T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

KOLOREKTAL KARSİNOMLARDA HIF-1 ALFA, CXCR4 VE CA9 İMMÜNHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLERİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ

UZMANLIK TEZİ

DR. BURCU SAKA

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. AYŞE DURSUN

ANKARA

ARALIK 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

KOLOREKTAL KARSİNOMLARDA HIF-1 ALFA, CXCR4 VE CA9 İMMÜNHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLERİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ

UZMANLIK TEZİ

DR. BURCU SAKA

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. AYŞE DURSUN

ANKARA

ARALIK 2010

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak yetişmemde büyük katkıları bulunan değerli hocalarım; Patoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Gülen Akyol, tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe Dursun, Prof. Dr. Ömer Uluoğlu, Prof. Dr. Leyla Memiş, Prof. Dr. Aylar Poyraz, Doç. Dr. Nalan Akyürek, Doç. Dr. Özlem Erdem, Yrd. Doç. Dr. İpek Işık Gönül, Yrd. Doç. Dr. Özgür Ekinci, Yrd. Doç. Dr. Pınar Uyar Göçün ve Yrd. Doç. Dr. Güldal Yılmaz'a, tezime katkıda bulunan Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa Benekli'ye ve Dr. Ramazan Yıldız'a, dostluklarını esirgemeyen, özlemle hatırlayacağım sevgili araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve tüm laboratuar personeline en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Teşekkür ……..... i

İçindekiler …….....ii

1. GİRİŞ ……... 1

2. GENEL BİLGİLER…….. 3

2.1 Tümör ve Hipoksi ……... 3

2.2 HIF 1 Alfa…….....7

2.3 Kemokin Reseptör CXCR4 …….13

2.4 Karbonik Anhidraz 9 ……...20

2.5 Kolorektal Karsinomlarda Tanımlanan Prognostik Parametreler……23

3. GEREÇ VE YÖNTEM ……..28

3.1 Hastaların seçimi …….28

3.2 İncelenen parametreler ……28

3.3 Verilerin toplanması…….28

3.4 Mikroarray Bloklarının Hazırlanması……..30

3.5 İmmünhistokimyasal Yöntem……..31

3.6 İmmünhistokimyasal Belirteçlerin Değerlendirilmesi…….33

3.7 İstatistiksel Analiz……35

3.8 Etik Kurul Onayı …….36

4. BULGULAR…….37

4.1 Hastaların Demografik ve Klinik özellikleri ……...37

4.2 İmmünhistokimyasal Bulgular…….44

4.3 İmmünhistokimyasal Sonuçların Prognostik Özellikler ile İlişkisi……48

5. TARTIŞMA …….63

6. SONUÇLAR…….86

7. KAYNAKLAR…….88

8. ÖZET …….....103

9. SUMMARY……105

10. ÖZGEÇMİŞ …….107

1. GİRİŞ

Kolorektal karsinomlar, gelişmiş ülkeler başta olmak üzere, tüm dünyada yaygın olarak rastlanan tümörlerdir. En sık görülen kanserler arasında dünyada 3. ülkemizde ise, 2006 yılı Sağlık Bakanlığı verilerine göre, erkeklerde 4. , kadınlarda ise 2. sırada yeralmaktadır.

Kolorektal karsinogenezis konusunda son yıllarda yapılan çalışmalar, kanser gelişiminin temel mekanizmalarında birçok noktanın aydınlanmasını sağlamıştır. Ayrıca tümörlerdeki genetik değişikliklerin prognostik rolü olduğu görülmüştür. En önemlisi de bu genetik değişikliklerle ilişkili yeni terapötik ajanlar gündeme gelmiştir.

Bu çalışmada, başka kanser türlerinde de prognostik önemi tartışılan ve hedefe yönelik tedaviye yön vereceği umut edilen üç molekülün -Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa (HIF-1α), Kemokin reseptör CXCR4 (CXCR4) ve Karbonik Anhidraz 9 (CA9) - kolorektal karsinomlardaki ekspresyonu ve hastaların klinik özellikleri (yaş, cinsiyet), tümörün yerleştiği barsak segmenti, tümör çapı, tümörün makroskopik büyüme paterni, histolojik tipi, tümör grade'i, anjiolenfatik invazyon varlığı, TNM evresi, takipte lokal nüks ve metastaz gelişimi ve hastaların sağ kalımı ile ilişkisi araştırılmıştır.

Bu moleküllerden ikisinin -HIF-1α ve CA9- başlıca görevi, tümör dokusundaki hipoksi ile mücadele etmek ve hipoksiye rağmen tümör hücrelerinin canlılığını sağlamaktır. CXCR4 ise, tümör hücrelerinin metastaz kapasitesini belirlemektedir. Buna göre; her üç molekülün artan ekspresyonunun kötü prognozu belirlediği düşünülmektedir.

Bu moleküllerin patogenezdeki rolü kesinleştiğinde, sadece prognostik bir belirteç olarak kalmayacakları, tedavi stratejilerine de katkıda bulunacakları umut edilmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tümör ve Hipoksi

Değişen glikoz metabolizması ve hipoksiye hücresel adaptasyon kazanılması kanser biyolojisinin ve tedavisinin temelini oluşturmaktadır (1).

Hipoksi, tümörlerde sık rastlanan bir durumdur (2) . Özellikle radyoterapi duyarlılığını azaltmakla birlikte, kemoterapi etkinliğini de olumsuz etkiler (2). Çünkü radyoterapi ve kemoterapinin DNA hasarlayıcı etkisi için oksijen gereklidir. Hipoksik hücrelerin prolifere olmamayı seçmeleri, asıl etkisi çoğalan hücreler üzerine olan kemoterapötiklerin etkisini kısıtlayan bir diğer faktördür. Ayrıca hipoksik mikroçevre, tümör hücresinde metastaz kapasitesini arttırıcı genleri indükleyerek, tümör hücrelerinden dirençli olanların seçilmesine, böylelikle agresif ve metastatik potansiyelin ortaya çıkmasına yol açar (3, 4). Hipoksik hücreyi hedef alan tedavi yöntemleri yıllardır ilgi çekici olmakla birlikte, hangi hastaların bu tedaviden fayda göreceği netleştirilemediği için klinik çalışmalar yavaşlamıştır.

Dokuya ulaşan oksijen miktarının, ihtiyaç duyulandan az olması hipoksi ile sonuçlanır. Tümör dokusunun anormal vasküler yapısı ve tümör hücrelerinin yüksek proliferatif aktivitesinin neden olduğu yüksek metabolik aktivite hipoksinin temel 2 nedenidir (5). Nekroz, hipoksinin histopatolojik yansımasıdır (6).

Tümörde, akut ve kronik olmak üzere iki tip hipoksik hücre izlenir:

Akut hipoksik hücreler, vasküler yapılar komşuluğunda bulunan ve arteriollerin rastgele kasılıp gevşemesi ile spontan reoksijenize olan hücrelerdir.

Kronik hipoksik hücreler ise, vasküler yapılardan uzakta yerleşenlerdir. Kronik hipoksik hücrelerde, DNA tamir enzimleri hasarlandığı için, radyoterapi duyarlılığından sorumlu esas hücreler, akut hipoksik tümör hücreleri olmaktadır (7).

Tümör oksijenizasyonunu saptamada temel olarak 3 yöntemden yararlanılmaktadır (8):

1) Endojen belirteçler

Hücre hipoksiye maruz kaldığında eksprese edilen proteinler, hipoksinin endojen belirteçlerini oluşturmaktadır. Bu proteinlerin immünhistokimyasal olarak tesbiti, arşiv materyalinde de çalışılabilen noninvaziv bir yöntem olması nedeniyle diğer yöntemlerden daha kolaydır. En sık kullanılan endojen belirteçler HIF-1α, CA9 ve Glikoz taşıyıcı protein-1 (GLUT-1)'dir (4).

2) Nitroimidazol grubu içeren ilaçlar

Bu ilaçlar nitrojen grubu içeren imidazol türevleridir. Bu grubun en iyi bilinen örneği metranidazoldür. Parazit ve anaeorobik bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde faydalıdır. Bu grup ilaçlar, hipoksik hücreyi hedef alarak, intraselüler alanda birikirler. İmmünhistokimyasal olarak ya da PET ve SPECT gibi görüntüleme yöntemleri ile tespitleri sayesinde hipoksik hücreler saptanabilmektedir (7, 9).

3) Elektrotlar

Tümöre yerleştirilen elektrotlar ile oksijen seviyesinin direkt ölçümü hipoksi tespitinde kullanılan üçüncü yöntemdir(7, 9).

Vücut, asit-baz dengeleyici mekanizmalarla ekstraselüler pH'yı (pH_e) 7,4'te, intraselüler pH'yı (pH_i) da 7,2 de sabit tutar. Asidik pH_i, hücre fonksiyonunu, büyümesini ve bölünmesini etkiler, apopitozisi indükler (10).

Asit üretiminin temel kaynağı aerobik ve anaerobik solunumdur. Tümör hücresinin normal hücreden önemli bir farkı, O_2 desteğinin yetersiz olması nedeniyle aerobik solunum yerine anaerobik solunumu tercih etmesidir.

1930'larda tümörlerin normal dokudan çok daha fazla laktik asit ürettiği bulunmuş ve uzun yıllar düşük pH_i ve pH_e'ye sahip oldukları düşünülmüştür (11). Zamanla bu görüş değişmiştir. Günümüzde, çoğu tümörde pH_i'nin normal dokuya benzer şekilde 7,0 ile 7,4 arasında tutulduğu, fakat pH_e'nin 6,9 ile 7,0 arasında, olduğu, bazen 6'ya kadar düşebildiği bilinmektedir (12). İnvivo ve invitro çalışmalarda, ekstraselüler asiditenin, ekstraselüler matriks ve bazal membran yıkımını kolaylaştırarak tümör büyümesini, invazyonunu ve metastazını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (13). İntraselüler asidite ise, normal hücre için olduğu gibi, tümör hücresi için de yaşamı tehdit edicidir.

Normal hücrede, glikoz glikoliz ile pirüvik asite çevrilir ve mitokondrilerde krebs siklusuna girer. Açığa çıkan CO_2 hücre zarından serbestçe ekstraselüler alana geçer ya da karbonik anhidraz ile intraselüler hidrasyona uğrar. Sonrasında oluşan, bikarbonat (HCO_3^-) ve H^+ hücre dışına taşınır. Hücre ile kapiller arasındaki mesafenin kısa olması sayesinde, difüzyon kapasitesi yüksektir. Böylelikle pH_e'nın plazma pH'sına eşit olması sağlanır (14).

Tümör hücresinde ise, glikoliz sonrasında, pirüvik asit laktata dönüştürülür. Laktat hücre membran yerleşimli proteinlerle hücre dışına taşınır. Hücre içi asit

(H^+) yükünden kurtulmanın bir diğer yolu H^+ iyonunun, bikarbonat (HCO_3^-) ile reaksiyona girerek (bikarbonat titrasyonu) CO_2 oluşturmasıdır. CO_2 hücre membranından pasif difüzyonla ekstraselüler alana geçer ve hücre zarında yerleşen CA9 enzimi sayesinde hidrasyona uğrar. Oluşan karbonik asit konjugatlarına ayrılığında, H^+ ve HCO_3^- tekrar oluşur. Tümördeki yetersiz perfüzyon nedeniyle, hücre dışındaki H^+ iyonları difüzyonla uzaklaştırılamaz, ekstraselüler alanda birikir ve asidik pH_e'ye neden olur. Düşük pH_e'nin asıl nedeninin sanılanın aksine, laktat değil, CO_2 olduğu sonucuna varılmıştır (15).

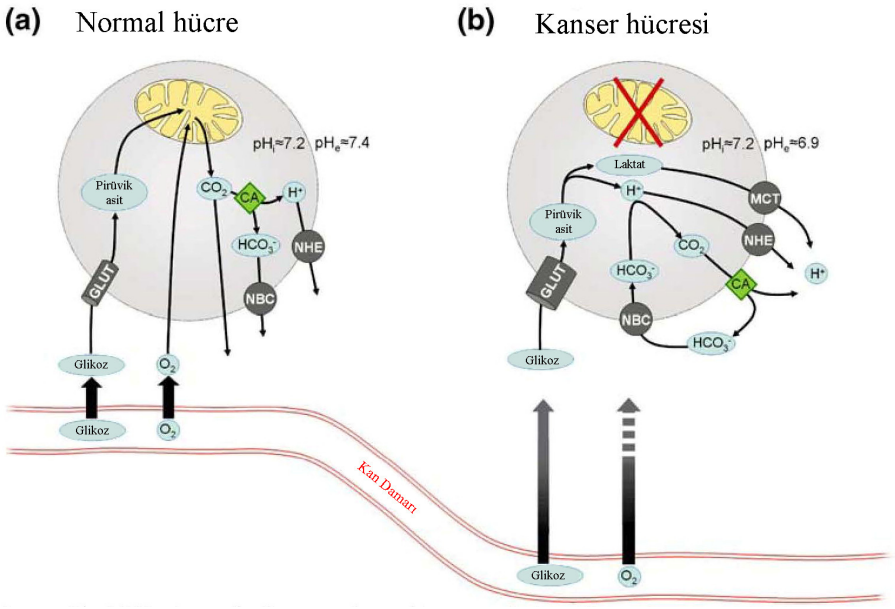
Tümör hücresinde CO_2 üretimine yol açan temel yol glikoliz ve sonrasında bikarbonat titrasyonu olmakla birlikte, buna nükleotid sentezini sağlayan pentoz fosfat şantı (heksoz monofosfat yolu) da katkıda bulunmaktadır. Tümör metabolizmasında krebs döngüsünün yeri oldukça sınırlı olduğu için mitokondrial CO_2 üretimi göz ardı edilebilir. Normal hücrenin ve tümör hücresinin solunum profili Şekil 1'de karşılaştırılarak sunulmuştur (14).

Tümör hücresini glikolize yönelten temel etken hipoksidir. Her ne kadar anjiogenez tümörün temel fenotipik özelliklerinden olsa da, vasküler yapının anormal olması nedeniyle hipoksinin önüne geçilemez (16). Hipoksi, HIF-1α ile başlayan bir sinyal zincirini tetikleyerek glikolizi düzenler (17). Tümör hücresinin glikoliz kapasitesi, agresif biyolojik davranışı ile doğru orantılıdır (13).

Kanser, karmaşık genetik değişikliklerin bir sonucudur. Translokasyonlar, gen amplifikasyonları, mutasyonlar ve bazı genlerin susturulmasını içeren genetik değişiklikler, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör supresör genlerin inaktivasyonu ile sonlanır (18). Hipoksik mikroçevre, tümör hücresinin genetik insitabilitesine

katkıda bulunur ve yeni mutasyonlar kazanmasına yol açar. Hipoksinin, ilaç direncinden sorumlu ABCB1 ve antiapopitotik Bcl-2 geninin ekspresyonunu arttırdığı ve p53 tümör supresör geninde kayıba yol açtığı gösterilmiştir (18,19).

Hipoksinin genetik değişiklikleri nasıl başlattığının anlaşılmasıyla, kanserin temel sebebinin aydınlanacağı ve kanser tedavisinde köklü değişiklikler olacağı düşünülmektedir (18).



Şekil 1. Normal hücrenin ve tümör hücresinin solunum profili **(GLUT: Glikoz taşıyıcı protein, NHE: Na^+- H^+ iyon değiştirici, NBC: Na + ve Bikarbonat taşıyıcı protein, MCT: Monokarboksilat taşıyıcı protein, CA: Karbonik Anhidraz)**

2.2 HIF 1 Alfa

Hiçbir tümör anjiogenez olmaksızın 2 mm^3'ten daha fazla büyüyemez. Çünkü tümör merkezindeki oksijen yetersizliği, apopitoz ve nekrozla sonlanır (19). Düşük oksijen basıncı, anjiogenezin ve angiogenezin anahtar molekülü olan

vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) temel uyaranıdır. Başta anjiogenez olmak üzere hipoksinin tüm sonuçları HIF-1'in kontrolü altındadır.

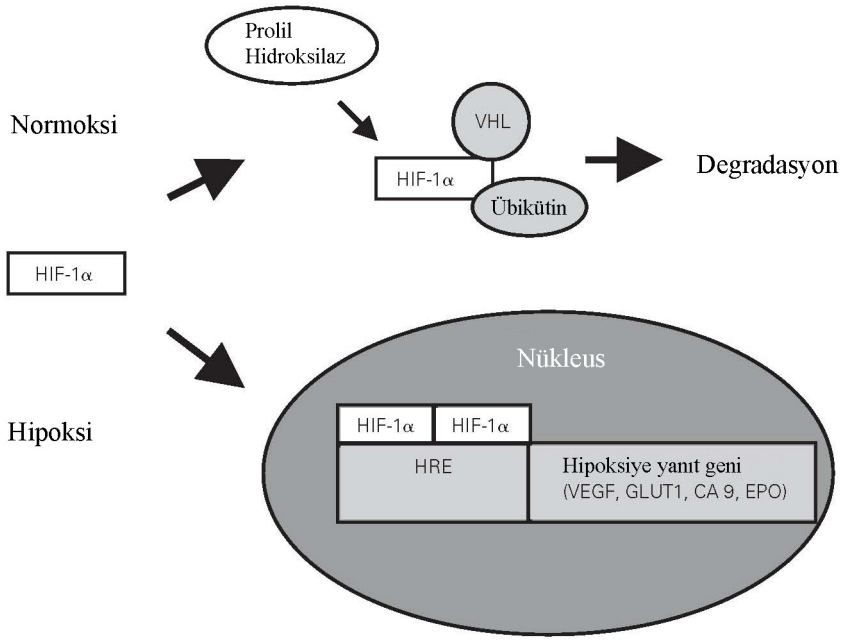
HIF-1, alfa ve beta (ARNT-aryl hydrocarbon receptor nucleer translocator) alt birimlerinden oluşan, heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür. Her iki alt birim Per-ARNT-Sim (PAS) ailesine aittir (20). Kompleksin hipoksiye yanıttan sorumlu temel birimi alfa subünitesidir (21). HIF-1α, oksijen varlığında ubikütin/ proteozom yolağı ile proteolizise uğramasına neden olan ODD (oxygen dependent degradation) domainine sahiptir (20). Bu reaksiyonu bir tümör supresör gen olan von Hippel-Lindau (VHL) proteini indükler. Proteoliz, VHL proteininin, HIF-1α'nın ODD bölgesindeki hidroksile prolinleri tanıyan E3 übikütin ligaz enzimini içermesi sayesinde gerçekleşir (22).

Hipokside, hidroksilasyon bloke olur. Böylelikle, HIF-1α'nın stabilizasyonu, nükleusa translokasyonu ve sonrasında aktivasyonu söz konusu olur (23). HIF-1α molekülünün normoksik ve hipoksik durumlardaki farklı fonksiyonu Şekil 2 'de şematize edilmiştir (4).

HIF-1α bu süreçte, ARNT ile dimerize olur ve hedef genlerin promotor bölgelerine bağlanır. HIF-1α -ARNT aksı, VEGF, PGK1 ve LOX genlerinin de içinde bulunduğu bir grup genin aktivasyonundan sorumlu olup (Şekil 3A), anjiogenez, glikoliz ve metastaz gibi malignite özelliklerinin sergilenmesinde rol alır (24).

HIF-1α'nın etki gösterme yollarından diğeri ve malign progresyonda daha etkin olanı, HIF-1α-c-Myc aksıdır (18). Burada HIF-1α, Sp1'e bağlanmak için c-Myc ile yarışır. Ve ekspresyonları için c-Myc'e ihtiyaç duyan DNA tamir

genlerinin (MSH2, MSH6 ve NBS1) ekspresyonunun inhibisyonuna yol açar (Şekil 3B) (25, 26). MSH2 ve MSH6, DNA replikasyon hatalarını, NBS1 ise DNA kırıklarını düzeltmekle görevli genlerdir (27, 28). MSH genlerinin inhibisyonu artmış genomik (mikrosatellit) insitabiliteye neden olur (25, 26, 29). Bu genlerin germline mutasyonları, herediter nonpolipozis kolorektal kanserlerle (HNPCC) ilişkilidir.

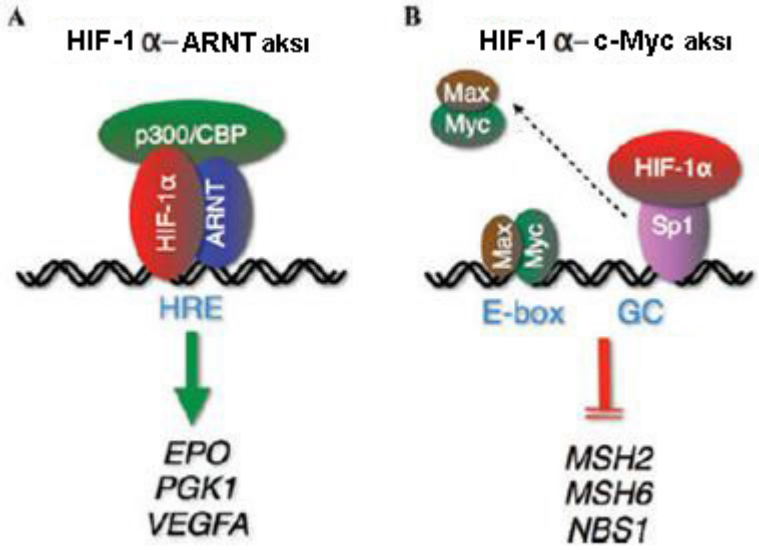


Şekil 2. HIF-1α fonksiyonunun şematik gösterimi

(HRE:Hipoksiye yanıt elemanı, VHL: Von- Hippel-Lindau proteini, VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü, GLUT 1: Glikoz taşıyıcı protein- 1, CA9: Karbonik Anhidraz 9, EPO: Eritropoietin)

HIF-1α'nın normoksik durumlarda, nonhipoksik proinflamatuar stimuluslarla da uyarıldığı bildirilmiştir (30, 31). Bu durumda, gram negatif bakterilerin duvarında yer alan lipopolisakkarit (LPS) dikkati çekmektedir.

Kolondaki yüksek gram negatif bakteri popülasyonu göz önüne alındığında, LPS, normoksik durumlarda, HIF-1α'nın olası stimülatörü olarak görünmektedir (32).



Şekil 3. HIF-1 Alfa'nın etki gösterirken izlediği iki yol

(HRE: Hipoksiye yanıt elemanı)

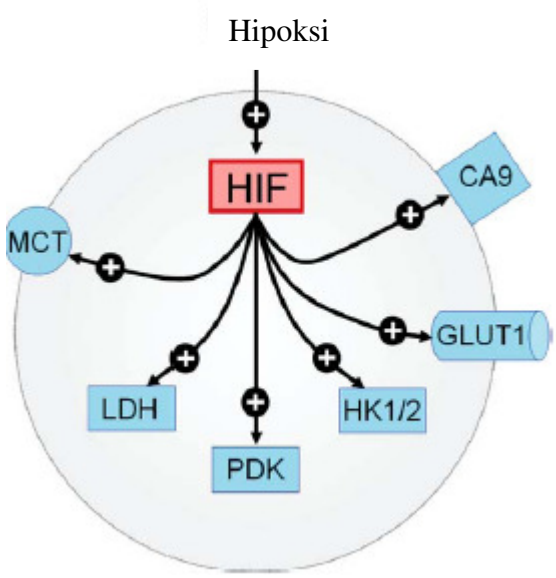
Yüksek HIF-1α düzeylerine yol açan nonhipoksik stimuluslar arasında, NO, IL-1β, TNF-α, insulin ve insulin benzeri büyüme faktörleri (IGF-1, IGF-2), VHL, p53, PTEN ve diğer tümör supresör gen mutasyonları ve Her2neu (c-erbB-2) gibi onkogen aktivasyonları da sayılabilir. (33, 34)

HIF-1α ekspresyonunun glioblastomda olduğu gibi vasküler yapılardan uzak, perinekrotik hücrelerde izlenmesi, ekspresyonunda fizyolojik (hipoksi) nedenlerin rol oynadığını göstermektedir. Ancak hemanjioblastomda ve oligodendrogliomlarda olduğu gibi, vaskülerize, nekroz içermeyen tümörlerde de saptanması, altta nonfizyolojik nedenlerin -olasılıkla onkojenik- de olduğunu akla getirmektedir (1, 35)

Bununla birlikte, HIF-1α'nın hipoksinin ne kadar iyi bir belirteci olduğu da tartışmalıdır. İnvitro çalışmalarda, akciğer hücrelerinde, % 0,5 O_2 maruziyeti ile yaratılan hipoksik ortamda, hipoksi başlangıcından sonra, HIF-1α protein seviyelerinin 4-6. saat aralığında belirginleştiği gösterilmiştir. Bu süre diğer hipoksi belirteçlerine göre gecikmiş bir yanıttır. Ayrıca yarı ömrünün kısa olması saptanabilirliğini zorlaştırmaktadır (36). Jewell ve ark. HeLA hücrelerinde hipoksinin 2. dakikasında HIF-1α'nın indüklendiğini ve en yüksek seviyesine 1. saatte ulaştığını bildirmektedir. Aynı çalışmada, HIF-1α düzeyinin reoksijenizasyonun 8. dakikasında azalmaya başladığı ve 32. dakikada saptanamaz düzeylere indiği gösterilmiştir (37).

Çalışmalar birbiri ile çelişen sonuçlar içermekle birlikte, her ikisi de, HIF-1α düzeylerinin doğru yorumlanması için, molekülün ve tümörün dinamik özelliklerini yansıtacak doğru örneklemenin şart olduğunu ve normoksik durumlarda da HIF-1α pozitifliğine rastlanabileceğini vurgulamaktadır.

HIF-1α, 40'tan fazla geni regüle eder (38). Temel etkileri şekil 4'te özetlenmiştir. Hücre içine glikoz girişini, glikoz taşıyıcı proteini ve hekzokinazı indükleyerek arttırır. Piruvatı, pirüvat dehidrogenaz kinazı ve laktat dehidrogenazı indükleyerek -krebs döngüsüne girmek yerine- laktata dönüştürür. Monokarboksilat taşıyıcı proteinin indüksiyonu ile laktatın hücre dışına çıkarılmasını sağlar. Monokarboksilat taşıyıcı proteinler, laktat veya pirüvat ile birlikte H^+ iyonunu da hücre dışına taşıyarak, intraselüler asit yükünün azaltılmasında rol alırlar (14). CA9'un da görevi intraselüler asit yükünü azaltmakır.



Şekil 4. Hipoksi ile tetiklenen hücre içi sinyaller

(GLUT 1: Glikoz taşıyıcı protein 1, MCT: Monokarboksilat taşıyıcı protein, CA9: Karbonik anhidraz 9, PDK: Pirüvat dehidrogenaz kinaz, HK 1/ 2: Hekzokinaz 1 ve 2, LDH: Laktat dehidrogenaz)

HIF-1α'nın indükledikleri arasında eritropoietin, transferrin, endotelin1, indüklenebilir nitrik oksid sentaz, hem oksijenaz, VEGF, CXCL12 olarak da bilinen SDF-1 (stromal cell derived factor 1) ve IGF-2 proteinlerinin genleri de bulunmaktadır. Böylelikle, vazodilatasyon, neovaskülarizasyon ve metastaz sağlanır (39, 40) .

Başta CA9 olmak üzere, HIF-1α kontrolündeki proteinlerin seviyelerinin, düşük oksijen konsantrasyonları ile HIF-1α'dan daha iyi korele olacağı düşünülmektedir (41) Ancak VHL proteininin HIF-1α degradasyonunda rol alması nedeniyle (şekil 1), VHL disfonksiyonu ile ilişkili renal hücreli karsinomlarda HIF-1α ve CA9 seviyelerinin hipoksiden bağımsız artışı da bilinmektedir (42, 43).

Özetle, HIF-1α hücrenin hipoksiye yanıtını yöneten esas proteindir (44). Hücrenin düşük oksijen seviyesine adaptasyonu için gerekli genleri aktive eder, glikolizi, eritropoezi ve anjiogenezi indükler (45). Böylelikle tümör hücresi daha çok O_2'ye ulaşabilir ya da düşük O_2 seviyelerine metabolik adaptasyon gösterir. (46). Sonuçta yaşam şansını arttırır.

Tümör biyolojisinin anlaşılması ve klinik yansımalarının ortaya konması tedavi gelişimi için şarttır. Her ne kadar HIF-1α'nın birçok kanser türünde ekpresyonu raporlansa da, kolorektal karsinomlar başta olmak üzere, klinik önemini yansıtan çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (19). HIF-1α'nın prognostik önemini anlamak ve tedavideki hedef molekül özelliğini ortaya koymak için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (1).

2.3 Kemokin Reseptör CXCR4

Meme kanseri hücrelerinin sistematik olarak bazı organları hedeflediğini gözlemesi, Paget'in 'tohum ve toprak' (seed and soil) teorisine yön vermiştir. Bu modele göre, kanser gelişimi için uygun özelliklere sahip organlar, metastazda tercih edilmektedir (47). Geçen bir yüzyıllık dönem bu teorinin alternatiflerini de beraberinde getirmiştir.

Günümüzde tartışılan yeni metastaz mekanizmaları, kemokinlerin bu konudaki rolünü gün ışığına çıkarmıştır. Bu 'haberleşme/ hedefe ulaşma' (signaling/ homing) mekanizması, yakın ya da uzak organlardaki kanser hücrelerini spesifik reseptörleri yolu ile etkileyen kemokinlerin, hedef organlardan üretimini ve salınımını öngörmektedir (48). Aslında bu teori de 'toprak ve tohum'

teorisinin prensiplerini devam ettirmektedir. Sinyaller (kemokinler) yoluyla, kanser hücresinin spesifik göçü sağlanmakta ve 'uygun toprağa' implantasyonu gerçekleşmektedir.

Kemokinler, yaklaşık 50 tane düşük moleküler ağırlıklı kemotaktik sitokini kapsayan bir ailedir. Bu sitokinler, 8-15 kDa ağırlıklı monomerik proteinlerdir. Başta immün sistem hücrelerinin (T lenfositler, makrofajlar, dendritik hücreler) kemotaksisi olmak üzere, embriyogenez, anjiogenez, hematopoez, ateroskleroz, tümör büyümesi, metastazı ve HIV enfeksiyonu gibi birçok biyolojik olayda rol alırlar (49, 50).

Kemotaktik sitokinler, fonksiyonlarına ve ekspresyon paternlerine göre, homeostatik ve inflamatuar kemokinler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır: (8) *Homeostatik kemokinler*, bazı özel dokularda yapısal olarak eksprese olan, hematopoietik ve immün sistemin homeostazının sağlanmasında görev alan proteinlerdir. *İnflamatuar kemokinler* ise, ekspresyonları lokal proinflamatuar sitokinlerle sıkı bir şekilde kontrol altında tutulan grubu oluşturmaktadır. Kemokinler, amino terminallerinde yer alan sistein aminoasidinin pozisyonuna göre incelendiğinde, 4 alt grup ortaya çıkmaktadır (51): CXC (alfa), CC (beta) , CX_3C (sigma) ve C (gama) . Bu isimlendirmede X herhangi bir aminoasidi temsil etmektedir.

CXC grubunda yer alan kemokinler, CXCL12 (SDF-1/ stromal cell-derived factor-1) ve CXCL13 (BCA-1/B cell attractinng kemokin-1) haricinde inflamatuar kemokinler olup, bu ikisi homeostatik grupta yer almaktadır.

CXC alt grubu, CXC domaininden önce, glutamik asit-lösin-arginin üçlüsünden oluşan tripeptid dizisinin (ELR motifi) olup olmamasına göre, ELR^+ ve ELR^- olarak iki alt gruba daha ayrılır. ELR^+CXC kemokinler genellikle anjiogenezi uyarırken, ELR^-CXC kemokinler anjiogenezi inhibe etmektedir.

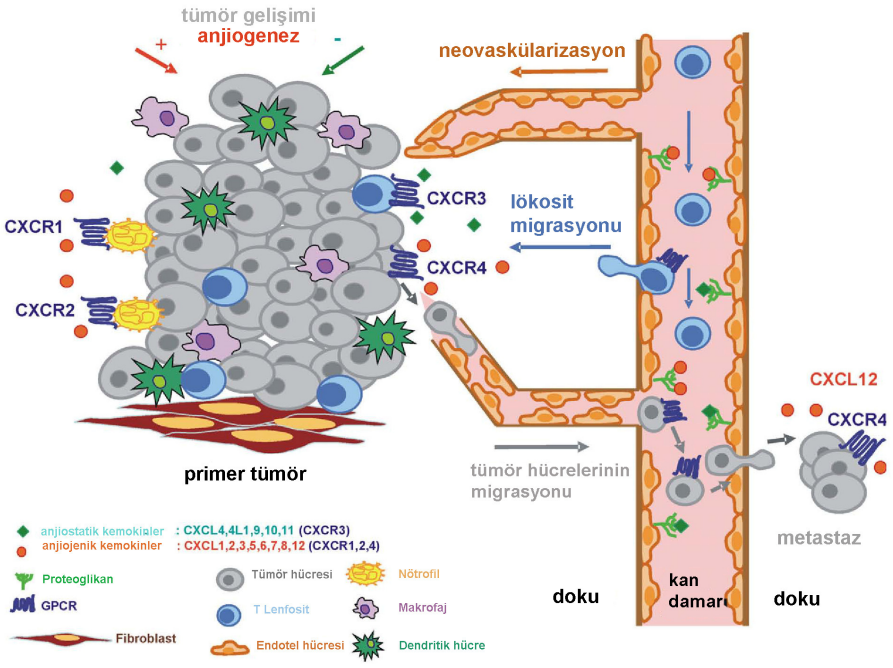
Anjiogenez; embriyogenez, yara iyileşmesi ve tümör büyümesi gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreç için gerekli biyolojik bir olaydır (52). Çok sayıda stimülatör ve inhbitör sinyalin (ör: integrinler, anjiopoietin, kemokinler, oksijen sensörleri, büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks proteinleri) etkisiyle düzenlenir. Tümör gelişimi için, anjiogenik ve anjiostatik sinyaller arasındaki dengenin anjiogenik faktörler lehine bozulması gerekir. Anjiogenezin tümör gelişiminin olmazsa olmaz şartı olduğu uzun süredir bilinmektedir. 1972'de ilk kez Folkmann tarafından antianjiojenik ajanların kanser tedavisinde kullanılabileceği fikri ortaya atılmıştır (53).

Kemokinlerin büyük kısmı**,** lökositleri, CXCR ya da CCR olarak isimlendirilen, G proteinleri ile ilişkili transmembran reseptörlere bağlanarak aktive ederler (54). Yaklaşık 20 kemokin reseptörü tanımlanmıştır (55). Bu süreçte kemokinler dimerizasyon/oligomerizasyon gösterirler veya bazik yapıları sayesinde negatif yüklü glikozaminoglikanlar ile biraraya gelirler. Böylece reseptörlerine daha kolay bağlanırlar (56). Kemokinin reseptörüne bağlanması, lökositin, selektin ve integrinlerle interaksiyonunu ve transendotelyal migrasyonunu sağlar. Sonuçta lökosit inflamasyon alanına ulaşır.

Tümörlerin kemokin sistemlerini kullandıklarına dair bilgi giderek artmaktadır. Solid tümörler, tümör hücrelerinin yanı sıra, endotel ve fibroblast

gibi stromal hücreler de içerirler. Bu hücreler kemokin kaynağı olmaları nedeniyle, lökosit trafiğini düzenleyici rol üstlenirler. Kemokinler, lökositlerdeki reseptörlerine bağlanarak endotele yaklaşmalarını, yapışmalarını ve damar duvarını aşarak, kemokin üreten dokuya, yani tümör dokusuna ulaşmalarını sağlar. Sonuçta, nötrofiller, makrofajlar, T lenfositler ve dendritik hücrelerle karakterli inflamatuar infiltrat içeren tümör dokusu oluşur. İnflamatuar hücrelerden salınan matriks yıkım enzimleri ve büyüme faktörleri tümör progresyonunda rol alır. Kemokin-reseptör etkileşimleri, tümöre inflamatuar hücre göçünü sağlamakla kalmaz, tümör metastazının gerçekleşmesinde de esas rolü üstlenir.

Kemokinlerin ve reseptörlerinin tümördeki rolleri Şekil 5'te şematize edilmiştir (8).



Şekil 5. Kemokinlerin ve reseptörlerinin tümördeki rolü

(GPCR: G protein coupled seven transmembrane receptors)

Uzak organ metastazı, yaşamı tehdit eden, hasta sağ kalımını kısıtlayan bir olaydır. Klinik olarak saptanabilir metastatik kitlelerin oluşumu için tümör hücrelerinin oldukça kompleks bir seri basamağı aşması gerekir. Metastaz kaskadı;

-anjiogenez,

-primer odakta ekstraselüler matriksin invazyonu,

-vasküler bazal membranın aşılması,

-dolaşıma katılma,

-hedef organ damarlarına adhezyon ve ekstravazasyon basamaklarını içeren karmaşık bir süreçtir. Hedef organda anjiogenezin de bu sürece katkısıyla metastatik odaklar oluşmaktadır (8, 57).

Metastazın ilk aşamaları, lökosit göçünü taklit etmektedir. İn vitro çalışmalarda, farklı tümör hücrelerinin, farklı kemokin reseptörlerine sahip olduğu, migrasyon, invazyon, proliferasyon ve canlı kalmanın, lökositlere benzer şekilde, kemokin-reseptör etkileşimi ile gerçekleştiği gösterilmiştir (58-61). İn vivo çalışmalarda ise, tümör hücrelerinde, başta CXCR4 olmak üzere bazı kemokin reseptörlerinin yüksek ekspresyonu izlenmiş ve CXCR4 nötralizasyonu ile metastaz formasyonunda anlamlı azalma saptanmıştır (62-65).

CXCR4, membran yerleşimli bir reseptördür (66, 67). İlk kez insan immünyetmezlik virüsünün (HIV), $CD4^+$ T lenfositleri enfekte etmesinde kofaktör olarak görev aldığının anlaşılmasıyla adı duyulmuştur. Bu süreçte CXCR4'ün görevi viral membranın, konak membranı ile füzyonunu sağlamaktır. Bu nedenle 'fusin' olarak da isimlendirilmiştir (68). Bu proteinin epitelyal tümör hücrelerinin

yüzeyinde de sıklıkla ekprese olduğu 2000'li yılların başında birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (69-74).

Ligandı olan CXCL12/SDF-1 ise, ilk kez 1993 yılında mürin kemik iliğinde tanımlanmıştır**.** HIV enfeksiyonunda CXCR4-CXCL12/SDF-1 etkileşiminin $CD8^+$ T hücrelerin apopitozisine neden olduğu görülmüştür (75). Öncelikle bu reseptör-ligand aksının inflamasyon alanına lenfosit göçünü stimüle ettiği bulunmuştur. 2000'li yıllara gelindiğinde etkilerinin daha geniş olduğu anlaşılmış, immünolojinin birçok alanında ve embriyogenez, kardiak ve nöral gelişim başta olmak üzere organogenez, kök hücre motilitesi, hematopoez, yeni damar oluşumu gibi temel biyolojik süreçlerde rolü olduğu görülmüştür (76). Sonrasında, hücrenin yaşamasında, çoğalmasında, kemotaksisinde, migrasyonunda ve adezyonunda görev aldığı ortaya konarak, tümörogenezle de ilişkili olduğunu işaret eden bulgulara varılmıştır (77-80). CXCR4-CXCL12/SDF-1 reseptör-ligand etkileşimi meme, akciğer, over, böbrek, prostat, pankreas kanseri ve nöroblastomun da aralarında olduğu çeşitli tümörlerde çalışılmıştır (57, 62, 70, 81-85). Ancak çalışmaların büyük kısmı in vitro çalışmalar olduğu için, bu etkileşimin tümörlerdeki patofizyolojik önemi henüz aydınlığa kavuşmamıştır (86).

CXCR4 eksprese eden tümör hücreleri, CXCL12/SDF-1'nin yüksek oranda eksprese edildiği dokulara -akciğer, karaciğer, lenf nodu ve kemik iliği- metastaz yaparlar. Normal karaciğer dokusunda yapılan immünhistokimyasal çalışmalarda, CXCL12'nin subkapsüler alanda, sinuzoidal vasküler yapıların duvarında ve kupfer hücrelerinde yaygın ekspresyonu saptanmıştır. Kemokinin bu

dağılım paterni, metastazın erken aşamalarında tümör hücreleri ile etkileşime girmesine imkan verecek şekildedir (57).

Meme kanserinde ve glioblastomda, otokrin ya da parakrin yolla CXCR4 ve CXCL12/SDF-1'in koekspresyonu bildirilmiştir, böylelikle tümörün yayılması kolaylaşmaktadır (87-89).

CXCL12/SDF-1'in tümör hücresinde otokrin ekspresyonunun immün sistemle olan ilişkisi ile ilgili bilgiler henüz sınırlıdır. Ancak, etkileri farklı iki varyant tanımlanmıştır. Buna göre; SDF-1 alfa eksprese eden tümör hücreleri kendilerini sitotoksik immün reaksiyondan koruyabilmektedir. Çünkü, CXCL12/SDF-1 alfa, $CD8^+$ T hücrelerin apopitozisini indükler ve tümör yatağında Th1'den Th2'ye dönüşüme neden olur. SDF-1 beta ise tümör rejeksiyonunu indükler.

CXCR4-CXCL12/SDF-1 etkileşiminin çok basamaklı metastaz kaskadının hangi aşamalarında rol oynadığı konusunda literatürde farklı görüşler sunulmuştur. Akciğerin küçük hücreli karsinomunun, multipl myelomun ve malign melanomun da aralarında bulunduğu bir grup tümörde, hücrelerin CXCL12 ile stimülasyonunun, endotele adhezyon kapasitesini arttırdığı gösterilmiştir (65, 90, 91). Bunun yanı sıra, metastatik potansiyelin, sinuzoidlere adhezyon kapasitesinden çok, karaciğerde ekstravazasyon yeteneği ile ilişkili olduğu da düşünülmektedir (92). Bu fikri destekleyen bir in vivo çalışmada, kolorektal karsinom hücrelerinin CXCR4 blokajının, tümör hücrelerinin karaciğer mikrovasküler yatağına tutunmasında etkisiz olduğu ancak ekstravazasyonlarında belirgin azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, tümör hücrelerinin

CXCL12/SDF-1 ile stimülasyonu, migrasyonu ve ekstravazasyonu arttırırken, adhezyonda etkili olmamaktadır (57).

İn vivo çalışmalarda tümör hücrelerinin metastaz potansiyelinin, düşük oksijen konsantrasyonları ile korele olduğu görülmüştür. Bunun nedeni, HIF-1α'nın tümör hücrelerinde CXCR4'ün de aralarında olduğu bir grup kemokin reseptörünün transkripsiyonunu indüklemesidir (93-97). HIF-1α'nın kontrolü altında olan VEGF ise, endotel hücrelerinde CXCR4 ekspresyonunu stimüle etmektedir (98). Bu görüşü destekler şekilde, pankreatik adenokarsinomlarda, HIF-1α ve CXCR4'ün immünhistokimyasal ekspresyonunun korele olduğu görülmüştür (85).

CXCL12/SDF-1'in reseptörü ile etkileşiminin bloke edilmesinin, metastatik potansiyelin inhibisyonuna ve tümör hücrelerinin immünterapi için sensitizasyonuna yol açacağı düşünülmektedir (99). Bu nedenle, CXCR4 reseptör antagonistlerinin kanser tedavisinde önemli yer edineceği tahmin edilmektedir. (8). CXCR4 antagonistleri ile ilgili çalışmalar henüz Faz I / II klinik çalışma aşamasındadır (85).

2.4 Karbonik Anhidraz 9

Karbonik anhidraz bir transmembran proteindir. Bugüne kadar 13 izoformu tanımlanmıştır. Bazı izoformları sitoplazmada (ör: CA1, 2, 3, 7), bazıları ise (ör: CA4, 9, 12, 14, 15) hücre membranında yerleşir. CA9, en hızlı H^+ iyon transferi yapan izoformdur. Nükleer lokalizasyonu da bildirilmiştir. İlk kez

1992 de HeLa hücrelerinde saptanmıştır (100). Moleküler yapısı ilk kez 1994'te Patorek ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur (101).

CA9, 466 aminoasitten oluşur. C-terminali intraselüler alanda, N-terminali ise ekstraselüler alanda yerleşir. Hidrofobik bir transmembran segmente sahiptir. Hücre dışında yerleşen katalitik bölgesi, izoformlar arasında benzerlik gösterir ve çinko bağlayan histidin rezidüleri içerir (102-105).

CA9, hücrenin artık asidik ürünlerini (Karbondioksit ve laktik asit) konjugatlarına (Bikarbonat ve laktat) dönüştürür. pH_e üzerine etkisi hücrenin asıl artık ürününüyle ilişkili olarak değişir. Bu ürün CO_2 ise, CO_2'nin ekstraselüler alanda hidrasyonuna neden olur ve bu reaksiyonun sonunda açığa çıkan H^+ iyonları nedeniyle pH_e'yı azalır. H^+ iyonlarının etkin bir şekilde uzaklaştırılabilmesi için CO_2, ekstraselüler alanda hidrate edilmelidir. Aksi durumda, sitoplazmada kısa devre oluşur. Şekil 6'da bu reaksiyonun ayrıntıları gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi, H^+ iyonları membranı CO_2 formunda aşmaktadır.

Eğer artık ürün laktik asit ise, bu kez CA9, bikarbonat (HCO_3^-) ile titrasyonunu sağlayarak, hücre içi laktik asit yükünü azaltır ve pH_e'yı arttırır. (106).

CA9'un pH_e'ye etkisi değişken olsa da, her durumda hücre içi asit birikimini azaltıcı etkisi vardır.

Her ne kadar hücrenin artık asidik ürünleri farklı formlarda olabilse de, hem normal hücrede, hem de tümör hücresinde asit yükünün esas nedeni CO_2' dir.

Dolayısıyla CA9'un asıl etkisi pH_e'yı azaltmaktır. Tümör dokusunda,

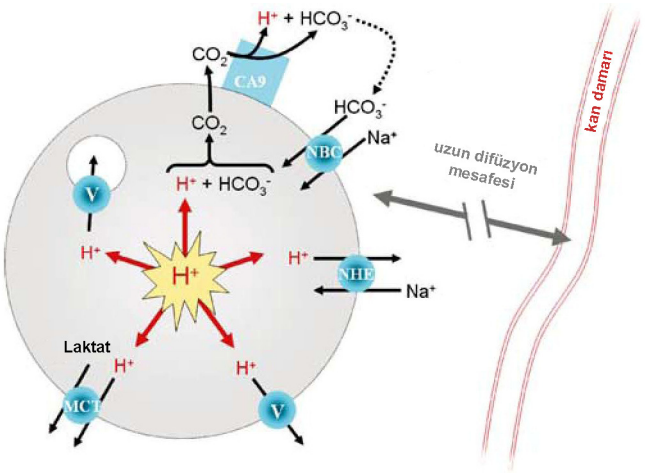
azalan pH_e tümör büyümesini ve invazyonunu kolaylaştırır. pH kontrolünün basit diffüzyonla sağlanamadığı, perfüzyonu yetersiz dokularda (ör: tümör dokusu), pH_e ile pH_i paralel gider ve pH_i da azalır, asidik pH_i ise apopitozisi indükler.

Tümör hücresinde CA9 düzeyinin yüksekliği kötü prognostik bir belirteç iken, tümör hücresinin asit-baz dengesini bozmayı hedefleyen CA9 inhibitörleri tümör tedavisinde umut vericidir.

CA9'un normal dokularda düşük, özellikle hipoksik tümör alanlarında yüksek ekspresyonu bu enzimi bir tedavi hedefi haline getirmiştir. Bu konudaki ilk çalışmalar CA inhibisyonunun tümör büyümesini yavaşlattığını gösterse de, CA9'un selektif inhibisyonunun, intraselüler ve ekstraselüler CA izoformlarının incelenmesine ihtiyaç vardır. Böylelikle yalnızca CA9 inhibisyonun terapötik fayda için yeterli olup olmayacağı ve diğer izoformların blokajı ile bir sinerji yakalanıp yakalanamayacağı anlaşılacaktır (14).

pH_e 'nin arttırılmasını hedef alan tedaviler, asidik pH'da iyonize olan kemoterapötiklerin iyonizasyonunu azaltıp, intraselüler alana ulaşmalarını sağlayarak tedavi etkinliğini de arttıracaktır.

T lenfosit cevabını uyaran aşılar ve CA9'u hedef alan radyoizotop işaretli antikorlar diğer güncel CA9 hedefleyici tedavi yöntemleridir. CA9'u ya da pH regülasyonunu hedef alan yöntemlerle fayda sağlanabilmesi için, tümör hücrelerinin yüzde kaçında CA9 ekspresyonuna ihtiyaç olduğu henüz bilinmemektedir. VHL mutasyonu nedeniyle HIF 1, HIF 2 upregülasyonu ve buna sekonder CA9 ekspresyonunda artış ile karakterli şeffaf hücreli renal hücreli karsinomlar CA9 hedefleyici tedavilerin olası adayıdır.



Şekil 6. Kanser hücresinde yoğun metabolik aktivite sonucu ortaya çıkan H^+ yükünün uzaklaştırılmasında CA9'un rolü **(V: Vezikül tipi H^+ ATPaz)**

2.5 Kolorektal Karsinomlarda Tanımlanan Prognostik Parametreler

Kolorektal karsinomlarda, günümüzde en önemli ve bağımsız prognostik faktör cerrahi sonrası yapılan tümör-lenf nodu-metastaz (TNM) evrelemesidir (107). Her ne kadar TNM sistemi hastaların evrelenmesini ve spesifik tedaviler için seçilmesini sağlasa da, bu sisteme göre aynı evrede olan hastaların farklı klinik gidiş göstermeleri, yeni prognostik biyolojik belirteçlerin gerekliliğini göstermektedir.

AJCC/ UICC (American Joint Committee on Cancer/ Union International Againtst Cancer) tarafından 2002 yılında yayınlanan 6. TNM edisyonuna ait, TNM kategorileri Tablo 1'de, evreleme sistemi ise Tablo 2'de sunulmuştur.

Kolorektal karsinomlarda tanımlanan prognostik faktörler, klinik, morfolojik, immünhistokimyasal ve moleküler olmak üzere 4 grupta sınıflanabilir.

Tablo 1. Kolorektal tümörlerde TNM sınıflaması (*)

T	**Primer tümör**
TX	Primer tümör değerlendirilememektedir.
T0	Primer tümör bulgusu yok.
Tis	Karsinoma in situ: intraepitelyal tümör ya da lamina propria invazyonu
T1	Tümör submukozaya invazedir.
T2	Tümör muskularis propriaya invazedir.
T3	Tümör muskularis propriayı aşmış, subserozaya ya da periton ile örtülü olmayan perikolik ya da perirektal dokulara ulaşmıştır.
T4	Tümör diğer organları, kolorektumun diğer segmentini invaze etmiş ve/ veya perforasyona neden olmuştur.
N	**Bölgesel lenf nodları**
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir.
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur.
N1	Bölgesel lenf nodlarının 1-3'ünde metastaz mevcuttur.
N2	Bölgesel lenf nodlarının 4'ünde ya da 4'ten fazlasında metastaz mevcuttur.
M	**Uzak metastaz**
MX	Uzak metastaz değerlendirilememektedir.
M0	Uzak metastaz yoktur.
M1	Uzak metastaz mevcuttur.

(*: Bu sınıflama sadece karsinomlar için geçerlidir.)

Tablo 2. Kolorektal tümörlerde evreleme **(*)**

Evre	**T**	**N**	**M**
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Evre IIA	T3	N0	M0
IIB	T4	N0	M0
Evre IIIA	T1, T2	N1	M0
IIIB	T3, T4	N1	M0
IIIC	Herhangi bir T	N2	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

(*: Bu sınıflama sadece karsinomlar için geçerlidir.)

Bunlardan bir kısmı tedavi planı için kritikken, bir kısmının henüz tedavideki yeri net değildir. Prognostik faktörler aşağıda sıralanmış, kötü prognozla ilişkili olanlar *italik* yazılmıştır. (108),(109)

Klinik özellikler:

- tümöral kitlenin *sesil, ülsere* ya da polipoid olması

- *obstrüksiyon varlığı*

- *perforasyon varlığı (tümöral alanın ya da tümör proksimalinin)*

- *rezidü tümör varlığı (*Özellikle rektal tümörlerde radial cerrahi sınırın durumu)

- yeterli lenf nodu diseksiyonu (en az 12 adet)

- c*errahi sınırlara 2-5 cm'den daha yakın rezeksiyon*

- dolaşımdaki yüksek tümör hücre sayısı

Morfolojik özellikler:

- yüksek histolojik grade

- lenfatik, venöz ve perinöral invazyon varlığı

- tümörün tomurcuklanarak büyümesi

- tümör sınırının konfigürasyonu (*infiltratif*, iterek)

-mikrosatellit insitabiliteyi telkin eden özellikler (medüller karsinom özellikleri, müsinöz/ taşlı yüzük hücre diferansiasyonu, intratümoral ve peritümöral lenfositik cevap)

- invazyon paterni (ekspansil, *infiltratif*)

- satellit nodüllerin varlığı

- azalan histolojik differansiasyon

(*taşlı yüzük hücreli karsinom ve müsinöz adenokarsinom, adenoksuamöz karsinom, küçük hücreli karsinom, anaplastik karsinom*)

- yüksek mikrodamar yoğunluğu

-tümöral infiltrasyona karşı gelişen lokal inflamatuar ve desmoplastik yanıt

-dolaşımdaki tümör hücre miktarı (110)

İmmunhistokimyasal özellikler:

- DNA tamir genlerinin (MLH 1, MSH 2, MSH 6, PMS 2) kaybı

Moleküler özellikler:

- KRAS ve BRAF mutasyonu

- 18. kromozomda heterozigosite kaybı (LOH18q)

- 17p, 1p, 5q, 8p kaybı, p53, siklin A'nın artmış, p27'nin azalmış ekspresyonu,

- matriks yıkım enzimlerinin (katepsin, ürokinaz, doku plazminojen aktivatörü, metalloproteinaz inhibitörü) ve apopitozisle ilgili genlerin ekspresyonu (bcl2, bax, survivin) ve metabolik enzimlerin (GLUT 1, siklooksijenaz 2) prognostik önemi bildirilmiştir.(111, 112)

Tümör çapının prognostik önemi diğer tümörlerin tersine kolon karsinomlarında minimaldir.

Mikrometastazların önemi tartışmalı olmakla birlike, metastatik lenf nodlarının mezenter cerrahi sınırına yakın ve tümörden uzak olması kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (113-115).

Tedavi yanıtını öngörmede, yukardaki parametrelerin yol göstericiliği sınırlıdır. Ancak bazı moleküler değişikliklerin prediktif faktör olabileceği düşünülmektedir. MSI-H tümörlerin 5-FU bazlı kemoterapilere, KRAS mutasyonu gösterenlerin EGFR blokörlerine dirençli olduğu görülmüştür (116).

Tanımlanan faktörlerin çok sayıda ve birbiri ile ilişkili olması, prognostik ve prediktif değerleri konusundaki yorumu güçleştirmektedir. Günümüzde anatomik evreleme klinik korelasyonun başlıca dayanağını oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, bazı demografik ve klinik özellikleri bilinen kolorektal karsinomlu bir grup hastaya ait rezeksiyon materyalinde immünhistokimya çalışarak, kolon karsinomlarında da prognostik önemi tartışılan 3 belirtecin (HIF-1α, CXCR4, CA9) olası anlamlarını araştırmaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hastaların Seçimi

Bu çalışmada, 1993-2010 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan ve Gazi Üniversitesi Medikal Onkoloji Anabilim Dalı'nda takibi olan, 186 kolorektal karsinom vakası ele alınmıştır.

Bu vakalara ait patoloji materyalinin tümünü kolon rezeksiyonları (sağ/sol hemikolektomi, total kolektomi, segmental rezeksiyon, low anterior rezeksiyon, abdominoperineal rezeksiyon) oluşturmaktadır.

3.2 İncelenen Parametreler

186 hastaya ait, yaş, cinsiyet, tümör yerleşim yeri, tümör çapı, makroskopik tümör büyüme paterni, histolojik tipi ve grade'i, anjiolenfatik invazyon varlığı, T, N, M değerleri ve hastalığın evresi, tanı anındaki ve takipteki metastaz bilgisi, takipte lokal nüks gelişimi, ana basamakları ile uygulanan tedavi, klinik takip süresi (genel sağkalım süresi) ve hastaların bu süre sonunda hayatta olup olmadıkları bilgisine ulaşılmıştır. Doku mikroarray yöntemi ile hazırlanan tümör bloklarında immünhistokimyasal olarak HIF-1α, CXCR4 ve CA9 belirteçleri çalışılmış ve immünhistokimyasal sonuçlar ile, yukarda sayılan parametreler arası ilişkisi incelenmiştir.

3.3 Verilerin Toplanması

Hastaların cinsiyeti, tanı anındaki yaşı, tümörün yerleştiği barsak segmenti, tanı anında ve/veya takipte metastaz varlığı, takipte lokal nüks gelişip gelişmediği,

metastaz ve/veya lokal nüks gelişmişse lokalizasyonu, hastaların takip süresi, uygulanan tedavinin genel şeması ve takip süresi sonunda hastaların sağkalım bilgisine Onkoloji Anabilim Dalı'na ait verilerden ulaşılmıştır.

Buna göre, hastalarda metastaz ve/veya lokal nüks kararına klinik, radyolojik ve /veya patolojik olarak varıldığı, adjuvan tedavide oksaliplatin bazlı, evre 4 hastalarda ise bevasizumab kombinasyonlu irinotekan bazlı kemoterapi rejimi uygulandığı öğrenilmiştir. Hastalardan 3'ü neoadjuvan, 22'si adjuvan RT almıştır.

Tümörün çapı ve makroskopik özelliği patoloji raporlarından öğrenilmiştir. Tümörlerin makroskopik büyüme paterninin ülserevejetan, polipoid ya da mukozadan deprese olduğu görülmüştür.

Rezeksiyon materyallerine ait hematoksilen-eozin boyalı preperatlar tek gözlemci tarafndan tekrar incelenmiştir. Tümörün histolojik tipi, grade'i, invazyon derinliği, anjiolenfatik invazyon varlığı ve lenf nodları değerlendirilmiştir. AJCC/UICC 2002 kriterlerine göre hastalığın evresi belirlenmiştir.

Tümörlerin differansiasyon derecelerine Dünya Sağlık Örgütü'nün 2000 yıllında yayınladığı kriterler ile karar verilmiştir. Buna göre, tümörün %95'ten fazlasında gland formasyonu görülüyorsa iyi diferansiye, %50-95'inde gland formasyonu varsa orta derecede differansiye, %5-50'sinde gland formasyonu varsa az differansiye adenokarsinom olarak değerlendirilmiştir. Tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasında intrasitoplazmik müsin mevcutsa taşlı yüzük hücreli karsinom, tümörün %50'den fazlasını ekstraselüler müsin oluşturuyorsa

müsinöz adenokarsinom tanısı verilmiştir. İyi diferansiye adenokarsinomlar grade 1, orta derecede differansiye adenokarsinomlar grade 2, az diferansiye ve müsinöz adenokarsinomlar ve taşlı yüzük hücreli karsinomlar grade 3 tümörlerdir.

Anjiolenfatik invazyon varlığına karar verilirken, öncelikle hematoksilen eozin boyalı preperatlar değerlendirilmiş, invazyon yönünden şüpheli olgularda ise D2 40 ve CD31 immünhistokimyaları uygulanarak bu olgular yeniden değerlendirilmiştir.

3.4 Mikroarray Bloklarının Hazırlanması

Vakaların kolon duvarına ait, HE boyalı tümör preperatları incelenerek, en az tesbit artefaktı, nekroz ve en çok tümör dokusu içeren parafin bloğu seçilmiştir. Müsinöz tümörlerde, en çok tümör hücresi içeren, müsin gölcüklerinden daha fakir bloklar tercih edilmiştir.

Bu bloklar (verici bloklar) kalınlıklarına göre kabaca gruplandırılarak, alıcı bloklara gömülen dokuların birbirine benzer kalınlıkta olmasına ve teknik hatalarının azaltılmasına çalışılmıştır. Her vakanın verici bloğundan mikroarray cihazı ile (Veridiam VTA-100 tissue arrayer) 1 mm çaplı iğne kullanılarak 4 kor alınmıştır. Alıcı bloklarda, satır ve sütünlar şeklinde, 1 mm çaplı delikler açılmış, referans bir deliğe plasenta dokusu, diğer deliklere tümör dokuları gömülerek, her birinde ortalama 8-12 vaka içeren toplam 18 adet mikroarray bloğu hazırlanmıştır. Satır ve sütunlarda hangi vakanın bulunduğunu gösteren haritalar hazırlanarak, vakaların karışması önlenmiştir.

3.5 İmmünhistokimyasal Yöntem

%10'luk formaldehit ile tesbit edilen dokulara ait 18 adet mikroarray bloğundan 4 mikrometre kalınlığındaki kesitler polilizinli lamlara alınmıştır. HIF-1α, CXCR4 ve CA9 ekspresyonunu belirlemek için, streptavidin-biyotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak, teknik personel tarafından, manuel boyama yapılmıştır. HIF-1α(Santa Cruz, monoclonal mouse, HIF-1α67) antikoru 1/ 50, CXCR4 antikoru 1α (ABCAM, polyclonal goat) 1/50 ve CA9 (Santa Cruz, polyclonal rabbit, H-120) antikoru 1/100 oranında PBS ile dilüe edilmiştir. Biyotinlenmiş bağlayıcı (sekonder) antikorun, streptavidin-biyotin kompleksinin ve kromojen olarak kullanılan 3,3'-diaminobenzidinin (DAB) ticari olarak kullanıma hazır kitleri kullanılmıştır.

Pozitif kontrol olarak, HIF-1α için torsiyone testis dokusu, CA9 için şeffaf hücreli renal hücreli karsinom ve CXCR4 için hepatoselüler karsinom kullanılmıştır.

Uygulanan immünhistokimyasal boyama prosedürünün basamakları aşağıda sıralanmıştır.

1. Polilizinli lamlara alınan 4 mikrometrelik kesitler 56^0C'lik etüvde gece boyunca deparafinize edilmiştir.
2. Kesitler ksilolde 30 dakika bekletilmiştir.
3. Her birinde 5'er dakika bekletilerek sırasıyla %100, %95 ve %90 'lık alkolden geçirilerek dokuların hidrasyonu sağlanmıştır.
4. Çeşme suyu ile yıkanmıştır.

5. Endojen peroksidazı bloke etmek için %3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletilmiştir.
6. Distile sudan geçirilmiştir.
7. Antjen retrival için, HIF-1α, Sitrat buffer (pH 6.0), CA9, EDTA buffer (pH 9.0) ve CXCR4 ise Tris-EDTA buffer (pH 9.0) içinde, mikrodalga fırında yüksek sıcaklıkta, 20 dakika bekletilmiştir.
8. Soğuması için 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
9. Kesitler fosfat buffer saline pH 7.6 (PBS) ile 5 dakika yıkanmıştır.
10. Protein bloklama için non-immün protein bloklama serumunda 10 dakika tutulmuş, ardından kurulanmıştır.
11. Primer antikorlar lam üzerindeki doku kesitlerini kapatacak şekilde damlatılmıştır. HIF-1α ve CXCR4 buzdolabında ($+4^0$C) bir gece, CA9 oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir.
12. Lamlar PBS ile 5 dakika yıkanmıştır.
13. Bağlayıcı (sekonder) antikor (Multi-species ultra streptavidin detection system-HRP, Zymed, Massachusetts, USA) ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.
14. Lamlar PBS ile 5 dakika yıkanmıştır.
15. Stretavidin-biyotin kompleksi (Zymed) uygulanarak 20 dakika bekletilmiştir.
16. Lamlar PBS ile 5 dakika yıkanmıştır.
17. Renk vererek görüntülemeyi sağlamak için kromojen (DAB, Lab-Vision, Neomarkers, USA) damlatılarak 5 dakika inkübe edilmiştir.

18. Çeşme suyunda yıkanmıştır.
19. Harri's Hematoksilen ile 10 saniye zıt boyama yapılmıştır.
20. Lamlar çeşme suyu ile yıkanmış, sırasıyla 2 dakika alkolde ve 2 dakika ksilolde tutulmuştur.
21. Entellan kullanılarak kapatılmıştır.

İmmünhistokimyasal boyama sonrasında, mikroarray korunda yeterli tümör dokusunun olmadığı (normal kolon mukozası, serozal yağ doku, muskuler tabakadan ibaret) görülen olgularda, verici bloklara dönülerek yeniden mikroarray bloğu hazırlanmıştır. Bu bloklardan ve teknik nedenlerle boyanmanın suboptimal olduğu vakalardan yeni kesitler hazırlanarak immünhistokimyasal çalışmalar tekrarlanmıştır.

3.6 İmmünhistokimyasal Belirteçlerin Değerlendirilmesi

İmmünhistokimya preperatları, vakaların klinik özellikleri bilinmeden, tek gözlemci tarafından değerlendirilmiştir.

3.5.1 HIF-1α:

Pozitif kontrol olarak kullanılan torsiyone testis dokusunda spermatogenetik seri elemanlarında nükleer pozitiflik izlenmiştir.

HIF-1α ekpsresyonu görülen olguların büyük kısmında nükleer, bir kısmında da sitoplazmik pozitiflik izlenmiş, yalnızca nükleer pozitiflikler anlamlı kabul edilmiş ve skorlanmıştır.

Nükleer immünreaktivite değerlendirilirken, boyanmanın şiddeti ve yaygınlığı kullanılmıştır. Buna göre, yaygınlık; nükleer boyanma yoksa: 0, tümör

hücrelerinin %30'undan azında ise: 1, %30-60'ı arasında ise: 2, %60'ından fazlasında ise: 3 olarak skorlanmıştır. Şiddet ise; zayıfsa 1, orta şiddette ise 2, pozitif kontrol kadar kuvvetli ise 3 olarak değerlendirilmiştir.

3.5.2 CXCR4:

Pozitif kontrol olarak kullanılan iyi differansiye hepatoselüler karsinom olgusunda sitoplazmik ve membranöz pozitiflik görülmüştür.

CXCR4 ekpsresyonu görülen olgularda ise yalnızca sitoplazmik pozitiflik izlenmiş olup, boyanmanın yaygınlığı ve şiddeti ayrı ayrı skorlanmıştır. Yaygınlık, pozitif tümör hücrelerinin yüzdesine göre 0 ile 3 arasında derecelenmiştir. Buna göre; hiç boyanma yok ise: 0, hücrelerin %30'undan azı pozitifse: 1, %30- 60 'ı pozitifse: 2, %60'tan fazlası pozitifse: 3 skoru verilmiştir. Boyanma şiddeti ise 0 ile 3 arasında derecelendirilmiştir.

3.5.3 Karbonik Anhidraz 9:

CA9 ile olguların büyük kısmında sitoplazmik boyanma izlenmiştir. Ancak yalnızca membranöz boyanma anlamlı kabul edilerek ayrıntıları değerlendirilmiştir. Boyanma yüzdesi değerlendirilirken; tümör hücrelerinde boyanma yoksa: 0, %30'undan azı boyanmışsa: 1, %30-60'ı boyanmışsa: 2, %60'dan fazlası boyanmışsa: 3 skoru verilmiştir. Boyanma şiddeti değerlendirilirken, pozitif kontrol kabul edilen şeffaf hücreli renal hücreli karsinom esas alınmıştır (117). Bu şiddetteki boyanmalar güçlü kabul edilerek, 3 skoru verilmiştir. Orta şiddetteki boyanmalar 2, zayıf boyanmalar ise 1 skorunu almıştır.

Her 3 belirteç değerlendirilirken, boyanma şiddetinin vakalarda genelde homojen olduğu görülmekle birlikte, farklı şiddette boyanma alanları içeren olgularda tümör dokusunun %50'den fazlasında izlenen şiddet esas alınmıştır. Yaygınlık ve şiddet skorları çarpılarak final skorlar elde edilmiştir. Final skorları, 0-3 ise zayıf, 4-6 ise orta, 7-9 ise kuvvetli kabul edilmiştir.

3.7 İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS for Windows 11.5 paket programında yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler sunulurken, yaş için ortalama ± standart sapma, tümör çapı, takip süresi ve immünhistokimyasal belirteçlerin final skorları için minimum-maksimum ve ortanca değerleri, sınıflanabilir değişkenler için de vaka sayıları ve yüzdeleri (%) verilmiş, belirteçlere ait boyanma yaygınlığı, şiddeti ve final skorları olgu sayılarıyla birlikte ifade edilmiştir.

Gruplar arasında belirteçlerin boyanma yaygınlığı, şiddeti ve final skorları yönünden farkın önemliliği bağımsız grup sayısı iki olduğunda Mann Whitney U testi ile, ikiden fazla olduğunda ise Kruskal Wallis testiyle değerlendirilmiştir. Gruplar arasında boyanma final skoru sınıflarının dağılımı Pearson'un Ki-Kare testiyle karşılaştırılmıştır.

Belirteçlerin birbiriyle ve yaş, tümör çapı, tümör grade'i, T, N, M kategorileri ve evre ile aralarında anlamlı korelasyon olup olmadığı Sperman'ın Korelasyon testiyle araştırılmıştır.

Cinsiyet, tümör yerleşim yeri, tümörün makroskopik büyüme paterni gibi değişkenler sınıflanabilir değişken olduğu için bu verileri değerlendirirken varyans analizi ve sıra sayıları testleri yapılmıştır.

$p<0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Yaygınlık, şiddet, final skor değerlerinin tümü ordinal (sıralanabilir) veri olduğu için tanımlayıcı istatistik olarak ortalama yerine ortanca (median), standart sapma yerine, minimum ve maksimum değerler kullanılmıştır. Bu çalışmada ortanca değerleri, karşılaştırılan gruplarda hemen hemen aynı olduğundan, immünhistokimyasal belirteçlerin sonuçları olgu sayıları ile birlikte sunulmuştur.

3.8 Etik Kurul Onayı

Bu çalışma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan 24 Haziran 2009 tarihinde, 391 karar numaralı etik kurul onayı alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri

Bu çalışmada ele alınan 186 hastaya ait demografik ve klinik özellikler Tablo 3-7'de sunulmuştur.

Hastaların ortalama yaşının 56,7 (25-87) olduğu , %53,8'ini erkeklerin, %46,2'sını kadınların oluşturduğu görülmüştür.

Tümörün rektum ve rektosigmoid bölgeden çok (%31,7) kolonda yerleştiği (%68,3), segmentlere göre incelendiğinde ise, en sık rektum ve rektosigmoid bölgeyi (%31,7), en nadir çekumu (%3,2) tuttuğu görülmüştür.

Tablo 3. Olguların demografik ve klinik özellikleri yönünden dağılımı -1

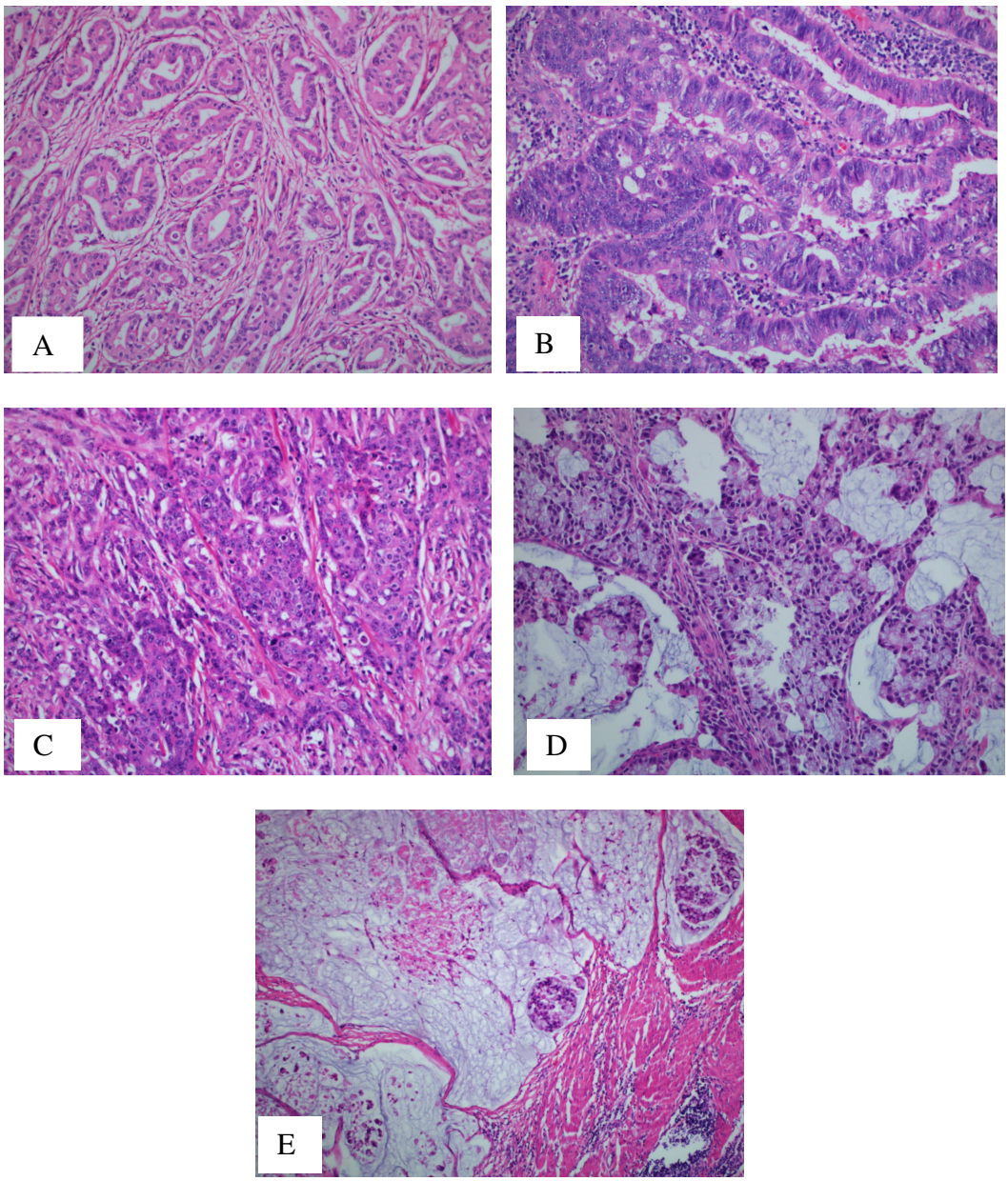
Değişkenler	**n=186**
Yaş	56,7±12,6
Yaş Grupları	
≥50 yaş	133 (%71,5)
<50 yaş	53 (%28,5)
Cinsiyet	
Erkek	100 (%53,8)
Kadın	86 (%46,2)
Lokalizasyon	
Rektum ve rektosigmoid bölge *	59 (%31,7)
Sigmoid kolon	46 (%24,7)
İnen kolon	20 (%10,8)
Transvers kolon	11 (%5,9)
Çıkan kolon	44 (%23,7)
Çekum	6 (%3,2)

(*): Tümörün inferior sınırı anal kenara 16 cm'den daha yakınsa rektal yerleşimlidir. Rektum ve sigmoid kolon geçişinde, tenia colilerin dentat çizginin 12-15 cm proksimalinde füzyonu görülür. Bu bulgu rekrum ve sigmoid kolon ayrımımnda yol göstericidir. Eğer rektum ve sigmoid kolon ayrımı yapılamıyorsa tümör lokalizasyonu rektosigmoid olarak nitelendirilir.

Tümör çapı 0,3 cm ve 13,5 cm arasında değişmekte olup, ortalama tümör çapının 5 cm olduğu görülmüştür.

Makroskopik tümör büyüme paterni, ülserevejetan, deprese ve polipoid olarak sınıflandırılmıştır. Makroskopik büyüme paterninin sıklıkla ülserevejetan olduğu (%60,3), polipoid tümörlerin oldukça nadir görüldüğü (%7,6) dikkati çekmiştir.

Vakalarda sıklık sırasıyla, adenokarsinom (%82,8), müsinöz karsinom (%12,9) ve taşlı yüzük hücreli karsinom (%4,3) olmak üzere 3 histolojik tip izlenmiştir. Bu histolojik tiplere ait örnekler Resim 1'de sunulmuştur.



Resim 1. Histolojik tiplerin örnekleri

(A: İyi differansiye adenokarsinom, B: Orta derecede differansiye adenokarsinom, C: Az differansiye adenokarsinom, D: Taşlı yüzük hücreli karsinom, E: Müsinöz adenokarsinom HEX200)

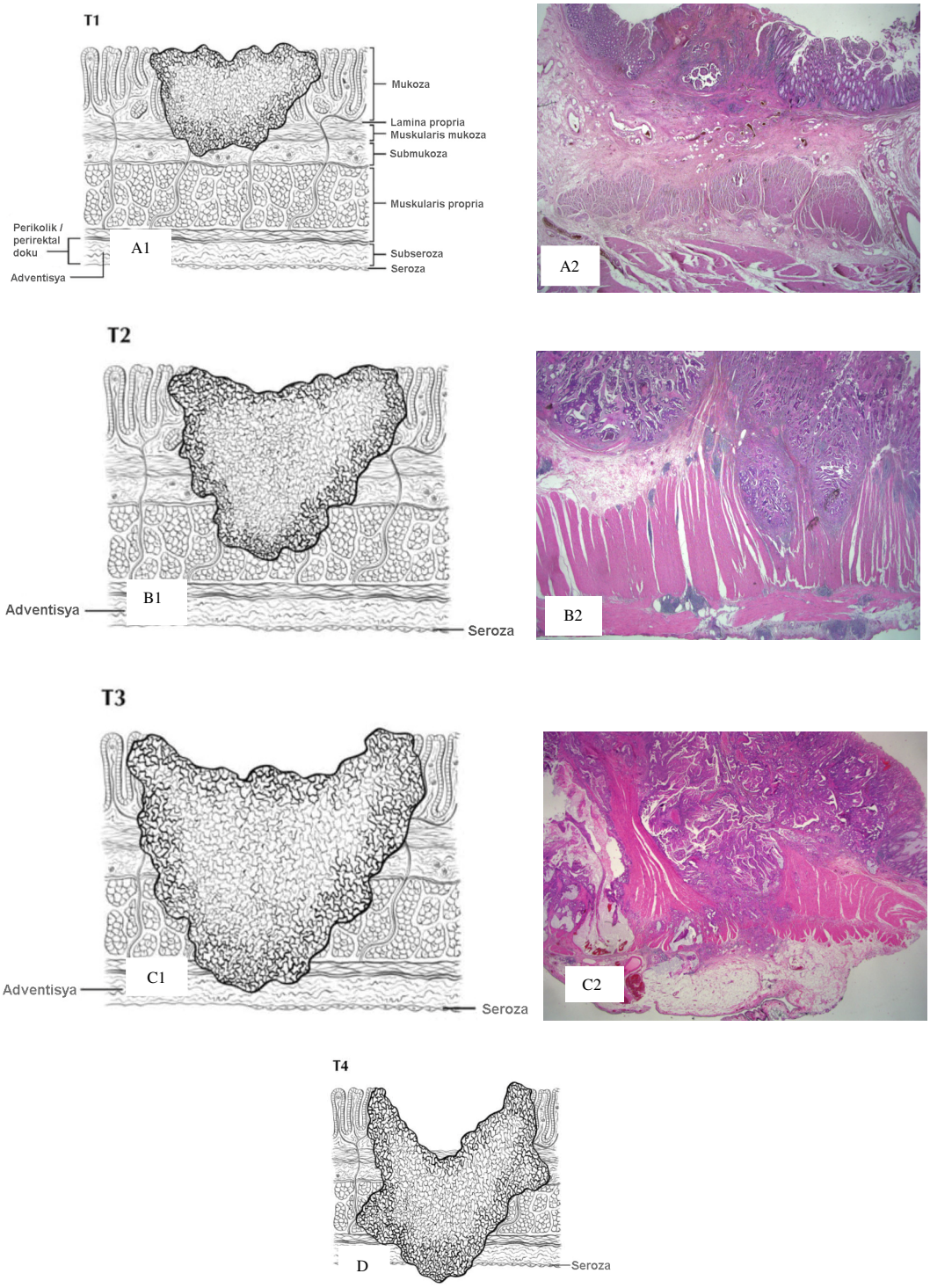
En sık grade 2 (%40,3) tümörlere rastlanmıştır.

Anjiolenfatik invazyon izlenen (85/184) ve izlenmeyen (99/184) vakaların yaklaşık aynı sayıda olduğu görülmüştür.

Tablo 4. Olguların klinik özellikleri yönünden dağılımı -2

Değişkenler	**n=186**
Tümör büyüme paterni	
Ülserevejetan	111 (%59,7)
Deprese	59 (%31,7)
Polipoid	14 (%7,5)
Tümör çapı	5 (0,3-13,5)
Histolojik Tip	
Adenokarsinom	154 (%82,8)
Müsinöz karsinom	24 (%12,9)
Taşlı yüzük hücreli karsinom	8 (%4,3)
Grade	
1	63 (%33,9)
2	75 (%40,3)
3	48 (%25,8)
Anjiolenfatik invazyon	
Pozitif	99 (%53,2)
Negatif	87 (%46,8)

Patolojik tümör evrelerine bakıldığında, pT3 tümörlerin vakaların büyük kısmını (%64) oluşturduğu görülmüştür. pT1 evresinde yalnızca 1 (%0,5), pT2 evresinde ise 7 (%3,8) olgu saptanmıştır. Resim 2'de her bir pT evresine ait olgu fotoğrafları şematik karşılıkları ile birlikte sunulmuştur.



Resim 2. Kolon adenokarsinomlarında T kategorileri

(A: T1, submukoza invazyonu; B: T2, muskularis propria invazyonu; C: T3, subseroza invazyonu, D: T4, Tümör visseral peritona/serozaya ulaşmış, HEX125)

Lenf nodu metastazı izlenen olgu sayısı (%58,6), izlenmeyenlerden daha yüksek (%41,4) bulunmuştur. N evresi 1 (58/186) ve 2 (51/186) olan hasta sayısının yaklaşık olduğu görülmüştür.

Vakaların çoğunda (%72,6) tanı anında uzak organ metastazına rastlanmamıştır.

Hastalar, 6. AJCC/UICC TNM sistemine göre evrelendiğinde vakaların evre III'te yoğunlaştığı dikkati çekmiştir. Vakaların T, N ve M kategorileri ve evrelerine göre dağılımı Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Olguların klinik özellikleri yönünden dağılımı -3

Değişkenler	**n=186**
T	
"1"	1 (%0,5)
"2"	7 (%3,8)
"3"	119 (%64,0)
"4"	59 (%31,7)
N	
"0"	77 (%41,4)
"1"	58 (%31,2)
"2"	51 (%27,4)
M	
"0"	135 (%72,6)
"1"	51 (%27,4)
Evre	
I	5 (%2,6)
IIA	48 (%25,8)
IIB	9 (%4,8)
IIIA	1 (%0,5)
IIIB	35 (%18,8)
IIIC	37 (%19,9)
IV	51 (%27,4)

Hasta takip süreleri 2 ila 109 ay arasında değişmekte olup, ortanca değer 23 ay bulunmuştur. Hastaların klinik takibinde radyolojik ve/veya histopatolojik

inceleme ile ortaya konan uzak organ metastazına % 25,8, lokal nükse ise % 7 oranında rastlanmıştır.

Hastaların %29'unun malignite nedeniyle hayatını kaybettiği görülmüştür.

Tablo 6. Olguların klinik özellikleri yönünden dağılımı -4

Değişkenler	**n=186**
Takip süresi* ortanca değeri (minimum-maksimum)	23 (2-109)
Takipte metastaz gelişimi	48 (%25,8)
Takipte lokal nüks gelişimi	13 (%7,0)
Eksitus	54 (%29,0)

(*): ay

Tanı anındaki uzak organ metastazlarının karaciğerde (%78,4), takiptekilerin ise karaciğer dışı solid organlarda (%60,4) yoğunlaştığı görülmüştür (Tablo 7).

Tablo 7. Olguların klinik özellikleri yönünden dağılımı -5

Değişkenler	
Tanı anında metastaz yeri	**n=51**
Karaciğer (izole ya da karaciğer dışı uzak organla* birlikte)	40 (%78,4)
İzole karaciğer dışı uzak organ **	11 (%21,5)
Takipte metastaz yeri	**n=48**
Karaciğer (izole ya da karaciğer dışı uzak organla*** birlikte)	19 (%39,5)
İzole karaciğer dışı uzak organ ****	29 (%60,4)

(*): periton, akciğer

(**): periton, kemik, over,

(***): periton, kemik

(****): periton, akciğer, kemik, adrenal, pankreas

Evre IV hastaların (51/186) takibinde, 4 hastada yeni metastatik odakların geliştiği görülmüştür.

4.2 İmmünhistokimyasal Bulgular

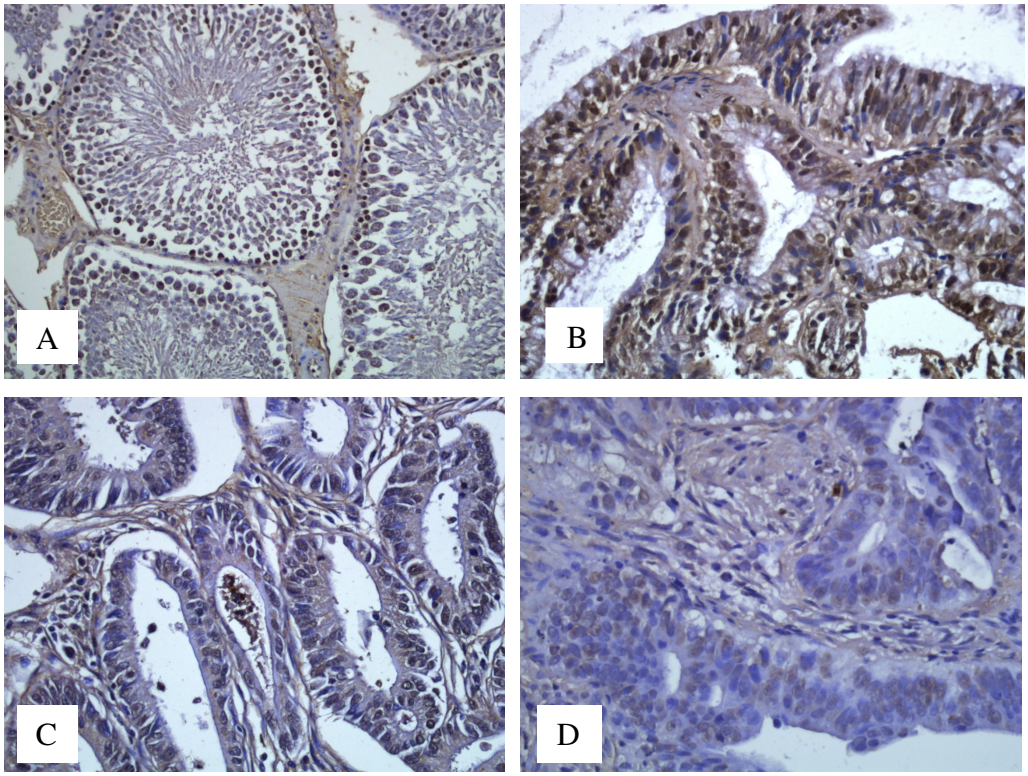
Her bir immünhistokimyasal belirtecin yaygınlık, şiddet ve final skorları yönünden dağılımı Tablo 8-10'da sunulmuştur.

Final skorlara bakıldığında HIF-1α ekspresyonunun sıklıkla zayıf (ortanca değer: 3), nükleer, CXCR4 ekpresyonunun zayıf sitoplazmik (ortanca değer:3) olduğu görülmüştür. CA9'un membranöz ekspresyonuna olguların ancak %15,6'sında rastlanmıştır.

Tablo 8. Olguların HIF-1α yaygınlık, şiddet ve final skorları yönünden dağılımı

Değişkenler	**n=186**
HIF-1α yaygınlık skoru	
"0"	11 (%5,9)
"1"	20 (%10,8)
"2"	28 (%15,1)
"3"	127 (%68,3)
HIF-1α şiddet skoru	
"0"	11 (%5,9)
"1"	81 (%43,5)
"2"	75 (%40,3)
"3"	19 (%10,2)
HIF-1α final skoru ortanca değeri (minimum-maksimum)	3 (0-9)
HIF-1α final skoru	
0-3	95 (%51,1)
4-6	73 (%39,2)
7-9	18 (%9,7)

Her bir belirteç için, değişen şiddet skorlarına ait olgu fotoğrafları pozitif kontrollerle birlikte Resim 3-5' de sunulmuştur.

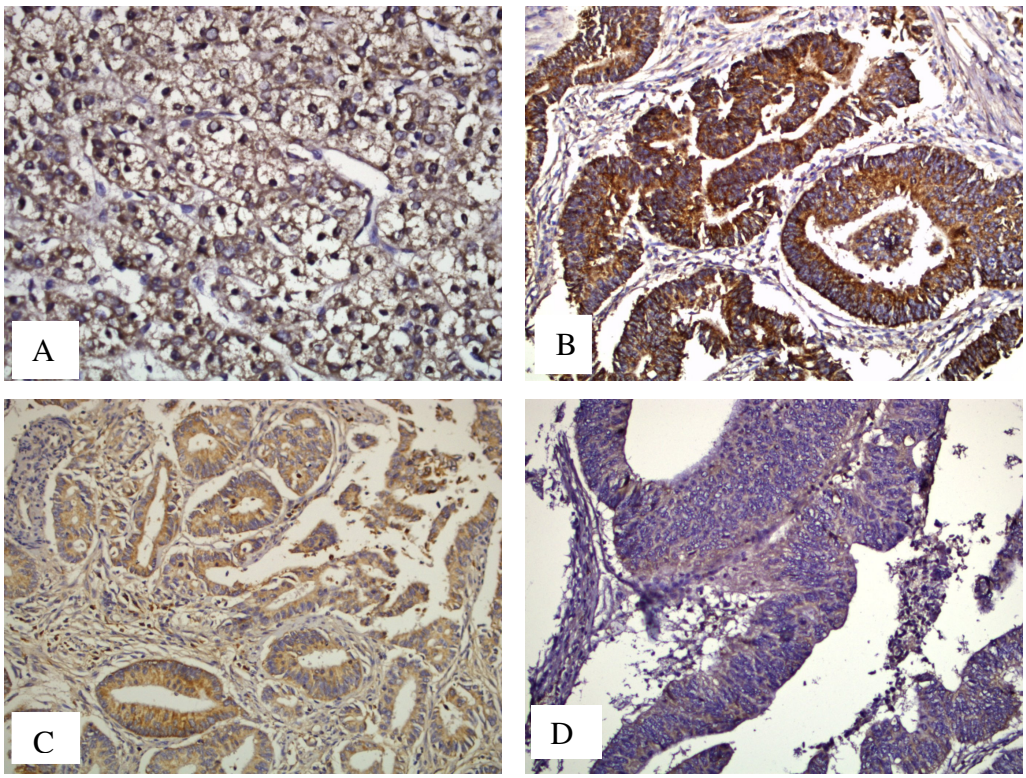


Resim 3. Farklı şiddetlerde nükleer HIF-1α ekpresyonu

(A: pozitif kontrol, B: skor 3, C: skor 2, D: skor 1, DABx400)

Tablo 9. CXCR4 yaygınlık, şiddet ve final skorları yönünden olguların dağılımı

Değişkenler	**n=186**
CXCR4 yaygınlık skoru	
"0"	21 (%11,3)
"1"	27 (%14,5)
"2"	26 (%14,0)
"3"	112 (%60,2)
CXCR4 şiddet skoru	
"0"	21 (%11,3)
"1"	60 (%32,3)
"2"	67 (%36,0)
"3"	38 (%20,4)
CXCR4 final skoru ortanca değeri (minimum-maksimum)	3 (0-9)
CXCR4 final skoru	
0-3	94 (%50,5)
4-6	60 (%32,3)
7-9	32 (%17,2)

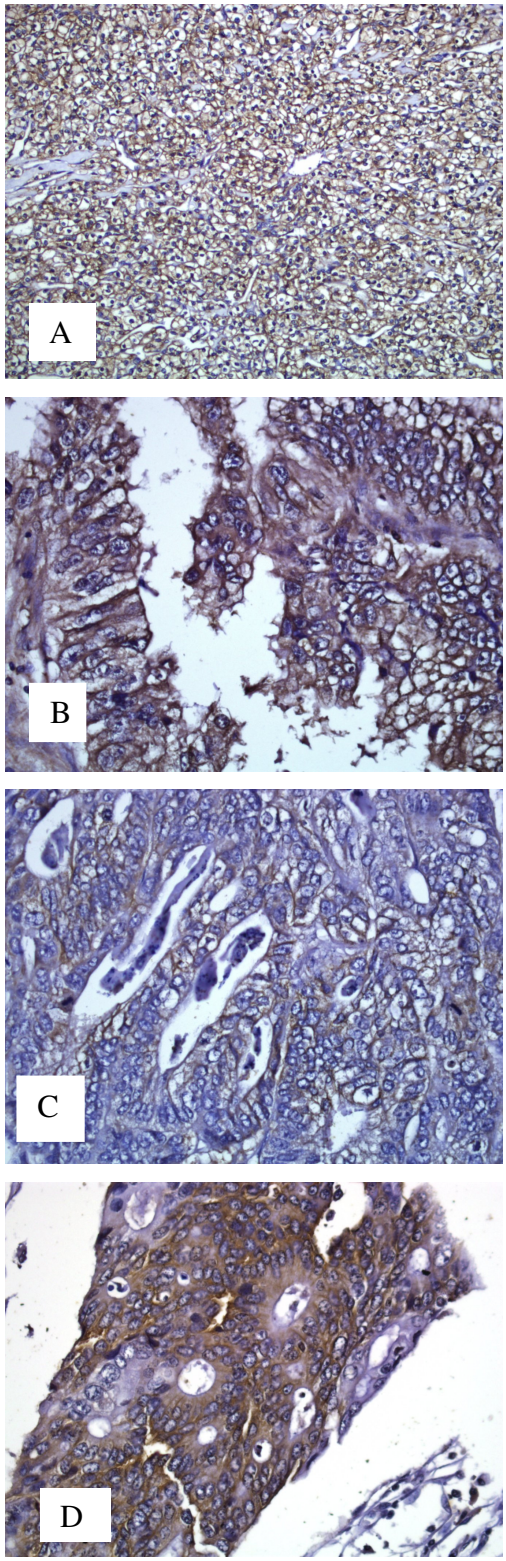


Resim 4. Farklı şiddetlerde sitoplazmik CXCR4 ekspresyonu

(A: pozitif kontrol, B: skor 3, C: skor 2, D: skor 1, DABx400)

Tablo 10. CA9 Yaygınlık, Şiddet ve Final Skorları Yönünden Olguların Dağılımı

Değişkenler	**n=186**
CA9 yaygınlık skoru	
"0"	157 (%84,4)
"1"	11 (%5,9)
"2"	8 (%4,3)
"3"	10 (%5,4)
CA9 şiddet skoru	
"0"	157 (%84,4)
"1"	10 (%5,4)
"2"	8 (%4,3)
"3"	11 (%5,9)
CA9 final skoru ortanca değeri (minimum-maksimum)	0 (0-9)
CA9 final skoru	
0-3	173 (%93,0)
4-6	10 (%5,4)
7-9	3 (%1,6)



Resim 5. Farklı şiddetlerde membranöz CA9 ekpresyonu

(A: pozitif kontrol, DABx200 , B: skor 3, DABX400, C: skor 2, DABX400, D: skor 1, DABx400)

4.3 İmmünhistokimyasal Sonuçların Prognostik Özellikler ile İlişkisi

Bilinen her bir prognostik veri ile her bir immünhistokimyasal belirtecin yaygınlık, şiddet ve final skorları arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Hastalar 50 yaş ve üstü ve 50 yaş altı olarak gruplandırılarak, her 3 belirteçle ilişkisi araştırılmış, ancak istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır (Tablo 11).

Tablo 11. Yaş grupları ve immünhistokimyasal sonuçların ilişkisi

Değişkenler	**<50 Yaş (n=53)**	**≥50 Yaş (n=133)**	**p-değeri**
HIF-1α yaygınlık skoru 0/1/2/3	6/4/9/34	5/16/19/93	0,375
HIF-1α şiddet skoru 0/1/2/3	6/24/19/4	5/57/56/15	0,106
HIF-1α final skoru	3 (0-9)	4 (0-9)	0,197
HIF-1α final skoru 0-3/4-6/7-9	30/20/3	65/53/15	0,423
CXCR4 yaygınlık skoru 0/1/2/3	5/7/10/31	16/20/16/81	0,986
CXCR4 şiddet skoru 0/1/2/3	5/17/18/13	16/43/49/25	0,482
CXCR4 fınal skoru	4 (0-9)	3 (0-9)	0,537
CXCR4 fınal skoru 0-3/4-6/7-9	25/17/11	69/43/21	0,701
CA9 yaygınlık skoru 0/1/2/3	43/2/3/5	114/9/5/5	0,357
CA9 şiddet skoru 0/1/2/3	43/1/2/7	114/9/6/4	0,306
CA9 final skoru	0 (0-9)	0 (0-9)	0,295
CA9 final skoru 0-3/4-6/7-9	46/5/2	127/5/1	0,121

Her 3 belirtecin cinsiyetle ilişkisi araştırıldığında, 2 grup arasında özellikle HIF-1α'nın final skoru açısından anlamlı farklılık saptanmış ($p<0,05$) , erkeklerde daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 12).

Tablo 12. Cinsiyet ve immünhistokimyasal sonuçların ilişkisi

Değişkenler	**Kadın (n=86)**	**Erkek (n=100)**	**p-değeri**
HIF-1α yaygınlık skoru 0/1/2/3	5/13/16/52	6/7/12/75	0,044 *
HIF-1α şiddet skoru 0/1/2/3	5/45/29/7	6/36/46/12	0,050
HIF-1α final skoru	3 (0-9)	6 (0-9)	0,013 *
HIF-1α final skoru 0-3/4-6/7-9	52/28/6	43/45/12	0,055
CXCR4 yaygınlık skoru 0/1/2/3	12/14/12/48	9/13/14/64	0,196
CXCR4 şiddet skoru 0/1/2/3	12/28/29/17	9/32/38/21	0,415
CXCR4 fınal skoru	3 (0-9)	4 (0-9)	0,188
CXCR4 fınal skoru 0-3/4-6/7-9	48/23/15	46/37/17	0,302
CA9 yaygınlık skoru 0/1/2/3	71/9/4/2	86/2/4/8	0,703
CA9 şiddet skoru 0/1/2/3	71/7/2/6	86/3/6/5	0,560
CA9 final skoru	0 (0-6)	0 (0-9)	0,697
CA9 final skoru 0-3/4-6/7-9	83/3/0	90/7/3	0,081

(*): İstatistiksel olarak anlamlı p değerleri

İmmünhistokimya sonuçları ile tümör lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tablo 13).

Tablo 13. Tümör lokalizasyonu ve immünhistokimyasal sonuçların ilişkisi

Değişkenler	**Rektum ve Rektosigmoid (n=59)**	**Kolon (n=127)**	**p-değeri**
HIF-1α yaygınlık skoru 0/1/2/3	2/6/8/43	9/14/20/84	0,324
HIF-1α şiddet skoru 0/1/2/3	2/25/26/6	9/56/49/13	0,451
HIF-1α final skoru	4 (0-9)	3 (0-9)	0,482
HIF-1α final skoru 0-3/4-6/7-9	29/25/5	66/48/13	0,816
CXCR4 yaygınlık skoru 0/1/2/3	9/7/8/35	12/20/18/77	0,707
CXCR4 şiddet skoru 0/1/2/3	9/17/23/10	12/43/44/28	0,496
CXCR4 fınal skoru	4 (0-9)	3 (0-9)	0,740
CXCR4 fınal skoru 0-3/4-6/7-9	29/22/8	65/38/24	0,502
CA9 yaygınlık skoru 0/1/2/3	52/1/3/3	105/10/5/7	0,395
CA9 şiddet skoru 0/1/2/3	52/2/1/4	105/8/7/7	0,383
CA9 final skoru	0 (0-9)	0 (0-9)	0,416
CA9 final skoru 0-3/4-6/7-9	54/4/1	119/6/2	0,849

Olgular, tümör çapının 5 cm'yi aşıp aşmamasına göre 2 gruba ayrılarak immünhistokimyasal bulgularla ilişkisi araştırıldığında, HIF-1α ve CXCR4 yaygınlığının, CXCR4 şiddet ve final skorlarının 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu ($p<0,05$), tümör çapı arttıkça bu belirteçlerin ekpresyonunun azaldığı görülmüştür (Tablo 14).

Tablo 14. Tümör çapı ve immünhistokimyasal sonuçlar arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri

	Tümör Çapı	
	r	*p*
CA9 YAYGINLIK	-0,055	0,458
CA9 ŞİDDET	-0,063	0,396
CA9 FİNAL	-0,058	0,436
CXCR4 YAYGINLIK	-0,154	0,036*
CXCR4 ŞİDDET	-0,142	0,053 *
CXCR4 FINAL	-0,162	0,028*
HIF 1 YAYGINLIK	-0,188	0,010*
HIF 1 ŞİDDET	-0,089	0,227
HIF 1 FİNAL	-0,129	0,081

(*): İstatistiksel olarak anlamlı p değerleri

Tümörler, makroskopik büyüme paterni ülserevejetan ve deprese olanlar ile polipoid olanlar şeklinde iki gruba ayrılarak, immünhistokimya sonuçları ile ilişkisi değerlendirilmiş, ülserevejetan ve deprese grubunda CA9 yaygınlık, şiddet ve final skorları polipoid olanlardan istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) yüksek bulunmuştur (Tablo 15) .

Tablo 15. Tümörün makroskopik büyüme paterni ve immünhistokimyasal sonuçların ilişkisi

Değişkenler	**Ülserevejetan /Deprese (n=170)**	**Polipoid (n=14)**	**p-değeri**
HIF-1α yaygınlık skoru 0/1/2/3	11/18/26/115	0/2/2/10	0,709
HIF-1α şiddet skoru 0/1/2/3	11/74/71/14	0/7/4/3	0,507
HIF-1α final skoru	3 (0-9)	4,5 (1-9)	0,501
HIF-1α final skoru 0-3/4-6/7-9	88/69/13	7/4/3	0,192
CXCR4 yaygınlık skoru 0/1/2/3	17/27/24/102	2/0/2/10	0,442
CXCR4 şiddet skoru 0/1/2/3	17/54/63/36	2/6/4/2	0,285
CXCR4 fınal skoru	4 (0-9)	3 (0-9)	0,836
CXCR4 fınal skoru 0-3/4-6/7-9	84/56/30	8/4/2	0,854
CA9 yaygınlık skoru 0/1/2/3	146/9/6/9	9/2/2/1	0,040 *
CA9 şiddet skoru 0/1/2/3	146/8/7/9	9/2/1/2	0,035 *
CA9 final skoru	0 (0-9)	0 (0-6)	0,039 *
CA9 final skoru 0-3/4-6/7-9	159/8/3	12/2/0	0,346

(*): İstatistiksel olarak anlamlı p değerleri

Vakalar histolojik gradelerine göre, grade 1 ve 2 olanlar ile 3 olanlar şeklinde 2 gruba ayrılarak incelendiğinde, CXCR4 yaygınlık ve final skorlarının grade 1 ve 2 olanlarda, 3 olanlardan daha yüksek olduğu ($p<0,05$) bulunmuştur (Tablo 16).

Tablo 16. Tümörün histolojik grade'i ve immünhistokimyasal sonuçlar arası ilişki

Değişkenler	**Grade 1 ve2 (n=138)**	**Grade 3 (n=48)**	**p-değeri**
HIF-1α yaygınlık skoru 0/1/2/3	6/13/20/99	5/7/8/28	0,059
HIF-1α şiddet skoru 0/1/2/3	6/60/58/14	5/21/17/5	0,360
HIF-1α final skoru	4 (0-9)	3 (0-9)	0,194
HIF-1α final skoru 0-3/4-6/7-9	68/56/14	27/17/4	0,704
CXCR4 yaygınlık skoru 0/1/2/3	13/19/15/91	8/8/11/21	0,013*
CXCR4 şiddet skoru 0/1/2/3	13/43/51/31	8/17/16/7	0,095
CXCR4 fınal skoru	4 (0-9)	3 (0-9)	0,030*
CXCR4 fınal skoru 0-3/4-6/7-9	65/47/26	29/13/6	0,270
CA9 yaygınlık skoru 0/1/2/3	116/9/6/7	41/2/2/3	0,869
CA9 şiddet skoru 0/1/2/3	116/7/7/8	41/3/1/3	0,817
CA9 final skoru	0 (0-9)	0 (0-9)	0,844

(*): İstatistiksel olarak anlamlı p değerleri

Anjiolenfatik invazyon varlığı ile immünhistokimyasal belirteçler arasında ilişkisi saptanmamıştır (Tablo 17).

Tablo 17. Anjiolenfatik invazyon ve immünhistokimyasal sonuçlar arası ilişki

Değişkenler	**Negatif (n=87)**	**Pozitif (n=99)**	**p-değeri**
HIF-1α yaygınlık skoru 0/1/2/3	7/11/9/58	4/9/18/68	0,655
HIF-1α şiddet skoru 0/1/2/3	7/34/32/12	4/46/43/6	0,620
HIF-1α final skoru	3 (0-9)	3 (0-9)	0,836
HIF-1α final skoru 0-3/4-6/7-9	44/29/12	50/44/5	0,070
CXCR4 yaygınlık skoru 0/1/2/3	7/13/15/50	13/14/11/61	0,974
CXCR4 şiddet skoru 0/1/2/3	7/33/27/18	13/27/39/20	0,818
CXCR4 final skoru	3 (0-9)	4 (0-9)	0,549
CXCR4 final skoru 0-3/4-6/7-9	47/26/12	46/33/20	0,409
CA9 yaygınlık skoru 0/1/2/3	72/4/3/6	83/7/5/4	0,951
CA9 şiddet skoru 0/1/2/3	72/6/2/5	83/4/6/8	0,828
CA9 final skoru	0 (0-9)	0 (0-9)	0,880
CA9 final skoru 0-3/4-6/7-9	80/3/2	91/7/1	0,443

T kategorileri 1-2 ve 3-4 olarak gruplandığında immünhistokimyasal bulgular açısından gruplar arası fark bulunmamıştr (Tablo 18).

Tablo 18. T kategorisi ve immünhistokimyasal sonuçlar arası ilişki

Değişkenler	**Evre I-II (n=8)**	**Evre III-IV (n=178)**	**p-değeri**
HIF-1α yaygınlık skoru 0/1/2/3	0/0/0/8	11/20/28/119	0,054
HIF-1α şiddet skoru 0/1/2/3	0/6/2/0	11/75/73/19	0,200
HIF-1α final skoru	3 (3-6)	3,5 (0-9)	0,841
HIF-1α final skoru 0-3/4-6/7-9	6/2/0	89/71/18	0,143
CXCR4 yaygınlık skoru 0/1/2/3	1/3/0/4	20/24/26/108	0,401
CXCR4 şiddet skoru 0/1/2/3	1/2/2/3	20/58/65/35	0,488
CXCR4 fınal skoru	3 (0-9)	3,5 (0-9)	0,793
CXCR4 fınal skoru 0-3/4-6/7-9	5/1/2	89/59/30	0,741
CA9 yaygınlık skoru 0/1/2/3	8/0/0/0	149/11/8/10	0,217
CA9 şiddet skoru 0/1/2/3	8/0/0/0	149/10/8/11	0,217
CA9 final skoru	0 (0-0)	0 (0-9)	0,217
CA9 final skoru 0-3/4-6/7-9	8/0/0	165/10/3	0,429

Lenf nodu metastazı varlığı ile immünhistokimyasal bulgular arası ilişki bulunmamıştır (Tablo 19).

Tablo 19. N kategorisi ve ve immünhistokimyasal sonuçlar arası ilişki

Değişkenler	**N0 (n=77)**	**N1 ve N2 (n=109)**	**p-değeri**
HIF-1α yaygınlık skoru 0/1/2/3	5/7/13/52	6/13/15/75	0,916
HIF-1α şiddet skoru 0/1/2/3	5/32/31/9	6/49/44/10	0,725
HIF-1α final skoru	3 (0-9)	3 (0-9)	0,755
HIF-1α final skoru 0-3/4-6/7-9	39/29/9	56/44/9	0,763
CXCR4 yaygınlık skoru 0/1/2/3	11/9/11/46	10/18/15/66	0,792
CXCR4 şiddet skoru 0/1/2/3	11/23/28/15	10/37/39/23	0,640
CXCR4 final skoru	3 (0-9)	3 (0-9)	0,777
CXCR4 final skoru 0-3/4-6/7-9	39/28/10	55/32/22	0,636
CA9 yaygınlık skoru 0/1/2/3	65/3/3/6	92/8/5/4	0,892
CA9 şiddet skoru 0/1/2/3	65/5/2/5	92/5/6/6	0,986
CA9 final skoru	0 (0-9)	0 (0-9)	0,937
CA9 final skoru 0-3/4-6/7-9	71/4/2	102/6/1	0,700

Tanı anında metastaz varlığı ve immünhistokimyasal sonuçlar arası ilişki bulunmamıştır (Tablo 20).

Tablo 20. Tanı anında metastaz varlığı ve immünhistokimyasal sonuçlar arası ilişki

Değişkenler	**Metastaz Yok (n=135)**	**Metastaz Var (n=51)**	**p-değeri**
HIF-1α yaygınlık skoru 0/1/2/3	9/17/19/90	2/3/9/37	0,319
HIF-1α şiddet skoru 0/1/2/3	9/60/55/11	2/21/20/8	0,245
HIF-1α final skoru	3 (0-9)	6 (0-6)	0,228
HIF-1α final skoru 0-3/4-6/7-9	71/54/10	24/19/8	0,289
CXCR4 yaygınlık skoru 0/1/2/3	17/21/20/77	4/6/6/35	0,143
CXCR4 şiddet skoru 0/1/2/3	17/39/56/23	4/21/11/15	0,667
CXCR4 final skoru	4 (0-9)	3 (0-9)	0,386
CXCR4 final skoru 0-3/4-6/7-9	66/51/18	28/9/14	0,817
CA9 yaygınlık skoru 0/1/2/3	117/5/7/6	40/6/1/4	0,195
CA9 şiddet skoru 0/1/2/3	117/8/4/6	40/2/4/5	0,137
CA9 final skoru	0 (0-9)	0 (0-9)	0,170
CA9 final skoru 0-3/4-6/7-9	126/7/2	47/3/1	0,777

Vakalar erken (Evre I ve II) ve ileri evre (Evre III ve IV) olarak gruplandırıldığında, immünhistokimya sonuçları ile ilişkisi görülmemiştir (Tablo 21).

Tablo 21. Hastalık evresinin ve immünhistokimyasal sonuçların ilişkisi

Değişkenler	**Erken Evre (n=62)**	**İleri Evre (n=124)**	**p-değeri**
HIF-1α yaygınlık skoru 0/1/2/3	5/6/10/41	6/14/18/86	0,623
HIF-1α şiddet skoru 0/1/2/3	5/26/24/7	6/55/51/12	0,861
HIF-1α final skoru	3 (0-9)	3,5 (0-9)	0,803
HIF-1α final skoru 0-3/4-6/7-9	33/22/7	62/51/11	0,715
CXCR4 yaygınlık skoru 0/1/2/3	9/7/10/36	12/20/16/76	0,646
CXCR4 şiddet skoru 0/1/2/3	9/17/25/11	12/43/42/27	0,750
CXCR4 fınal skoru	4 (0-9)	3 (0-9)	0,820
CXCR4 fınal skoru 0-3/4-6/7-9	30/25/7	64/35/25	0,146
CA9 yaygınlık skoru 0/1/2/3	53/2/2/5	104/9/6/5	0,885
CA9 şiddet skoru 0/1/2/3	53/5/1/3	104/5/7/8	0,704
CA9 final skoru	0 (0-9)	0 (0-9)	0,796
CA9 final skoru 0-3/4-6/7-9	58/2/2	115/8/1	0,323

Tanı ya da takibinde karaciğer metastazı gelişen ve gelişmeyen vakalar arasında immünhistokimyasal bulgular yönünden farklılık saptanmamıştır (Tablo 22).

Tablo 22. Tanı ya da takipte uzak organ metastazı durumunun ve immünhistokimyasal Sonuçların İlişkisi

Değişkenler	**Metastaz Yok (n=90)**	**KC Metastazı* (n=59)**	**KC Dışı Metastaz (n=37)**	**p-değeri**
HIF-1α yaygınlık skoru 0/1/2/3	6/11/16/57	3/5/7/44	2/4/5/26	0,373
HIF-1α şiddet skoru 0/1/2/3	6/36/40/8	3/26/23/7	2/19/12/4	0,778
HIF-1α final skoru	4 (0-9)	3 (0-9)	3 (0-9)	0,814
HIF-1α final skoru 0-3/4-6/7-9	43/40/7	30/22/7	22/11/4	0,573
CXCR4 yaygınlık skoru 0/1/2/3	10/13/14/53	5/6/5/41	6/6/7/18	0,157
CXCR4 şiddet skoru 0/1/2/3	10/26/37/17	5/23/16/15	6/11/14/6	0,750
CXCR4 fınal skoru	4 (0-9)	3 (0-9)	3 (0-9)	0,467
CXCR4 fınal skoru 0-3/4-6/7-9	43/33/14	31/14/14	20/13/4	0,317
CA9 yaygınlık skoru 0/1/2/3	80/5/3/2	44/5/4/6	33/1/1/2	0,137
CA9 şiddet skoru 0/1/2/3	80/6/2/2	44/4/4/7	33/0/2/2	0,073
CA9 final skoru	0 (0-6)	0 (0-9)	0 (0-9)	0,094
CA9 final skoru 0-3/4-6/7-9	87/3/0	52/5/2	34/2/1	0,200

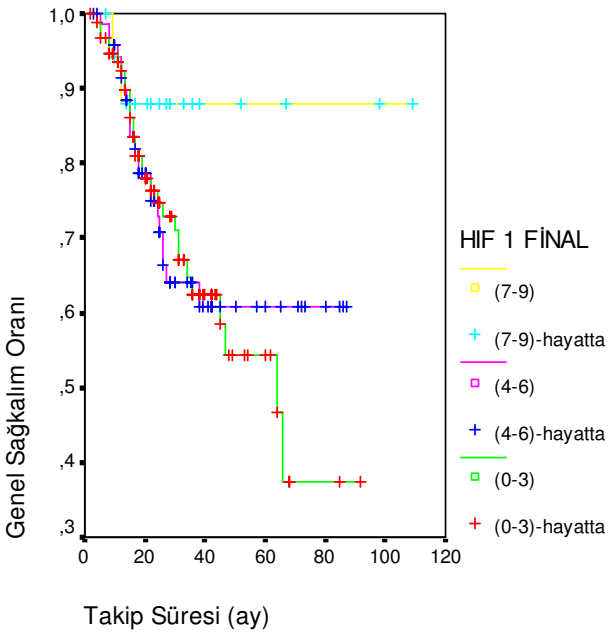
(*): İzole karaciğer metastazı ya da karaciğer dışı uzak organla birlikte

Takipte lokal nüks gelişimi ile immünhistokimyasal bulgular arasında ilişkisi saptanmamıştır (Tablo 23).

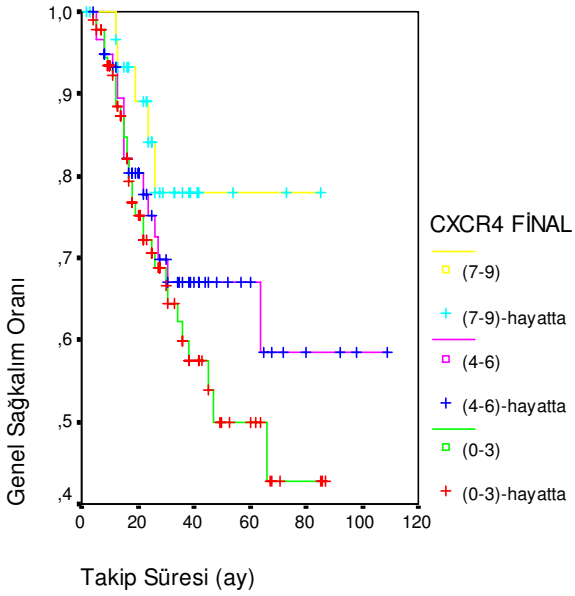
Tablo 23. Takipte lokal nüks gelişiminin ve immünhistokimyasal sonuçların ilişkisi

Değişkenler	**Lokal Nüks Yok (n=173)**	**Lokal Nüks Var (n=13)**	**p-değeri**
HIF-1α yaygınlık skoru 0/1/2/3	10/18/25/120	1/2/3/7	0,273
HIF-1α şiddet skoru 0/1/2/3	10/75/71/17	1/6/4/2	0,892
HIF-1α final skoru	3 (0-9)	3 (0-9)	0,633
HIF-1α final skoru 0-3/4-6/7-9	88/68/17	7/5/1	0,961
CXCR4 yaygınlık skoru 0/1/2/3	19/23/25/106	2/4/1/6	0,205
CXCR4 şiddet skoru 0/1/2/3	19/54/63/37	2/6/4/1	0,150
CXCR4 fınal skoru	4 (0-9)	2 (0-9)	0,061
CXCR4 fınal skoru 0-3/4-6/7-9	85/57/31	9/3/1	0,335
CA9 yaygınlık skoru 0/1/2/3	146/10/8/9	11/1/0/1	0,986
CA9 şiddet skoru 0/1/2/3	146/9/8/10	11/1/0/1	0,980
CA9 final skoru	0 (0-9)	0 (0-9)	0,990
CA9 final skoru 0-3/4-6/7-9	161/10/2	12/0/1	0,198

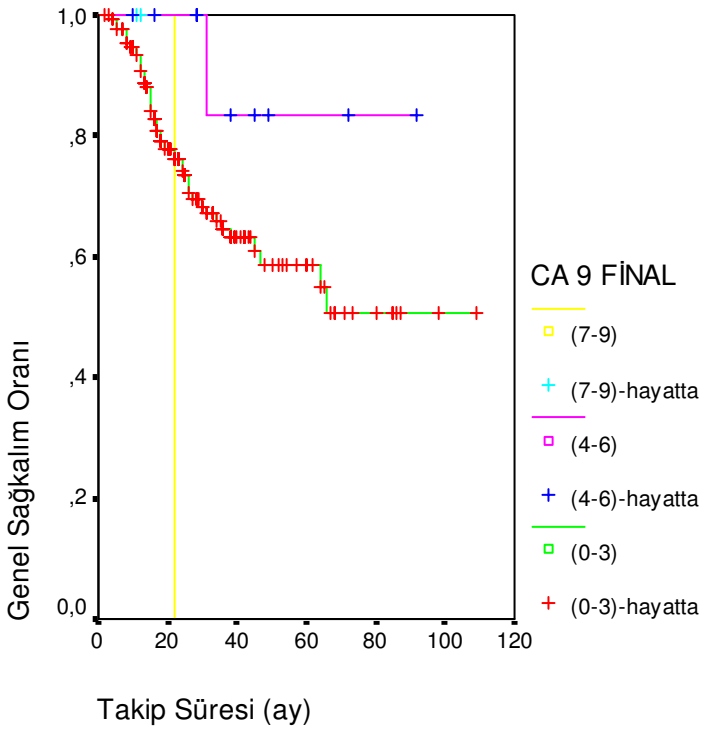
İmmünhistokimya sonuçlarından hiçbiri ile (şiddet, yaygınlık ve final skorları) genel sağ kalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Her 3 belirteç için final skorlar ile elde edilen, Kaplan Meier eğrileri Şekil 7-9 'da sunulmuştur.



Şekil 7. HIF-1α final skoruna göre Kaplan Meier genel sağkalım eğrileri



Şekil 8. CXCR4 final skoruna göre Kaplan Meier genel sağkalım eğrileri



Şekil 9. CA 9 final skoruna göre Kaplan Meier genel sağkalım eğrileri

Her 3 belirtecin tümörogenezde birbiri ile ilişkili yollarda görev aldığının tartışılması nedeniyle, ekspresyonları arası ilişki araştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Tablo 24).

Tablo 24. Markerlerin boyanma yaygınlık, şiddet ve final skorlarının birbirleri arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri

	CA9-CXCR4		**CA9-HIF1**		**HIF1-CXCR4**	
	r	*p*	*r*	*p*	*r*	*p*
YAYGINLIK	-0,027	0,711	-0,066	0,374	-0,038	0,607
ŞİDDET	-0,030	0,687	0,003	0,968	-0,023	0,755
FİNAL	-0,040	0,584	-0,019	0,798	-0,020	0,790

5. TARTIŞMA

Kolorektal karsinomlar, en sık görülen kanserler arasında dünyada 3. ülkemizde ise, 2006 yılı Sağlık Bakanlığı verilerine göre, erkeklerde 4. , kadınlarda ise 2. sırada yeralmaktadır. Hem erkekler hem de kadınlar için, halen yüksek mortalite ve morbidite nedenidir (118). Avrupa birliğinde yıllık kolorektal karsinom insidansı ve mortalitesi sırasıyla 58/100.000 ve 30/100.000 olarak bildirilmektedir (119) . Erken tanı, klinik prognostik parametrelerin iyi anlaşılması ve kemoterapi veya radyoterapi ile kombine edilen cerrahi tedavi yöntemleri sayesinde tedavi etkinliği artmıştır. Florourasil ile kombine oksaliplatin, lökovorin (folinik asit) ve irinotekan kullanımı son zamanlarda uygulanan etkin tedavi yötemlerindendir (120). Hedefe yönelik tedaviler arasında öne çıkan cetuximab ve panitumumab ise epitelial büyüme faktör reseptörüne (EGFR) karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlardır.Bu ajanlar ileri evre kolorektal karsinomlu hastalarda kullanım için sırasıyla 2004 ve 2006 yıllarında FDA onayı almışlardır ve ülkemizde de bazı hastalara uygulanabilmektedir. Bu ilacın kullanılabilmesi için kolon karsinomlu hastaların tümörlerinde K-ras onkogeninin doğal halde (wild tip) bulunması gerekmektedir. Eğer tümördeki bu onkogen mutant ise, EGFR blokörü antikorların etkili olması beklenmemektedir.

Gelişen tedavi yöntemlerine rağmen gastrointestinal sistem kanserlerinde, ideal tedavi yönteminin seçilmesi halen önemli bir sorundur. Her ne kadar bir miktar başarı sağlanabildiyse de, hastanın prognozunu, tedaviye cevabını, tedavinin toksisitesini ve hastalık rekürrensini öngörmek için daha geçerli belirteçlere ihtiyaç vardır. Böylelikle, kemoterapiye cevap verme ihtimali daha

yüksek hastalar seçilebilecek, hastaya ve tümöre spesifik molekülleri hedefleyen tedavi yöntemleri uygulanabilecektir (121). Nitekim cetuximab gibi hedefe yönelik tedavi protokollerinin, önümüzdeki yıllarda tümör genetiğindeki çalışmaların ışığında daha da gelişeceği açıktır.

Kolorektal karsinomlarda her ne kadar erken evre hastalarda 5 yıllık yaşam %90' a yaklaşsa da, sağ kalımın uzak metastaz ve lokal nüks varlığında dramatik düşüşü (% 19) dikkati çekmektedir. Kolorektal karsinomların uzak organ metastazlarında karaciğer öne çıkmakta ve mortalitenin başlıca nedeni olmaktadır (47, 48, 122). Kolorektal karsinomlarda ileri evre hastalığın ve mortalitenin sık rastlanan diğer bir nedeni de peritoneal metastazlardır. Li ve arkadaşları kolorektal karsinoma ait hücre serileri ile yaptıkları fare deneylerinde, peritoneal ve intradermal tümör modelleri oluşturarak mikroskopik tümör odaklarında hipoksiyi araştırmışlardır. 1 mm'den küçük tümörlerin vasküler desteğinin ve perfüzyonunun çok düşük olduğunu bulmuşlardır. Dolayısıyla 1 mm'den küçük tümörler ve asit içinde serbest olarak yüzen tümör hücreleri, hipoksik tümör odaklarıdır. 1-4 mm çapa ulaşan tümörlerde, vasküler yapı gelişmekte ve hipoksik alan kalmamaktadır. 4 mm'yi geçen tümörlerde ise, nekroz odakları ile karakterize tipik hipoksi bulguları izlenmiştir (123, 124).

Kanser biyokimyasının ilgi çekici bir araştırma konusu olduğu 1950'li yıllardan sonra, hipoksi-tümörogenez ilişkisi ortaya atılmıştır. Hipoksinin immünhistokimyasal olarak tesbitine yönelik çalışmalar ise son 10 yılda gündeme gelmiş ve özellikle son 5 yılda hız kazanmıştır(125). Böylelikle hipoksi göstergesi olabileceği düşünülen immünhistokimyasal belirteçler de, malignitelerde

prognostik önemi tartışılan parametreler arasında yerini almıştır. Bunlardan gündemde olan ikisi HIF-1α ve CA9'dur.

Tedavi yöntemlerindeki gelişmelerle birlikte, kemoterapötiklerin yalnız başına ya da radyoterapi ile birlikte lokorejyonel uygulamaları gündeme gelmiştir (124). Tümördeki hipoksi paterninin anlaşılması ve hipoksi derecesinin azaltılması, kolorektal tümörlerin pimer odakları yanı sıra, peritoneal metastazları için de denenen tedavi yöntemlerinin efikasitesini arttıracaktır (123).

Kolorektal karsinomlarda moleküler yöntemlerle tanımlanan prognostik genetik değişiklikler olmasına rağmen, bunların rutin kullanıma girememesi ve immünhistokimyanın nisbeten ucuz bir yöntem oluşu, prognostik immünhistokimyasal belirteçler aramayı ilgi çekici kılmaktadır. Ancak, kolorektal karsinomlarda henüz immunhistokimyasal olarak geçerli, TNM evrelemesine ve diğer morfolojik özelliklere üstünlüğü olan prognostik ve prediktif belirteç sunulmamıştır. Gündemde olan immünhistokimyasal belirteçlerin başlıcaları, kolorektal tümorogenezde rol alan sinyal yollarının proteinleri (WNT sinyal yolağı: β-katenin, APC, E-kaderin; TGF-β yolağı: TGF-β, SMAD proteinleri; RAS-MAP kinaz yolağı: RKIP, RHAMM) hücre döngüsü durdurucuları (p53, p27, p21), apopitozis (Bcl-2, Bax) ya da proliferasyon (Ki-67) göstergeleridir (126). Bu proteinlerin prognostik değeri henüz tedaviye yön verecek kadar aydınlığa kavuşmamıştır, ancak p21, p53 ekpsresyonundaki artış ve p27 ekpsresyon kaybının kötü prognostik faktörler olduğu düşünülmektedir. VEGF ve EGFR tedavi yansımaları da olan diğer umut verici belirteçlerdir. Ancak gözlemciler arası skorlama farklılıkları, uyum sorunu, araştırma metodlarındaki farklılıklar ve

yetersiz örneklem büyüklüğü gibi sorunlar nedeniyle immünhistokimya sonuçlarında çelişkili sonuçlara varılmaktadır. Doku mikroarray blokları ile çalışmanın bu çelişkili sonuçların önüne geçmede katkısının olacağı düşünülmektedir. Doku mikroarray yöntemi ile skorlanacak tümör alanının küçük olması gözlemciler arası farkı azaltmaktadır. Bu yöntemin bir diğer avantajı aynı örnekte çok sayıda belirteç çalışılabilmesi ve ilişkilerinin ortaya konabilmesidir (126).

HIF-1α ile ilgili çalışmalar 1990'ların sonlarında gündeme gelmiştir. Normal dokuda ve birçok kanser türünde (ör: prostat, mide, oral kavite, serviks uteri, endometrium) immünhistokimyasal olarak tesbitine dayalı çok sayıda çalışma mevcuttur (1, 127-132).

Zhong ve arkadaşları 19 farklı malignite ve 21 farklı nonneoplastik dokudan oluşan 353 vakalık bir çalışma yapmışlardır. Ancak serideki kolon adenokarsinomlu olgu sayısı 22, nonneoplastik kolon örneği sayısı ise 24 ile sınırlıdır. HIF-1α'nın normal dokularda çoğu zaman negatif olduğu görülmüştür. Kondrositler, adrenal korteks, böbreğin distal tübül epiteli, pankreasın asiner hücreleri, testis seminifer tübülleri nadiren fokal HIF-1α ekspresyonu gösteren nontümöral dokulardır. Adrenal kortekste, fetal karaciğerde, böbrek distal tüp epitelinde, dalak ve tonsildeki B hücrelerindeki zayıf HIF-1α pozitifliğine, bu hücrelerdeki yüksek Ki-67 proliferasyon indeksinin de eşlik ettiği raporlanmıştır. İncelenen 19 malign tümör tipinden 13'ünde (kolon, meme, pankreas, mide, prostat adenokarsinomları, akciğerin küçük hücreli karsinomu ve adenokarsinomu, over karsinomu, glial tümörler, renal hücreli karsinom, mezotelyoma, malign

melanom ve malign fibröz histiyositom) normal doku ile karşılaştırıldığında artmış HIF-1α ekspresyonu saptanmıştır (1, 40, 133, 134). Bu durum p53 ekspresyon oranları ile de korele bulunmuştur. Meme ve uterusun benign tümörlerinde (fibroadenom ve leiomyom) HIF-1α negatifken, meme, kolon ve prostatın preneoplastik lezyonlarında (komedo tipte intraduktal karsinom, prostatik intraepitelyal neoplazi ve adenomatöz polip) ekspresyonu saptanmıştır. Özetle, normal dokudan, premalign lezyona ve karsinoma giden süreçte artan HIF-1α ekspresyonu görülmüştür. HIF-1α'nın tümörogenezdeki rolüne işaret eden bu bulgulara ek olarak, boyanma paterni (özellikle tümörün periferinde ya da neovaskülarizasyon gösteren alanlarında yoğunlaşan boyanma) ve metastazlarda primer tümöre göre daha yüksek pozitifliği nedeniyle kanser progresyonunda da rolü olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonucu, beyin tümörlerinin derecesi ile HIF-1α ekspresyonun paralellik göstermesi de desteklemektedir (1).

Talk ve arkadaşları ise 5 adet kolon adeokarsinom olgusunun da bulunduğu farklı malign tümörleri içeren 57 vakayı incelemişlerdir.

Tablo 25. Literatürde bildirilen HIF-1α pozitiflik yüzdeleri

Tümör tipi	**HIF-1α pozitif tümörler**	
	Zhong ve ark	**Talks ve ark**
Prostat Adenokarsinomu	%82	%40
Kolon Adenokarsinomu	%100	%80
Meme Adenokarsinomu	%29	%83
Yüksek dereceli glial tümör		%40

Zhong ve Talk'ın serilerinde bildirilen malignitelerin bir kısmına ait HIF-1α ekpresyon sıklığı Tablo 25'te sunulmuştur. Her iki seride de HIF-1α'nın dominant intraselüler lokalizasyonunun nükleus olduğu ve boyanmanın perinekrotik alanlarda ve tümörün invaziv sınırlarında yoğunlaştığı görülmüştür. HIF-1α'nın prognostik öneminin araştırıldığı 13 çalışmayı derleyen Vordermark ve arkadaşları (4), çalışmaların 9'unda (35, 135-142) yüksek HIF-1α düzeyleri ile birlikte, tedaviye başlangıç yanıtının, genel sağkalımın ve hastalıksız sağkalımın azaldığını görmüşlerdir. HIF-1α'nın kötü prognostik faktör olduğunu söyleyen bu 9 çalışmada, ele alınan vakaların çoğunu kemoterapi ile birlikte ya da tek başına radyoterapi verilen baş-boyun tümörleri oluşturmaktadır. Artan HIF-1α düzeyleri ile genel sağkalımın da arttığını söyleyen 2 çalışmada ise, primer tedavi yöntemi olarak cerrahi uygulanan baş-boyun tümörleri ve akciğerin küçük hücreli dışı karsinomu ele alınmıştır (134, 143). Bu durum HIF-1α'nın kötü prognozdan çok, radyoterapi direncinin bir göstergesi olduğunu akla getirmektedir. Diğer yandan primer tedavi yönteminin cerrahi olduğu serviks kanserli bir grup hastada HIF-1α yine kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (136). Bu çelişkili sonuçlar, HIF-1α'nın serviks kanserinde endojen hipoksi belirteci olarak güvenilirliğinin baş boyun kanserleri kadar net olmaması ile açıklanmıştır (144).

Değişen çalışmalarda HIF-1α, oligodendrogliomlar, serviks uteri invaziv karsinomları, overin yüzey epitel kökenli tümörleri ve meme karsinomlarında kötü prognostik bir faktör olarak bildirilmiştir. Meme karsinomlu, lenf nodu metastazı olmayan hastalarda önemli bir prognostik belirteç olduğu savunulmuştur (145).

HIF-1α'nın kolon adenokarsinomlarının öncü lezyonları olan adenomatöz polipler ve serrated poliplerde, karsinogenezin erken basamaklarında eksprese olduğu ve invaziv basamağa gelindiğinde maksimum düzeye ulaştığını saptayan immünhistokimyasal çalışmaların yanı sıra, net bir ilişkiyi ortaya koyamayan yayınlar da vardır.

Kolorektal karsinogenezde, öncü lezyonların değişen morfolojisine göre 2 temel yol tanımlanmıştır. Bunlar, adenom-karsinom sekansı (konvansiyonel yol) ve serrated yoldur (6). Tümörlerin %70-80'inde geçerli geleneksel yol (adenom-karsinom sekansı), sırasıyla K-RAS, APC ve p53 genlerinin mutasyonunu içermektedir (146).

Sugai ve arkadaşları adenomlarda displazi derecesi arttıkça p53 gen mutasyonlarının da arttığını göstermiştir (29). Aynı basamakta HIF-1α ekspresyonunda da artış bildirilmektedir (6). Kolorektal karsinomların %15'inde geçerli serrated yolda ise, BRAF mutasyonu ve MLH-1 replikasyon tamir kompleksinin metilasyonla inaktivasyonu ve mikrosatellit insitabilite rol alır. Bu yolun öncü lezyonları olan hiperplastik poliplerde BRAF mutasyonu %2, MLH-1 metilasyonu %36 iken, bu oranlar sesil serrated adenomlarda sırasıyla % 75 ve %70'tir (147). BRAF mutasyonu ile artan HIF-1α ekspresyonu ilk kez melanom hücrelerinde ortaya konmuştur (148). MLH-1 ve HIF-1α arasındaki ilişki ise henüz netleştirilememiştir. Ancak mevcut bulgular, HIF-1α ekspresyonunun, konvansiyonel ve serrated yolların her ikisinde de, genetik insitabilite ile korele olarak arttığını göstermektedir (6).

Simiantonaki ve arkadaşları (6) normal kolon mukozası, prekürsör lezyonlar ve karsinomlardaki HIF-1α ekspresyon profilini belirleyerek karsinogenezdeki rolünü anlamayı amaçladıkları bir çalışmada, klasik ve serrated adenomlar ile normal mukozayı, metastatik karsinomlar ile nonmetastatik vakaları karşılaştırmışlardır. Normal kolon mukozası, düşük dereceli displazi gösteren adenomatöz polipler ve hiperplastik polipler HIF-1α ile negatifken, yüksek dereceli displazi gösteren adenomatöz poliplerin (%50) ve sesil serrated adenomların (%54) bir kısmında HIF-1α'nın nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu izlenmiştir. Ele alınan evre III, orta derecede differansiye 92 kolon adenonokarsinom vakasının tümünde değişen yoğunluklarda nükleer ve eşlik eden sitoplazmik boyanma görülmüştür. Nükleer boyanma şiddetinin vakaların çoğunda (%47) güçlü olduğu raporlanmıştır.

Greijer ve arkadaşları ise, normal kolon mukozasında da pozitiflik izlenmiş ve normal mukoza (%100), adenomlar (%87) ve karsinomlar (%78) arasında HIF-1α ekspresyonu açısından istatistiksel olarak farklılık bildirmemişlerdir (149). Ancak boyanma paterninde farklılık raporlamışlardır. Normal mukozada ve adenomlarda yüzey epitel hücrelerinde, karsinomlarda ise nekroz komşuluğunda nükleer pozitiflik görülmüştür. Normal mukozada izlenen yüzeyel boyanmanın, kolon lümenindeki anaerobik çevrenin yüzey epitelinde yarattığı rölatif hipoksiye sekonder olabileceği yorumu yapılmıştır.

Bizim çalışmamızda da olguların %94,1 inde HIF-1α ekspresyonu görülmüştür. Bu oran kolon adenokarsinomlarındaki pozitifliği %100 veya %100'e yakın olarak raporlayan yukardaki çalışmalar ile benzerdir. Ancak

vakalarımızda diğer çalışmalardan farklı olarak, nükleer ekspresyon şiddetinin sıklıkla (%51,1) zayıf olduğu görülmüştür. Literatürdeki çalışmalarda HIF-1α ekspresyonu değerlendirilirken genellikle boyanmanın yaygınlığına göre skorlama yapılmış, az sayıda çalışmada boyanma şiddeti de skorlamada kullanılmıştır. Bunlardan biri olan Greijer ve arkadaşlarının çalışmasında, ele alınan 23 kolon adenokarsinom vakasının %61 'inde, Simiantonaki ve arkadaşlarının çalışmasında ise incelenen 92 kolon adenokarsinom vakasının %47 'sinde nükleer ekspresyonun şiddetli olduğu raporlanmıştır. Bizim çalışmamızla çelişen şiddet skorlarının, doku mikroarray bloklarımızı hazırlarken nekrozdan ve tümör-normal doku sınırından uzak tümör alanlarını seçmemiz olduğu düşünülmüştür.

HIF-1α'nın tümör invazyonunda rol alan genlerin ekspresyonunu düzenlediği in vivo çalışmalarda gösterilmiş olsa da, Simiantonaki'nin çalışmasında, tümörün yüzeyel kısmı ile derin invaziv bölgesi arasında da immünreaktivite farkı görülmemiştir. Ayrıca tümörlerde, homojen sitoplazmik boyanmaya karşılık, nükleer boyanmanın heterojen olduğu, ancak rastgele olmadığı görülmüştür. Nükleer pozitiflikler nekroz ve peritümöral inflamasyon alanlarında yoğunlaşmaktadır. Bu boyanma paterni HIF-1 α'nın inaktif formunun sitoplazmada sentezi, sonrasında nükleusa translokasyonu ve düşük oksijen ve yüksek inflamatuar sitokin seviyeleriyle aktivasyonunun göstergesidir(150).

Çalışmamız doku mikroarray blokları ile planlandığı için tümördeki dağılım paterni incelenememiştir. Ancak olguların bir kısmında zayıf sitoplazmik pozitiflik izlenmekle birlikte, HIF-1α'nın bir transkripsyon faktörü olması ve tümorogenezde rol alan aktif formunun nükleusta lokalize olması nedeniyle

yalnızca nükleer boyanmalar önemsenmiştir. HIF-1α tümörlerde genelde nükleer boyanma göstermekle birlikte, kolon, meme, pankreas ve prostat adenokarsinomlarında sitoplazmik pozitiflik de bildirilmiştir (133).

HIF-1α ile ilgili araştırmaların çoğu karsinogenezis temelli olup, prognostik önemini bildiren klinik çalışmalar az sayıdadır. Bunlardan biri Cao ve arkadaşlarının çalışmasıdır(19). Bu çalışmada 71 kolorektal karsinom olgusu incelenmiş, vakaların %54.9'unda nükleer ve sitoplazmik boyanma görülmüştür. Boyanmanın nekroz çevresinde yoğunlaştığını ve normal mukozada özellikle boyanma olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, HIF-1α ekpresyonu ile yaş, cinsiyet, tümörün çapı, histolojik grade'i ve infiltrasyon derinliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı, ancak evre III ve IV'te, karaciğer ve lenf nodu metastazlarında HIF-1α ekpresyonunda anlamlı artış olduğu belirtilmiştir. Evrelere göre değişen HIF-1α ekpresyon oranları, özofagusun skuamöz hücreli karsinomunun ve rektal adenokarsinomların da içinde olduğu başka tümörlerde de bildirilmiştir (151-153). Hastaların 5 yıllık sağ kalımına bakıldığında, HIF-1α pozitif olguların (%46), negatiflere göre (%75) daha kötü prognozlu olduğu görülmüştür. Çok değişkenli analizde HIF-1α ekspresyonunda artışın bağımsız bir prognostik faktör olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak kesin yorumlar için örnek sayısının artırılması gerektiğine dikkat çekilmiştir.

Prognostik ilişkiyi araştıran bir başka klinik çalışma Simiantonaki ve arkadaşlarının çalışması olup, bu çalışmada da lenf nodu metastazı ve hematojen metastaz yapan vakalar ile non-metastatikler arasında HIF-1α ekspresyonu açısından anlamlı fark ortaya konamamıştır.

Joshimura (154) ve Wincewicz (155) isimli araştırmacılar da metastaz ile HIF-1α ekpresyonu arasında ilişkili bulmamıştır. Ancak bu konuda farklı görüşler de mevcuttur. Dukes evre C veya D vakalarda artmış HIF-1α pozitifliği saptayan çalışmalar da bildirilmektedir (156). Bazı çalışmalarda HIF-1α ekspresyonu, lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunurken, bazılarında lenfojen değil, hematojen metastazlarla (ör: karaciğer) ilişkili olduğu görüşüne varılmıştır (157),(158).

Bizim çalışmamızda da, literatürdeki araştırmaların çoğunda olduğu gibi, HIF-1α ekpresyonu sonuçları ile yaş, tümörün yerleştiği barsak segmenti ve makroskopik büyüme paterni arasında ilişki bulunmamıştır.

Tümörün histolojik tipi önemli bir prognostik faktördür. Hatta adenokarsinom tipleri arasında taşlı yüzük hücreli karsinom tanısının evreden bağımsız prognostik faktör olduğu bildirilmiştir(159). Ancak çalışmamızda histolojik tip ve HIF-1α ekspresyonu arasında ilişki bulunmamıştır.

Artan tümör grade'i prognozu kötü etkileyen bir diğer güçlü prognostik faktördür. Geleneksel olarak 4 basamaklı (iyi diferansiye:1, orta derecede diferansiye:2, az diferansiye:3, andiferansiye: 4) derecelendirme sistemi kullanılsa da, bu sistemle gözlemciler arası uyumun düşük olması ve prognostik farklılıkların 2'li sistemin sonuçları ile korele olması nedeniyle son Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasında 4 basamağın, ikişerli birleştirilerek düşük ve yüksek grade'li tümörler olmak üzere 2 sınıf yapılması önerilmiştir (160). Bizim çalışmamızda da olgular iyi-orta differansiye (düşük grade'li) ve az diferansiye (yüksek grade'li) olarak 2 sınıfa ayrılarak incelenmiş**,** Cao ve arkadaşları ile

benzer şekilde HIF-1α ekspresyonu açısından bu iki grup arasında farklılık bulunmamıştır.

Günümüzde özellikle ekstramural venöz invazyonun ve lenfatik invazyonun sağkalımı etkileyen bağımsız bir prognostik faktör olduğu sonucuna varılmışken, intramural venöz invazyonun önemi daha belirsizdir(161). Ancak çalışmamızda bu güçlü prognostik faktör ile HIF-1α ekspresyonu arasında ilişki saptanmamıştır.

Bizim çalışmamızda da, Cao, Simiantonaki, Joshimura ve Wincewicz isimli araştırmacıların çalışmaları ile benzer şekilde, T, N, M kategorileri ile HIF-1α ekspresyonu arasında ilişki bulunmamıştır. Cao'nun tersine prognostik altın standart parametre olan evre ile de ilişki görülmemiştir. Takipte metastaz, lokal nüks gelişimi ve hastaların genel sağkalımı ile HIF-1α ekspresyonu arasında da korelasyon bulunmamıştır.

Ancak Cao ve arkadaşlarının aksine bizim çalışmamızda cinsiyet ve HIF-1α ekpresyonu arasında ilişki bulunmuştur. AJCC 2000 yılında kolorektal kanserlerde çalışılan çok çeşitli prognostik faktörü kullanımı kolay, pratik değeri olan bir sınıflamada toparlamaya çalışmıştır (162). Fakat cinsiyetin prognostik değeri bu sınıflamada gruplanamamıştır ve önemi sınırlıdır. Bununla birlikte hastalığın kadınlarda daha iyi seyrettiği bidirilmiştir (163). Çalışmamızda, erkeklerde HIF-1α ekpresyonu kadınlardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek çıkmıştır.

Çalışmamızda, çapı 5 cm'yi aşan tümörlerde HIF-1α ekspresyonunun 5 cm'den küçük tümörlerden düşük olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı

olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte tümör çapı kolorektal karsinomlarda diğer malignitelerden daha az önemli ve güvenilirliği sınırlı bir prognostik faktör olduğu da bilinmektedir (164).

HIF-1α'nın kolorektal karsinomlardaki prognostik önemi tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda, ekspresyonu agresif klinik gidiş ve metastaz gelişimi ile korele bulunurken (154), bazılarında, çalışmamızda da olduğu gibi tümör progresyonu ile direkt ilişkisi saptanmamıştır (1, 154-158, 165-167).

Kısaca, bizim çalışmamızda HIF-1α ile ilişkili bulunan cinsiyet ve tümör çapı parametrelerinin güçlü prognostik faktör olmaması nedeniyle, her ne kadar literatürdeki bazı çalışmalarda HIF-1α ekspresyonunun, evre ve sağ kalım gibi önemli prognostik parametreler ile ilişkisi raporlansa da, sonucumuz, bu konunun geniş serilerde çalışılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

CA9 'un tümör patogenezindeki rolü 1990'lı yılların başında HIF-1α ile ilişkisinin bulunması ile anlaşılmıştır (43).

HIF-1α ve CA9 ekspresyon paterninin farklı olduğunu saptayan birbaşka çalışma, Russell ve arkadaşlarının, farelere enjekte ettikleri kolon adenokarsinom hücrelerinde, CA9 ve HIF-1α boyanma paternini araştırdıkları çalışmadır. Oksijenizasyonu karbojen (%95 oranında O_2 ve %5 oranında CO_2 içeren gaz karışımı) ve hidralazin ile manipüle ederek, tümörde varolan dinamik hipoksik süreç için model oluşturduklarında, iki belirtecin boyanma paterninde farklılıklar saptamışlardır. CA9'un geçmişe ait, HIF-1α'nın ise yakın zamana ait hipoksik durumu yansıtan, reoksijenizasyonu saptayabilen değerli endojen belirteçler

olduğu sonucuna varmışlardır (7). Bizim çalışmamızda da HIF-1α ve CA9 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır.

Buna karşı, Koukourakis ve arkadaşları ise, baş boyun bölgesinin skuamöz hücreli karsinomlarını ele almış ve CA9 ekspresyonunun diğer hipoksi belirteçleri ile korele olduğunu ve artan HIF-1α, CA9 ve GLUT-1 düzeylerinin tedavi direncini telkin ettiğini bildirmişlerdir (168).

Jankovic ve arkadaşları servikal kanserlerle ilgili çalışmalarında, pimonidazol (bir nitroimidazol) ve CA9 seviyeleri arasında korelasyon saptamışlar, ancak HIF-1α'nın bu ikisiyle ilişkisini zayıf bulmuşlardır. Bu durumu, HIF-1α'nın oksijen varlığında hızla parçalanan bir protein olmasına karşı, CA9'un uzun yarı ömre sahip olmasıyla açıklamışlardır. CA9, HIF-1α'nın hedef geni olmakla birlikte, boyanma paterni HIF-1 α ile birebir örtüşmemektedir (169).

Greijer ve arkadaşlarının çalışmasında, CA9 ile normal mukozada kriptlerin büyük kısmında (%70) pozitiflik görülmüş olup, boyanmanın kript bazalindeki proliferatif kompartmanda yoğunlaştığı dikkati çekmiştir. Bu durum, normal kolon mukozasında, CA9'un HIF-1α'dan bağımsız regülasyonunu akla getirmiştir. Aynı araştırmacılar, adenomlarda yüzey epitelini de içeren diffüz boyanma, adenokarsinomlarda ise, HIF-1α'ya benzer şekilde perinekrotik bölgede boyanma saptamışlardır (149).

Ivanov ve arkadaşlarının, CA9'un normal dokulardaki ve tümörlerdeki ekspresyonunu araştıran bir çalışmasında normal safra duktus ve safra kesesi epitelinde, mide mukozasında, intestinal kript epitelinde, koroid pleksusta yüksek oranda pozitif olduğu, böbrek, beyin ve prostatta ise negatif olduğu bulunmuştur.

Tümörlerdeki pozitifliği, sadece membranöz ya da membranöz ve sitoplazmik boyanma şeklinde izlenmiştir. Bu araştırıcıların ele aldığı tümörler ve CA9 pozitiflik yüzdeleri Tablo 26'da sunulmuştur. Bu çalışmada, ele alınan kolon adenokarsinom olgu sayısı bildirilmemiş, ancak vakaların tamamında membranöz (sitoplazmik boyanma eşlik edebilir/etmeyebilir) CA9 pozitifliği raporlanmıştır. Bizim çalışmamızda sadece membranöz ekspresyon önemsenmiş ve olguların ancak %15,6'sında değişen derecelerde CA9 pozitifliği gözlenmiştir (170). Bu durumun nedeninin immünhistokimyasal teknik farklılıkları olabileceği düşünülmüştür.

Tablo 26. Bazı Tümörlerde CA9 pozitiflik yüzdesi

Tümör tipi	**CA9 pozitif tümörler**
Prostat Adenokarsinomu	%0
Kolon Adenokarsinomu	%100
Meme Adenokarsinomu	%26
Yüksek dereceli glial tümör	%100
Düşük dereceli glial tümör	%0
Serviks Karsinomu	%99
Baş boyun karsinomları	%89

Monoklonal antikorlar kullanılarak, CA9'un tümör davranışı ve prognozu ile ilişkisini saptamaya yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Prognostik ilişkiyi ortaya koyan yayınlar yanı sıra, prognozla ilişki saptamayanlar da vardır. Örneğin meme karsinomlarını elen alan araştırıcılardan, Chia ve arkadaşları, CA9

pozitifliğini östrojen reseptör negatifliği ile, Generali ve arkadaşları ise epirubisin rezistansı ile ilişki bularak, CA9 ekspresyonunun güçlü ve bağımsız bir prognostik faktör olduğunu rapor etmişlerdir (171, 172).

Loncaster ve arkadaşları serviks karsinomlarında, Giatromanolaki ve arkadaşları ise küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında CA9'un genel sağkalıma etkisini araştırmış ve kötü prognostik faktör olduğunu söylemişlerdir (173-175). Buna karşılık, Kaanders ve arkadaşları baş boyun tümörlerinde, Hui ve arkadaşları ise nazofarengeal karsinomlarda CA9 ekspresyonu ile prognoz arasında ilişki saptamamışlardır ((138),(176)

Jua ve arkadaşları, hiperplastik polip, adenomatöz polip ve karsinom vakalarından oluşan toplam 69 vakalık kolorektal neoplazi vakasında, CA9 ve Ki-67 pozitifliğinin korele olduğunu gözlemişlerdir. Hiperplastik poliplerde CA9 pozitifliğinin kriptlerde, adenomatöz poliplerde yüzeyde, karsinom olgularında ise diffüz olduğunu bildirmişlerdir. CA9'un kolorektal karsinogenezde rol alan bir molekül olabileceğini düşünmüşlerdir (177).

Niemela ve arkadaşları ise, farklı genetik değişiklikleri taşıyan kolon adenokarsinomlarında CA9 ekspresyon profilinde farklılık olup olmadığını araştırmışlardır. Mikrosatellit stabil, instabil ve HNPCC'den oluşan 3 grup arasında CA9 pozitifliğini karşılaştırdıklarında, HNPCC grubunda diğerlerinden yüksek bulmuşlardır. Araştırıcılar toplam 113 kolorektal karsinom vakasını ele almışlar, CA9 ekspresyonu ile Dukes evresi ve tümörün grade'i arasında ilişki bulmamışlardır(178).

Buna karşı, Korkeila ve arkadaşlarının çalışmasında, 166 rektal adenokarsinom vakası ele alınmış, tek değişkenli sağ kalım analizinde, CA9 ekspresyon şiddetinin hastalıksız sağ kalımı öngörmede önemli bir parametre olduğu ortaya konmuştur. Tümörde CA9 boyanma şiddeti zayıfsa /negatifse bunun daha uzun hastalıksız sağkalımı ve genel sağkalımı predikte ettiği sonucuna varılmıştır (117). Hong ve arkadaşları ise, 31 kolorektal karsinom vakasını ele almış ve Korkeila ile benzer sonuçlara varmışlardır (179).

Çalışmamızda, Korkeila ve Hong'un aksine, istatistiksel olarak anlamlı bulunan tek parametre, prognostik değeri sınırlı olan tümör makroskopik paterni ve CA9 ekspresyonu arası ilişkidir. Buna göre ülserevejetean ve deprese tümörlerde CA9 ekspresyonu, polipoid olanlardan daha yüksektir. Bizim çalışmamızda, Niemela ve arkadaşları ile benzer şekilde, CA9 ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, tümör çapı, histolojik tip, grade, anjiolenfatik invazyon varlığı, T, N, M katergorileri, evre, takipte lokal nüks gelişimi ve genel sağkalım arasında ilişki saptanmamıştır.

CXCR4 'ün 1980'li yıllarda HIV ile birlikte adının duyulması, zamanla birçok epitelyal tümör hücresi yüzeyinde eksprese oluşunun fark edilmesi ve kemokinlerin daha iyi anlaşılması ile tümorogenezdeki rolünü irdeleyen çalışmalar öne çıkmıştır.

Farklı kanserlerde, farklı uzak organların metastatik hedef olmaları, kanser gelişiminin ilk aşamalarında düzenlenen spesifik kemokin reseptörleri ile ilişkili bulunmuştur (180).

Kolorektal karsinomlar, kemokin reseptör ekspresyonunun klinik ilişkisini değerlendirmek için uygun bir modeldir. Çünkü yeni kemoterapötik yaklaşımlara rağmen dünyada kansere bağlı ölümler arasında 3. sırada yer almaktadır (12) ve neden olduğu ölümlerin büyük kısmı karaciğer metastazından kaynaklanmaktadır. Her ne kadar venöz drenaj paterni, karaciğer metastazı gelişiminde bir mekanik etki oluşturtursa da bu süreçte kemokinlerin rolü olduğuna dair kanıtlar giderek artmaktadır. Karaciğerde saptanan yüksek CXCL12/ SDF-1 düzeyleri, bu ligandın reseptörünü taşıyan tümör hücreleri için ($CXCR4^+$ tümör hücreleri) metastaz hedefi olabileceğini akla getirmektedir (62).

Non-neoplastik dokuların tersine, tümörlerde sıklıkla artmış CXCR4 ekspresyonuna rastlanmaktadır. Son 5 yılda gastrointestinal sistem tümörleri başta olmak üzere birçok tümörde (meme, beyin, küçük hücreli dış akciğer karsinomları), CXCR4'ün tümör hücre migrasyonunu, invazyonunu ve yeni damar oluşumunu stimüle ederek tümör yayılımını kolaylaştırdığı bulunmuştur. Birçok tümörde, artmış CXCR4 ekspresyonu ile hematojen ve lenfojen metastaz varlığının korele olduğu ve sağkalımın kısaldığı görülmüştür(74, 181, 182). CXCR4 ekspresyon düzeyindeki artışın, tümör rekürrensini ve kötü prognostik gidişi öngörmede prediktif değeri olacağı düşünülmektedir (9).

İn vitro çalışmalarda bu reseptörün aktivasyonu proliferasyon, migrasyon ve invazyonla ilişkili bulunmuştur. Bu özellikler, CXCR4 blokajı ile kolaylıkla kontrol altına alınabilmiştir (183). İn vivo çalışmalarda, AMD3100 isimli CXCR4 inhibitörü ile glioblastomda tümör regresyonu görülmüştür. Diğer bir antagonist

olan T22 ile, murinde, malign melanomun akciğer metastazının gerilediği saptanmıştır

Çalışmaların büyük kısmını in vitro çalışmalar ve hayvan modelleri oluşturmaktadır, klinik ilişkiyi ortaya koyan çalışma sayısı oldukça azdır (73). Bunlardan birinde özofagus kanserlerinde, CXCR4 eksprese eden tümörlerde sağ kalım 20 ay bulunurken, CXCR4 negatiflerde 76 ay bulunmuştur (184). Çok değişkenli analizde, CXCR4 ekspresyonunun sağ kalımı belirlemede güçlü bir bağımsız değişken olduğu saptanmıştır.

Yapılan immünhistokimyasal çalışmalarda CXCR4'ün değişik ekspresyon paternleri ile karşılaşılmış ve bu paternlerin prognostik önemi üzerinde durulmuştur. CXCR4 membran yerleşimli bir reseptör olduğu halde, mide kanseri hücre kültürlerinde yapılan akım sitometrik analizde ve immünhistokimyasal çalışmada, ekspresyonunun daha çok sitoplazmik olduğu görülmüştür. Bu durumun sebebinin, nöroblastomda da adı geçen, membran CXCR4 ekspresyon insitabilitesi olabileceği öne sürülmüştür (84). Diğer olasılıklar arasında, otokrin SDF-1 sekresyonunun CXCR4 endositozuna ve ubikütin ilişkili degradasyona yol açması ya da CXCR4'ün endoplazmik retikulumda kalarak hücre yüzeyine ulaşamaması sayılmaktadır (185). Marechal ve arkadaşları pankreatik adenokarsinomlarda, Burger ve arkadaşları ise küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında sitoplazmik pozitifliğin ön planda olmasını ve az sayıda vakada eşlik eden membranöz boyanmanın görülmesini, CXCR4'ün membrandan sitoplazmaya translokasyonu ile açıklamışlardır (85, 90).

Yoshitake ve arkadaşları ise kolorektal karsinomlarda karşılaştıkları boyanmayı, tümördeki dominant morfolojiye göre, nükleer ve sitomembranöz (sitoplazmik ve membranöz boyanma birlikte) olmak üzere 2 farklı patern şeklinde saptamışlardır (86). Nükleer patern hepatoselüler karsinom, nazofarengeal karsinom , meme ve akciğer karsinomunda da bildirilmiştir (186-189). CXCR4'ün transmembran bir protein olması, immünhistokimyasal olarak membranöz ve sitoplazmik pozitifliğin anlamlı, nükleer boyanmanın ise nonspesifik olacağı sonucuna vardırsa da, kolorektal kanser hücre serilerinde, western blot yöntemi ile CXCR4'ün membranöz fraksiyonuna eşlik eden, nükleer bir fraksiyonunun da olduğu gösterilmiştir (86). Aynı araştırmada, nükleer ve sitomembranöz patern gösteren vakalar karşılaştırıldığında, nükleer pozitiflikle birlikle, tümör diferansiasyon derecesinin azaldığı, tümör evresinin ve lenf nodu metastazının arttığı görülmüştür.

Mide kanserlerinde, CXCR4 pozitifliği peritoneal karsinomatozis gelişimi ve malign asit oluşumu ile ilişkili bulunmuştur. Asit sıvısında yüksek CXCL12 düzeylerine rastlanmıştır (190). Bir başka çalışmada, 221 vakada immünhistokimyasal olarak CXCR4 çalışılmış, düşük ve yüksek CXCR4 eksprese eden grup arasında, yaş, cinsiyet, tümör grade'i, lenfatik ve venöz invazyon ya da tümör çapı yönünden fark bulunmamıştır. Ancak yüksek CXCR4 ekspresyon oranlarının, ileri evre hastalık, lenf nodu metastazı ve tümör derinliği ile korele olduğu saptanmıştır (185). Yinede de CXCR4'ün mide kanserinde klinik bulgularla korele olup olmadığı tartışmalıdır (191, 192).

Hepatoselüler karsinomlu hastalarda ise yüksek CXCR4 düzeylerinin, lokal ileri evre hastalık, metastaz ve kötü prognozla korele olduğu bildirilmiştir (193).

Marechal ve arkadaşlarının pankreas adenokarsinomlarını ele alan çalışmalarında, R0 rezeksiyon yapılan, 70 hasta incelenmiş ve CXCR4'ün immünhistokimyasal ekspresyonunun, tümörün Ki-67 proliferasyon indeksi, lenf nodu ve karaciğer metastazı ile ilişkili olduğu bulunmuş ve genel sağkalım için bağımsız negatif prognostik faktör olduğu saptanmıştır (85). Bu bulgular CXCR4'ün tümör hücresinin yaşamasını ve çoğalmasını indüklediği sonucuna varan in vivo çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (69, 194, 195). Belki de gelecekte, büyük prospektif çalışmalarla, CXCR4 ekspresyonundaki artışın, hastaların adjuvan kemoterapi için seçilmeleri konusunda klinisyene yol gösterecek bir veri olduğu sonucuna varılacaktır (85).

Kolorektal karsinomlarda artmış CXCR4 ekspresyonu, ileri evre (evre III/ IV) hastalık, lenf nodu metastazı ve hematojen metastazla ilişkili bulunmuştur. Tümörün metastatik hedefleri arasında karaciğer öne çıkmaktadır (74, 177, 196).

Kim ve arkadaşları, 100 kolorektal tümör ve 39 karaciğer metastazı üzerinde çalışmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu ve immünhistokimya ile yapılan çalışmada, AJCC evre I/II hastalarda şiddetli CXCR4 ekspresyonunun metastaz riskini arttırdığı saptanmıştır. Vakaların tümünde değişen şiddetlerde membranöz boyanmanın da eşlik edebildiği sitoplazmik pozitiflik gözlemişlerdir (13,73).

Yoshitake ve arkadaşları, kolorektal karsinomlu toplam 60 hastaya ait cerrahi rezeksiyon ya da endoskopik biyopsi materyalini ele alarak, SDF-1 Alfa

ve CXCR4'ün metastazdaki rolünü incelemiştir (86). Bu amaçla, tümörün invaziv sınırlarında ve metastatik lenf nodlarında, immünhistokimyasal olarak bu belirteçlerin ekspresyonunu değerlendirmiştir. Vakaların tümünde CXCR4 ekspresyonu izlemişler, nükleer ya da sitomembranöz olmak üzere 2 farklı patern tanımlamışlardır. Her iki antikorun yüksek ekspresyon şiddeti, ileri tümör evresi, lenfatik/ venöz invazyon, lenf nodu metastazı ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Ancak çok değişkenli analizde, CXCR4 ve SDF-1 Alfa ekspresyonunun prognostik önemi olmadığı, bağımsız tek prognostik faktörün evre olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda, literatürle benzer şekilde olguların büyük kısmında (%89,3) farklı şiddetlerde CXCR4 pozitifliği izlenmiş olup, Kim ve arkadaşları ile benzer şekilde bu boyanmanın sitoplazmik olduğu görülmüştür. Nükleer ya da membranöz pozitiflik izlenmemiştir. Ancak bu çalışmaların aksine, bizim çalışmamızda, CXCR4 ekspresyonunun kolorektal karsinomlarda kötü prognoz ile ilişkili olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak, çalışmamızda ele alınan moleküller, kolorektal karsinomlar da dahil, malignitelerdeki prognostik değeri çelişkili olan, henüz tedavi planındaki rolü bilinmeyen moleküllerdir. Her ne kadar hipoksi malignitelerin olmazsa olmaz bir komponenti ve agresif klinik gidişin göstergesi olsa da, HIF-1α ve CA9'un immünhistokimyasal olarak tesbitinin tümördeki dinamik hipoksik süreci doğru temsil edip edemediği de önemli bir tartışma konusudur. CXCR4 ile birlikte, karsinogenez ve tümör progresyonunda sorumlu olan bu moleküllerin gerçek rollerini anlamak bu süreçlerin kompleks moleküler ve genetik değişikliklerin

sonucu olması nedeniyle zorlaşmaktadır. Diğer yandan, tümörogenezde rol alsalar bile, prognozun birbiri ile korelasyon gösteren çok faktörlü bir etkileşimin sonucu oluşu, bu moleküllerin prognostik değerlerini anlamayı zolaştıran önemli bir nedendir. Gelecekte, prognostik önemleri netleşememiş birçok parametreden biri olabilecekleri gibi, hastaya ve tümöre spesifik, hedefe yönelik tedaviye yön veren birer molekül de olabilirler, bu durum ancak geniş serilerle yapılan, çok merkezli prospektif çalışmalarla netleşecektir.

6. SONUÇLAR

1. 186 kolorektal karsinom vakasının % 94'ünde nükleer HIF-1α ekspresyonu görülmüştür.

2. Az sayıda vakada nüklerr HIF-1α ekspresyonuna eşlik eden zayıf sitoplazmik boyanma görülmüştür.

3. HIF-1α ekspresyonu ile yaş, tümörün yerleştiği barsak segmenti, tümörün makroskopik büyüme paterni, grade'i, anjiolenfatik invazyon varlığı, T, N, M kategorileri, evre, tanı ya da takipte karaciğer metastazı gelişimi, lokal nüks gelişimi ve hastaların genel sağ kalımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

4.HIF-1α ekspresyonu ile cinsiyet ve tümör çapı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır ($p<0,05$). Buna göre; erkek hastalarda ve çapı 5 cm'den küçük tümörlerde daha yüksek ekspresyonu görülmüştür.

5.186 kolorektal karsinom vakasının %89'unda sitoplazmik CXCR4 ekspresyonu izlenmiştir. Membranöz ya da nükleer boyanma görülmemiştir.

6. CXCR4 ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, tümörün yerleştiği barsak segmenti, tümörün makroskopik büyüme paterni, anjiolenfatik invazyon varlığı, T, N, M kategorileri, evre, tanı ya da takipte karaciğer metastazı gelişimi, lokal nüks gelişimi, hastaların genel sağ kalımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

7. CXCR4 ekspresyonu ile tümör çapı ve grade'i arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır ($p<0,05$). Buna göre; çapı 5 cm'den küçük tümörlerde ve grade 1-2 tümörlerde daha yüksek ekspresyonu görülmüştür.

8. CA9 ekspresyonunun sitoplazmik ve/veya membranöz olduğu görülmüştür.

9. Sitoplazmik boyanma eşlik etsin ya da etmesin, membranöz ekspresyon 186 kolorektal karsinom vakasının %15,6'sında saptanmıştır

10. CA9 ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, tümörün yerleştiği barsak segmenti, grade'i, anjiolenfatik invazyon varlığı, T, N, M kategorileri, evre, tanı ya da takipte karaciğer metastazı gelişimi, takipte lokal nüks gelişimi ve hastaların genel sağ kalımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

11. CA9 ekspresyonu ile tümörün makroskopik büyüme paterni arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmüştür. Buna göre; ülserevejetan ve deprese büyüme paterni gösteren tümörlerde polipoid olanlardan daha yüksek ekspresyonu görülmüştür.

12. HIF-1α, CA9 ve CXCR4 ekspresyonu arasında korelasyon saptanmamıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. Cancer Res. 1999 Nov 15;59(22):5830-5.
2. Le QT. Identifying and targeting hypoxia in head and neck cancer: a brief overview of current approaches. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2007;69(2 Suppl):S56-8.
3. Rofstad EK, Danielsen T. Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. Br J Cancer. 1999 Aug;80(11):1697-707.
4. Vordermark D, Brown JM. Endogenous markers of tumor hypoxia predictors of clinical radiation resistance? Strahlenther Onkol. 2003 Dec;179(12):801-11.
5. Rischin D, Fisher R, Peters L, Corry J, Hicks R. Hypoxia in head and neck cancer: studies with hypoxic positron emission tomography imaging and hypoxic cytotoxins. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2007;69(2 Suppl):S61-3.
6. Simiantonaki N, Taxeidis M, Jayasinghe C, Kurzik-Dumke U, Kirkpatrick CJ. Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression increases during colorectal carcinogenesis and tumor progression. BMC Cancer. 2008;8:320.
7. Russell J, Carlin S, Burke SA, Wen B, Yang KM, Ling CC. Immunohistochemical detection of changes in tumor hypoxia. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009 Mar 15;73(4):1177-86.
8. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. Cancer Lett. 2008 Aug 28;267(2):226-44.
9. Schimanski CC, Galle PR, Moehler M. Chemokine receptor CXCR4-prognostic factor for gastrointestinal tumors. World J Gastroenterol. 2008 Aug 14;14(30):4721-4.
10. Roos A, Boron WF. Intracellular pH. Physiol Rev. 1981 Apr;61(2):296-434.
11. Elliott KA, Benoy MP, Baker Z. The metabolism of lactic and pyruvic acids in normal and tumour tissues: Rat kidney and transplantable tumours. Biochem J. 1935 Aug;29(8):1937-50.
12. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen consumption and tissue oxygenation of human tumors. Adv Exp Med Biol. 1990;277:895-905.
13. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? Nat Rev Cancer. 2004 Nov;4(11):891-9.
14. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. Cancer Metastasis Rev. 2007 Jun;26(2):299-310.
15. Yamagata M, Hasuda K, Stamato T, Tannock IF. The contribution of lactic acid to acidification of tumours: studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase. Br J Cancer. 1998 Jun;77(11):1726-31.

16. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. J Natl Cancer Inst. 2001 Feb 21;93(4):266-76.
17. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem. 1994 Sep 23;269(38):23757-63.
18. Yoo YG, Hayashi M, Christensen J, Huang LE. An essential role of the HIF-1alpha-c-Myc axis in malignant progression. Ann N Y Acad Sci. 2009 Oct;1177:198-204.
19. Cao D, Hou M, Guan YS, Jiang M, Yang Y, Gou HF. Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. BMC Cancer. 2009;9:432.
20. Huang ZJ, Edery I, Rosbash M. PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors. Nature. 1993 Jul 15;364(6434):259-62.
21. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jun 6;92(12):5510-4.
22. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. Science. 2001 Apr 20;292(5516):464-8.
23. Semenza GL. Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1. Exp Physiol. 2006 Sep;91(5):803-6.
24. Koshiji M, Huang LE. Dynamic balancing of the dual nature of HIF-1alpha for cell survival. Cell Cycle. 2004 Jul;3(7):853-4.
25. Koshiji M, To KK, Hammer S, Kumamoto K, Harris AL, Modrich P, et al. HIF-1alpha induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSalpha expression. Mol Cell. 2005 Mar 18;17(6):793-803.
26. To KK, Sedelnikova OA, Samons M, Bonner WM, Huang LE. The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1alpha from HIF-2alpha in NBS1 repression. EMBO J. 2006 Oct 18;25(20):4784-94.
27. Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR, 3rd, et al. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. Cell. 1998 May 1;93(3):477-86.
28. D'Amours D, Jackson SP. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 May;3(5):317-27.
29. Sugai T, Habano W, Uesugi N, Jiao YF, Nakamura S, Sato K, et al. Molecular validation of the modified Vienna classification of colorectal tumors. J Mol Diagn. 2002 Nov;4(4):191-200.
30. Frede S, Berchner-Pfannschmidt U, Fandrey J. Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation. Methods Enzymol. 2007;435:405-19.

31. Zhong H, Mabjeesh N, Willard M, Simons J. Nuclear expression of hypoxia-inducible factor 1alpha protein is heterogeneous in human malignant cells under normoxic conditions. Cancer Lett. 2002 Jul 26;181(2):233-8.
32. Koury J, Deitch EA, Homma H, Abungu B, Gangurde P, Condon MR, et al. Persistent HIF-1alpha activation in gut ischemia/reperfusion injury: potential role of bacteria and lipopolysaccharide. Shock. 2004 Sep;22(3):270-7.
33. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. Mol Cell Biol. 2001 Jun;21(12):3995-4004.
34. Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. FASEB J. 2001 Nov;15(13):2445-53.
35. Birner P, Gatterbauer B, Oberhuber G, Schindl M, Rossler K, Prodinger A, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. Cancer. 2001 Jul 1;92(1):165-71.
36. Cangul H, Salnikow K, Yee H, Zagzag D, Commes T, Costa M. Enhanced overexpression of an HIF-1/hypoxia-related protein in cancer cells. Environ Health Perspect. 2002 Oct;110 Suppl 5:783-8.
37. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. FASEB J. 2001 May;15(7):1312-4.
38. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2003 Oct;3(10):721-32.
39. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. Cancer Res. 1999 Aug 15;59(16):3915-8.
40. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. Cancer Res. 1996 Mar 1;56(5):941-3.
41. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. Science. 2002 Feb 1;295(5556):858-61.
42. Wiesener MS, Munchenhagen PM, Berger I, Morgan NV, Roigas J, Schwiertz A, et al. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. Cancer Res. 2001 Jul 1;61(13):5215-22.
43. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. Cancer Res. 2000 Dec 15;60(24):7075-83.
44. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, et al. Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. Genes Dev. 1998 Jan 15;12(2):149-62.

45. He F, Deng X, Wen B, Liu Y, Sun X, Xing L, et al. Noninvasive molecular imaging of hypoxia in human xenografts: comparing hypoxia-induced gene expression with endogenous and exogenous hypoxia markers. Cancer Res. 2008 Oct 15;68(20):8597-606.
46. Semenza GL. Regulation of mammalian O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. Annu Rev Cell Dev Biol. 1999;15:551-78.
47. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin. 2000 Jan-Feb;50(1):7-33.
48. McLeod HL, McKay JA, Collie-Duguid ES, Cassidy J. Therapeutic opportunities from tumour biology in metastatic colon cancer. Eur J Cancer. 2000 Aug;36(13 Spec No):1706-12.
49. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med. 1998 Feb 12;338(7):436-45.
50. Struyf S, Proost P, Van Damme J. Regulation of the immune response by the interaction of chemokines and proteases. Adv Immunol. 2003;81:1-44.
51. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity. 2000 Feb;12(2):121-7.
52. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature. 2005 Dec 15;438(7070):932-6.
53. Liekens S, Bronckaers A, Perez-Perez MJ, Balzarini J. Targeting platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase for cancer therapy. Biochem Pharmacol. 2007 Dec 3;74(11):1555-67.
54. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. Annu Rev Immunol. 2004;22:891-928.
55. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. Nat Immunol. 2001 Feb;2(2):129-34.
56. Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, et al. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Feb 18;100(4):1885-90.
57. Gassmann P, Haier J, Schluter K, Domikowsky B, Wendel C, Wiesner U, et al. CXCR4 regulates the early extravasation of metastatic tumor cells in vivo. Neoplasia. 2009 Jul;11(7):651-61.
58. Youngs SJ, Ali SA, Taub DD, Rees RC. Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines. Int J Cancer. 1997 Apr 10;71(2):257-66.
59. Robledo MM, Bartolome RA, Longo N, Rodriguez-Frade JM, Mellado M, Longo I, et al. Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. J Biol Chem. 2001 Nov 30;276(48):45098-105.
60. Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, Schmidt K, et al. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov 11;100(23):13513-8.

61. Chen Y, Stamatoyannopoulos G, Song CZ. Down-regulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion in vitro. Cancer Res. 2003 Aug 15;63(16):4801-4.
62. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature. 2001 Mar 1;410(6824):50-6.
63. Murakami T, Maki W, Cardones AR, Fang H, Tun Kyi A, Nestle FO, et al. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. Cancer Res. 2002 Dec 15;62(24):7328-34.
64. Bertolini F, Dell'Agnola C, Mancuso P, Rabascio C, Burlini A, Monestiroli S, et al. CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. Cancer Res. 2002 Jun 1;62(11):3106-12.
65. Cardones AR, Murakami T, Hwang ST. CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells in vitro and in vivo via beta(1) integrin. Cancer Res. 2003 Oct 15;63(20):6751-7.
66. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. Nature. 1996 Aug 29;382(6594):829-33.
67. Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, Iizasa H, Bleul CC, Yoshie O, et al. Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Dec 10;93(25):14726-9.
68. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. Science. 1996 May 10;272(5263):872-7.
69. Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P, Obonyo D, Wachowiak R, Busch P, et al. Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. J Natl Cancer Inst. 2005 Dec 21;97(24):1840-7.
70. Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, et al. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. Cancer Res. 2002 Oct 15;62(20):5930-8.
71. Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ, Ricke WA. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. Int J Cancer. 2003 Oct 20;107(1):1-10.
72. Hartmann TN, Burger JA, Glodek A, Fujii N, Burger M. CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. Oncogene. 2005 Jun 23;24(27):4462-71.
73. Kim J, Takeuchi H, Lam ST, Turner RR, Wang HJ, Kuo C, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. J Clin Oncol. 2005 Apr 20;23(12):2744-53.

74. Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N, Jayasinghe C, Gonner U, Wilsberg V, et al. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2005 Mar 1;11(5):1743-50.
75. Herbein G, Mahlknecht U, Batliwalla F, Gregersen P, Pappas T, Butler J, et al. Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. Nature. 1998 Sep 10;395(6698):189-94.
76. Murdoch C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. Immunol Rev. 2000 Oct;177:175-84.
77. Vlahakis SR, Villasis-Keever A, Gomez T, Vanegas M, Vlahakis N, Paya CV. G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways. J Immunol. 2002 Nov 15;169(10):5546-54.
78. Kayali AG, Van Gunst K, Campbell IL, Stotland A, Kritzik M, Liu G, et al. The stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 ligand-receptor axis is critical for progenitor survival and migration in the pancreas. J Cell Biol. 2003 Nov 24;163(4):859-69.
79. Soriano SF, Serrano A, Hernanz-Falcon P, Martin de Ana A, Monterrubio M, Martinez C, et al. Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses. Eur J Immunol. 2003 May;33(5):1328-33.
80. Fernandis AZ, Prasad A, Band H, Klosel R, Ganju RK. Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. Oncogene. 2004 Jan 8;23(1):157-67.
81. Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnica-Worms D, et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. Cancer Res. 2004 Dec 1;64(23):8604-12.
82. Pan J, Mestas J, Burdick MD, Phillips RJ, Thomas GV, Reckamp K, et al. Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. Mol Cancer. 2006;5:56.
83. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. Cancer Res. 2002 Mar 15;62(6):1832-7.
84. Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L, Meshel T, Rechavi G, Witz IP, et al. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. J Immunol. 2001 Oct 15;167(8):4747-57.
85. Marechal R, Demetter P, Nagy N, Berton A, Decaestecker C, Polus M, et al. High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma. Br J Cancer. 2009 May 5;100(9):1444-51.
86. Yoshitake N, Fukui H, Yamagishi H, Sekikawa A, Fujii S, Tomita S, et al. Expression of SDF-1 alpha and nuclear CXCR4 predicts lymph node metastasis in colorectal cancer. Br J Cancer. 2008 May 20;98(10):1682-9.

87. Lee BC, Lee TH, Avraham S, Avraham HK. Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. Mol Cancer Res. 2004 Jun;2(6):327-38.
88. Kang H, Mansel RE, Jiang WG. Genetic manipulation of stromal cell-derived factor-1 attests the pivotal role of the autocrine SDF-1-CXCR4 pathway in the aggressiveness of breast cancer cells. Int J Oncol. 2005 May;26(5):1429-34.
89. Barbero S, Bajetto A, Bonavia R, Porcile C, Piccioli P, Pirani P, et al. Expression of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1 in human brain tumors and their involvement in glial proliferation in vitro. Ann N Y Acad Sci. 2002 Nov;973:60-9.
90. Burger M, Glodek A, Hartmann T, Schmitt-Graff A, Silberstein LE, Fujii N, et al. Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. Oncogene. 2003 Nov 6;22(50):8093-101.
91. Parmo-Cabanas M, Bartolome RA, Wright N, Hidalgo A, Drager AM, Teixido J. Integrin alpha4beta1 involvement in stromal cell-derived factor-1alpha-promoted myeloma cell transendothelial migration and adhesion: role of cAMP and the actin cytoskeleton in adhesion. Exp Cell Res. 2004 Apr 1;294(2):571-80.
92. Schluter K, Gassmann P, Enns A, Korb T, Hemping-Bovenkerk A, Holzen J, et al. Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential. Am J Pathol. 2006 Sep;169(3):1064-73.
93. Schioppa T, Uranchimeg B, Saccani A, Biswas SK, Doni A, Rapisarda A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. J Exp Med. 2003 Nov 3;198(9):1391-402.
94. Schutyser E, Su Y, Yu Y, Gouwy M, Zaja-Milatovic S, Van Damme J, et al. Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells. Eur Cytokine Netw. 2007 Jun;18(2):59-70.
95. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. Nature. 2003 Sep 18;425(6955):307-11.
96. Wilson JL, Burchell J, Grimshaw MJ. Endothelins induce CCR7 expression by breast tumor cells via endothelin receptor A and hypoxia-inducible factor-1. Cancer Res. 2006 Dec 15;66(24):11802-7.
97. Maxwell PJ, Gallagher R, Seaton A, Wilson C, Scullin P, Pettigrew J, et al. HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells. Oncogene. 2007 Nov 15;26(52):7333-45.

98. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. Am J Pathol. 1999 Apr;154(4):1125-35.
99. Lee CH, Kakinuma T, Wang J, Zhang H, Palmer DC, Restifo NP, et al. Sensitization of B16 tumor cells with a CXCR4 antagonist increases the efficacy of immunotherapy for established lung metastases. Mol Cancer Ther. 2006 Oct;5(10):2592-9.
100. Pastorekova S, Zavadova Z, Kostal M, Babusikova O, Zavada J. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. Virology. 1992 Apr;187(2):620-6.
101. Pastorek J, Pastorekova S, Callebaut I, Mornon JP, Zelnik V, Opavsky R, et al. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. Oncogene. 1994 Oct;9(10):2877-88.
102. Sterling D, Reithmeier RA, Casey JR. A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers. J Biol Chem. 2001 Dec 21;276(51):47886-94.
103. Dorai T, Sawczuk IS, Pastorek J, Wiernik PH, Dutcher JP. The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer. Eur J Cancer. 2005 Dec;41(18):2935-47.
104. Svastova E, Zilka N, Zat'ovicova M, Gibadulinova A, Ciampor F, Pastorek J, et al. Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. Exp Cell Res. 2003 Nov 1;290(2):332-45.
105. Zatovicova M, Sedlakova O, Svastova E, Ohradanova A, Ciampor F, Arribas J, et al. Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. Br J Cancer. 2005 Nov 28;93(11):1267-76.
106. [Gastrointestinal giardiasis associated with Helicobacter pylori]. Eksp Klin Gastroenterol. 2010(6):30-4.
107. Shepherd NA, Saraga EP, Love SB, Jass JR. Prognostic factors in colonic cancer. Histopathology. 1989 Jun;14(6):613-20.
108. Washington MK, Berlin J, Branton P, Burgart LJ, Carter DK, Fitzgibbons PL, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. Arch Pathol Lab Med. 2009 Oct;133(10):1539-51.
109. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. Postgrad Med J. 2008 Aug;84(994):403-11.
110. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. Nature. 2007 Dec 20;450(7173):1235-9.
111. McLeod HL, Murray GI. Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. Br J Cancer. 1999 Jan;79(2):191-203.

112. Chung DC. Molecular prognostic markers and colorectal cancer: the search goes on. Gastroenterology. 1998 Jun;114(6):1330-2.
113. Oberg A, Stenling R, Tavelin B, Lindmark G. Are lymph node micrometastases of any clinical significance in Dukes Stages A and B colorectal cancer? Dis Colon Rectum. 1998 Oct;41(10):1244-9.
114. Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, Merico M, Bossola M, Vecchio FM, et al. Accurate lymph-node detection in colorectal specimens resected for cancer is of prognostic significance. Dis Colon Rectum. 1999 Feb;42(2):143-54; discussion 54-8.
115. Calaluce R, Miedema BW, Yesus YW. Micrometastasis in colorectal carcinoma: a review. J Surg Oncol. 1998 Mar;67(3):194-202.
116. Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, et al. Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. Gut. 2006 Jun;55(6):848-55.
117. Korkeila E, Talvinen K, Jaakkola PM, Minn H, Syrjanen K, Sundstrom J, et al. Expression of carbonic anhydrase IX suggests poor outcome in rectal cancer. Br J Cancer. 2009 Mar 24;100(6):874-80.
118. Hawk ET, Limburg PJ, Viner JL. Epidemiology and prevention of colorectal cancer. Surg Clin North Am. 2002 Oct;82(5):905-41.
119. Van Cutsem EJ, Kataja VV. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up of colon cancer. Ann Oncol. 2005;16 Suppl 1:i16-7.
120. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. Lancet. 2000 Mar 25;355(9209):1041-7.
121. Lenz HJ, Johnston P. Accomplishments in 2007 in biologic markers for gastrointestinal cancers. Gastrointest Cancer Res. 2008 May;2(3 Suppl):S51-6.
122. Booth RA. Minimally invasive biomarkers for detection and staging of colorectal cancer. Cancer Lett. 2007 Apr 28;249(1):87-96.
123. Li XF, Carlin S, Urano M, Russell J, Ling CC, O'Donoghue JA. Visualization of hypoxia in microscopic tumors by immunofluorescent microscopy. Cancer Res. 2007 Aug 15;67(16):7646-53.
124. Alvarez RD, Huh WK, Khazaeli MB, Meredith RF, Partridge EE, Kilgore LC, et al. A Phase I study of combined modality (90)Yttrium-CC49 intraperitoneal radioimmunotherapy for ovarian cancer. Clin Cancer Res. 2002 Sep;8(9):2806-11.
125. Graff S, Barach A, Bickerman HA, Beck GJ, Eisenberg M, Freedman AD. Hypoxia in cancer. Acta Unio Int Contra Cancrum. 1960;16:651-5.
126. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. J Clin Pathol. 2008 May;61(5):561-9.
127. Zhong H, Semenza GL, Simons JW, De Marzo AM. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is an early event in prostate carcinogenesis. Cancer Detect Prev. 2004;28(2):88-93.

128. Griffiths EA, Pritchard SA, Valentine HR, Whitchelo N, Bishop PW, Ebert MP, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression in the gastric carcinogenesis sequence and its prognostic role in gastric and gastro-oesophageal adenocarcinomas. Br J Cancer. 2007 Jan 15;96(1):95-103.
129. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. J Natl Cancer Inst. 2001 Feb 21;93(4):309-14.
130. Costa A, Coradini D, Carrassi A, Erdas R, Sardella A, Daidone MG. Re: Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha during breast carcinogenesis. J Natl Cancer Inst. 2001 Aug 1;93(15):1175-7.
131. Gagnoux-Palacios L, Dans M, van't Hof W, Mariotti A, Pepe A, Meneguzzi G, et al. Compartmentalization of integrin alpha6beta4 signaling in lipid rafts. J Cell Biol. 2003 Sep 29;162(7):1189-96.
132. Horree N, van Diest PJ, van der Groep P, Sie-Go DM, Heintz AP. Hypoxia and angiogenesis in endometrioid endometrial carcinogenesis. Cell Oncol. 2007;29(3):219-27.
133. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. Cancer Res. 1996 Oct 1;56(19):4509-15.
134. Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. Anticancer Res. 2000 May-Jun;20(3A):1527-33.
135. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. Cancer Res. 2001 Apr 1;61(7):2911-6.
136. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. Cancer Res. 2000 Sep 1;60(17):4693-6.
137. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2002 Aug 1;53(5):1192-202.
138. Hui EP, Chan AT, Pezzella F, Turley H, To KF, Poon TC, et al. Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. Clin Cancer Res. 2002 Aug;8(8):2595-604.
139. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, et al. Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. Br J Cancer. 2001 Sep 14;85(6):881-90.

140. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, Corti L, Blandamura S, Piazza M, et al. Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. Cancer Res. 2001 Mar 1;61(5):1830-2.
141. Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. Clin Cancer Res. 2002 Jun;8(6):1831-7.
142. Sivridis E, Giatromanolaki A, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI. Association of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma. Cancer. 2002 Sep 1;95(5):1055-63.
143. Beasley NJ, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, et al. Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. Cancer Res. 2002 May 1;62(9):2493-7.
144. Fyles A, Milosevic M, Hedley D, Pintilie M, Levin W, Manchul L, et al. Tumor hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer. J Clin Oncol. 2002 Feb 1;20(3):680-7.
145. Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. Cancer. 2003 Mar 15;97(6):1573-81.
146. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. World J Gastroenterol. 2007 Jul 28;13(28):3784-91.
147. Konishi K, Yamochi T, Makino R, Kaneko K, Yamamoto T, Nozawa H, et al. Molecular differences between sporadic serrated and conventional colorectal adenomas. Clin Cancer Res. 2004 May 1;10(9):3082-90.
148. Kumar SM, Yu H, Edwards R, Chen L, Kazianis S, Brafford P, et al. Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1alpha expression in melanoma. Cancer Res. 2007 Apr 1;67(7):3177-84.
149. Greijer AE, Delis-van Diemen PM, Fijneman RJ, Giles RH, Voest EE, van Hinsbergh VW, et al. Presence of HIF-1 and related genes in normal mucosa, adenomas and carcinomas of the colorectum. Virchows Arch. 2008 May;452(5):535-44.
150. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. Cancer Res. 2003 Mar 1;63(5):1138-43.
151. Kurokawa T, Miyamoto M, Kato K, Cho Y, Kawarada Y, Hida Y, et al. Overexpression of hypoxia-inducible-factor 1alpha(HIF-1alpha) in oesophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. Br J Cancer. 2003 Sep 15;89(6):1042-7.

152. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jul 22;94(15):8104-9.
153. Rasheed S, Harris AL, Tekkis PP, Turley H, Silver A, McDonald PJ, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha are expressed in most rectal cancers but only hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with prognosis. Br J Cancer. 2009 May 19;100(10):1666-73.
154. Yoshimura H, Dhar DK, Kohno H, Kubota H, Fujii T, Ueda S, et al. Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. Clin Cancer Res. 2004 Dec 15;10(24):8554-60.
155. Wincewicz A, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S. Clinicopathological significance and linkage of the distribution of HIF-1alpha and GLUT-1 in human primary colorectal cancer. Pathol Oncol Res. 2007;13(1):15-20.
156. Jiang YA, Fan LF, Jiang CQ, Zhang YY, Luo HS, Tang ZJ, et al. Expression and significance of PTEN, hypoxia-inducible factor-1 alpha in colorectal adenoma and adenocarcinoma. World J Gastroenterol. 2003 Mar;9(3):491-4.
157. Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Onogawa S, Matsutani N, Kaio E, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. Int J Cancer. 2003 Jun 10;105(2):176-81.
158. Lu XG, Xing CG, Feng YZ, Chen J, Deng C. Clinical significance of immunohistochemical expression of hypoxia-inducible factor-1alpha as a prognostic marker in rectal adenocarcinoma. Clin Colorectal Cancer. 2006 Jan;5(5):350-3.
159. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. Dis Colon Rectum. 2005 Jun;48(6):1161-8.
160. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med. 2000 Jul;124(7):979-94.
161. Di Fabio F, Nascimbeni R, Villanacci V, Baronchelli C, Bianchi D, Fabbretti G, et al. Prognostic variables for cancer-related survival in node-negative colorectal carcinomas. Dig Surg. 2004;21(2):128-33.
162. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. Cancer. 2000 Apr 1;88(7):1739-57.
163. Griffin MR, Bergstralh EJ, Coffey RJ, Beart RW, Jr., Melton LJ, 3rd. Predictors of survival after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. Cancer. 1987 Nov 1;60(9):2318-24.

164. Wolmark N, Fisher ER, Wieand HS, Fisher B. The relationship of depth of penetration and tumor size to the number of positive nodes in Dukes C colorectal cancer. Cancer. 1984 Jun 15;53(12):2707-12.
165. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. Am J Pathol. 2000 Aug;157(2):411-21.
166. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. Cancer Res. 2006 Jan 15;66(2):632-7.
167. Yu JX, Cui L, Zhang QY, Chen H, Ji P, Wei HJ, et al. Expression of NOS and HIF-1alpha in human colorectal carcinoma and implication in tumor angiogenesis. World J Gastroenterol. 2006 Aug 7;12(29):4660-4.
168. Koukourakis MI, Bentzen SM, Giatromanolaki A, Wilson GD, Daley FM, Saunders MI, et al. Endogenous markers of two separate hypoxia response pathways (hypoxia inducible factor 2 alpha and carbonic anhydrase 9) are associated with radiotherapy failure in head and neck cancer patients recruited in the CHART randomized trial. J Clin Oncol. 2006 Feb 10;24(5):727-35.
169. Jankovic B, Aquino-Parsons C, Raleigh JA, Stanbridge EJ, Durand RE, Banath JP, et al. Comparison between pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and expression of endogenous hypoxia markers in cancer of the uterine cervix. Cytometry B Clin Cytom. 2006 Mar;70(2):45-55.
170. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. Am J Pathol. 2001 Mar;158(3):905-19.
171. Chia SK, Wykoff CC, Watson PH, Han C, Leek RD, Pastorek J, et al. Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. J Clin Oncol. 2001 Aug 15;19(16):3660-8.
172. Generali D, Fox SB, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, et al. Role of carbonic anhydrase IX expression in prediction of the efficacy and outcome of primary epirubicin/tamoxifen therapy for breast cancer. Endocr Relat Cancer. 2006 Sep;13(3):921-30.
173. Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, Wycoff CC, et al. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. Cancer Res. 2001 Sep 1;61(17):6394-9.
174. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos K, Pastorek J, Wykoff CC, et al. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy. Clin Cancer Res. 2001 Nov;7(11):3399-403.

175. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, et al. Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer. Cancer Res. 2001 Nov 1;61(21):7992-8.
176. Kaanders JH, Pop LA, Marres HA, Bruaset I, van den Hoogen FJ, Merkx MA, et al. ARCON: experience in 215 patients with advanced head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2002 Mar 1;52(3):769-78.
177. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, Haukipuro K, Pastorekova S, Pastorek J, et al. Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. Am J Pathol. 1998 Jul;153(1):279-85.
178. Niemela AM, Hynninen P, Mecklin JP, Kuopio T, Kokko A, Aaltonen L, et al. Carbonic anhydrase IX is highly expressed in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007 Sep;16(9):1760-6.
179. Hong YS, Cho HJ, Kim SY, Jung KH, Park JW, Choi HS, et al. Carbonic anhydrase 9 is a predictive marker of survival benefit from lower dose of bevacizumab in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. BMC Cancer. 2009;9:246.
180. Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis. Contrib Microbiol. 2006;13:191-9.
181. Kato M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. Breast Cancer Res. 2003;5(5):R144-50.
182. Uchida D, Begum NM, Almofti A, Nakashiro K, Kawamata H, Tateishi Y, et al. Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. Exp Cell Res. 2003 Nov 1;290(2):289-302.
183. Mori T, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Ito D, Kami K, et al. CXCR4 antagonist inhibits stromal cell-derived factor 1-induced migration and invasion of human pancreatic cancer. Mol Cancer Ther. 2004 Jan;3(1):29-37.
184. Gockel I, Schimanski CC, Heinrich C, Wehler T, Frerichs K, Drescher D, et al. Expression of chemokine receptor CXCR4 in esophageal squamous cell and adenocarcinoma. BMC Cancer. 2006;6:290.
185. Lee HJ, Kim SW, Kim HY, Li S, Yun HJ, Song KS, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression, function, and clinical implications in gastric cancer. Int J Oncol. 2009 Feb;34(2):473-80.
186. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. Nature. 1998 Jun 11;393(6685):591-4.
187. Shibuta K, Mori M, Shimoda K, Inoue H, Mitra P, Barnard GF. Regional expression of CXCL12/CXCR4 in liver and hepatocellular carcinoma and cell-cycle variation during in vitro differentiation. Jpn J Cancer Res. 2002 Jul;93(7):789-97.

188. Wang N, Wu QL, Fang Y, Mai HQ, Zeng MS, Shen GP, et al. Expression of chemokine receptor CXCR4 in nasopharyngeal carcinoma: pattern of expression and correlation with clinical outcome. J Transl Med. 2005 Jun 26;3:26.
189. Pan B, Kato Y, Sengoku K, Takuma N, Niizeki N, Ishikawa M. Treatment of climacteric symptoms with herbal formulas of traditional Chinese medicine. Gynecol Obstet Invest. 2004;57(3):144-8.
190. Brainard DM, Tharp WG, Granado E, Miller N, Trocha AK, Ren XH, et al. Migration of antigen-specific T cells away from CXCR4-binding human immunodeficiency virus type 1 gp120. J Virol. 2004 May;78(10):5184-93.
191. Kwak MK, Hur K, Park DJ, Lee HJ, Lee HS, Kim WH, et al. Expression of chemokine receptors in human gastric cancer. Tumour Biol. 2005 Mar-Apr;26(2):65-70.
192. Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, Saitoh Y, Arita Y, Shinohara K, et al. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. Cancer Res. 2006 Feb 15;66(4):2181-7.
193. Schimanski CC, Bahre R, Gockel I, Muller A, Frerichs K, Horner V, et al. Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4. Br J Cancer. 2006 Jul 17;95(2):210-7.
194. Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, et al. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. Clin Cancer Res. 2000 Sep;6(9):3530-5.
195. Marchesi F, Monti P, Leone BE, Zerbi A, Vecchi A, Piemonti L, et al. Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4. Cancer Res. 2004 Nov 15;64(22):8420-7.
196. Wehler T, Wolfert F, Schimanski CC, Gockel I, Herr W, Biesterfeld S, et al. Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by pancreatic cancer correlates with advanced disease. Oncol Rep. 2006 Dec;16(6):1159-64.

ÖZET

KOLOREKTAL KARSİNOMLARDA HIF-1 ALFA, CXCR4 VE CA9 İMMÜNHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLERİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ

Kolorektal karsinomlar, dünyada ve ülkemizde sık görülen, her iki cins için de yüksek mortalite ve morbidite nedeni olan tümörlerdir.

Günümüzde altın standart prognostik parametre TNM evrelemesidir. Ancak aynı evredeki hastaların farklı klinik gidiş göstermeleri yeni prognostik parametreler araştırmayı gerekli kılmaktadır.

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan ve Onkoloji Anabilim Dalı'nda takipli, 186 kolorektal karsinoma ait rezeksiyon materyali incelenmiştir. Amacımız, bu tümörlerde, immünhistokimyasal olarak HIF-1α, CXCR4 ve CA9 ekspresyonlarını belirlemek, bu ekspresyonların hastaların klinik özellikleri (yaş, cinsiyet), tümörün yerleştiği barsak segmenti, tümör çapı, tümörün makroskopik büyüme paterni, histolojik tipi, tümör grade'i, anjiolenfatik invazyon varlığı, TNM evresi, karaciğer metastazı, takipte lokal nüks gelişimi ve hastaların sağ kalımı ile ilişkilerini inceleyerek, prognostik önemlerini araştırmaktır.

Vakaların %94'ünde nükleer HIF-1α ekspresyonu, %89'unda sitoplazmik CXCR4 ekspresyonu ve %15,6'sında ise membranöz CA9 ekspresyonu görülmüştür. Her 3 belirtecin immünhistokimyasal ekspresyonu ile T, N, M kategorileri, anjiolenfatik invazyon, evre ve sağ kalım gibi majör prognostik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır. CXCR4 ekspresyonunun grade 1-2 tümörlerde, grade 3 tümörlerden daha yüksek olduğu

bulunmuş ($p<0,05$), HIF-1α ve CA9 ekspresyonu ile tümör grade'i arasında ilişki bulunmamıştır.

Sonuç olarak, bu üç belirtecin prognostik öneminin sınırlı olduğu ve rol aldıkları biyokimyasal basamakların öngördüğünün aksine kötü prognostik belirteç olmadıkları görülmüştür.

Literatürdeki çelişkili sonuçların aydınlanması ve bu belirteçlerin tedavideki rollerinin belirlenebilmesi için, standardize teknik yöntemlerin kullanılacağı geniş serilerde yapılacak araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Kolorektal adenokarsinomlarda prognostik belirteçler, HIF-1α, CXCR4, CA9

SUMMARY

PROGNOSTIC ROLE OF HIF-1 ALPHA, CA9 AND CXCR4 IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION IN COLORECTAL CARCINOMAS

Colorectal carcinoma is common in our country and worldwide. It is still a cause of high mortality and morbidity for both genders.

For now, TNM staging is the gold standart prognostic parameter for colorectal carcinoma. However, remarks about different clinical behaviour of patients at the same stage necessitate to search for new prognostic parameters.

One hundred and eighty six colorectal carcinoma cases, diagnosed at the Pathology Department of Gazi University Medical School and clinically followed by the Oncology Department, were included in this study. Our aim was to analyse the immunohistochemical expression of HIF-1α, CXCR4 and CA9 in resection materials and find their relation with patients' clinic features (age, gender), tumour localization, tumour dimension, macroscopic growth pattern, histologic type, grade, angiolymphatic invasion, TNM stage, liver metastasis, local recurrence and overall survival. This way we planned to determine the prognostic significance of these immunohistochemical markers.

Ninety-four percent of the operative samples showed nuclear positivity with HIF-1α. Eighty-nine percent of cases showed cytoplasmic CXCR4 expression. CA9 membranous expression was seen in fifteen percent of the cases. Immunhistochemical expression of none of these markers were related to major prognostic parameters as angiolymphatic invasion, T, N, M categories, stage and

overall survival. CXCR4 expresion was significantly higher in grade 1-2 tumours compared with grade 3. But we did not find any correlation between the grade and CA9 and HIF-1α expression.

This study showed that, prognostic significance of these three markers is very limited in colorectal carcinomas. Although they appear to be poor prognostic factors based on their role in the biochemical pathways of carcinogenesis, we did not find any evidence for this.

In conclusion, to clarify the conflicting results in the literature, and to determine the role of these markers for treatment, there must be larger prospective studies with standardized technical methods.

Keywords: Prognostic parameters in colorectal carcinoma, HIF-1α, CXCR4, CA9

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı
Burcu Saka
Doğum Yeri ve Tarihi
Ordu, 27.08.1981
Eğitimi
2006-2010 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
2010 Emory Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Bölümü, Atlanta, ABD (Short term Scholar)
1999-2005 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
1992-1999 Tokat Anadolu Lisesi
Yabancı Dili
İngilizce
Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar
Ankara Patoloji Derneği
Türk Patoloji Derneği
Özeti Basılmış Uluslararası Kongre Bildirileri
Medulloblastoma with myogenic and melanotic differentiation:
A case report and rewiew of literature. 27 th International Congress of the International Academy of Pathology, 12-17 Ekim 2008, Atina, Yunanistan.
Poyraz A**, Saka B,** Işık Gönül İ, Baykaner K, Uluoğlu Ö.
Özeti Basılmış Ulusal Kongre Bildirileri
1. Endoservikal Müsinöz Taşlı Yüzük Hücreli Varyant Olgu Sunumu. Korucuoğlu Ü, Ekinci Ö, Onan A, **Saka B,** Himmetoğlu Ö, Taşkıran Ç, Ataoğlu Ö. 11. Ulusal Jinekolojik Onkoloji Kongresi, Belek, Antalya, 30 Nisan-4 Mayıs 2008, Poster no: P-097
2. Eş Zamanlı Schwannom ve Psammomatöz Meningiom ile Karakterli Nörofibromatozis tip 2: Olgu sunumu. **Saka B**, Yılmaz G, Uluoğlu Ö. 18. Ulusal Patoloji Kongresi, Belek, Antalya, 25-29 Ekim 2008. Özet kitabı, s.180, Poster no: P-345
3. Olgu Sunumu: Mezenterik Fibromatozis (İntraabdominal Desmoid Tümör) **Saka B**, Uyar Göçün P, Dursun A. 18. Ulusal Patoloji Kongresi, Belek, Antalya, 25-29 Ekim 2008. Özet kitabı, s.61, Poster no: P-86
4. Olgu Sunumu: Dedifferansiye Kordoma**. Saka B,** Poyraz A, Uluoğlu Ö. 18. Ulusal Patoloji Kongresi, Belek, Antalya, 25-29 Ekim
2008. Özet kitabı, s.189, Poster no: P-363
5. Deride Skuamöz Hücreli Karsinomun Nadir Varyantı: Psödovasküler Skuamöz Hücreli Karsinom **. Saka B**, Ekinci Ö, Erdem Ö, Ataoğlu Ö. 18. Ulusal Patoloji Kongresi, Belek, Antalya, 25-29 Ekim 2008. Özet kitabı, s.161, Poster no: P-304
6. Mitotik Aktif Koranjiom (Plasental Hemanjiom). **Saka B,** Yılmaz G, Erdem M, Poyraz A 18. Ulusal Patoloji Kongresi, Belek, Antalya, 25-29 Ekim 2008. Özet kitabı, s. 101, Poster no: P-168
7. Parotis Bezinde Ekstranodal Marginal Zon B Hücreli Lenfoma (Malt Tipi). Çakır A, **Saka B**, Erdem Ö, Işık Gönül İ, Uyar Göçün P. 4. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, Ankara, 22-29 Mart 2009. Kongre kitabı, s. 103, Poster no: P-10.

8.Meme Lezyonlarının İncelenmesinde Tuzaklar ve İpuçları: 3 olgu sunumu. Uyar Göçün P, **Saka B**, Çelik S, Çakır A. 4. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, Ankara, 22-29 Mart 2009. Kongre kitabı, s. 139, Poster no: P-66.
9. Atipik Glandüler Hücreler İçeren Pap Smearlerde Nadir Görülen Histopatolojik İnceleme Sonuçları:3 olgu sunumu. **Saka B,** Çelik S, Çakır A, Yılmaz G, Uyar Göçün P. 4. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, Ankara, 22-29 Mart 2009. Kongre kitabı, s. 160, Poster no: P-97.

Yayınları

Four different malignancies in one patient: a case report.
Demirci U, Coşkun U, Göçün PU, Gurlek B, Saka B, Oztürk B, Benekli M, Büyükberber S, Cases J. 2010 Feb 8;3:53, PMID: 20205852