



T.C  
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**LEİOMYOM VE LEİOMYOSARKOMDA VASKÜLER  
ENDOTELİYAL GROWTH FAKTÖR(VEGF) VE  
RESEPTÖRÜNÜN(VEGF-R) ROLÜ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Nihal TOPRAK DANAÖĞLU

Danışman

Prof.Dr.Semra ORUÇ KOLTAN

MANİSA - 2008



T.C  
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**LEİOMYOM VE LEİOMYOSARKOMDA VASKÜLER  
ENDOTELİYAL GROWTH FAKTÖR(VEGF) VE  
RESEPTÖRÜNÜN(VEGF-R) ROLÜ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Nihal TOPRAK DANAÖĞLU

Danışman

Prof.Dr.Semra ORUÇ KOLTAN

MANİSA - 2008

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇ KAPAK.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
KISALTMALAR.....	III
RESİM VE TABLO LİSTESİ.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.LEİOMYOM.....	4
2.2.LEİOMYOSARKOM.....	10
2.3. ANJİOGENEZ VE VEGF.....	14
2.3.1. Anjiogenez.....	18
2.3.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü.....	23
2.3.3 Anti VEGF Stratejileri.....	23
2.3.4 VEGF' ye yönelik monoklonal antikorlar.....	23
2.3.5 VEGF reseptörlerine yönelik tedaviler.....	23
2.3.6 VEGF reseptör tirozin kinaz inhibitörleri.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
4. BULGULAR.....	27
5 TARTIŞMA.....	33
6. SONUÇLAR.....	40
7. RESİMLER.....	42
8. KAYNAKLAR.....	44

## KISALTMALAR

BBA	Büyük büyütme alanı
EGF	Epidermal büyüme faktör
ECM	Ekstraselüler matrix
FGF	Asidik ve bazik fibroblast büyüme faktör
GCSF	Granülosit koloni stimüle edici faktör
HBEGF	Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü
HGF	Hepatosit büyüme faktör
HIF-1	Hypoxia-inducible transcription factor
IFN	İnterferon
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL	İnterlökin
LMS	Leiomyosarkom
MI	Myozitin inozitol
MMP	Matrix metalloproteinaz
NO	Nitrik oksit
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktör
PGF	Plasental büyüme faktör
TAF	Tümör anjiogenezis faktör
TGF	Transforme edici büyüme faktör
TNF	Tümör nekroz faktör
tPA	Doku-tip plazminojen aktivatörü
uPA	Ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktör
VEGF-R	Vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü
VPF	Vasküler permeability faktör

## RESİM VE TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1</b>	Uterin düz kas tümölerinin makroskopik özelliklerinin sınıflandırılması	<b>11.sf</b>
<b>Tablo 2</b>	FİGO, Endometrium Kanseri Cerrahi Evreleme.	<b>14.sf</b>
<b>Tablo 3</b>	Anjiyogenik faktörler ve anjiyogenezi önleyen faktörler	<b>16.sf</b>
<b>Tablo 4</b>	Hastaların Yaşa Göre Dağılımları	<b>27.sf</b>
<b>Tablo 5</b>	Myom çapı ile VEGF İmmunohistokimyasal Boyanma Düzeylerinin Karşılaştırılması	<b>28.sf</b>
<b>Tablo 6</b>	Myom çapı ile VEGF-R İmmunohistokimyasal Boyanma Düzeylerinin Karşılaştırılması	<b>28.sf</b>
<b>Tablo 7</b>	Leiomyoma komşu myometriyum ile olağan myometriyumun VEGF ekspresyonu karşılaştırması	<b>29.sf</b>
<b>Tablo 8</b>	Leiomyoma komşu myometriyum ile olağan myometriyumun VEGF-R ekspresyonu karşılaştırması	<b>29.sf</b>
<b>Tablo 9</b>	Leiomyom ile normal myometriyumun VEGF ekspresyonu karşılaştırılması	<b>30.sf</b>
<b>Tablo 10</b>	Leiomyom ile normal myometriyumun VEGF-R ekspresyonu karşılaştırılması	<b>30.sf</b>
<b>Tablo 11</b>	Leiomyom ile Leiomyom Nodülüne Komşu Myometriyumda VEGF İmmunohistokimyasal Boyanma Düzeylerinin Karşılaştırılması	<b>31.sf</b>
<b>Tablo 12</b>	Leiomyom ile Leiomyom Nodülüne Komşu Myometriyumda VEGF-R İmmunohistokimyasal Boyanma Düzeylerinin Karşılaştırılması	<b>31.sf</b>
<b>Tablo 13</b>	Leiomyosarkom Olgularının Boyanma Düzeyleri	<b>32.sf</b>
<b>Resim1-a/b</b>	Normal myometriyum VEGF immunohistokimyasal boyanması,x200 /Normal myometriyum VEGF-R immunohistokimyasal boyanması,x200	<b>42.sf</b>
<b>Resim2-a/b</b>	Leiomyomda VEGF immunohistokimyasal boyanması,x200/ Leiomyomda VEGF-R immunohistokimyasal boyanması,x200	<b>42.sf</b>
<b>Resim3-a/b</b>	Leiomyosarkomda VEGF immunohistokimyasal boyanması, x200/ Leiomyosarkomda VEGF-R immunohistokimyasal boyanması, x200	<b>43.sf</b>

## TEŞEKKÜR

Çalışmamı yönlendiren ve destekleyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Semra Oruç Koltan'a, çalışmanın labaratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr.Peyker TEMİZ 'e ve eğitimimde emeği geçen başta Kadın Hastalıkları ve Doğum AD Başkanımız Prof.Dr.Faik Mümtaz Koyuncu olmak üzere tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma, bu süreçte hiçbir fedakarlıktan kaçınmaksızın yanımda olan eşime ve aileme içtenlikle teşekkür ederim.

# LEİOMYOM VE LEİOMYOSARKOMDA VASKÜLER ENDOTELİYAL GROWTH FAKTÖR(VEGF) VE RESEPTÖRÜNÜN(VEGF-R) ROLÜ

## ÖZET

**Amaç:** Büyük myom, küçük myom ve leiomyosarkom'lu olgularda immunohistokimyasal olarak VEGF ve VEGF-R'ünün ekspresyonu karşılaştırılarak VEGF ve VEGF-R'ünün myom gelişimi, büyümesi ve leiomyosarkom oluşumundaki önemi araştırılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Celal Bayar Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde yer alan 2007-2008'de tanı almış çapı 10 cm.'den küçük 40 adet ve çapı 10.cm'den büyük 11 adet leiomyom ile 2005 yılında tanı almış 2 adet leiomyosarkom ele alındı. Ayrıca 19 adet leiomyom nodülüne komşu normal myometrium dokusu ve 6 adet olağan myometrium dokusu çalışmada yer aldı. Seçilen tüm bloklara VEGF ve VEGF-R immunohistokimyasal boyaları uygulandı. Boyanmanın yoğunluğu ve dağılımı göz önüne alınarak derecelendirme yapıldı. Endometrial bezlerin luminal yüzlerindeki boyanma; boyanmamış olanlar 0 (negatif), hafif olanlar 1 (hafif), orta derece olanlar 2(orta), daha güçlü olanlar 3 (güçlü) olarak adlandırıldı.

**Bulgular:** Myom boyutu ile VEGF ve VEGF-R immunohistokimyasal boyaması ve leiomyom, ona komşu normal myometrium ve olağan myometrium VEGF ve VEGF-R immunohistokimyasal boyaması açısından istatistiksel anlamda bir fark tespit edilmedi ( $P>0.05$ ). Leiomyosarkom olguları sayıca yetersiz olduğundan istatistiksel değerlendirme yapılamadı ancak hücre stoplazmasında VEGF ve VEGF-R' ü varlığı gösterildi.

**Sonuç:** Myom oluşumu ve büyümesinde tek bir faktörün etkili olmadığını, myometriumun leiomyoma dönüşümünün normal myometriumun somatik mutasyonları ve lokal büyüme faktörleri ile seks steroidlerinin karmaşık ilişkileri sonucunda geliştiğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** VEGF, VEGF-R, Leiomyom

# **THE ROLE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR(VEGF) AND RECEPTOR IN LEIOMYOMA AND LEIOMYOSARCOMA**

## **ABSTRACT**

**Objective :** To determine the role of VEGF and VEGF-R expression in formation, growth of small, large myomas and leiomyosarcomas using immunohistochemical method.

**Materials and Methods:** 40 small leiomyomas( small than 10 cm diameter), 10 large leiomyomas (large than 10 cm) and 2 leiomyosarcomas were chosen from the archive of Celal Bayar University Pathology department for comparison 19 samples of myometrium adjacent to leiomyoma nodules and 6 normal samples were also examined. VEGF and VEGF-R expression was assessed using immunohistochemistry method. The interpretation of immunohistochemical staining was expressed as follows: 0 ( no staining), 1 (mild positive),2 (moderate positive), 3 (strong positive).

**Results :** There were no statistically significant relationship between myoma size, leiomyoma and normal myometrium( $p>0.05$ ). Due to small number of leiomyosarcomas, 2 samples weren't taken in to account. But significant VEGF and VEGF-R expression detected in cytoplasmas.

**Conclusion :** Our study showed that, there are more than one factor, take role in forming growing leiomyomas. Recent studies showed that transformation of myometrium to leiomyoma may be related to complex relationship between somatic mutations of myometrium, local growth factors and sex steroids.

**Keywords:** VEGF, VEGF-R, Leiomyoma



## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kadın genital organlarının en yaygın patolojilerinden biri olan myoma uteri, uterusun en sık görülen tümörüdür. Düz kas liflerinden oluşmasından dolayı myoma ya da leiomyoma olarak adlandırılmakta ise de düz kas lifleri arasında fibröz bağ dokusu da bulunduğu için, fibromyoma, myofibroma, leiomyofibroma, fibroleiomyoma, fibroma ve fibroid olarak da adlandırılmaktadır. Ancak en sık myom ya da leiomyom terimleri kullanılmaktadır.(1,2)

Kadınlarda en sık görülen tümör olmasına rağmen myomların etyolojisi bilinmemektedir. Normal myometrial dokunun myoma dönüşüm mekanizması ve myom hücrelerinin anormal gelişimini yöneten faktörler iyice anlaşılamamıştır(3,4).Ancak günümüzde myometriumun leiomyoma dönüşümünün normal myometriumun somatik mutasyonları ve lokal büyüme faktörleri ile seks steroidlerinin karmaşık ilişkileri sonucunda geliştiği düşünülmektedir(5). Leiomyomlarda en yaygın eksprese olan anjiogenik faktörler VEGF ve adrenomedullin'dir. Bunlar normal myometriuma göre leiomyomlarda upregüle olmuşlardır. Adrenomedullin ekspresyonu hem leiomyom hem de myometriumdaki vasküler dansite ve endotelial hücre proliferasyonu ile ilişkili gibi görünmektedir. Bu yüzden adrenomedullin anti anjiogenik tedavinin hedefi olarak gösterilmiştir.

Leiomyosarkomlar ise uterin malignitelerinin %1-3' ünü ve uterin sarkomaların 1/3'ünü temsil etmektedir. Uterusun yaklaşık her 800 düz kas tümöründen birisi leiomyosarkomdur(6). Leiomyosarkom olarak tümörü tanımlamaya yardım eden mikroskopik özellikler myometrial infiltrasyon ve vasküler invazyondur. Prognostik faktörler incelendiğinde hastanın premenapoz olması, tümörün myom içerisinde lokalize kalması, düşük mitoz sayısı, nekroz yokluğu ve komşu dokuda hyalinizasyon iyi prognostik faktörler olarak tanımlanmaktadır(7). Leiomyosarkomun 5 farklı klinikopatolojik varyantı daha bulunmaktadır. Bunlar intravenöz leiomyomatozis, metastaz gösteren leiomyom,

leiomyoblastom, leiomyomatozis peritonealis disseminata ve mikst leiomyosarkomdur.

Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi demek olan anjiyogenez, vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojik de olabilmektedir. Fizyolojik anjiyogenez; embriyogenez sırasında, yara iyileşmesinde ve kadın üreme sisteminde gözlenmektedir(VEGF1). Proanjiogenik ve anti anjiogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiogenez kontrol edilememekte ve çeşitli kanserlerde (meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, uterus, serviks, glioblastom) anjiyogenez patolojik olarak ortaya çıkmaktadır.

Anjiyogenezin düzenlenme evreleri pek çok büyüme faktörünün ve düzenleyici proteinin kontrolü altındadır. Anjiyogenik uyarıcılar ve anjiyogenez inhibitörleri arasındaki denge, normalde damarsal bileşenlerin sessiz halde kalmalarını sağlamaktadır. Anjiyogenik uyarıların artışı ve anjiyogenez inhibitörlerinin azalışı anjiyogenezi başlatmaktadır. Vascular endothelial growth factor(VEGF); anjiyogenezde rol oynayan faktörlerden birisidir. VEGF'nin post-natal damarlanma, yara iyileşmesi, kanser, romatoid artrit, retinada yeni damarlanma ve kalp-damar hastalıkları dahil olmak üzere çok sayıdaki patofizyolojik durumda önem taşımaktadır. Endotel hücrelerinin çok sayıdaki biyolojik fonksiyonu, sitokin sentezi ve salınımı, trombolitik ve pıhtılaşma yollarında yer alan moleküllerin ekspresyonu ve düz kas hücre hiperplazisini düzenlemesi VEGF ile yapılmaktadır(8-12). VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak üç reseptörü ile gerçekleştirmektedir. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4)'dür. Bunlardan VEGF-R1 ve R2 endotel hücreleri üzerinde iken VEGF-R3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır (13,14,15). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve ras GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, ve diferansiyasyonunu sağlamaktadır(16).

Anjiogenez inhibitörleri, matriks yıkımının engellenmesi, endotel hücrelerinin direkt inhibisyonu, anjiogenez aktivatörlerinin engellenmesi, integrin inhibisyonu ve nonspesifik mekanizmalarla etkilerini göstermektedir. Tümör tedavisinde ümit veren bu maddelerle ilgili çalışmalara insanlarda 1988'de başlanmıştır ve yıllarca sürmesi muhtemel gözükmektedir(17).

Biz de bu çalışmamızda leiomyom ve leiomyosarkom nedeniyle Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde histerektomi ve myomektomi yapılmış hastaların myometriunda ve normal myometrium dokusunda VEGF ve VEGF-R' ünün rolünü ve myom boyutu ile bu faktörler arasında bağlantı olup olmadığını araştırdık. Normal myometriuma oranla myom ve sarkom saptanan myometriumlarda VEGF ve VEGF-R' ü varlığı ve/ veya anlamlı artmış ekspresyonun tespit edilmesi, VEGF'in myom büyümesi ve sarkom oluşumu için risk faktörü olarak değerlendirilmesini sağlayacaktır. Tümör gelişiminde başlıca rol oynamasından dolayı VEGF ve reseptörü leiomyomun medikal tedavisi ve kanser tedavisinde iyi bir ajan olarak düşünülebilir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.LEİOMYOM

Çok eskiden beri bilinen myoma uteri konusu ile ilk olarak GALENOS meşgul olmuş ve 'Scleroma' adını vermiştir.Daha sonraki yıllarda, 'uterus molü', 'fibrom', 'fibroid' gibi isimler kullanılmıştır.(1,2) Nihayet WİRCHOW tarafından 'myom' tabiri ortaya atılmıştır. Kadın genital organlarının en yaygın patolojilerinden biri olan myoma uteri, uterusun en sık görülen tümörüdür. Düz kas liflerinden oluşmasından dolayı myoma ya da leiomyoma olarak adlandırılmakta ise de düz kas lifleri arasında fibröz bağ dokusu da bulunduğu için, fibromyoma, myofibroma, leiomyofibroma, fibroleiomyoma, fibroma ve fibroid olarak da adlandırılmaktadır. Ancak en sık myom ya da leiomyom terimleri kullanılmaktadır. Uterus duvarında herhangi bir yerde tek olarak bulunabildiği gibi birden fazla sayıda da bulunabilmektedir. Mikroskopik büyüklükten kilolarca büyüklüğe kadar ulaşabilmektedir. Küçük myomların kapsülü olmamasına rağmen tümör büyüdükçe çevresindeki myometrium liflerini tazyikle yassılaştırarak bir'pseudocapsule' geliştirmektedir. Kapsüldeki damarlarla beslendiği için de tümörün orta kısımlarında beslenme bozukluğuna bağlı değişmeler sık gözlenmektedir.(90,91)

Leiomyom klinik olarak 30 yaşın üzerinde ki kadınların %20-30'unda görülmektedir. Bütün premenapozal kadınların %20-77'sinde oluşmaktadır.Amerika Birleşik Devletlerinde tüm histerektomilerin %30'unun nedeni myoma uteri olarak bildirilmektedir.(39) Kadınlar da 30 yaştan önce nadir olarak görülmektedir. En genç kayıt edilen hasta 13 yaşındadır. Bazı leiomyomlar menapozdan sonra küçülmekle birlikte sıklıkları azalmaz.

Myoma uterinin kesin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte etyolojide bazı faktörler sorumlu tutulmaktadır;

**İrk:** Zenci kadınlarda beyazlara oranla hayli fazla miktarda myom saptanmaktadır. Bu oranı Miller 9 kat, Alsobrook 5 kat,Cohen 8 kat, Levy ise 7 kat fazla bildirmektedir.(3,4)

**Genetik:** Son zamanlarda yapılan sitogenetik, moleküler ve epidemiyolojik çalışmalar leiomyomların patogenez ve patofizyolojisinde genetik komponentin olduğunu kuvvetle ima etmektedir. Rezeke edilen leiomyomlardan yapılan sitogenetik çalışmalar da leiomyomların yaklaşık %40' ında nonrandom kromozomal anomaliler olduğu bildirilmektedir. Bu anomaliler başlıca altı sitogenetik alt gruptan oluşmaktadır. Leiomyomlardaki en sık kromozomal translokasyon t(12;14) (g14-g15;g23-g24) olup karyotip çalışması yapılan leiomyomların yaklaşık %20' sinde saptanmaktadır.(57)

**Endokrin Teorisi:** Myom etyolojisinde üzerinde en çok durulan konulardan birisidir. Bazı myomlar östrojen kullanımı ile büyümekle birlikte deneysel olarak uterus myomlarının östrojen stümlasyonu ile gelişmeye başladığı kanıtlanamamaktadır. Yapılan çalışmalarda, myomlardaki östrojen reseptörlerinin konsantrasyonu, bitişindeki normal myometrium kadar ya da ondan hafifçe yüksek olarak saptanmaktadır. Progesteron reseptörlerinin konsantrasyonu ise normal myometriuma göre daha düşük gözlenmektedir. Östrojen ve progesteron reseptörlerinin relatif konsantrasyonu belirgin olarak myomların büyümesini etkilemektedir(5) Östrojenlerin leiomyomlar üzerindeki etkilerini epidermal growth faktör(EGF) aracılığıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Hücre kültürlerinde progesteron, hücre içindeki immünoaktif EGF miktarını artırmakta, ayrıca östradiol ise hücrelerdeki EGF-reseptörü miktarını da artırmaktadır(progesteron bu etkiyi göstermez).EGF leiomyom büyümesini kontrol eden önemli bir lokal faktör olarak bildirilmektedir(92). Östrojen ve progestinlerin etkileri leiomyom gelişiminde birbirini tamamlayıcı gibi görünmektedir(93). Normal myometriumda östrojen reseptör düzeyleri fluktuasyon gösterse de leiomyomlarda tüm menstrüel siklus boyunca aynı ve yüksek düzeylerde kalmaktadır. Bu durum tümör dokusunun östrojene yanıtı sınırlama kabiliyetini kaybettiğini düşündürmektedir.(94) Yine leiomyom biyopsilerinde 5-alpha androjen konsantrasyonlarında artış olduğunun gösterilmesi, leiomyomların androjene duyarlı tümörler olduğuna işaret etmektedir. Ancak bu hormonlar ile leiomyom arasındaki ilişki östrojenlere göre daha az belirgindir.(96)

#### **Etkili Diğer Faktörler:**

İnsülin-like growth faktör(IGF) hücre çoğalmasını ve büyümesini uyaran küçük peptiddir. Hem insan hem de fare uterusundan izole edilmişlerdir. IGF-1 ve IGF-1 reseptörlerinin uterusun içinde en yoğun olduğu yer myometriumdur. Myometrial ve leiomyom hücre kültürlerinde IGF-1'in hücreler için mitojenik olduğu gösterilmiştir.

İnsan myometrium ve leiomyomlarında hem IGF-1 hem de IGF-2 mRNA'sı eksprese edilmektedir. Her iki doku arasında IGF-1 açısından fark yok iken, IGF-2 leiomyomlarda daha yüksek bulunmaktadır. Bu ve reseptörlerde olabilecek farktan dolayı myom proliferasyonunun uyarılmış olabileceği öne sürülmektedir.(97) IGF-1 leiomyom hücre kültürlerinde proliferating cell nuclear antigen(PCNA) indeksinde ve bcl-2 protein ekspresyonunda değişikliğe yol açmakta, hücre sağ kalımı ve proliferasyonunu artırmaktadır. IGF-1 bcl-2 aracılığıyla apoptozu inhibe ederken, PCNA indeksini artırarak proliferasyon potansiyelini artırmaktadır.(98)

Heparin bağlayıcı büyüme faktörleri arasında trombosit kaynaklı growth faktör (PDGF), bazik ve asidik fibroblast growth faktör(FGF) , vasküler endotelial growth faktör(VEGF) ve heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü(HBEGF) yer almaktadır. Bu faktörler heparine bağlandığı için ekstrasellüler matrikste kalmakta ve burada bir büyüme faktör rezervi oluşturmaktadırlar. Bunlar leiomyomlar için hem mitojen uyarıyı hem de anjiogenezi sağlarlar.(97) Leiomyomlarda en yaygın eksprese olan angiogenik faktörler VEGF ve adrenomedullin'dir. Bunlar normal myometriuma göre leiomyomlarda upregüle olmuşlardır. Adrenomedullin ekspresyonu hem leiomyom hem de myometriumdaki vasküler dansite ve endotelial hücre proliferasyonu ile ilişkili gibi görünmektedir. Bu yüzden adrenomedullin anti anjiogenik tedavinin hedefi olarak gösterilmektedir.

TGF-beta ailesi 5 adet dimerik proteinden meydana gelmektedir. Çok fonksiyonlu büyüme faktörleri olan TGF'ler proliferasyon, ekstrasellüler matriks üretimi, diferansiasyon, migrasyon ve adezyonu düzenlemektedir. TGF-beta üç ayrı reseptörü myometrium ve leiomyomlarda eksprese olmaktadır. TGF-beta3 reseptörü leiomyomlarda 5-8 kat daha fazla eksprese olmaktadır.

Uterus myomlarının kassal histogeneze sahip olduğu kabul edilmekte ise de, etyolojileri konusunda kesin bir şey bilinmemektedir. Çoğu araştırmacı, kaynağın olgun kas ögelerinden değil, olgunlaşmamış kas hücrelerinden geldiği şeklindeki Meyer'in görüşünü onaylamaktadır(99). Bu görüşe göre, olgunlaşmamış kas ögeleri myom oluşumuna neden olmaktadır. Kan damarlarını çevreleyen kas dokusunda neoplastik nekroz oluşmakta ve bu nekrozdaki tümör gelişmektedir. Günümüzde ise myometriumun leiomyoma dönüşümünün normal myometriumun somatik mutasyonları ve lokal büyüme faktörleri ile seks steroidlerinin karmaşık ilişkileri sonucunda geliştiği düşünülmektedir(125)

Leiomyomların histolojik subtiplerinin çeşitliliğine rağmen hepsi makroskopik olarak benzemektedir. Multiple leiomyomlar, bayanların 2/3'ünde mevcuttur. Sferik ve sert olan leiomyomlar etraflarını çevreleyen myometriümdan çıkıntı yaparak düzensiz yüzeyli görünümüne neden olabilmektedir. Kesit yüzleri kıvrımlı, trabeküler patern içermekte ve rengi beyazdan esmere değişmektedir(18,19) .

Buldukları yerlere göre; korpusta ya da servikste olabilen leiomyomların %90'ından fazlası korpus uteride bulunmaktadır. Daha çok uterusun üst ve arka kısmında yer almaktadır. Serviks myomları ise serviksin herhangi bir yerinde olabilmekte ve gelişerek serviks duvarını ileri derecede bombeli duruma getirebilmektedir. Ayrıca myomlar %1 oranında istmus ve portio da bulunabilmektedir.

Myomlar uterus duvarının çeşitli tabakalarında yerleşim yerlerine göre çeşitli gruplara ayrılabilir. Bütün tümörler aslında kas duvarından başladığından orjinleri intramural'dır. Büyüdükleri zaman dışarı gelişmeleri halinde subseröz, içerde kalırsa intramural, endometrial kaviteye doğru gelişirse submüköz olmaktadır.

Submukozal leiomyomlar tüm myomların %5-10 kadarını oluşturmaktadır. Küçük saplı biçimleri olduğu gibi, uterusun şeklini bozan ve kaviteyi tümüyle dolduran büyük şekilleri de bulunmaktadır. Bu myomlar üzerini örten endometriüme sıkıştırmakta, genişledikçe endometrial kaviteye çıkıntı yapmaktadır. Nadir olarak pediküllü olup serviksten prolabe olmaktadır. Sarkomatöz değişiklikler submüköz leiomyomlarda daha fazla olmaktadır. Ayrıca diğer şekillere göre daha ağır kanamalara neden olabilmektedir. Bazı submüköz tümörler, uterus kasının sıkıştırıcı etkisi sonucunda saplı hale gelip serviksten hatta vajinadan dışarı çıkabilmekte ve bunlar 'myoma instatus nascendi' ya da ' myoma pendulum' olarak isimlendirilmektedir.

Yerleşim yerlerine göre en yaygın olan intramural leiomyomlardır. Myomların %50-60' ı bu grupta yer almaktadır. Küçük oldukları zaman uterus konturunda herhangi bir değişime neden olmazken büyük yada çok nüveli olduklarında uterusta belirgin büyüme ve kontürlerinde nodüler değişime neden olmaktadır. Bazen uterusun her yanı eşit şekilde büyüyerek(Kugel myomu) normal bir gebelik görünümüne neden olmaktadır.

Subserozal leiomyomlar ise tüm myomların %25-30 kadarını oluşturmaktadır. Bazıları uterus yüzeyine sıkı ve geniş bir tabanla oturur bazıları ise

pedinküllüdür. Pedinkülün torsiyonu ve nekrozu sonucunda leiomyom, uterus ile olan bağlantısını kaybedebilir ve yalnızca komşu organ bağlantıları ile yaşamlarını sürdürebilir bunlar 'Parazitik myomlar' olarak adlandırılmaktadır.(20,21) Parazitik myomlar yaygın olduğunda intraperitoneal leiomyomatozis( Leiomyomatozis Peritonealis Disseminata) olarak isimlendirilmektedir.(22) Uterus adelesinin dış tarafından gelişen myom, ligamentum latum yaprakları arasına doğru büyüyünce bunlara 'intraligamenter myomlar' denilir ki bunlar da uterus ile bağlantıları azsa ya da yoksa ligament damarları ile beslenmektedir.(23)

Leiomyomlar benign tümörler olmalarına rağmen değişik derecelerde neydana gelebilen iskemik nekrozlardan dolayı malign tümörlere benzer görünümmler oluşturabilmektedir. Malign benign ayrımında sıklıkla mitotik indeks, sitolojik atipi derecesi, tümör hücresi nekrozu(koagulasyon nekrozu) kullanılmaktadır. Mitotik indeksi 5-15 arasında olan tümörlerin bazıları agresif davranış gösterebilmektedir bu yüzden bunlar 'smooth muscle tumor of uncertain potential' olarak isimlendirilmektedir. Ayrıca bazı tümörlerde belirgin hücrel atipi görülsede malign davranış görülmez, bunlar ise 'symplastik leiomyom' olarak adlandırılmaktadır.(24)

Leipmyomlar mikroskopik olarak uniform görünümlü, fuziform düz kas hücrelerinin kıvrımlı anastomoz yapan fasiküllerinden oluşmaktadır. İğsi şekilli hücreler, belli belirsiz sınırlara ve abondan fibriler eozinofilik stoplazmaya sahiptir. Nükleusların uçları kör, sivrileşen, elonge, iyi şekilde ayrımlaşmış kromatinli ve küçük nükleollere sahiptirler.Çoğu leiomyomun etrafını çevreleyen myometriumdan sınırları ayırlanamamaktadır(25,26,27) Myomlarda dejeneratif değişiklikler leiomyomlarda yaygın olarak gözlenmektedir. Hyalin fibrozis özellikle postmenapozal kadınların %60'dan fazlasında bulunurken ödem leiomyomların yaklaşık %50'sinde bulunmaktadır. Leiomyomların yaklaşık %10'unda bölgesel, keskin sınırlı, belirgin hemoraji alanları gözlenmektedir(28). Kistik dejenerasyon ve mikrokalsifikasyon alanları yaklaşık %4 oranında vardır.Hemoraji, ödem, miksoid değişiklik, hiperselüler odaklar ve selüler hipertrofi hamile olan veya progesterin tedavisi alan kadınların leiomyomlarında oluşmaktadır. Çoğu leiomyomların kenarları mikroskopik olarak sınırlı iken bazı benign tümörler, yaygın olarak etrafını çevreleyen myometrium ile iç içe girmiş olabilmektedir. Submüköz leiomyomlar özellikle endometrial kaviteye protrüde olursa , akut inflamatuvar hücrelerle birlikte olan geniş nekroz alanları gösterebilmektedir.Nekroz alanları yanındaki tümör hücrelerinde, artmış mitotik aktivite bulunmaktadır.(29,30,31)



Uterin leiomyom oluşumunda nulliparite, anovulasyona bağlı karşılanamayan estradiol üretimi, obezite ,ırk gibi birçok risk faktörü tanımlanmış olup ideal vücut ağırlığının üstündeki, her 10 kilogram için risk %21 oranında artmaktadır(32)Ayrıca 1970'lerde oral kontraseptif kullanımının leiomyom gelişimine neden olduğu yolunda birçok yayın yapılmışsa da (33), geniş epidemiyolojik araştırmalar 10 yıl süreyle oral kontraseptif kullanımının uterin leiomyom gelişme riskini %30'dan fazla oranda azalttığını göstermektedir.

Büyükliklerine göre değerlendirildiğinde myomlar mikroskopik veya çok büyük boyutlarda olabilmektedir. Myomlar simetrik olarak uterusu büyütebilmekte veya uterin yapıyı belirgin olarak bozabilmektedir. Bir leiomyomun kıvamı sert (kalsifikasyon) olabileceği gibi yumuşak da (kistik dejenerasyon) olabilmektedir. Genellikle kıvamı,sert veya lastiksi olarak tanımlanmaktadır. Her ne kadar gerçek bir kapsülleri yoksa da; tümör kenarları künttür ve infiltre olmayan, itici tabiatta, genellikle myometriumdan cerrahi olarak enükleasyona izin veren ve bağ dokusundan meydana gelen pseudokapsülü bulunmaktadır. Her tümörün genellikle tek bir majör kan damarı bulunmakta, kesit yüzeyi karakteristik olarak halkalar halinde gözlenmektedir.

Leiomyomlar genellikle asemptomatiktirler.Büyük leiomyomlar bile hiç semptom vermeyebilirler. Bu nedenle pek çoğunun tanısı rutin muayene ve ultrasonografi ile konulmaktadır. Myomların semptomları lokalizasyonlarına, boyutlarına göre değişiklik gösterebilmektedir.Anormal vajinal kanamalar myomların en önemli klinik bulgusudur ve hastaların yaklaşık %30'unda bulunmaktadır. Leiomyomlarda karakteristik kanama paterni menoraji ve hipermenore şeklinde gözlenmektedir. Premenstrüel spottingede sık rastlanmaktadır. Menstrüasyon süreci dışındaki zamanlarda kanama leiomyom için karakteristik değildir(34)Anormal kanama görülme sıklığı submüköz leiomyomlarda daha fazla saptanmaktadır. Leiomyomlarda görülen anormal kanamanın nedeni uterusun büyümesiyle, kanayan endometrium alanının büyümesi, intramural leiomyomlarda uterusun kontraksiyon yeteneğinin azalması ve hemostaz yapmakta gecikmesi, submüköz leiomyomlarda çevredeki damarların, kısmen venlerin distorsiyon ve konjesyonuna veya üstteki endometriumun ülserasyonuna bağlı olmaktadır. Ağrı sık bir bulgu değildir ancak dolaşımın tıkanması veya enfeksiyon sonrası tümör içerisindeki dejenerasyon nedeni ile, pedinküllü tümörlerin torsiyonu veya submüköz leiomyomların uterin kaviteden atılması için oluşan myometrial kontraksiyonlar sonucu oluşabilmektedir(35).Tümörler kemik pelvise çakılı hale gelip sinirlere bası yaparak ağrının bele veya alt ekstremitelere

yayılmasına neden olabilmektedir. İntramural, subserozal veya intraligamenter leiomyomlar diğer organları obstrükte ederek şeklini bozabilmektedir. Parazitik leiomyomlar intestinal obstrüksiyona neden olabilirken büyük servikal myomlar gerçek pelvisi doldurarak üreterlere, mesaneye veya rektuma bası yapabilmekte veya yerini değiştirebilmektedirler. Bazen leiomyomlarda ilk şikayet gebe kalamama olabilmektedir. Ancak tek başına hastaların %2-10'unda infertilite nedeni olabilmektedir(36). Myom sonucu infertilite; anormal uterin kan akımı, sperm transportunda bozukluk, anormal uterin veya tubal motilite, aralıklı anovulasyon gibi birçok nedene bağlı olabilmektedir. Beş santimetreden büyük, serviks ve ostiumlara yakın yerleşimli leiomyomlar daha sıklıkla infertiliteye neden olmaktadır(37)

Leiomyoma sekonder spontan abortus insidansı bilinmemekle birlikte leiomyomu olan gebelerde normal olguların yaklaşık olarak 2-3 katı olmaktadır. Myomektomiden önce spontan abortus insidansı ortalama %40 iken myomektomiden sonra %20 olarak bildirilmektedir(38).

## **2.2.LEİOMYOSARKOM**

Leiomyosarkomlar uterin malignansilerin %1-3' ünü ve uterin sarkomaların 1/3'ünü temsil etmektedir. Uterusun yaklaşık her 800 düz kas tümörlerinden birisi leiomyosarkomdur(6) Leiomyosarkomların çoğu intramural olup %50-70'i soliter kitlelerdir( 40). Leiomyosarkomların ortalama çapı 6-9 cm, sınırları belirli, dolgun veya yumuşaktır(41). Kesit yüzeyi nekroz ve hemoraji alanları içeren gri-sarı veya pembe. Leiomyosarkom, leiomyomdan daha yumuşak ve büyük olmaya meyillidir, ayrıca daha irregüler kenarlı, hemorajik ve nekrotik olmaktadır.

Mikroskopik olarak sıradan leiomyosarkom, abondan eozinofilik stoplazmalı iğsi hücrelerin fasiküler tarzda yerleşiminden oluşmaktadır. En iyi trikrom boyasında değerlendirilen longitudinal stoplazmik fibriller sıklıkla gözlenmektedir. Çekirdek yapısı fuziform, genellikle yuvarlak uçlara sahiptir, belirgin nükleollü, kaba kromatinli ve hiperkromatiktir. Selülarite ve pleomorfizm az diferensiyel neoplazmlarda dikkat çekicidir. Multinükleer tümör hücreleri leiomyosarkomların %50'sinde bulunmaktadır. Genellikle osteoklastlara benzeyen dev hücreler saptanmaktadır(42,43). Nadiren ksantoma hücreleri belirgin olabilmektedir. Çoğu leiomyosarkom etrafını çevreleyen myometriuma invazyon yapmasına karşın, düzgün sınırlı bir leiomyosarkom, her an bir metastazla karşımıza çıkabilmektedir. Vasküler invazyon leiomyosarkomların %10-22'sinde tanımlanmaktadır. Tümör hücresi nekrozu tipik olarak belirgin olup

mevcut olması gerekmemektedir. Son zamanlarda yayınlanan serilerde, vakaların %80'inde mitotik index büyük büyütme altında 15 'in üstünde olduğu ifade edilmektedir(44). Uterus leiomyosarkomlarını teşhis etmek için kullanılan esas kriterler nükleer atipinin varlığı, yüksek bir mitotik index ve koagülatif tümör hücre nekrozudur. Mixoid leiomyosarkom, makroskopik incelemede genelde sınırlı görünen büyük jelatinöz neoplazmlardır(45,46,47). Mikroskopik olarak, düz kas hücreleri mixoid materyal vasıtasıyla genişçe yayılmaktadır. Karakteristik düşük selülarite çoğu mixoid leiomyosarkomda düşük mitotik indexi kısmen açıklamaktadır. Bazen mitotik index, yüksektir ve yüksek dereceli atipi mevcuttur. Mixoid görünüme ilaveten, leiomyosarkom olarak tümörü tanımlamaya yardım eden diğer mikroskopik özellikler myometrial infiltrasyon ve vasküler invazyondur. Düşük mitotik sayıya rağmen, mixoid leiomyosarkom tipik leiomyosarkom gibi kötü prognaza sahiptir. Leiomyosarkomlarda bulunan mixoid diferansiyasyonu dejenere olan leiomyomlarda görülen hidropik değişikliklerden ayırmak önem arz etmektedir. Epiteloid leiomyosarkomlarda sitolojik atipi, tümör hücresi nekrozu ve yüksek mitotik indeks olabileceği gibi, konvansiyonel leiomyosarkomlarda görülen malignensinin alışılan özelliklerine ek olarak, epiteloid diferansiyasyon gösteren alanlarıda içerebilmektedir (48,49,50,51,52). Leiomyomlar ve leiomyosarkomlar arasındaki farklar tablo1' de gösterilmiştir.

**Tablo:1 Uterin düz kas tümönerinin makroskopik özelliklerinin sınıflandırılması**

<b>LEİOMYOM</b>	<b>LEİOMYOSARKOM</b>
Genellikle multiple	Genellikle soliter(%50-75)
Farklı çaplarda, genellikle 3-5 cm	Geniş çaplı olup, çap 10 cm'nin üzerindedir.
Kesit yüzeyi, sıkı, girdapsı yapılar içerir	Kesit yüzeyi yumuşak etli kıvamlıdır
Renk: beyaz	Renk: sarı veya sarımsı kahverengi .
Hemoraji ve nekroz sık değildir	Hemoraji ve nekroz sıktır

Leiomyosarkomun ortalama görülme yaşı 43-53'tür. Premenapozal hastalarda prognoz daha iyi olmaktadır. Hastaların %4'ünde pelvik radyoterapi uygulanmaktadır. Aslında benign myomlarla sarkomların birbirlerinden bağımsız geliştiği düşünülmekle

beraber uterin leiomyomların %0.13-0.83'ünde sarkomatöz değişim olduğu belirtilmektedir(53,54)

Leiomyosarkomların(LMS) ilk semptom ve fizik muayene bulgusu kitle olarak bildirilmektedir. Vajinal kanama veya ağrı da tespit edilebilmektedir. Postmenapozal hızla büyüyen kitlelerde şüphelenilmelidir. Endometrial biopsi ile olguların ancak üçte birinde ve submüköz yerleşimli olanlarda tanı konulabilmektedir. Hastaların %50-75'inde tek bir lezyon vardır ve %70'inde intramural , %20'sinde submukozal ve %10'unda subserozal yerleşim saptanmaktadır. Servikal tutulum leiomyomlara göre daha sık gözlenmektedir.(55)

Yayılım lokal olarak myometriuma ve pelvik organlara olmaktadır. Uzak yayılım ise kan yoluyla olmakta ve de en sık akciğer tutulumu görülmektedir. Bir çalışmada LMS nedeniyle ölen hastaların otopsi raporları incelenmiş ve %100'ünde intraabdominal yayılım, %80'inde akciğer ve plevra metastazı, %40'ında paraaortik nod tutulumu, %33'ünde böbrek tutulumu ve %20'sinde karaciğer tutulumu saptanmıştır.(56)

Prognostik faktörler incelendiğinde Dinh ve Woodruff premenapozu, tümörün myom içerisinde lokalize kalmasını, düşük mitoz sayısını, nekroz yokluğunu ve komşu dokuda hyalinizasyonu iyi prognostik faktörler olarak bildirmektedir.(7)

Leiomyosarkomun 5 farklı klinikopatolojik varyantı daha bulunmaktadır. Bunlar intravenöz leiomyomatozis, metastaz gösteren leiomyom, leiomyoblastom, leiomyomatozis peritonealis disseminata ve mikst leiomyosarkomdur.

**İntavenöz leiomyomatozis;** histolojik olarak selim tabiatta olan düz kasın önce ligamentum latum içindeki venöz kanallara girmesi daha sonra da uterin ve iliac venlere ilerlemesiyle karakterizedir(58,59,60). İntravasküler gelişim myomatö uterusdan parametriumlara pelvis yan duvarları boyunca ilerleyen solucansı yapılar şeklinde görüldüğü için endolenfatik stromal myozis ile karıştırılabilmektedir. Semptomlar beraberinde görülen myomlara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Hastaların çoğu yaşamlarının beş ya da altıncı dekadındadır. Pelvik damarlarda tümör bırakıldığında bile prognoz iyidir. Bununla birlikte geç lokal nüksler görülebilmekte ve inferior vena kavaya yayılım ya da kalbe metastaz nedeniyle ölümler bildirilmektedir.

**Benign metastaz yapan leiomyom;** histolojik olarak selim olan uterus düz kas tümörünün malign sayılabilecek şekilde davranarak genellikle akciğerlere ya da lenf

bezlerine metastaz yapmasıyla karakterize olan nadir bir durumdur(61). Metastaz yapan leiomyomların uzak bölgelerde gelişme gösterebilmelerine karşın intravenöz tümörler sadece kan damarları içinde direk yayılım göstermektedir. Deneysel ve klinik deneyimler her iki tümör tipinde östrojenle stümüle olduklarını göstermektedir. Bu nedenle, kastrasyon, dışardan verilen östrojenin kesilmesi ya da progestin, tamoxifen veya gonadotropin tedavisi gibi yöntemlerle östrojen kaynağının kaldırılması tümör üzerinde iyileştirici etki yapmaktadır(62).

**Leiomyoblastom;** grubu içinde epiteloid leiomyomlar, berrak hücreli leiomyomlar ve pleksiform tümörler bulunmaktadır(63). Bu grup atipik düz kas tümörleri mekik şeklinden ziyade yuvarlak hücrelerden oluşur. Bu lezyonlar özelleşmiş düşük gradeli leiomyosarkom olarak kabul edilebilirler. 10'luk büyütmeye 5' ten daha az mitoz gösteren bu tümörlerde prognoz gayet iyidir.

**Leiomyomatozis peritonealis disseminata;** nadir görülen bir tümör grubudur. Bu grup periton yüzeyleri üzerine yayılmış selim düz kas nodülleri ile karakterizedir(64). Bu durum muhtemelen subperitoneal mezenterial kök hücrelerinin östrjen ve progesteron etkisi altında düz kas, fibroblast, miyofibroblast ve desidual hücrelere metaplazi olmasına bağlı olmaktadır. Bildirilen hastaların çoğunu 30-40 yaşları arasındaki kadınlar oluşturmaktadır ve bunlarda yeni geçirilmiş gebelik ya da uzun süreli oral kontraseptif kullanım hikayeleri sıklıkla saptanmaktadır. Bu hastalığın özellikleri makroskopik olarak habis görünümlü histolojisinin ise selim oluşu ve klinik gidişinin iyi olmasıdır.

**Miksoid leiomyosarkom;** makroskopik olarak jelatinimsi görünümü ve düzgün yuvarlak sınırlar ile karakterize olup mikroskopik olarak da miksomatöz stromaya sahiptir. Komşu dokulara ve kan damarlarına belirgin invazyon göstermektedir(65). Mitoz sayısı düşüktür bu da tümörün agresif olmayışını nispeten iyi prognozlu oluşunu açıklamaktadır.

Endometrium kanseri gibi evreleme cerrahisi yapılması tavsiye edilmekle beraber bunun yaşam oranlarına çok da fazla bir etkisi bulunmamaktadır. Evrelemede FIGO'nun 1988 Cerrahi Evrelemesi kullanılmaktadır

**Tablo2:FIGO, Endometrium Kanseriinde Cerrahi Evreleme**

Evre1a	Tümör endometriumda sınırlı
1b	Myometriumun yarısından azında invazyon
1c	Myometriumun yarısından fazlasında invazyon
Evre2a	Endoservikte sadece glanduler tutulum
2b	Servikal stromal invazyon
Evre3a	Serozaya ve/veya adnekslere invazyon ve/veya batın sitolojisi pozitifliği
3b	Vajinal metastaz
3c	Pelvik ve/veya para-aortik lenf nodu metastazı
Evre4a	Mesane ve/veya barsak mukozasında tümöral tutulum
4b	İntraabdominal ve/veya inguinal lenf nodlarını içeren uzak metastazlar

Genellikle evre 1 olgularda 5-yıllık yaşam %50 civarında olmakta ve evre 2-4 olgularda bu oran %10'lara kadar gerilememektedir.

## **2.3.ANJİOGENEZ VE VEGF**

### **2.3.1.ANJİOGENEZ**

Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi demek olan anjiyogenez, vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojik de olabilmektedir. Fizyolojik anjiyogenez; embriyogenez, yara iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde gözlenmektedir(66). Proanjiogenik ve anti anjiogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiogenez kontrol edilememektedir. İnflamatuvar hastalıklarda(artrit, kronik inflamasyon, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, psöriazis), çeşitli kanserlerde (meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, uterus, serviks, glioblastom) ve göz hastalıklarında (yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, proliferatif retinopati) anjiyogenez patolojik olarak ortaya çıkmaktadır Periferik arter hastalıklarında ve gecikmiş yara iyileşmesinde ise anjiyogenezin yetersizliği söz konusu olmaktadır (67-72)

Primordial damarsal sistemin gelişimi vaskülojeniz olarak tanımlanmakta ve ilkel

damarsal ağı oluşturmak üzere endotelial progenitor hücrelerin embriyonik ve embriyo dışı mezoderm içerisinde farklılaşmasını kapsamaktadır. Damarsal ağlarının uzanması ve değişimi için yeni kapillerlerin oluşması, tomurcuklanma ve önceden oluşan damar ağının yeniden düzenlenerek küçük ve büyük damarları oluşturması gerekmektedir.(73) Gelişen damarsal yapıların birbiri ardı sıra olgunlaşmaları ise perivasküler hücrelerin yeniden yapılanmasına ve bazal membran üzerinde yapılaşmasını sağlayan faktörlerin varlığına bağlıdır. Embriyonik damarsal sistemin gelişmesi esnasında meydana gelen olaylar ve embriyonun oksijen ve besin ihtiyacı, aynen erişkin bir organizmada anjiyogenez oluşumunda, özellikle hipoksinin aktive ettiği metabolik cevaplarla benzerlik göstermektedir.(74,75) Anjiyogenez oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşmekte, ekstraselüler matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiyogenezde temel rol oynamaktadır.(76-79) Damar endotelini oluşturan endotel hücreleri, anjiyogenez süreci içinde yer alan temel hücredir. Perisitler ile birlikte kapiller damar duvarlarını oluşturarak ana damarları, dalları ve kapiller ağı oluşturucu genetik bilgileri içermektedir.(80) Erişkin insanlardaki vasküler endotelial hücreler tipik olarak düşük turnover hızında olmalarına rağmen, yaşamları boyunca yeni kan damarları oluşturacak çoğalma kapasitesine sahiptirler. 70 kg'lık bir insanda bir trilyondan fazla endotelial hücre, kan damarlarının içini döşer ve bu da yaklaşık 1000 metrekarelik bir alana eşittir. Endotelial hücrelerin yaşam siklusu (yenilenme süresi) 1000 günü geçmektedir. Anjiyogenezin sıkı denetlendiği kadın üreme sistemi ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik durumlar dışında anjiyogenez organizmada oldukça sınırlı oluşmaktadır(81).

Anjiyogenezin düzenlenme evreleri pek çok büyüme faktörünün ve düzenleyici proteinin kontrolü altındadır. Henüz tüm anjiyogenik etkileşimlerin niteliği açıklığa kavuşmamıştır. En büyük olasılık anjiyogenik uyarıcılar ve anjiyogenez inhibitörleri arasındaki dengenin, normalde damarsal bileşenlerin sessiz halde kalmalarını sağlıyor olmasıdır. Anjiyogenik uyarıların artışı ve anjiyogenez inhibitörlerinin azalışı anjiyogenezi başlatmaktadır. Anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler Tablo 3'de gösterilmektedir.(82)

**Tablo 3. Anjiyogenik ve anjiyogenezi önleyen faktörler**

<b>Anjiyogenik Faktörler</b>	<b>Anjiyogenezi Önleyen Faktörler</b>
VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktör)	Trombospondin- 1
PGF(Plasental büyüme faktör)	Anjiostatin
FGF(Asidik, bazik fibroblast büyüme faktör)	Endostatin
FGF-3 (Fibroblast büyüme faktör 3)	Vazostatin
FGF-4 (Fibroblast büyüme faktör-4)	Vasküler endotelial büyüme faktör inh.
TGF- $\alpha$ (Transforme edici büyüme faktör- $\alpha$ )	Trombosit faktör-4 fragmanı
TGF- $\beta$ (Transforme edici büyüme faktör-b)	Prolaktin derivesi
EGF (Epidermal büyüme faktör)	Restin
HGF (Hepatosit büyüme faktör)	Proliferinle ilgili protein
TNF- $\alpha$ (Tümör nekroz faktör- $\alpha$ )	İnterferon- $\alpha$ - $\beta$
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktör)	Anjiopoetin-2
GCSF (Granülosit koloni uyaran faktör)	Antitrombin-3 fragmanı
IL- 8 (İnterlökin8)	İnterferon ile indüklenen protein-10
Anjiogenin	

Yeni damar oluşumu aşağıda belirtilen olayları kapsayan çok basamaklı bir süreçtir:

- **Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması**
- **Endotel hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve göçü**
- **Tubul oluşumu ve olgunlaşma, damar stabilizasyonu ve ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi**



### **1. Bazal Membranın Proteolitik Enzimler Tarafından Yıkılması**

Anjiyogenez süreci damar endotelini döşeyen kollajen, laminin gibi glikoproteinlerden ve heparan sülfat gibi proteoglikanlardan oluşan bazal membranın proteolitik yıkımı ile başlamaktadır.(83)

Endotel hücreleri göç etmek ve çoğalmak üzere uyarıldığında membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana gelmektedir. Normalde, endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka oluşturmakta ancak anjiyogenez sırasında çoğalıp yayılma göstermektedir. Normal, hastalıklı yada hasarlı dokularda üretilip salgılanan anjiogenik büyüme faktörleri komşu dokulara difüzyon yolu ile geçmektedir. Anjiogenik büyüme faktörleri yakınındaki önceden var olan kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere bağlanmaktadır. Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerinin yıkımına neden olmakta bu yıkımı da endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenme izlemektedir(84). Endotel hücrelerinin invazyon ve göç süreçleri, plazminojen aktivatör (PA) ve matriks metaloproteinaz (MMP) sisteminin işbirliği içinde aktive olmasını gerektirmektedir. Ürokinaz-tip (uPA) ve doku-tip (tPA) plazminojen aktivatörleri plazminojeni plazmine çeviren serin proteazları grubuna aittirler. ECM bileşenlerinin yıkılması ve MMP-1, MMP-3, MMP-9, elastaz gibi matriks metaloproteinazlarının aktivasyonu da plazminin işlevleri arasında bulunmaktadır(85-87).

### **2. Endotel Hücrelerde Göçme ve Çoğalma**

Anjiogenik uyarı, proteolitik yıkım ile kısa bir süre sonra endotel hücreleri aktive etmektedir. Endotel hücreleri ekstraselüler matrikse göç ederek çoğalmakta ve bu süreçte en etkili anjiogenik faktör olarak vasküler endotel büyüme faktörü VEGF rol oynamaktadır(88).

### **3. Kapiller Oluşumu ve Damar Olgunlaşması**

Endotel hücre çoğalmasından sonra ECM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstraselüler proteoliz mutlaka lokal olarak inhibe edilmelidir. Kapiller filizlenme oluşuktan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM'de yıkılma ortaya çıkmakta ve bu sayede daha ileri yayılımı mümkün olmaktadır. Bazal membranın yıkılması endotel hücre göçüne ve filiz oluşumuna izin vermekte endotelin yol alması ve uzaması sırasında hücre içi ve hücreler arası boşlukta, sonunda

kendilerinden damarların oluştuğu lümenler gelişmektedir. Böylece, ekstraselüler matriks proteolizinin birbirini sırayla izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda kapillerler oluşmaktadır. Proteolitik yıkılma ve endotel hücresi göçünden sonra yeni oluşan kapillerler, yeni bazal membranı oluşturmaktadır. Bu nedenle, endotel hücrelerinin yeni kapiller yapılar oluşturabilmeleri için birbirlerine ve ECM'e tutunma gereksinimi bulunmaktadır. Damar olgunlaştıktan ve uygun anjiyogenez ortaya çıktıktan sonra anjiyogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiyogenez inhibitörlerinde artış gözlenmektedir. Böylece endotel hücreleri sessiz bir hale bürünmekte ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmektedir(82,89). Bu olayları özetleyecek olursak, fibroblast büyüme faktörü (basic-FGF) ve VEGF gibi büyüme faktörlerinin aktivasyonu, hücrelerin çoğalmasını ve ekstraselüler matriks içine göç etmesini uyarmaktadır. Aynı zamanda, büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ECM bileşenlerinin yıkılmasına neden olmaktadır. Mitojenik endotel hücreleri kapiller filizleri oluşturmakta, integrinler gibi membran proteinleri de bu süreç içinde yer alarak endotel hücrelerinin birbirine ve ECM'ye tutunmalarına yardımcı olmakta, böylece yeni kapillerler oluşmaktadır. Büyüme faktörlerinin inhibisyonu veya büyüme faktör inhibitörlerinin varlığı anjiyogenezi inhibe etmekte, ECM'nin proteolitik yıkımı da inhibe olarak yeni oluşmuş kapillerler etrafında matriks bileşenleri sentez edilmektedir.

**2.3.2Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü:** (Vascular endothelial growth factor; VEGF);

VEGF anjiyogenezde rol oynayan faktörlerden biridir. VEGF'nin post-natal damarlanma, yara iyileşmesi, kanser, romatoid artrit, retinada yeni damarlanma ve kalp-damar hastalıkları dahil olmak üzere çok sayıdaki patofizyolojik durumda önem taşımaktadır. VEGF, başlangıçta damar geçirgenliğini artıran bir faktör olarak tanımlanmakla birlikte endotel hücrelerinin çok sayıdaki biyolojik fonksiyonunu, sitokin sentezi ve salınımı, trombolitik ve pıhtılaşma yollarında yer alan moleküllerin ekspresyonu ve düz kas hücre hiperplazisini de düzenlemektedir(8-12). Anjiyogenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı Vascular Endotelial Growth Factor (VEGF)' dür ve vascular permeability factor (VPF) olarak ta bilinmektedir. Önceleri iki ayrı yapı zannedilirken aynı protein oldukları gösterilmiştir ve daha çok VEGF olarak adlandırılmaktadır. VEGF homodimerik, heparin-binding glikoprotein yapısında bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGF A, B, C, D, E, ya

da aminoasit sayılarına göre VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206 ve VEGF145 gibi isoformları bulunmaktadır(95). VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak üç reseptörü ile gerçekleştirmektedir. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4) olarak sıralanabilir. Bunlardan VEGF-R1 ve R2 endotel hücreleri üzerinde iken VEGF-R3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır (13,14,15). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve ras GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, ve diferansiyasyonunu sağlamaktadır(16). Nitric oxide (NO) ise anjiogenezin VEGF-bağımlı bir mediyatördür. VEGF'in NO sentez enzimi üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu oluşan NO endotel hücre migrasyonunda rol almaktadır (100,101). Başta RAS, SRC ve HER-2 onkogenleri olmak üzere VEGF düzeyi; p53 gen mutasyonu, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-13, FGF-4, PDGF, TGF- $\beta$ , IGF-1, TNF- $\alpha$  ve NO gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmekte ve tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonunu artmaktadır(102). Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1) de VEGF salınımlarında etkili rol oynamaktadır (103). Ayrıca, VEGF muhtemel temel anjiogenik faktör olma özelliği yanında; VEGF' e maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında fenestrasyon, vesiküler organeller ve transselüler gap oluşumuna olanak sağlayarak vasküler permeabiliteyi artırmaktadır (104). Endotel hücreleri için migratuar özelliğinin yanı sıra VEGF; hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile urokinaz ve doku- tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarmakta ve böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırmaktadır(105).

Anjiogenezis kavramının tarihçesine baktığımızda yaklaşık 100 yıl önce tümör içerisinde yeni damar gelişimlerinden bahsedildiğini görmekteyiz. Ancak bu dönemde tümör hiperemisi olarak adlandırılan bu durumun, tümör metabolitlerine bağlı basit bir dilatasyon olduğu düşünülmüştür (106). Daha sonraki bir-iki dekatta, tümörün mevcut damarlarla mı beslendiği yoksa neovaskülarizasyonun mu olduğu tartışılmış, neovaskülarizasyonu kabul edenler bile bunun tümör gelişimi için gerekli olmadığını, basit bir reaksiyon olduğunu düşünmüşlerdir. 1939 yılında, yaralanma sonucunda oluşan neovaskülarizasyonun durduğu ve gerilediği ancak tümör implantında damar gelişiminin giderek arttığı farkedilmiştir (107). 1945 yılında yapılan bir çalışmada ise, tümör implantındaki yeni damarların konakçı damarlarından köken aldığı

belirtmiştir(108). Anjiogenezis konusundaki asıl gelişimin 1971’de Folkman ile başladığını görüyoruz (109). Folkman “tümör gelişimi anjiogenezise bağımlıdır” diyerek şu teorileri ortaya atmıştır:

1) Primer solid tümörlerin büyük bir çoğunluğunda muhtemelen uzamış bir avasküler evre vardır ve bu dönemde tümörler maksimum 1-2 mm çapa ulaşabilmektedir. Bu büyüklüğe kadar, tümör hücreleri, gerekli oksijen ve besin ihtiyacını pasif diffüzyon ile karşılanmaktadır.

2) Bu mikroskopik tümör kitlesi matür konakçı damarlarından kendisine doğru yeni kapiller damarların tomurcuklanması ve sonuçta tümöral kitleyi infiltre etmesine yol açan anjiogenezisi başlatabilmektedir. Böylece tümöral kitlenin sürekli olarak genişlemesi ve hematojen metastaz oluşturma ortamı oluşmaktadır.

3) Anjiogenezisin tümör hücrelerinden “Tümör Anjiogenezis Faktör (TAF)” adı verilen bir büyüme faktörünün ektopik olarak yapımına bağlı olduğu ortaya atılmıştır.

4) TAF yapımını ya da onun biyolojik fonksiyonunu önleyerek ya da yeni oluşan immatür kan damarlarındaki endotel hücrelerini hedef alarak tümör anjiogenezisi ve tümör büyümesini bloke etmek mümkün olabilmektedir.

5) Bu tip tedavi yaklaşımları başarılı olursa, tümör hücrelerini eradike edilemese de tümör hücrelerinin daha da çoğalmasını engellenerek belki de tümörün kan desteği olmaksızın yaşamını sürdürebileceği 1-2 mm lik boyutlara regresyonu sağlanabilir.

Bundan sonraki yıllarda, tümör damarları yeni çoğalan kapillerler midir, anjiogenez sürecindeki adımlar nelerdir, anjiogenez nasıl kantifiye edilebilir, in vivo olarak tümör hücrelerinden salınan anjiogenik faktörler endotel gelişimini nasıl stimüle eder gibi sorulara cevap aranmıştır. 1980 ortalarına gelindiğinde tümör gelişiminin anjiogenezise bağımlı olduğuna dair pek çok delil toplanmış, tümördeki yeni kapiller artışının tümör hücre popülasyonundaki her bir ilave artışa öncelik ettiği ve anjiogenezis inhibe edilirse tümörün durağan olarak kalacağı görüşleri kabul görmüştür (110,111). Metastazlarda olduğu gibi anjiogeneziste de matriks metalloproteinazlarına ihtiyaç bulunmaktadır. İnsan tümörlerinin çoğu, saptandığında neovaskülarizedir. Ancak deneysel ve klinik veriler bu tümörlerin aylarca ve yıllarca anjiogenik olmadan kaldığını göstermektedir(112). Tümörler, kapillerleri çekebilecek mi, kan akımı ile bağlantı sağlayabilecek mi sorusunda en belirleyici faktör kritik lokal dengenin anjiogenik faktörler lehinde bozulmuş olmasıdır(113). Vaskülarizasyonla birlikte replike olan

hücrelerin total popülasyonu önemli ölçüde artmakta hızlı bir büyüme, invazyon ve çevre dokulara kompresyon oluşmaktadır.

İnvazyon oluşması için neovaskülarizasyon şartı bulunmamaktadır. Anjiogenezis ise invazyonu kolaylaştırmakta ve tümörlerin genişlemesine izin vermektedir(115). Endotel hücrelerinden salınan proteolitik maddeler, tümörün invazivliğine katkıda bulunabilmektedir. Tümörler 1-2 mm den daha fazla büyüyecekleri zaman kapillerlerle bağlantı kurmak zorundadır. Neovaskülarizasyonla birlikte, beslenme ve artıkların değişimi problemi geçici olarak çözülmekte hem tümör hücreleri hem endotel hücreleri için gerekli olan büyüme faktörleri sağlanmaktadır(116,117). Tümör hücreleri vaskülarize olduklarında sadece kanlanmakla kalmayıp aynı zamanda endotel hücrelerinden parakrin stimuluslar da almaktadır(115,118). Kan akımı yokluğunda tümör hücreleri tercihan endoteller boyunca büyümektedir. Parakrin stimuluslar iki yönlü, işlemekte tümör hücreleri ve endotel hücreleri birbirlerinin proliferasyonunu stimüle etmektedir (119).Vaskülarize bir tümörde tüm tümör hücreleri anjiogenik değildir. Çok iyi vaskülarize tümörlerde bile mikrodamar dansitesinin düşük olduğu alanlar ve yüksek olduğu alanlar gözlenmekte ve heterojen bir anjiogenik aktivite bulunmaktadır. Tümör popülasyonu genişledikçe de anjiogenik özellik kazanmış tümör hücre varyantlarının oluşma ihtimali artmaktadır(120). Metastazların klonal orijini nedeniyle yüksek oranda anjiogenik hücre içeren tümörler yaygın metastaz yapmaktadır çünkü hedef dokulara ulaştığında zaten anjiogenik özellik taşırlar (121). Bir tümör hücresinin metastaz yapabilmesi için, damar sistemine girmek, dolaşımında canlı kalabilmek, hedef organın mikrodamarlarında duraklayabilmek, damar sisteminden dışarı çıkabilmek, hedef organda büyüebilmek ve anjiogenezi indükleyebilmek gibi çeşitli bariyerleri aşabilmesi gerekmektedir (120,121,122).

Deneysel çalışmalarda, neovaskülarizasyondan önce, tümör hücrelerinin nadiren dolaşıma girdikleri gösterilmiştir (123). Neovaskülarizasyon olduğunda ise yüksek mikrodamar dansitesi nedeni ile yüzey alanı arttığından hücrelerin dolaşıma girmesi kolaylaşmakta ve hücreler sürekli olarak dolaşımında bulunmaktadır. Tümör hücresi anjiogenik iken metastaz yaparsa, saptanabilir tümör oluşturma ihtimali daha fazladır. Metastatik kaskadın başında olduğu kadar sonunda da anjiogeneze ihtiyaç vardır. Tümör hücresi başarıyla metastaz yapmış olsa bile hedef organda hemen vaskülarize olmazsa mikroskopik düzeyde kalabilmektedir (114).

Klinik veriler metastatik potansiyelin ve prognozun anjiogenezinin şiddetine bağlı

olduğunu desteklemektedir(120). Bu nedenle tümörlerde anjiogenezin şiddeti belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu konuda kullanılan yöntemler, mikrodamar dansitesinin saptanması, anjiogenik faktörlerin kan ve idrarda ölçülmesi, anjiogenik proteinlerin doku düzeylerinin saptanmasıdır. Kan ve idrarda anjiogenik proteinlerin saptanması hastalık ilerlemesini belirlemede ve tedavide yol gösterici olmaktadır. Mesane karsinomunda VEGF değerleri yüksek olanlarda, daha fazla metastaz yapma özelliği saptanamamaktadır(124). Ancak her zaman tek bir protein ile ilişki saptanmayabilir. Çünkü daha önce de belirtildiği gibi anjiogeneziste önemli olan anjiogenik ve anjiostatik maddeler arasındaki dengedir.

Anjiogenez inhibitörleri, matriks yıkımının engellenmesi, endotel hücrelerinin direkt inhibisyonu, anjiogenez aktivatörlerinin engellenmesi, integrin inhibisyonu ve nonspesifik mekanizmalarla etkisini göstermektedir. Tümör tedavisinde ümit veren bu maddelerle ilgili çalışmalara insanlarda 1988'de başlanmıştır ve yıllarca sürmesi muhtemel gözükmemektedir (17). Deney hayvanlarındaki heyecan verici bir sonuçtan klinik çalışmalarına geçmek, zor ve sistematik bir süreci gerektirmektedir. Hayvanlardaki antikanser aktiviteli proteinlerin insanlarda kullanılabilmesi için bu protein yeterli miktarda sağlanabilmeli, emin bir şekilde metabolize edilebilmeli ve diğer çeşitli güvenlik testlerini geçmelidir. İnsanlardaki tümör biyolojisinin ve metabolizmanın deney hayvanlarından farklı olması insanın relatif büyüklüğü çok daha fazla dozda ilaç gerektirebildiğinden tahmin edilemez yan etkiler oluşabilmektedir. Antianjiogenik aktiviteyi antiproliferatif kemoterapiden ayıran ana hatlar, antianjiogenik tedavinin direkt olarak endotel hücrelerine yönelik olması ve standart kemoterapötiklerle gözlenen yan etkilerin görülmemesi, uzun yıllar boyunca kesilmeksizin kullanılabilmesi ve rezistans problemlerinin olmamasıdır (126). Antianjiogenik ilaçlar kemik iliği baskılanması, saç kaybı, gastrointestinal semptomlar gibi yan etkilere yol açmamaktadır. Endotel hücrelerine sitotoksik değildir ancak bu hücrelerin proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe ederek uzun yıllar içerisinde involüsyon sağlayabilmektedir. Bugüne kadar yapılmış deneysel ya da klinik uzun süreli çalışmalarda major bir rezistans problemi ile karşılaşılmamıştır. Çünkü endotel hücrelerinde tümör hücrelerindeki gibi mutasyon yoktur ve genetik olarak stabildirler. Tümör tedavisinde antianjiogenik ve diğer klasik ajanların birlikte kullanılmasının daha da etkili olabileceği düşünülmektedir. Örneğin kemoterapi ile tümör kitlesi küçültülüp antianjiogeniklerle tümörün durağan olarak kalması sağlanabilmektedir. Literatürde bu tipte çalışmalar mevcuttur (127,128).

Tümörler, anjiojenik faktörlerin üretimiyle karakterize dokular olduklarından, bunların ekspresyonunun ya da etkilerinin inhibisyonu tümör anjiojenezinin baskılanmasında indirek ancak etkili bir yaklaşım olacaktır. Öncelikli hedefler içinde en çok tercih edilenler VEGF ve VEGF reseptörleridir.

### **2.3.3. Anti VEGF Stratejileri**

VEGF'in endotel hücreleri üzerinde bulunan transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması ile tetiklenen sinyal yolu birçok seviyede farklı açılardan inhibe edilerek VEGF in etkinliği önlenmektedir(129,130). Bu mekanizmalar 3 grupta ele alınmaktadır;

- **VEGF inhibitörleri**
- **VEGFR inhibitörleri**
- **Monoklonal Antikorlar**

### **2.3.4. VEGF'e yönelik monoklonal antikorlar**

*rhuMab VEGF (Bevacizumab, Avastin)*; anti-anjiojenik ve anti-tümör etkinliği olan rekombinant insan monoklonal VEGF antikorudur. Faz I çalışmalarında kemoterapi ile birlikte kullanıldığında serum VEGF seviyelerini ölçülemeyecek seviyelere kadar düşürdüğü ve farklı tümörlerde büyümeyi inhibe ettiği bulunmuştur. Ayrıca yakın zamanda yapılmış randomize faz III çalışmasında metastatik kolorektal kanserli hastalarda konvansiyonel tedaviye kıyasla klasik IFN tedavisiyle kombine edildiğinde hastalarda survinin önemli derecede arttığı, tümör progresyonunda ciddi azalmanın olduğu ve tromboembolik komplikasyonda herhangi bir artış olmadığı tespit edilmiştir. (131,132).

VEGF-trap; Faz I çalışmaları devam eden ve monoklonal antikorlara göre VEGF' e olan affinitesi çok daha yüksek olan spesifik VEGF antagonistidir. Cilt altı uygulaması ise bir diğer önemli avantajıdır (133).

### **2.3.5. VEGF reseptörlerine yönelik tedaviler**

VEGF sistemi aynı zamanda monoklonal antikorlarla yada spesifik tirozin kinaz inhibitörleri aracılığıyla VEGF'in reseptörleri hedef alınarak da inhibe edilebilir. Bunlar anjiojenezde direk veya indirek olarak rol alan VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (Flk-1), Tie-1 ve Tie-2 gibi reseptörleri hedef alan küçük moleküllerdir. Bunların içinde ise en önemlisi, özellikle tümör dokusunda endotel hücre proliferasyonu ve

kemotaksisinden sorumlu olan Flk-1 (VEGFR-2)' dir (134).

### **2.3.6.VEGF reseptör tirozin kinaz inhibitörleri**

**SU5416;** klinik olarak test edilmiş ilk VEGF reseptör tirozin kinaz inhibitörüdür. Parenteral uygulanan kinolon derivesi olarak SU5416, VEGFR-2 (Flk-1)'i inhibe eder (135). Kısa yarılanma ömrü, aktif plazma konsantrasyonu için sık aralıklarla kullanılması, ve özellikle gemcitabine/cisplatin kemoterapisi ile kombine kullanımda ortaya çıkan pulmoner emboli, myokardiyal enfarktüs ve serebrovasküler olay geliştirmesi kullanımını kısıtlamaktadır (136).

**SU6668;** VEGF, bFGF ve PDGF reseptörlerini inhibe eden oral kullanımlı anti-anjiojenik ajandır (137). Günde tek dozluk uygulamalar hastalar tarafından tolere edilebilirken doz arttıkça nefes darlığı, göğüs ağrısı ve perikardiyal effüzyona sebep olabilmektedir (138).

**SU11248;** ise geniş spektrumlu oral tirozin kinaz inhibitörüdür ve VEGF, PDGF, c-Kit ile Flt-3 kinaz aktivitesini inhibe eder (139).

**PTK787/ZK22854;** oral VEGFR-1 ve -2 reseptör inhibitörüdür. Ataksia, vertigo, hipertansiyon ve venöz tromboembolizm görülen yan etkileridir. Hepatik metastazı olan kolorektal kanserli hastalarda kan akımını belirgin azalttığı gözlemlenmiştir. Kombine faz II ve III çalışmaları sürmektedir (140).

**ZD6474;** ise hem VEGF hem EGF reseptör tirozin kinaz inhibitörüdür. Kullanımı sırasında diyare ve cilt kızarıklığı görülmesi özellikle EGF reseptörlerinin yaygın olarak bloke edildiğini göstermektedir (141).

**CP-547,632** ise selektif VEGFR-2 tirozin kinaz inhibitörüdür. Paz I çalışmaları sevindirici farmakokinetik sonuçlar vermektedir (142).

Sonuç olarak, son yıllarda kanser tedavisi için yapılan araştırmalarda tümör çoğalması ve metastazının mekanizmalarının anlaşılması için uğraşmakta ve bu mekanizmaları hedef alan tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Antianjiojenik tedavi de bu görüşle ortaya atılmış, gerek tek başlarına gerekse konvansiyonel tedavilere ek olarak kullanılmaya başlanmış ve yan etkilerinin klasik ilaçlara göre az olmasıyla kanser tedavisinde önemli bir yer bulmuştur. Günümüzde yeni ve daha etkili ajanların kullanıma girmesiyle kanser tedavisinde önemli adımlar atılmış olacaktır.



### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Olgular:

Celal Bayar Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde yer alan 2007-2008'de tanı almış çapı 10 cm.'den küçük 40 adet ve çapı 10.cm'den büyük 11 adet leiomyom ile 2005 yılında tanı almış 2 adet leiomyosarkom ele alındı. Ayrıca leiomyom nodüllerine komşu 19 adet ve ayrıca seçilen 6 adet olağan myometrium dokusu çalışmada yer aldı. Olguların yaşı klinik istem formlarından ya da dosyalarından elde edilerek kaydedildi.

Hematoksilen-eozin boyalı preparatlar tekrar değerlendirilerek histopatolojik tanı doğrulandı.

İmmunohistokimyasal değerlendirmeye yetecek oranda endometrial doku içeren bloklar seçildi. VEGF ve VEGF-R boyamasında pozitif kontrol amacıyla hemanjiom kesitleri kullanıldı.

#### İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

Seçilen tüm bloklara VEGF ve VEGF-R immunohistokimyasal boyaları uygulandı. İmmunohistokimyasal boyamaların her birinde, pozitif ve negatif kontrol kullanıldı.

%10'luk tamponlanmış formalinde tespit edilip, rutin yöntemlerle takip edilmiş ve parafine gömülmüş dokulardan 4 µ kalınlığında hazırlanan kesitler poly-L-Lizinle kaplı lamalar üzerine alındı. Lamlar 55°C'de etüvde 16 saat kurutuldu. Ksilol ile deparafinizasyon ve alkol ile rehidratasyon işleminden sonra çeşme suyu ve distile su ile yıkanıp endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla 10 dakika %3'lük hidrojen peroksidaz solüsyonunda bekletildi. Çeşme suyu ve distile suda yıkanan kesitler sitrat buffer solüsyonu (pH=6.0) içinde 20 dakika mikrodalga ile antijen açığa çıkarma işlemi uygulandı. Bu işlemden sonra kesitler oda ısısında soğutuldu. Çeşme suyu ve distile suda yıkandıktan sonra 4 farklı kap içindeki Tris tampon solüsyonunda (TBS) (pH=7.6) 3'er dakika bekletildi. Ardından VEGF ve VEGF-R immunohistokimyasal belirleyicisi için non-spesifik zemin boyasını önlemek için oda ısısında 10 dakika protein blokajı (ScyTek,

lot 13981) yapıldı ve primer antikor uygulamasına geçildi.

Kesitlere VEGF proteinine yönelik predilüe antikor VEGF Ab-7(VG1) (Neomarkers MS-1467-R7) ve VEGF-R proteinine yönelik predilüe antikor ile (Flt-1 Ab-1) (Neomarkers-RB-1527-R7) 30 dakika inkübasyon uygulandı.

Kesitler, TBS (pH=7.6) ile 4 kez yıkadıktan sonra sekonder antikor işlemi için sırasıyla biotin ve streptavidin-peroksidaz solüsyonlarında 15'er dakika inkübe edildi. İnkübasyonlar arasında yine TBS (pH=7.6) ile 4 kez yıkandı.

Daha sonra kesitler kromojen olarak diaminobenzidin (DAB,ScyTek lot 13352) solüsyonunda 10 dakika bekletilip distile suda 3 dakika yıkandı. Asitsiz ve alkolsüz Mayer hematoksileni ile zıt boyama yapıldıktan sonra çeşme suyu ve distile suda 3'er dakika yıkandı. Alkollerden geçirilen lamalar kurutulduktan sonra şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan® (Merck and Co., Berlin) ile kapatıldı.

Uygulama sırasındaki tüm inkübasyonlar oda sıcaklığında, nemli ve kapalı bir ortamda yapıldı

### **İmmünohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi**

Tüm değerlendirmeler iki ayrı patolog tarafından standart ışık mikroskopunda yapıldı.

VEGF ve VEGF-R ile sitoplazmik boyanma elde edildi. Endometrial bezler ve damar kesitleri pozitif kontrol olarak kabul edildi. Boyanmanın yoğunluğu ve dağılımı göz önüne alınarak derecelendirme yapıldı. Endometrial bezlerin luminal yüzlerindeki boyanma; boyanmamış olanlar 0(negatif), hafif olanlar 1(hafif), orta derece boyananlar 2 (orta), güçlü olanlar 3 (güçlü) olarak adlandırıldı.

### **İstatistiksel Değerlendirme**

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde kişisel bilgisayarla çalışan SPSS (Statistical Package for Social Sciences) programının 10.0 versiyonu kullanıldı. Korelasyonun araştırılmasında Pearson ve Spearman korelasyon analizi, farklı serilerin anlamlılığının sınanmasında Qi-kare testi ve varyans analizi kullanıldı. Sonuçlar p<0.05 olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4.BULGULAR

Hastanemizde çeşitli nedenlerle 2007-2008 tarihleri arasında myomektomi ve histerektomi operasyonları geçirmiş ve leiomyom(10 cm.altı 40 adet ve 10 cm. üstü 11adet), normal myometrium tanıları almış toplam 57 adet ve 2005 yılında tanı almış toplam 2 leiomyosarkom olgusu çalışma kapsamına alınmıştır.

**Tablo 4: Hastaların Yaşa Göre Dağılımları**

Yaş	n			
		X±SD	Min.	Max
Leiomyom	51	47.51±8.44	30.00	75.00
Leiomyosarkom	2	66.00±18.38	53.00	79.00
Olağan Myometrium	6	47.00±6.19	41.00	57.00

Tablo 4'te hastaların tanılarına göre yaş gruplarının dağılımı görülmektedir. Leiomyom tanısı alan hastaların yaş ortalamasının 47.51±8.44 olduğu en düşük 30.00, en yüksek ise 75.00 olduğu, leiomyosarkom tanısı alan hastaların yaş ortalamasının 66.00±18.38 olduğu en düşük 53.00, en yüksek ise 79.00 olduğu, olağan myometrium dokusuna sahip olan hastaların da yaş ortalamasının 47.00±6.19 olduğu en düşük 41.00, en yüksek ise 57.00 olduğu görülmektedir.

Çalışmamızın ilk aşamasında myom boyutu ile VEGF ve VEGF-R'ünün ayrı ayrı boyanma dereceleri arasındaki ilişkiyi değerlendirdik. 10 cm. altı çapa sahip leiomyomlar küçük leiomyom ve 10 cm. ve üstündeki çapa sahip leiomyomlar büyük leiomyom olarak sınıflandırıldı. Hem VEGF(Tablo5) hem de VEGF-R(Tablo6) boyanma dereceleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark tespit edilmedi.(p>0.05)

**Tablo5: Myom çapı ile VEGF İmmunohistokimyasal Boyanma Düzeylerinin Karşılaştırılması**

Myom Çapı	VEGF									
	Negatif		Hafif		Orta		Güçlü		TOPLAM	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
10 cm ↓	22	55.0	9	22.5	7	17.5	2	5.0	40	100.0
10 cm ve ↑	5	45.5	5	45.5	1	9.1	-	-	11	100.0
X2: 2.743 p=0.433 P>0.05										

**Tablo6: Myom çapı ile VEGF-R İmmunohistokimyasal Boyanma Düzeylerinin Karşılaştırılması**

Myom Çapı	VEGFR							
	Negatif		Hafif		Orta		TOPLAM	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
10 cm ↓	14	35.0	23	57.5	3	7.5	40	100.0
10 cm ve ↑	3	27.3	6	54.5	2	18.2	11	100.0
X2: 1.172 p=0.557 P>0.05								

Leiomyoma komşu myometrium ile leiomyomu olmayan hastalardan alınan

myometrium(Resim 1-a/b) dokuları da VEGF(Tablo7) ve VEGF-R(Tablo8)'ünün ayrı ayrı boyanma dereceleri açısından değerlendirdi. Ancak hem VEGF hem de VEGF-R' ü açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi. ( $p>0.05$ )

**Tablo 7: Leiomyoma komşu myometrium ile olağan myometriumun VEGF ekspresyonu karşılaştırması**

	MYOM VEGF					
	Negatif		Hafif		TOPLAM	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<b>Olağan Myometrium</b>	6	100.0	-	-	6	100.0
<b>Leiomyom Nodülüne Komşu Myometrium</b>	17	89.5	2	10.5	19	100.0
X2: 0.686 p=1.0 P>0.05						

**Tablo 8: Leiomyoma komşu myometrium ile olağan myometriumun VEGF-R ekspresyonu karşılaştırması**

	MYOM VEGFR							
	Negatif		Hafif		Orta		TOPLAM	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<b>Olağan Myometrium</b>	-	-	6	100.0	-	-	6	100.0
<b>Leiomyom Nodülüne Komşu Myometrium</b>	2	10.5	12	63.2	5	26.3	19	100.0
X2: 3.070 p=0.215 P>0.05								

Leiomyom(Resim2-a/b) ile leiomyomu olmayan normal hastadan(Resim1-a/b) alınan myometriumun karşılaştırmasında da hem VEGF(Tablo9) hem de VEGF-

R'ü(Tablo10) açısından istatiksels olarak anlamlı fark tespit edilmedi.(p>0.05)

**Tablo 9:Leiomyom ile normal myometriyumun VEGF ekspresyonu karşılaştırılması**

	MYOM VEGF									
	Negatif		Hafif		Orta		Güçlü		TOPLAM	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Leiomyom	27	52.9	14	27.5	8	15.7	2	3.9	51	100.0
Normal Myometriyum	6	100.0	-	-	-	-	-	-	6	100.0
X2: 4.877 p=0.181 P>0.05										

**Tablo 10: Leiomyom ile normal myometriyumun VEGF-R ekspresyonu karşılaştırması**

	MYOM VEGFR									
	Negatif		Hafif		Orta		TOPLAM			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%		
Leiomyom	17	33.3	29	56.9	5	9.8	51	100.0		
Normal Myometriyum	-	-	6	100.0	-	-	6	100.0		
X2: 4.215 p=0.122 P>0.05										

Leiomyom(Resim 2-a/b) ile leiomyom nodülüne komşu normal myometriyumdan alınan örneklerde VEGF(Tablo11) ve VEGF-R' ünün(tablo12) ayrı ayrı boyanma dereceleri incelendi. Hem VEGF hem de VEGF-R' ü ekspresyonu açısından istatiksels

olarak anlamlı fark bulunmadı.(p>0.05)

**Tablo11:Leiomyom ile Leiomyom Nodülüne Komşu Myometriumda VEGF İmmunohistokimyasal Boyanma Düzeylerinin Karşılaştırılması**

Leiomyom	Leiomyom Nodülüne Komşu Myometrium					
	Negatif		Hafif		TOPLAM	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Negatif	12	92.3	1	7.7	13	100.0
Hafif	3	75.0	1	25.0	4	100.0
Orta	1	100.0	-	-	1	100.0
Güçlü	1	100.0	-	-	1	100.0
n:19 X2: 1.236 p=0.744 P>0.05						

**Tablo12:Leiomyom ile Leiomyom Nodülüne Komşu Myometriumda VEGF-R immunohistokimyasal Boyanma Düzeylerinin Karşılaştırılması**

Leiomyom	Leiomyom Nodülüne Komşu Myometrium							
	Negatif		Hafif		Orta		TOPLAM	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Negatif	1	14.3	5	71.4	1	14.3	7	100.0
Hafif	1	9.1	7	63.6	3	27.3	11	100.0
Orta	-	-	-	-	1	100.0	1	100.0
N:19 X2: 3.381 p=0.496 P>0.05								

Leiomyosarkom olgularımız sayıca az olduğu için (2 adet) istatistiksel olarak değerlendirilemedi. Ancak her iki olgu da VEGF-R(Resim 3-b) immunohistokimyasal

boyamada orta derece boyanma gösterirken biri VEGF(Resim 3-a) ile negatif diğeri ise hafif boyanma gösterdi .

**Tablo13:Leiomyosarkom Olgularının Boyanma Düzeyleri**

Leiomyosarkom	Negatif		Hafif		Orta		TOPLAM	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
VEGF	1	50.0	-	-	1	50.0	2	100.0
VEGF-R	-	-	2	100.0	-	-	2	100.0



## 5.TARTIŞMA

Kadın genital organlarının en yaygın patolojilerinden biri olan myoma uteri, uterusun en sık görülen tümörüdür. Kadınlarda en sık görülen tümör olmasına rağmen myomların etyolojisi bilinmemektedir. Normal myometrial dokunun myoma dönüşüm mekanizması ve myom hücrelerinin anormal gelişimini yöneten faktörler iyice anlaşılammıştır(3,4).Ancak günümüzde myometriyumun leiomyoma dönüşümünün normal myometriyumun somatik mutasyonları ve lokal büyüme faktörleri ile seks steroidlerinin karmaşık ilişkileri sonucunda geliştiği düşünülmektedir(5). Leiomyomlarda en yaygın eksprese olan angiogenik faktörler VEGF ve adrenomedullin'dir. Bunlar normal myometriyuma göre leiomyomlarda upregüle olmuşlardır.

Anjiyogenez, vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojik de olabilmektedir. Fizyolojik anjiyogenez; embriyogenez, yara iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde gözlenmektedir(66).Proanjiogenik ve anti anjiogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiogenez kontrol edilememektedir. İnflamatuvar hastalıklarda(artrit, kronik inflamasyon, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, psöriazis), çeşitli kanserlerde (meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, uterus, serviks, glioblastom) ve göz hastalıklarında (yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, proliferatif retinopati) anjiyogenez patolojik olarak ortaya çıkmaktadır. VEGF anjiyogenezde rol oynayan faktörlerden biridir. VEGF'nin post-natal damarlanma, yara iyileşmesi, kanser, romatoid artrit, retina da yeni damarlanma ve kalp-damar hastalıkları dahil olmak üzere çok sayıdaki patofizyolojik durumda önemli olduğu düşünülmektedir. VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak üç reseptörü ile gerçekleştirmektedir. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4) oluşturmaktadır. Bunlardan VEGF-R1 ve R2 endotel hücreleri üzerinde iken VEGF-R3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır(13,14,15). Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1) de VEGF salınımlında etkili rol oynamaktadır (103). Endotel hücreleri için migratuar özelliğinin yanı sıra VEGF; hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile urokinaz ve doku- tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımlını da uyarmakta böylelikle

invazyon ve metastazı da kolaylaştırmaktadır(105). Hipoksik tümör alanları ile VEGF gibi pro-anjiojenik sitokinler arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar genellikle kan damarlarından uzaktaki selüler alanlarda ve nekroze alanlardaki VEGF sinyallerinin ölçümüne dayanmakta ve VEGF sinyallerinin varlığı hipoksik olarak kabul edilmektedir. Hipoksi hücre ölümüne ve yüksek vaskülariteye yol açan patofizyoloji süreçlerinden sadece bir tanesidir. Yüksek vaskülariteli alanlarda damar içi oksijen yetersiz ise hipoksi gözlemlenmektedir. Son dönem hipoksi belirteçlerinin insana uygulanması güvenlidir ve bu da VEGF sinyalleri ve hipoksi arasındaki ilişkinin saptanmasını kolaylaştırmaktadır. Raleigh ve arkadaşlarının ayrıca Evans ve arkadaşlarının yaptığı pimanidazolün hipoksi markeri olarak kullanıldığı iki ayrı çalışmada insan sguamoz hücreli karsinomunda hipoksi ile VEGF m-RNA'sının düzenlendiği kanıtlanmıştır(143,144). Etyolojiye ışık tutması açısından leiomyom ve leiomyosarkom için de bu tip çalışmaların yapılmasının uygun olacağı kanısındayız.

Kadınlarda en sık görülen tümör olmasına rağmen etyolojisi ve büyümesinde etkili faktörleri tam anlayamayan leiomyomlarda; biz de VEGF(Resim 2-a) ve VEGF-R'nin (Resim 2-b) rolünü araştırdık. Hem myom boyutu hem de normal myometriuma(Resim 1-a/b) göre leiomyomlarda VEGF ve VEGF-R immunohistokimyasal boyanması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit etmedik. Çok sayıda büyüme faktörünün değerlendirildiği Dixon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada transforming growth factor alpha(TGF-alfa), epidermal growth factor(EGF), insülinlike growth factor(IGF-I), vascular endotelial growth factor(VEGF165,189,121), basic Fibroblast growth factor(FGF-2), EGF receptor(R), IGF-IRbeta ve FGF-R1'in; 42-47 yaş aralığında menstrüel siklusun proliferasyon fazında bulunan 7 kadında leiomyom ve ona komşu normal myometriumda düz kas hücre stoplazmasında immunolokalizasyonları değerlendirilmiştir. Büyüme faktörlerinin leiomyom ve komşu myometriumda farklı şekilde salgılandığı, bununla birlikte diğer büyüme faktörlerinde istatistiksel anlamlı fark olmamasına rağmen IGF-IRbeta ve IGF-I 'nin leiomyomlarda menstrüel siklusun proliferasyon fazında komşu myometriuma göre daha fazla eksprese olduğunu bununda tümör büyümesinde önemli neden olduğunu öne sürmüşlerdir. Yine bu çalışmada EGF'in myomlarda komşu

myometriuma göre daha az eksprese olduğu bulunmuş ve bu da EGF'nin progesteron etkisiyle regüle edilmesine bağlanmıştır(145). Yine Harrison ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada VEGF messengerRNA (mRNA) ve VEGF peptid normal myometrium ve leiomyomda incelenmiş, normal myometriumda VEGF-mRNA'nın siklusun sekretuar fazında proliferatif faza göre daha fazla eksprese olduğu saptanmış ancak leiomyom ve normal myometrium arasında VEGF-mRNA immunohistokimyasal boyanması açısından anlamlı fark saptanmamıştır.(146) . Yukarıdaki bulgularla ve bizim bulgularımızla çelişen bir başka çalışmada da 36 premenapozal kadında leiomyom ve komşu myometrium dokusunda VEGF-A ekspresyonu incelenmiş, 36 leiomyom vakasının yarısına operasyon öncesi gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) uygulanmıştır. Tedavi alan ve almayan grupta VEGF-A ekspresyonu açısından anlamlı fark bulunmamış ancak leiomyom dokusunda normal myometriuma göre VEGF-A ekspresyonu daha yüksek bulunmuştur. Gentry ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada leiomyom ve normal myometrium arasındaki VEGF-A ekspresyonu farkının tümör büyümesindeki lokal anjiogenezis'in önemli rol oynadığını gösterdiğini öne sürmüşlerdir.(147) Ayrıca yine bu çalışmada endojen östrojen üretimini azaltan GnRHa down regülasyonu leiomyomadaki VEGF ekspresyonunu etkilemediğinden dolayı; VEGF'in leiomyom üzerindeki etkisinin östrojenden bağımsız olduğu sonucuna varılmıştır. Leiomyomda menstrüel siklusun proliferatif ve luteal fazında VEGF-A ekspresyonunda fark olmaması da leiomyom büyümesinde östrojenden bağımsız alternatif bir yol olduğunu düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda, myomlardaki östrojen reseptörlerinin konsantrasyonu, bitişindeki normal myometrium kadar ya da ondan hafifçe yüksek olarak saptanmaktadır. Progesteron reseptörlerinin konsantrasyonu ise normal myometriuma göre daha düşük gözlenmektedir. Östrojen ve progesteron reseptörlerinin relatif konsantrasyonu belirgin olarak myomların büyümesini etkilemektedir(5) Östrojenlerin leiomyomlar üzerindeki etkilerini epidermel

growth faktör(EGF) aracılığıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Hücre kültürlerinde progesteron, hücre içindeki immünoreaktif EGF miktarını artırmakta, ayrıca östradiol ise hücrelerdeki EGF-reseptörü miktarını da artırmaktadır(progesteron bu etkiyi göstermez). EGF leiomyom büyümesini kontrol eden önemli bir lokal faktör olarak bildirilmektedir(92). Östrojen ve progestinlerin etkileri leiomyom gelişiminde birbirini tamamlayıcı gibi görünmektedir(93). Yapılan çalışmalarda büyüme faktörlerinin menstrüel siklusun sekretuar ve proliferatif fazlarında leiomyom ve normal myometriumda farklı şekilde etkili olduklarını göstermektedir. Çalışmamızın retrospektif olması ve bizim çalışmamızda hastaların yaş ortalaması leiomyom için  $47.51 \pm 8.44$  olup en düşük 30.00, en yüksek ise 75.00 olması, olağan myometrium dokusuna sahip olan hastaların ise yaş ortalamasının  $47.00 \pm 6.19$  olup en düşük 41.00, en yüksek ise 57.00 olması ve hastaların çoğunun postmenapoz yaş grubunda olması (Tablo 4) genel olarak perimenapozal kadınları kapsayan ve adet döneminin fazlarına göre VEGF ekspresyonunu ortaya koyan literatürdeki çalışmalarla olan farklılığı açıklayabilmektedir. VEGF ve VEGF-R' e karşı antikorlar birçok hayvan deneyinde kullanılmış ve umut vaad eden sonuçlar doğurmuştur. Bu yüzden, leiomyom tedavisinde anti VEGF kullanımının araştırılması gerektiğini düşünüyoruz. Benzer şekilde GnRH analogları ile de VEGF ekspresyonunda fark olmaması, angiostatin ve endostatin gibi antianjiogenik ilaçların da GnRH analoglarından bağımsız olarak leiomyomların tıbbi tedavisinde gelecekte bir rol oynayabileceğini göstermektedir.(148) Yine Folkman ve arkadaşlarının yayınladığı raporda hepatit tedavisi için anti-anjiogenik ajan olan interferon kullanılan bir kadında büyük uterus leiomyomunun %90 oranında küçüldüğü belirtilmiştir ve bu küçülme interferon tedavisinden 17 ay sonrasına kadar devam etmiştir(149). Bu sonuç da antianjiogenik ajanların, %0.1' den daha az oranda gözüken leiomyomun leiomyosarkoma dönüşümünü durduru ajan olarak kullanımının araştırılabileceğini düşündürmektedir.(150,151)

Myomlarda büyüme paterni ile serum VEGF165 düzeyinin incelendiği bir çalışmada, semptomatik leiomyom nedeniyle histerektomi uygulanmış 80 kadının histerektomiden 6 saat önce ve 48 saat sonraki serum VEGF165 düzeyleri ELİSA ile ölçülüp myomlar boyut açısından histerektomi materyalinin ağırlığı ölçülerek gruplandırılmıştır. Histerektomi sonrası serum VEGF düzeyleri histerektomi öncesine göre anlamlı olarak düşük bulunmuş ancak myom boyutu ile serum VEGF arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Bu da leiomyom boyutunun VEGF serum düzeyi ile ilişkili olmadığını göstermektedir(152). Zhang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da büyük uterin myomlarda biyolojik aktivite araştırılmış, büyük leiomyom(10 cm. üstü), küçük leiomyom(10 cm. altı) ve komşu myometrium dokusunda histokimyasal analiz ile seçilmiş gen ürünleri, damar dansitesi ve hyalin dejenerasyon oranı incelenmiştir. Çalışmada büyük myomlarda küresel bölgesel farklılık olduğu ve periferik bölgenin biyolojik olarak en aktif bölge olduğu, damar dansite ve büyüme hızının daha yüksek hyalin dejenerasyonun ise daha az olduğu, merkezin ise zıt etki gösterdiği saptanmış ve büyük uterin leiomyomların beslenmeye bağlı büyüme paterni gösterdiği bulunmuştur(153). Bizim çalışmamızda da büyük(10 cm üstü) ve küçük(10 cm altı) myomlarda VEGF ve VEGF-R immunohistokimyasal boyanması açısından anlamlı fark saptanmamıştır ve bu da myom büyümesinde tek başına anjiogenezisin etkili olmadığını düşündürmektedir.

Leiomyosarkomlar uterin malignansilerin %1-3' ünü ve uterin sarkomaların 1/3' ünü temsil etmektedir. Uterusun yaklaşık her 800 düz kas tümöründen birisi leiomyosarkomdur(6). Leiomyom ve leiomyosarkomlarda anjiogenik ve apoptotik faktör ekspresyonunun araştırıldığı Hong ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 30 leiomyosarkom ve 21 leiomyom olgusu ele alınmış, anjiogenik faktör olarak vasküler endothelial growth factor(VEGF), platelet-derived endothelial cell growth factor(PD-ECGF), transforming growth factor-alpha(TGF-alpha) ve basic fibroblast growth factor(bFGF) , intratümöral mikrodamar dansitesi(IMVD) ve apoptotik faktör olarak da p53, Bcl-2 ve Bax 30 immunohistokimyasal analiz ile incelenmiştir. Bu çalışmada VEGF, PD-ECGF(p=0.041) ve TGF-alpha, bFGF, IMVD(p=0.012) immunohistokimyasal ekspresyonu leiomyomlarda leiomyosarkomlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte p53 gen ekspresyonu leiomyosarkomda %47 oranında pozitif olarak gösterilmiş ve Bcl-2/Bax oranının da leiomyosarkomda leiomyomlara göre anlamlı olarak fazla olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak VEGF, PD-

ECGF ve TGF-alpha gibi anjiogenik faktörlerin leiomyosarkomda tümör anjiogenezisinde rol oynadığı ve yüksek Bcl-2/Bax oranının ve özellikle de p53 gen mutasyonunun leiomyosarkom tedavisindeki rezistansa sebep olan mekanizma olabileceği bildirilmiştir(154)

Son zamanlara kadar, VEGF nin tümör biyolojisindeki yerini belirtmeye çalışan araştırmalar ilk önce VEGF nin angiogenezisine sebep olduğu üzerinde yoğunlaşmıştır. Fakat, VEGF reseptörleri, flt-1(VEGF-R1) ve flk-1(VEGF-R2), sadece endothelial damar hücrelerinde değil aynı zamanda akciğeri, yumurtalıkları (overian) göğüs ve prostatı içeren birçok karsinomun hastalıklı epitelial hücrelerinde de gösterilmiştir. VEGF'in tümör hücrelerini otokrin mekanizma ile direkt olarak etkilediği düşünülmektedir . 2005 yılında yapılan bir çalışma da VEGF otokrin sinyal ilişkisinin varlığı belirtilerek ilk defa flt-1 ve flk-1 uterin sarkom ifadeleri kullanılmıştır. Bu çalışmada 26-67 yaş aralığında 4'ü endometrial stromal sarkom(ESS), 9'u homolog, 5'i heterolog karsinosarkom ve 21'i leiomyosarkom olmak üzere toplam 39 uterin sarkomlu hasta alınmış ve bunlar normal myometrium ile karşılaştırılmıştır. VEGF , flt-1(VEGF-R1) ve flk-1(VEGF-R2) ile immunohistokimyasal boyama yapılmış, tüm sarkom gruplarında normal myometriuma kıyasla VEGF,flt-1 ve flk-1 açısından istatistiksel olarak anlamlı boyanma elde edilmiştir (155). Bizim çalışmamızda da istatistiksel olarak anlamlı olmasa da her iki leiomyosarkom vakasında da VEGF-R1 boyanması gösterilmiştir. Endotelial hücreler ve son zamanlarda in vitro da büyüyen belirli tümör hücreleri için büyütücü bir faktör olarak VEGF'in rol oynadığı bildirilmektedir. VEGF'in tümör hücrelerindeki ayrıntılı mekanizması henüz açıklanamamakla birlikte, antiapoptotic proteinlerin sentezine sebep olarak ve daha genel olarak endotelial hücrelerde araştırılmış olduğu gibi apoptozisleri engelleyerek tümör büyümesinde etki gösterdiği düşünülmektedir.

Uterus leiomyosarkomunun tedavisi için kemoterapi ajanları denenmesine rağmen kemoterapiye verilen karşılık oranı 30% un altında olmaktadır(156-158). Yeni kavramlara dayanarak, bazı yeni anti-kanser ilaçlar son on yıl içerisinde geliştirilmiştir. Bunlar geniş sistemik hasar olmaksızın tümörlerin daha kesin odaklı terapisine izin verecek, genetik olarak özel molekülleri hedef almaktadır. Bazı çalışmalar da VEGF-R ve farelerdeki çözülebilir alıcılara karşı monoklonal antikorun tedavi edici uygulamasını bildirmektedir(159,161).

Sonuç olarak, p-flt-1 in immunoreaktivitesinin, VEGF'den bağımsız olarak uterus

sarkomlarında ki prognozla önemli şekilde ilgili olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda da leiomyosarkom vakalarımız VEGF-R1(flt-1) immunohistokimyasal boyası ile hafif boyanma göstermiştir(Resim 3-b). Ancak vaka sayımız yetersiz olduğu için leiomyosarkomda VEGF ve VEGF-R1 varlığını göstermiş olmak dışında bir sonuca varamadık. Şu ana kadar uterus sarkomlarında ki standart kemoterapi sınırlı değere sahip olduğundan, uterin sarkomlarda VEGF ve VEGF-R gibi biyolojik faktörlerin daha geniş çaplı araştırmalarla ortaya konması, yeni tedavilerin gelişmesi için çok önemlidir ve bu leiomyosarkom tedavisinde yeni bir umut olabilir.

## 6.SONUÇLAR

1.Çalışmamız gerek leiomyom gerekse leiomyosarkomda VEGF ve VEGF-R varlığını hücre stoplazmasında göstermiştir. Son yıllarda kanser tedavisi için yapılan araştırmalarda tümör çoğalması ve metastazının mekanizmalarının anlaşılması için uğraşmakta ve bu mekanizmaları hedef alan tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Antianjiyotik tedavi de bu görüşle ortaya atılmış, gerek tek başlarına gerekse konvansiyonel tedavilere ek olarak kullanılmaya başlanmış ve yan etkilerinin klasik ilaçlara göre az olmasıyla kanser tedavisinde önemli bir yer bulmuştur. Günümüzde yeni ve daha etkili ajanların kullanıma girmesiyle kanser tedavisinde önemli adımlar atılmış olacaktır Ancak bunun için daha geniş çapta çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.Leiomyom ve normal myometriyumun VEGF ve VEGF-R açısından immunohistokimyasal boyanmasında VEGF ve VEGF-R varlığını göstermiş olsak da istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edemedik. Yapılan çalışmalar da büyüme faktörlerinin menstrüel siklusun sekretuar ve proliferatif fazlarında leiomyom ve normal myometriyumda farklı şekilde etkili olduklarını göstermektedir. Çalışmamız retrospektif olduğundan ve menstrüel sıklusa göre değerlendirme yapılamadığından anlamlı sonuç elde edememiş olabiliriz.

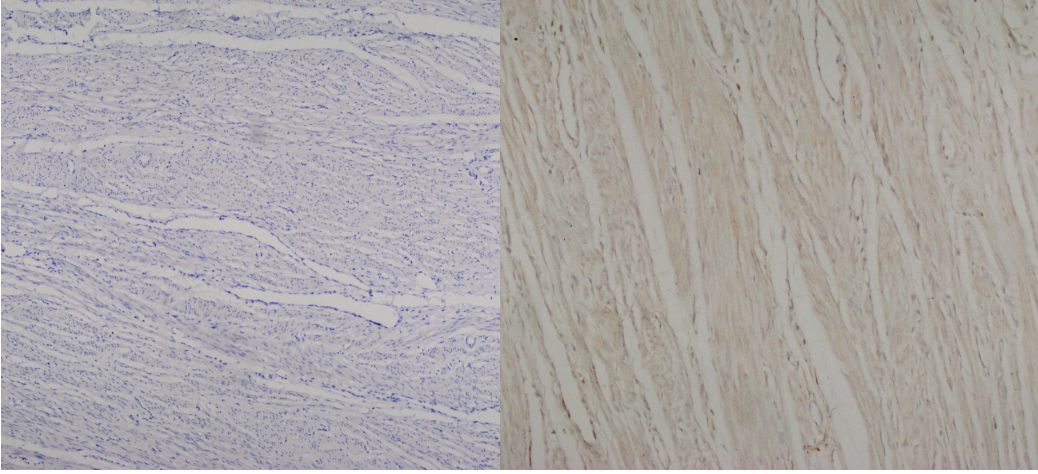
3.Myom boyutu ile VEGF ve VEGF-R ilişkisinin de araştırıldığı çalışmamızda boyut ile VEGF ve VEGF-R immunohistokimyasal boyanmasında anlamlı fark bulamadık, bu da literatür ile uyumlu görünmektedir ve leiomyom büyümesinde tek başına VEGF'in etkili olmadığını düşündürmektedir. Ancak hepatit tedavisinde anti-anjiyotik ilaç olan interferonla yapılan tedavide hastanın leiomyom boyutunda anlamlı küçülme olması da leiomyom büyümesinde farklı anjiyotik ajanların araştırılması gerektiğini düşündürmektedir. Böylece belki de gelecekte cerrahiye uygun olmayan hastalarda anti-anjiyotik ilaçlar tedavide kullanılabilir.

4. Yapılan tüm çalışmalar ve bizim çalışmamız myom oluşumu ve büyümesinde tek bir

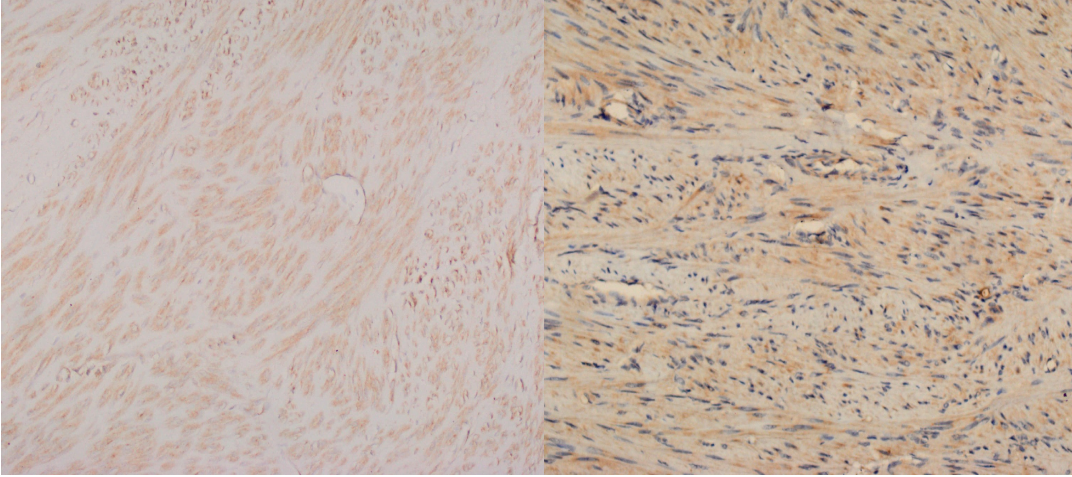


faktörün etkili olmadığını, myometriyumun leiomyoma dönüşümünün normal myometriyumun somatik mutasyonları ve lokal büyüme faktörleri ile seks steroidlerinin karmaşık ilişkileri sonucunda geliştiğini göstermektedir.

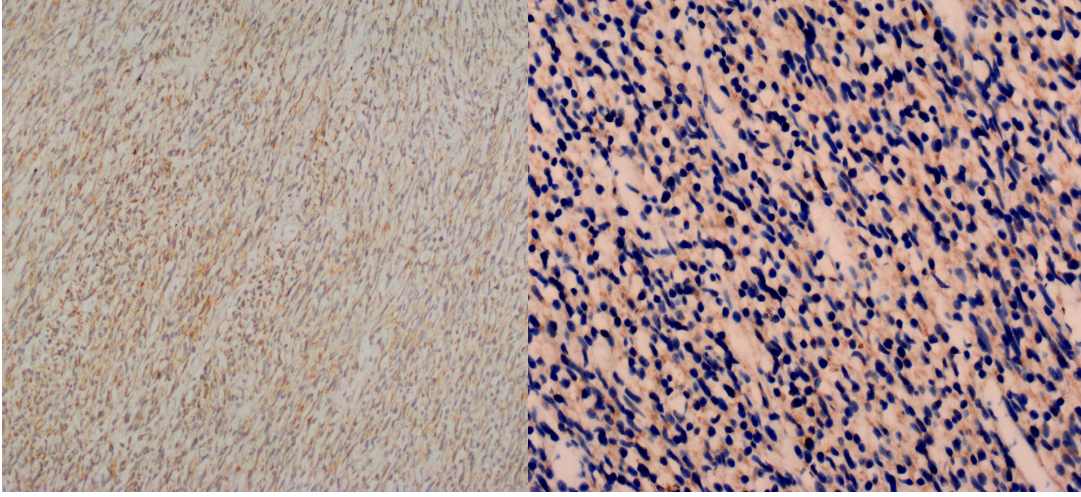
## 7.RESİMLER



Resim 1-a(sol) Normal myometrium VEGF immunohistokimyasal boyanması (HE,x200) 1-b(sağ) Normal myometrium VEGF-R immunohistokimyasal boyanması (x200)



Resim 2-a(sol) Leiomyomda VEGF immunohistokimyasal boyanması(HEx200) 1-b(sağ) Leiomyomda VEGF-R immunohistokimyasal boyanması(x200)



Resim 3-a(sol) Leiomyosarkomda VEGF immunohistokimyasal boyanması  
(HE,x200) 3-b(sağ) Leiomyosarkomda VEGF-R immunohistokimyasal boyanması(x200)

## 8.KAYNAKLAR

1. Novak, ER., Woodrooff, JD.: Novak's Gynecologic and Obstetric Pathology. W.B.Saunders Comp., Philedelphia, 1974
2. Morton, GD.: Myoma of the Uterus. Gynecology and Obstetrics, volum 11 Ch.12. 1966
3. Torpin r, Pound E, Peeples WJ. The etiologic and pathologic factors in a series of 1741 fibromyomas of the uterus. Am J Obstet Gynecol. 1942;44:569-74
4. Rubenstein AH, Seftel HC, Miller K, Berson I, Wright AD. Metabolic response to oral glucose in healthy South African White, Indian and African subjects. Br. Med. J. 1969;1:748-51
5. Farber, M., Conrad, S., Heinrichs, F.L., Harrmann, L.L.: 'Estradiol binding by fibroid tumors and normal myometrium' in Obstet Gynecol, 40:479, 1972
6. Leibsohn S, d' Ablain G, Mischen DR Jr, Schlaerth JR Leiomyosarcoma in a series of hysterectomies performed for presumed uterine leiomyomas Am J Obstet Gynecol 1990; 162:968-974
7. Dinh TV, Woodruff JD. Leiomyosarcoma of the uterus. Am J Obstet Gynecol 1982;144:817.
8. Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. J Neurosci. 1995; 15: 4738-4747.
9. Zachary I, Mathur A, Yla-Herttuala S, Martin J. Vascular protection: A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; 20: 1512- 1520.
10. Servos S, Zachary I, Martin JF. VEGF modulates NO production: The basis of a cytoprotective effect? Cardiovasc Res. 1999; 41: 509-510.

11. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor- 1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 181: 902- 906.

12.Turhan MS. Meme tümörlü hastalarda vaskuler endotelial büyüme faktörü, nitrik oksit ve ürokinaz plazminojen aktivator. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıpta Uzmanlık tezi, 2004.

13. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001; 7: 186-91.

14.Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis.

15. Kliche S, Waltenberger J. VEGF receptor signaling and endothelial function. *JUBMB Life* 2001; 52(1-2): 61-6.

16. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-39.

17. Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol Ther* 1994;63:265-311.

18.Cremer SF, Patel A.The Frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol* 1990;94:435-438

19.Downes KA, Hart WR.Bizarre leiomyomas of the uterus: a comprehensive pathologic study of 24 cases with long- term follow up. *Am J Surg Pathol* 1997;21(11)1261-1270

20.Cho KR, Woodruff JD, Epstein JJ. Leiomyoma of the uterus with multiple extrauterine smooth muscle tumors: a case report suggesting multifocal origin. *Hum Pathol* 1989;20:80-83

21.Cramer SF, Horiszny J, Patel A, Sigrist S. The relation of fibrous degeneration to menopausal status in small uterine leiomyomas with evidence for postmenopausal origin of seedling myomas. *Mod Pathol* 1996;9:774-7811.

22.Rader JS, Binette SP, Brandt TD, Sreekanth S, and Chhablani A. Ileal hemorrhage caused by a parasitic uterine leiomyoma. *Obstet Gynecol* 76:531-534,1990.

- 23.Howard, W.J., Georgeanna,S.J.:‘Uterus Myomu’ in Novaks’s gynecology, Menteş Kitabevi, İstanbul, s.527, 1985
- 24.Hendrikson MR, and Kempson RL. A diagnostic approach to smooth muscle tumors of the uterus.Current Diagnostic Pathology 6.21-30,2000.
- 25.Martin-Reay D, Christ M, La Pata R. Uterine leiomyoma with skeletal muscle differentiation. Repor of a case. Am J Clin Pathol 1991;96(3):334-347.
- 26.Mazur MT, Kraus FT. Histogenesis of morphologic variations in tumors of the uterine wall. Am J Surg Pathol 1980;4:59-74
- 27.Nogales FF, Matilla A, Carrascal E. Leiomyomatosis peritonealis disseminata : an ultrastructural study. Am J Clin Pathol 1978;69:452-45
- 28.Norris HJ, Hilliard GD, Ireys NS. Hemorrhagic cellular leiomyomas (‘apoplectic leiomyoma’) of the uterus associated with pregnancy and oral contraceptives. Int J Gynecol Pathol 1988;7:212-224
- 29.Fekete PS, Vellios F: The clinical and histologic spectrum of endometrial stromal neoplasms: a report of 41 cases . Int J Gynecol Pathol 1984;3:198-212
- 30.Hyde KE, Geisinger KR, Marshall RB, Jones TL. The clear-cell variant of uterine epithelioid leiomyoma. An immunohistologic and ultrastructural study, Arc Pathol Lab Med1989;113:551-553 126
- 31.Maluf HM, Gersell DJ.Uterine leiomyomas with high content of mast cells. Arc Pathol Lab Med 1994;118:712-714
- 32.Ross RK, Pike MC, Vessey MP, Yeates D, Casagrande JT. Risk factors for uterine fibroids: reduced risk associated with oral contraceptives. Br.Med. J. 1986;293:359-62
- 33.John AH, Martin R. Growth of leiomyomata with estrogen –progesterone terapy.J. Reprod. Mod. 1971;6:56-8
- 34.Elizabeth A. Steward. Uterine fibroids. Lancet 2001;357:293-98.
- 35.Jonas HS, Masterson BJ.Giant uterine tumors. Case report and review of the literature. Obstet. Gynecol . 1977;50(Suppl1):2.
- 36.Wallah EE, Vu KK.Myoma uteri and infertility. Obstet Gynecol. Clin. N. Am. 22:791-99.

37. Ubaldi F, Tournaye H, Camus M, Van Der Pas H, Gepts E, Devroey P. Fertility after hysteroscopic myomectomy. *Hum Reprod Update* 1995;1:81-90
38. Li TC, Mortimer R, Cooke ID. Myomectomy: a retrospective study to examine reproductive performance before and after surgery. *Hum Reprod*. 1999;14:1735-4027.
39. Steven H. Eisinger, Sean Meldrum, Kevin Fiscella, Helen D. Le Raux, David S. Guzick. Low-dose mifepristone for uterine leiomyomata. *Obstetrics & Gynecology*. 2003;101(2):243-250
40. Vardi JR, Tove HMM. Leiomyosarcoma of the uterus: clinicopathologic study. *Obstet Gynecol* 1980;56:428-434.
41. Bradley LD, Falcone T, Magen AB. Radiographic imaging techniques for the diagnosis of abnormal uterine bleeding. *Obstet Gynecol Clin in North Am* 2000;27(2):245-276.
42. Darby AL, Papadaki L, Beilby JOW. An unusual leiomyosarcoma of the uterus containing osteoclast-like giant cells. *Cancer (Phila)* 1975;36:465-504.
43. Marshall RJ, Braye SG, Jones DB. Leiomyosarcoma of the uterus with giant cells resembling osteoclasts. *Int J Gynecol Pathol* 1986;5:260-268.
44. Abercrombie M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat Rec* 1946; 94: 239-247.
45. Atkins K, Beli S, Kempson R, Hendrickson M. Myxoid smooth muscle neoplasms of the uterus. *Mod Pathol* 2001;14(1):132A.
46. Chen KT. Myxoid leiomyosarcoma of the uterus. *Int J Gynecol Pathol* 1984;3:389-392 78.
47. King ME, Diekersin GR, Scully RE (1982) Myeloid leiomyosarcoma of the uterus: a report of six cases. *A J Surg Pathol* 1982;6:589-598.
48. Atkins K, Beli S, Kempson R, Hendrickson M. Epithelioid smooth muscle neoplasms of the uterus. *Mod Pathol* 2001;14(1) 132A
49. Kurman RJ, Norris HJ. Mesenchymal tumors of the uterus. VI. Epithelioid smooth muscle tumors including leiomyoblastoma and clear cell leiomyoma: a clinical and pathological analysis of 26 cases. *Cancer (Phila)* 1976;37:1853-1865
50. Clement PB. The pathology of uterine smooth muscle tumors and mixed

endometrial stromal-smooth muscle tumors: a selective review with emphasis on recent advances. *Int J Gynecol Pathol* 2000;19(1):39-55.

51. Karpuz Y, Joris F, Letovanec N, Branchmanski F, Kapanci Y. Metastizing low-grade clear cell leiomyosarcoma of the uterus. *Pathol Int* 1998;48(1):82-85.

52. Oliva E, Nielsen PG, Young RH, Scully RE. Epithelioid smooth muscle tumors of the uterus: a clinicopathologic study of 80 cases. *Mod pathol* 1997;10:107A

53. Taylor HB, Norris HJ. Mesenchymal tumors of the uterus. IV. Diagnosis and prognosis of leiomyosarcoma. *Arch Pathol* 1966;82:40.

54. Gudgeon DH. Leiomyosarcoma of the uterus. *Obstet Gynecol* 1968;32:96.

55. Zaloudek CJ, Norris HJ. Mesenchymal tumors of the uterus. in Kurman RJ (ed) *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, 4th edition. New York: Springer-Verlag, 1994;487-528.

56. Corscaden JA, Singh BP. Leiomyosarcoma of the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1959;77:286.

57. Gross KL, Morton CC. Genetics and the development of fibroids. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44:335-49.

58. Norris HJ, Parmley T. Mesenchymal tumors of the uterus. V. Intravenous leiomyomatosis: a clinical and pathologic study of 14 cases. *Cancer* 1975;36:2164-78.

59. Scharfenberg JC, Geary WL. Intravenous leiomyomatosis. *Obstet Gynecol* 1974;43:909-14.

60. Evans AT III, Symmonds RE, Gaffey TA. Recurrent pelvic intravenous leiomyomatosis. *Obstet Gynecol* 1981;57:260-4

61. Abell MR, Littler ER. Benign metastasizing; uterine leiomyoma: multiple lymph node metastases. *Cancer* 1975;36:2206-13.

62. Banner AS, Carrington CB, Emory WB, Kittle F, Leonard G, Ringus J, et al. Efficacy of oophorectomy in lymphangioliomyomatosis and benign metastasizing leiomyoma. *N Engl J Med* 1981;305:204-9.

63. Kurman RJ, Norris HJ. Mesenchymal tumors of the uterus. VI. Epithelioid smooth muscle tumors including leiomyoblastoma and clear cell leiomyoma. A clinical and pathologic analysis of 26 cases. *Cancer* 1976;37:1853-65.



64. Tavasso H FA, Norris HJ. Peritoneal leiomyomatosis (leiomyomatosis peritonealis disseminata): a clinicopathologic study of 20 cases with ultrastructural observations. *Am J Gynecol Pathol* 1982;1:59-74.
65. King ME, Dickersin GR, Scully RE. Myxoid leiomyosarcoma of the uterus. *Am J Surg Pathol* 1982;6:589-98.
66. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003; 9: 653- 660.
67. Issa R, Krupinski J, Bujny T, Kumar S, Kaluza J, Kumar P. Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke. *Lab Invest*. 1999; 9: 417-425.
68. Slevin M, West D, Kumar P, Rooney P, Kumar S. Hyaluronan, angiogenesis and malignant disease. *Int J Cancer*. 2004; 109: 793- 794.
69. Lutun A, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr Atheroscler Rep*. 2000; 2: 407- 416.
70. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 401- 410.
71. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*. 2000; 21: 505- 515.
72. Yin G, Liu W, An P, Li P, Ding I, Planelles V, Schwarz EM, Min W. Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis. *Mol Ther*. 2002; 5: 547- 554.
73. Folkman Y, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992; 267: 10931–10934.
74. Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: An overview. *EXS Regul Angiogenesis*. 1997; 79: 1–7.
75. Intaglietta M, Johnson PC, Winslow RM. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res*. 1996; 32: 632–643.
76. Lawrence WT, Diegelmann RF. Growth factors in wound healing. *Clin Dermatol*. 1994; 12:157-169.
77. Goodsell DS. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells*. 2003; 21: 118–119.

78. Brooks PC. Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer* .1996; 32A: 2423–2429.
79. Hu DE, Hori Y, Fan TP. Interleukin–8 stimulates angiogenesis in rats. *Inflammation*. 1993; 17: 135- 143.
80. Cleaver O, Melton DA Endothelial signalling during development. *Nat Med*. 2003; 9: 661- 668.
81. Allure R. Basement membranes: Structure, assembly and role in tumor angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 422- 433.
82. Haroon ZA, Peters KG, Greenberg CS, Dewhirst MW. Angiogenesis and Oxygen Transport in Solid Tumors. In: Totowa, New Jersey, Teicher BA (eds). *Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy*. 3- 21, Humana Press, 1999.
83. Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein*. 1996; 49: 117- 137.
84. Ausprunk DH and Folkman J. Migration and proiferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res*. 1977; 14: 53–65.
85. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: *Int J Cancer*. 1997; 72: 1-22.
86. Blasi F. uPA, uPAR, PAI- 1: Key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol Today*.1997; 18: 415- 417.
87. Stepanova VV, Tkachuk VA. Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator. *Biochemistry (Mosc)*. 2002; 67: 109- 118.
88. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9: 669- 676.
89. Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassalli JD. Angiogenesis: A paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein*. 1996; 49: 138–162.
90. Robert, SN.: 'Leiomyomas of the uterus' in Sciarra, Vol.1, Chap.14., Philadelphia, 1987, p.1.
91. Richard, FM., John, D.T.: 'Leiomyomata uteri' in *The Linde's Operative Gynecology*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1985, p.203.

92. Shimomura Y, Matsuo H, Samoto T, and Maruo T. Up-regulation by progesterone of proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor expression in human uterine leiomyoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:2192-2198,1998
93. Matsuo H, Kurachi O, Shimomura Y, Samoto T, and Maruo T. Molecular bases for the actions of ovarian sex steroids in the regulation of proliferation and apoptosis of human uterine leiomyoma. *Oncology* 57 Suppl 2:49-58,1999.
94. Andersen J, and Barbieri RL. Abnormal gene expression in uterine leiomyomas. *J Soc Gynecol Investig* 2:663-672.1995.
95. Ferrara N. VEGF: An update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11: 517-24.
96. Chavez NF, Stewart EA. Medical treatment of uterine fibroids. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44:372-84
97. Nowak RA. Fibroids: pathophysiology and current medical treatment. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 13:223-238.1999.
98. Gao Z, Matsuo H, Wang Y, Nakago S, and Maruo T. Up-regulation by IGF-1 of proliferating cell nuclear antigen and Bcl-2 protein expression in human uterine leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5593-5599,2001.
99. Meyer R. 'Die pathologische Anatomie der Gebärmutter', in *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, edited by F. Henke and O. Lubarsch, Vol., 7, Part 1, Julius Springer, Berlin, 1930
100. Laka KP, Chakraborty C. Role of Nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *Lancet Oncol* 2001; 2: 149-55
101. Noiri E, Lee E, Testa J et al. Podokinesis in endothelial cell migration: Role of nitric oxide. *Am J Physiol* 1998; 43: 236-44.
102. Ria R, Roccaro AM, Merchionne F et al. Vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma. *Leukemia* 2003; 17: 1961-1966.
103. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M et al. Anti-angiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002; 5: 237-256.
104. Bates DO, Hillman NJ, Williams B et al. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* 2002; 200: 587-597.

105. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrin Rev* 1997; 18: 4-25.
106. Coman DR, Sheldon WF. The significance of hyperemia around tumor implants. *Am J Pathol* 1946;22:821-831.
107. Ide AG, Baker NH, Warren SL. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentgenol* 1939;42:891-899.
108. Algire GH, Chalkely HW, Legallais FY, Park H. Vascular reactions of normal and malignant tumors in vivo: I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *JNCI* 1945;6:73-85.
109. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-1186.
110. Folkman J. The vascularisation of tumors. *Sci Am* 1976;234:5873.
111. Folkman J. Angiogenesis. In: *Biology of endothelial cells*. Ed. EA Jaffe. Boston: Nijhoff, 1984, pp 412-428.
112. Guidi AJ, Fischer L, Harris JR, Schnitt SJ. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. *JNCI* 1994;86:614-619.
113. Pepper MS, Montesano R. Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Differ Dev* 1990;32:319-328.
114. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Med* 1995;1:149-153.
115. Nicoisa RF, Tchao R, Leighton J. Interactions between newly formed endothelial channels and carcinoma cells in plasma clot culture. *Clin Exp Metastasis* 1986;4:91-104.
116. Folkman J. Tumor angiogenesis. In *Cancer: A Comprehensive Treatise*, vol 3. Ed. FF Becker. New York: Plenum Press, 1975, pp 355-388.
117. Folkman J, Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med* 1973;138:745-753.

118. Hamada J, Cavanaugh PG, Lotan O, Nicolson GL. Seperable growth and migration factors for large-cell lymphoma cells secreted by microvascular endothelial cells derived from target organs for metastasis. *Br J Cancer* 1992;66:349-354.
119. Folkman J. Tumor angiogenesis. In *The Molecular Basis of cancer*. Edited by Mendelsohn, PM Howley, MA Israel, LA Liotta. Philadelphia: Saunders, 995, pp 206-232.
120. Weidner N, Semole JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive breast carcinoma. *N Engl JMed* 1991;324:1-8.
121. Weinstat-Saslow D, Steeg PS. Angiogenesis and colonisation in the tumor metastatic process: basic and applied advances. *FASEB J* 1994;8:401-407.
122. Nicolson GL. Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at spesific secondary sites. *Cancer Metastasis Rev* 1988;7:143-188.
123. Liotta LA, Saidel MG, Kleinerman J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res* 1976;36:889-894.
124. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. Different angiogenic pathways chracterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res* 1995;55:510-513.
125. Rein MS, Barbieri RL, Friedman AJ. Progesterone : a critical role in the pathogenesis of uterine myomas (Review) *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1995.Jan;172(1 Pt 1):14-8
126. Brem H, Goto F, Budson A, Saunders L, Folkman J. Minimal drug resistance after prolonged antiangiogenic therapy with AGM-1470. *Surg Forum* 1994;45:674-677.
127. Teicher BA, Sotomayor EA, Huang ZD. Antiangiogenic agents potentiate cytotoxic cancer therapies against primary and metastatic disease. *Cancer Res* 1992;52:6207-6204.
128. Teicher BA, Holden SA, Ara G. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. *IntJ Cancer* 1994;57:920-925.
129. Jung YD, Mansfield PF, Akagi M et al. Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in nude mice model. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1133-40.

130.Kim ES, Serur A, Huang J et al. Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:11399-11404.

131.Margolin K, Gordon MS, Talpaz M et al. Phase 1b trial of intravenous recombinant human monoclonal antibody (Mab) to vascular endothelial growth factor (rhuMab VEGF) in combination with chemotherapy (CHrX) in patients with advanced cancer (CA): pharmacologic and long-term safety data. *Proc ASCO* 1999; 18:435a (abstrac 1678).

132.Hurwitz H, Fehrenbacher L, Cartwright T et al. Bevacizumab (a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) prolongs survival in first-line colorectal cancer (CRC): results of phase III trial of bevacizumab in combination with bolus IFL (irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin) as first line therapy in subjects with metastatic CRC. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003.

133.Dupont J, Camastra D, Gordon M et al. A phase I study of VEGF trap in patients with solid tumors and lymphoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22: 194 (abstrac 776).

134.Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237:1 -30.

135.Fong TA, Shawver LK, Sun L et al. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 1999; 59(1):99-106.

136.Kuenen BC, Rosen L, Smit EF, et al. Dose-finding and pharmacokinetic study of cisplatin, gemcitabine, and SU5416 in patients with solid tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20(6):1657-67.

137.Herbst RS, Hidalgo M, Pierson AS et al. Angiogenesis inhibitors in clinical development for lung cancer. *Semin Oncol* 2002; 29 (1 Suppl.4):66-77.

138.Rosen L, Rosen P, Kabbinavar F et al. Phase I experience with SU6668, a novel multiple receptor tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced malignancies. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20:97a.

139.Mendel D, Laird A, Xin X et al. Development of a preclinical pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship for the angiogenesis inhibitor SU11248,

a selective inhibitor of VEGF and PDGF receptor tyrosine kinases in clinical development. Proc Am Soc Clin Oncol 2002; 21.

140.Trarbach T, Shleucher N, Riedel U et al. Phase I/II study of the oral vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor inhibitor PTK787/ ZK222854 in combination with irinotecan/5-fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer. Proc Am Soc Clin Oncol 2003; 22:285.

141.Minami H, Ebi H, Tahara M et al. A phase I study an oral VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor ZD6474 in Japanese patients with solid tumors. Proc Am Soc Clin Oncol 2003; 22: 194.

142.Tolcher AW, O'Leary, J, DeBono, JS et al. A phase I and biologic correlative study of an oral endothelial vascular growth factor receptor-2 (VEGFR-2) tyrosine kinase inhibitor, CP-547,632 in patients with advanced solid tumors. Proc ASCO 2002; 21: 84.

143.Raleigh JA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, Ballenger CA, Weissler MC, Novotny DB and Varia MA.Hypoxia and vascular endothelial growth factor expression in human squamous cell carcinoma using pimonidazole as a hypoxia marker. Cancer Res 58,3765-3768

144.Evans SM, Hahn S, Pook DR, Jenkins WT, Chalian AA, Zhang P, Stevens C, Weber R, Benjamin I, Mirza M, Morgan M, Rubin S, McKenna WG, Lord EM and Koch JC(2000). Detection of hypoxia in human squamous cell carcinoma by EF5 binding. Cancer Res 60,2018-2024.

145.Dixon D, He H, Haseman JK. Immunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. Environ Health Perspect.2000 Oct;108 Suppl 5:795-802.

146.Harrison-Woolrych ML, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Smith SK. Localization and quantification of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid ,in human myometrium and leiomyomata.J Clin Endocrinol Metab. 1995 Jun;80(6):1853-8

147.Gentry CC, Okolo SO, Fong LF, Crow JC, Maclean AB, Perrett CW. Quantification of vascular endothelial growth factor-A in leiomyomas and adjacent myometrium. Clin Sci(Lond). 2001 Dec;101(6):691-5.

148. Sim, B.K., MacDonald, N.J. and Gubish, E.R. (2000) Angiostatin and endostatin: endogenous inhibitors of tumour growth. *Cancer Metastasis Rev.* 19, 181-190.
149. Folkman, J. (1996) Clinical applications of research on angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* 333, 1757-1763
150. Buttram, V.C. and Reiter, R.C. (1981) Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology and management. *Fertil. Steril.* 36, 433-445
151. Corscaden, J.A. and Singh, B.P. (1958) Leiomyosarcoma of the uterus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 75, 149-153
152. Chen DC, Liu JY, Wu GJ, Ku CH, Su HY, Chen CH. Serum vascular endothelial growth factor levels and uterine fibroid volume. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005 Apr; 84(4): 317-21.
153. Wei JJ, Zhang XM, Chiriboga L, Yee H, Perle MA, Mittal K. Spatial differences in biologic activity of large uterine leiomyomata. *Fertil Steril.* 2006 Jan; 85(1): 179-87.
154. Hong T, Shimada Y, Uchida S, Itami A, Li Z, Ding Y, Kaganoi J, Komoto I, Sakurai T, Imamura M. Expression of angiogenic factors and apoptotic factors in leiomyosarcoma and leiomyoma. *Int J Mol Med.* 2001 Aug; 8(2): 141-8.
155. Arita S, Kikkawa F, Kajiyama H, Shibata K, Kawai M, Mizuno K, Nagasaka T, Ino K, Nomura S. Prognostic importance of vascular endothelial growth factor and its receptors in the uterine sarcoma. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 329-336.
156. Edmonson JH, Blessing JA, Cosin JA, Miller DS, Cohn DE, Rotmensch J. Phase II study of mitomycin, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced uterine leiomyosarcoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2002; 85: 507-10.
157. Gallup DG, Blessing JA, Andersen W, Morgan MA. Evaluation of paclitaxel in previously treated leiomyosarcoma of the uterus: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 48-51.
158. Rose PG, Blessing JA, Soper IT, Barter JF. Prolonged oral etoposide in recurrent or advanced leiomyosarcoma of the uterus: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 1998; 70: 267-71
159. Toi M, Bando H, Ogawa T, Muta M, Hornig C, Weich HA. Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF) / soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. *Int J Cancer* 2002; 98: 14-8.



160.Hasumi Y, Mizukami H, Urabe M *et al.* Soluble FLT-1 expression suppresses carcinomatous ascites in nude mice bearing ovarian cancer. *Cancer Res* 2002;62:2019-23.

161.Brekken RA, Overholser JP, Stastny VA, Waltenberger J, Minna JD, Thorpe PE. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res* 2000;60:5117-24.