

ARAŞTIRMA

Serpil Paksoy¹
Özgül Sağol²

¹Balıkesir Atatürk Devlet Hastanesi Patoloji Kliniği, Balıkesir
²İzmir dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, İzmir

Yazışma Adresi:
Dr. Serpil Paksoy
Balıkesir Atatürk Devlet Hastanesi Patoloji Kliniği, Balıkesir
Email: serpilselinbaytekin@hotmail.com

Konuralp Tıp Dergisi
e-ISSN1309-3878
konuralptipdergi@duzce.edu.tr
konuralpgeneltip@gmail.com
www.konuralptipdergi.duzce.edu.tr

Pankreas Adenokarsinomunda Anjiogenetik Aktivite ve Cox-2 Ekspresyonunun Prognostik Önemi

ÖZET

Amaç: Çeşitli tümörlerde anjiogenez ve siklooksijenaz 2 (COX-2)'nin artmış ekspresyonu arasındaki ilişki çalışılmıştır. Bizim çalışmamızda pankreas duktal adenokarsinomunda COX-2 ekspresyonu ve mikrodamar dansitesinin birbirleri ile ve çeşitli klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada pankreas adenokarsinomu tanısı almış 61 olgu yer almaktadır. Olgulara ait kesitlere CD31 proteinine karşı geliştirilmiş primer poliklonal antikor ve COX-2 proteinine karşı geliştirilmiş primer poliklonal antikor kullanılarak, streptavidin-biotin-immunperoksidaz yöntemiyle boyama uygulandı. CD31 antikoruna ile işaretlenen mikrodamarlar Barth ve arkadaşlarının çalışmalarında tanımladıkları stereolojik yöntem ile sayısal olarak değerlendirildi. COX-2 ekspresyonu, mikrodamar yoğunluğu ve klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki değerlendirildi.

Bulgular: Olguların %73.8'inde COX-2 ekspresyonu gösterilmiştir. Çalışmamızda COX-2 reseptör boyanma oranları ve damar parametreleri ve standart prognostik parametrelerin sağ kalım ile ilişkisi saptanmamıştır.

Sonuç: Pankreas duktal adenokarsinom tanısı almış olgularımızın çoğunda COX-2 ekspresyonu izlense de COX-2 ile anjiogenez arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ve klinikopatolojik faktörler değerlendirildiğinde COX-2'nin aşırı ekspresyonunun prognoza etkisi olmadığı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Pankreas Duktal Adenokarsinom, COX2, CD31, Mikrodamar Dansitesi, VSD, NVES.

Angiogenetic Activity in Pancreatic Adenocarcinoma and Prognostic Significance of Cox-2 Expression

ABSTRACT

Objective: The relationship between angiogenesis and hyperexpression of COX-2 in various tumors has been studied. In our study, COX-2 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma, and micro vessel density was investigated in relation to each other and with various clinicopathological parameters.

Materials and Methods: There are sixty one cases diagnosed with pancreas adenocarcinoma in this study. Streptavidin-biotin immunoperoxidase staining technique was applied to sections belonging to the cases, using primary polyclonal antibody developed against the CD31 protein and primary polyclonal antibody developed against the COX-2 protein. Microvessels marked with CD31 antibodies were numerically evaluated by the stereological method described by Barth and his colleagues in their studies. The relationship between COX-2 expression, microvessel density and the clinicopathological parameters were also evaluated.

Evidence: COX-2 expression was shown in 73.8% of the cases. No correlation was detected between rates of COX-2 receptor staining, vessel parameters, standard prognostic parameters and survival.

Conclusion: Although COX-2 expression was tracked in most cases diagnosed with pancreatic ductal adenocarcinoma, no significant association was found between COX-2 and angiogenesis, and it was thought that hyperexpression of COX-2 doesn't have an impact on prognosis, considering the clinicopathological factors.

Keywords: Pancreas Ductal Adenocarcinoma, COX-2, CD31, Microvessel Density, VSD, NVES.

GİRİŞ

Diğer gastrointestinal sistem kanserlerinin aksine pankreas kanseri etiolojisi ile ilgili bilgiler yetersizdir. Pankreas karsinomlarının etyopatogenezinde sigara kullanımı, pankreatit, geçirilmiş gastrik cerrahi, allerjik hastalıklar, alkol, kahve ve çay tüketimi ile pankreas kanserine predispozisyon hazırlayan familial sendromlar öne sürülmektedir. Pankreas duktal adenokarsinomlarının %60-70'i glandın baş bölgesini, %10-15'i kuyruk kısmını, %10-15'i ise glandı diffüz olarak tutmaktadır. Tümörün yerleşim yeri, boyutu, derecesi, evresi, perinöral invazyon ve damar invazyonu, bu tümörlerde prognozu belirleyen faktörler arasındadır. Pankreas duktal adenokarsinomunun prognozu gelişmiş cerrahi tekniklere rağmen kötüdür. Cerrahi sonrası 1 yıllık yaşam %20 iken 5 yıllık yaşam oranı sadece %5'tir (1). Anjiogenez önceden var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Vaskülogenez ise embriyonik gelişim sırasında angioblastlar ya da hemangioblastlar gibi mezodermal prekürsörler tarafından gerçekleştirilen bir olaydır. Tümör anjiogenezi anjiogenez ve vaskülogenezin kombinasyonu olarak gerçekleşir. Birçok anjiogenetik faktör bildirilmiştir: Fibroblast büyüme faktörü (aFGF), Bazik FGF (bFGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) bunlardan bir kısmıdır. İnsan pankreatik karsinom hücrelerinde aFGF ve bFGF'nin aşırı ekspresyonu ve bunun kanser progresyonu ile ilişkisi gösterilmiştir (2-3). Anjiogenez tümör hücreleri tarafından sekrete edilen ve çok sayıda büyüme faktörü tarafından regüle edilir. Tümör büyümesinde ve metastazda kritik role sahiptir. İntratümör mikrodamar dansitesi (microvessel density-MVD) meme, kolon, mide ve mesane tümörlerinde anjiogenezi saptamada kullanılan belirleyicidir. İmmun doku-kimyasal (IHK) olarak MVD analizine ek olarak tümör spesimeninde anjiogenezi değerlendirmede FVIII-RA, CD31/PECAM ve CD34 gibi ekstrasellüler spesifik antikorlar kullanılır (4). Pankreas tümörleri genelde hipovasküler olmasına karşın kanserin büyüme ve gelişiminde anjiogenez kritik bir rol oynar. COX enzimi araşidonik asitten Prostaglandin H2 sentezinde hız sınırlayıcı adımı katalizleyen enzimdir. Bu enzimin iki izoformu tanımlanmıştır. COX-1 çoğu dokuda eksprese edilir. Ve doku homeostazında önemlidir. COX-2 çoğu hücre ve dokuda çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve tümör promotörleri tarafından stimüle edilen indüklenebilen formudur. Yapısal benzerliklerine karşın COX-1 ve COX-2'nin doku biyolojisi ve hastalıklarda farklı rollere sahip olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda hücre büyümesi, hücre ölümü, hücre motilitesi ve kanserde COX-2'nin rolü anlaşılabilmiştir (5). Spesifik olmayan COX inhibitörleri, non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİD), son zamanlarda

geliştirilen COX-2 spesifik inhibitörlerinin hem hayvan modellerinde hem de kanserli hastaların tedavisinde tümör progresyon ve insidansını azaltmadaki etkisi gösterilmiştir (6). COX-2'nin vücutta Prostaglandin üretimi hem normal hem de tümör hücrelerinde hücre proliferasyonunu ve büyümeyi arttırdığı bildirilmiştir (7). COX-2 tümör hücre büyümesini ilerleten diğer bir mekanizma olan apoptozun inhibisyonunda önemli bir role sahiptir (8). COX-2 inhibitörlerinin tümör hücre migrasyonunu, hücre adezyonunu ve tümör invazivliğini azalttığı in vivo ve in vitro deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. COX-2 tümör gelişiminin ve migrasyonun ileri evresinde tümör anjiogenezinde önemli bir yere sahiptir. COX-2 ekspresyonu VEGF üretimini belirgin olarak artırır ve bunu spesifik COX-2 inhibitör NS-398 bloke eder. Buna karşın spesifik olmayan ve spesifik COX-2 inhibitörleri anjiogenezi belirgin biçimde inhibe eder (9).

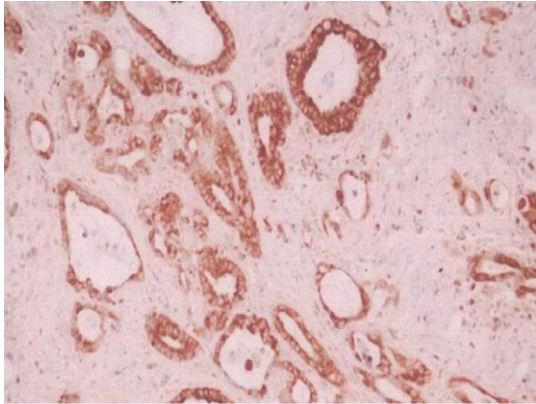
Biz bu çalışmada pankreas duktal adenokarsinomlarında COX-2 ekspresyonu ve mikrodamar dansitesinin birbirleriyle ve diğer klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini araştırdık.

YÖNTEM

Bu çalışmada 1994-2000 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda pankreas adenokarsinomu tanısı almış 61 olgu yer almaktadır. Tüm olgulara ait H/E boyalı arşiv preparatları yeniden gözden geçirilmiştir. Hastaların yaşı, cinsiyeti, tümör boyutu, lokalizasyonu, tümörün histolojik tipi, derecesi, lokal yayılımı, kan ve lenf damarı ve perinöral invazyonu ve lenf düğümü metastazına ait bilgiler elde edilmiştir. Tüm olgular TNM patolojik evrelemesine göre yeniden evrelendirildi. Sağ kalım verilerine klinisyen aracılığıyla ulaşılmıştır. Olgulara ait tümörü temsil eden uygun parafin bloklar seçilmiş ve IHK'sal boyama için lizinli lamlara 5 mikronluk kesitler hazırlanmıştır. Olgulara ait kesitlere CD31 (1:100, DAKO, Denmark) proteinine karşı geliştirilmiş primer antikor ve COX-2 (1:50, Novo Castra, UK, 4H12) proteinine karşı geliştirilmiş primer antikor kullanılarak streptavidin-biotin-immunperoksidaz yöntemiyle boyama uygulandı.

Kesitler ksilolde deparafinize edildi ve inen alkol serilerinden geçirilerek (%96, %90, %80, %70) geçirilerek rehidrate edildi. Daha sonra %3'lük H₂O₂, 5 dakika uygulanarak, endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. CD31 antikorunu uygulanacak kesitler mikrodalga fırında 15 dakika EDTA Buffer solüsyonunda, COX-2 uygulanacak kesitler Sitrat Buffer solüsyonunda (0.01 ml/l, pH=6) mikrodalga fırında 3 kez 5'er dakika kaynatıldı ve böylece antijenin açığa çıkması sağlandı. Kesitler 15-20 dakika süreyle oda ısısında soğumaya bırakıldı. Daha sonra kesitler üzerine CD31 ve COX-2 primer antikorları damlatılarak oda ısısında 30 dakika

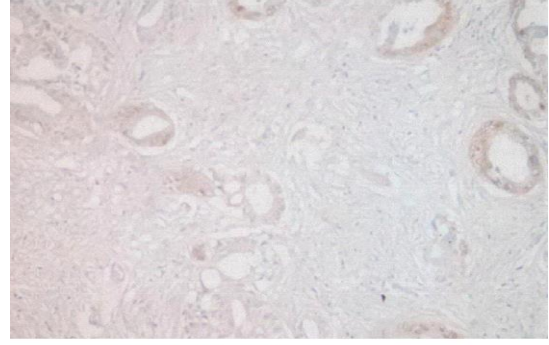
bekletildi. Tris solüsyonunda (pH=7.2) 5 dakika yıkandı. Biotinize antikordan damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. 5 dakika Tris solüsyonunda yıkandı. Streptavidin peroksidaz solüsyonu kesitler üzerine damlatılarak 10 dakika bekletildi. 5 dakika Tris solüsyonunda yıkandı. Kromojen olarak 3.3'-diaminobenzideteraklorür (DAKO, Denmark) solüsyonundan kesitler üzerine damlatıldı, kahverengi renklenme gözlenene dek bekledi sonra çeşme suyunda yıkandı. Tüm kesitler zıt boyanma sağlamak için Mayer'in hematoksilen boyasında 2 dakika bekletildi. Tekrar çeşme suyunda yıkandıktan sonra yükselen alkol serilerinden geçirilerek ksilolde 20 dakika bekletildi. Entellan damlatılarak lamelle kapatıldı. İHK'sal derecelendirme için tümör alanları seçilerek değerlendirildi. COX-2 proteini için sitoplazmik pozitif boyanmanın yoğunluğu ve dağılımı için 1'den 3'e kadar derece verildi. Buna göre zayıf boyanma derece 1, orta derecede boyanma 2, kuvvetli boyanma 3 olarak değerlendirildi. CD31 antikoruna ile işaretlenen mikro damarlar Barth ve arkadaşlarının çalışmalarında tanımladıkları stereolojik yöntem ile sayısal olarak değerlendirildi (10). Bu çalışmaya göre her olguda 10 tümör alanı içerisinde vasküler yüzey dansitesi (VSD) ve mikrodamar sayısı (NVES) stereolojik yöntemle değerlendirildi.



Resim 1: Duktal adenokarsinomda COX-2 ile şiddetli sitoplazmik boyanma (+++)



Resim 2: Duktal adenokarsinomda COX-2 ile orta şiddette sitoplazmik boyanma



Resim 3: Duktal adenokarsinomda COX-2 ile zayıf sitoplazmik boyanma (+)

Tüm stereolojik ölçümler bilgisayar ekranında mikroskoptan buna monte edilmiş bir CCD kamera ile görüntü aktararak 10'luk büyütmede uygulanmıştır. Bilgisayar ekranına görüntünün üzerine süperpoze olacak şekilde 11 horizontal, 1 vertikal çizgiden oluşan toplam 121 kesişim noktasının bulunduğu bir grid çizilmiş olan asetat monte edilmiştir. Bu ölçüm asetatın boyutu thoma lamı ile hesaplanmıştır: ($L_r=8.074$ mm). Ölçüm sırasında 10'luk büyütmede, grid çizgileri ile kesişen mikrodamarlar ve stromaya düşen çizgi kesişim noktalarının sayısı her olgu için 10 tümör alanında hesaplanarak aşağıdaki formüller ile VSD ve NVES hesaplanmıştır.

$$\text{Stroma volümü} = V_v(\text{STR}) = I(\text{STR})/121$$

($I(\text{STR})$)=pankreatik stroma üzerine denk gelen kesişim noktaları)

VSD birim doku hacmine düşen vasküler yüzeye eşittir. Avasküler olan dokunun epitelyal ve lümenal kompartmanları ve bu kompartmanların dokunun değişken miktardaki kısmını oluşturması nedeniyle dokunun stromal kompartmanındaki vasküler yüzey dansitesini 1 ve 2 no'lu denklemlerle hesaplanmıştır:

$$VSD = \sum I_n * 2/L_r * V_v(\text{STR})$$

Yöntemin aynı basamağında ölçülen grid alandaki damarlar (N) sayılmıştır ve stromada mm^2 ye düşen damar sayısı NVES formülüne göre hesaplanmıştır.

$$NVES = N/V_v(\text{STR})$$

İstatistiksel analizler SPSS (Scientific Package for Social Sciences) programında yapıldı. İHK'sal ve stereolojik ölçüm sonuçları ile prognostik parametreler arası ilişkiler Ki-kare, Student T testi, One-Way ANOVA testleri ile değerlendirilmiştir. Anlamlı ilişki gösteren parametrelerin arasındaki ilişki Spearman korelasyon ve Kendall Tau-b korelasyon testleri ile ortaya konmuştur. 0.005'ten küçük olasılık katsayıları istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ($p<0.005$). Parametrelerin hastaların yaşam sürelerine etkisi COX regresyon analizi ile test edilmiştir.

BULGULAR

Altmış bir olgumuzun 36'sı (%59.1) kadın, 25'i (%40.9) erkektir. Genel yaş ortalaması 62 (41-78) dir. Tümör boyutu 1 cm ile 13 cm (ortalama 4.3 cm, ortanca 4 cm, standart sapma 2.08 cm) arasında

değişmektedir. Tümör lokalizasyonu tüm olgularda pankreas başı bölgesidir. Olgularımızın 56'sı hastanemiz Genel Cerrahi Kliniği'nde Whipple operasyonu olmuş, 5 olgu operasyon sırasında inoperable bulunarak primer tümörü örneklenmiştir. Olgularımızın ortanca yaşam ayı 12.22 ay (minimum 0, maksimum 29 ay) dır. Sağ kalım verileri bilinen 48 olgudan 9 (%18.8)'u halen sağ olup, 39 (%82.3)'u ise yaşamını yitirmiştir. Kalan 13 olgunun yaşam durumları, yeterli klinik bilgiye ulaşılamadığından bilinmemektedir. Tümör evresi bilinen 61 olgudan 17 (%27.9)'si evre 1, 33 (%54.1)'ü evre 2, 11 (%18)'i evre 3'tür. T evresi bilinen 56 olgudan 1 (%1.6)'i T1, 10 (%16.4)'ü T2, 38 (%62.3)'i T3 ve 7 (%11.5)'si T4'tür. Lenf düğümü metastazı bilinen 59 olgudan 20 (%32.8)'sinde lenf nodu metastazı yok, 39 (%63.9)'unda lenf düğümü metastazı vardır. Uzak organ metastazı bilinen 61 olgudan 38 (%62.3)'inde metastaz yok, 23 (%37.7)'ünde ise vardır. Evresi bilinen 61 olgudan 1 (%1.6)'i evre 1, 3 (%4.9)'ü evre 2, 10 (%16.4)'ü evre 3, 19 (%31.1)'ü evre 4, 4 (%6.6)'ü evre 5 ve 24 (%39.3)'ü evre 6'dır. R evresi bilinen 51 olgudan 29 (%56.9)'unda R0, 21 (%41.2)'inde R1 ve 1 (%2)'inde R2'dir. Perinöral invazyonu değerlendirilebilen 57 olgudan 9 (%15.8)'unda perinöral invazyon yok, 48 (%84.3)'inde ise vardır. Kan damarı invazyonu değerlendirilebilen 59 olgudan 38 (%64.4)'inde kan damarı invazyonu yok, 21 (%35.6)'inde ise vardır. Lenf damar invazyonu değerlendirilebile 59 olgudan 29 (%49.2)'unda lenf damarı invazyonu yok, 30 (%50.8)'unda ise vardır. COX-2 antikoru ile pozitif boyanan 45 olgudan 17 (%27.9)'sinde (+), 23 (%37.7)'ünde (++) , 5 (%8.2)'inde (+++) boyanma saptanmış olup, 16 (%26.2) olguda boyanma olmamıştır. VSD ortalama değerleri 6.33 mm¹ (maksimum 30.10, minimum 1.19) ve NVES ortalama değerleri 32.18 mm² (maksimum 150.80, minimum 8.40) tır. Olgularımızın TNM evreleri ve klinik stage'i ile tümör derecesi, boyutu, perinöral, lenfatik ve kan damar invazyonları arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde metastazı olan ve olmayan gruplar arasında tümör derecesi açısından anlamlı bir farklılık saptandı (p=0.023). Ancak tümör derecesi ve metastaz arasında doğru korelasyon saptanmadı. Ayrıca metastazı olan ve olmayan gruplar arasında kan damarı invazyonu açısından anlamlı bir farklılık vardı (p=0.045). Metastazı olan olgularda kan damarı invazyonu daha sıklıkla izlendi (p=0.047). Bunun dışında diğer parametrelerin kendi aralarında anlamlı ilişki göstermediği saptandı. Olgularda COX-2 reseptör boyanma oranları ile tümörlerin TNM evresi, tümör boyutu, klinik evresi, perinöral, lenfatik ve kan damarı invazyonu, tümör boyutu ve derecesi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (p>0.05). Lenf düğümü metastazı olan ve olmayan olgular arasında damar parametreleri (VSD ve NVES) açısından anlamlı bir farklılık vardı (sırasıyla

p=0.013 ve p=0.016). Lenf düğümü metastazı olan olgularda VSD ve NVES değerleri daha yüksekti (sırasıyla p=0.02 ve p=0.07). Klinik evreler, Evre 1A,1B ve 2A düşük evre, Evre 2B, 3 ve 4 ise yüksek evreler olarak gruplandırıldığında yüksek ve düşük evreli tümörler VSD açısından anlamlı farklılık göstermekte idi (p=0.045). Yüksek evrelerde damarlanma artmış olarak saptandı (p=0.01). Çalışmamızda COX-2 reseptör boyanma oranları ve damar parametreleri ve standart prognostik parametrelerin sağ kalım ile ilişkisi saptanmamıştır. Bu çalışmada COX-2 ile anjiogenez arasında anlamlı bir ilişki saptanmamış ve klinikopatolojik parametreler değerlendirildiğinde COX-2'nin aşırı ekspresyonunun prognoza etkisi olmadığı düşünülmüştür.

TARTIŞMA

Anjiogenezis, karsinogenezin evrelerinde önemli olduğu bilinen önceden var olan damarlardan yeni damar oluşumudur. Tümörlerin vaskülarize olmadıkları sürece 1-2 mm çaptan öteye gidemedikleri ve hipoksinin, p53 aktivasyonu sonucu tümör hücrelerinin apoptozuna yol açması ile tümör büyümesinin engellendiği öne sürülmektedir. Anjiogenez sadece tümör büyümesi için değil tümör metastazı için de gereklidir. Vaskülarizasyon sağlanmadıkça tümör hücreleri metastaz yapamazlar. Bugüne kadar melanom, meme, kolon, akciğer ve prostat gibi çeşitli kanser türlerinde anjiogenez (mikrodamar dansitesi) ile metastaz arasındaki ilişki çalışılmıştır. İn vitro ve in vivo deneysel çalışmalarda artmış anjiogenetik faktör ekspresyonuna bağlı artan anjiogenezin primer tümör büyümesi ve metastaz yapmasını arttırdığı gösterilmiştir (10,11).

Tümör anjiogenezinin değerlendirilmesi için tüm vasküler endotelial hücrelere özgü saptanan antikorlar bulunmuştur. Faktör VII Ag, CD31, CD34, CD36 ya da Ulex europaeus aglutinin-I bunlar arasında yer alan belirleyicilerdir. Birçok solid neoplazilerde anjiogenez araştırma konusu olmuş ve tümör progresyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Meme kanserlerinde anjiogenezin metastaz yeteneği ile bağlantılı olduğu, tümörün metastatik potansiyelinin belirlenmesi ve antianjiogenik tedavi alacak hastaların seçiminde önemli olduğu gösterilmiştir (12). Renal hücreli karsinomlar, akciğerin küçük hücreli dışı karsinomları, mesane, over, meme karsinomları gibi birçok solid tümörlerde anjiogenezin derecesi ile metastaz olasılığı ve yaşam süresi arasında ilişki bulunduğu saptanmıştır (13-19). Bir çalışmada invaziv prostat kanserlerinde tümör anjiogenezi ile metastaz ilişkili olarak bulunmuştur (12). Yörükoğlu ve ark. (20) yaptıkları bir çalışmada prostat iğne biyopsileri ile radikal prostatektomi materyallerinde anjiogenetik aktivite ölçümlerini karşılaştırmışlar ve her iki materyaldeki anjiogenez ölçüm değerlerinin korele olduğunu

bulmuşlardır. Ayrıca bu çalışmada anjiogenezin prostat iğne biyopsilerinde evreyi belirleyebileceği sonucuna varmışlardır.

Pankreatik adenokarsinom cerrahi tedavi ve kemoterapi rejimlerine rağmen yüksek sıklıkta lokal rekürrens ve uzak metastaz yapan agresif karakterli bir tümördür. Antianjiogenetik ajanların birçok tümörde olduğu gibi pankreas kanserinde de uygulanımına yönelik çalışmalar bazı merkezlerde sürmektedir. Ancak pankreas kanserinde anjiogenezin prognostik belirleyicilerle ilişkisi literatürde tam olarak aydınlatılmamıştır. Ikeda ve ark. (17) pankreatik kanser hastalarında intratümöral mikrodamar dansitesinin bağımsız prognostik faktör olduğunu bulmuşlardır. Öte yandan Ellis ve ark. (21) pankreas kanserinde hastalığın yaygınlığı ve damar miktarı arasında ilişki olmadığını bildirmişlerdir. Egawa ve ark. (22) ile Kawarada ve ark. (23) ise, pankreatik adenokarsinomunun hematojen yayılımının tümör büyümesinde önemli rol alan anjiogenezin inhibisyonu ile ortadan kaldırılacağını bildirmişlerdir.

Tümör vaskülarizasyonunun niceliği morfometrik yöntemlerle ölçülen ve her bir kesitte gelişigüzel sayılan mikrodamar sayısına bağlıdır. Bizim çalışmamızda anjiogenez stereolojik yöntem ile VSD (mm^{-1}) ve NVES (mikrodamar sayısı mm^2) değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. VSD ortalama değerleri 6.33 mm^{-1} (maksimum 30.10, minimum 1.19) ve NVES ortalama değerleri 32.18 mm^2 (maksimum 150.80, minimum 8.40)'tır. Bu çalışmada tümör dereceleri arasında VSD ve NVES değerleri açısından anlamlı istatistiksel farklılık bulunmuştur. Tümör derecesi arttıkça damar parametrelerinde artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca anjiogenetik aktivite ile diğer prognostik parametreler arasındaki ilişkiye bakıldığında, lenf nodu metastazı olan ve olmayan olgular arasında, damar parametreleri (VSD ve NVES) açısından anlamlı bir farklılık saptanmış ve lenf nodu metastazı olan olgularda VSD ve NVES değerleri daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca klinik evreler dikkate alındığında yüksek evrelerde vasküler yüzey dansitesi düşük evrelere göre anlamlı olarak fazladır. Tümör içi vasküler ve perinöral invazyon yanı sıra uzak metastaz ile damar parametreleri arasında ilişki yoktur. Bu bulgulara göre, çalışmamız pankreas kansinomlarında, artmış tümör damarlanmasının, yüksek tümör evresi, derecesi ve lenf düğümü metastazı gibi kötü prognozu belirleyen faktörler ile ilişkili olduğu fikrini desteklemektedir. Ancak damar parametreleri ile sağkalım süreleri arasında doğrudan bir ilişki saptanmamıştır. Bu da tümör büyüme ve metastazının kompleks ve çok basamaklı oluşu ve anjiogenezin pankreas kansinomlu hastaların sağkalımını belirleyen tek basamak olmayışı ile açıklanabilir.

COX enzimi, Araşidonik asitten Prostaglandin H2 sentezinde hız sınırlayıcı adımı katalizleyen enzimdir. Son zamanlarda COX-2'nin hücre büyümesinin kontrolünde, apoptozu önlemede, hücre motilitesi, adezyon, anjiogenez ve kanser oluşumundaki rolü araştırılmaktadır.

Spesifik olmayan COX inhibitörleri, NSAİD'ler, son zamanlarda geliştirilen COX-2 spesifik inhibitörlerinin, hem hayvan modellerinde hem de kanserli hastaların tedavilerinde tümör progresyon ve insidansını azaltmadaki etkisi gösterilmiştir.

Sindirim sisteminde özefagus, kolorektal, karaciğer ve pankreas tümörlerinde ayrıca akciğer, prostat ve meme tümörlerinde yapılan çalışmalarda COX-2'nin artmış ekspresyonunun tümör oluşumunda önemli rolü olduğu ve COX-2 mRNA ekspresyonunun artmış olduğu gösterilmiştir. COX-2'nin bu kanser türlerinde artmış ekspresyonunun hücre-hücre adezyonunu ve apoptozisi önlemede ve anjiogenez uyarımda da dolayısı ile kanser progresyonunda etkisi olduğu bulunmuştur.

Bir çalışmada COX-2 proteininin artmış ekspresyonu ile gastrik kansinomlarında lenf düğümü metastazı ve derin invazyon ile anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur (24). Ancak bir başka çalışmada ise mide tümörlerinde bizim çalışmamızda olduğu gibi COX-2 ekspresyonu ile lenf düğümü metastazı, vasküler invazyon ve tümör hücre diferansiyasyon derecesi arasında bir korelasyon bulunamamıştır (25). Bir başka çalışmada ise mide kansinomunda anjiogenez ile artmış COX-2 ekspresyonu arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (26). Meme kanserinde yapılan bir çalışmada COX-2 inhibisyonunun kanser tedavisindeki anlamlı vurgulanmıştır (27).

Pankreas kanserinde ise COX-2'nin rolü ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Yine COX-2'nin anjiogenez ile ilişkisi ile ilgili çok kısıtlı veri bulunmaktadır. Pankreatik duktal adenokarsinomlarının %57-80'inde COX-2'nin artmış ekspresyonu bildirilmektedir (28).

Çalışmamızda elde edilen standart prognostik veriler değerlendirildiğinde beklendiği gibi uzak organ metastazı olan ve olmayan gruplar arasında kan damarı invazyonu ve tümör derecesi açısından anlamlı bir farklılık saptanmıştır. Ayrıca sonuçlarımıza göre anjiogenetik aktivitenin yüksek evreli tümörlerde ve lenf düğümü metastazı yapmış yüksek dereceli tümörlerde daha belirgin olduğu ortaya konmuştur. Bu grup olgularda anti-anjiogenetik tedavilerin uygulanması pankreas kanserli olguların tedavisinde yeni ufuklar açabilir. Ancak COX-2 ekspresyonunun pankreas kanserinin biyolojik davranışına etkisi bu çalışmada gösterilememiştir. Bu çalışma ile tümör tedavisinde etkili olabilecek ajanların araştırılması ve bulunması açısından daha fazla çalışma yapılmasının büyük önem taşıdığı görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Warshaw AL, Fernandez-Del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med.* 1992; 326(7): 455-65.
2. Ikeda N, Adachi M, Taki T, et al. Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 1999; 79(9): 1553-63.
3. Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, et al. Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res.* 1993; 53(21): 5289-96.
4. Reinmuth N, Parikh AA, Ahmad SA, et al. Biology of angiogenesis in tumors of the gastrointestinal tract. *Microscopy Research and Technique* 2003; 60 (2): 199-207.
5. Chen YK, Capdevila J, Haris RC. Cytochrome p450 epoxygenase metabolism of arachidonic acid inhibits apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2001a; 21 (18): 6322-31.
6. Subbaramaiah K, Zakim D, Weksler BB, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase: A novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Biol Med.* 1997; 216(2): 201-10.
7. Tessier TG, Cohn SM, Schloemann S, Stenson WF. Prostaglandins prevent decreased epithelial cell proliferation associated with dextran sodium sulfate injury in mice. *Gastroenterology* 1998; 115(4): 874-82.
8. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by Prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 1998; 58(2): 362-6.
9. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998; 93(5): 705-16.
10. Barth PJ, Weingartner K, Köhler HH, et al. Assessment of the vascularization in prostatic carcinoma: a morphometric investigation. *Hum Pathol.* 1996; 27(12): 1306-1310.
11. Cheng S-Y, Huang HJ, Nagane M, et al. Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(16): 8502-7.
12. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillet NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a Mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest.* 1995; 95(4): 1789-97.
13. Weidner N, Semple JP, Elch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastases-correlation in invasive breast carcinoma. *N Eng J Med.* 1991; 324(1): 1-8.
14. Horak ER, Leek N, Lejeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris AL. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastasis and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340(8828): 1120-4.
15. Weidner N. Intratumor Microvessel Density as a Prognostic Factor in Cancer. *Am J Pathol.* 1995;147(1):9-19.
16. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ. Tumor angiogenesis in advanced ovarian carcinoma. *Ann J Pathol.* 1995; 147(1): 33-41.
17. Köhler HH, Barth PJ, Siebel A, Gerharz EW, Bittinger A. Quantitative assesment of vascular surface density in renal cell carcinomas. *Br J Urol.* 1996; 77(5): 650-4.
18. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularition to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet.* 1992; 340(8812): 145-6.
19. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. Two mechanisms of basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res.* 1997; 57 (1): 136-40.
20. Yörükoğlu K, Sağol Ö, Özkara E, et al. Comparison of microvascularization in diagnostic needle biopsies and radical prostatectomies in prostate carcinoma. *Eur Urol.* 1999; 35(2): 109-12.
21. Ellis LM, Takahashi Y, Fenoglio CJ, Cleary KR, Bucan CD, Evans DB. Vessel counts and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer.* 1998; 34(2): 337-40.
22. Egawa S, Tsutsumi M, Konishi Y, et al. The role of angiogenesis in the tumor growth of Syrian hamster pancreatic cancer cell line HPD-NR. *Gastroenterology.* 1995; 108(5): 1526-33.
23. Kawarada Y, Ishikura H, Kishimoto T, et al. Inhibitory effects of the angiogenetic agent TNP-470 on establishment and growth of hematogenous metastasis of human pancreatic carcinoma in SCID beige mice in vivo. *Pancreas.* 1997; 15(3): 251-7.
24. Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, et al. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma. *Cancer.* 2001; 91(10): 1876-81.
25. Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2003; 9(7): 1421-6.
26. Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to Prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(1): 135-8.
27. Howe LR, Dannenberg AJ. COX-2 inhibitors for prevention of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2003; 8(1): 31-43.
28. Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, et al. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res.* 1999; 59(17): 4356-62.