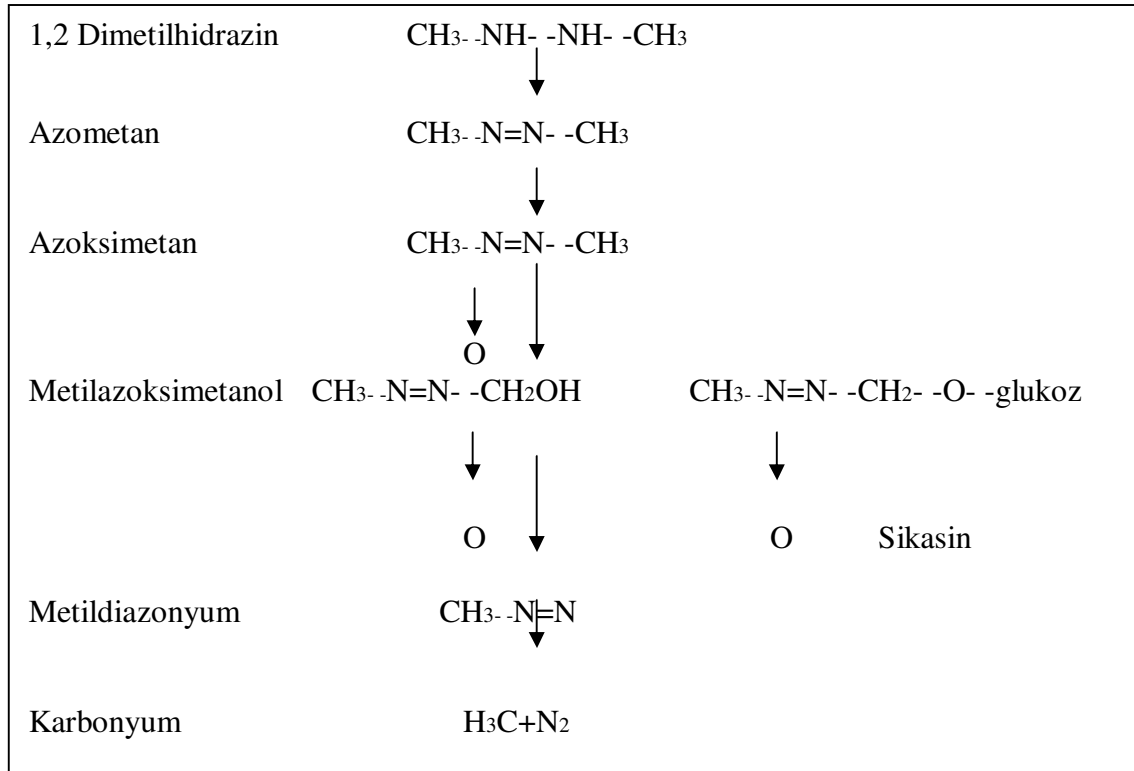
2.7. KİMYASAL MADDELERLE DENEYSSEL KANSER OLUŞTURMA

Deney hayvanlarında intestinal tümör oluşturulması konusunda ilk deneysel çalışmalar 1940'lı yıllarda yapılmıştır. Çalışmalarda kanser oluşumunu indükleyen değişik kimyasal maddeler kullanılmıştır. 1,2 Dimetilhidrazin (DMH), Azoksimetan, Metilazoksimetanol, N-Metil, N-Nitrozoganidin, metilnitrozoüre ve α -diflorometilornitin deneysel hayvan modellerinde kolonun adenom ve adenokarsinomunu oluşturmak amacı ile kullanılan kanserojen ajanlardan bazılarıdır (98). Bu kimyasallar arasında en fazla kullanılanlardan biri DMH'dır.

2.7.1. 1,2 Dimetilhidrazin (DMH)

Bir metil hidrazin türevi olan 1,2 dimetilhidrazin, organizmada metil radikali salıveren bileşiklere dönüşmek sureti ile etkinlik kazanan bir ajandır. DNA (Deoksiribonükleik asit) moleküllerini metilleyerek mutajenik etki yapan 1,2 dimetilhidrazin aynı zamanda RNA (Ribonükleik asit) ve dolayısıyla protein sentezini de bozar. Bu madde ile karsinogenezisin başlamasındaki esas yol; 1,2 dimetilhidrazinin karaciğerde azoksimetan ve azoksimetanole dönüşmesidir. Azoksimetanol daha sonra glukuronik asitle konjuge olur ve bilier ekskresyona uğrar. Kolon lümeninde glukuronoidler bakteriyal hidrolize uğramak suretiyle aktif karsinojen metabolitlere dönüşür. Deneysel hayvan modelinde 1,2 dimetilhidrazinin metabolizması aşağıda şematik olarak gösterilmiştir (Tablo 2.4), (98,102-104).

Tablo 2.4. Hayvan modelinde 1,2 dimetilhidrazin'in metabolizması



Deneysel kolon kanseri karsinojenin yüksek dozlarda kronik uygulanmasına bağılı olarak oluşan DNA zararının tamir etme yeteneği azalmış hücreler tarafından tamir edilmemesi sonucu oluşur. Kolon mukozası, hayat süresi 100-120 saat olan kısa G₁ fazlı hücrelerden oluşur. Bazı organlarda eğer hücre bölünmesi gerçekleşmeden önce DNA tamiri tamamlanmamışsa DNA'daki hasarlar hücrelerin bir sonraki jenerasyonuna aktarılır. Bu sayede hatalar (hasarlar) karsinojene kronik maruz kalma sürecinde bir bölgeye toplanır. DMH'a karsinojenik cevapta risk altındaki hücrelerin sayıca artışı önemli rol oynar. Deneysel kanser oluşturmada indüktif periyot kötü huylu tümör oluşumuna rehberlik edecek özelliklere sahip olan populasyona ulaşıncaya kadar geçen zaman olarak tanımlanmıştır. Kötü huylu tümörün oluşabilmesi için ise 140-175 veya biraz daha az nesil gereklidir (105). DMH alkali bir ajan olup bu kimyasal ajan ile muamele nokta mutasyonları uyarır. DMH uygulaması kolonda apopitozu uyardığı kadar insan kolon kanserinin özelliği olan kolonik epitelyal hücrelerdeki hücresel çoğalma artışını da uyarır (103). DMH tarafından indüklenen deneysel kolon tümörleri epitelyal orijinli olup ve insan kolonu neoplazmlarına benzer histoloji, morfoloji ve anatomi sergilediği görülmüştür. Buna ilaveten DMH'ın ve pro-karsinojen türevlerinin genel toksisitesinden az ve sık uygulanan dozlarla kaçınılabılır (106,107). DMH intramuskuler, intrarektal, oral ve subkutan tarzda 4 yolla uygulanabilir. Ratlara DMH'ın oral olarak verilmesinin düşük tümör oranı (%14-30) ile sonuçlandığı bildirilmiş olup intrarektal uygulamanın ise 34. haftadan sonra kolonda hafif hiperplazi ve preneoplastik lezyonlara sebep olduğu rapor edilmiştir (108). Yapılan çalışmalarda deneysel kanser oluşturmak için değişik dozların değişik sürelerde uygulandığı görülmektedir. Thurher (1973) yaptığı çalışmada farelere haftada tek doz şeklinde 24 hafta süresince (20 mg/kg) DMH uygulamış ve tedavinin başlangıcından 186 gün sonra hayvanların %90'ında kolon kanserinin oluştuğunu rapor etmiştir (109). Thulesen (2004) yaptığı çalışmada ise 8 haftalık ve ortalama 18-20 gr ağırlığında olan farelere 20 mg/kg DMH'ı 12 hafta boyunca haftada bir kez subkutan olarak enjekte ettikten üç ay sonra alınan dokularda morfolojik ve histolojik değerlendirmeler sonucunda hayvanların tümünde kolon tümörü oluştuğunu bildirmiştir (107). Jackson (1999) ise farelere 6,8 mg/kg DMH dozunu 1, 5, 10 ve 20 hafta süresince uyguladıktan sonra, fareleri iki yıl boyunca takip etmiştir. DMH dozundaki artışın farelerin hayatta kalma süresini azalttığını tespit etmiştir. Ayrıca toplam 34, 68 ve 136 mg/kg DMH alan hayvanların sırasıyla %26, %76 ve %87'sinde kolon tümörlerinin geliştiği rapor

edilmiştir (110). Diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda ise DMH uygulamasına ait doza bağlı değişimler 10-30 mg/kg arasında, süreye bağlı değişimler ise 1 hafta ile 22 haftalık uygulama arasında değişmekte olup, DMH hayvanlara subkutan veya intraperitoneal tarzda uygulanmıştır. Bu çalışmaların hemen hepsinde de kolon mukozasından histopatolojik değişikler rapor edilmiştir (103,106,111-115). Cooper (1978) farklı ırklar üzerinde DMH'in etkisini incelediği çalışmasında DMH'in aktivasyon ve inaktivasyonuna karışan metabolik yolların hayvanların çeşitli ırklarında ve organlarında farklı bir şekilde etkili olduğunu bildirmiştir (116). Çeşitli fare ırklarında (Balb/C, C57BL/6J ve C3H) DMH uygulaması yapan Kuraguchi (2001) DMH uygulamasına karış Balb/C farelerinin C57BL/6J farelerinden 10 kat daha fazla ve C3H farelerinin ise C57BL/6J farelerinden 5 kat daha fazla yanıt verdiğini ve DMH'a karış en hassas ırkın Balb/C türü olduğunu rapor etmiştir (104). Heijstek (2005) kolorektal kanser gelişme oranının kullanılan karsinojen'in dozu, uygulama sıklığı ve süresine bağlı olduğu kadar uygulama şekline de bağlı olduğunu bildirmiştir (108).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DENEYSEL KANSER OLUŞTURMA VE TEDAVİ PROGRAMI

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 07.03.2006 tarih ve 01/81 nolu kararı ile onay alındıktan sonra, Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkez'inde (DEKAM) gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlıkları 25-30gr (gram) arasında değişen, 30 adet, 8 haftalık erkek Balb-c türü fare kullanıldı. Fareler araştırma süresince 19-21 °C sabit sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/karanlık dönemlerin bulunduğu özel hazırlanmış, otomatik olarak klimatize edilen odalarda korundu. Fareler normal pellet cinsi yem ile beslendi. Fareler her grupta 10 fare olacak şekilde rastgele 3 gruba ayrıldı. Birinci grup fareler kontrol grubunu oluştururken ikinci ve üçüncü grup farelere 1,2 dimetilhidrazin (DMH) enjekte edilerek deneysel kolon kanseri oluşturuldu. Deneysel kanser oluşturmada daha önce tarafımızdan yapılan bir çalışmadaki protokol uygulandı (117). Belirtilen çalışmada farelere haftada bir kez 20 mg/kg DMH subkutan tarzda 12 hafta süresince verildi ve hayvanlar son DMH enjeksiyonundan 1.5, 3, 4.5 ve 6 ay sonra kurban edilmiştir. Hayvanlardan alınan doku örneklerinin histopatolojik yönden incelenmesi sonucu 1.5 ay sonra kesilenlerin tamamında mukozal displazi gözlenirken hiçbirinde kötü huylu tümöral lezyonun belirlenmediği, 3 ay sonra kesilenlerin %71.4'ünde, son iki grubun ise hepsinde (%100) kötü huylu tümöral lezyonların bulunduğu görülmüştür. Yapılan çalışmada şiddetli displazi ve karsinom görülme sıklığının zamana bağlı olarak artış gösterdiği, hafif displazide ise bu durumun gözlenmediği rapor edilmiştir

Mevcut araştırmada çalışma grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

Deney Grupları:

Grup 1 (Kontrol grubu): 12 hafta suresince sadece serum fizyolojik enjekte edildi.

Grup 2 (DMH grubu): 12 hafta suresince haftada bir kez 20 mg/kg DMH enjekte edildi.

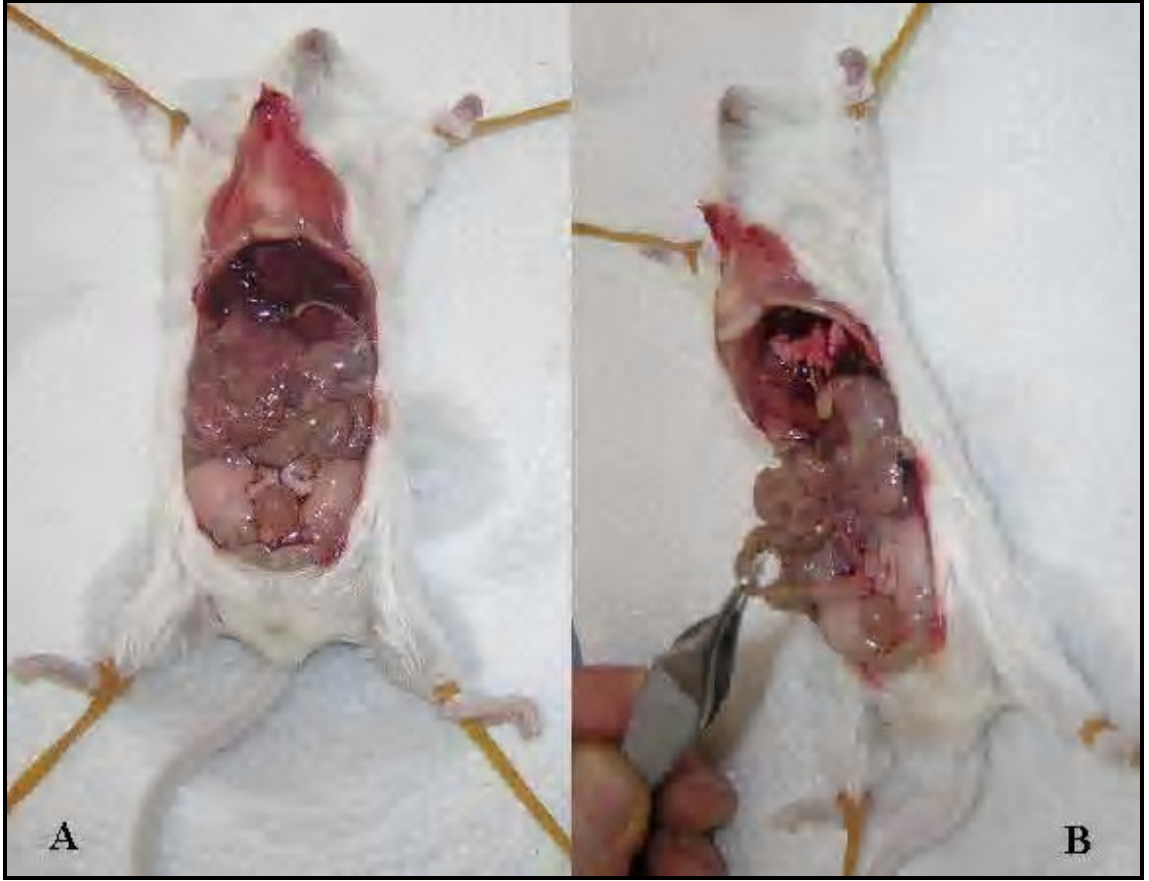
Grup 3 (DMH+Anjiostatin grubu): 12 hafta suresince haftada bir kez 20 mg/kg DMH enjekte edildikten 1.5 ay sonra başlangıçta bir kez 20 µg rekombinant insan anjiostatininin K1-3 (rHuAng K1-3) formu intraperitoneal olarak verildi. Bunu takiben 12 hafta suresince iki gunde bir 5µg rHuAng K1-3 farelere subkutan tarzda uygulamaya devam edildi.

Grup 3'teki farelere anjiostatin uygulaması yapılırken, grup 1 ve 2'deki farelere aynı miktarda PBS (fosfat tampon solasyonu) aynı sure ve tarzda enjekte edildi. DMH her hafta enjeksiyon gunnde taze olarak hazırlandı. Farelere enjekte edilecek DMH, %0.05'lik EDTA'da (etilendiamin tetraasetikasit) ozld ve NaHCO₃ (sodyum bikarbonat) ile solusunun pH'ı 6.5 olarak ayarlandı. Farelere enjeksiyonlar sırt bölgesinden, bel omurları seviyesinde subkutan tarzda uygulandı. Anjiostatin de enjeksiyon gunnde taze olarak hazırlandı. Anjiostatin, PBS ilave edilerek seyreltildi. DMH ve anjiostatin uygulamaları sırasında hayvanları irrite etmemek ve herhangi bir enfeksiyona sebep olmamak için her denek için ayrı insülin enjektörü kullanıldı. Enjeksiyonlar sırt bölgesinde farklı alanlara uygulandı. Deney suresince fareler günlük olarak kontrol edilerek haftalık kiloları olld. Genel morfolojik görünümleri makroskobik olarak değerlendirildi.

Her  gruba ait fareler son DMH enjeksiyonundan 4.5 ay sonra sakrifiye edildi.

3.2. KOLONUN ÇIKARILMASI VE HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Deney suresinin sonunda (DMH enjeksiyonundan 4.5 ay sonra) farelerin (kontrol ve deney grupları) ketamin-xylasine (50mg/kg-15mg/kg) genel anestezi altında karın bölgesi anal (pubis) bölgeden itibaren V harfi şeklinde açıldı. 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 analis'e kadar ince bir makas yardımı ile diseke edilerek takip edildi. Kolon parçası, dokuya zarar verilmeden çıkarılarak PBS içeren bir petri kabına alınıp Swissroll tekniği uygulanarak tespit edildi.

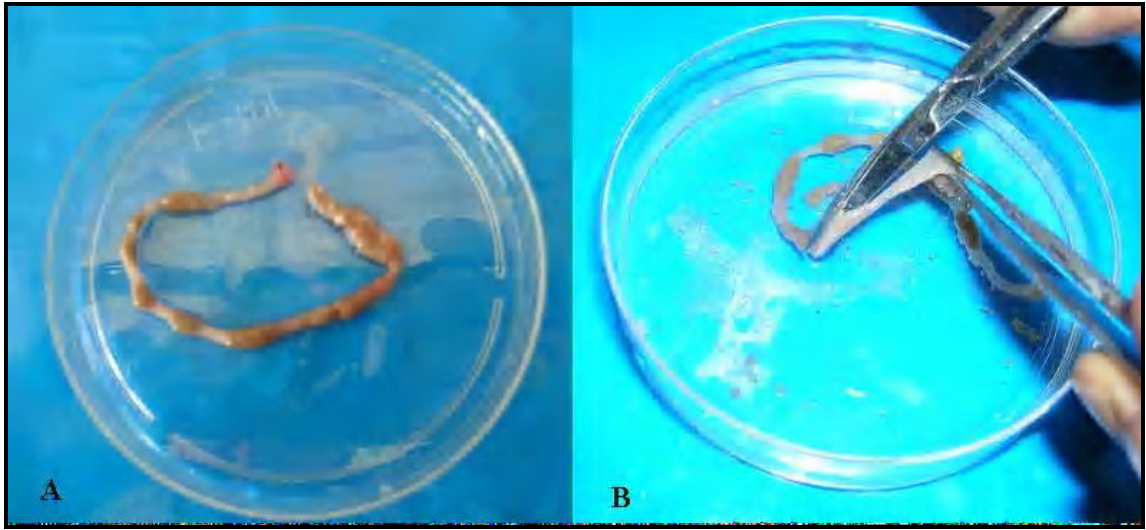


Resim 3.1. A) Karın bölgesini açılması B) Kolonun çıkarılması

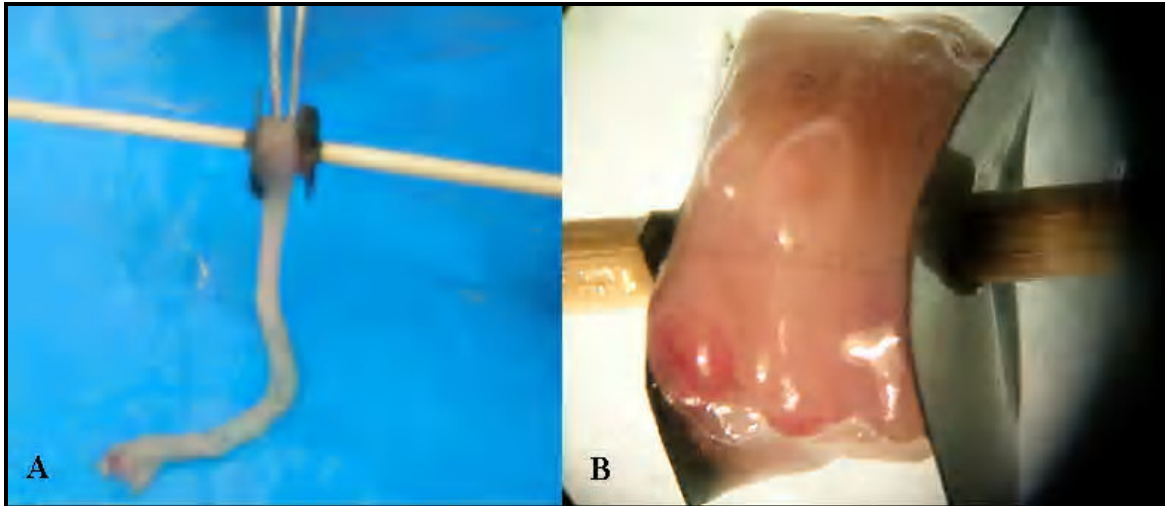
3.3. SWISS ROLL TEKNİĞİ

Bağırsağın histolojik incelenmesi esnasında bazı problemler oluşabilir. Bağırsak karın boşluğundan çıkarıldıktan sonra longitudinal kasların etkisi ile direkt olarak kısalır. Hayvanın ölümünden kısa bir süre sonra bağırsak epiteli değişir. Lümeninde yer alan içerik yüzünden bağırsağın hızlı bir şekilde çıkarılması ve 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 Relly ve Kirsner tarafından sunulan SwissRoll tekniğine uygun (118) bir şekilde dokular hazırlandı. Numuneler tampon solüsyonu (PBS) ihtiva eden bir petri kabına konulduktan sonra steromikroskop altında bağırsakta uygun bir makas yardımıyla uzunlamasına bir kesi yapılarak bağırsak içeriği boşaltıldı (Resim 3.2). Daha 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 tespit edildi. Tespit işlemine kadar geçen sürenin çok kısa olmasına dikkat edildi. Tespitten sonra bu swiss roll dikkatli bir şekilde ağaç çubuktan uzaklaştırıldı ve rutin histolojik takiplerden sonra parafine gömüldü. 5 µm'lik kesitleri alınan dokular önce doku kalitesi ve kanserli alanların tespiti için rutin histolojik takiplerden geçirildikten sonra hematoxilen-eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi.



Resim 3.2. A) Petri kabına konulmuş kolon parçası, B) Kolonun longitudinal olarak açılması.



Resim 3.3. A) Swiss roll tekniği uygulanması B) Swiss roll tekniği ile sarılmış bir kolon

Saptanan lezyonlar histopatolojik olarak hafif displazi, şiddetli displazi ve karsinom olarak sınıflandırıldı. Gruplardaki histopatolojik lezyonların sayısı belirlendi. Lezyonlar belirlenirken kolonun hangi bölgesinde olduğuna dikkat edildi ve bu işlem için kolon proksimal, orta ve distal olmak üzere 3 bölgeye ayrıldı. Bu işlemde ağaç 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 düşünüldü. İstatistiksel analiz için SSPS paket programı kullanıldı. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi Mann Whitney-U testi ile yapıldı.

3.4. HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRMA

1) Displazi: Prekanseroz lezyon olarak displazi belirli hücresel ve yapısal değişimlerle tanımlanmış dokudaki anormal durumlar olarak tarif edilir. Displazinin asıl histolojik özelliği olgunlaşmamış hücrelerin sayısında artış ile sonuçlanan aşırı hücre çoğalmasındır. Hücreler pleomorfizm, şekil ve boyutlarında farklılıklar, artmış nükleus sitoplazma oranı ve az hücresel farklılaşma sergiler. Yalancı tabakalaşma ve mitoz yaygındır. Fakat dev (iri) nükleuslar ve anormal mitoz yoktur. Mitozlar sıklıkla epitelde anormal yerleşimler gösterir. Displazi terimi açık bir şekilde anormal olan bezler için de atfedilebilir. Bezler tomurcuklanma, dallanma ve toplanma ile beraber yapısal bir düzensizlik gösterir. Displastik değişiklikler sıklıkla kanseroz değişim odaklarına bitişiktir. Adenomlar tanımlamalarında displazinin çeşitli derecelerini sergiler (92,101).

2) Karsinom: İntestinal adenokarsinomlar indifferansiye ile iyi differansiye arasında differansiyasyon sergileyen glandular tümörlerdir. Çok iyi differansiye olan karsinomalarda intraglandular papiller katlanmalar mevcuttur. Bu tümörler sıklıkla genişçe büyüme ve solid nodüler kitleler oluşturur. İyi differansiyeden, tamamen indifferansiye olanlara kadar kolon karsinomları gerçekte anaplastik kitlelerdir. Anaplastik hücreler belirgin pleomorfizm gösterir. Karakteristik olarak çekirdek aşırı derecede hiperkromatik ve büyüktür. Çekirdek sitoplazma oranı normaldeki 1:4 veya 1:6 yerine 1:1'e yaklaşabilir. Komşularından daha büyük dev hücreler oluşabilir ve dev boyutlu tek çekirdek veya çok sayıda çekirdek içerebilir. Anaplastik çekirdek değişkendir ve boyut ve şekilleri ile tuhaftır. Kromatin kaba ve kümelidir. Çekirdekçik şaşırtıcı boyutta olabilir. Daha önemli olarak mitozlar sıklıkla çok sayıda ve belirgin derecede atipiktir, bazen tripolar veya kuadripolar dağınık çoklu demetler şeklinde görülebilir. İntramukozal karsinom yüksek derece displazi ile benzer değişiklikleri

gösterir. Bu benzerliğe ilaveten tümör hücreleri lamina propria'nın mukozal stromasına invaze olur. İnflamatuvar ve dezmoplastik bir reaksiyon sağlar. İnvaziv kanser, tümör hücrelerinin muskularis mukozanın ötesine submukoza'ya invaze oldukları zaman teşhis edilir.

Karsinoma hücrelerinin büyük bir çoğunluğu kolumnar hücrelerdir. Mukus hücreleri yaygın olarak mevcuttur. İntرالuminal sekresyon genellikle mukus ve az miktarda sialomusin de içerebilir. Goblet hücreleri az bulunur. Endokrin hücreleri yaygın olarak mevcuttur. Neoplastik paneth hücreleri de kolon ve ince bağırsağın adenokarsinomlarında tanımlanmıştır (92,101).

4. BULGULAR

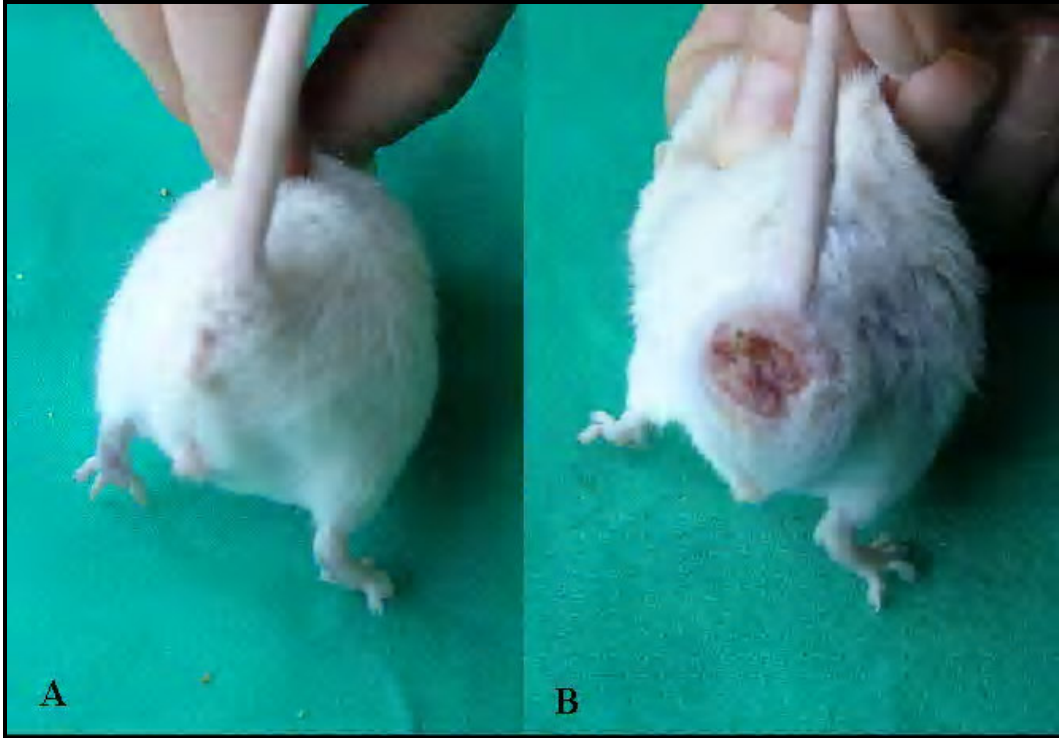
Çalışmada toplam 30 adet Balb/c türü erkek fare kullanıldı. Bu fareler her birinde 10 tane olacak şekilde biri kontrol, ikincisi DMH deney grubu ve üçüncüsü DMH ve anjiostatin deney grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı.

Çalışmada kullanılan farelerin günlük takiplerinde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında deney gruplarındaki farelerde anal ve sırt bölgelerindeki tüylerinde dökülmeler ve genel olarak tüylerinde düzensizlik, burunlarında kızarıklık ve halsizlik durumları gözlemlendi (Resim 4.1).

Ayrıca yapılan rutin gözlemlerde deney gruplarındaki bazı farelerde ilk DMH enjeksiyonundan 5-6 ay sonra anal bölgelerinde dışarıya doğru şiskinlik şeklinde büyük kitleler ve yaralar olduğu tespit edildi. Bu kitlelerden alınan doku örneklerinin mikroskopik olarak incelenmesi sonucu bu lezyonların epidermoid karsinom olduğuna karar verildi. Benzer kitlelere kontrol grubundaki farelerde rastlanmadı (Resim 4.2).



Resim 4.1. A) Kontrol grubu B) Deney grubu farelerinin genel görünümü

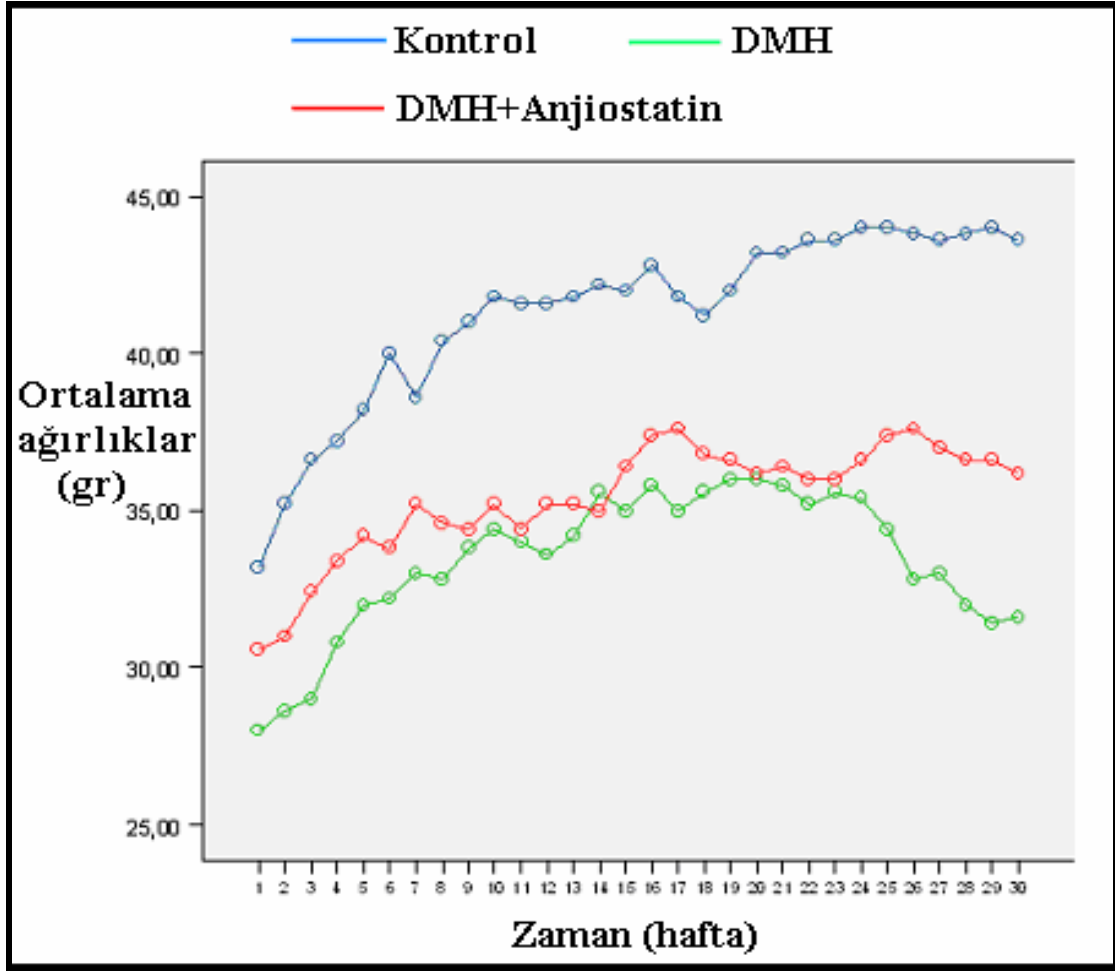


Resim 4.2. A) Kontrol grubu B) Deney grubu farelerinin anal bölgesinin genel görünümü

Deney süresince 3 gruptaki farelerin haftalık ağırlık ölçümleri yapıldı. Ölçümler haftanın aynı günlerinde aynı saatlerinde gerçekleştirildi. 30 hafta süresince kontrol ve deney gruplarındaki hayvanların ağırlıklarındaki değişiklikler istatistiksel olarak değerlendirildi ve gruplar arasındaki farklılıklar anlamlı bulundu ($p<0.001$). Kontrol grubundaki hayvanların 1. haftadaki ortalama ağırlıkları 33.20 ± 1.30 gr olarak belirlenirken grup 2 ve 3'de 1. haftadaki ortalama ağırlıklar sırasıyla 28.00 ± 1.00 gr ve 30.60 ± 0.54 gr şeklinde bulundu. Her üç gruptaki hayvanların ağırlıkları ilk 15-20 hafta boyunca genel anlamda artış göstermekte olup 16. haftada maksimum değere ulaştı. Son haftalarda ise kontrol grubu hariç diğer 2 deney grubu farelerinin ağırlıklarında bir azalma görüldü. Bu azalma muhtemelen hayvanlardaki mevcut tümör varlığından kaynaklanabilir. Kontrol grubundaki hayvanların son haftadaki ortalama ağırlıkları 43.60 ± 1.14 gr olarak belirlenirken grup 2 ve 3'de son haftadaki ortalama ağırlıklar sırasıyla 31.60 ± 1.51 gr ve 36.20 ± 0.83 gr şeklinde bulundu (Tablo 4.1, Grafik 4.1).

Tablo 4.1. Gruplardaki ağırlıkların (gr) dağılımları

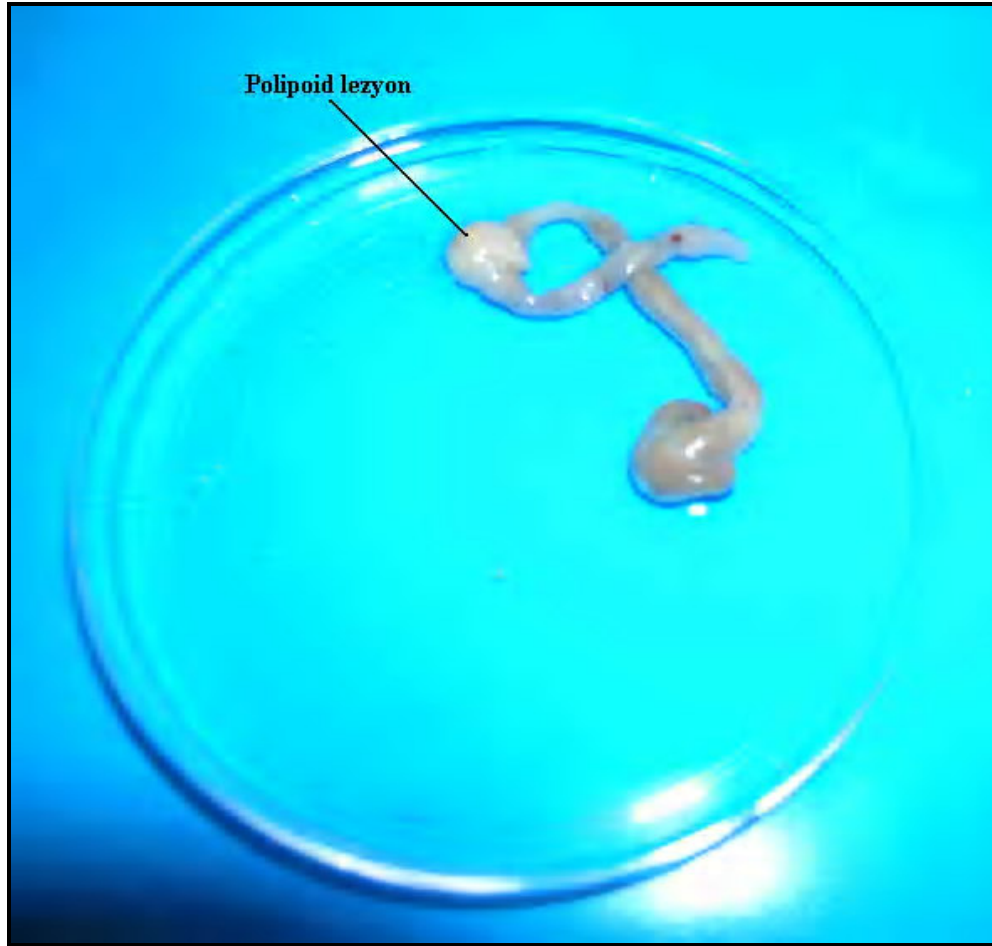
Gruplar	I.Hafta		16.Hafta		30.Hafta	
	Ortalama \pm SD	Min. ve mak. değerler	Ortalama \pm SD	Min. ve Mak. değerler	Ortalama \pm SD	Min. ve Mak. değerler
Kontrol (N= 10)	33.20 ± 1.30	32.0-35.0	42.80 ± 0.83	42.0-44.0	43.60 ± 1.14	42.0-45.0
DMH (N=7)	28.00 ± 1.00	27.0-29.0	35.80 ± 0.83	35.0-37.0	31.60 ± 1.51	30.0-33.0
DMH + Anjiostatin (N=7)	30.60 ± 0.54	30.0-31.0	37.40 ± 1.14	36.0-39.0	36.20 ± 0.83	35.0-37.0



Grafik 4.1. Gruplardaki ağırlıkların 30 hafta süresince dağılımları

Kontrol grubunu oluşturan ve sadece EDTA verilen farelerde çalışmanın sonuna kadar genel sağlık durumları ile ilgili gözle görülen hiçbir anormal bulguya rastlanmadı. Çalışmanın sonuna kadar hayatlarını sağlıklı bir şekilde devam ettirdiler. Kolorektal karsinom oluşturmak amacı ile sadece DMH verilen farelerden 3, tedavi amaçlı DMH'a ilave olarak anjiostatin uygulanan farelerden de 3 adet olmak üzere 6 fare değişik zaman dilimlerinde hayatlarını kaybettiler. Yapılan otopsilerinde makroskopik olarak patolojik hiçbir bulguya rastlanmadı ve postmortem nekrozis nedeniyle dokularının histopatolojik incelemesi yapılamadı. Ölen farelerin DMH uygulaması sonucu irrite olmalarından ve kendi aralarında kavga etmeleri nedeniyle öldüğü kanaatine varıldı. Bu yüzden ölen fareler çalışma dışı bırakıldı.

Deney sonunda tüm gruplara ait farelerin karın bölgeleri açılarak karın içi organlar incelendiğinde kolon dışındaki organlarda makroskobik olarak patolojik bir durum gözlenmedi. Kontrol grubu hayvanların kolonlarında da göz ile görülebilir herhangi bir patoloji gözlenmezken deney grubu (2. ve 3. gruplar) hayvanların kolonlarında değişik yer, sayı ve büyüklükte polipoid lezyonlar görüldü (Resim 4.3). Karın boşluğundan çıkarılan kolonlar longitudinal olarak kesilerek serum fizyolojik içerisinde bağırsak içeriği uzaklaştırıldıktan sonra yapılan stereomikroskopik incelemede 2. ve 3. gruptaki tüm hayvanlarda çıplak göz ile fark edilemeyen farklı büyüklüklerde tekli veya çoklu patolojik lezyonlar belirlendi (Resim 4.4-4.7).



Resim 4.3. DMH deney grubunda kolon açılmadan makroskobik olarak görülen tümöral lezyon



Resim 4.4. DMH deney grubunda kolonun distal 1/3'ünde görülen çoklu tümöral lezyonlar



Resim 4.5. DMH deney grubunda kolonun distal 1/3'ünde görülen tekli tümöral lezyon



Resim 4.6. Anjiostatin deney grubunda kolonun orta 1/3'ünde görülen çoklu tümöral lezyonlar

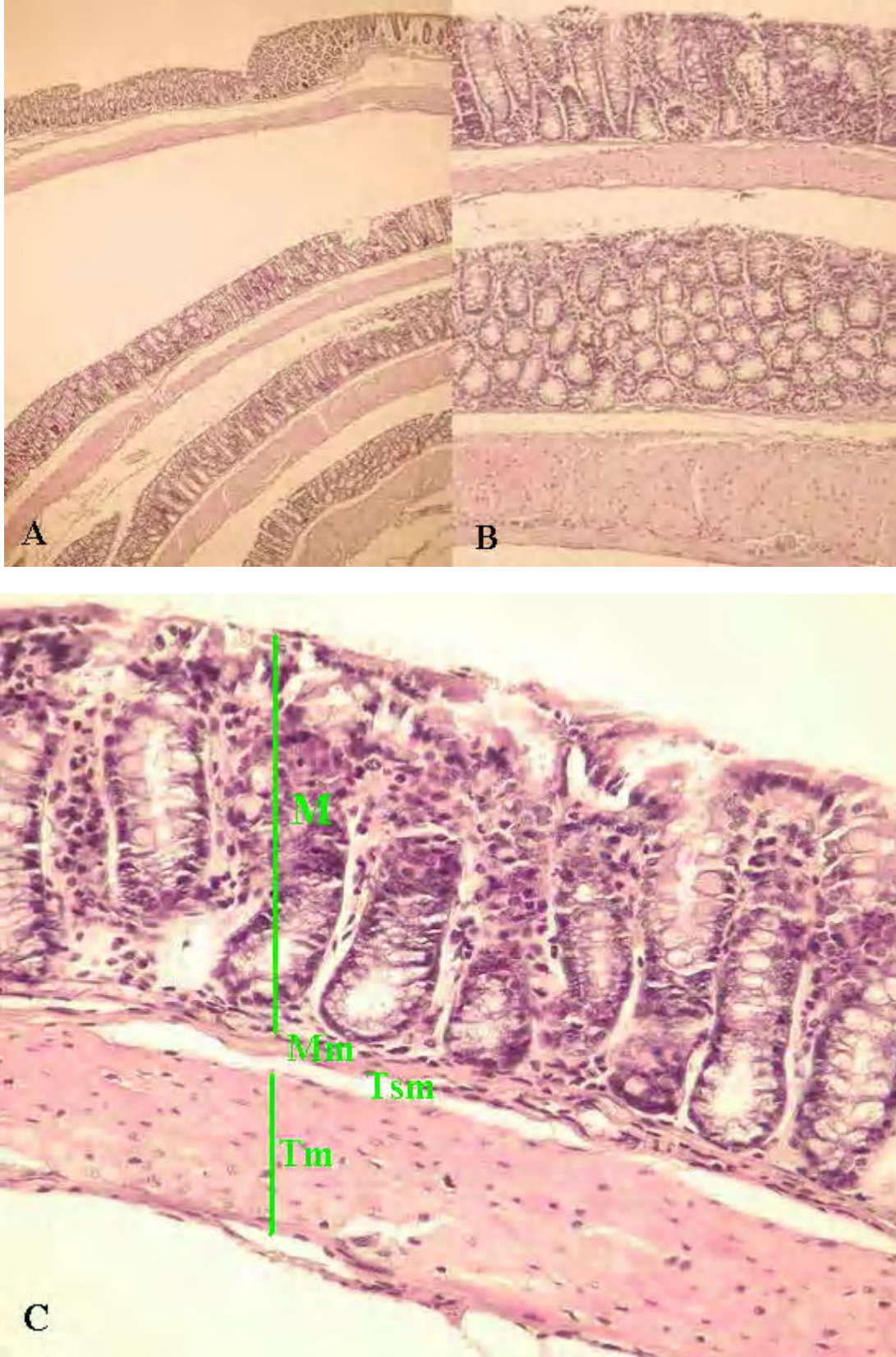


Resim 4.7. Anjiostatin deney grubunda kolonun distal 1/3'ünde görülen çoklu tümöral lezyonlar

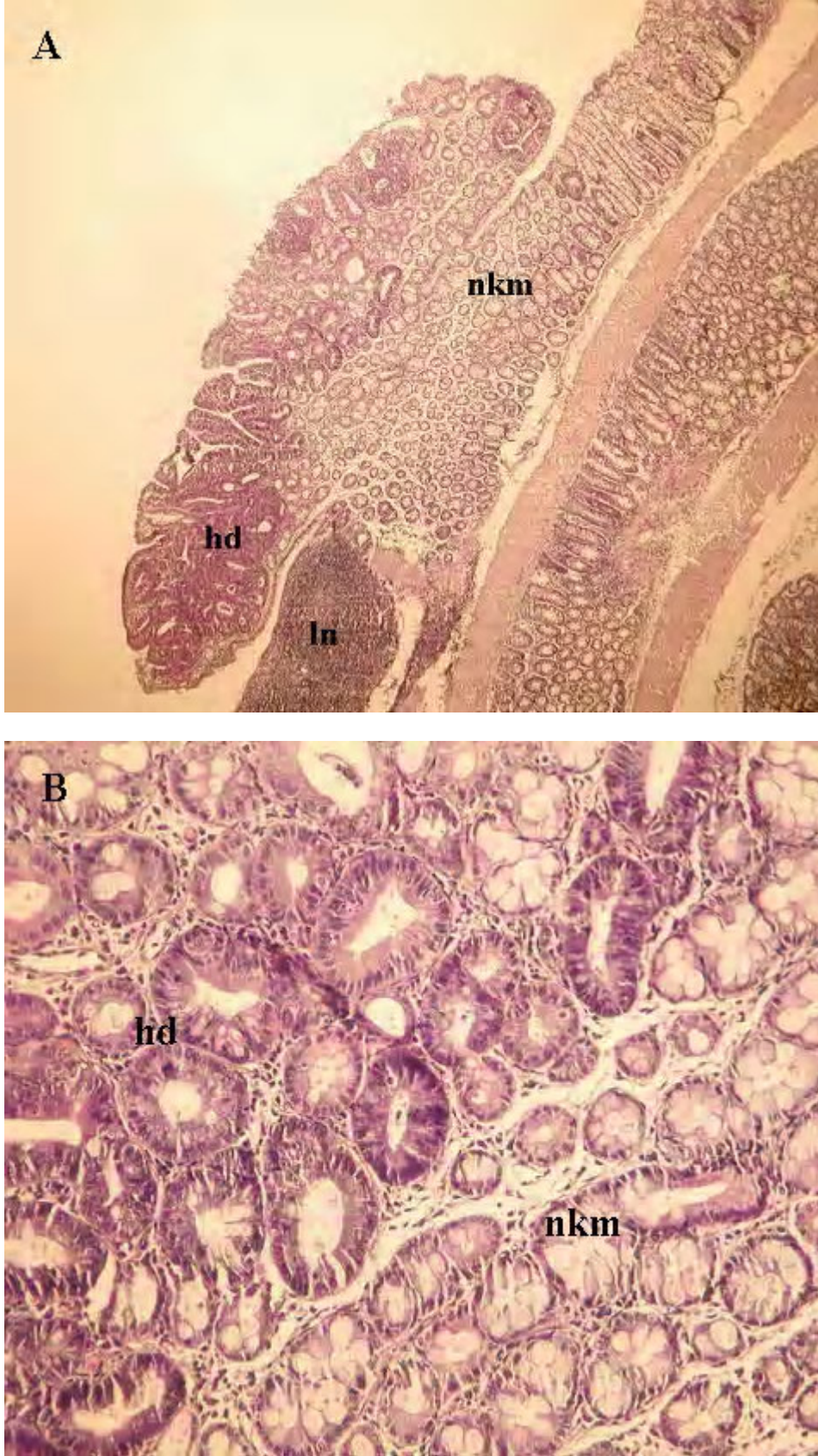
Işık mikroskobu düzeyinde yapılan incelemede kontrol grubundaki hayvanların dokularında hiçbir histopatolojik lezyona rastlanmadı (Resim 4.8). Sadece DMH ve DMH'a ilave olarak anjiostatın verilen deney gruplarındaki farelerde ise değişik sayıda lezyon mevcuttu. Lezyonların histopatolojilerine bakıldığında bunların bir kısmının hafif displazi, bir kısmının şiddetli displazi, bir kısmının ise kötü huylu tümöral lezyon olduğu tespit edildi.

Histolojik olarak displastik lezyonlarda bezler yapısal düzensizlik göstermekte olup, bezlerde uzamalar ve şekilsizlik mevcuttu. Hücreler pleomorfizm, şekil ve boyutlarında farklılıklar, artmış nukleus sitoplazma oranı ve az hücresel farklılaşma sergiliyordu. Nukleusları genişlemiş ve hiperkromatikti. Displastik değişiklikler sıklıkla kanseröz değişim odaklarına bitişikti. Adenomlar displazinin çeşitli seviyelerini sergilemekteydi (Resim 4.9-4.10).

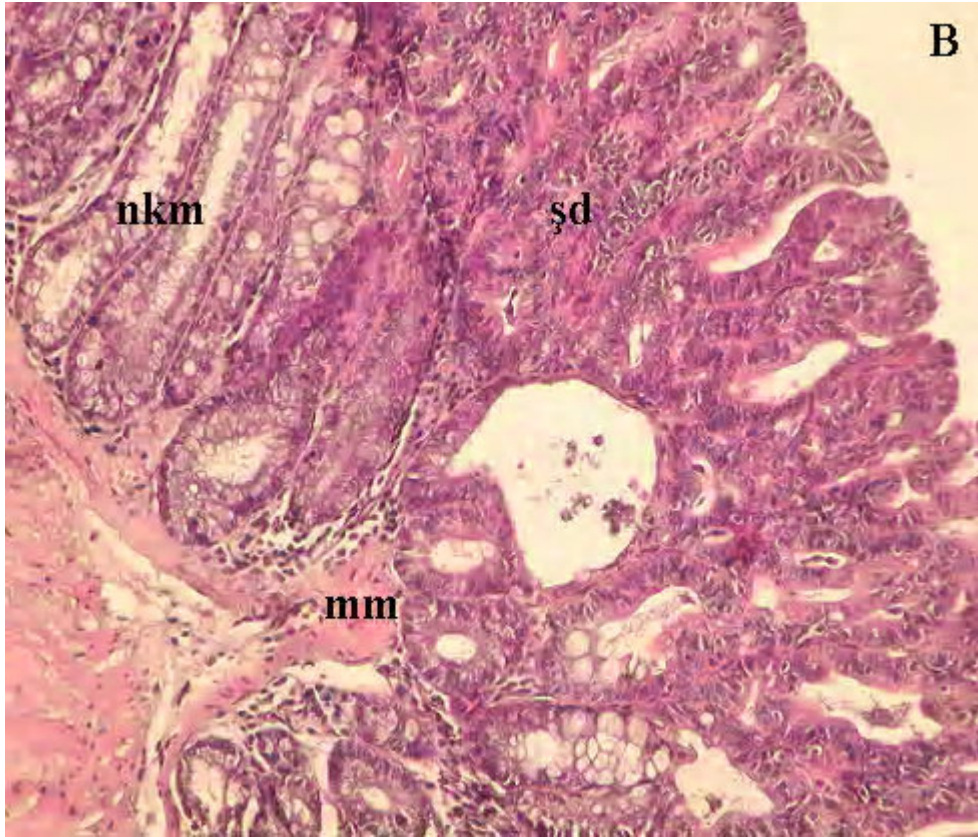
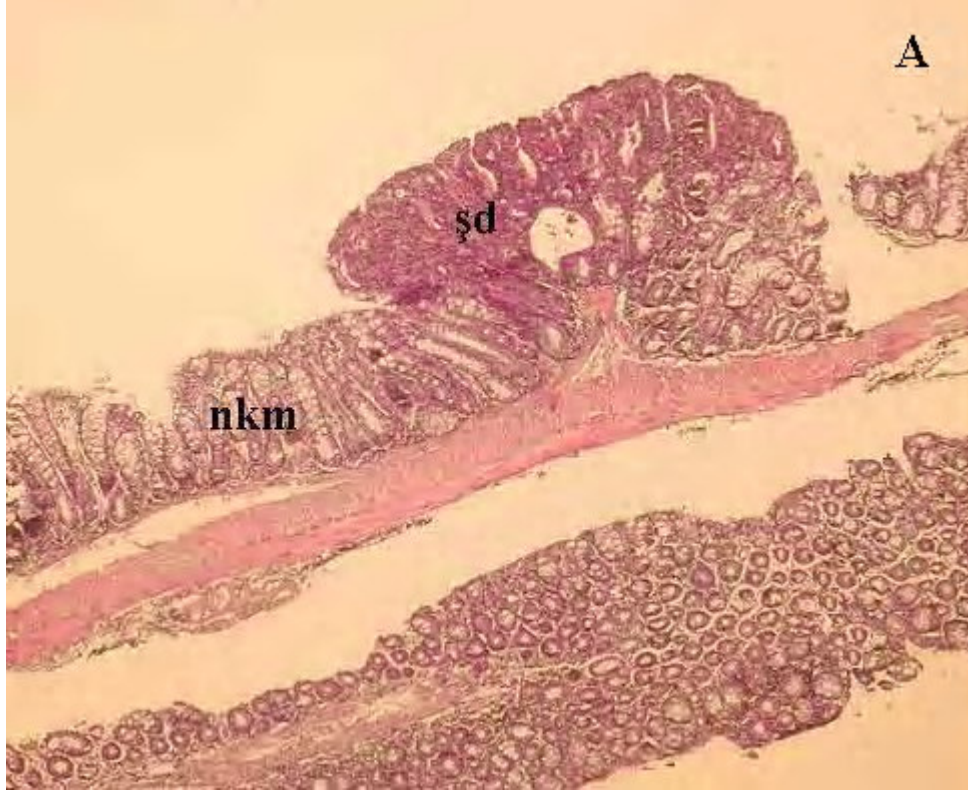
Histolojik olarak kolorektal karsinomların bazıları indiferansiye bazıları ise iyi diferansiyeydi. Büyümeleri sıklıkla mukoza ile sınırlıydı ve bazı tümörlerde bağırsak duvarında invazyon gözüküyordu. Neoplastik bezlerde uzama, şekilsizlik ve dallanmalar mevcuttu. Bu bezler temel olarak, mukus salgılayan goblet hücrelerinin arasına serpişmiş olan neoplastik uzun kolumnar hücrelerden oluşuyordu. Mukoza yüzeyi boyunca normal mukozaya zıt olarak epitel hücrelerinin kendine has papiller kümeleşmeleri mevcuttu. Tümörlerdeki invazyon derinliği bazı tümörlerde muskularis mukozaya kadar inerken bazı tümörlerde tunika serozaya kadar idi. Tunika serozaya invazyon nadir olarak görüldü. Bu tümörler sıklıkla genişçe büyüme ve solid nodüler kütleler oluşturup bağırsak lümenini daraltıyordu. Neoplastik hücreler belirgin pleomorfizm göstermekte olup karakteristik olarak çekirdekleri aşırı derecede hiperkromatik ve büyüktü. Çekirdek sitoplazma oranı birbirine yakındı. Mitotik hücreler sıklıkla çok sayıda ve belirgin derecede atipikti (Resim 4.11-4.13).



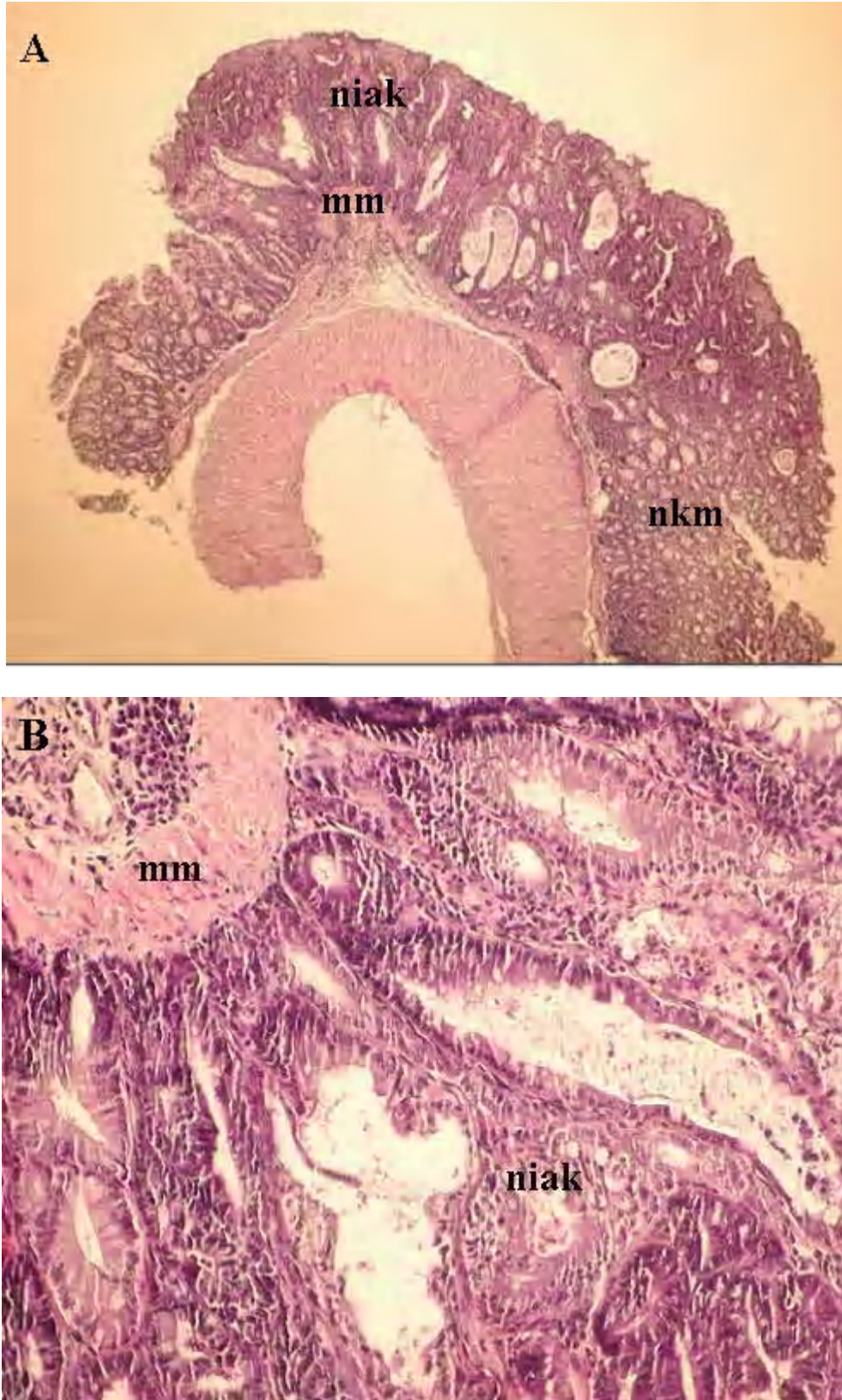
Resim 4.8. Kontrol grubundaki farelerin kolonunun normal histolojik görünümü. **A)** HE X 4 **B)** HE X 10 **C)** HE X 20 büyütme **M:** Tunika mukoza, **Mm:** Lamina muskularis mukoza, **Tsm:** Tunika submukoza, **Tm:** Tunika muskularis



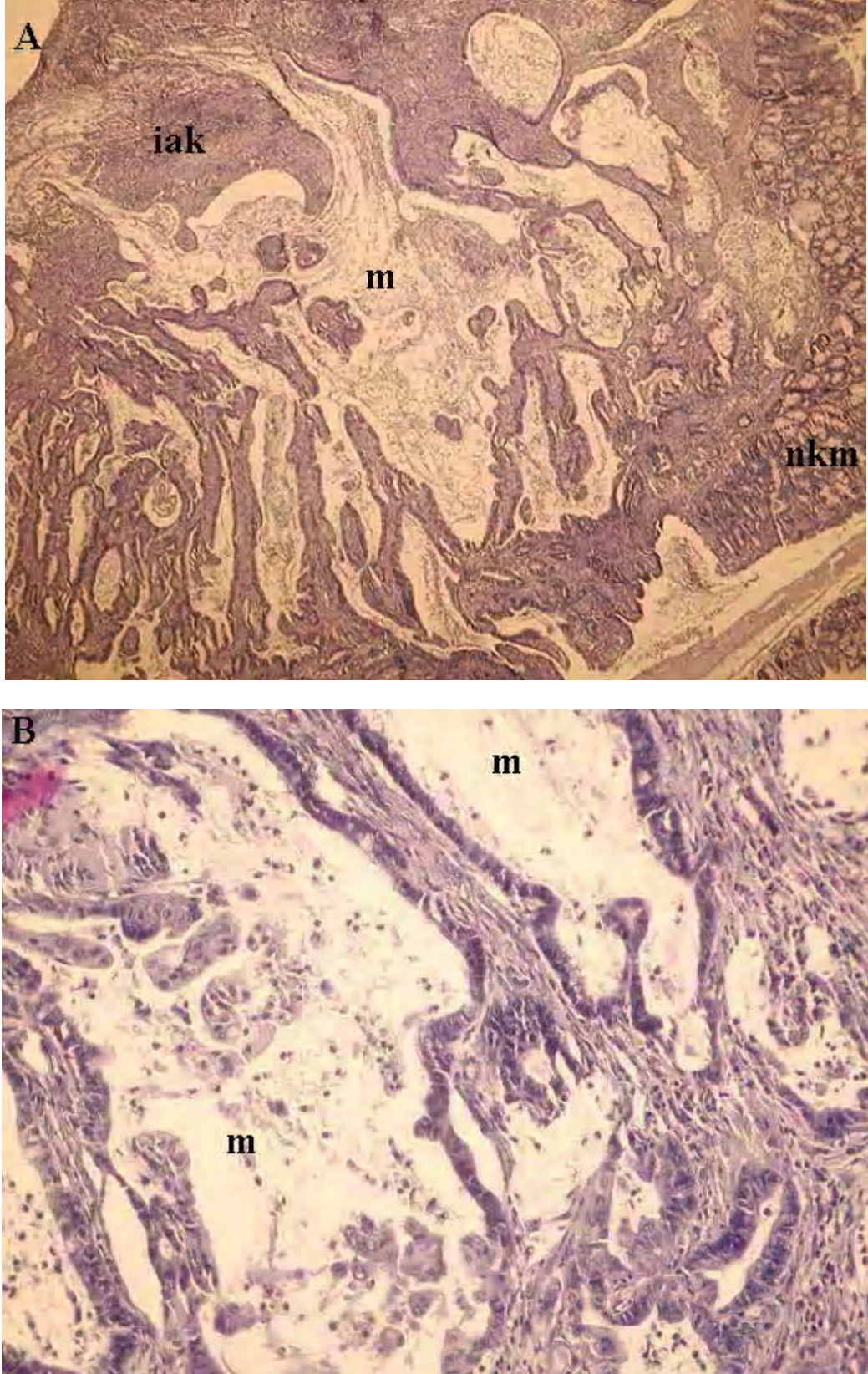
Resim 4.9. Kolonda görülen hafif displazi. **A)** HE X 4, **B)** HE X 20 büyütme. **hd:** hafif displastik alan, **nkm:** normal kolon mukozası, **ln:** lenf nodülü



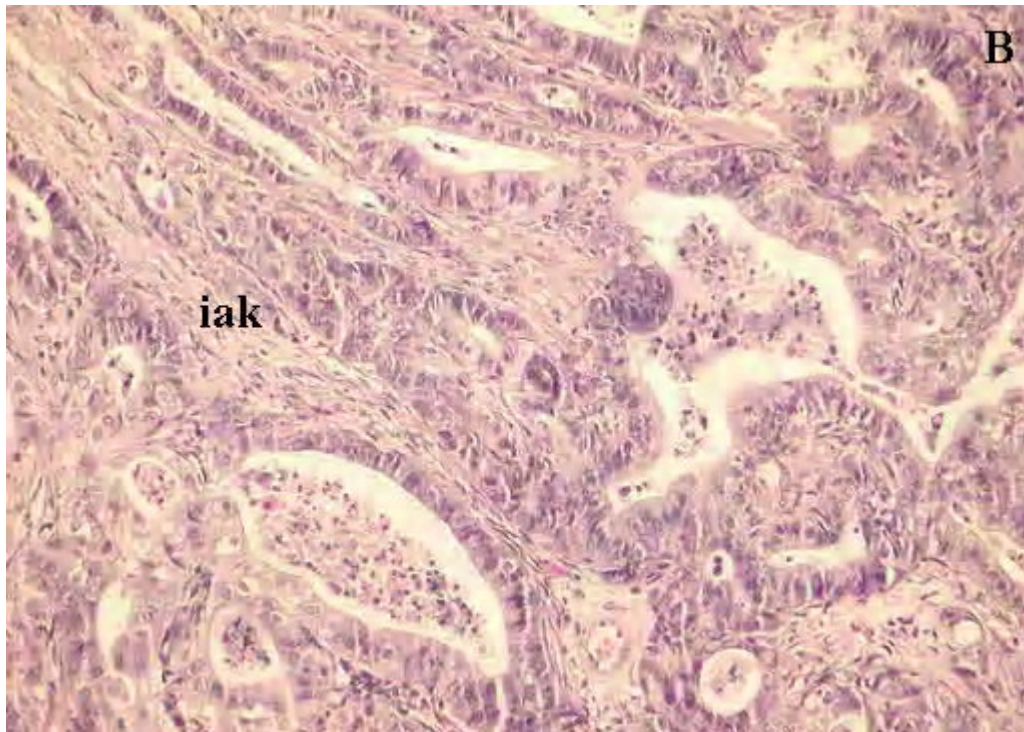
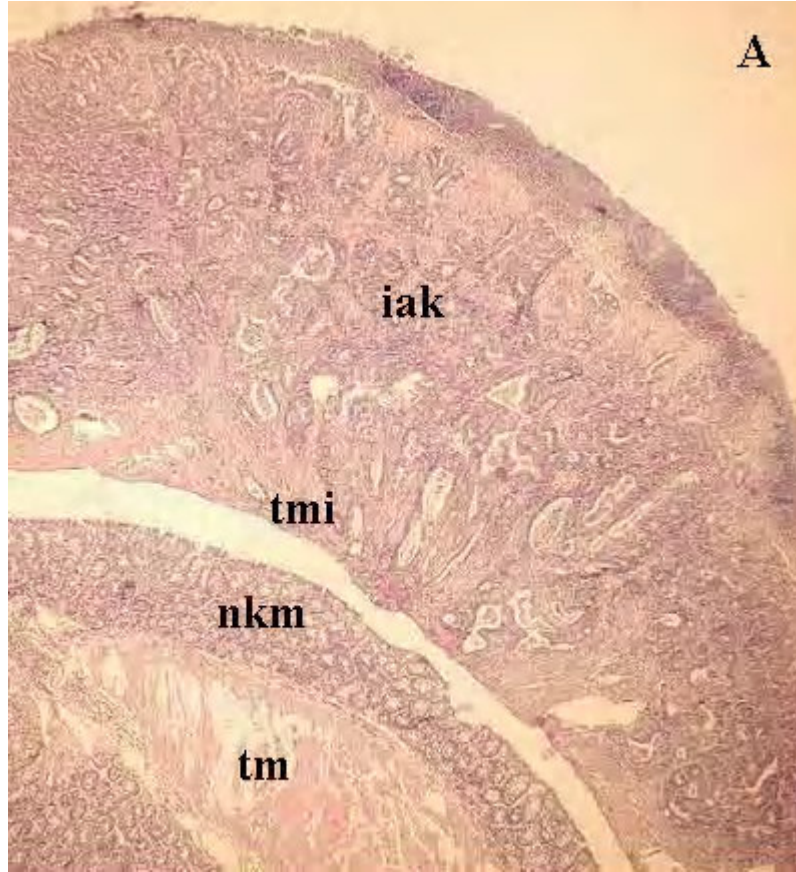
Resim 4.10. Kolonda görülen şiddetli displazi. **A)** HE X 4, **B)** HE X 20 büyütme.
şd: şiddetli displastik alan, **nkm**: normal kolon mukozası, **mm**: muskularis mukoza



Resim 4.11. Kolonda görülen noninvaziv adenokarsinom. A) HE X 4, B) HE X 20 büyütme. **niak:** noninvaziv adenokarsinom, **nkm:** normal kolon mukozası, **mm:** muskularis mukoza



Resim 4.12. Kolonda görülen invaziv adenokarsinom **A)** HE X 4, **B)** HE X 20 büyütme.
iak: invaziv adenokarsinom, **nkm:** normal kolon mukozası, **m:** musin salgısı



Resim 4.13. Kolonda görülen invaziv adenokarsinom **A)** HE X 4, **B)** HE X 20 büyütme.
iak: invaziv adenokarsinom, **nkm:** normal kolon mukozası, **tm:** tunika muskularis,
tmi: tunika muskularis'e invazyon

Deney grubundaki lezyonlar incelendiğinde, DMH verilen gruptaki farelerde ortalama toplam histopatolojik lezyon sayısı 9.85 ± 4.91 iken DMH'a ek olarak anjiostatin verilen gruptaki ortalama değer 8.71 ± 3.49 olarak bulundu (Tablo 4.2). DMH verilen gruptaki tüm hayvanlarda görülen histopatolojik lezyonların sayısı 69 olarak belirlenirken; bu lezyonların %62.32'sinin kolonun distalinde, %26.08'nin kolonun ortasında ve %11.59'nun da kolonun proksimalinde bulunduğu tespit edildi. DMH'a ek olarak anjiostatin verilen grupta ise toplam lezyon sayısı 61 olarak belirlenirken; bu lezyonların kolonun distal, orta ve proksimal bölümlerindeki dağılımları sırasıyla %70.49, %26.22 ve %3.27 olarak tespit edildi. Histopatolojik lezyonları hafif displazi, şiddetli displazi ve kötü huylu tümöral lezyon olarak sınıflandırıp değerlendirdiğimizde sadece DMH verilen gruptaki farelerde ortalama lezyon sayıları sırasıyla 2.28 ± 1.79 , 3.14 ± 2.67 ve 4.42 ± 2.29 şeklinde bulunurken, DMH'a ek olarak anjiostatin verilen gruptaki farelerde ortalama lezyon sayıları sırasıyla 2.71 ± 1.38 , 2.28 ± 1.49 ve 3.71 ± 2.29 olarak belirlendi. DMH'a ek olarak anjiostatin verilen grupta bulunan farelerde tespit edilen toplam histopatolojik lezyon sayısı, şiddetli displazi ve kötü huylu tümöral lezyon sayısı, sadece DMH verilen grupta bulunan farelerdekine oranla daha düşük, hafif displazide ise hafif bir artış gözlemlendi. Fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Deney gruplarında belirlenen ortalama histopatolojik lezyonların sayısı

Gruplar	Hafif Displazi	Şiddetli Displazi	Kötü Huylu Tümöral Lezyon	Toplam Lezyon
Kontrol (N=10)	-	-	-	-
DMH (N=7)	2.28 ± 1.79	3.14 ± 2.67	4.42 ± 2.29	9.85 ± 4.91
DMH+Anjiostatin (N=7)	2.71 ± 1.38	2.28 ± 1.49	3.71 ± 2.29	8.71 ± 3.49

Sadece DMH verilen gruptaki farelerin 6'sında hafif displastik lezyonlar görüldü. Farelerde toplam hafif displastik lezyonların sayısı 16 olarak saptandı. Ortalama lezyon sayısı 2.28 ± 1.79 olarak belirlenirken, bu lezyonların %18.75'i kolonun proksimal kısmında, %43.75'i orta kısmında, %37.5'i de distal kısmında görüldü. DMH'a ek olarak anjiostatin verilen grupta ise farelerin hepsinde (%100) hafif displastik lezyonlar görülürken, toplam lezyon sayısı 19 olarak tespit edildi. Bu gruptaki farelerde ortalama

lezyon sayısı 2.71 ± 1.38 iken lezyonların dağılımı; % 5.26'sı kolonun proksimalinde, %42.10'u orta kısmında ve %52.63'ü distal kısmındaydı. DMH grubundaki bir farede, kolonun orta bölümünde görülen maksimum lezyon sayısı 4 iken, DMH'a ilave olarak anjiostatın verilen farelerden birinde kolonun distalinde maksimum lezyon sayısı 3 olarak tesbit edildi (Tablo 4.3, Resim 4.9).

Tablo 4.3. Deney gruplarında bulunan hafif displastik lezyonların kolon'daki dağılımı ve istatistiksel değerleri

Gruplar	Lezyon görülen fare sayısı	Lezyon sayısı	Ortalama lezyon sayısı	Ortanca	Min ve Mak	Kolon'da dağılım n (%)		
						Proksimalde	Ortada	Distal
DMH (N:7)	6	16	2.28 ± 1.79	2.00	0-5	3 (18.75)	7 (43.75)	6 (37.50)
DMH+ Anjiostatın (N:7)	7	19	2.71 ± 1.38	2.00	1-5	1 (5.26)	8 (42.10)	10 (52.63)

Lezyonları şiddetli displazi yönünden değerlendirdiğimizde (Resim 4.10) sadece DMH verilen farelerde toplam şiddetli displastik lezyonların sayısı 22 olarak saptandı. Bir farede şiddetli displaziye rastlanmazken, bir farede ise 7 adet şiddetli displazi mevcuttu (ortalama 3.14 ± 2.67). Bu lezyonların büyük bir çoğunluğu (% 68.18) kolonun distal kısmında görüldü. DMH'a ek olarak anjiostatın verilen grupta ise toplam lezyon sayısı 16 olarak tespit edildi. Bu gruptaki farelerde ortalama lezyon sayısı 2.28 ± 1.49 , bir farede şiddetli displaziye rastlanmazken bir farede ise 4 olarak belirlendi. Bu gruptaki farelerde kolonun proksimal kısmında şiddetli displastik lezyonlar görülmedi. Lezyonların % 87.5'i kolonun distal geri kalan bölümü de orta kısmında tespit edildi.

DMH grubunda kolonun orta bölümünde görülen maksimum lezyon sayısı 5 olup iki farede görülür iken, DMH'a ilave olarak anjiostatın verilen farelerden birinde kolonun distalinde maksimum lezyon sayısı 4 olarak tespit edildi. Yukarıdaki veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde DMH'a ek olarak anjiostatın verilen gruptaki farelerin lezyonlarında bir azalma olmasına rağmen bu anlamlı değildi (Tablo 4.4).

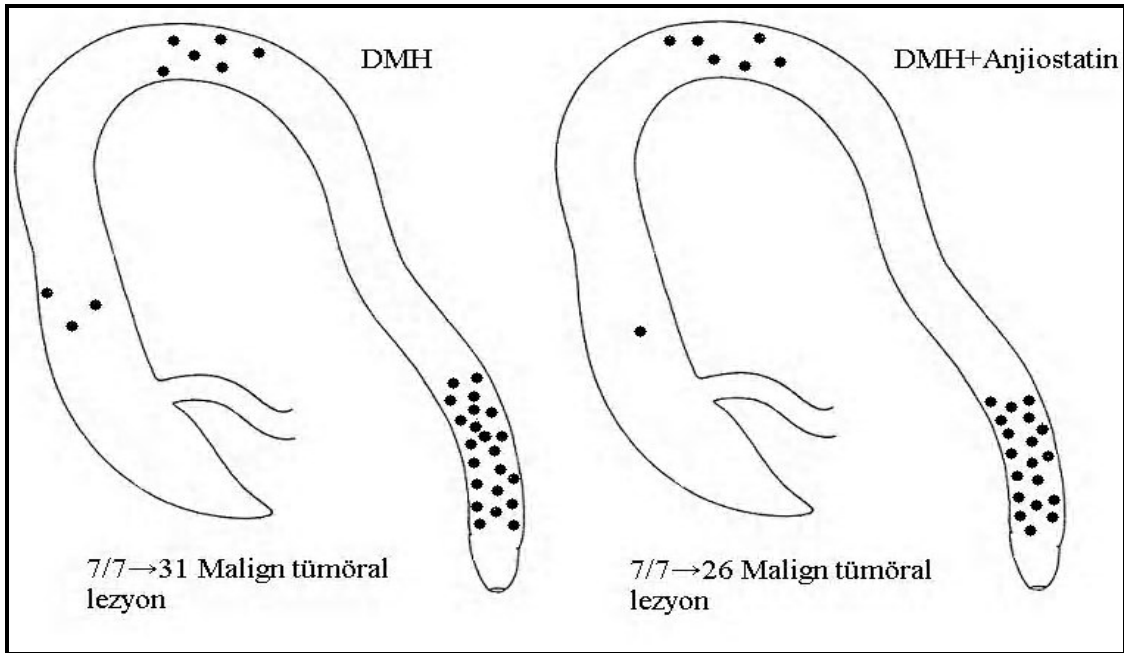
Tablo 4.4. Deney gruplarında bulunan şiddetli displastik lezyonların kolon'daki dağılımı ve istatistiksel değerleri

Gruplar	Lezyon görülen fare sayısı	Lezyon sayısı	Ortalama lezyon sayısı	Ortanca	Min ve Mak	Kolon'da dağılım n (%)		
						Proksimal	Orta	Distal
DMH (N:7)	6	22	3.14±2.67	3.00	0-7	2 (9.09)	5 (22.72)	15 (68.18)
DMH+ Anjiostati (N:7)	6	16	2.28±1.49	2.00	0-4	0 (0)	2 (12.5)	14 (87.5)

Histolojik kesitler kötü huylu tümöral lezyonlar yönünden incelendiğinde, kontrol grubundaki farelerin hiçbirinde kötü huylu tümöral lezyon gelişmezken, DMH ve DMH'a ilave olarak anjiostatin verilen her iki gruptaki farelerin hepsinde (%100) kötü huylu tümöral lezyonların geliştiği saptandı. DMH verilen gruptaki farelerin ortalama kötü huylu tümöral lezyon sayısı 4.42±2.29 olarak belirlendi. Bu lezyonların %9.67 kolonun proksimalinde, %19.35 orta kısmında, %70.96'sı da distal kısmında bulunmaktaydı. En fazla lezyonun görüldüğü kolonun distalinde bir farede görülen minimum ve maksimum lezyon sayıları sırasıyla 1 ve 6 olarak belirlendi. 6 lezyon sadece 2 farede tespit edildi. DMH'a ek olarak anjiostatin verilen gruptaki farelerde ortalama lezyon sayısı ise 3.71±2.21 olarak belirlendi. Lezyonların kolonda dağılımı ise proksimal %3.84, orta %23.07, distal %73.07 olarak saptandı (Tablo 4.5, Şekil 4.1). Kolonun distalinde görülen lezyonlar için minimum ve maksimum değerleri 0 ve 6 olarak belirlendi. 6 lezyon sadece 1 hayvanda tespit edildi. DMH'a ek olarak anjiostatin verilen grupta ortalama lezyon sayısı sadece DMH verilen gruba göre düşük bulundu, fakat bu istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4.5). Saptanan lezyonlar histopatolojik yönden değerlendirildiğinde lezyonların adenokarsinom olduğu tespit edildi. Bu adenokarsinom lezyonlar ise noninvaziv (intramukozal) ve invaziv adenokarsinom şeklinde alt gruplara ayrıldı. Sadece DMH verilen gruptaki farelerde kötü huylu tümöral lezyonların %64.52'si noninvaziv adenokarsinomlar, %35.48'i ise invaziv adenokarsinomlar idi. DMH'a ek olarak anjiostatin verilen grupta noninvaziv ve invaziv adenokarsinomların görülme sıklığı ise % 50'şerdi.

Tablo 4.5. Deney gruplarında kötü huylu tümöral lezyonların kolon'daki dağılımı ve istatistiksel değerleri

Gruplar	Lezyon görülen fare sayısı	Lezyon sayısı	Ortalama lezyon sayısı	Ortanca	Min ve Mak	Kolon'da dağılım n (%)		
						Proksimal	Orta	Distal
DMH (N:7)	7	31	4.42±2.29	4.00	2-8	3 (9.67)	6 (19.35)	22 (70.96)
DMH+ Anjiostatin (N:7)	7	26	3.71±2.21	4.00	1-8	1 (3.84)	6 (23.07)	19 (73.07)



Şekil 4.1. Deney gruplarında kötü huylu tümöral lezyonların kolondaki dağılımı.

Kötü huylu tümöral lezyonları noninvaziv karsinom kriterine göre değerlendirdiğimizde DMH vererek kanser oluşumunu indüklediğimiz gruptaki farelerin hepsinde (% 100) noninvaziv adenokarsinomlar tespit edildi (Resim 4.11). Bu gruptaki toplam lezyon sayısı 20 olarak belirlenirken, ortalama lezyon sayısı 2.85 ± 1.95 olarak tespit edildi. Kolonun proksimalinde lezyon yoktu, mevcut lezyonların %15'i kolonun orta kısmında, %85'i ise distal kısmında idi. DMH'a ek olarak anjiostatin verilen grupta ise hayvanların 6'sında noninvaziv karsinomlar belirlendi. Bu gruptaki toplam lezyon sayısı sadece DMH verilen gruptaki lezyon sayısına göre düşüş göstermekte olup 13 olarak tespit edildi. Bu gruptaki lezyonların ortalama sayısı 1.85 ± 1.34 olarak

belirlenirken, sadece DMH verdiğimiz gruptaki gibi bu grupta da lezyonlar kolonun proksimalinde görülmedi. Lezyonların %15.38'i kolonun orta, %84.62'si distal kısmında tespit edildi.

DMH grubunda kolonun distalinde görülen maksimum lezyon sayısı 5 olup 2 farede görülür iken, DMH'a ilave olarak anjiostatin verilen farelerden birinde kolonun distalinde maksimum lezyon sayısı 4 olarak tespit edildi. Yukarıda da açıklandığı gibi DMH'a ek olarak anjiostatin verilen grupta lezyon sayısında bir azalma olmasına rağmen bu veri istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Deney gruplarında noninvaziv karsinomların kolon'daki dağılımı ve istatistiksel değerleri

Gruplar	Lezyon görülen fare sayısı	Lezyon sayısı	Ortalama lezyon sayısı	Ortanca	Min ve Mak	Kolon'da dağılım (%)			n
						Proksimal	Orta	Distal	
DMH (N:7)	7	20	2.85±1.95	2.00	1-6	0 (0)	3 (15)	17 (85)	
DMH+ Anjiostatin (N:7)	6	13	1.85±1.34	2,00	0-4	0 (0)	2 (15.38)	11 (84.62)	

Kötü huylu tümöral lezyonları histopatolojik olarak invaziv karsinom şeklinde (Resim 4.12, 4.13) sınıflandırdığımızda sadece DMH verilen gruptaki farelerin 6'sında invaziv adenokarsinomlar tespit edildi. Farelerdeki toplam lezyon sayısı 11 ve ortalama lezyon sayısı ise 1.57 ± 0.97 olarak belirlendi. Mevcut lezyonların %27.27'si kolonun proksimalinde, %27.27'si orta kısmında ve %45.45'i de distal kısmında bulunmaktaydı. DMH'a ek olarak anjiostatin verilen grupta ise hayvanların hepsinde (%100) invaziv adenokarsinomlar görülürken, toplam lezyon sayısı 13 olarak tespit edildi. Bu gruptaki farelerde ortalama lezyon sayısı 1.85 ± 1.06 iken lezyonların %7.69'unun kolonun proksimalinde, %30.76'sinin orta kısmında ve %61.53'ünün de distal kısmında bulunduğu tespit edildi.

DMH grubundaki bir farede kolonun distalinde görülen maksimum lezyon sayısı 1 olup 5 farede gözlenirken DMH'a ek olarak anjiostatin verilen gruptaki farelerde kolonun distal kısmında maksimum 2 lezyon görülürken bu durum ise 2 farede belirlendi.

Lezyonlarda her iki grup içinde invazyon derinliği çoğunlukla muskularis mukoza ve submukozaya doğru iken nadir olarak bazı lezyonların tunika serozaya kadar invazyon gösterdiği tespit edildi Yukarıdaki veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde DMH'a ek olarak anjiostatin verilen gruptaki farelerin lezyonlarında bir artma olmasına rağmen bu anlamlı değildi (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Deney gruplarında invaziv karsinomların kolon'daki dağılımı ve istatistiksel değerleri

Gruplar	Lezyon görülen fare sayısı	Lezyon sayısı	Ortalama lezyon sayısı	Ortanca	Min ve Mak	Kolon'da dağılım n (%)		
						Proksimal	Orta	Distal
DMH (N:7)	6	11	1.57±0.97	2.00	0-3	3 (27.27)	3 (27.27)	5 (45.45)
DMH+ Anjiostatin (N:7)	7	13	1.85±1.06	2.00	1-4	1 (7.69)	4 (30.76)	8 (61.53)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bağırsak tümörleri tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir. Rektum da dahil olmak üzere kolon, vücuttaki diğer organlardan daha fazla primer neoplazmın kaynak noktasıdır. Kolorektal kanserler ölümcül kanserler arasında, bronkojenik kanserlerden sonra ikinci sırada gelmektedir. Kolorektal kanserlerin etiyojisi tam anlamıyla bilinmemekle beraber bazı faktörlerin kolorektal kanser oluşumu ile ilgili olduğu bilinmektedir. Bu faktörleri genel anlamda çevresel ve genetik faktörler şeklinde sınıflandırabiliriz. Kanser oluşumu, çevresel etkenlerin ve genetik yatkınlığın etkileşimi sonucu uzun bir süreç sonrasında ortaya çıkmaktadır (92,98). Hayvan modelleri, insanda kolorektal kanser gelişimi ve patogenezi altında yatan mekanizmaların iç yüzünün kavranmasında önemli katkılar sağlayabilir (108). Ratlar ve fareler gibi laboratuvar hayvanları kolon kanserini doğal olarak geliştiremezler. Bu sebeple hayvanlar genellikle kanseri başlatan bir uyarıcı ile muamele edilir. DMH ve metabolik ürünü olan azoksimetan bazı çalışmalarda kanseri başlatıcı olarak sıklıkla kullanılmışlardır. DMH kolona karşı yüksek derecede organ spesifitesi olan kuvvetli bir karsinogen olup hayvanlara intraperitoneal, subkutan, intrarektal ve oral tarzda uygulanabilir (101,113,119,120). Hayvanlarda kalın bağırsak tümörlerini indüklemeye

DMH'in tercih edilmesinin sebepleri ise DMH tarafından indüklenen kolon tümörlerinin epitel orijinli olup insan kolonu neoplazmlarına benzer morfoloji sergilemesi, tümörlerin dağılımında insan kolonundakine benzer bir dağılım olmasıdır (103,121). Farelerde DMH'a karşı cevapta ırka bağlı duyarlılıkta değişkenlikler mevcuttur (116,122,123). Kuraguchi (2001) iki farklı karsinogeni uyguladığı çalışmada kullanmış olduğu fare ırkları arasında Balb-c farelerinin DMH'a karşı cevapta en duyarlı ırk olduğunu bildirmiştir (104). Hayvan modellerinde kolorektal kanser gelişme oranı kullanılan karsinogenin dozuna, uygulama şekline, uygulama sıklığı ve süresine bağlıdır. Bunlara ilaveten farelerin cinsiyeti, yaşı ve genetik geçmişi kolorektal kanser gelişme oranını etkiler. Ayrıca farelerin bağırsak florası, diet gibi faktörler de karsinogenik bileşiklerin metabolizmasına tesir ederek bu bileşiklerin etkili lokal konsantrasyonlarını etkileyebilir (108).

Laboratuvar hayvanlarında deneysel kanser oluşturmada, DMH farklı sayı ve dozlarda uygulanmıştır. Kolon kanseri oluşturmak için DMH'ın tek doz uygulamasının etkisini inceleyen çalışmalarda, farklı dozlar (6.8-30 mg/kg) ve farklı uygulama yöntemleri (intraperitoneal-subkutan) kullanılmış, DMH enjeksiyonundan sonra değişik sürelerde (12 saat-2 yıl) bekletilen hayvanların kolonlarında patolojik bir lezyona rastlanılmamıştır (103,104,106,116,119). Farelerde DMH'ın tek doz uygulanmasının etkisini daha ayrıntılı olarak inceleyen Toth ve ark. (1976), 20 mg/kg DMH'ı 5 haftalık 50 dişi ve 50 erkek swiss albino faresine subkutan tarzda uygulayıp hayvanları yaşamları boyunca takip etmiştir. Hayvanlarda kontrol gruplarına göre çok az bir kilo kaybını rapor etmiştir. Histopatolojik yönden değerlendirdiğinde ise 57 haftalık 1 dişi farede çekum adenokarsinomu, 75 haftalık 1 erkek farede ise çekum polipoid adenomasının geliştiğini tespit etmiştir. Bunların dışında hayvanlarda farklı zamanlarda kan damarları ve akciğer tümörlerinin oluştuğunu belirtmiştir (124).

Çoklu doz uygulamalarında ise değişik fare ırkları üzerinde yapılan çalışmalarda; 2-26 hafta aralığında haftada bir kez değişik dozlarda (6,8-20 mg/kg) sadece DMH uygulanmış ve son DMH enjeksiyonundan sonra değişik sürelerde (1 hafta-2 yıl) bekletilen deney hayvanlarında farklı oranlarda (%26-%100) verilen doza, süreye ve uygulama şekline bağlı olarak kolon tümörlerinin geliştiği, bunların çoğunlukla kolonun distal kısmında gözleendiği belirtilmiştir. Bazı hayvanlarda kolon tümörleri yanında anal bölge ve akciğer tümörlerinin de geliştiği tespit edilmiştir (105,107,110,111,122,125).

Chang (1986) CF-1 fareleri üzerinde DMH'nin etkisini incelemiş olduğu çalışmasında farelere 20 mg/kg DMH'ı haftada bir kez 9, 11 ve 18 hafta boyunca subkutan tarzda vermiş ve hayvanları son DMH enjeksiyonundan 1 hafta sonra öldürmüştür. Kimyasal indüklenmiş kolon neoplazmlarının biyolojik davranışı üzerinde DMH'in farklı toplam dozlarının etkisini incelemek için ise farelere aynı dozda DMH uygulamasını 12 ve 22 hafta süresince yapmış ve hayvanları 25.-26. haftalarda sakrifiye etmiştir. Makroskopik olarak görülmemesine rağmen, DMH uygulamasının başlamasından 9 hafta sonra öldürülen farelerin hepsinde displastik kriptaların ve küçük neoplastik lezyonların kolon mukozasında ışık mikroskobu altında gözlendiğini rapor etmiştir. 11 ve 18 haftalıkarda neoplazmların sayı ve boyutlarında bir artış tespit etmiş olup neoplazmların mukoza ile sınırlı olduğunu belirtmiştir. 12 ve 22 hafta süresince DMH uygulananların hepsinde (%100) kolonun distal kısmında çoklu neoplazmaları belirlemiş olup, oluşan neoplazmların büyük bir çoğunluğunun invazyon sergilediğini bildirmiştir. Yapmış olduğu çalışmada kimyasal olarak indüklenmiş kolon neoplazmlarının üretiminin hayvanlara verilen karsinojenin toplam dozuna bağlı olduğunu, neoplazmların invazyon derinliğinde ise toplam karsinojen dozundan daha çok tedaviye başlangıç ile sakrifiye arasındaki geçen zamanın önemli bir faktör gibi gözüktüğünü bildirmiştir (126).

Toth ve arkadaşları (1976) Swiss Albino fareleri üzerinde DMH'nin etkisini inceledikleri geniş çaplı araştırmalarında 5 haftalık farelere 20 mg/kg DMH'ı 10 hafta boyunca haftada bir kez subkutan tarzda uygulamışlardır. Hayvanları ölünceye kadar takip etmişler ve 41 dişi farenin (%82) kalın bağırsağında 130 tümör, 45 erkek farenin (%90) kalın bağırsağında 156 tümör geliştiğini rapor etmişlerdir. Dişi farelerde ilk tümörün 29, son tümörün 90 haftalıkken görüldüğünü, erkek farelerde ise ilk tümörün 32, son tümörün ise 77 haftalıkken görüldüğünü belirtmişlerdir. Tümörlerin çekum, kolon ve rektumun adenom ve adenokarsinomları olduğu belirtilmiş olup, tümörler çok fazla sıklıkla ileuma komşu çekumda, kolonun alt bölümünde ve rektumda tespit edilmiştir. Cinsiyetler arasında tümörlerin dağılımı bakımından önemli bir farklılık görülmemiş ve tümörlerin sıklıkla muskularis mukozaya invaze olduğu, nadir olarak da serozayı içine alan bağırsağın tüm duvarı boyunca bir büyümenin olduğu rapor edilmiştir. Çok az vakada metastatik lezyonlar tespit edilmiştir. Hayvanlarda kalın bağırsağın tümörleri dışında değişik organlarda kan damarı tümörleri, akciğer tümörleri, böbrek tümörleri ve anüs tümörleri rapor edilmiştir (124).

Wu (1994) ve arkadaşları 4-5 haftalık Balb-c türü fareler üzerinde yapmış olduğu çalışmalarında ilk 14 hafta boyunca 15 mg/kg daha sonraki 8 hafta süresince 20 mg/kg DMH'ı haftada bir kez olarak subkutan tarzda farelere uygulayıp, 25. haftada tüm hayvanları sakrifiye etmişlerdir. Hayvanların %46.4'ünde kolon tümörü oluşumunu rapor etmişler ve hayvan başına düşen ortalama tümör sayısını 2.76 ± 0.4 olarak belirtmişlerdir. Hayvanların %23'ünde 3'ten fazla tümör bulunduğunu bildirmişlerdir (115).

DMH'in deneysel kolon kanseri oluşturma üzerine etkisini inceleyen önceki bir çalışmamızda (117), Balb-c farelerine hafta bir kez 20 mg/kg DMH 12 hafta süresince subkutan tarzda uygulanmış ve son DMH enjeksiyonundan sonra değişik sürelerde (1.5, 3.0, 4.5 ve 6.0 aylar) hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Çalışma süresince DMH enjekte edilen farelerin genel görüntüsünde farklılık gözlenirken, vücut ağırlıkları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı tesbit edilmiştir. 4.5 ay sonra sakrifiye edilen hayvanlar histopatolojik yönden değerlendirildiğinde hafif displazi ve karsinomun hayvanların hepsinde (%100) şiddetli displazinin ise %85'inde görüldüğü, şiddetli displazi ve karsinoma görülme sıklığının zamana bağlı olarak artış gösterirken, hafif displazide bu durum gözlenmemiştir. Son DMH enjeksiyonundan 4.5 ay sonra öldürülen hayvanlarda toplam hafif displazi, şiddetli displazi ve karsinom sayılarının sırasıyla 16, 13 ve 30 olduğu, ayrıca tümöral lezyonların genellikle adenokarsinom olduğu ve patolojik olarak değerlendirip sınıflandırılan lezyonların büyük bir çoğunluğunun kolonun distal kısmında geliştiği görülmüştür.

Mevcut literatür bilgilerini incelediğimizde farelerde deneysel kolon kanseri oluşturmak için karsinojen olarak DMH'in seçildiği doz ve uygulama şekli olarak da genellikle 20 mg/kg subkutan uygulamanın daha etkili bir sonuç verdiği belirlendi. Ayrıca yapılan çalışmalarda karsinojenin uzun süreli haftalık uygulanması gerektiği ve bu sürecin sonunda hayvanlarda kanser oluşumu için belirli bir süre beklenmesi gerektiği tespit edildi (117,124,126). Gerek yukarıda verilen daha önceki yapılan çalışmalar, gerekse bizim yaptığımız çalışmanın sonuçları ışığında yapmış olduğumuz bu çalışmamızda Balb-c türü farelere 20 mg/kg DMH subkutan olarak 12 hafta süresince uygulandı ve son DMH uygulamasından 4.5 ay sonra fareler sakrifiye edildi. Deney süresince sadece DMH verilen farelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında genel görünümünde bozuklukların olduğu ve kilolarının daha az olduğu belirlendi. Farelerin kolonlarını

histopatolojik olarak değerlendirdiğimizde hafif displastik ve Şiddetli displastik lezyonların hayvanların % 85.71'inde, kötü huylu tümöral lezyonların ise hayvanların % 100'ünde olduğu tespit edildi. Tümöral lezyonların hepsinin adenokarsinom olduğu, bir kısmının invazyon gösterdiği, lezyonların çoğunlukla kolonun distal kısmında yerleşim sergilediği ve farelerde çoklu tümöral lezyonların bulunduğu tespit edildi. Elde ettiğimiz veriler mevcut literatür bilgileri ile uyum göstermekteydi. Deneysel kanser oluşturmada araştırmacılar arasında bazı sayısal farklılıkların bulunması kullanılan fare ırkına, DMH dozuna, süresine, uygulama Şekline ve DMH uygulaması sonrası farklı bekleme zamanlarına bağlanabilir.

Günümüzde insanların ölümüne neden olan sebepler arasında kanser ilk sıralarda yer almaktadır. Teşhis ve tedavisindeki ilerlemelere rağmen hastaların hayatta kalma oranı halen azdır. Bugüne kadar tümör hücrelerinin kendileri antikanser tedavisi için ilk hedef olarak kabul ediliyordu. Bu durum solid tümörlerin bazıları için hastaların hayatta kalma sürelerini uzatırken, tedaviye bağlı toksisite ve ilaç direncindeki artış morbidite ve mortalitenin en büyük sebebi olmaya devam etmekteydi (39). Son gelişmeler ve araştırmalar tümör büyümesi ve gelişimi için önemli olan yolları seçici olarak hedefleyen normal dokuları ayırma yeteneği olan tedaviler üzerinde yoğunlaşmıştır (68). Tümör büyümesi ve metastazı ile anjiogenezis arasındaki sıkı ilişkinin 1971 yılında Folkman tarafından açıklanması ve ileriki dönemlerde anjiogenezis basamaklarının aydınlatılması, anjiogenezis inhibisyonunun tedavi avantajı sağlayabileceği düşüncesini geliştirmiştir (59). Kolorektal kanserde primer tümördeki artmış anjiogenezis kötü prognoz ve hastalığın nüksetmesi ile ilişkilendirilmiştir. Araştırmacılar mikrodamar yoğunluğunun kanserin invazyon derinliği ile bir ilişkisinin olabileceğini ve anjiogenezisin metastaz oluşumu ve büyümesi için Őart olduğunu bildirmişlerdir (18). Kolorektal kanserli hastaların tedavisi için önerilen ve değerlendirilen ilk antianjiogenik bileşikler endostatin ve anjiostatindir (68). Anjiostatin dolaşımdaki bir anjiogenezis inhibitörü olup 3LL tümörü taşıyan C57BI6/J farelerinin idrar ve serumunda Folkman Laboratuvarı tarafından keşfedilmiştir (18,62). Anjiostatin, plazminojenin kringle alanı olarak bilinen ve disülfid bağları ile bağlanmış beş tane olan üçlü ilmeklerinin ilk dördünü içerir. (Kringle 1-4), (60,62,72). Anjiostatin büyüyen primer tümör varlığında dolaşımda çoğalır ve primer tümör uzaklaştırılmasından sonra dolaşımdan kaybolur. Böylece 3LL karsinomasının kesilip alınması dolaşan anjiostatinin azalması ile sonuçlanır. Bu durumda yeni damarlanma ve akciğer

metastazlarının büyümesine mücade eder (62). Anjiostatin'nin keşfi büyük bir heyecan uyandırmıştır. Çünkü primer tümörün çıkarılmasından sonra dıştan anjiostatin uygulaması metastatik büyümeyi engelleyebilir gibi gözükmektedir (127). Bu hipotezler ışığında anjiostatin ile ilgili birçok in vitro ve in vivo deneyler yapılmıştır (41,62,72,75,76).

Plazminojenden arındırılmış fare veya insan anjiostatini, in vitro olarak çeşitli dozlarda (1-100 µg/ml) uygulandığı zaman insan umbilikal veni endotel hücrelerini (HUVE), malign fare hemangioendothelioma (EOMA) hücrelerini, inek kapiller endotel hücrelerini (BCE) ve inek aort endotel hücrelerini (BAE) içeren endotel soylarının çoğalmasını doza bağımlı tarzda inhibe ettiği bildirilmiştir. Buna zıt olarak endotel hücre çoğalmasının maksimum inhibisyonunu sağlayan anjiostatin konsantrasyonlarının, 3T3 fibroblastları, inek aort düz kas hücrelerini, insan fetal fibroblastlarını, inek retinal pigment epitel hücrelerini, inek aortik düz kas hücrelerini ve 3LL kemirgen Lewis akciğer karsinoma hücrelerini içeren çeşitli normal ve neoplastik nonendotel hücre grupları üzerinde inhibitör etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum ise anjiostatinin özellikle endotel hücre çoğalmasını engellediğini göstermiştir (41,60,62,72,73,75).

Endotel çoğalmasının engellenmesi üzerine insan anjiostatininin daha küçük bileşenleri üzerine yapılan çalışmalarda her bir kringel yapısı arasında fonksiyonel farklılıklar olduğu ve anjiostatinin endotel hücreleri üzerinde inhibitör aktivitesinin kringel 1, kringel 2 ve kringel 3 tarafından paylaşılmakta olup, muhtemelen bu paylaşımında kringel 4'ün yer almadığı belirlenmiştir. Birleşmiş kringel parçalarının endotel hücreleri üzerinde inhibisyon etkisinin araştırıldığı çalışmalarda ise K 1-3'ün en kuvvetli inhibitör etkiyi gösterdiği bildirilmiştir (41,60,62,72,74,76).

Chorioallantoic membran incelemelerinde anjiostatin in vivo olarak çeşitli dozlarda (0.1-100 µg/embriyo) uygulandığında anjiostatinin anjiogenezisi engellediği ve doza bağımlı inhibisyonun 20 µg'da başladığı, yaklaşık 100 µg da ise doyuma ulaştığı belirtilmiştir (41,62).

Kim ve arkadaşları (1999) normal anjiostatinden (K 1-4) bir tane eksik kringle içeren anjiostatinin (rPK1-3) in vivo olarak değişik dozlarının (10-30 µg) çeşitli anjiogenik moleküller tarafından uyarılan yeniden damarlanma üzerinde etkisini tavşan korneaları üzerinde yaptıkları bir çalışmada incelemişlerdir. rPK1-3 ile muamele edilmiş korneaların daha az yeniden damarlanma sergilediklerini ve yeniden damarlanmanın inhibisyon derecesinin verilen dozla doğru orantılı olduğunu belirtmişlerdir (76).

Önceki çalışmalar göstermiştir ki insan anjiostatininin sistematik uygulanması farelere transplante edilmiş olan insan ve kemirgen primer tümörlerini güçlü bir şekilde inhibe etmektedir (73,128). 3 agresif kemirgen primer tümör (Lewis Lung karsinoma, T241 fibrosarkoma ve reticulum hücre sarkoması) büyümesinin günlük 100 mg/kg dozlarda ortalama %84 oranında inhibe olduğu bildirilmiştir (128). Primer tümörlerin büyümesinin inhibisyonu günlük 10 mg/kg dozlarda kolaylıkla görülmüştür. Anjiostatin'in dozlarındaki artış ile anti tümör etkinlik arasında doğru orantılı bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Anjiostatinin insan göğüs karsinomasını %95, kolon karsinomasını %97 ve prostat karsinomasını ise neredeyse %100 inhibe ettiği rapor edilmiştir (62,128). Kolon ve göğüs karsinomasını taşıyan farelerde, anjiostatin tedavisinin geri çekilmesinden 2 hafta sonra tümörlerin yeniden büyüdüğü tespit edilmiştir. Anjiostatin tedavisi günlük 100 mg/kg maksimum doza ulaşsa bile farelerde kilo kaybı ve benzeri hiçbir toksisite görülmemiştir. Toksisitenin olmayışı gösterir ki anjiostatin ile yapılan etkili antitümör tedavisi tümörün endotelyal bölümünü direkt olarak etkiler ki bu durum tümör büyümesinin kontrol edilmesinde endotel hücre kompartmanının önemini göstermiştir (62).

Sim ve arkadaşları (1997) primer ve metastatik tümör büyümesi üzerine anjiostatinin etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarında 8 haftalık C57Bl/6J farelerine LLC (Lewis Lung karsinoma) hücrelerini implante etmişler ve tümörler 1500 mm³ boyuta ulaştığında (bu durum ise implantasyondan yaklaşık 14 gün sonra olur) bu tümörleri cerrahi olarak uzaklaştırmışlardır. Tümörleri çıkarılmış gruptaki hayvanlara doğal ve rekombinant anjiostatin proteinlerini sistematik olarak 14 gün süresince günlük 1.5 mg/kg doz şeklinde uygulamışlar ve fareleri 28. günde sakrifiye etmişlerdir. Yaptıkları incelemelerde rekombinant anjiostatin proteini ve doğal anjiostatin ile muamele edilmiş farelerin akciğer metastazlarının sayısını (10±1, 3±1) kontrol grubu farelerinin akciğer metastaz sayılarından (77±15) farklı olduğunu belirlemişler ve %90'ın üzerinde

inhibisyonu tespit etmişlerdir. Günlük 100 mg/kg (fare başına 2mg) rekombinant anjiostatin proteininin primer tümöre etkisini inceledikleri çalışmalarında ise bu dozun farelerde primer LLC tümörlerini dramatik bir şekilde baskıladığını rapor etmişlerdir (73).

Yokoyama ve arkadaşları (2000) MA148 ovaryum kanseri hücrelerini farelere implante ederek oluşturdukları ovaryum kanseri üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında fare anjiostatininin 30 gün süre ile günlük 20 mg/kg subkutan enjeksiyonlarının tümör büyümesini tedavi süresi boyunca önemli derece azalttığını rapor etmişlerdir. Anjiostatin ile 2 hafta tedaviden sonra ortalama tümör hacmini 200 mm³, kontrol grubunda ise 589 mm³ olarak belirlemişlerdir. Tedavi sonucunda anjiostatinin tümör büyümesini %57 engellediğini tespit etmişlerdir. Yaptıkları histolojik incelemelerde kontrol tümörleri ile karşılaştırıldığında anjiostatin ile tedavi edilmiş tümörlerde kan damarı yoğunluğunun azalmış olduğunu, apoptozisde ise belirgin bir artışın olduğunu belirlemişlerdir. Antianjiogenik tedavinin tümör anjiogenezinin azalmasına, bu durumun da ovaryum kanser hücrelerinin apoptotik ölümüne neden olduğunu bildirmişlerdir (80). Dings ve arkadaşları (2003) ise dişi athymic nude farelerde aynı tür hücre grubu ile oluşturdukları ovaryum kanserinde aynı doz ve tarzda anjiostatin uygulaması yapmışlar ve tümör büyümesinin yaklaşık %50 inhibe edildiğini ve tümör mikrodamar yoğunluğunun azaldığını rapor etmişlerdir (77).

Joe ve arkadaşları (1999) athymic nude farelerde insan glioma hücrelerinin (U-87) intraserebral implantasyonu ile beyin tümörleri elde etmişlerdir. Farelere günlük 100 mg/kg rekombinant kringle 1-3 (rPK1-3) uygulamasını implantasyonun 7. gününden itibaren subkutan tarzda 21 gün süresince yapmışlardır. rPK1-3 uygulaması süresince hiçbir yeniden büyüme ve oluşmanın görülmediğini, kontrol tümörleri ile karşılaştırıldığında büyümenin %71.2 oranında önemli bir şekilde gerilediğini bildirmişlerdir. rPK1-3 ile muamele edilen hayvanlarda tümörlerin ortalama maksimum alanının 11.1±6 mm², kontrollerin ise 45.5±20.4 mm² olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca tedavi edilen hayvanlarda beyin tümörlerinin damarlanmasının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %78.9 daha az olduğunu, bFGF ve VEGF ekspresyonunun da aynı şekilde tedavi grubunda azalmakta olduğunu bildirmişlerdir (78).

Drixler ve arkadaşları (2000) 8-10 haftalık erkek Balb-c farelerine C-26 (Kolon adenokarsinoma) hücrelerini subkutan tarzda implante etmişler ve deneyi tümör hacimleri farelerin hayat kalitesini etkilemiş olduğu 14. günde sona erdirmişlerdir. Tedavi programı (7.-14. günler arası) primer subkutan tümörler üzerinde ve %70 kısmi hepatektomi uygulanan farelerde ya günde iki kez subkutan tarzda 100 µl anjiostatin ya da sürekli mikro pompalar yoluyla 200 µl anjiostatin şeklinde uygulanmıştır. Tümör hücrelerinin enjeksiyonundan 14 gün sonra kontrol grubu tümörlerinin ortalama hacminin $1848 \pm 84 \text{ mm}^3$ 'e, günlük iki kez anjiostatin ile muamele edilen farelerde $919 \pm 94 \text{ mm}^3$ 'e ulaştığı ve anjiostatini devamlı alan grupta ise tümör büyümesinin neredeyse tamamen baskılandığı ($104 \pm 16 \text{ mm}^3$) rapor edilmiştir. Kısmi hepatektomiye uğramış yenilenen karaciğerdeki hızlanmış tümör büyümesinin anjiostatin tarafından önemli bir şekilde engellendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada anjiostatinin sürekli uygulanmasının bolus (günde 2 kez subkutan) enjeksiyon ile karşılaştırıldığında hem tümör büyümesi hem de anjiogenezis inhibisyonunu önemli bir şekilde artırdığı tespit edilmiştir. Bu durum sadece primer subkutan tümörler için değil aynı zamanda aşılama sonrası normal şartlarda kemirgenlerin 15 ± 2 gün içerisinde ölümüne sebep olan yüksek derecede agresif hücre grubu kullanan metastatik aşırı büyüme içinde gösterilmiştir. Bunlara ilaveten aynı tarz uygulama ve 100 mg/kg günlük dozun % 70 kısmi hepatektomiden sonra kolorektal hepatik metastazların hızlanmış aşırı büyümesini de aynı şekilde engellediği rapor edilmiştir (79).

Nestler ve arkadaşları (2005) anjiostatinin CC531 kolon karsinoma hücreleri üzerinde in vitro ve laparoskopik hayvan modelinde ise in vivo inhibitör etkisini incelemişlerdir. Çalışmalarında anjiostatinin değişik dozlarının ($10-20 \mu\text{g/ml}$) in vitro olarak tümör hücreleri üzerinde sitotoksik hiçbir etkisinin olmadığını fakat tümör hücrelerinin adezyon ve invazyonunu anlamlı bir şekilde engellediğini rapor etmişlerdir. Laparoskopik hayvan modelinde ise tümör hücrelerinin aşılama sonrası hayvanlara değişik dozlarda (hayvan başına $5-20 \mu\text{g}$) anjiostatin uygulamasını intraperitoneal ve/veya subkutan tarzda yapmışlar ve hayvanları 21 gün sonra sakrifiye etmişlerdir. Bu in vivo çalışmada araştırmacılar $20 \mu\text{g/ml}$ anjiostatinin hem sadece bir kere intraperitoneal uygulamasının hem de 48 saatte bir $5 \mu\text{g/ml}$ subkutan uygulamayla birleşmiş tedavisinin intra-peritoneal tümör ağırlığını anlamlı bir şekilde azalttığını bildirmişlerdir (81).

Beerepoot ve arkadaşları (2003) farklı kanser hastaları üzerinde farklı dozlarda (günlük 7.5-30 mg/m²) rekombinant insan anjiostatininin günlük iki kez subkutan uygulamasının toksisitesini ve farmakokinetiklerini incelemişlerdir. Çalışmalarında bu inhibitörün çok iyi bir şekilde tolere edildiğini ve bu dozların uygulanabilir olduğunu rapor etmişlerdir. Tedavi süresince hastaların hiç birinde WHO (Dünya Sağlık Örgütü) kriterlerine göre objektif tümör cevabı belirlenmemiştir (71).

Çalışmalarda anjiostatin ve bunun çeşitli formlarının kullanıldığı ve anjiostatinin endotel hücreleri üzerindeki inhibitör etkisinin K1-3 segmentlerinde bulunduğu ve bu anjiostatin K1-3 formunun normal anjiostatin (K1-4) formundan daha etkili olduğu bildirilmiştir (74,76). Bu verilerin ışığında biz de çalışmamızda tedavi grubunda rekombinant insan anjiostatininin K1-3 (rHuAng K1-3) formunu kullandık. Nestler ve arkadaşları (2005) CC531 kolon karsinoma hücreleri ile yaptıkları in vivo çalışmalarında 20 µg/ml anjiostatinin hem sadece bir kere intraperitoneal uygulamasının hem de 48 saatte bir 5 µg/ml subkutan uygulamayla birleşmiş tedavisinin diğer uygulamalara göre daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir (81). Biz de çalışmamızda DMH ile kanser indüklemesi gerçekleştirdikten sonra hayvanlara başlangıçta bir doz 20 µg rHuAng K1-3'ü intraperitoneal tarzda, daha sonra ise 2 günde bir 5 µg rHuAng K1-3'ü subkutan tarzda 3 ay boyunca uyguladık. Çalışmamızın sonucunda tedavi grubunda kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda şiddetli dizplazi ve kötü huylu tümöral lezyonların sayılarında bir azalış belirledik. Bu sonuçlar azalma göstermesi yönünden mevcut literatür bilgileriyle tutarlılık sergiliyordu (73,78-81). Çalışmamızda elde ettiğimiz azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bunun sebepleri ise tedavi için kullandığımız anjiostatinin çok pahalı olması nedeniyle yüksek dozlarının hayvanlara verilememesi, sürekli uygulamanın yapılamaması ve hayvan sayısının düşük olmasına bağlayabiliriz. Çünkü mevcut çalışmalarda hayvanlara yüksek dozlar uygulanmış ve uygulanan doz miktarlarında 100 mg/kg gibi maksimum doza ulaşılmış ve anjiostatinin inhibitör etkisinin doza bağımlı olduğu ve farelerde insan anjiostatininin yarılanma ömrünün yaklaşık 4-6 saat olduğu ve bu yüzden sürekli uygulamanın günde iki kez subkutan uygulamaya göre daha etkili bir sonuç verdiği bildirilmiştir (62,71,78,79). Mevcut çalışmalarda anjiostatinin oluşturulmuş primer tümör üzerine veya metastazları üzerine etkisi incelenmiş olup bizim çalışmamızda ise anjiostatinin koruyucu etkisine bakılmıştır. Çünkü deneyimizde anjiostatin uygulamasına son DMH uygulamasının bitiminden 6 hafta sonra başladık. Bu konu ile ilgili daha önce yaptığımız çalışmada son

DMH enjeksiyonundan 6 hafta sonra farelerin kolonlarında kötü huylu tümöral lezyonların oluşmadığı ancak %100 displastik lezyonların varlığı tespit edilmiştir (117). Bu çalışmanın ışığında biz de son DMH enjeksiyonundan sonraki 6 haftalık süreç içerisinde farelerde displastik lezyonların olduğunu kabul ederek, anjiostatinin koruyucu etkisini incelemek üzere çalışmamızı sürdürdük. Bu veriler ışığında bir antianjiogenik faktör olan anjiostatinin tümör gelişimi üzerinde uygulanan bu dozlarda az da olsa bir koruyucu etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar mevcut literatür bilgileri ile uyumluluk göstermekteydi (73,78-81).

Sonuç olarak anjiostatinin yüksek dozlarda sistematik uygulamasının, radyoterapi ve kemoterapi ile ortak olarak kullanıldığında hem koruyucu hem de tedavi edici etkisinin primer tümörler ve metastatik yayılım üzerinde daha fazla olabileceği kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Velasco P, Lange-Asschenfeldt B. Dermatological aspects of angiogenesis. *British Journal of Dermatology* 2002; 147(5):841-52.
2. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney International* 1999; 56(3):794-814.
3. Hacialioğulları M. İnterleukin-12'nin embriyonik vitellus kesesi damarlanması üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2005.
4. Bhushan M, Young HS, Brenchley PEC, et al. Recent advances in cutaneous angiogenesis. *British Journal of Dermatology* 2002; 147(3):418-425.
5. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; 267(16):10931-10934.
6. Shimizu K, Oku N. Cancer anti-angiogenic therapy. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 2004; 27(5):599-605.
7. Mangi MH, Newland AC. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *British Journal of Haematology* 2000; 111(1):43-51.
8. Mcnamara DA, Harmey JH, Walsh TN, et al. Significance of angiogenesis in cancer therapy. *British Journal of Surgery* 1998; 85:1044-1055.

9. Konukoğlu D, Turhan MS. Anjiyogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiyogenezi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2005; 36(1):42-48.
10. Distler JW, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, et al. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine* 2003; 47:149-61.
11. Kılıç T, Yıldırım Ö, Şahin S, Pamir MN. Glial tümörlerin anjiogenezi. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 2005; 15(1):1-9.
12. Talks KL, Haris AL. Current status of antiangiogenic factors. *British Journal of Haematology*. 2000; 109:477-489.
13. Torun E, Bayram F. Endokrin bir organ olarak endotel ve endotelinin hipertansiyondaki rolü. *Erciyes Tıp Dergisi* 2004; 26(3):126-131.
14. Ülger H. The growth promoting effects of bFGF, VEGF and PD-ECGF on embriyonic developmenmt and yolk sac vascularisation, PhD Thesis, Department of Human Anatomy and Cell Biology Universty of Nottingham, England 1997.
15. Fox SB, Gatter KC, Haris AL. Tumor angiogenesis. *Journal of Pathology* 1996;179:232-237.
16. Bloemendal HJ, Logtenberg T, Voest EE. New strategies in anti-vascular cancer therapy. *European Journal of Clinical Investigation* 1999; 29(9):802-809.
17. Red-Horse K, Ferrara N. Imaging tumor angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116(10):2585-7.
18. Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, et al. Angiogenesis and antiangiogenic therapy of colon cancer liver metastasis. *Annals of Surgical Oncology*. 2003; 10(7):722-33.
19. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews* 1997; 18(1):4-25.
20. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases, angiogenesis and cancer. *Clinical Cancer Research* 2003; 9:551-554.
21. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. *Science* 2002; 295:2387-2392.
22. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 2001; 93(3):178-93.

23. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, et al. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *The Journal of Cell Biology* 1987; 105:1039-1045.
24. Shah M, Foreman DM, Ferguson MWJ. Neutralisation of Tgf-B₁ and Tgf-B₂ or exogenous addition of Tgf-B₃ to cutaneous rat wounds reduces scarring. *Journal of Cell. Science* 1995; 108:985-1002.
25. O'Sullivan C, Lewis CE, Harris AL, et al. Secretion of epidermal growth factor by macrophages associated with breast carcinoma. *Lancet* 1993; 342(8864):148-9.
26. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 2004; 59(2):21-6.
27. Miyazono K, Okabe T, Urabe A, et al. Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets. *The Journal of Biological Chemistry* 1987; 262(9):4098-4103.
28. Usuki K, Heldin NE, Miyazono K, et al. Production of platelet-derived endothelial cell growth factor by normal and transformed human cells in culture. *Cell Biology* 1989; 86:7427-7431.
29. Stupack DG, Cheresch DA. Get a ligand, get a life: Integrins, signaling and cell survival. *Journal of Cell Science* 2002; 115:3729-3738.
30. Kumar CC, Malkowski M, Yin Z, et al. Inhibition of angiogenesis and tumor growth by Sch221153, a dual $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrin receptor antagonist. *Cancer Research* 2001; 61:2232-2238.
31. Lasagna N, Fantappie O, Solazzo M, et al. Hepatocyte growth factor and inducible nitric oxide synthase are involved in multidrug resistance-induced angiogenesis in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Research* 2006; 66:2673-2682.
32. Gutschalk CM, Herold-Mende CC, Fusenig NE, et al. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promote malignant growth of cells from head and neck squamous cell carcinomas in vivo. *Cancer Research* 2006; 66:8026-8036.
33. Chen Y, Zhang S, Chen YP, et al. Increased expression of angiogenin in gastric carcinoma in correlation with tumor angiogenesis and proliferation. *World Journal Gastroenterol* 2006; 12(32):5135-5139.
34. Jackson D, Volpert OV, Bouck N, et al. Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein. *Science* 1994; 266(5190):1581-4.

35. Lopez CL, LeRoith D, Aleman IT. Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004; 101(26):9833–9838.
36. Rakic JM, Lambert V, Devy L, et al. Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2003; 44:3186-3193.
37. Konturek PC, Kania J, Burnat G, et al. Prostaglandins as mediators of Cox-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2005; 56(5):57-73.
38. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *The Journal of Clinical Investigation* 1994; 94:2036-2044.
39. Madhusudan S, Haris AL. Drug inhibition of angiogenesis. *Current Opinion in Pharmacology* 2002; 2:403-414.
40. Kim YM, Hwang S, Kim YM, et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(31):27872–27879.
41. O'Reilly M, Holmgren L, et al. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79:315-328.
42. Dawson DW, Pearce SFA, Zhong R, et al. CD36 mediates the in vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *The Journal of Cell Biology* 1997; 138(3):707–717
43. Ranieri G, Gasparini G. Angiogenesis and angiogenesis inhibitors: a new potential anticancer therapeutic strategy. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine and Metabolic Disorders* 2001; 1:241-253.
44. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal* 1991; 5:2145-2154.
45. Maione TE, Gray GS, Petro J, et al. Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* 1990; 247(4938):77-9.
46. Pike SE, Yao L, Jones KD, et al. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *The Journal of Experimental Medicine* 1998; 188(12):2349–2356.

47. Fotsis T, Zhang Y, Pepper MS, et al. The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature* 1994; 368(6468):237-239.
48. Boivin D, Gendron S, Beaulieu E et al. The antiangiogenic agent neovastat (Æ-941) induces endothelial cell apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics* 2002; 1:795–802.
49. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, et al. Matrix metalloproteinases: Biologic activity and clinical implications. *Journal of Clinical Oncology* 2000; 18(5):1135-1149.
50. Gutheil JC, Campbell TN, Pierce PR, et al. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using vitaxin: A humanized monoclonal antibody to the integrin $\alpha_v\beta_3$. *Clinical Cancer Research* 2000; 6:3056–3061.
51. Volpert OV, Ward WF, Lingen MW, et al. Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats. *The Journal of Clinical Investigation* 1996; 98(3):671–679.
52. Takano S, Gately S, Neville ME, et al. Suramin, an anticancer and angiosuppressive agent, inhibits endothelial cell binding of basic fibroblast growth factor, migration, proliferation, and induction of urokinase-type plasminogen activator. *Cancer Research* 1994; 54:2654-2660.
53. Vukanovic J, Isaacs JT. Linomide inhibits angiogenesis, growth, metastasis, and macrophage infiltration with in rat prostatic cancers. *Cancer Research* 1995; 55:1499-1504.
54. Hori Y, Hu DE, Yasui K, et al. Differential effects of angiostatic steroids and dexamethasone on angiogenesis and cytokine levels in rat sponge implants. *British Journal of Pharmacology* 1996; 118:1584-1591.
55. Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G, et al. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 1998; 95:8795–8800.
56. Pienta KJ, Nguyen NM, Lehr JE. Treatment of prostate cancer in the rat with the synthetic retinoid fenretinide. *Cancer Research* 1993; 53:224-226.
57. Hu DE, Fan TPD. Suppression of VEGF-induced angiogenesis by the protein tyrosine kinase inhibitor, lavendustin A. *British Journal of Pharmacology* 1995; 114:262-268.
58. Eichhorn ME, Strieth S, Dellian M. Antivascular tumor therapy: Recent advances, pitfalls and clinical perspectives. *Drug Resistance Updates* 2004; 7:125–138.

59. Folkman J. Antiangiogenesis: New concept for therapy of solid tumors. *Annals of Surgery* 1972; 175(3):409-416.
60. Lucas R, Holmgren L, Garcia I, et al. Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells. *Blood* 1998; 92(12):4730-4741.
61. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: Past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 213:505-515.
62. Cao Y. Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer. *Haematologica* 1999; 84:643-650.
63. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology* 2002; 29:15-18.
64. Weinstat-Saslow D, Steeg PS. Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: Basic and applied advances. *The FASEB Journal* 1994; 8:401-407.
65. Weidner N. Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: The evidence continues to grow. *Journal of Pathology* 1998; 184(2):119-122.
66. Özuysal S. Tümöral Anjiogenezis. *Türk Patoloji Dergisi* 2001; 17(3-4):90-93.
67. Kılıç T, Yıldırım Ö, Pamir MN. Beyin tümörlerinde antianjiogenik yaklaşımlar. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 2005; 15(1):10-16.
68. Mancuso A, Sternberg CN. Colorectal cancer and antiangiogenic therapy: What can be expected in clinical practise. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2005; 55:67-81.
69. Folkman J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica* 2004; 112:496-507.
70. Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJF, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(17):11721-11726.
71. Beerepoot LV, Witteveen EO, Groenewegen G et al. Recombinant human angiostatin by twice-daily subcutaneous injection in advanced cancer: A pharmacokinetic and long-term safety study. *Clinical Cancer Research* 2003; 9(15):4025-4033.
72. Cao Y, Ji RW, Davidson D. et al. Kringle domains of human angiostatin: characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(46):29461-29467.
73. Sim BKL, O'Reilly MS, Liang H, et al. A recombinant human angiostatin inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Research* 1997; 57:1329-1334.

74. Yang DZ, He J, Zhang J, et al. Angiostatin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and growth in nude mice. *World Journal Gastroenterol* 2005; 11(32):4992-4996.
75. Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, et al. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Cell Biology* 1998; 95:5579-5583.
76. Kim JH, Kim JC, Shin SH, et al. The inhibitory effects of recombinant plasminogen kringle 1-3 on the neovascularization of rabbit cornea induced by angiogenin, bFGF, VEGF. *Experimental and Molecular Medicine* 1999; 31(4):203-209.
77. Dings RPM, Yokoyama Y, Ramakrishnan S, et al. The designed angiostatic peptide anginex synergistically improves chemotherapy and antiangiogenesis therapy with angiostatin. *Cancer Research* 2003; 63:382-385.
78. Joe Y, Hong Y, Chung D, et al. Inhibition of human malignant glioma growth in vivo by human recombinant plasminogen kringles 1-3. *International Journal of Cancer* 1999; 82:694-699.
79. Drixler TA, Rinkes IHMB, Ritchie ED, et al. Continuous administration of angiostatin inhibits accelerated growth of colorectal liver metastases after partial hepatectomy. *Cancer Research* 2000; 60:1761-1765.
80. Yokoyama Y, Dhanabal M, Griffioen AW, et al. Synergy between Angiostatin and Endostatin: Inhibition of Ovarian Cancer Growth. *Cancer Research* 2000; 60:2190-2196.
81. Nestler G, Schulz HU, Tautenhahn J, et al. Effects of the angiogenesis inhibitor angiostatin on the growth of CC531 colon carcinoma cells in vitro and in a laparoscopic animal model of peritoneal carcinomatosis. *International Journal of Colorectal Disease* 2005; 5:1-7.
82. Lannutti BJ, Gately ST, Quevedo ME, et al. Human angiostatin inhibits murine hemangioendothelioma tumor growth in vivo. *Cancer Research* 1997; 57:5277-5280.
83. Pathbase. http://eulep.pdn.cam.ac.uk/Necropsy_of_the_Mouse/index.php?file, (Erişim tarihi: 5.5.2008).
84. Tekelioğlu M. Özel histoloji ince yapı ve gelişme. 1. baskı, Antıp A.S., Ankara, 2002:49-93.
85. Hebel R, Stromberg MW. *Anatomy and embryology of the Laboratory rat*. First edition, Apel-Druck Donau-Verlag GmbH, Günzburg, 1986:231-251.

86. Sadler TW. Langman medikal embriyoloji. 9. baskı. Palme yayıncılık, Ankara, 2005;277-313.
87. Aytekin Y, Solakoğlu S. Temel histoloji. 1. baskı, Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul. 2006:291-325.
88. Demir R. Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş. 1. baskı, Palme yayıncılık, Ankara, 2006:421-444.
89. Gartner LP. Color Textbook of Histology. Second edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2001:379-411.
90. Wheather PR. Wheather's Functional Histology. Third edition, Churchill Livingstone, London, 1993:247-271.
91. Erbenđi T. Histoloji 2. 1. baskı, Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş., İstanbul, 1985:88-99.
92. Çevikbaş U. Robbins Temel Patoloji. 7. baskı, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul, 2003:579-585.
93. Canda MŞ. Temel Patoloji III Sindirim. 1. baskı, Kanseri Savaş Derneği Yayınları, Sivas, 1988:65-76.
94. Patıroğlu TE. Sindirim Kanalı Patolojisi. 1. baskı, Erciyes Üniversitesi Basım Evi, Kayseri, 1994:159-179.
95. Bumin O. Sindirim Sistemi Cerrahisi. 3. basım. İlk-San Matbaası LTD. ŞTİ., Ankara, 1986:210-229.
96. Çiftlikçi A. Kolorektal Kanselerde Tümör Belirleyicilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya 2002.
97. Bresalier RS, Kim YS. Malignant neoplasms of the large intestine, in Gastrointestinal and Liver disease, (eds. Sleisenger and Fordtran) ed 6, vol 2. WB Saunders Company, Philadelphia, 1998:1906-1942
98. Ergenoğlu OM. 1,2 Dimetilhidrazin ile Kolorektal Kanseri Oluşturulan Sıçanlarda Selenyum, Vitamin E ve Levamizolün Etkileri, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana 1999.
99. Sandler RS. Cholecystectomy and colorectal cancer. Gastroenterology 1993; 105:286-288
100. Reddy BS, Rao CV, Rivenson A, Kellof G. İnhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. Carcinogenesis 1993; 14:1493-1497.

101. Ming SC, Goldman H. Pathology of the gastrointestinal tract. Second edition, Williams and Wilkins, Baltimore, 1998:819-855.
102. Pozharisski KM, Kapustin YM, Likhachev AJ, et al. The mechanism of carcinogenic action of 1,2-Dimethylhydrazine (SDMH) in rats. *International Journal of Cancer* 1975; 15(4):673-83.
103. Newell LE, Heddle JA, The potent colon carcinogen, 1,2-Dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mutation Research* 2004; 564:1-7.
104. Kuraguchi M, Cook H, Williams ED, et al. Differences in susceptibility to colonic stem cell somatic mutation in three strains of mice. *Journal of Pathology* 2001; 193:517-521.
105. Richards TC. Early changes in the dynamics of crypt cell populations in mouse colon following administration of 1,2-Dimethylhydrazine. *Cancer Research* 1977; 37:1680-1685.
106. Wang JG, Wang DF, Lv BJ, et al. A novel mouse for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1,2-Dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium. *World Journal Gastroenterol* 2004; 10(20):2958-2962.
107. Thulesen J, Hartmann B, Hare KJ, et al. Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) accelerates the growth of colonic neoplasms in mice. *Gut* 2005; 53:1145-1150.
108. Heijstek MW, Kranenburg O, Rinkes IHMM. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Digestive Surgery* 2005; 22:16-25
109. Thurnher N, Deschner EE, Stonehill EH, et al. Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1,2-Dimethylhydrazine. *Cancer Research* 1973; 33:940-945.
110. Jackson PE, Cooper DP, O'Connor PJ, et al. The relationship between 1,2-Dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumors: Tumour development in female SWR mice does not require a K-Ras mutational event. *Carcinogenesis* 1999; 20(3):509-513.
111. Kingsnorth AN, Abu-Khalaf M, Ross JS, et al. Potentiation of 1,2-Dimethylhydrazine-induced anal carcinoma by epidermal growth factor in mice. *Surgery* 1985; 97(6):696-700.
112. Moorghen M, Orde M, Finney AJ, et al. Sulindac enhances cell proliferation in DMH-treated mouse colonic mucosa. *Cell proliferation* 1998; 31:59-70.

113. Leblanc AM, Perdigon G. Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. *Medical Science Monitor* 2004; 10(4):96-104.
114. Kozoni V, Tsioulis G, Shiff S, et al. 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.
115. Wu RY, Chiang H, Shao BJ, et al. Effects of 2.45-GHz microwave radiation and phorbol ester 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate on dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice. *Bioelectromagnetics* 1994; 15:531-538.
116. Cooper HK, Buecheler J, Kleihues P. DNA alkylation in mice with genetically different susceptibility to 1,2-Dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Cancer Research* 1978; 18:3063-3065.
117. Karaca Ö, Ertekin T, Canöz Ö, ve ark. Experimental colon tumorigenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in Balb/C mice. 11. National Congress of Anatomy, 26th – 29th October, Pamukkale, Denizli Turkey.
118. Moolenbeek C, Ruitenberg EL. The ‘Swiss roll’: a simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Laboratory Animals* 1981; 15:57-59.
119. Jackson PE, O’Connor PJ, Cooper DP, et al. Associations between tissue-specific DNA alkylation, DNA repair and cell proliferation in the colon and colon tumour yield in mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* 2003; 24(3):527-533.
120. Colussi C, Fiumicino S, Giuliani A, et al. 1,2-Dimethylhydrazine-induced colon carcinoma and lymphoma in *msh2^{-/-}* mice. *Journal of the National Cancer Institute* 2001; 93(21):1534-1540.
121. Povey AC, Badawi AF, Cooper DP, et al. DNA alkylation and repair in the large bowel: Animal and human studies. *The Journal of Nutrition* 2002; 132:3518-3521.
122. Boffa LC, Diwan BA, Gruss R, et al. Differences in colonic nuclear proteins of two mouse strains with different susceptibilities to 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis. *Cancer Research* 1980; 40:1774-1780.
123. Wedemeyer J, Gali SJ. Decreased susceptibility of mast cell-deficient *kit^w/kit^{w-v}* mice to the development of 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal tumors. *Laboratory Investigation* 2005; 85:388-396.

124. Toth B, Malick L, Shimizu H. Production of intestinal and other tumors by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in mice. *American Journal of Pathology* 1976; 84(1):69-80.
125. Sun BC, Zhao XL, Zhang SW, et al. Sulindac induces apoptosis and protects against colon carcinoma in mice. *World Journal Gastroenterol* 2005; 11(18):2822-2826.
126. Chang WWL. The mode of growth and compartmentalization of neoplastic glands during experimental colon carcinogenesis. *The American Journal of Pathology* 1986; 124(3):420-426.
127. Wahl ML, Moser TL, Pizzo SV. Angiostatin and antiangiogenic therapy in human disease. *Endocrine Journals* 2004; 28:73-104.
128. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Medicine* 1996; 2:689-692.

ÖZGEÇMİŞ

23.01.1978 yılında Afyon'da doğdu. İlköğretimini Kadınana İlköğretim okulunda, orta öğretimini Merkez ortaokulunda ve lise eğitimini Afyon Anadolu Öğretmen Lisesinde tamamladı. Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nden 1999 eğitim öğretim yılında mezun oldu. Aynı yıl Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans programına başladı. Yüksek Lisan eğitimini Ocak 2002 döneminde tamamladı ve aynı yıl içerisinde Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 1.5 yıllık görev süresinden sonra Yüksek Öğretim Kurumunun akademik personel yetiştirme programı aracılığı ile Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak görevlendirildi. Halen bu anabilim dalında görevini devam ettirmektedir. İngilizce ve bilgisayar kullanmayı bilmektedir.