

**T.C. HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK DERECELİ OVER SERÖZ KARSİNOMLARINDA LENF NODU  
TUTULUMU OLAN VE OLMAYAN OLGULARDA APELİN VE APJ  
RESEPTÖRÜ DOKU DAĞILIMLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Işık ÜNAL**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA  
2018**

**T.C HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK DERECELİ OVER SERÖZ KARSİNOMLARINDA  
LENF NODU TUTULUMU OLAN VE OLMAYAN OLGULARDA  
APELİN VE APJ RESEPTÖRÜ DOKU DAĞILIMLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Işık ÜNAL**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. N. Dilara ZEYBEK**

**ANKARA  
2018**



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Tıp Fakültesi

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

12.02.2018

Sayı : 58792979/

Konu :

Tıp Fakültesi Dekanlığına,

Dr. Işık Ünal'ın 12 Şubat 2018 tarihinde jürimiz önünde savunmasını yaptığı "Yüksek Dereceli Over Seröz Karsinomlarında Lenf Nodu Tutulumu Olan ve Olmayan Olgularda Apelin ve Apı Reseptörü Doku Dağılımlarının Araştırılması" başlıklı tez çalışması jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. A. Nur Çakar  
TOBB Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu  
H.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğr. Üyesi

Doç. Dr. Dilara Zeybek  
H.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğr. Üyesi

ONAY

Bu tez/ Tıp'ta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent Altun  
Tıp Fakültesi Dekan

## TEŞEKKÜR

Gece gündüz demeden her koşul ve zaman diliminde çalışmamızı sonuna kadar sahiplenerek özveriyle bilgi ve deneyimlerini aktaran değerli tez danışmanım Doç. Dr. Dilara Zeybek'e,

Çalışmamızın en zor süreçlerinden biri olan ilk aşamada planlanmasında multidisipliner toplantılar düzenleyen, sorunun ve çalışma düzeninin planlanmasını sağlayan ilk tez danışmanım Prof. Dr. Sinan Yürüker'e,

Bana iyi bir çalışma ortamı sunan Hacettepe Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine ve pratik yaklaşımı ile laboratuvar çalışmalarım sırasında çok şey öğrendiğim Bio. Tülay Dağışan'a,

Asistanlığa başladığım ilk zamanlardan itibaren çalışma disiplini ile hep örnek aldığım, çalışmamdaki desteği ve daha önemlisi dostluğu için Dr. Can Ilgın'a,

Çalışmamızda klinik destek sağlayan, tezimde bilimsel katkıları ve hastalar için saatlerce ameliyatlardaki özverili çalışmaları için Doç. Dr. Nejat Özgül'e,

Patoloji rotasyonum sırasında çok şey öğrendiğim Prof. Dr. Alp Usubütün'e, hastaların doğru tanı ve tedavi alabilmesi için canla başla çalışan, başta Dr. Gözde Elif Taşar olmak üzere tüm patoloji asistanlarına,

Çanakkaleden asistanlık yaptığım süre içinde tüm kısıtlılıklara rağmen eğitimime katkı sağlayan Yrd. Doç. Dr. Aslı Muratlı ve Yrd. Doç. Dr. Nilfen Yıldırım Erdoğan'a ve hayata karşı güçlü duruşuyla tüm mücadelelerimde yanımda olan dostum Dr. Serap Akyüz'e,

Tanıdığım en iyi eğitimci ve hayatımın en büyük şanslarından biri olan Hacer Gencelli'ye,

Acısıyla tatlısıyla asistanlık süresinin benim için en büyük kazanımlarından olan, yüzümü hep güldüren, uzun çalışma saatlerinin keyifli geçmesini sağlayan, her zaman yanımda olan dostlarım Dr. Zeynep Bengisu Kaya ve Dr. Naz Güleray'a,

Zekasıyla ve çözüm önerileriyle beni hep şaşırtan, her zaman yaşam tarzıyla örnek aldığım Abim Güneş Ünal'a,

ve

Bugünlere gelmemi sağlayan, 6 yaşında söylediğim gibi gerçek bir "bilim anne" olarak bana en güzel örnek teşkil eden biricik Annem'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Işık ÜNAL, Yüksek Dereceli Over Seröz Karsinomlarında Lenf Nodu Tutulumu Olan ve Olmayan Olgularda Apelin ve APJ Reseptörü Doku Dağılımlarının Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Uzmanlık Tezi, Ankara, 2018.** Over kanseri ileri evrede tanı alması ve yüksek mortalite oranları nedeniyle önemli bir sağlık sorunudur. En sık görülen alt tipi olan seröz karsinom, ileri evrede ve uzak metastaz/lenf nodu metastazı olduktan sonra saptanabilmektedir. Lenfatik invazyon ve anjiyogenez üzerinde etkili faktörler arasında sayılan ve son yıllarda obezite ve diyabetle de ilişkili bir adipokin olan apelin molekülü ile reseptörü APJ, seröz over karsinomlarındaki lenf nodu tutulumu üzerinde etkili olabilir. Çalışmamızda yüksek dereceli seröz karsinom olgularında yaş, vücut kitle indeksi, sağ kalım oranları gibi demografik veriler yanısıra tümör/stroma oranı, apelin ve APJ immünreaktivitesinin lenf nodu tutulumu ile ilişkisi araştırıldı. Bu amaçla, indirekt immünperoksidaz yöntemi ile işaretlenen kesitlere MATLAB analizi uygulandı ve tüm veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Obez ve preobez olan hastalarda, tümör hücrelerinde apelin immünreaktivitesi vücut kitle indeksi normal olan hastalardan daha şiddetli olarak saptandı. Stromadan zengin grupta lenf nodu tutulumu oranının daha yüksek olduğu ve sağ kalım oranının düşük olduğu saptandı. Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan grupların her ikisinde de H-skoruna göre şiddetli apelin ve orta derecede APJ immünreaktivitesi saptandı. Gruplar arasında istatistiksel fark bulunmadı. Bu çalışma sonucunda seröz karsinom olgularından obez ve preobezlerde tümör hücrelerindeki artmış apelin immünreaktivitesi ilk kez ortaya konmuştur. İleri evre seröz karsinomlarında apelin lenf nodu tutulumu ilişkisinin gösterilmesinde stromal kompartmandaki hücrelerde de apelin /APJ sisteminin değerlendirilmesi gerekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Seröz over kanseri, obezite, adipokin, lenfatik invazyon, MATLAB, apelin, APJ reseptörü.

**Destekleyen Kuruluş:** Bu çalışma HÜTF Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi TSA-2017-13046 numaralı projeden sağlanan iki antikor kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

## ABSTRACT

**Işık ÜNAL, Investigation of Apelin and APJ Receptor Tissue Distributions in High Grade Serous Ovarian Carcinoma with and without Lymph Node Involvement, Hacettepe University School of Medicine, Histology and Embryology Specialty Thesis, Ankara, 2018.** Ovarian cancer is an important health problem because of its advanced diagnosis and high mortality rates. Serous carcinoma, the most common subtype, can be detected in advanced stage and after distant metastasis or lymph node metastasis. The apelin molecule, an adipokine associated with obesity and diabetes in recent years and its receptor APJ which are considered to be effective factors for lymphatic invasion and angiogenesis can both affect the lymph node involvement in serous ovarian carcinomas. In our study, demographic data such as age, body mass index, survival rates, as well as tumor / stroma ratio, apelin and APJ immunoreactivity in relation to lymph node involvement were investigated in high grade serous carcinomas. For this purpose, sections labelled with indirect immunoperoxidase method were evaluated by MATLAB analysis and statistical analysis was performed. In obese and preobese patients, apelin expression in tumor cells was found to be more severe than in patients with normal body mass index. It was found that the rate of lymph node involvement was higher and the survival rate was lower in the stroma rich group. Severe apelin and moderate APJ immunoreactivity was detected according to H-score in both groups with and without lymph node involvement. There was no statistical difference between the groups. As a result of this study, increased apelin immunoreactivity in tumor cells in obese and preobese serous carcinoma patients was first demonstrated. In the study of apelin and lymph node involvement in advanced stage serous carcinomas, apelin / APJ system should be evaluated in stromal compartment cells.

**Key Words:** Serous ovarian cancer, obesity, adipokine, lymphatic invasion, MATLAB, Apelin, APJ receptor.

**Supported by:** This study was carried out using two antibodies obtained from the project (TSA-2017-13046) supported by Hacettepe University Faculty of Medicine Scientific Research Projects Coordination Unit.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xiv
GRAFİKLER	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Over Kanseri	3
2.2.2 Over Kanseri Patogenezi	4
2.2.3. Epitelyal Over Kanserleri Sınıflaması	6
2.2.4. Yüksek Dereceli Seröz Karsinom (HGSC)	7
2.3 Kanser Mikroçevresi	9
2.4 Lenfatik İnvazyon ve Lenfanjiyogenez	10
2.4.1. Lenfanjiyogenez:	11
2.4.2. Premetastatik Niş Oluşumu:	12
2.4.3. Tümör Hücrelerinin Lenf Noduna Ulaşması	13
2.4.4. Tümör Hücrelerinin Lenf Nodunda İmmun Yanıttan Kaçışı	15
2.5 Obezite ve Kanser	16
2.6 Yağ Doku, Adipokinler ve Kanser	17
2.7 Apelin ve APJ Reseptörü	18
2.7.1 Over Dokusunda Apelin ve APJ Reseptörü	19
2.7.2 Apelin/ APJ Sistemi ve Anjiyogenez	20
2.7.3 Kanserde Apelin ve APJ reseptörü; Lenfatik İnvazyon ve Metastazda Etkisi	21
2.7.4 Over Kanserinde Apelin ve APJ Reseptörü	22

3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1 Hasta Gruplarının Belirlenmesi ve Örneklerin Elde Edilmesi	24
3.2 Hasta Verilerinin Toplanması	24
3.3 Doku Kesitlerinin Alınması	25
3.4 Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması	25
3.4.1 Mayer'in Hematoksileni	25
3.4.2 Eozin	25
3.4.3 Trikrom Boyası Hazırlanışı	26
3.4.4. TBS (pH:7,6 10x TBS solüsyonu)	26
3.4.5. TBS + BSA (%2.5)	27
3.4.6. TRİS-EDTA (10 mM Tris Base, 1mM EDTA solüsyonu)	27
3.4.7. Sitrat Tampon (100 mm trisodyum sitrat)	28
3.4.8. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Blokaj Solüsyonu	28
3.4.9 Serum Blokaj Solüsyonu	28
3.4.10 Primer Antikorlar	29
3.4.11 Sekonder Antikor	29
3.4.12 Diamino Benzidin (DAB) Solüsyonu	29
3.5 Histokimya Yönteminin Uygulanması	30
3.5.1 Mayer'in Hematoksileni Boyama Protokolü	30
3.5.2 Trikrom Boyama Protokolü	30
3.6 İndirekt İmmunperoksidaz Yönteminin Uygulanması	31
3.7. Görüntüleme ve Değerlendirme	33
3.7.1 Kesitlerin Görüntülenmesi	33
3.7.2. Tümör Stroma Oranının Değerlendirilmesi	33
3.7.3 İmmünohistokimyasal İşaretlemenin Değerlendirilmesi	33
3.7.4 İstatistik Analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1 Hasta Verilerinin Değerlendirilmesi	39
4.1.1 Hastaların Demografik Özellikleri	39
4.1.2 Sağ Kalım Oranları ile Vücut Kitle İndeksinin Karşılaştırılması	39



4.2 Seröz Over Karsinomu Vakalarının Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi	42
4.3 Tümör/Stroma Oranının Değerlendirilmesi	47
4.4 İmmünohistokimya Boyaması ile Preperatların Değerlendirilmesi	49
4.4.1 Tümör hücrelerinde Apelin ve APJ immünreaktivitesi:	51
4.4.2. İmmünreaktivitenin Obezite ile Değerlendirilmesi	56
4.4.3. İmmünreaktivitenin Lenf Nodu Tutulumu İle Değerlendirilmesi	57
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ	66
KAYNAKLAR	68
EKLER	75
Ek 1. Etik Kurul	75

**KISALTMALAR**

AKT	Protein kinaz B
APLN	Apelin geni
Apelin	APJ reseptörü endojen ligandı
APJ	Apelin reseptörü
BMI	Vücut kitle indeksi
BRCA	BReast CAncer gene
BSA	Sığır Serum Albumini
CAF	Kanser ilişkili fibroblast
DAB	Diaminobenzidin
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ECM	Ekstrasellüler matriks
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FSH	Folikül stimüle edici hormonun
H&E	Hematoksilen ve Eozin
HEV	Yüksek endotelial venül
HGSC	Yüksek dereceli seröz karsinom
HNPCC	Hereditör nonpolipozis kolorektal kanser sendromu
HRP	Horseshoe peroxidase
IARC	International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Ajansı)
LGSC	Düşük dereceli seröz karsinom
LH	Lüteinizan hormonun
MATLAB	Matrix laboratory
MMP	Matriks metalloproteinaz
NCI	National Cancer Institute
OKS	Oral kontraseptif
PI3K	Fosfatidil inositol 3-kinaz

SCS	subkapsuler sinus
SEE-FIM	Sectioning and Extensive Examining of the FIMbria
SLN	Sentinel lenf nodu
STIC	Seröz Tubal İntraepitelyal Karsinom
TAM	Tümör ilişkili makrofajlar
TBS	Tris tamponlu salin
TRIS-EDTA	Tris-Etilen diamin tetra asetik asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

## ŞEKİLLER

- Şekil 1.** *Colour deconvolution* yöntemi ile indirekt immünperoksidaz ile işaretlenen kesitlerde (1-A), hematoksilen (1-B) , DAB (1-C) ve rezidüel alanlar (1-D) belirlendi. Rezidüel alanlar ile hematoksilenle boyanmış çekirdekler analiz dışı bırakılarak tümör hücrelerinin sadece sitoplazma ve membranlarındaki immünreaktivite değerlendirildi (1-E). 35
- Şekil 2.** Çalışmada kullanılan *Fuzzy C Means* algoritması (s: Algoritm tekrarlanma sayısı,  $\epsilon$ : eşik değer, U matrisi: her örneğin pixel olarak kümelere olan benzerliği, V: her kümenin orta nokta değeri) 36
- Şekil 3.** *Fuzzy C Means* algoritmasına göre immünreaktivite şiddetinin 3 renk boyutunda (*RGB: red, green, blue*) ve 0 (siyah) -255 (beyaz) arasında kümeleneş işleminde kullanılan skala 37
- Şekil 4.** *Fuzzy C Means* algoritması ile immünreaktivite şiddetinin 3 kategoride sınıflandırılması. İmmünreaktivite; şiddetli: kırmızı, orta şiddette: mavi, hafif: yeşil renk ile ifade edilecek şekilde rekleştirildi (4-B) 37
- Şekil 5.** Seröz papiller karsinom ile infiltrate over dokusu, korpus albicans yapısı, kistik dejenere alanlar, fibrotik over dokusu izlenmektedir. (Hematoksilen- Eozin, x 40) 42
- Şekil 6.** Seröz over karsinomu farklı morfolojik paternlerde izlendi. A) Papiller, B) Mikropapiller, C) İnfiltratif, D) Solid patern (Hematoksilen- Eozin, x40). 43
- Şekil 7.** Tümör içinde kanama alanları (oklar) (Hematoksilen-Eozin, x 12,5) 44
- Şekil 8.** Daha büyük büyütmede tümör dokusu içinde A) nekrotik alanlar (beyaz ok), B)hemorajik alanlar (siyah ok), farklı boyutlarda konsantrik yapıda psammom cisimleri (mavi oklar) izlenmektedir. (Hematoksilen-Eozin, A. B: x200) 44
- Şekil 9.** Over seröz kanserine ait örneklerde nükleer atipi ve bazaar dev çekirdek içeren tümör hücreleri izlenmektedir. (Hematoksilen-Eozin, A, B: X400) 45
- Şekil 10.** Tümör hücrelerinde mitotik figürler sık izlendi. A, B) Telofaz evresinde aktif mitoz geçiren tümör hücreleri (siyah ok). C,D) Atipik mitoz örnekleri (kırmızı ok) Hematoksilen X630 45
- Şekil 11.** Lenf nodu tutulumu olan gruptan lenf düğümüne ait bir örneğin ışık mikrofrafında tümör hücrelerinin subkapsüler sinüslerde yerleşimi izlenmektedir. Lenfositler arasında büyük atipik çekirdekli tümör hücreleri gözlenmektedir. (A, C, D- Hematoksilen-Eozin A:x 12,5, C:X100, D: X200, B-Masson trikrom boyama x 12,5) 46

- Şekil 12.** Omental yağ dokusu içinde infiltratif tümör odakları izlenmektedir. (Hematoksilen-Eozin A: X12,5, B: X40) 46
- Şekil 13.** Papiller over seröz karsinomuna ait örnekte tümör stroma ilişkisi ve stromada damarlarda konjesyon izlenmektedir. (Masson'un trikromu A: x40, B: x100) 47
- Şekil 14.** Lenf nodu tutulumu olan grupta A) Stromadan zengin ve B) Stromadan fakir olan tümör dokusu C) Lenf nodu tutulumu olmayan grupta stromadan zengin D) Stromadan fakir olan tümör dokusu (Trikrom, A-D: x100) E) Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan gruplarda stromadan zengin (yeşil) ve fakir (mavi) olan vakaların dağılım grafiği (n=30). F) Stromadan zengin ve fakir olan olgularda Kaplan Meier sağ kalım grafiği. 48
- Şekil 15.** Normal ovaryum dokusunda anti-apelin antikoru ile yapılan immün işaretlemeye A) ovaryum stromasında B) germinal epitelde C, D) Damar endoteli ve damar düz kasında pozitif apelin immünreaktivitesi izlenmektedir. (İndirekt immünperoksidaz A: x40, B,C, D: x400) 49
- Şekil 16.** Normal tuba uterina dokusunda, epitelde ve stromal hücrelerde apelin ifadesi (İndirekt immünperoksidaz A: X400 B: X630) 50
- Şekil 17.** Normal ovaryum dokusunda anti- APJ antikoru ile yapılan immün işaretlemeye APJ immünreaktivitesi A) Ovaryum stroması ve germinal epitelde, B)Damar endotel hücrelerinde pozitif olarak izlenmektedir. (İndirekt immünperoksidaz A, B: x400) 50
- Şekil 18.** Normal tuba uterina dokusuna ait örnekte tuba uterina epitelinde APJ immünreaktivitesi izlenmektedir.(İndirekt immünperoksidaz A:X200, B: X400) 50
- Şekil 19.** A)Tümör hücrelerinde apelin immünreaktivitesi (İndirekt immünperoksidaz x400), B)Negatif kontrol, (Hematoksilen x400), C)MATLAB analiz programı ile immünohistokimya boyanma şiddetinin analizi (kırmızı: kuvvetli, mavi: orta şiddette boyanma, yeşil: hafif boyanma) 51
- Şekil 20.** Tümör hücrelerinde sitoplazmik apelin immünreaktivitesi izlendi. Lenf nodu tutulumu olan grupta A, A-1) şiddetli B, B-1) hafif şiddette apelin immünreaktivitesi izlenmektedir. (A,B: İndirekt immünperoksidaz x400) 52
- Şekil 21.** Tümör hücrelerinde sitoplazmik apelin immünreaktivitesi izlendi. Lenf nodu tutulumu olmayan grupta A, A-1) şiddetli B, B-1) hafif-orta şiddette apelin immünreaktivitesi izlenmektedir. (A,B: İndirekt immünperoksidaz x400) 52
- Şekil 22.** Tümör hücrelerinde pozitif APJ immünreaktivitesi izlendi. Lenf nodu tutulumu olan grupta A, A-1) Şiddetli B, B-1) Hafif şiddette APJ

- immünreaktivitesi izlenmektedir. (A,B: İndirekt immünperoksidaz x400) 54
- Şekil 23.** Tümör hücrelerinde pozitif APJ immünreaktivitesi izlendi. Lenf nodu tutulumu olmayan grupta A, A-1) şiddetli B, B-1) hafif şiddette APJ immünreaktivitesi izlenmektedir (A,B: İndirekt immünperoksidaz x400) 54
- Şekil 24.** Tümör dokusunda apelin immünreaktivitesi A- A-2) Lenf nodu tutulumu olan B- B-2) Lenf nodu tutulumu olmayan gruplarda şiddetli ve orta şiddette apelin immünreaktivitesi (A-D:İndirekt immünperoksidaz x400), C) Şiddetli apelin immünreaktivitesi yüzdelerinin gruplar arası dağılım grafiği D) Apelin immünreaktivitesi için gruplarda H skoru grafiği 58
- Şekil 25.** Tümör dokusunda APJ immünreaktivitesi Lenf nodu tutulumu olan A- A-2) ve olmayan (B- B-2) gruplarda APJ immünreaktivitesi şiddetli (A-D:İndirekt immünperoksidaz x400), C) Şiddetli APJ immünreaktivitesi yüzdelerinin gruplar arası dağılım grafiği D) APJ immünreaktivitesi için gruplarda H skoru grafiği 59

## TABLOLAR

Tablo 1.	Ülkemizde ölüm nedeni istatistikleri, TÜİK, 2016	1
Tablo 2.	Epitelyal over kanseri alt tiplerinin evre I/II ve evre III/IV dağılımı	7
Tablo 3.	Vücut kitle indeksine göre obezite sınıflaması- Dünya Sağlık Örgütü 2004 verileri	16
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan primer antikorların özellikleri	29
Tablo 5.	Çalışmamızda immünreaktiviteyi belirlemede kullanılan görüntülerin elde edilmesinde fotoğraflar arası standardizasyonun sağlanması için sabit tutulan pozlama ( <i>exposure</i> ), ışık yoğunluğu ( <i>intensity</i> ) ve diyafram açıklığı ( <i>aperture</i> ) değerleri	34
Tablo 6.	Dünya Sağlık Örgütünün vücut kitle indeksi ve nutrisyon durumu sınıflamasına göre hastaların yüzde dağılımları.	39
Tablo 7.	Çalışmamızda sağ kalım, lenf nodu tutulumu ve immünohistokimyasal işaretlenmelerin analizinde kullanılan obezite sınıflaması.	40
Tablo 8.	Lenf nodu tutulumu olan grupta MATLAB analizi ile belirlenen apelin immünreaktivitesi pixel değerleri ve toplam apelin ifadesi içindeki şiddetli, orta ve hafif immünreaktivite yüzde dağılımları	53
Tablo 9.	Lenf nodu tutulumu olmayan grupta MATLAB analizi ile belirlenen apelin immünreaktivitesi pixel değerleri ve toplam apelin ifadesi içindeki şiddetli, orta ve hafif immünreaktivite yüzde dağılımları	53
Tablo 10.	Lenf nodu tutulumu olan grupta MATLAB analizi ile belirlenen APJ immünreaktivitesi pixel değerleri ve toplam APJ ifadesi içindeki şiddetli, orta ve hafif immünreaktivite yüzde dağılımları	55
Tablo 11.	Lenf nodu tutulumu olmayan grupta MATLAB analizi ile belirlenen APJ immünreaktivitesi pixel değerleri ve toplam APJ ifadesi içindeki şiddetli, orta ve hafif immünreaktivite yüzde dağılımları	55
Tablo 12.	Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan gruplarda apelin ve APJ immünreaktivitesi ortalamaları ve H-skoru değerleri	57

## GRAFİKLER

- Grafik 1.** Kadınlarda görülen kanserlerin 2012 yılı insidansları, Uluslararası Kanser Ajansı (IARC), Globocan 2012 verileri 3
- Grafik 2.** Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin dağılımı, Uluslararası Kanser Ajansı (IARC), Globocan 2012 verileri. 3
- Grafik 3.** Tüm Yaş Gruplarındaki Kadınlarda En Sık Görülen Kanserlerin Yüzde Dağılımları, Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014. 4
- Grafik 4.** Obezite ile ilişkili Kanserlerin Yaşa Standardize İnsidans Hızlarının Cinsiyete Göre 2010-2014 Yılları Arasındaki Dağılımı (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2010-2014) (Dünya Standart Nüfusu,100.000 Kişide) (56) (Kadınlar için özofagus, kolorektal, safrakesesi, pankreas, meme, uterus korpusu, over, böbrek; Erkekler için özofagus, kolorektal, pankreas, böbrek tümörleri değerlendirilmiştir.) 17
- Grafik 5.** Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan hasta gruplarında Kaplan-Meier sağ kalım grafiği 41
- Grafik 6.** Vücut kitle indeksine göre normal, preobez ve obez olgularda Kaplan-Meier sağ kalım grafiği 41
- Grafik 7.** MATLAB analiz sonuçlarına göre obezite ile tümör dokusunda apelin immünreaktivite şiddetinin dağılım grafiği. A) Preobez ve obez olanlarda tümörde şiddetli apelin immünreaktivitesi izlendi. B) Vücut kitle indeksi normal olan hastalarda hafif şiddette apelin immünreaktivitesi izlendi. (\* P<0.05) 56



## 1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde giderek artan bir sağlık problemidir. Gelişmiş ve gelişmekte olan toplumlarda önemli bir sosyoekonomik yüke, bireylerde maddi ve manevi kayıplara yol açmaktadır. Ülkemizde sebebi bilinen ölümler sıralamasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık görülen ikinci ölüm sebebi (Tablo 1) olması açısından önemli bir toplum sağlığı problemidir (1).

**Tablo 1.** Ülkemizde ölüm nedeni istatistikleri, TÜİK, 2016

	2015 <sup>(r)</sup>		2016	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)
<b>Toplam</b>	<b>397 037</b>	<b>100,0</b>	<b>408 782</b>	<b>100,0</b>
Dolaşım sistemi hastalıkları	159 194	40,1	162 876	39,8
İyi huylu ve kötü huylu tümörler (malign ve benign neoplazmlar)	79 160	19,9	80 577	19,7
Solunum sistemi hastalıkları	43 821	11,0	48 532	11,9
Endokrin (iç salgı bezi), beslenme ve metabolizmayla ilgili hastalıklar	19 803	5,0	20 330	5,0
Sinir sistemi ve duyu organları hastalıkları	19 114	4,8	19 923	4,9
Dışsal yaralanma nedenleri ve zehirlenmeler	18 936	4,8	18 136	4,4
Diğer (enfeksiyon ve parazit hastalıkları, mental ve davranışsal bozukluklar, kas-iskelet sistemi ve bağ dokusunun hastalıkları vb.)	57 009	14,4	58 408	14,3

(r) 2015 yılı verileri idari kayıtların güncellenmesi nedeniyle revize edilmiştir.

Over kanseri kadınlarda geç tanı alması ve yüksek ölüm oranları nedeniyle önemli bir sağlık sorunudur. Kadınlarda kanser vakalarının önemli bir kısmını oluşturur. Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (NCI) 2014 yılı istatistik verilerine göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlarda kansere bağlı ölümlerde 5. sırada yer almaktadır(2).

Vakaların üçte ikisi evre III ve IV olarak tanı almaktadır. Evre III ve IV olan over kanseri olgularında 5 yıllık sağ kalım oranı %25-30 iken, evre I-II olan vakalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %80-95'tir (3). Epitelyal over kanserleri tüm over kanserlerinin %90'ını oluşturur ve jinekolojik kanserler içinde en sık ölüme neden olan kanserlerdir (4).

Lenf nodu tutulumu over kanseri olgularında evreyi değiştirmekte ve mortaliteyi artırarak 5 yıllık sağ kalım oranlarını etkilemektedir. Lenfatik invazyonda etkili olan faktörler arasında, son yıllarda yapılan çalışmalarda bir adipokin olan apelin ve apelinin G protein kenetli reseptörü olan APJ reseptörünün rol oynadığı

gösterilmiştir. Altinkaya ve arkadaşları endometrium kanseri hastalarından obez olanlarda serum apelin düzeylerinin daha yüksek olduğunu saptamıştır (5).

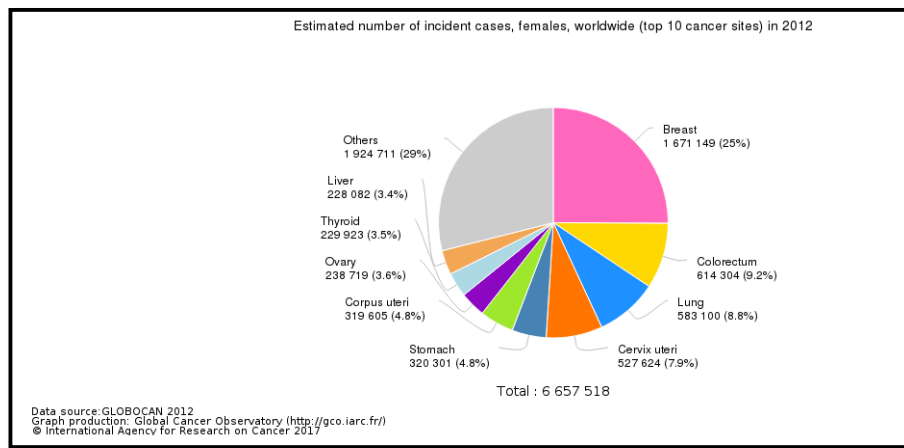
Apelinin, lenfatik endotel hücrelerinde ERK ve PI3K yolları üzerinden lenfanjiyogenez ve lenfatik metastazı artırdığı, melanom hücre hattı ile yapılan çalışmada gösterilmiştir (6). Obezitede ve diyabette düzeyleri artan apelinin bazı kanser gruplarında etkisi ile ilgili çalışmalar mevcuttur, ancak over kanseri patogeneğinde etkisi ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışma; evre III-IV yüksek dereceli over seröz karsinomlarda yaş, vücut kitle indeksi, sağ kalım oranları gibi demografik veriler ile tümör/stroma oranı, apelin ve APJ immünreaktivitesinin lenf nodu tutulumu ile ilişkisini araştırmak amacıyla planlanmıştır.

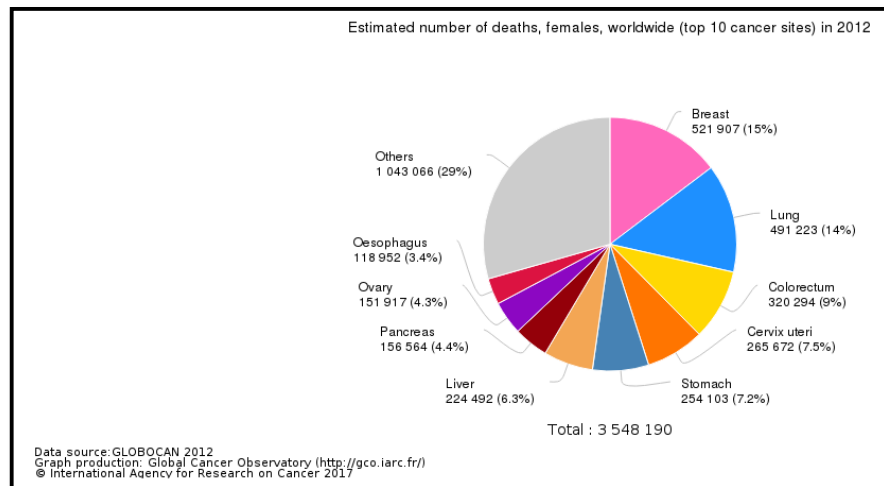
## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1 Over Kanseri

Over kanseri, dünya genelinde kadınlarda görülen kanserler içinde yedinci sıradadır (Grafik 1). Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre, 151.564 yeni tanı alan vaka bildirilmiştir. Bununla birlikte kadınlarda kansere bağlı ölümlerde sekizinci sıradadır (Grafik 2) (7).

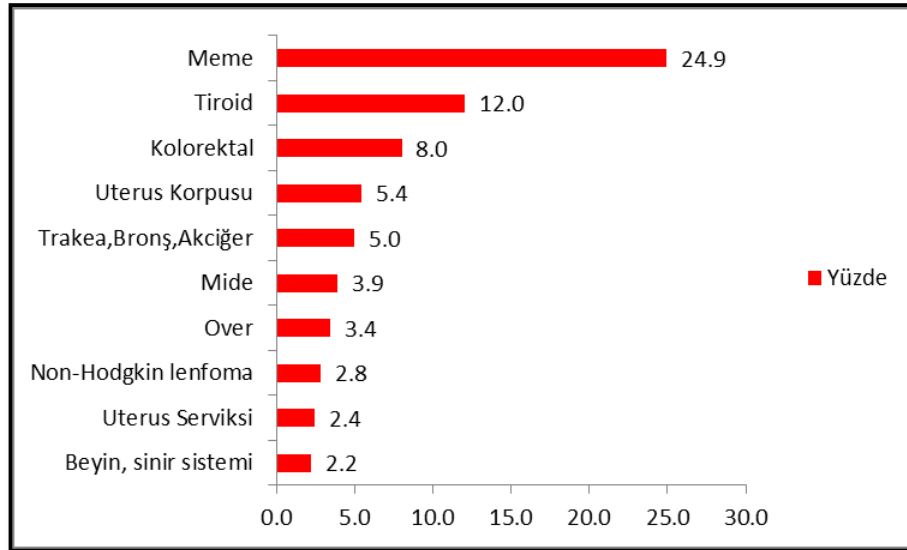


**Grafik 1.** Kadınlarda görülen kanserlerin 2012 yılı insidansları, Uluslararası Kanser Ajansı (IARC), Globocan 2012 verileri



**Grafik 2.** Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin dağılımı, Uluslararası Kanser Ajansı (IARC), Globocan 2012 verileri.

Ülkemizde de over kanseri sıklık ve ölüm oranları bu verilere benzer olmakla birlikte, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun yayınladığı kanser istatistiklerine bakıldığında, 2014 yılı Türkiye Birleşik Veri Tabanı verilerine göre tüm yaş gruplarındaki kadınlarda görülen kanserler arasında yedinci sıradadır (Grafik 3) (8).



**Grafik 3.** Tüm Yaş Gruplarındaki Kadınlarda En Sık Görülen Kanserlerin Yüzde Dağılımları, Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014.

Over kanserlerinde sağ kalım oranlarını belirleyen faktörler hastanın yaşı, genel durumu, tümörün evresidir. Bu faktörler arasında hastanın sağ kalımını en fazla belirleyen hastanın evresidir. Over dışında peritona, karın içi organlara ve lenf nodlarına metastaz yapmış evre III ve evre IV olgularda sağ kalım oranları düşmektedir.

### 2.2.2 Over Kanseri Patogenezi

Over kanseri gelişiminde birçok risk faktörü bildirilmiştir. Bunlar arasında öne çıkan ileri yaş, parite ve aile öyküsünün varlığıdır. Artan gebelik sayısı ile over kanseri insidansı düşer. Birinci veya ikinci dereceden akrabada over kanseri olması, BRCA1 ya da BRCA2 mutasyonu taşıyıcılığı, Lynch 2/HNPCC, nulliparite, infertilite ve/veya fertilite ilacı kullanımı, beyaz ırk, postmenopozal hormon replasman

tedavisi, erken menarş, geç menopoz, artmış CA-125 seviyesi, sigara kullanımı bilinen risk faktörleri arasındadır (9).

Günümüze kadar over kanseri patogenezinde farklı teoriler öne sürülmüştür. Bunlar aralıksız ovulasyon teorisi, retrograd menstruasyon, sürekli gonadotropin maruziyeti ve son yıllarda öne sürülen tubal epitelden seröz tubal intraepitelyal karsinom (STIC) zemininde seröz karsinom gelişimidir.

Over kanserinin hücresel kökeninin over yüzey epiteli olduğu 1971 yılında Fathalla tarafından öne sürüldü ve 30 yılı aşkın süre bu görüş kabul edildi (10). Fathalla, ovulasyon sırasında tekrarlayan hasar-tamir döngüsünün over yüzey epitelinde kalıcı değişikliklere yol açtığı hipotezini öne sürdü. Bu hipoteze göre, ovulasyon sonrasında bütünlüğü bozulan yüzey epiteli inklüzyon kisti oluşturur. Bu inklüzyon kisti onkojen faktörlerle neoplastik transformasyona uğrar. Bu hipotez, overde dinlenme zamanı olmayan, infertil olan veya başka nedenlerle doğum yapmamış olan kadınlarda over kanseri insidansının daha yüksek olduğunu gösteren epidemiyolojik kanıtlarla desteklendi (11).

Retrograd mensturasyon teorisine göre uterus kavitesi ve serviksten fallop tüpleri ile overlere taşınan karsinojenlerin over kanserine neden olabileceği öne sürülmüştür. Oral kontraseptif (OKS) kullanımı ile retrograd mensturasyonun azalması OKS'lerin koruyucu etkisi bu teoriyi destekler. Ayrıca tubal ligasyon ve histerektominin over kanserindeki koruyucu etkisi de retrograd mensturasyon teorisini desteklemektedir (12).

Yüksek seviyede pitüiter gonadotropinlere sürekli maruziyet over kanseri gelişimindeki teoriler arasındadır. Folikül stimüle edici hormonun (FSH) epitelyal over kanser hücrelerinde in vitro ortamda büyümeyi arttırdığı ve lüteinizan hormonun (LH) kanser hücrelerinde büyümeyi bloke ettiği ortaya konmuştur. Hipofizer gonadotropin salınımının azaldığı gebelik ve OKS kullanımının over kanseri riskini düşürmesi bu teoriyi desteklemektedir. Fertilitate tedavisi gören hastalarda over kanseri risk artışı da bu teoriyi desteklemektedir (9).

Daha sonra yapılan araştırmalarla BRCA1 ve BRCA2 genlerinin meme ve over kanserinden sorumlu olduğu tespit edildiğinde yüksek dereceli seröz karsinomun

(HGSC) hücresel kökeni ile ilgili araştırmalar da yön değiştirdi (13,14). Bu buluş sonrası, BRCA1/2 mutasyonu taşıyan yüksek riskli grupta over kanseri riskini azaltmak için reproduktif dönem geçtikten sonra salfingo-ooforektomi standart bir protokol haline geldi.

Profilaktik salfingo-ooforektomi BRCA1/2 mutasyonu taşıyan sağlıklı kişilerde over ve tubaların detaylı incelenbilmesine olanak sağlamış oldu (15,16). Çalışmalar özellikle fallop tüpü epitelindeki iki hücre tipi (sekretuar hücreler ve silli hücreler) içinde sekretuar hücreler üzerine yoğunlaştı.

Piek ve arkadaşları, over kanseri için yüksek riskli kişilerden profilaktik olarak alınan tuba örneklerinde, sekretuar hücrelerde normale göre daha yüksek proliferasyon gösteren displastik değişiklikler saptadı (15). Bu lezyonlar çoğunlukla tubanın fimbrial ucunda bulundu (17). Daha sonra fallop tüplerinin daha ayrıntılı değerlendirildiği SEE-FIM (Sectioning and Extensive Examining of the FIMbria) yöntemi geliştirildi (17). Bu ileri inceleme yöntemi ile tubada bulunan erken seröz karsinom prekürsörlerinin tanımlanması sağlandı.

Seröz over karsinomu tanımı son yıllarda yüksek dereceli seröz karsinom (HGSC) olarak tanımlanmakla birlikte over kanseri için yüksek riskli olan ve genetik yatkınlığı bulunan kişilerde profilaktik salfingooferoktomi uygulanmakta ve overde neoplastik oluşum saptanmayan vakaların bir kısmında tuba epitelinde prekanseröz öncü lezyonlar saptanmaktadır.

Daha önceden öne sürülen teorilerden farklı olarak günümüzde HGSC'lerin over yüzey epitelinden değil, çoğunlukla tuba distal fimbrial uç epitelinden kaynaklandığı bilinmektedir (18).

### **2.2.3. Epitelyal Over Kanseri Sınıflaması**

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2014 sınıflamasına göre epitelyal over kanserleri beş ana kategoriye ayrılmıştır.

- 1- Yüksek dereceli seröz karsinom (HGSC)
- 2- Düşük dereceli seröz karsinom (LGSC)
- 3- Endometrioid karsinom

#### 4- Şeffaf hücreli karsinom

#### 5- Müsinöz karsinom

Epitelyal over kanserinin bu alt tiplerinin, platin bazlı kemoterapi, radyoterapi ve hedeflenen diğer tedavilere duyarlılıkları farklıdır. Ayrıca ailesel kanser sendromları açısından farklılık gösterir (19).

Köbel ve arkadaşlarının 500 over kanseri vakası ile yaptığı kohort çalışmasına göre epitelyal over kanseri alt tiplerinin evrelere göre dağılımı ve görülme sıklıkları Tablo 2. de gösterilmiştir (20).

**Tablo 2.** Epitelyal over kanseri alt tiplerinin evre I/II ve evre III/IV dağılımı

Epitelyal Over Karsinomu Histolojik Tipi	Yüzde dağılım (bütün evreler)	Yüzde dağılım (evre III/IV)	Evre I/II Evre III/IV Oranı
Yüksek dereceli seröz	%68.1	%87.7	20:80
Şeffaf hücreli	%12.2	%4.5	82:18
Endometrioid	%11.3	%2.5	88:12
Müsinöz	%3.4	%1.2	82:18
Düşük dereceli seröz	%3.4	%5.3	18:82

#### 2.2.4. Yüksek Dereceli Seröz Karsinom (HGSC)

Yüksek dereceli seröz karsinom, epitelyal over kanserleri içinde en sık görülen, en fazla morbidite ve mortalite ile ilişkili olan kanserdir. Köbel ve arkadaşlarının kohort çalışmasında HGSC'lar LGSC'lara göre 20 kat daha fazla (HGSC sıklığı %68.1 iken, LGSC sıklığı %3.4) olarak saptanmıştır (20).

Düşük dereceli ve yüksek dereceli seröz karsinomlar, bu şekilde isimlendirilmelerine rağmen aynı neoplazmın farklı dereceleri değil, tamamen farklı iki tümör tipidir. Histogenezleri, onkogenezdeki moleküler yolları, davranışları ve prognozları tamamen farklıdır.

Düşük dereceli seröz karsinomlar, benign seröz kistadenomdan köken alarak borderline seröz tümöre dönüşür. İyi tanımlanmış adenom- karsinom dönüşümü ile invaziv düşük dereceli seröz karsinomlar haline gelir. LGSC'ların tümünün seröz

borderline tümörden geliştiği kanıtlanmamış olsa da, %80'inde seröz borderline tümör tanımlanmıştır (21).

Yüksek dereceli seröz karsinomlar ise seröz borderline tümörler ile ilişkili değildir. Günümüzde HGSC lerin çoğunlukla tuba distal fimbrial uç epitelinden kaynaklandığı bilinmektedir. Seröz tubal intraepitelyal karsinom (STIC) gelişiminde, tubal epitel hücrelerinde çoğalma ile çok katlı epitel meydana gelmesi, nükleer atipi, çekirdek/sitoplazma oranı artması, hücrelerde polarite kaybı görülür ve silli hücrelerde kayıp olur.

Yüksek dereceli seröz karsinomların morfolojik değerlendirilmesinde, tümörün kendi içinde ve diğer tümörlerle karşılaştırıldığında heterojenite gösterdiği görülür. Farklı yapısal paternlerin oluşturduğu bir karışım olarak izlenir.

HGSC de farklı morfolojik paternler bir arada görülebilir. Bunlar;

- 1-Papiller,
- 2-Mikropapiller,
- 3-Kesik-yarık benzeri (slit like)
- 4-Glanduler,
- 5-Mikrokistik/ mikroglanduler,
- 6-Solid veya
- 7-Değişici epitel benzeri özellikte olabilir.

Papiller yapılar ve yarık benzeri boşluklar HGSC'nin karakteristik özelliklerinden olmakla birlikte, iyi düzenlenmiş glanduler yapılar da sık görülür ve tümöre psödoendometrioid bir görünüm verir.

Tümör hücreleri genellikle çok az sitoplazma içerir ancak nadiren geniş eozinofilik şeffaf sitoplazma içerebilir, sitoplazmalarında vakuolizasyon veya müsin içermeleri ile zaman zaman taşlı yüzük hücresi görünümü izlenebilir. Tümör hücreleri yüksek dereceli tümörlerin nükleer özellikleri olan belirgin pleomorfizm, yüksek mitotik indeks ve sık anormal mitotik figürler gösterme eğilimindedir. Büyük büyütme alanında çok sayıda mitoz kolaylıkla seçilebilir ve bazaar dev tümör hücreleri izlenebilir. Nekroz alanları ve psammom cisimleri sık görülür. HGSC de



tümör içi heterojenitenin fazla olması, epitelyal over kanserlerinin diğer alt tipleri ile morfolojik olarak ayırımında güçlüğüne neden olabilir.

### 2.3 Kanser Mikroçevresi

Kanser, çevresel faktörlerin hücrelerin DNA'sında oluşturduğu değişiklikler sonucu kontrolsüz bölünme sürecinin başlaması ile oluşur. Ancak kanserin ortaya çıkabilmesi için sadece kontrolsüz çoğalma yetmez. Aynı zamanda invazyon ve metastaz özellikleri de kazanması gerekmektedir. Tümör invazyon ve metastazında anahtar moleküllerden biri ekstrasellüler matriks (ECM) elemanlarıdır.

Ekstrasellüler matriks, organizmalara yapısal destek sağlayan, proteinler ve proteoglikanlar içeren hücre proliferasyonu, farklılaşması ve göçü, doku morfogenezisi gibi pek çok biyolojik aktivitede etkili karmaşık ve dinamik bir oluşumdur. Sürekli yapım ve yıkım halindedir.

ECM yeniden düzenlenimi organ homeostasisi ve fonksiyonları için sıkı bir şekilde kontrol edilir. Patolojik koşullarda dokularda bir dizi tümorojenik olaylar izlenir. Aktive olmuş kanserle ilişkili fibroblastlar oluşur (CAFs). Anormal ECM üretimi çevredeki epitel hücreleri, endotel hücreleri ve bağ doku hücreleri üzerine etki eder. Bunun sonucunda epitel hücrelerinde hiperplazi görülür. Daha ileri evrelerde mediatörler aracılığıyla tümör alanında toplanan immün sistem hücreleri kanser gelişimini uyarır (22). Vasküler biyoloji üzerine etkiler ortaya çıkar ve tümör ilişkili anjiyogenez görülür. Bu tümör damar yaplanması tümör hücrelerinin damara invazyonu ve uzak alanlara metastazı ile ilişkilidir. Uzak alanlara ulaşan tümör hücreleri dolaşımdan ayrılır ve dokulara yerleşir. Kanser hücreleri, stromal hücreler ile ECM düzenleyici enzimleri sentezlemeye başlar ve lokal metastatik niş oluşur. Anormal niş tümör hücrelerinin hayatta kalmasını sağlar ve proliferasyon için ortam oluşturur.

Daha sonraki aşamalarda kanser hücreleri uyurken uyanıklık haline geçer, anormal ECM anjiyojenik anahtarı açar (primer tümör alanındaki mekanizma gibi) böylece kanser hücrelerinin hızla büyümesi, mikrometastaz alanının genişlemesi ve makrometastaz haline dönmesini sağlar (23).

ECM, tümör büyümesi ve yayılımını önlemek için primer bariyer görevi görür. Kanserin invazyon ve metastaz yapması için ECM'in yıkılması gereklidir. Kanseri hücreleri, bu bariyeri aşmak için proteinazları kullanırlar. Proteinaz enzimlerden olan matriks metalloproteinazlar (MMP) sadece bazal membran yıkımı ve stromal invazyondan sorumlu değildir, aynı zamanda büyüme faktörleri salınımını sağlar. Açığa çıkardıkları kollajen yıkım ürünleri ve proteoglikanlar kemotaksi, anjiyogenez ve tümör büyümesinden sorumludur (22).

Tümör hücreleri ve stromada bulunan immün yanıt hücrelerinin etkileşimleri, aynı tanıyı alan hastalar arasında farklı klinik yanıtlara neden olabilir ve tümör hücrelerine kanser mikroçevresinde bulunan immün yanıt hücrelerinin cevabı farklılık gösterebilir. Anormal ECM üretimi hastalığın prognozunu etkileyebilir.

Literatürde tümör/ stroma oranının prognozla ilişkilendirildiği çalışmalar mevcuttur. Chen ve arkadaşları epitelyal over kanserleri vakaları arasında stromal kompartmandan zengin olanların daha ileri evrede saptandığını, rekürrens oranlarının yüksek olduğunu, lenf nodu metastazı oranlarının stromal kompartmanı az olan vakalara göre daha yüksek olduğunu saptamıştır (24). Meme kanseri olgularında stromal kompartmandan zengin olanlarda sağ kalım oranlarının düşük olduğu ve rekürrens oranlarının yüksek olduğu bildirilmiştir (25). Wang ve arkadaşları özefagus squamöz hücreli karsinomlarında stromal kompartmandan zengin olanlarda sağ kalım oranlarının düşük olduğunu saptamış ancak çalışmalarında lenf nodu tutulumu ile ilişki saptamamıştır (26).

#### **2.4 Lenfatik İnvazyon ve Lenfanjiyogenez**

Over kanserlerinde hastanın sağ kalımını en fazla belirleyen hastanın evresidir. Over dışında peritona, karın içi organlara ve lenf nodlarına metastaz yapmış evre III ve evre IV olgularda sağ kalım oranları düşmektedir. Bölgesel veya sentinel lenf nodlarında (SLN) tümör hücrelerinin varlığı, hastalık ilerlemesi, kötü prognoz ile ilişkili olduğu ve çoğu zaman uygulanacak tedavi yöntemini belirlediği için klinik önem taşır (27).

Lenf nodları, birçok solid tümörde kanser metastazı için başlangıç bölgeleridir. Lenfatik metastaz daha önceden belirtildiği gibi tamamen pasif bir süreç değildir. Lenfatik damarlara tümör hücrelerinin geçişi, lenfatik damarlar yoluyla taşınması, bu damarların drene olduğu lenf nodlarına tümör hücrelerinin ekimi ile sonuçlanan çok basamaklı ve hücrelerin aktif olarak rol aldığı bir süreçtir (28). Kanser biyolojisinde lenf nodu metastazındaki karmaşık süreci anlamak için çok sayıda araştırma yapılmış ve hücrelerel değişiklikler yanında pek çok moleküler sinyal yolağında değişiklikler saptanmıştır. Bu değişikliklerden bazıları lenfanjiyogenez, immünespresif hücrelerin metastatik alanda artışı, kemokinler ve sitokinlerin salınımı ve lenf düğümünde damar yeniden oluşumudur (29).

#### **2.4.1. Lenfanjiyogenez:**

Dokularda bulunan lenfatik damarlar, hücreler arası sıvıyı emen ince duvarlı damarlardır. Bu damarlar, gözenekli yapıda olup, endotel mikro valvleri içerir. Aralıklı bazal membrana sahiptir. Perisit ve düz kas eksikliği nedeniyle hücreler tarafından kolayca geçilebilirler (30). Doku homeostazı, sıvı dengesi, bağışıklık fonksiyonu, beslenme ile alınan lipidlerin emilmesi ve taşınmasında önemli rol oynayan damarlardır. Lenfatik endotel hücreleri, LYVE-1, Proxl, podoplanin (gp38), VEGFR-2, VEGFR-3, nöropilin-2, anjiyopietin-1 ve CCL21 moleküler belirteçlerini ifade etmektedir.

İlk olarak dokuda kör uç olarak başlayan lenf damarları, lenfatik sıvıyı afferent lenfatiklerle lenf nodlarına, lenf nodundan çıktıktan sonra efferent lenf damarlarına, daha sonra büyük toplayıcı lenfatik damarlara, son olarak da kan dolaşımına taşır (31). Normal fizyolojideki rollerine ek olarak, lenfatik damarlar, inflamasyon ve kanser gibi patolojik koşullarda kritik öneme sahiptir. Kanser gibi patolojik koşullarda, tümör mikro ortamında tümör hücreleri veya diğer hücreler tarafından salgılanan büyüme faktörleri, kemokinler ve diğer sinyal moleküllerine yanıt olarak lenfatik damarlar ve lenf nodlarında yeniden yapılanma meydana gelir ve bu süreç de hastalığın ilerlemesine neden olarak prognozu etkiler (32).

Hızla büyüyen solid tümörlerin karakteristik bir özelliği, tümörü çevreleyen lenfatik ağı artırmalarıdır. Bununla birlikte, fonksiyonel lenfatik damarlar solid tümörlerin periferinde yerleşmiş olarak bulunur (33). Bu meme kanseri ve melanom hastalarında bildirilmiştir. Tümör merkezindeki lenf damarlarının fonksiyonel açıdan yetersiz olması, tümör içindeki sıvı basıncını artırarak sentinel lenf nodlarına lenf akımını artırır (34).

Benzer bir gözlem, deneysel fare kanser modellerinde lenfanjiyojenik büyüme faktörleri VEGF-C ve VEGF-D'nin aşırı ekspresyonunun, tümör periferinde lenfatik damarların oluşumunu ve lenf nodu metastazını artırdığını göstermiştir (35). VEGF-C ayrıca lenfatik endotelde CCL21 ekspresyonunu artırır, böylece CCR7 + tümör hücrelerinin lenfatik girişini arttırır (36). Tümör kaynaklı VEGF-C / D, toplayıcı proksimal lenfatik damarların kasılmasını artırarak, lenf akışını ve potansiyel tümör hücre yayılımını artırabilir (37).

Lenfatik damarlar tümör trombüsü nedeniyle tıkanıldığında, kollateral lenfatik damarların oluşumu ile lenfatik kapasitenin azalmasını telafi edebilir (38).

Son zamanlarda, popliteal lenf nodu lenfadenektomisinin, önceden mevcut kollateral lenfatik damarlar yoluyla inguinal lenf nodlarına alternatif lenf drenajına yol açtığı gösterilmiştir. Lenfadenektomi sonrası drenaj paternlerinin değişerek kanser metastazının farklı bir lenfatik drenaj yolu izleyebileceği gösterilmiştir(39). Bu sonuçlar, bölgesel lenfadenektomilerin tüm lenf nodu metastazlarını ortadan kaldırmak için yeterli olup olmadığı sorusunu gündeme getirmektedir, çünkü alternatif lenf nodlarına yeni ulaşım yolları mevcut olabilir

#### **2.4.2. Premetastatik Niş Oluşumu:**

Pre-metastatik lenf nodlarına ilişkin yapılan çalışmalarda lenfanjiyogenez ve lenf akımında artış (40), yüksek endotelial venüllerin (HEV) yeniden yapılanması (41), miyeloid hücrelerin ortama çağırılması ve efektör lenfosit sayısının ve/veya fonksiyonun azaltılması gibi değişiklikler saptanmıştır.

Fare kanser modeli ve kanser hastalarında HEV duvar kalınlığının azalması ve ince duvarlı damarların çapında artış saptanmıştır (41).

Damarların yeniden şekillendirilmesine ek olarak, lenf nodlarında bağışıklık hücresi ve stromal hücre popülasyonları artar ve büyük ölçüde immünoşüpresif sitokinlerden zengin bir ortam oluşur. Birçok çalışmada güçlü immün şüpresif etki gösteren IL-10'un sentinel lenf nodlarında diğer lenf nodlarına göre daha fazla salgılandığı gösterilmiştir (42).

Primer tümör ve / veya lenf düğümlerinden salınan TGF- $\beta$ , GM-CSF ve PGE2 gibi diğer immünoşüpresif sitokin ve moleküller SLN'nin tümör hücrelerine yanıtını etkileyebilir. SLN'ler, primer tümör boyutunda bir artış ile birlikte giderek daha fazla immün şüpresif hale gelir (43). Hem primer tümör, hem de SLN'ları immünoşüpresif sitokinlerin kaynağı haline gelir. Kan dolaşımından premetastatik lenf nodlarına çağırılan tümör ilişkili makrofajların da bulunduğu miyeloid kökenli hücreler ve stromal hücrelerin sayısının artışı, bu bölgedeki tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını kolaylaştıran immünoşüpresif bir mikroçevre oluşturur (44). Son çalışmalar, CD8 + T hücrelerinin, tümör hücrelerinin kolonizasyonunu önlemek için potansiyel bir mekanizma olarak SLN'lerdeki miyeloid hücreleri öldürebildiğini göstermektedir (45).

#### **2.4.3. Tümör Hücrelerinin Lenf Noduna Ulaşması**

Lenfatik damarlara girdikten sonra, kanser hücreleri hipoksik bir ortamla karşı karşıya kalır. Lenfatik damarlarda oksijenin bulunması, doku tipi, lenfatik endotelin metabolik aktivitesi ve dokudaki kan damarlarına yakınlığına bağlıdır.

Normal fizyolojik koşullar altında tümör hücrelerinin lenf nodunda ilk ulaştıkları bölge olan subkapsuler sinüs (SCS) kan damarları ve eritrositlerden yoksun olduğundan, oksijen miktarı yetersizdir (46). SCS'deki tümör hücreleri, parakorteksdeki damarlardan uzakta bulunur. Hipoksik bir çevre ile karşılaştıklarında, hücreler ya düşük oksijen miktarına uyum sağlayabilir ya da kan damarlarına göç ederek, oksijen ve gerekli besin ihtiyaçlarını kan damarlarından temin ederek hayatta kalabilir (47). Hipoksik koşuldaki tümör hücreleri ve konakçı hücreler, VEGF gibi proanjyogenik faktörleri üreterek, anjiyogenezi sağlar ve lokal hipoksiyi ortadan kaldırmaya çalışırlar (48).

Hipoksik koşullardaki tümör hücreleri, anaerobik glikoliz için ilişkili genlerin ve glikoz taşıyıcılarının ekspresyonunu artırarak hipoksik çevrede uyum kapasitesine sahiptir. Lokal normoksik hücreler ise elde edilen laktatı enerji kaynağı olarak kullanabilirler (49).

Hipoksi'nin tümör hücresi metabolizması üzerindeki etkilerine ilaveten, kronik hipoksik bir ortamın daha agresif ve metastatik klonları seçtiğı gösterilmiştir (50). Bu seçim ve adaptasyon, parankim içindeki kan damarına invazyona kadar kanser hücrelerinin subkapsüler sinüste hayatta kalmasını sağlayabilir.

Alternatif olarak, mikrometastatik lezyonlar, avasküler subkapsüler sinüste iken durağan hale (dormancy) girebilir. Bir "anjiojenik geçiş" i indüklemek yerine, tümör hücreleri, kan damarlarının bulunduğu lenf nodu parankimini işgal ederek bu durağan uyku halinden kurtulabilir.

Parankim invazyonu için moleküler tetikleyiciler iyi anlaşılammıştır, ancak kemokinler bir bileşen olabilir (51). Kemokinler, spesifik G-protein birleşimli reseptörlerle birleşerek hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve migrasyonunu indükleyebilen sitokin benzeri moleküllerin süper aileleridir. Kemokinler, lenf düğümündeki immün hücrelerin migrasyonu, çoğalması ve olgunlaşmasında kritik rol oynarlar. Kemokinler, kanser hücrelerinin birincil bölgedeki lenfatik damarlara invazyonunda ayrıca metastatik tümör hücrelerinin de kan veya lenf damarlarını istila ettikten sonra ikincil metastatik bölgelere ulaşmasını sağlayabilir. Muller ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bazı insan meme kanseri hücrelerinin, normal meme epitel hücreleriyle karşılaştırıldığında CXCR4 ve CCR7 gibi birçok kemokin reseptörünün artmış ekspresyonu gösterdiğini ve bunun lenf düğümlerine metastaz yapabilme yetenekleri ile ilişkili olduğunu gösterdi (52). Bu reseptörler aracılığıyla sinyalleşme meme karsinom hücrelerinde aktin polimerizasyonunu ve psödopod oluşumunu artırarak, motilite artışına ve invaziv fenotip kazanmalarına neden olur. Bu reseptörlerin ligandları, lenf nodu mikro ortamında eksprese edilir ve kanser hücreleri için güçlü kemoatraktan sinyal görevi görebilir. Son zamanlarda, CCL1 / CCR8, kemokin reseptör sinyal yolağının melanoma tümör hücrelerinin lenf nodu parankimine girişi için önemli olduğu saptandı. CCL1, lenf düğümünün subkapsüler

sinüsünde lenfatik endotel hücreleri tarafından eksprese edilir ve bu organa CCR8 + tümör hücresi girişini kolaylaştırır. Bu yolun engellenmesi, tümör hücresinin afferent lenfatik damardan lenf noduna girmesini önemli derecede inhibe etmiştir (51). Bu çalışmalar birlikte ele alındığında, kemokin reseptör sinyalleşmesinin, tümör hücrelerinin subkapsüler sinüs ve lenf nodu parankimi içine aktif taşınmasında hayati bir rol oynadığını göstermektedir. Belirli bir kemokinin, tümör hücresinin sentinel lenf noduna girişini veya çıkışını düzenleyen önemi muhtemelen lenf düğümündeki o molekülün ekspresyon seviyesine ve kanser hücreleri üzerinde reseptörünün varlığına bağlıdır. Kemokin sinyalizasyonunu tümör hücrelerinin lenf düğümünün subkapsüler sinüsüne çekilmesi için direkt bir rolünün yanında, bu moleküller immün sistem hücrelerinin kemotaksisinde de önemli rol oynar ve lenf düğümünde pro-tümöral bir mikro çevre kurmada rol oynayabilir.

#### **2.4.4. Tümör Hücrelerinin Lenf Nodunda İmmün Yanıttan Kaçışı**

Lenf düğümleri, yabancı, patojenik veya organizmanın kendi antijenlerinin biriktiği bağışıklık düzenleme alanıdır. Lenf düğümünde antijen yüklü dendritik hücreler (DC'ler) ve efektör T lenfositleri arasındaki etkileşimler, yabancı ve patojen antijenlere karşı kazanılmış immün yanıtları sağlar.

Lenf düğümündeki immün mikro çevre, üç ana hücre popülasyonundan oluşur: stromal hücreler, miyeloid hücreler ve lenfoid hücreler. Myeloid hücreler makrofajlardan ve dendritik hücrelerden oluşurken, lenfoid hücreler T ve B lenfositleri ile temsil edilir. Stromal hücreler, retiküler hücreler, kan hücreleri ve lenfatik endotel hücrelerinden oluşur.

Kronik inflamasyonda; aktive olmuş lenfatik endotel hücreleri nedeniyle dendritik hücre maturasyonunu bozular. Bunun sonucunda T lenfosit aktivasyonu ve proliferasyonu bozular. Tümör hücrelerinin immün yanıttan kaçışına neden olur. Lenfatik endotel hücreleri CD8 + T lenfositleri uyaracak moleküllerden yoksundur. Yüzeylerinde kuvvetli şekilde inhibitör ligand olan PD-L1 (Programmed death-ligand 1) ifadesi gösterir. Bu ligandın etkileşimi T hücrelerinde apoptoza neden olur. Ayrıca T lenfositte Bcl-2 gen ifadesini azaltarak proliferasyonu azaltır. Tümör hücrelerine

yanıt verecek lenfositlerin bu şekilde baskılanması tümör hücrelerinin immün yanıtta kaçışına neden olur.

## 2.5 Obezite ve Kanser

Obezite dünya genelinde önemli bir sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü 2004 yılında vücut kitle indeksi (BMI) hesaplanarak obezite için sınır değerleri belirlemiş (Tablo 3) ve obezite ile mücadele için gerekli yaşam tarzı değişikliklerine dikkat çekmiştir.

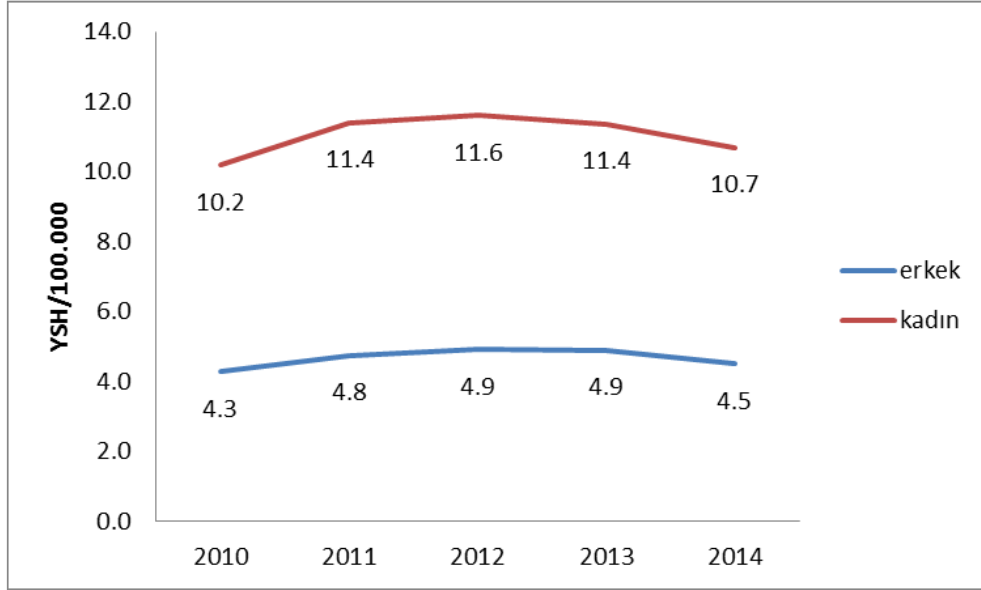
**Tablo 3.** Vücut kitle indeksine göre obezite sınıflaması- Dünya Sağlık Örgütü 2004 verileri

Vücut Kitle İndeksi (BMI) (kg/m <sup>2</sup> )	Sınıflama
18.5 altında	Zayıf
18.5–24.9	Normal kiloda
25.0–29.9	Şişman- Obezite öncesi
30.0–34.9	Obezite I. derece
35.0–39.9	Obezite II. Derece
40 üzeri	Obezite III. derece

Obezite ilişkili hastalıkların sıklığı son yıllarda artmaktadır. Tüm kanserlerinde %20 sinin aşırı vücut ağırlığı ile ilgisi olduğu düşünülmektedir (53). Amerika’da epidemiyolojik araştırmalar yüksek BMI olanların ortalama BMI olanlara göre kanserden ölüm oranlarının daha yüksek olduğunu göstermektedir (54). Prostat kanseri, kolorektal karsinom, meme kanseri, over kanseri, endometrium kanseri ve pankreas kanseri gibi birçok kanserin oluşumunda artmış yağ oranı ile ilişki saptanmıştır (55).

Meme, uterus korpusu ve over gibi kadın kanserlerinde en önemli risk faktörlerinden birisi de obezitedir. Obezitenin etken olduğu kanserler daha çok kadınları etkilemektedir. Bu nedenle obezite ile ilişkili kanserlerin örüntüsü incelendiğinde kadınlarda kanser insidans hızı erkeklere göre yüksek olarak görülmektedir (Grafik 4).





**Grafik 4.** Obezite ile ilişkili kanserlerin yaşa standardize insidans hızlarının cinsiyete göre 2010-2014 yılları arasındaki dağılımı (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2010-2014) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 kişide) (56) (Kadınlar için özofagus, kolorektal, safra kesesi, pankreas, meme, uterus korpusu, over, böbrek; Erkekler için özofagus, kolorektal, pankreas, böbrek tümörleri değerlendirilmiştir.)

## 2.6 Yağ Doku, Adipokinler ve Kanser

Adipoz doku endokrin, metabolik, immün düzenleyici görevleri olan kompleks bir organdır. Adipokin ve adipositokin denilen, otokrin, parakrin ve endokrin etki gösteren 20'den fazla hormon ve sinyal molekülü salgılar.

Normal koşullarda yağ dokudan salınan adipositokinler fizyolojik mekanizmaları düzenler, iştah, enerji metabolizması, lipid metabolizması, glukoz dengesi, insülin duyarlılığı, kan basıncı ve inflamatuvar olaylarda etkilidir. Obezitede; yağ hücrelerinde hipertrofi ve yaygın şekilde yağ depolanmasına neden olan hiperplazi ile mikroçevre bozulur ve fizyolojik süreçler etkilenir (57).

Adipoz kaynaklı hormonlar, büyüme faktörleri ve pro-inflamatuvar sitokinler: Leptin, Adiponektin, Apelin, Visfatin, Resistin, Chemerin, Omentin, Nesfatin, Vasfin, Sitokinler; (IL-6, TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ ), büyüme faktörleri NF-kB transkripsiyon faktörüdür. NF-kB transkripsiyon faktörü antiapoptotik gen ekspresyonu ile hücre proliferasyonu, anjiyogenez, metastazda ilişkili olduğu gösterilmiştir. IL-6 ise stat3

üzerinden tümör gelişimi özellikle kolit ile ilişkili kolon kanserlerinde etkili olduğu saptanmıştır (55) Obez hastalarda hem plazma apelin hem de insülin seviyeleri oldukça yüksektir (58).

## 2.7 Apelin ve APJ Reseptörü

Apelin, Tatamoto ve arkadaşları tarafından 1998 yılında tanımlanmış, 36 aminoasit içeren biyoaktif bir peptiddir (59). G proteini bağlı APJ reseptörünün endojen ligandıdır.

Apelin büyük oranda yağ hücrelerinden salınır. Fizyolojik aktif formu apelin 36'dır. Daha potent olan endojen formu ise apelin 13'tür. Apelin geni olan APLN (Xq25-q26.1), X kromozomu uzun kolu üzerinde bulunur ve preproapelin sentezinden sorumludur. Preproapelin bölünerek apelin fragmanları oluşturur. Apelin 36, 13, 12, 17 olarak tanımlanan apelin fragmanları mevcuttur. Piroglutamat ile bağlı form olan (Pyr1)apelin-13 ekzopeptidaz yıkımından korunur ve insan plazmasında en fazla bulunan apelin izoformudur (60).

İnsanlarda apelin reseptörü APJ, G protein-bağlı reseptördür ve gen sembolü APLNR'dir (61). G protein-bağlı reseptörler (GPCRs) birçok molekül tarafından aktive edilir. Nöropeptidler, polipeptid hormonlar, biyoaktif aminler, lipidler, nükleotidler ve iyonlar. Klasik olarak membranı 7 kez kat eden yapıdan oluşmuşlardır ve memeli genomunun en geniş ve en fazla çeşitlilik gösteren gen ailelerinden birini oluşturur (62). Apelin ve membranı kat eden reseptörü olan APJ'nin etkileşimi, hücre içinde sitoplazmada PI3K ve AKT yollarını aktifleştirerek son olarak çekirdekte jun ve fos transkripsiyon faktörleri üzerinden proliferasyonu uyarır (6) hücre göçünü artırır, apoptozu baskılar (60).

Apelin/APJ sistemi vücutta geniş bir dağılıma sahiptir. Büyük oranda yağ hücrelerinden salınmasının yanında, beyin, kalp, akciğer, böbrek, mide, damarlar, adipoz doku ve overlerde ekspresyonu gösterilmiştir(63), (64), (65).

APJ ve apelin homeostatik düzenlenimde birden fazla fizyolojik yanıtın anahtar araçları olarak ilişkilendirilmiştir. Kalp - damar fizyolojisi, kalp gelişimi, damar düz kas hücre proliferasyonu, enerji metabolizması, nöroendokrin stres

yanıtı, ağrı kontrolü ve sıvı dengesi gibi fizyolojik olaylarda etkili olduğu gibi, kalp hastalıkları, diyabet, obezite ve kanser gibi patolojik olaylarda da etkisi üzerine yayınlar mevcuttur.

Leeper ve arkadaşları fare monositlerinde ve makrofajlarında APJ reseptörü ekspresyonunu göstermiştir. Bu da makrofajların APJ reseptörü yoluyla apelin ile uyarıldığını göstermektedir. Peritoneal makrofajlardan salınan bazı sitokin (IL-6, MCP-1) ve kemokinlerin apelin etkisi ile düzeylerindeki farklılıklar gözlenmesi apelinin inflamasyonda da etkili olabileceğini göstermektedir (66).

### **2.7.1 Over Dokusunda Apelin ve APJ Reseptörü**

Adiposit kökenli bir hormon olan ve enerji metabolizması, sıvı dengesi gibi fizyolojik olaylarda etkili olduğu gösterilen apelinin, kadın genital sistem fonksiyonları ile de ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Hayvanlarda yapılan çalışmalarda Rak ve arkadaşları domuz over dokusunda gelişmekte olan foliküllerde, folikülün çapı ile orantılı olarak folikül sıvısından izole edilen apelin miktarının arttığını göstermiştir. Araştırmacılar granuloza ve teka hücrelerinde ve domuz oositlerinde apelin varlığını, hücre zarlarında ve zona pellusidada APJ reseptörünün kuvvetli pozitif olduğunu göstermiştir (67) .

Sığır over dokusunda, foliküllerin teka hücrelerinde apelin ve APJ reseptörü ekspresyonu ve granuloza hücrelerinde APJ reseptörü ekspresyonu izlenmiştir. Teka hücrelerinde apelin ve APJ reseptörü ekspresyonunun LH ile arttığı saptanmıştır. Granuloza hücrelerinde APJ reseptörü mRNA sında artışın foliküler atrezi ile ilişkili olduğu saptanmıştır (64).

Ovarian steroid sekresyonu üzerine yapılan çalışmalarda Roche ve arkadaşları apelinin insan granuloza hücrelerinde progesteron (P4) sekresyonunu uyardığını göstermiştir (68)

Antral foliküllerde, follikül genişlemesi ile birlikte follikül sıvısında apelin konsantrasyonu ve APJ reseptörü ifadesi artar ve genişlemiş foliküllerde apelin miktarı en fazla saptanmıştır (65).

Over foliküllerinde progesteronun, sığır granuloza hücreleri kültüründe, APJ ekspresyonunu artırdığı ve LH'nin kültürde teka hücrelerinde apelin ve APJ ekspresyonunu uyardığını göstermiştir. Bu bulgular apelin/APJ sisteminin over folikülogenezinde, follikül seçimi ve baskın folikülün belirlenmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir (64).

### **2.7.2 Apelin/ APJ Sistemi ve Anjiyogenez**

Apelinin damar oluşumunu artırması ve kardiyovaskuler sistem üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda Kasai ve arkadaşları 2004 yılında apelinin anjiyojenik bir faktör olduğunu göstermiştir(69). Kalin ve arkadaşları hücre kültüründe apelinin primer insan endotel hücrelerinde kemotaktik etkisi olduğunu, Xenopus embriyolarında damar gelişiminde etkili olduğunu göstermiştir (70). Aynı yıllarda endotel hücreleri için mitojen olduğu (71) ve kurbağalarda kalp gelişiminde etkili olduğu (72) , (73) ve fare kan damarlarının oluşumu için gerekli olduğu gösterilmiştir (74). Apelin knockdown farelerde retinal damarların gelişimi yetersizdir ve apelin hipoksi ile uyarılmış retinal anjiyogenez için gereklidir (69).

Ayrıca karaciğer sirozunda ve portal hipotansif sıçanlarda splanknik neovaskularizasyon ve portosistemik kollateralizasyonda apelinlerjik sistemin etkisi gösterilmiştir (75) (76) .

Bununla birlikte apelin, iskemik iyileşme sürecinde damar yenilenmesi, endotel hücre proliferasyonu (77) ve kan damarı çapının düzenlenmesinde terapötik etkileri bulunmaktadır (74).

Apelinlerjik sistem tümör neoanjiyogenezinde de rol oynar. Beyin tümörlerinde, mikrovasküler proliferasyonlarda apelin ve APJ ifadesinin arttığı gösterilmiştir (70). Tümör hücre hatlarından apelin aşırı ifadesi gözlenenlerde tümör büyümesinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (78) .

### **2.7.3 Kanserde Apelin ve APJ reseptörü; Lenfatik İnvazyon ve Metastazda Etkisi**

Kolorektal kanser, mide, akciğer, beyin, prostat ve endometrium kanseri gibi birçok kanserde apelin ekspresyonunun artışı gösterilmiştir (60).

Feng ve arkadaşları, cerrahi rezeksiyon uygulanmış 270 mide kanseri olgusu ile yaptıkları çalışmada tümör apelin ekspresyonunun hastalığın klinik gidişi, tümör diferansiyasyonu, lenf nodu tutulumu ve uzak metastaz üzerinde etkili olduğunu saptamışlar (79). Tümör apelin ekspresyonları daha yüksek olan olguların sağkalım oranlarının daha düşük olduğu gösterilmiş. Ayrıca bu olguların tümörlerinin kötü diferansiye olduğu, uzak metastaz yapmış ve lenf nodu tutulumu olan olgular olduğu saptanmış. Araştırmacılar bununla birlikte in vitro olarak, 3 farklı mide karsinomu hücre hattında western blot analizi ile saptanan apelin ve APJ ekspresyonunun normal mide mukozası hücre hattından yüksek olduğunu saptamışlar. Ayrıca apelin verilmesinden 8 saat sonra mide karsinomu hücre hattında göç ve invazyonda etkili olan MMP-1, MMP-9, BMP-2, IL-1 ve IL-6 sitokinlerinin artışı saptanmış. Hücreler APJ siRNA ile transfekte edilerek APJ reseptörü susturulan hücrelere 100 ng/mL apelin uygulandığında göç ve invazyon kapasitelerinde azalma saptanmış.

Hayvan deney modelleri ile yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinin lenfatik damarlarla yakın ilişki halinde olduğu ve lenfanjiyogenezin lenfatik metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Berta ve arkadaşları apelinin, lenfatik endotel hücrelerinde (LEC) ERK ve PI3K yolları üzerinden lenfanjiyogenez ve lenfatik metastazı artırdığını göstermiştir. Öncelikle apelinin reseptörü olan APJ'nin lenfatik endotel hücrelerinde ifade edildiğini gösteren araştırmacılar daha sonra apeline yanıt olarak in vitro ortamda, LEC proliferasyonunu artmadığı ancak endotel hücre göçünü, üç boyutlu kültürde sferoid benzeri oluşumları ve kapiller benzeri tüp oluşumlarını artırarak lenf damarı gelişimini artırdığını göstermişlerdir. Ayrıca apelinin endotel hücrelerini UV ile tetiklenen apoptozdan koruduğu ve in vivo matrijel implantasyonu yöntemi ile lenfatik mikrodamarların invaziv olarak büyümesine neden olduğu da çalışmanın diğer bulguları arasındadır. Apelin aşırı ekspresyonu tümör içi lenfanjiyogenezini artırır (4).

Peng ve arkadaşları insan meme adenokarsinomu (MCF-7) hücre hattında apelin-13'ün hücre proliferasyonunu ve invazyonu ERK1/2 fosforilasyonu üzerinden artırdığını göstermiştir. Araştırmacılar MCF-7 hücrelerine 10 µM apelin-13 uygulayarak 6 saat sonra bu hücrelerde kontrol grubuna göre invazyonun arttığını göstermiştir. Ayrıca apelin etkisi ile bu hücrelerde, hücre siklusu üzerinde G0/G1 den S fazına geçişte etkili olan siklin D1 ifadesinin ile artışını saptamıştır. Bununla birlikte bağ dokuda en yaygın bulunan kollajen olan tip 1 kollajenin yıkımında görevli MMP-1 ifadesinin de MCF-7 hücrelerinde apeline bağlı olarak arttığı gösterilmiştir (80).

#### **2.7.4 Over Kanserinde Apelin ve APJ Reseptörü**

Yapılan araştırmalarda apelinin, tümör damarlanması, metastaz ve invazyona etkisi ile hastalığın prognozuna etkisi, melanom, kolon kanseri, meme kanseri gibi farklı tümörlerle gösterilmiştir (5), (6), (79), (81). Ancak prognozu kötü olan ve yüksek mortalite oranlarına sahip over kanserleri ile ilgili çok kısıtlı sayıda araştırma mevcuttur.

Yuyin Yi ve arkadaşları çeşitli over kanseri hücre hatlarında apelin ekspresyonunun artışını göstermiştir. 2017 yılında yapılan bu çalışmaya göre, erişkin insan over, tuba ve endometrium dokularında mikroarray yöntemi ile saptanamayan apelin mRNA'sı over kanseri hücre hatlarında yüksek olarak saptanmıştır. Endometrioid kanser ve yüksek dereceli seröz karsinomla kıyaslandığında şeffaf hücreli over karsinomu hücre hatlarında mikroarray yöntemiyle apelin daha yüksek olarak saptanmış ve sonuçlar qRT-PCR ile doğrulanmıştır.

Araştırmacılar apelinin kanser hücreleri üzerindeki etkisini araştırmak için CRISPR/ Cas9 sistemi kullanarak apelin ekspresyonu baskılanan over kanseri hücre hatlarında over kanseri hücrelerinin mitoz girişinde gecikme, aktif hücre bölünmesinde ve hücre göçünde azalma saptamışlardır (82).

Apelinin over kanserinde etki mekanizması ile ilgili yapılmış kısıtlı sayıdaki çalışmadan biri de Hoffmann ve arkadaşlarının bisfenol A ile apelinin over kanser

hatlarındaki etkilerinin araştırıldığı çalışmadır. Bir ksenoöstrojen olan bisfenol A selektif östrojen reseptör modülatörü olarak davranır ve nükleer östrojen reseptörüne bağlanır. Bisfenol A'nın over kanserinde hücre proliferasyonunu ve göçünü artırdığı gösterilmiştir(83). Hoffmann ve arkadaşları da bu bilgiden yola çıkarak bisfenol A'nın over kanser hücre hatlarında apelin ifadesini artırdığını göstermiştir. Araştırmacılar öncelikle granuloza hücreli, endometroid ve seröz over karsinom hücre hatlarında bazal apelin düzeyleri, apelin mRNA ve APJ reseptörü düzeylerini saptamıştır. Over yüzey epiteli hücre hattı ile karşılaştırıldığında bazal apelin seviyesi over kanser hücre hatlarında yüksek bulunmuş. Daha sonra farklı formlarda uygulanan bisfenol A'nın kültürde doz bağımlı olarak 48 saat sonra OVCAR3 epitelyal over kanseri hücre hattında apelin sekresyonunu artırdığı ancak APJ reseptör ifadesinin hücre hatlarında değişmediğini göstermiştir. Bununla birlikte apelin uygulaması ile OVCAR3 hattında hücre proliferasyonunun arttığı saptanmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Hasta Gruplarının Belirlenmesi ve Örneklerin Elde Edilmesi

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 26.07.2016 tarihli 2016/15 numaralı toplantıda GO16/508 kayıt numarası ile etik açıdan uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmıştır.

Çalışma kapsamında, Hacettepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniği tarafından takip ve tedavisi düzenlenen, son 2 yıl içinde yüksek dereceli over seröz karsinomu tanısı almış 30 hasta belirlendi.

Bu hastalardan lenf nodu tutulumu olan 15 hasta ile lenf nodu tutulumu olmayan 15 hastanın over tümörü dokusuna ait parafin blokları Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilerek çalışma kapsamında incelenmiştir.

Deney grupları;

1. Yüksek dereceli over seröz kanseri lenf nodu tutulumu olmayan (n=15)
2. Yüksek dereceli over seröz kanseri lenf nodu tutulumu olan (n=15)

Her iki grupta yer alan hastalar cerrahi rezeksiyon öncesi kemoterapi veya radyoterapi almamıştır. Lenf nodu örnekleme yapılmayan ve rezeksiyon öncesi kemoterapi alan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

#### 3.2 Hasta Verilerinin Toplanması

Hacettepe Üniversitesi Nucleus hasta veri sistemi kullanılarak, hastalara ait tanı anında yaş ve ameliyat sonrası takip bilgilerinden kemoterapi ilaç kullanım raporlarındaki boy ve ağırlık bilgilerine ulaşılarak hastaların beden kitle indekslerine ulaşılmıştır. Ayrıca Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ölüm Bildirim Sistemi (ÖBS) veri tabanı kullanılarak hastaların tanıdan sonra sağ kalım durumları hakkında bilgilere ulaşılmıştır. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu veri tabanından bilgi elde edilemeyen, tedavisine KKTC'de devam eden ve 6 kür kemoterapi alan bir diğer hastaya ise telefonla ulaşılarak bilgileri sözel olarak alınmıştır.



### 3.3 Doku Kesitlerinin Alınması

Tıbbi Patoloji anabilim dalından alınan parafin bloklar, kesit alınmadan bir gün önce  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi. Kızaklı mikrotom kullanılarak 3  $\mu\text{m}$  kalınlığında kesitler, histokimyasal ve immünohistokimyasal inceleme için lamlara alındı.

### 3.4 Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması

#### 3.4.1 Mayer'in Hematoksileni

Hematoksilen kristali	(Sigma K.N:H 9627) 1 gr
Aluminyum potasyum sülfat ( $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	(Sigma K.N:A 7167) 50 gr
Sitrik asit (Monohidrat)( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	(Sigma K.N:C 7129) 1 gr
Kloral hidrat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_2$ )	(Sigma K.N:N 8383) 50 gr
Sodyum iyodat( $\text{NaIO}_3$ )	(Sigma K.N:S 407) 0.2 gr
Distile su	1000 ml

**Hazırlanışı:** Hematoksilen, aluminyum potasyum sülfat ve sodyum iyodat distile suda karıştırılarak çözülür. Daha sonra kloral hidrat ve sitrik asit karışıma eklenir. Karışım kaynatılıp soğumaya bırakılır. Soğuyan karışım süzülür.

**Boyama:** Hematoksilen-eozin ve trikrom boyama protokolünde 20 dk süreyle uygulandı. İmmunohistokimya boyama protokolünde çekirdek boyama aşamasında 45 sn süreyle uygulandı.

#### 3.4.2 Eozin

Eozin Y (suda eriyen)	3 gr
Asetik asit	2 damla
%95 Etanol	125 ml
Distile su	475 ml

**Hazırlanışı:** 3 gr Eozin Y 100 ml distile suda çözüldü. Üzerine 125 ml %95'lik etanol eklendi. Hazırlanan karışımın üzerine 375 ml distile su eklenerek 2 damla asetik asit damlatıldı ve karıştırıldı.

### 3.4.3 Trikrom Boyası Hazırlanışı

#### 1-Bouin solüsyonu

Pikrik asit	75 ml
%30-40 formaldehit	25 ml
Glasiyal CH <sub>3</sub> COOH	5 ml

#### 2- Trikrom boyası

Chromotrop 2R	0,6 gr
Light green	0,3 gr
Glasiyal CH <sub>3</sub> COOH	1 ml
Fosfotungstik asit	0,8 gr
Distile su	100 ml

#### 3- Asetik asit solüsyonu

CH <sub>3</sub> COOH	5 ml
Distile su	100 ml

#### 4- Asit alkol

%70Etilalkol	1000 ml
%37'lik Hidroklorik asit	100 ml

#### 5-Amonyaklı su

Bir miktar distile su ile birkaç damla amonyak karıştırılır. (Tercihen 70 ml distile su ile birkaç damla NH<sub>3</sub> karıştırılır.)

### 3.4.4. TBS (pH:7,6 10x TBS solüsyonu)

TrizmaHCl	24,23 gr
NaCl	80,06 gr
Distilsu	1000 ml

pH:7,6 olan 10x TBS solüsyonu hazırlamak için 24,23 gr trizma HCl ve 80,06 gr NaCl tartılarak 800 ml distile su içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. pH:7,6 olacak şekilde 1 N NaOH kullanılarak dengelenmiştir. Stok solüsyon kullanıma kadar +4 derecede saklanmıştır. Her kullanımda 10x solüsyon 1/10 oranında distile su ile sulandırılarak TBS çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

#### 3.4.5. TBS + BSA (%2.5)

TBS	100 ml
BSA (Sigma, Almanya)	2,5 gr

2,5 gr toz BSA tartılıp, 100 ml TBS içinde karıştırıldı.

#### 3.4.6. TRİS-EDTA (10 mM Tris Base, 1mM EDTA solüsyonu)

Tris base	12,1 gr
EDTA	3.7 gr
Tween 20	5 ml
Distilesu	1000 ml

pH ayarı için:

1 N NaOH

1 N hidroklorik asit

**Hazırlanışı:** %0.05 Tween 20 içeren pH 9.0 Tris- EDTA tamponu (10 mM Tris Base, 1mM EDTA solüsyonu) stok solüsyonu (10X) hazırlamak için; ilk olarak 12,1 gr Tris base tartılarak 950 ml distile su çözülmüştür. 3.7 gr EDTA tartılarak karışmakta olan çözeltiliye eklenmiştir. pH 9.0 olacak şekilde 1 N hidroklorik asit çözeltisi eklenmiştir. 5 ml Tween 20 eklenip, bu kez 1 N NaOH ile pH 9 'a ayarlanmıştır. Distile su ile son hacim 1 litre olacak şekilde stok solüsyon hazırlanmıştır. +4 °C de muhafaza edilen Tris EDTA stok solüsyonu her antijen geri çağırma uygulamasından sonra 1/10 oranında distile su ile sulandırılarak kullanılmıştır.

### 3.4.7. Sitrata Tampon (100 mm trisodyum sitrat)

Trisodyum sitrat	44,1 gr
Distile su	1000 ml
pH ayarı için:	
1 N NaOH	
1 N hidroklorik asit	

**Hazırlanışı:** pH'ı 6.0 olan sitrat tampon çözeltisi (100 mM Trisodyum sitrat) stok solüsyonu (10X) hazırlamak için 44,1 gr trisodyum sitrat tartılarak son hacim 1500 ml ye tamamlanmıştır. pH metre ile pH: 6.0 olacak şekilde ayarlanan stok solüsyonu +4 derecede kullanıma kadar saklanmıştır. Kullanılırken 100 ml stok sitrat tamponu distile su ile 10 kat sulandırılarak 1000 ml çalışma solüsyonu elde edilmiştir. Her kullanımda sulandırma işlemi sonrası hafifçe artmış olan pH, 1 N HCl solüsyonundan eklenerek pH metre yardımıyla tekrar 6.0'ya ayarlanarak kullanılmıştır.

### 3.4.8. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Blokaj Solüsyonu

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%30, Merck, Almanya)	100 µl
Metanol (Merck, Almanya)	450 µl
Distile su	450 µl

**Hazırlanışı:** Belirtilen oranlar kullanılarak 1000 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blokaj solüsyonu hazırlandı. Kesitler yaklaşık olarak 150-200 µl ile kapandığı için bu oranın katları hesaplanarak kesit sayısına göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blokaj solüsyonu her işlem öncesinde taze olarak hazırlandı.

%30 stok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonundan 100 µl alınarak, metanol ve distile su dilüsyonu ile 1/10 oranında hazırlandı.

### 3.4.9 Serum Blokaj Solüsyonu

Keçi serumu	100 µl
TBS+BSA	900 µl

**Hazırlanışı:** Serum blokaj basamağında sekonder antikorun üretildiği canlı türünün serumu 1/10 oranında sulandırılarak uygulanmıştır. Bu işlemde 1 ml %10 serum blokaj solüsyonunun hazırlanması için, 100 µl normal keçi serumu 900 µl TBS+BSA ile sulandırılmıştır.

### 3.4.10 Primer Antikorlar

**Tablo 4.** Çalışmada kullanılan primer antikorların özellikleri

Primer Antikor	Antikor kodu	Klonalite	İzotip	Dilüsyon oranı
Anti-Apelin	Ab59469	Poliklonal	Tavşan IgG	1/500
Anti-APJ	Ab84296	Poliklonal	Tavşan IgG	1/500

Çalışmada kullanılan primer antikorlar, tavşanda üretilmiş poliklonal özelliktedir ve insan antijenlerini belirleyebilecek özelliktedir.

Apelin antijenine yönelik primer antikor (Abcam; Ab59469) önerilen konsantrasyon olan 1/500 oranında TBS +BSA solüsyonu ile dilüe edilerek kesitlere uygulanmıştır.

APJ antijenine yönelik primer antikor (Abcam; Ab84296) önerilen konsantrasyon olan 5µg/ml konsantrasyonda TBS +BSA solüsyonu ile dilüe edilerek kesitlere uygulanmıştır.

### 3.4.11 Sekonder Antikor

HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (Lab vision -TPN-125-BN kodlu sekonder antikor kiti) kullanıldı. Kit içerisinde bulunan sekonder antikor kullanıma hazır olan, keçide üretilmiş polivalan (fare ve tavşan antikorlarına bağlanabilen) biyotinli IgG izotipinde poliklonal antikordur. HRP (horseradishperoksidaz) ile konjuge edilmiştir.

### 3.4.12 Diamino Benzidin (DAB) Solüsyonu

Kromojen olarak DAB (Lab vision, TA-125-HDX, İngiltere) ve dilüsyon solüsyonu olan DAB substratı kullanıldı. 2 ml DAB substratı içine 1 damla DAB eklenerek karıştırıldı.

### **3.5 Histokimya Yönteminin Uygulanması**

Histokimya yöntemi uygulanacak kesitler bir gece 60°C etüvde bekletilerek deparafinize edildi.

#### **3.5.1 Mayer'in Hematoksileni Boyama Protokolü**

Mayer'in Hematoksileni boyama prokolünde kesitler etüvden çıkarıldıktan sonra üç kez 15 dk süreyle ksilolden geçirilerek kalan parafin uzaklaştırıldı. İki kez 10 dk süreyle % 96 etanol ve bir kez 10 dk süreyle % 80 etanolde bekletilerek rehidrasyon uygulandı. Çeşme suyunda yıkandıktan sonra hematoksilende 20 dk bekletilen kesitler çeşme suyunda yıkanarak boyanın fazlası uzaklaştırıldı. Daha sonra amonyaklı sudan geçirilen kesitler çeşme suyunda yıkandı. Eozin içinde 1 dk bekletildi. %80 ve %96 ve tekrar %96 etanolden geçirilerek dehidrate edilen kesitler 3 kez 15 dk süreyle ksilende şeffaflandırıldıktan sonra entellan kapatma medyumu (Merck, Almanya) ile kapatıldı.

#### **3.5.2 Trikrom Boyama Protokolü**

Trikrom boyama prokolünde kesitler etüvden çıkarıldıktan sonra iki kez 15 dk süreyle ksilolden geçirilerek kalan parafin uzaklaştırıldı. İki kez 10 dk süreyle % 96 Etanol ve bir kez 10 dk süreyle % 80 Etanolde bekletilerek rehidrasyon uygulandı. Distile suda yıkandıktan sonra 60°C etüvde 1 saat süreyle Bouin içinde bekletildi. Çeşme suyunda yıkandıktan sonra hematoksilende 20 dk bekletilen kesitler çeşme suyunda yıkanarak boyanın fazlası uzaklaştırıldı. Asit alkolden geçirilen kesitler çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra amonyaklı sudan geçirilen kesitler çeşme suyunda yıkandı. Trikrom içinde 15 dk bekletildikten sonra 2 dk asetik asit (%0,5 lik) içinde bekletildi. %80 ve %96 etanolden geçirilen kesitler 15 dk ksilende şeffaflandırıldıktan sonra entellan kapatma mediyumu ile kapatıldı.

### 3.6 İndirekt İmmunperoksidaz Yönteminin Uygulanması

Hastalara ait tümör doku kesitlerine Apelin ve APJ reseptörü antijenlerine yönelik primer antikolar kullanılarak, HRP konjuge indirekt ABC immünohistokimya yöntemi uygulandı. Tüm aşamalar nemli ortamda ve oda ısısında gerçekleştirildi.

Parafin kesitler ilk olarak deparafinizasyon için 4 saat süreyle 60 °C etüvde bekletildi. Daha sonra ksilolde 2 x 5 dakika, % 96 etanolde 5 dakika, %90 etanolde 3 dakika, % 80 etanolde 3 dakika, % 70 etanolde 3 dakika, muamele edilerek rehidratasyon uygulandı. Rehidrate edilen kesitler distile suda yıkandı. Daha sonra pH 7,6 olan tris tamponlu salin (TBS) ile kesitler 3 x 5 dakika yıkandı ve antijen geri çağırma (*retrival*) kadar tris tamponlu salinde bekletildi.

Apelin antijeni için pH'sı 9.0 olan Tris- EDTA solüsyonu ile antijen açığa çıkarma yöntemi uygulandı. Düdüklü tencereye 1000 ml Tris-EDTA solüsyonu eklendikten sonra, tencere ısıtmaya başlanmıştır. Başlangıçta açık olan düdüklü tencere kapağı, kaynamaya başladıktan sonra kapatılarak 3 dakika beklenmiştir. Daha sonra düdüklü tencere, havuza alınarak soğuması beklenmiştir.

APJ reseptörü antijeni için pH'sı 6.0 olan sitrat tampon çözeltisi ile antijen açığa çıkarma yöntemi uygulanmıştır. Düdüklü tencereye 1000 ml sitrat tampon çözeltisi eklendikten sonra, tencere ısıtmaya başlanmıştır. Başlangıçta açık olan düdüklü tencere kapağı, kaynamaya başladıktan sonra kapatılarak 3 dakika beklenmiştir. Daha sonra düdüklü tencere, havuza alınarak soğuması beklenmiştir.

Antijen geri çağırma sonrası kesitler, Tris tamponlu salin (TBS) solüsyonu ile 3 x 5 dakika yıkanmıştır.

Yıkanan kesitlere, 10 dakika süreyle oda sıcaklığında nemli ortamda %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonuyla endojen peroksidaz blokajı uygulanır. %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu, %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stok solüsyonundan 1/10 oranında dilüsyonla hazırlanır.

Fosfat tamponlu salin ile 3 kez yıkama sonrası hedeflenen doku kesitlerinin çevresi hidrofobik işaretleyici kalem ile işaretlenmiştir. Diğer işlemler nemli ortamda gerçekleştirilmiştir.

Serum blokaj basamağında sekonder antikorun üretildiği canlı türünün serumu 1/10 oranında sulandırılarak uygulanmıştır. Bu işlemde 1 ml %10 serum

blokaj solüsyonunun hazırlanması için, 100 µl normal keçi serumu 900 µl TBS ile sulandırılmıştır.

Hazırlanan serum blokaj solüsyonu ile kesitler 2 saat muamele edilmiştir. Yıkama yapılmadan sadece blokaj solüsyonu mekanik olarak uzaklaştırılarak primer antikor uygulama basamağına geçilmiştir.

Apelin antijenine yönelik primer antikor (Abcam; Ab59469) önerilen konsantrasyon olan 1/500 oranında TBS +BSA solüsyonu ile seyreltilerek kesitlere uygulanmıştır. Kesitler nemli ortamda, +4 °C de, 1 gece (overnight) muhafaza edilmiştir. 1 gece inkubasyon sonrası fosfat tamponlu salin ile 3 kez 5 er dakika yıkanarak fazlası dokudan uzaklaştırılmıştır.

APJ antijenine yönelik primer antikor (Abcam; Ab84296) önerilen konsantrasyon olan 5µg/ml konsantrasyonda TBS +BSA solüsyonu ile seyreltilerek kesitlere uygulanmıştır. Kesitler nemli ortamda, +4 °C de, 1 gece (overnight) muhafaza edilmiştir. 1 gece inkubasyon sonrası fosfat tamponlu salin ile 3 kez 5 er dakika yıkanarak fazlası dokudan uzaklaştırılmıştır.

Sekonder antikor olarak kullanıma hazır olduğu için dilusyon yapılmadan uygulandı. Sekonder antikor 15 dakika süre ile uygulandıktan sonra fosfat tamponlu salin ile 3 kez 5 er dakika yıkanarak fazlası dokudan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kit içinde mevcut olan HRP de 15 dakika süre ile uygulandıktan sonra fosfat tamponlu salin ile 3 kez 5 er dakika yıkanarak fazlası dokudan uzaklaştırılmıştır.

Kromojen olarak diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Kesitlere uygulanan DAB boyanması mikroskop altında değerlendirildi. Optimum süre belirlenerek diğer kesitlere de aynı sürede uygulandı. DAB uygulanmış kesitler distile su ile yıkanarak fazla kromojen dokudan uzaklaştırıldı. DAB yüksek oranda toksik bir kimyasal olduğu için çamaşır suyu (sodyum hipoklorit) ile nötralize edilip, ayrı bir kapta zararlı atıklar deposunda depolandı.

Çekirdek boyası olarak 45 saniye süreyle Mayer'in hematoksileni uygulanmıştır. Hematoksilen boyasının fazlası çeşme suyu ile kesitler yıkanarak uzaklaştırılmıştır.



Kesitler, % 70 etanol,% 80 etanolde, % 90 etanolde ve %96 etanolden geçirilerek dehidrate edilmiştir. Daha sonra alkol uçması beklenip, ksilolde 2 x 3 dakika şeffaflandırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında kesitler kurumadan Entellan kapama mediumu kullanarak kapama yapılmıştır.

### **3.7. Görüntüleme ve Değerlendirme**

#### **3.7.1 Kesitlerin Görüntülenmesi**

Hematoksilen eozin, trikrom boyaması, apelin ve APJ antijenlerine yönelik immün işaretleme uygulanan kesitler LAS X programı kullanılarak, Leica DM6B Upright ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir. Kesitlerin fotoğraflarının elde edilmesinde Leica DFC7000T kamera kullanılmıştır.

#### **3.7.2. Tümör Stroma Oranının Değerlendirilmesi**

Tümör/stroma oranının değerlendirilmesinde Masson'un trikromu ile boyalı preparatlarda, X4 objektifle tümörün en invaziv özellikte olduğu, tümör ve stromal kompartmanın birlikte bulunduğu alanlar belirlendi. Kanama, nekroz olan alanlar değerlendirilmedi. Chen ve arkadaşlarının çalışmalarında belirtildiği gibi (24) x10 büyütme alanında görüntünün her köşesinde tümör olmasına dikkat edilerek tümör stroma oranı (TSR) yüzde olarak belirlendi. Stromal kompartman yüzdesine göre, preparatlar stromadan zengin (stroma  $\geq$  %50) ve stromadan fakir (stroma  $<$ %50) olarak iki grup halinde değerlendirildi. Tümör stroma oranı, apelin immünreaktivitesi ve lenf nodu tutulumu ile karşılaştırıldı.

#### **3.7.3 İmmünohistokimyasal İşaretlemenin Değerlendirilmesi**

İmmünohistokimyasal boyanma şiddetinin değerlendirilmesinde bilgisayar tabanlı görüntü analiz sistemi olan MATLAB (Matrix Laboratory) (R2017b) kullanılmıştır. MATLAB analizi için x4, x20 ve x40 objektifle 5'er alandan TIFF formatında görüntüler elde edilmiş ve kullanılan tüm objektiflerde fotoğraflar arasında standardizasyonun sağlanması için pozlama (*exposure*), ışık yoğunluğu

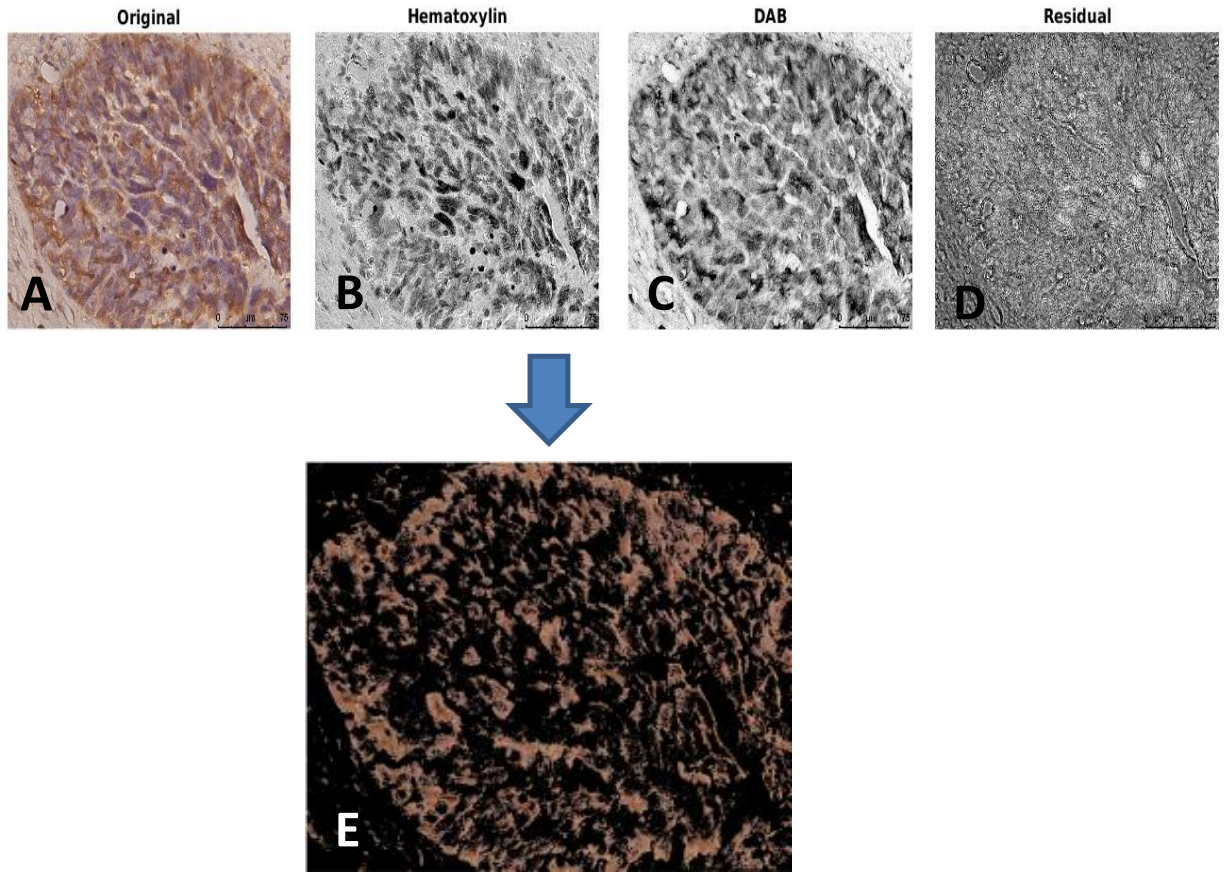
(*intensity*) ve diyafram açıklığı (*aperture*) değerleri sabit değerde tutularak görüntüler kaydedilmiştir.

**Tablo 5.** Çalışmamızda immünreaktiviteyi belirlemede kullanılan görüntülerin elde edilmesinde fotoğraflar arası standardizasyonun sağlanması için sabit tutulan pozlama (*exposure*), ışık yoğunluğu (*intensity*) ve diyafram açıklığı (*aperture*) değerleri

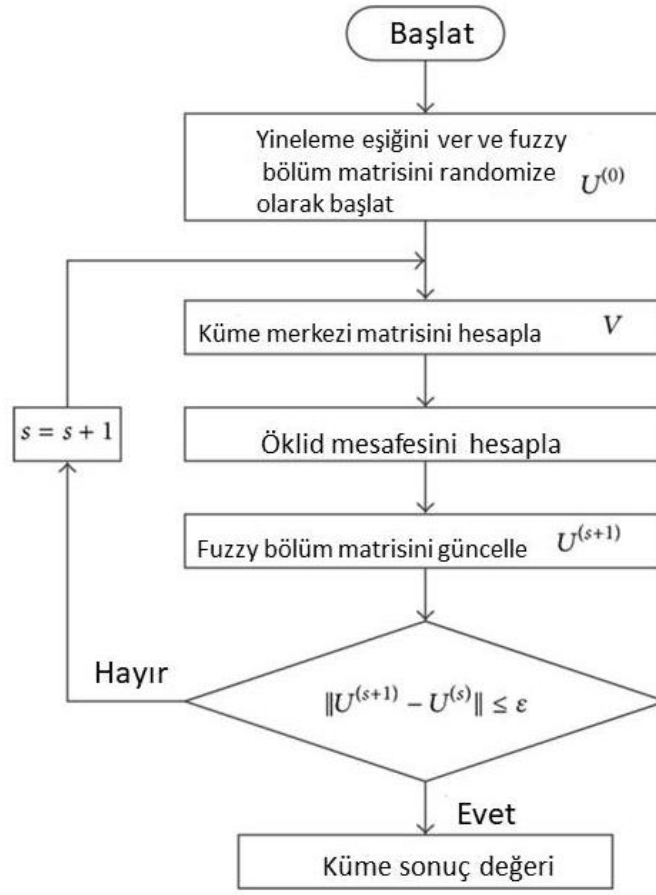
Parametre	x4	x20	x40
Pozlama ( <i>Exposure</i> )	20	26	36
Yoğunluk ( <i>Intensity</i> )	25	33	36
Diyafram açıklığı ( <i>Aperture</i> )	21	15	21

Analiz için kanama, nekroz gibi değerlendirmeyi olumsuz etkileyebilecek alanların dışlanması ve tümörün en yoğun olduğu alanların daha iyi saptanabilmesi amacıyla x40 objektifle görüntülenen alanlardan elde edilen her doku için 5 alan kullanıldı.

Elde edilen görüntülere ilk olarak *colour deconvolution* yöntemi uygulandı. Bu yöntem ile üç kanal (DAB, hematoksilin ve rezidüel alan) belirlendi (Şekil 1A-D). Hematoksilin ve DAB kromojeni renginin sisteme tanıtılan eşik değerleri iki gözlemci tarafından belirlendi. Rezidüel alan olarak tümör dışında kalan bağ doku alanları ve damar lümeni gibi alanlar ile hematoksilinle boyanmış çekirdekler siyah ile renklendirilerek analiz dışı bırakıldı. Böylece tümör hücrelerinin sadece sitoplazma ve membranlarındaki immünreaktivite değerlendirildi (Şekil 1-E). Alınan görüntülerden boyanma yoğunluğu en az, en zayıf ve boyanma yoğunluğu en çok, en güçlü olan görüntüler kullanılarak *Fuzzy C Means* algoritmasına göre kümelendirme işlemi uygulandı (Şekil 2).

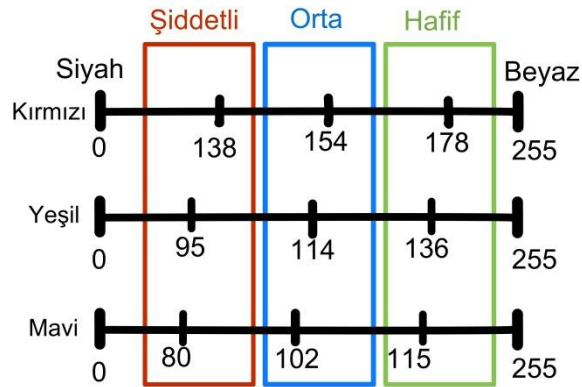


**Şekil 1.** *Colour deconvolution* yöntemi ile indirekt immünperoksidaz ile işaretlenen kesitlerde (1-A), hematoksilen (1-B) , DAB (1-C) ve rezidüel alanlar (1-D) belirlendi. Rezidüel alanlar ile hematoksilenle boyanmış çekirdekler analiz dışı bırakılarak tümör hücrelerinin sadece sitoplazma ve membranlarındaki immünreaktivite değerlendirildi (1-E).



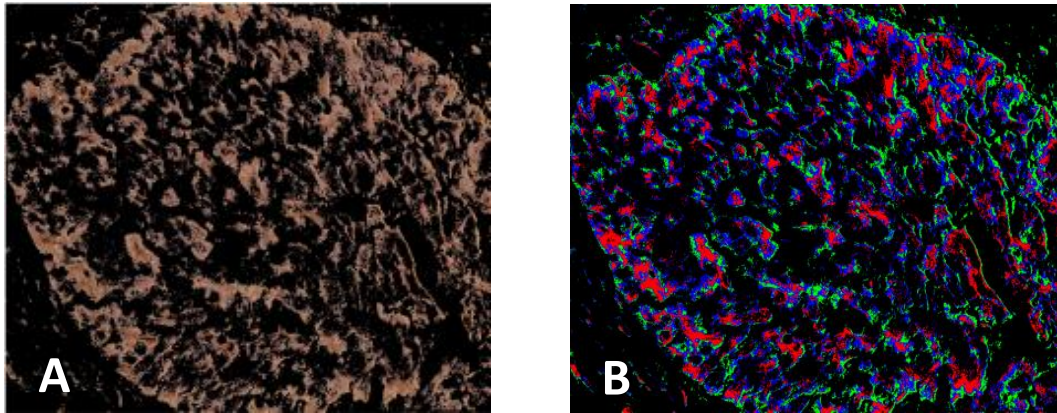
**Şekil 2.** Çalışmada kullanılan *Fuzzy C Means* algoritması (s: Algoritm tekrarlanma sayısı,  $\epsilon$ : eşik değer, U matrisi: her örneğin pixel olarak kümelere olan benzerliği, V: her kümenin orta nokta değeri)

Bilgisayar tabanlı analiz sisteminde görüntüler renk boyutunda red, green ve blue (RGB) olarak üç boyutlu olarak tanımlanmaktadır. Yapılan kümeleme işlemi sonucu 0 (siyah) -255 (beyaz) arasındaki renk skalası içindeki şiddetli- orta- hafif immünreaktiviteyi gösteren değerler belirlendi (Şekil 3).



**Şekil 3.** *Fuzzy C Means* algoritmasına göre immünreaktivite şiddetinin 3 renk boyutunda (*RGB: red, green, blue*) ve 0 (siyah) -255 (beyaz) arasında kümelenmesi işleminde kullanılan skala

Tüm görüntüler için şiddetli boyanma: kırmızı, orta şiddette boyanma: mavi ve hafif şiddette boyanma: yeşil renk ile ifade edilecek şekilde reklendirildi (Şekil 4-B). Benzer bir yöntemi Zuurbier ve arkadaşları da kullanmıştır (84).



**Şekil 4.** *Fuzzy C Means* algoritması ile immünreaktivite şiddetinin 3 kategoride sınıflandırılması. İmmünreaktivite; şiddetli: kırmızı, orta şiddette: mavi, hafif: yeşil renk ile ifade edilecek şekilde reklendirildi (4-B)

Bu alanlarda boyanma şiddeti analiz sonucuna göre pixel verileri olarak elde edildi. Her iki antikor için de elde edilen pixel verilerinden hafif- orta- şiddetli immünreaktivite yoğunlukları toplam pixel değerine bölünerek her üç kategori için boyanma yüzdeleri belirlendi. H skoru formülü kullanılarak boyanma yoğunluğu (0,

+1, +2 veya +3) ve boyanma yüzdesiyle (%0-%100 arası) immünreaktivitenin gruplar için H skor değeri hesaplanarak ortalamaları alındı.

$$H\text{-skor} = (\% \cdot x_0) + (\%+1 \cdot x_1) + (\%+2 \cdot x_2) + (\%+3 \cdot x_3)$$

#### **3.7.4 İstatistik Analiz**

Verilerin değerlendirilmesinde niceliksel veriler için sayı ve yüzde kullanıldı. Lenf nodu tutulumuna göre yapılan karşılaştırmalarda *Mann Whitney U* testi kullanıldı. Obezite sınıflamasına göre yapılan karşılaştırmalarda *Kruskal Wallis* testi uygulandı. Kategorik değişkenler, gruplarda niteliksel özelliklerin karşılaştırılmasında Ki kare kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Hasta Verilerinin Değerlendirilmesi

#### 4.1.1 Hastaların Demografik Özellikleri

Lenf nodu tutulumu olan grupta tanı anında ortalama yaş  $54.6 \pm 11,23$  iken, lenf nodu tutulumu olmayan grupta tanı anında ortalama yaş  $60.4 \pm 8.62$  dir. Lenf nodu tutulumu olan grupta hastalar ortalama 6 yaş daha erken over kanseri tanısı almıştır. Vücut kitle indeksi ortalaması lenf nodu tutulumu olan grupta 27.7, lenf nodu tutulumu olmayan grupta 28.8 dir. İki grupta toplam 30 hastanın 19'u (%63.33) vücut kitle indeksi 25'in üzerinde normal vücut ağırlığının üzerinde olan hastalardır. Gruplar arasında obezite açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. Lenf nodu tutulumu olan grupta normal vücut ağırlığının üzerinde olan hasta sayısı 9 (%60), lenf nodu tutulumu olmayan grupta normal vücut ağırlığının üzerinde olan hasta sayısı 10'dur (%66,6).

#### 4.1.2 Sağ Kalım Oranları ile Vücut Kitle İndeksinin Karşılaştırılması

Dünya sağlık örgütünün vücut kitle indeksi ve nutrisyon durumuna göre sınıflaması ve çalışmamızda yer alan hastaların yüzde dağılımları Tablo 6'de verilmiştir.

**Tablo 6.** Dünya Sağlık Örgütünün vücut kitle indeksi ve nutrisyon durumu sınıflamasına göre hastaların yüzde dağılımları.

Vücut Kitle İndeksi (BMI) (kg/m <sup>2</sup> )	Nutrisyon Durumu	Lenf nodu negatif grupta hasta sayısı / yüzdesi		Lenf nodu pozitif grupta hasta sayısı/ yüzdesi	
18.5 altında	Zayıf	0	% 0	2	% 13.3
18.5–24.9	Normal kiloda	5	% 33.3	4	% 26.6
25.0–29.9	Şişman- Obezite önces	5	% 33.3	2	% 13.3
30.0–34.9	Obezite I. derece	2	% 13.3	6	% 40
35.0–39.9	Obezite II. derece	2	% 13.3	0	% 0
40 ve üzeri	Obezite III. derece	1	% 6.6	1	% 6.6
Toplam		15	% 100	15	% 100

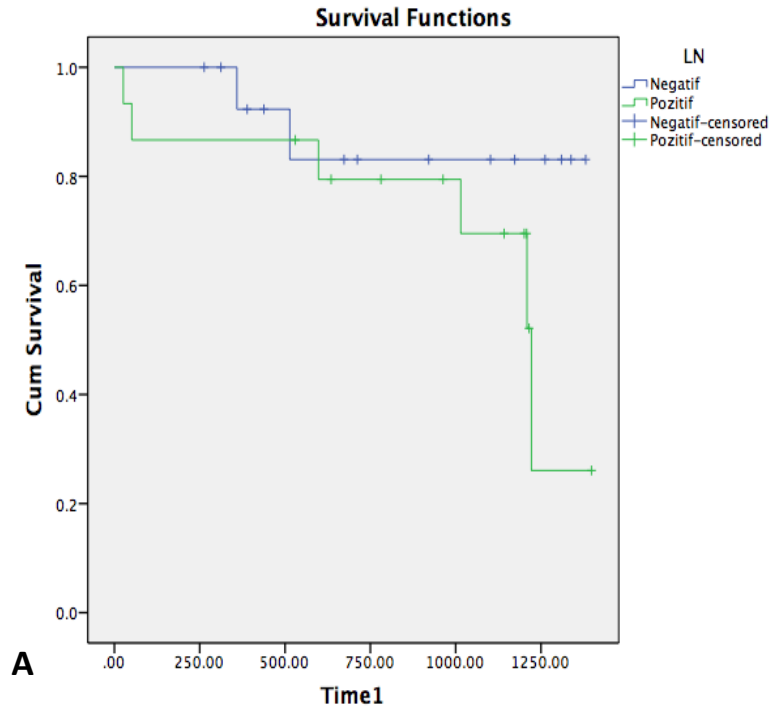
Çalışmamızda yer alan hastalar bu tabloya yerleştirildiğinde 1. 2. ve 3. derece obezite kategorilerinde yüzde dağılımları az olması nedeniyle, sağ kalım, lenf nodu tutulumu ve immünohistokimyasal işaretlenmelerin analizinde obezite tek kategori olarak değerlendirilmiştir (Tablo 7).

**Tablo 7.** Çalışmamızda sağ kalım, lenf nodu tutulumu ve immünohistokimyasal işaretlenmelerin analizinde kullanılan obezite sınıflaması.

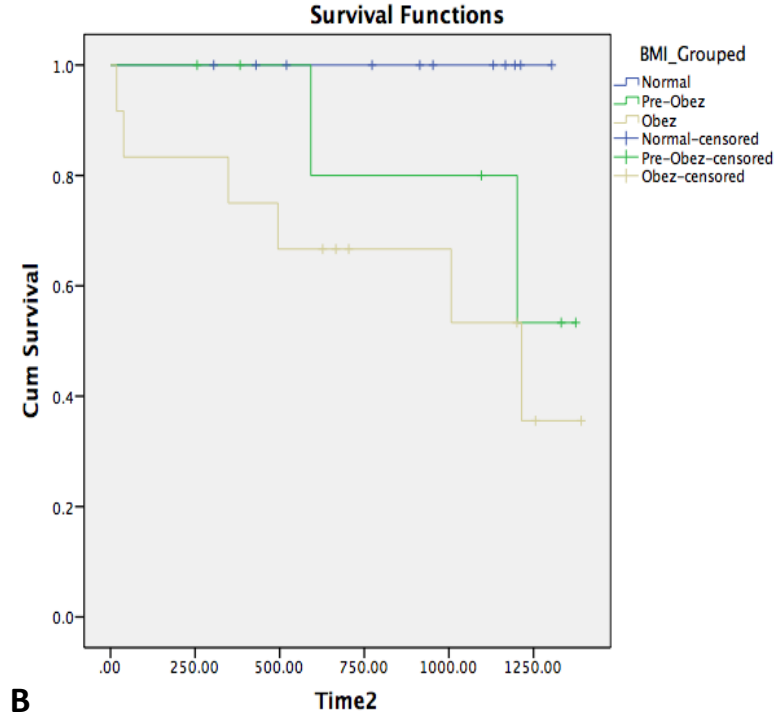
Vücut Kitle İndeksi (BMI) (kg/m <sup>2</sup> )	Nutrisyon Durumu	Lenf nodu negatif grupta hasta sayısı / yüzdesi		Lenf nodu pozitif grupta hasta sayısı/ yüzdesi	
24.9 altında	Normal kiloda	5	% 33.3	6	% 39.9
25.0–29.9	Şişman- Obezite öncesi	5	% 33.3	2	% 13.3
30.0 ve üzeri	Obezite	5	% 33.3	7	% 46.6
Toplam		15	% 100	15	% 100

Buna göre; BMI < 25: Normal kiloda (n=11), 25 ≤ BMI < 30 olanlar preobez (n=7) ve BMI ≥ 30 olanlar obez (n=12) olarak üç kategoriye ayrılarak değerlendirilen hastalarda sağ kalım oranına bakıldığında; obez ve preobezlerde sağ kalım oranları normal vücut kitle indeksine sahip bireylerle karşılaştırıldığında daha düşük saptandı. Normal vücut kitle indeksine sahip bireylerde sağ kalım %100 iken, preobezlerde sağ kalım %53, obezlerde %35 olarak saptandı. Obezlerde ölüm oranı daha yüksek saptanmasına rağmen örneklem genişliğine göre istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (P>0,05) .





**Grafik 5.** Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan hasta gruplarında Kaplan-Meier sağ kalım grafiği



**Grafik 6.** Vücut kitle indeksine göre normal, preobez ve obez olgularda Kaplan-Meier sağ kalım grafiği

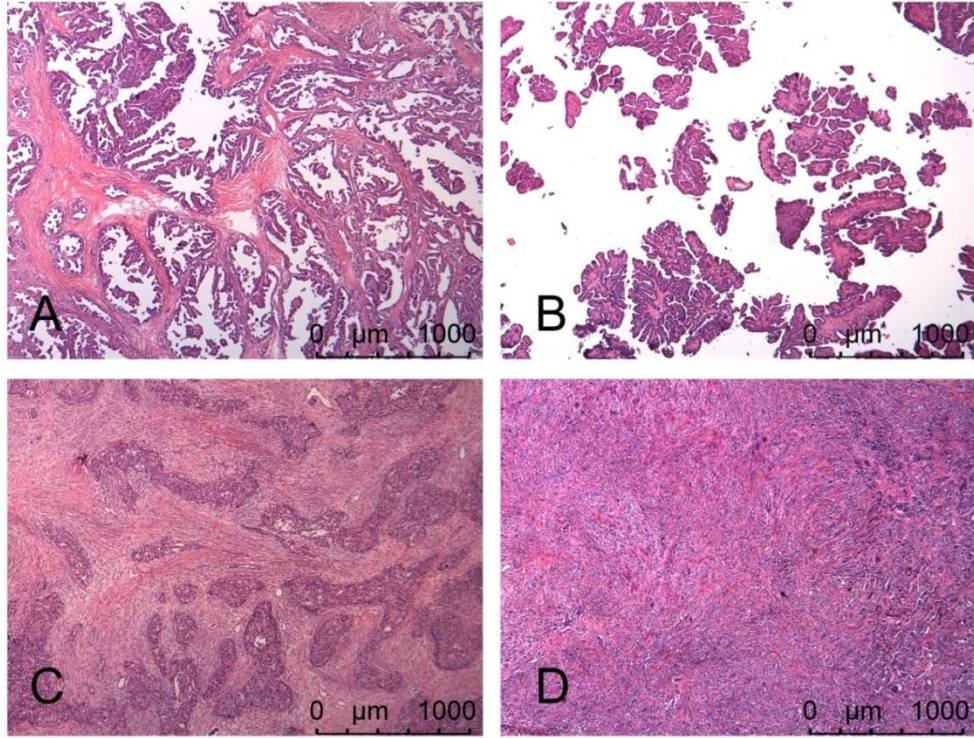
#### 4.2 Seröz Over Karsinomu Vakalarının Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

Over dokusuna ait kesitlerin ışık mikroskop altında incelenmesinde genel olarak tümör hücreleri ile infiltre olduğu gözlemlendi. Kesitlerde nadir olarak over dokusu izlendi. Çalışmamıza dahil edilen hastaların ortalama yaşı 55 ve üzeri olduğu için kesitlerde izlenen over dokusu daha çok fibrotik alanlardan oluşuyordu. Primordiyal folikül veya gelişmekte olan foliküller izlenmezken bazı alanlarda fibrotik over dokusu içinde nadiren korpus albicans yapıları izlendi (Şekil 5).



**Şekil 5.** Seröz papiller karsinom ile infiltre over dokusu, korpus albicans yapısı, kistik dejenere alanlar, fibrotik over dokusu izlenmektedir. (Hematoksilen- Eozin, x 40)

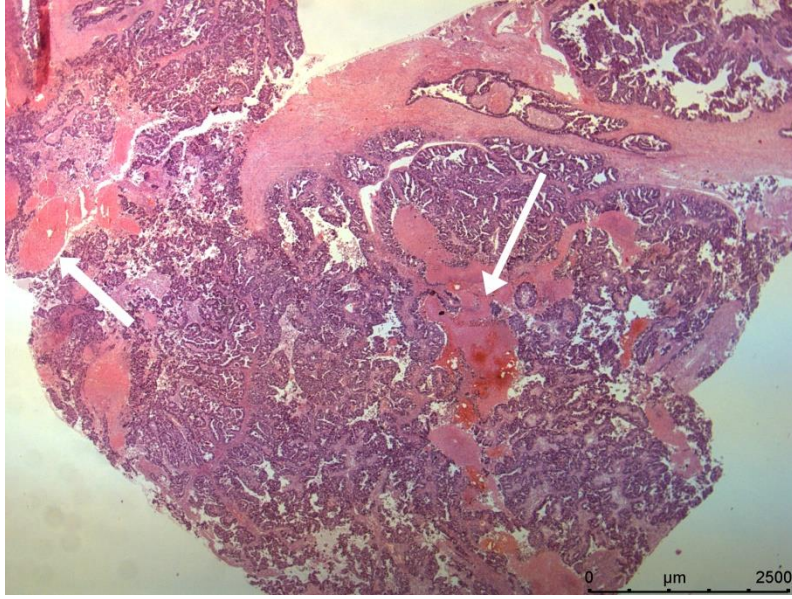
Yüksek dereceli seröz over karsinomu histopatolojik incelemelerde farklı morfolojik paternlerde: papiller, mikropapiller, infiltratif, glanduler, mikrokistik/ mikroglanduler, solid veya değişici epitel benzeri özellikte olabilir. Çalışmamızda incelenen kesitlerde genel olarak papiller karakter izlenmekle birlikte bazı vakalarda mikropapiller, infiltratif ve solid özellikte over seröz karsinom kesitleri gözlemlendi (Şekil 6).



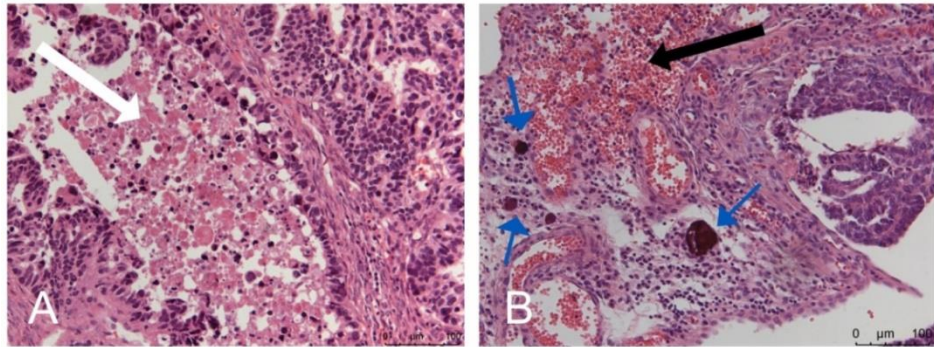
**Şekil 6.** Seröz over karsinomu farklı morfolojik paternlerde izlendi. A) Papiller, B) Mikropapiller, C) İnfiltratif, D) Solid patern (Hematoksilen- Eozin, x40).

Tümör dokusunun daha büyük büyütmede incelemesinde tümör içinde ve stromadaki damarlarda konjesyon, tümör içinde kanama alanları (Şekil 7), nekroz (Şekil 8), yer yer kistik dejenere alanlar izlendi. Distrofik kalsifikasyon alanları olan ve psammom cisimcikleri olarak adlandırılan kalsifikasyon alanları seröz over karsinomlarında tipik olarak gözlenmektedir. Çalışmamızda da psammom cisimcikleri hematoksilen-eozin ile boyalı preparatlarda bazofilik boyanan, konsantrik lameller görünümlü, farklı boyutlarda izlenebilen yapılar olarak saptandı (Şekil 8B). Tümör dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde nükleer atipi, bizaar dev çekirdek içeren tümör hücreleri izlendi (Şekil 9). Tümör hücrelerinde sık mitotik figürler yanında atipik mitozlar izlendi (Şekil 10).

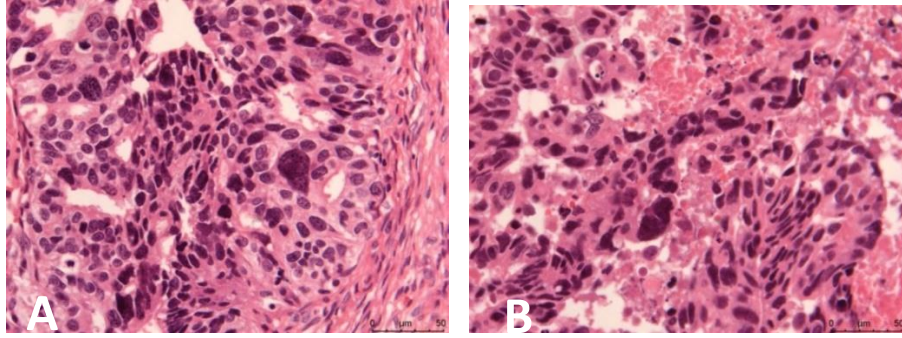




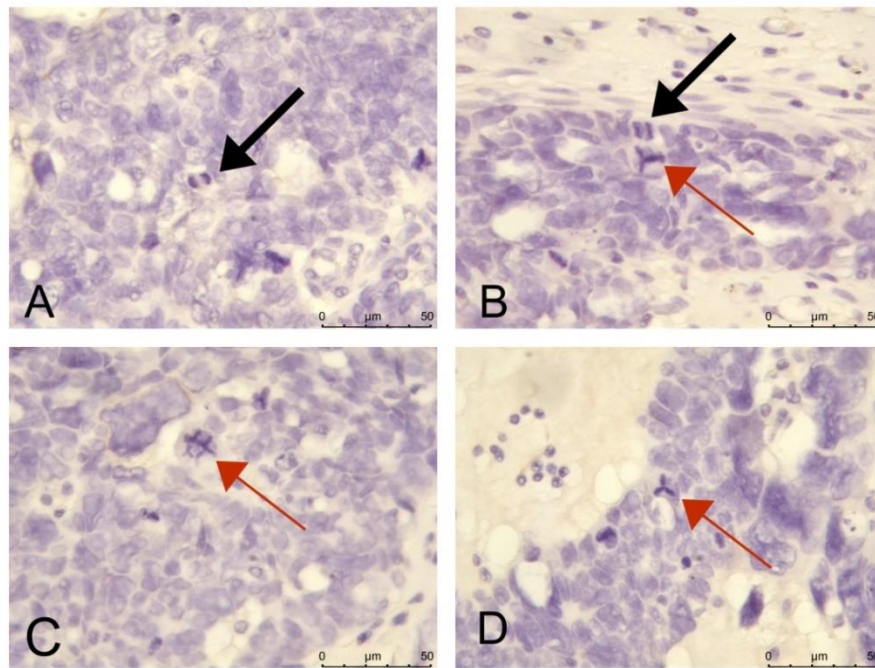
**Şekil 7.** Tümör içinde kanama alanları (oklar) (Hematoksilen-Eozin, x 12,5)



**Şekil 8.** Daha büyük büyütmede tümör dokusu içinde A) nekrotik alanlar (beyaz ok), B)hemorajik alanlar (siyah ok), farklı boyutlarda konsantrik yapıda psammom cisimleri (mavi oklar) izlenmektedir. (Hematoksilen-Eozin, A. B: x200)



**Şekil 9.** Over seröz kanserine ait örneklerde nükleer atipi ve bizaar dev çekirdek içeren tümör hücreleri izlenmektedir. (Hematoksilen-Eozin, A, B: X400)

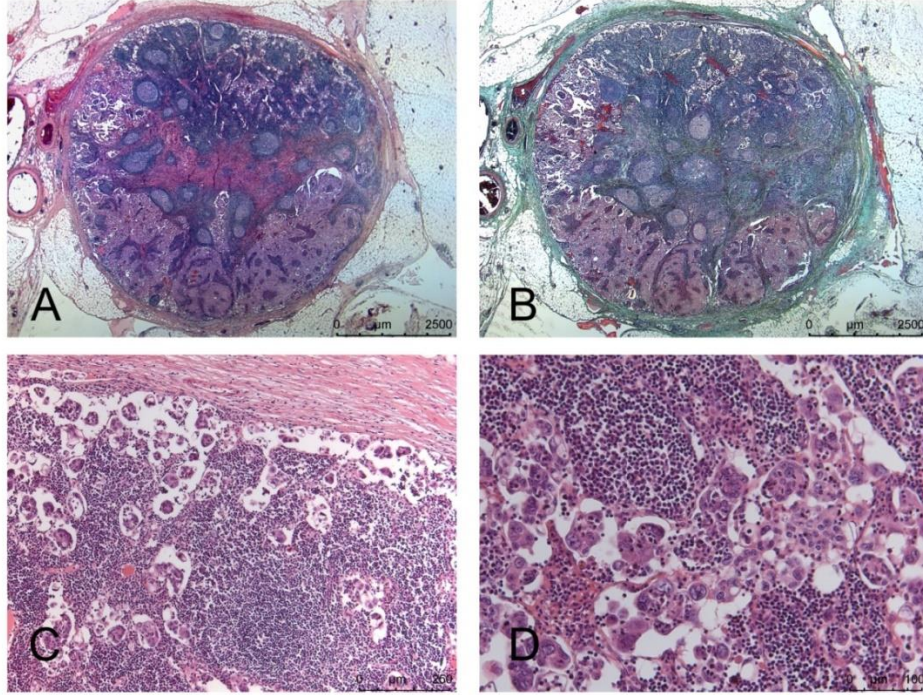


**Şekil 10.** Tümör hücrelerinde mitotik figürler sık izlendi. A, B) Telofaz evresinde aktif mitoz geçiren tümör hücreleri (siyah ok). C,D) Atipik mitoz örnekleri (kırmızı ok) Hematoksilen X630

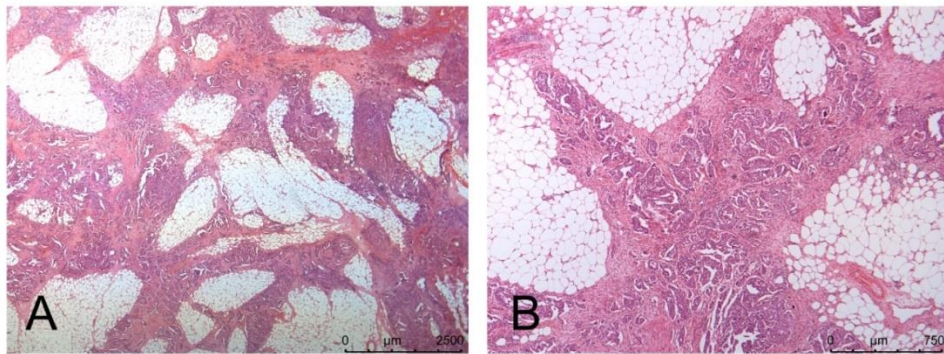
Patoloji kayıtlarına göre hastalardan lenf nodu tutulumu olmayan grupta uzak organ metastazı ve omentum tutulumu olmasına rağmen bölgesel lenf nodu diseksiyonu sonucu reaksiyoner lenf nodülleri izlenmiştir. Lenf nodu tutulumu olan grupta ise bölgesel lenf nodlarından obturator, iliak, paraaortik, presakral lenf nodlarından incelenenlerin birkaçı veya tamamı tümör hücreleri ile infiltre olduğu patoloji raporlarında saptandı. Hematoksilen- eozin ve Masson'un trikrom boyası ile



lenf nodunda kapsül altında tümör hücrelerinin ilk giriş yeri olan subkapsüler sinüslerde yerleştiği gözlemlendi (Şekil 11). Omental yağ dokusu içinde infiltratif özellikle tümör hücreleri izlendi (Şekil 12).



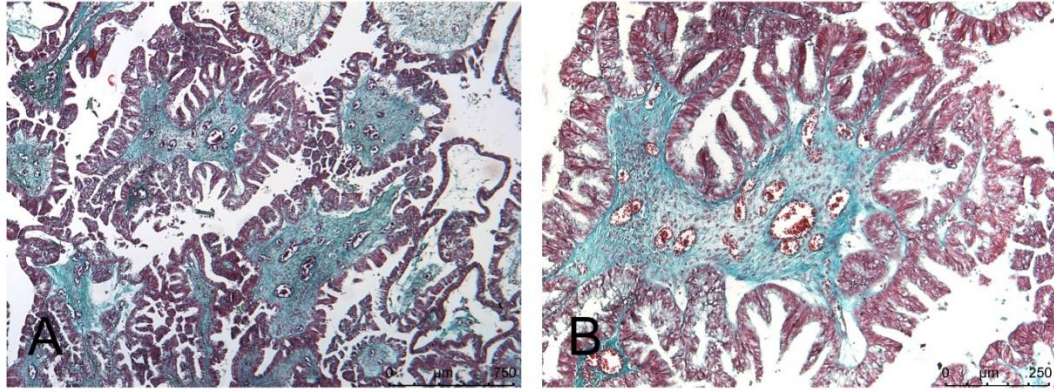
**Şekil 11.** Lenf nodu tutulumu olan gruptan lenf düğümüne ait bir örneğin ışık mikroskopunda tümör hücrelerinin subkapsüler sinüslerde yerleşimi izlenmektedir. Lenfositler arasında büyük atipik çekirdekli tümör hücreleri gözlenmektedir. (A, C, D- Hematoksilen-Eozin A:x 12,5, C:X100, D: X200, B-Masson trikrom boyama x 12,5)



**Şekil 12.** Omental yağ dokusu içinde infiltratif tümör odakları izlenmektedir. (Hematoksilen-Eozin A: X12,5, B: X40)

### 4.3 Tümör/Stroma Oranının Değerlendirilmesi

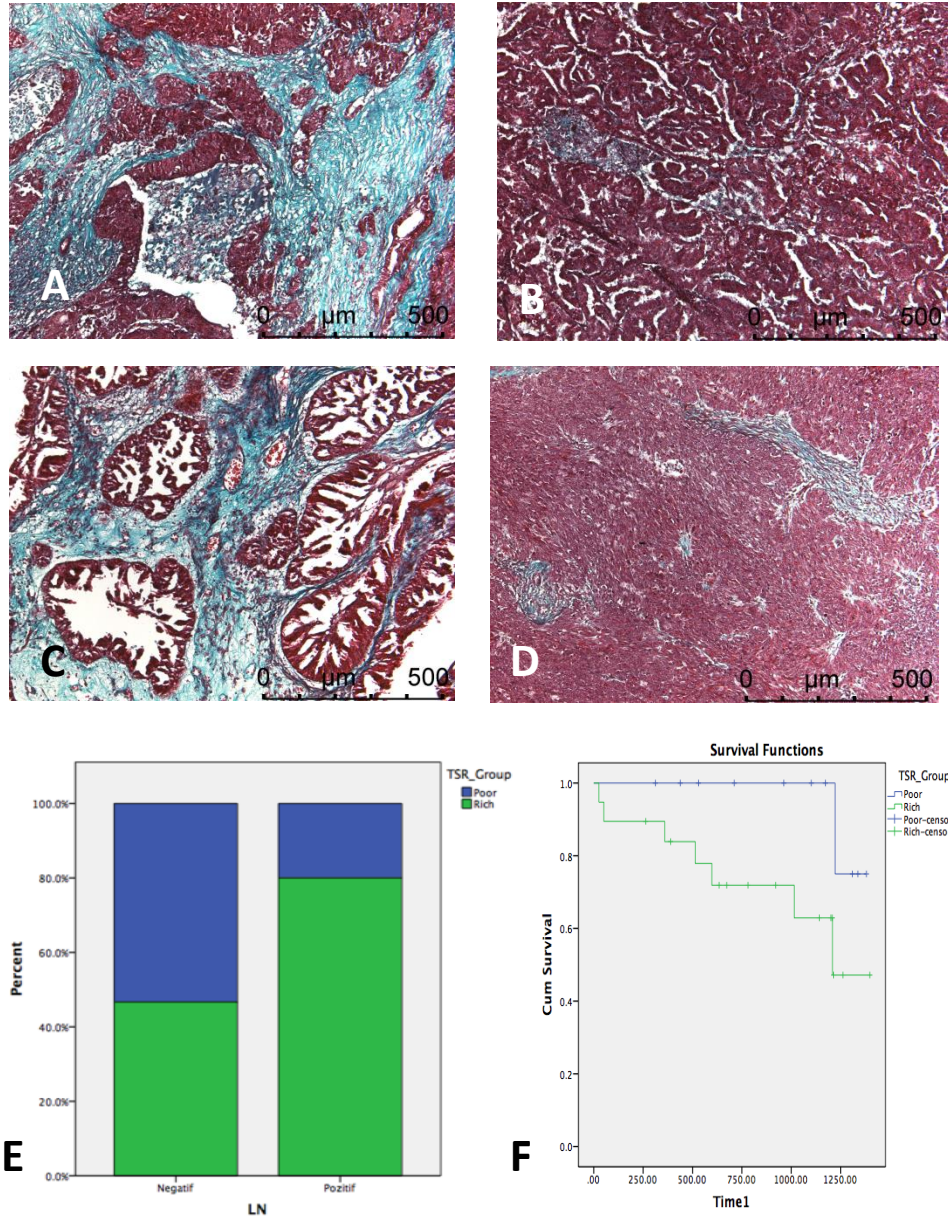
Tümör/stroma oranının değerlendirilmesinde Masson'un trikrom boyaması uygulanan kesitler (Şekil 11) gereç yöntem bölümünde belirtildiği gibi stromal kompartmanın yüzdesine göre stromadan fakir (stroma < %50) ve stromadan zengin (stroma  $\geq$  %50) olarak iki grup halinde değerlendirildi (Şekil 11). Tümör stroma oranı, lenf nodu tutulumu ve sağ kalım oranları ile karşılaştırıldı.



**Şekil 13.** Papiller over seröz karsinomuna ait örnekte tümör stroma ilişkisi ve stromada damarlarda konjesyon izlenmektedir. (Masson'un trikromu A: x40, B: x100)

Tümör/stroma oranına göre lenf nodu tutulumu olan grupta stromadan zengin olanların oranı %80, tutulum olmayan grupta %46,6 olarak izlendi (Şekil 14E). Stromadan zengin olan vakaların % 63,2'sinde lenf nodu tutulumu mevcuttur. Stromadan zengin olan grupta daha fazla lenf nodu tutulumu meydana gelmiştir ve gruplar arasındaki fark klinik açıdan anlamlıdır ( $p=0,058$ ). Stromadan zengin olan vakalarda sağ kalım oranı %42, stromadan fakir olanlarda ise %75'tir. Stromadan zengin grupta sağ kalım oranında istatistik fark bulunmamıştır ( $p=0,07$ ). Çalışma süresince ex olan toplam 8 vakadan 7'si stromadan zengin olan grupta yer almaktadır ve sağ kalım oranının stromadan zengin grupta düşük olması klinik açıdan anlamlıdır (Şekil 14F).





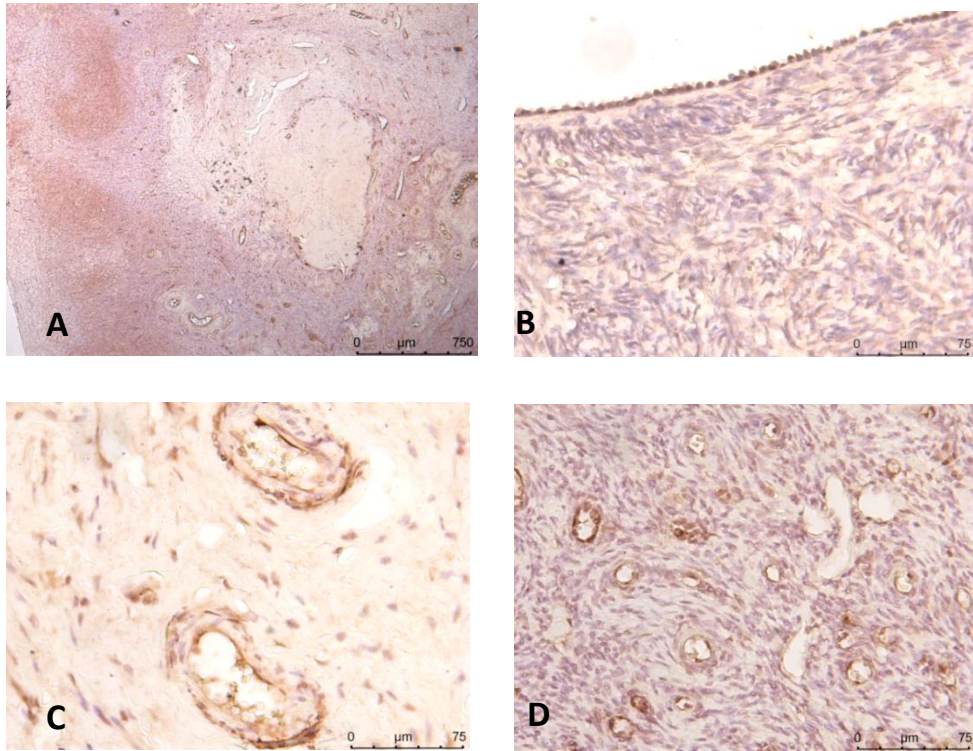
**Şekil 14.** Lenf nodu tutulumu olan grupta A) Stromadan zengin ve B) Stromadan fakir olan tümör dokusu C) Lenf nodu tutulumu olmayan grupta stromadan zengin D) Stromadan fakir olan tümör dokusu (Trikrom, A-D: x100) E) Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan gruplarda stromadan zengin (yeşil) ve fakir (mavi) olan vakaların dağılım grafiği (n=30). F) Stromadan zengin ve fakir olan olgularda Kaplan Meier sağ kalım grafiği.



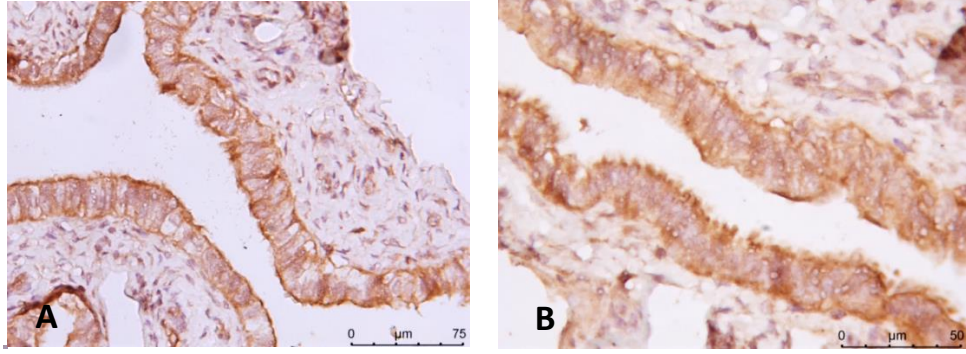
#### 4.4 İmmünohistokimya Boyaması ile Preperatların Değerlendirilmesi

Apeline yönelik yapılan immün işaretleme sonucu normal ovaryum germinal epitelinde ve normal tuba uterina epitelinde hafif şiddette sitoplazmik boyanma izlendi. Ovaryum ve tuba uterinada bağ doku içinde damar endotelinde, damar düz kası, yağ hücreleri ve bazı bağ doku hücrelerinde pozitif apelin immünreaktivitesi saptandı (Şekil 15, 16).

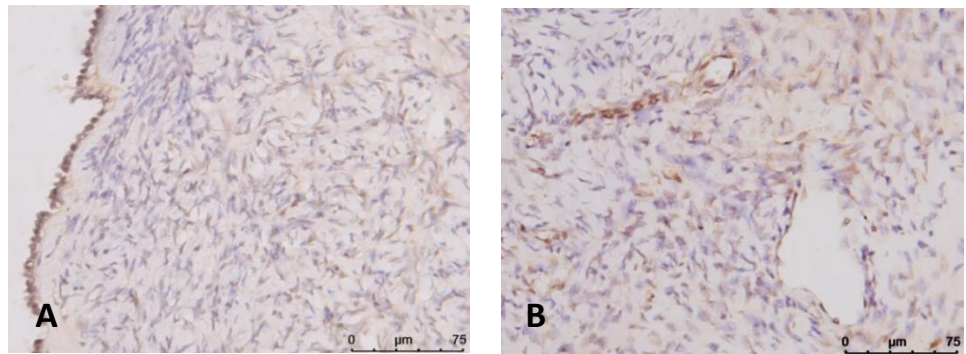
APJ reseptörüne yönelik immün işaretleme sonucu normal ovaryum germinal epitelinde, normal tuba uterina epitelinde, stromada damar endotelinde membranöz boyanma izlendi (Şekil 17, 18).



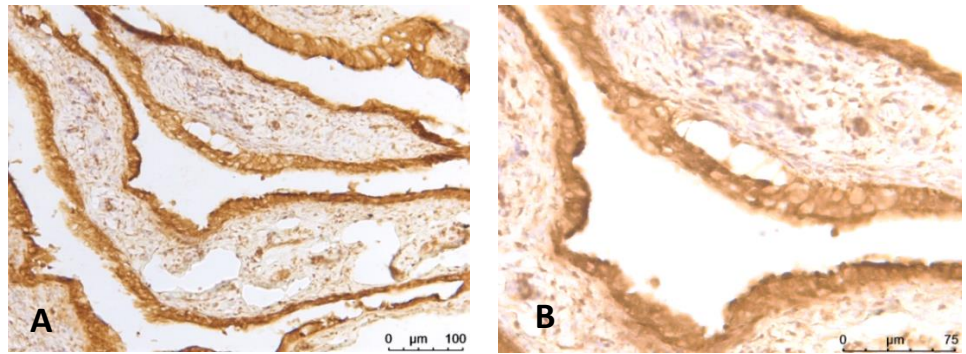
**Şekil 15.** Normal ovaryum dokusunda anti-apelin antikoru ile yapılan immün işaretlemede A) ovaryum stromasında B) germinal epitelde C, D) Damar endotel ve damar düz kasında pozitif apelin immünreaktivitesi izlenmektedir. (İndirekt immünperoksidaz A: x40, B,C, D: x400)



**Şekil 16.** Normal tuba uterina dokusunda, epitelde ve stromal hücrelerde apelin ifadesi (İndirekt immünperoksidaz A: X400 B: X630)



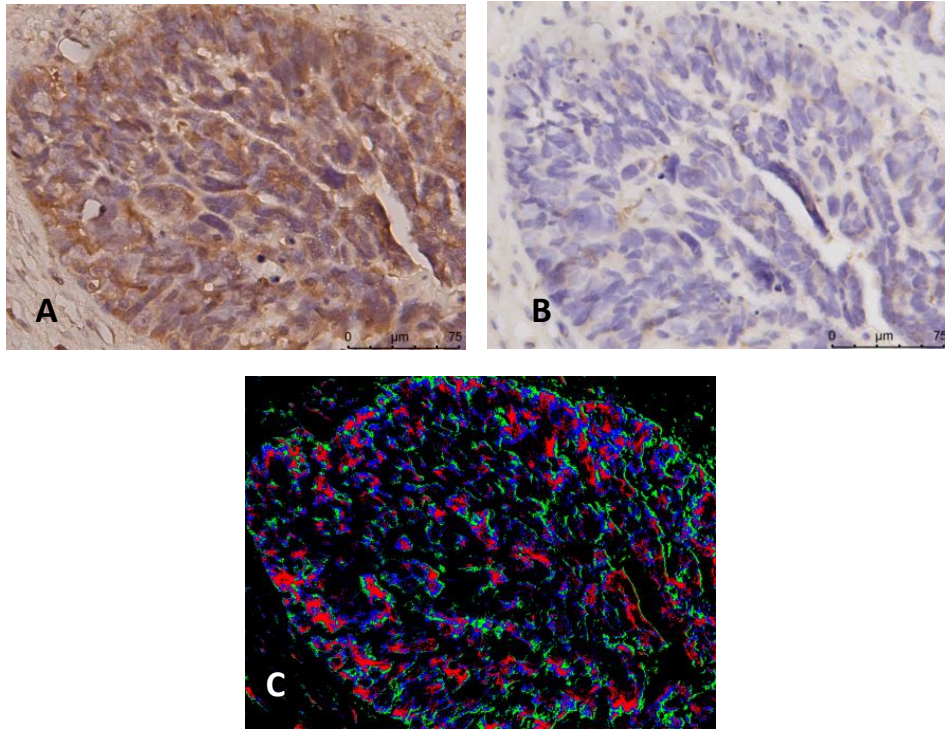
**Şekil 17.** Normal ovaryum dokusunda anti- APJ antikoruna ile yapılan immün işaretlemede APJ immünreaktivitesi A) Ovaryum stroması ve germinal epitelde, B) Damar endotel hücrelerinde pozitif olarak izlenmektedir. (İndirekt immünperoksidaz A, B: x400)



**Şekil 18.** Normal tuba uterina dokusuna ait örnekte tuba uterina epitelinde APJ immünreaktivitesi izlenmektedir. (İndirekt immünperoksidaz A: X200, B: X400)

#### 4.4.1 Tümör hücrelerinde Apelin ve APJ immünreaktivitesi:

Over seröz karsinomuna ait kesitlerde tümör hücrelerinde her iki antikorun immünreaktivitesi alınan görüntülerde bağ dokusu ve çekirdekler çıkarıldıktan sonra MATLAB analiz sistemi ile değerlendirildi. Tümör hücrelerinde immünreaktivite hafif, orta, şiddetli olarak belirlenerek hafif immünreaktivite yeşil, orta mavi, kuvvetli kırmızı renk ile tanımlanarak görüntü üzerine işaretlendi (Şekil 19).

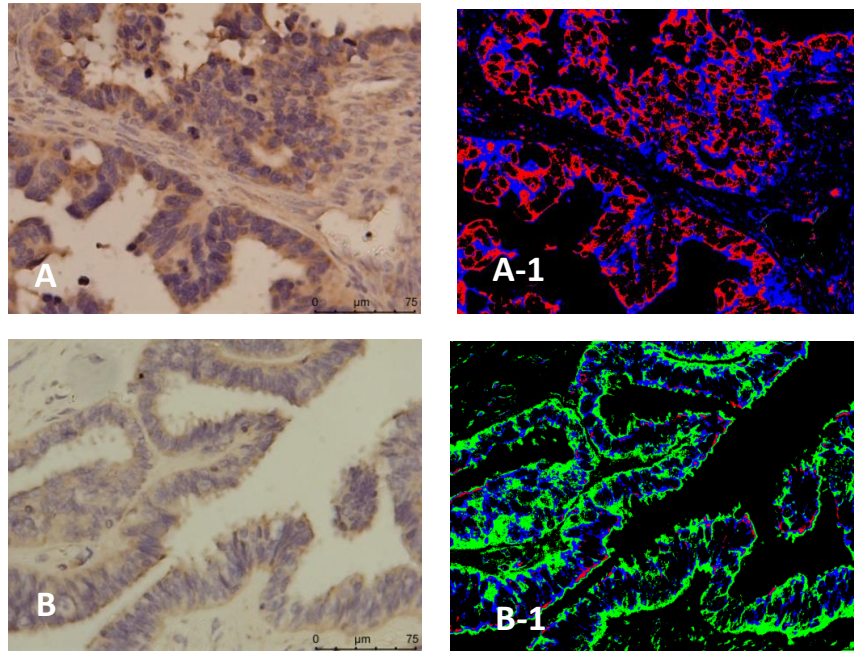


**Şekil 19.** A)Tümör hücrelerinde apelin immünreaktivitesi (İndirekt immünperoksidaz x400), B)Negatif kontrol, (Hematoksilen x400), C)MATLAB analiz programı ile immünohistokimya boyanma şiddetinin analizi (kırmızı: kuvvetli, mavi: orta şiddette boyanma, yeşil: hafif boyanma)

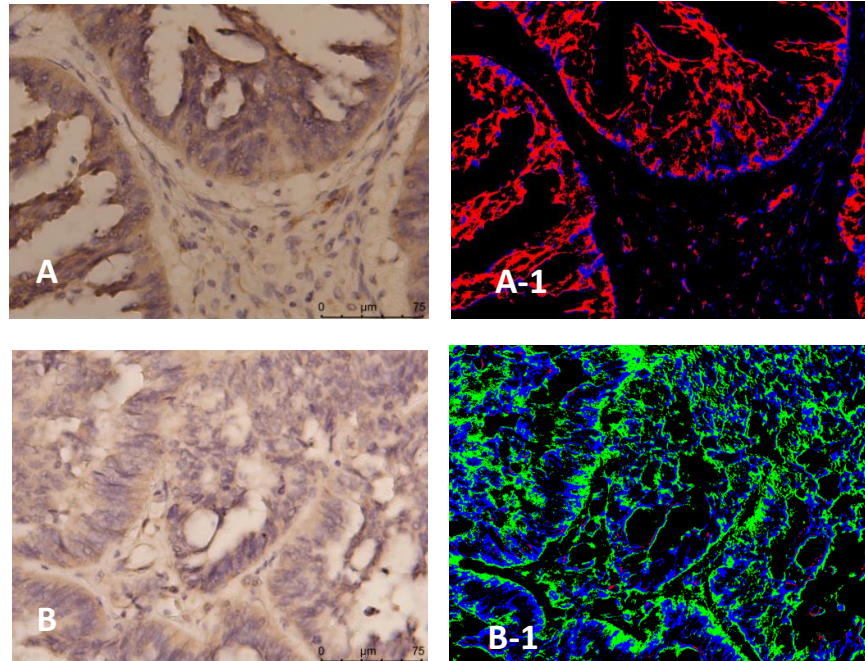
Tümör hücrelerinde apelin immünreaktivitesi, sitoplazmada ve hücre apikalinde (Şekil 20, 21), APJ immünreaktivitesi ise hücre membranında hafiften güçlüye değişen şiddette izlendi (Şekil 22, 23). APJ antikoruna G proteini kenetli reseptör olduğu için, membrana sınırlı çizgisel bir boyanmadan çok, hafif bir sitoplazmik alanın da işaretlendiği boyanma gözlemlendi. Her kesitte beş alanda apelin ve APJ immünreaktivitesinin şiddetli, orta ve hafif değerlerinin yoğunlukları pixel değeri şeklinde saptandı. Her vaka için bu değerlerin ortalaması ve yüzde dağılımları



belirlendi. Apelin ve APJ immünreaktivitesine ait pixel değerleri apelin için Tablo 8, 9 ve APJ için Tablo 10, 11’da verilmiştir.



**Şekil 20.** Tümör hücrelerinde sitoplazmik apelin immünreaktivitesi izlendi. Lenf nodu tutulumu olan grupta A, A-1) şiddetli B, B-1) hafif şiddette apelin immünreaktivitesi izlenmektedir. (A,B: İndirekt immünperoksidaz x400)



**Şekil 21.** Tümör hücrelerinde sitoplazmik apelin immünreaktivitesi izlendi. Lenf nodu tutulumu olmayan grupta A, A-1) şiddetli B, B-1) hafif- orta şiddette apelin immünreaktivitesi izlenmektedir. (A,B: İndirekt immünperoksidaz x400)

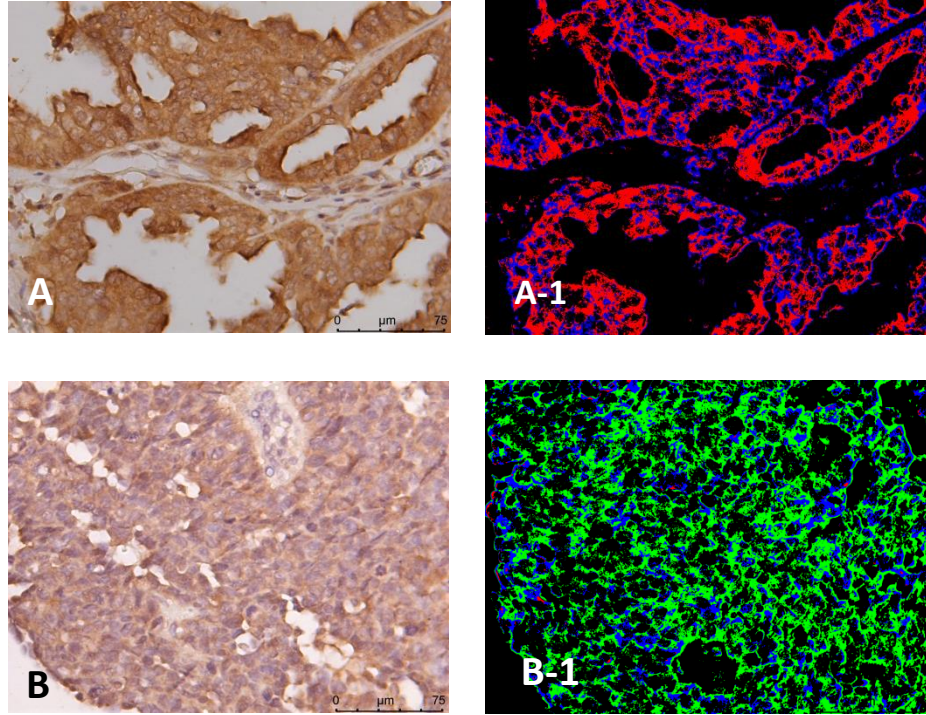
**Tablo 8.** Lenf nodu tutulumu olan grupta MATLAB analizi ile belirlenen apelin immünreaktivitesi pixel değerleri ve toplam apelin ifadesi içindeki şiddetli, orta ve hafif immünreaktivite yüzde dağılımları

LN+	Apelin İmmünreaktivitesi Pixel Değerleri				% Apelin İmmünreaktivitesi		
	şiddetli	orta	hafif	toplam	% şiddetli	% orta	% hafif
1	120164,4	819944,8	24420,6	964529,8	0,124583	0,850098	0,02531866
2	343056,8	578871,2	2912,8	924840,8	0,370936	0,625914	0,00314952
3	569601,4	412139,4	5739,6	987480,4	0,576823	0,417365	0,00581237
4	149750,4	844090,2	10551	1004392	0,149096	0,8404	0,01050487
5	63237	583483,6	82160,4	728881	0,086759	0,80052	0,11272128
6	626647,4	371293,6	233,2	998174,2	0,627794	0,371973	0,00023363
7	174798,2	458627,2	23822,4	657247,8	0,265955	0,6978	0,03624569
8	268293,2	383474,4	23918,6	675686,2	0,397068	0,567533	0,03539898
9	234812,6	386110,6	12391,4	633314,6	0,370768	0,609666	0,01956595
10	238387,2	599302	80736	918425,2	0,259561	0,652532	0,087907
11	201510,6	642713,6	14678,6	858902,8	0,234614	0,748296	0,01708994
12	38216,6	590196	101047,2	729459,8	0,05239	0,809086	0,13852333
13	56289,4	772772	40869,2	869930,6	0,064706	0,888315	0,04697984
14	754969,4	160481,8	86	915537,2	0,824619	0,175287	0,00009393
15	949492,4	207758	70	1157320	0,820423	0,179516	0,00006048

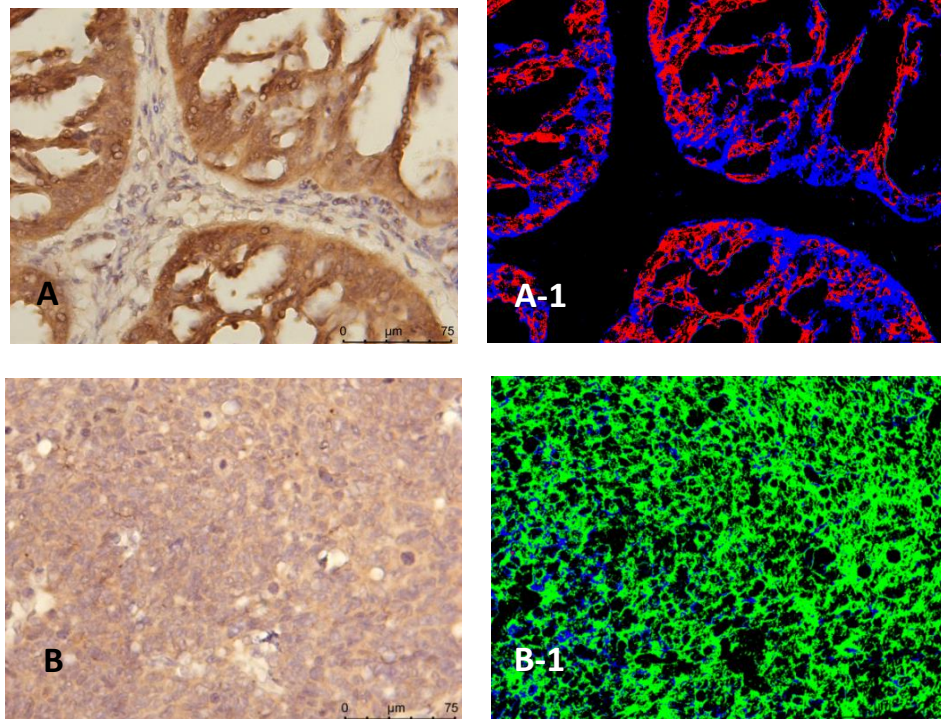
**Tablo 9.** Lenf nodu tutulumu olmayan grupta MATLAB analizi ile belirlenen apelin immünreaktivitesi pixel değerleri ve toplam apelin ifadesi içindeki şiddetli, orta ve hafif immünreaktivite yüzde dağılımları

LN -	Apelin İmmünreaktivitesi Pixel Değerleri				% Apelin İmmünreaktivitesi		
	şiddetli	orta	hafif	toplam pixel	şiddetli oran	orta şiddet	hafif şiddet
1	323965,8	1001336	9660	1334962	0,242678	0,750086	0,00723616
2	13117,8	541160,6	410366	964644,4	0,013599	0,560995	0,4254065
3	37386	349350,2	157301	544037,2	0,06872	0,642144	0,28913648
4	278532	407372	11531,2	697435,2	0,399366	0,5841	0,01653372
5	182006,2	423398,2	8469,6	613874	0,296488	0,689715	0,01379697
6	372251,4	537199,4	10753,4	920204,2	0,404531	0,583783	0,01168588
7	176206,2	882376	7641,4	1066224	0,165262	0,827571	0,00716679
8	295642,2	97456,4	873	393971,6	0,750415	0,247369	0,0022159
9	196673,4	513753	5651,8	716078,2	0,274654	0,717454	0,00789271
10	457223,6	272021,2	1514,8	730759,6	0,625683	0,372244	0,00207291
11	516044,2	399159,6	429,4	915633,2	0,563593	0,435938	0,00046897
12	58473	616732,4	28742,8	703948,2	0,083064	0,876105	0,04083085
13	222584,6	630681	1509,4	854775	0,260401	0,737833	0,00176584
14	436642,8	429575,8	1383,4	867602	0,503275	0,49513	0,00159451
15	496821,2	520922,8	1429,4	1019173	0,487475	0,511123	0,00140251





**Şekil 22.** Tümör hücrelerinde pozitif APJ immünreaktivitesi izlendi. Lenf nodu tutulumu olan grupta A, A-1) Şiddetli B, B-1) Hafif şiddette APJ immünreaktivitesi izlenmektedir. (A,B: İndirekt immünperoksidaz x400)



**Şekil 23.** Tümör hücrelerinde pozitif APJ immünreaktivitesi izlendi. Lenf nodu tutulumu olmayan grupta A, A-1) şiddetli B, B-1) hafif şiddette APJ immünreaktivitesi izlenmektedir (A,B: İndirekt immünperoksidaz x400)

**Tablo 10.** Lenf nodu tutulumu olan grupta MATLAB analizi ile belirlenen APJ immünreaktivitesi pixel değerleri ve toplam APJ ifadesi içindeki şiddetli, orta ve hafif immünreaktivite yüzde dağılımları

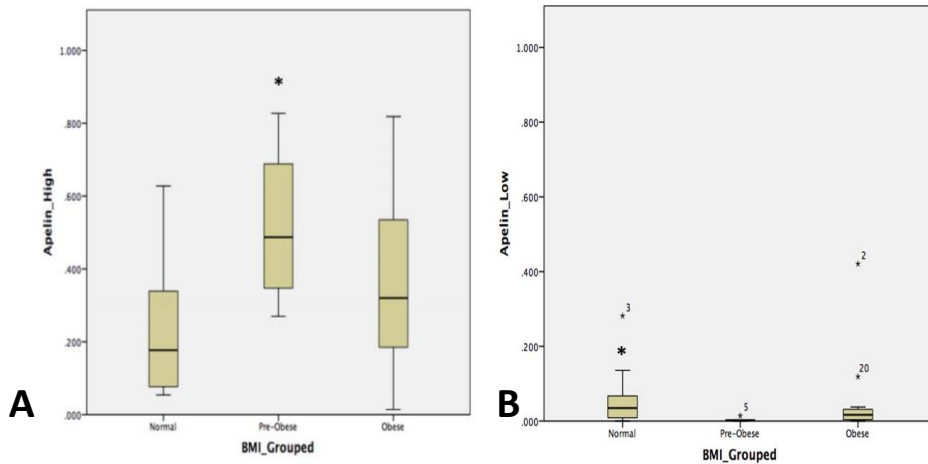
LN +	APJ İmmunreaktivitesi Pixel Değerleri				% APJ İmmunreaktivitesi		
	şiddetli	orta	hafif	toplam	%şiddetli	%orta	%hafif
1	628473,4	381783,8	7590,6	1017848	0,617453	0,375089	0,0074575
2	698050,4	238744	392,4	937186,8	0,744836	0,254745	0,0004187
3	79076,2	765211,2	267705	1111992	0,071112	0,688144	0,24074355
4	459388,2	821812	1635,8	1282836	0,358104	0,640621	0,00127514
5	631955	384509,8	494,8	1016960	0,621416	0,378097	0,00048655
6	9051,6	457616	678143,2	1144811	0,007907	0,399731	0,59236269
7	90852,6	509653,2	48298	648803,8	0,140031	0,785527	0,07444161
8	238098	732873,4	4092	975063,4	0,244187	0,751616	0,00419665
9	95519	599730,6	92122,2	787371,8	0,121314	0,761687	0,11699962
10	34029,8	681579,6	263924,6	979534	0,034741	0,69582	0,26943894
11	267,4	276030,4	1440756	1717054	0,000156	0,160758	0,83908615
12	126172,2	626266,4	206187,6	958626,2	0,131618	0,653296	0,21508655
13	715572,8	112281,8	239	828093,6	0,864121	0,135591	0,00028861
14	174815,8	1046996	159585,6	1381398	0,12655	0,757925	0,11552474
15	15205,6	1221776	283188,6	1520171	0,010003	0,80371	0,18628738

**Tablo 11.** Lenf nodu tutulumu olmayan grupta MATLAB analizi ile belirlenen APJ immünreaktivitesi pixel değerleri ve toplam APJ ifadesi içindeki şiddetli, orta ve hafif immünreaktivite yüzde dağılımları

LN -	APJ İmmunreaktivitesi Pixel Değerleri				% APJ İmmunreaktivitesi		
	şiddetli	orta	hafif	toplam	%şiddetli	%orta	%hafif
1	284230,4	683055,8	11173	978459,2	0,290488	0,698093	0,01141897
2	37680,8	655294,6	153436,4	846411,8	0,044518	0,774203	0,18127866
3	77608,6	447335,8	50464,4	575408,8	0,134876	0,777423	0,08770182
4	10924,6	396551,4	595634	1003110	0,010891	0,395322	0,59378732
5	142847,2	787206,6	194807	1124861	0,126991	0,699826	0,17318321
6	55987,8	750736	186769,8	993493,6	0,056354	0,755653	0,18799296
7	102916	716852,4	139259	959027,4	0,107313	0,747479	0,14520857
8	301804,8	398146,8	10244,6	710196,2	0,42496	0,560615	0,01442503
9	13051	678862,2	259423,8	951337	0,013719	0,713588	0,2726939
10	279684	601360,6	51291	932335,6	0,299982	0,645004	0,05501345
11	4082,6	255140,2	1043874	1303097	0,003133	0,195795	0,80107178
12	1191,4	230285,6	1186041	1417518	0,00084	0,162457	0,8367026
13	18256,6	543813,8	499581,8	1061652	0,017196	0,512233	0,47057012
14	273332,2	539208,6	27132,8	839673,6	0,325522	0,642165	0,03231351
15	224813,6	741669	108721,8	1075204	0,209089	0,689793	0,10111733

#### 4.4.2. İmmünreaktivitenin Obezite ile Değerlendirilmesi

Tümör hücrelerindeki apelin ve APJ immünoreaktivitesi obezite durumu ile karşılaştırıldı. Obez ve preobez olan hastalarda, tümör hücrelerinden apelin immünreaktivitesi vücut kitle indeksi normal olan hastalardan daha şiddetli olarak saptandı (Grafik 7A). Gruplar arasındaki apelinin şiddetli immünreaktivitesi arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). Benzer şekilde analiz sonuçlarına göre vücut kitle indeksi normal olanlarda tümörden apelin immünreaktivitesi hafif şiddette olarak bulundu (Grafik 7B). Apelinin hafif immünreaktivitesinin vücut kitle indeksi normal onlardaki yüzde dağılımlarının daha fazla olması ilk bulguyu destekler şekilde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). Analiz edilen kesitlerde obezite durumu ile tümör hücrelerindeki APJ reseptörü immünreaktivitesi arasında anlamlı ilişki saptanmadı.



**Grafik 7.** MATLAB analiz sonuçlarına göre obezite ile tümör dokusunda apelin immünreaktivite şiddetinin dağılım grafiği. A) Preobez ve obez olanlarda tümörde şiddetli apelin immünreaktivitesi izlendi. B) Vücut kitle indeksi normal olan hastalarda hafif şiddette apelin immünreaktivitesi izlendi. (\*  $P<0.05$ )



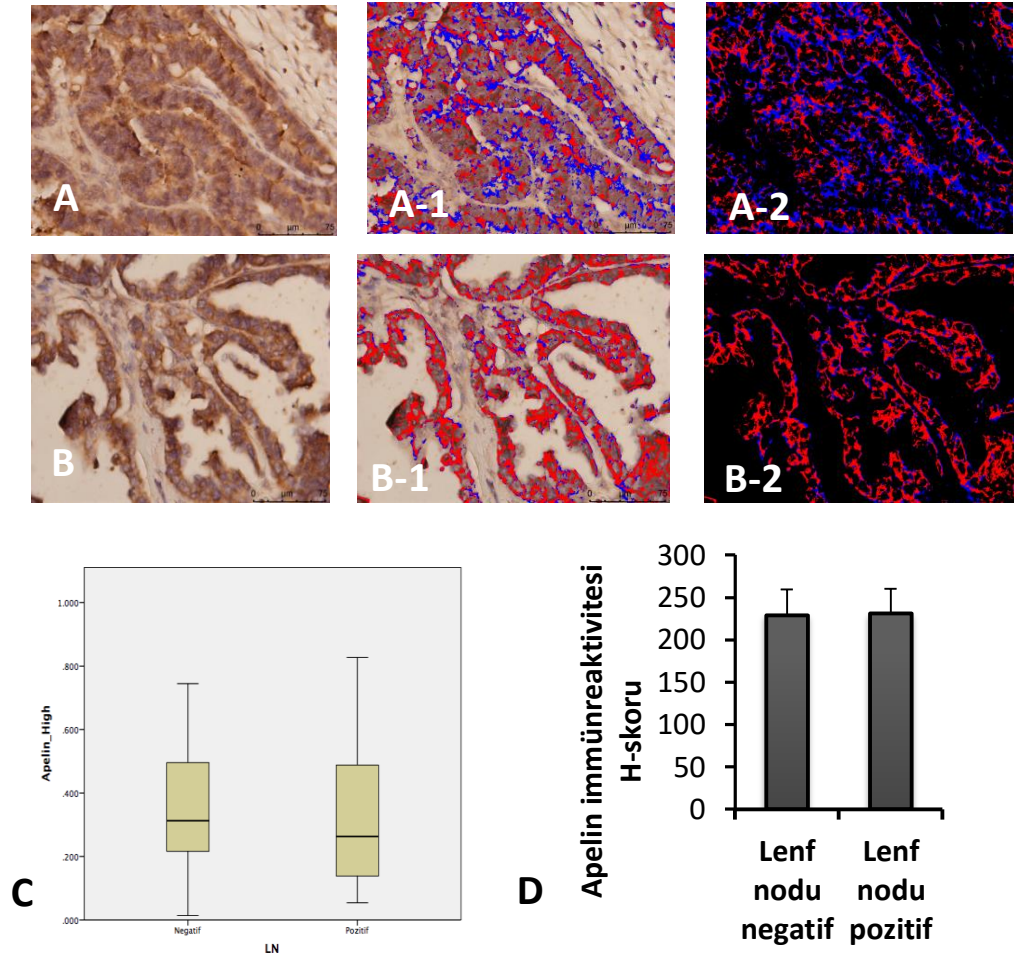
#### 4.4.3. İmmünreaktivitenin Lenf Nodu Tutulumu İle Değerlendirilmesi

Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan grupta apelin ve APJ immünreaktivitesinin hafif, orta, şiddetli işaretlenmesinin yüzde değerlerinin ortalaması Tablo 12’de verilmiştir. Her iki grupta da orta derecede Apelin ve APJ immünreaktivitesi yüzdesi daha fazladır. Lenf nodu tutulumu olan grupta apelinin şiddetli ve orta şiddette immünreaktivite saptanan alanların yüzdeleri arasında sırasıyla %1 ve %2 daha fazla olduğu görüldü. Apelinin hafif immünreaktivite olan alanların yüzdeleri değerlendirildiğinde lenf nodu tutulumu olmayan grupta %2 daha fazla hafif immünreaktivite görüldü. Bu oranlar klinik açıdan anlamlı olabilir ancak yapılan analizde istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı ( $p>0.05$ ).

Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan gruplar arasında farkın belirlenmesi için H skor hesaplanması kullanıldı. Her iki grupta da apelin ve APJ immünreaktivitesi ortadan şiddetliye pozitif reaksiyon göstermektedir. Gruplar arasında istatistiksel fark bulunmadı (Tablo 12) İki grup arasındaki apelin ve APJ immünreaktivite dağılım grafikleri ve H skoru grafikleri Şekil 24 ve Şekil 25’de verilmiştir.

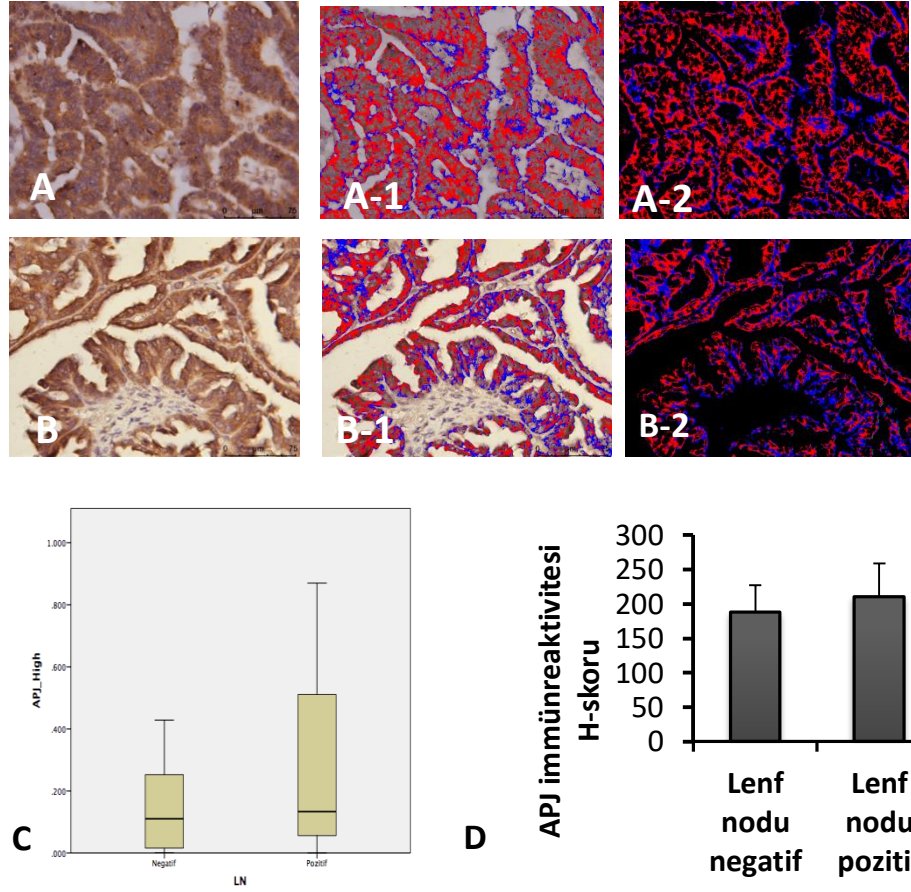
**Tablo 12.** Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan gruplarda apelin ve APJ immünreaktivitesi ortalamaları ve H-skoru değerleri

LN tutulumu		Apelin immünreaktivitesi				APJ immünreaktivitesi			
		Şiddetli	Orta	Hafif	H-skor	Şiddetli	Orta	Hafif	H-skor
Pozitif	Ortalama	,350	,614	,036	<b>231</b>	,278	,546	,176	<b>210</b>
	SS	,259	,233	,044	<b>28,91</b>	,297	,240	,243	<b>48,63</b>
Negatif	Ortalama	,347	,599	,055	<b>229</b>	,141	,597	,262	<b>187</b>
	SS	,215	,170	,124	<b>30,64</b>	,142	,198	,277	<b>39,35</b>



**Şekil 24.** Tümör dokusunda apelin immünreaktivitesi A- A-2) Lenf nodu tutulumu olan B- B-2) Lenf nodu tutulumu olmayan gruplarda şiddetli ve orta şiddette apelin immünreaktivitesi (A-D:İndirekt immünperoksidaz x400), C) Şiddetli apelin immünreaktivitesi yüzdelerinin gruplar arası dağılım grafiği D) Apelin immünreaktivitesi için gruplarda H skoru grafiği

APJ reseptörü immünreaktivitesinin şiddeti değerlendirildiğinde, lenf nodu tutulumu olan grupta şiddetli alanın yüzdesi ortalama olarak diğer gruptan %13 daha yüksek saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı ( $p>0.05$ ).



**Şekil 25.** Tümör dokusunda APJ immünreaktivitesi Lenf nodu tutulumu olan (A- A-2) ve olmayan (B- B-2) gruplarda APJ immünreaktivitesi şiddetli (A-D:İndirekt immünperoksidaz x400), C) Şiddetli APJ immünreaktivitesi yüzdelерinin gruplar arası dağılım grafiği D) APJ immünreaktivitesi için gruplarda H skoru grafiği

## 5. TARTIŞMA

Ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanserler yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde over kanseri reproduktif dönemdeki kadınlarda daha fazla gözlenmektedir (8). Bu değerlendirme epitelyal kanserlerin yanında diğer over kanser tiplerini de kapsamaktadır. Epitelyal over kanseri alt tiplerinin evrelere göre dağılımı ve görülme sıklıkları açısından karşılaştırıldıklarında yüksek dereceli over seröz karsinomları diğer over epitel kanserlerine göre daha sık görülmekte ve evre III, IV'de karşımıza çıkmaktadır (20). Bu nedenle çalışmamıza dahil edilen hasta gruplarında, omentum ve/veya uzak organ metastazı bulunması ile ileri evre seröz karsinomu hedeflenmiştir. Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan gruplarda tanı anında ortalama yaşın reproduktif dönemden sonraki dönemde olduğu ve lenf nodu tutulumu olan grupta hastaların ortalama 6 yaş daha erken over kanseri tanısı aldığı saptandı. Ülkemizde over tümörlerinin dağılımlarının yaş gruplarına göre değerlendirilmesinde overin germ hücre tümörleri gibi erken dönemde gözlenen diğer over tümörleri de bulunmakta ve dağılım sıklığını reproduktif döneme taşımaktadır. Çalışmamızda sadece seröz karsinom vakalarının bulunması nedeniyle hastaların reproduktif dönemden sonraki dönemde tanı aldığı görüldü. Lenf nodu tutulumu olan grupta hastaların daha erken tanı alması hastalığın daha hızlı ilerlediğini ve daha hızlı bulgu verdiğini düşündürmektedir. Çalışmamızda yer alan hastalarda patoloji kayıtlarından elde edilen bilgiye göre omentum tutulumu yanında sıklıkla kolon, apendiks, ince barsak serozası, uterus serozası tutulumu tanı anında mevcuttur. Bazılarında karaciğer, perikard tutulumu gibi uzak organ metastazları mevcuttur. Her iki grupta da omentum ve/veya uzak metastazı olmasına rağmen lenf nodu tutulumu olanların daha erken yaşta tanı alması, bu grupta tümörün daha erken semptomatik hale geldiğini düşündürmektedir. Ancak hastalığın semptomatik hale gelmesi, karın ağrısı, erken doyma hissi, karında şişlik gibi semptomlar uzak organ tutulumu, asit gelişimi veya başka birçok faktöre bağlı olabilmektedir.

Çalışmamızda Patoloji A.D tarafından raporlanan son iki yıl içinde HGSC tanısı almış vakalar kullanıldı ve operasyon öncesi kemoterapi almış hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Seröz over karsinomu olan vakaların tümör dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde genel olarak yoğun bir stroma ile ilişkili papiller uzantılar oluşturan seröz karsinom özelliğinde izlendi. Nükleer atipi, atipik mitozlar, sık mitotik figürler, bizaar dev nükleuslar, psammom cisimcikleri- kalsifikasyon alanları gibi karakteristik özellikleri gözlemlendi. Epitelyal tümörlerde, epitelyal komponentin bu histopatolojik özellikleri yanında bütün patoloji epitelyal kompartmanla sınırlı değildir. Uzun yıllar stromal kompartmandaki patoloji göz ardı edilmiş, ancak yapılan çalışmalarla bazı tümörlerde desmoplastik yapıda görülebilen yeni yapılanmış stromada bulunan hücrelerin patogenezdaki etkileri saptanmıştır (22). Kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF) ve polarize olmuş tümörle ilişkili makrofajlardan (TAM) salınan büyüme faktörleri ile sitokinler tümör hücrelerinin çoğalmasına neden olurken, salgıladıkları proanjiyojenik moleküllerle damar oluşumunu artırarak ve yüksek proliferasyon hızına sahip tümörler içinde hipoksik ortam oluşumunu engelleyerek tümör hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunmaktadır. Tümör hücreleri ve stromada bulunan immün yanıt hücrelerinin etkileşimleri ile anormal ECM üretimi hastalığın prognozunu etkileyebilir. Meme kanseri olgularında stromal kompartmandan zengin olanlarda sağ kalım oranlarının düşük olduğunu ve rekürrens oranlarının yüksek olduğunu saptanmıştır (25). Özefagus squamöz hücreli karsinomlarında stromal kompartmandan zengin olanlarda sağ kalım oranları daha düşüktür (26). Özefagus kanserinde stromadan zengin olan vakalarda lenf nodu tutulumu ile ilişki saptamazken (26), Chen ve arkadaşları epitelyal over kanserinde stromal kompartmandan zengin olanlarda rekürrens ve lenf nodu metastazı arasında ilişki saptamıştır (24). Biz de çalışmamızda tümör/stroma oranı değerlendirdiğimizde stromadan zengin olan grupta daha fazla lenf nodu tutulumu (% 63,2) meydana geldiğini ve bu farkın klinik açıdan anlamlı olduğunu saptadık ( $p=0,058$ ). Bununla birlikte stromadan zengin olan grupta sağ kalım oranlarının düşük olduğunu gözlemledik. Bu veriler birlikte değerlendirildiğinde epitelyal tümörlerde patogenezin ve hastalığın seyrinin sadece epitelyal kompartmanla sınırlı

olmadığını, stromal kompartmanın da prognoz ve tümörün davranışı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Obezite, kadınlarda gözlenen kanserlerde önemli risk faktörlerinden birisidir. Çalışmamızda yer alan toplam 30 hastanın 19'u normal vücut kitle indeksi üzerinde olduğu saptandı. Lenf nodu tutulumu ile obezite birlikte değerlendirildiğinde gruplar arasında obezite açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. Bunun sebebi örneklem genişliğimizin az olması, örneklem gruplarında daha önceden var olan obezitenin kanser geliştikten sonra tanı aldıkları süreye kadar kilo kaybı nedeniyle tesbit edilememesi olabilir. Kanser hastaları içinde BMI yüksek olanlarda tedavi sürecinde rekürrens oranlarının daha yüksek ve prognozun kötü olduğu bildirilmiştir (54). Ancak çalışmamızda süre kısıtlılığı nedeniyle rekürrens değerlendirilmemiş, sağ kalım oranları yorumlanmıştır.

Vücut kitle indeksi verileri ve sağ kalım oranları karşılaştırıldığında, obez ve preobezlerde sağ kalım oranları daha düşük saptandı. Preobezlerde sağ kalım %53, obezlerde %35 olarak belirlendi. Obezlerde ölüm oranının daha yüksek olması, eşlik eden kardiyovasküler hastalıklar, metabolik sendrom gibi birçok sistemi etkileyen hastalıkların varlığı ile açıklanabilir. Bununla birlikte obezlerde vücutta geniş yer tutan yağ dokusu ve hipertrofiye uğramış yağ hücrelerinden salınan adipokinler ve sitokinler de mevcut hastalıkların gidişatını etkileyebilir. Obeziteye bağlı eşlik eden hastalıkların mortaliteye olan etkisi yanında yağ dokudan salınan adipokinlerin de direkt olarak tümör yayılımı, hastalığın evresi ve prognoz üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar mevcuttur (85), (86).

Bir adipokin olan apelinin obezitede serum değerlerinde artış daha önceden yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Altınkaya ve arkadaşları endometrium kanserli hastalar arasında obez olanlarda serum apelin düzeylerinin daha yüksek olduğunu saptamıştır (5). Bununla birlikte bazı çalışmalar obez olan kanser hastalarında prognozun daha kötü olduğunu, tümör evresinin, tümör hücre proliferasyonun ve damarlanmasının proanjyogenik bir molekül olan apelinle ilişkili olarak artabileceğini göstermiştir. Feng ve arkadaşları, mide karsinomu vakalarında serum apelin değerlerinden çok tümörden salınan apelinin prognozla daha ilişkili olduğunu

saptamıştır (79). Biz de çalışmamızda obez ve preobez olan hastalarda, tümör hücrelerinde apelin immünreaktivitesinin vücut kitle indeksi normal olan hastalardan daha şiddetli ve preobezlerde istatistiksel olarak anlamlı olduğunu saptadık ( $p<0.05$ ). Obes olan hastalarda gözlenen farkın istatistiksel anlamlı bulunmaması örneklem genişliğine bağlı olabilir. Vücut kitle indeksi normal olanlarda tümörde apelin immünreaktivitesi hafif şiddetteydi. Apelinin hafif immünreaktivitesinin yüzde dağılımı olarak vücut kitle indeksi normal olanlarda daha fazla olması ilk bulguyu destekler şekilde istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0.05$ ). Çalışmamızdaki bu bulgular, daha önceki çalışmalarda obezitede serum değerleri yüksek bulunan apelinin, tümördeki ifadesinin de obeziteye bağlı olarak daha yüksek olabileceğini düşündürmektedir.

Apelin, APJ reseptörü üzerinden otokrin, parakrin ve endokrin etki göstermektedir. Apelin immünreaktivitesinde obez ve preobezlerde gözlenen fark, APJ reseptörünün immünreaktivitesinde saptanmadı. Çalışmamızda preobez ve obezlerde şiddetli apelin immünpozitif tümör alanının yüzde dağılımı artarken, APJ reseptöründe obeziteye göre fark bulunmaması, apelinin seröz karsinom hücrelerinde otokrin etkisinden çok, stromal hücrelerde parakrin etkilerinin değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Literatürde inflamasyonda peritoneal makrofajlarda (66), melanomda lenfatik endotelde (6) APJ reseptörü gösterilmiştir. Çalışmamızda apelin ve APJ immünreaktivitesinin değerlendirmesi tümör hücreleri ile sınırlandırılmıştır. Gelecek çalışmalarda stromada apeline yanıt veren damar endoteli, damar düz kası, tümör mikroçevresinde anjiyogenez ve lenfanjiyogenezde etkili moleküller sentezleyen fibroblast ve makrofajlar gibi bağ doku hücrelerinde APJ reseptörü immünreaktivitesinin değerlendirilmesi daha anlamlı olabilir. Ayrıca over şeffaf hücreli karsinomlarında APJ bağımsız bir yol kullanarak apelinin hücre proliferasyonu ve göçünü artırdığı gösterilmiştir (82). Bu da apelinin over tümörü hücrelerinde farklı reseptörler üzerinden etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ancak apelinin reseptör düzeyinde etkisinin saptanabilmesi için *in vitro* çalışmalar gerekmektedir.

Literatürde apelin immünreaktivitesi yüksek olan tümörlerde, ortalama sağ kalım süresi düşük olduğu ve apelinin tümör diferansiyasyonu, lenf nodu tutulumu ve uzak metastaz üzerinde etkili olduğunu saptanmıştır (77). Çalışmamızda tümör hücrelerinden apelin ve APJ immünreaktivitesi sağ kalım ile birlikte değerlendirildiğinde immünreaktivitenin sağ kalım üzerine etkisi anlamlı bulunmadı. Apelin ve APJ immünreaktivitesinin H skor analizlerinde de her iki grupta da şiddetliye yakın immünreaktivite değerleri saptandı. Örneklem genişliğimiz bu değerlendirmede anlamlı sonuçlara ulaşmamızı engellemiş olabilir. Bununla birlikte çalışmamızda karşılaştırılan her iki grupta da ileri evre seröz karsinom olması, yaygın metastatik hastalık bulunması değerlendirme sonuçlarını etkilemiş olabilir. Apelin, lenfatik damar oluşumunu artırması ve lenfatik metastazdaki rolünün yanında, hücre göçü ve proliferasyonunda da etkili olduğu için her iki grupta da benzer H skor değerleri saptanmış olabilir. Literatürde apelinin lenfatik metastazla direkt ilişkilendirildiği çalışmalarda araştırılan kanser hücreleri melanom ve meme kanseri gibi lenfatik metastazın daha sık görüldüğü kanserlerdir (6), (80). Bu nedenle incelediğimiz vakalarda omentum tutulumu yanında sıklıkla kolon, apendiks, ince barsak serozası, uterus serozası tutulumu, Bazılarında karaciğer, perikard tutulumu gibi uzak organ metastazları olması karmaşık metastaz sürecinde etkili epitelyal mezankimal geçiş gibi basamaklarda apelinin olası etkisi iki grup arasında fark bulmamızı engellemiş olabilir. Apelinin etkilerinin aydınlatılabilmesi için daha çok klinik ve deneysel çalışma gereklidir. Çalışmamızda in vitro hücre kültürü ve knock-out hayvan deneyi kullanılamaması apelin ve lenfatik invazyon nedensellik ilişkisinin kurulamamasına neden olmuştur. Bu çalışmamızdaki önemli bir kısıtlılıktır.

İmmunohistokimyasal değerlendirmede sıklıkla immünreaktivite şiddeti H-skoru adı verilen yöntem ile değerlendirilmektedir. Bu yöntemde, genellikle yoğunluk ve şiddet iki araştırmacı tarafından değerlendirilir. Ancak incelenen kesitlerde beyaz alan yanında bulunan kahverengi yoğunluğu göz yanılması ile olduğundan daha şiddetli, çekirdek gibi daha koyu olan alanlara komşu kahverengi alanlar olduğundan daha hafif immünreaktivite şekilde algılanabilir. Daha objektif bir değerlendirme için çalışmamızda bilgisayar tabanlı görüntü analiz sistemi



kullanılarak elde edilen pixel değerleri üzerinden H-skor analizi yapılmıştır. İmmunreaktivite şiddetinin daha objektif değerlendirilmesi açısından fuzzy C means algoritması ile otomatik olarak 3 değer için (şiddetli, orta ve hafif) kümelenme uygulanmıştır. Literatürde bu yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur, ancak kanser araştırmalarında bu yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar kısıtlı sayıdadır (87), (84), (88), (89).

Çalışmamızda pozlama (*exposure*), ışık yoğunluğu (*intensity*) ve diyafram açıklığı (*aperture*) sabit tutularak görüntüler elde edilmiştir. Buna rağmen tümörün kendi içinde ve vakalar arasında farklı morfolojik özelliklerde karşımıza çıkması bilgisayar tabanlı analiz sisteminde değerlendirme için güçlüklere neden olabilmektedir. Bununla birlikte çekirdeklerdeki atipi, bazaar dev çekirdeklerin varlığı ve mitotik figürlerin sık görülmesi de bu yöntemle kanser hücrelerinin değerlendirilmesinde güçlüğüne neden olmaktadır. Ancak yöntem daha ileri çalışmalarla geliştirildiğinde, kanser araştırmalarında ve doku düzeyinde değerlendirmeler için yararlı ve daha objektif veriler sağlama potansiyeli taşımaktadır.

## 6. SONUÇ

Yüksek dereceli over seröz karsinomlarında yaş, vücut kitle indeksi, sağ kalım oranları gibi demografik veriler yanısıra tümör/stroma oranı, apelin ve APJ immünreaktivitesinin lenf nodu tutulumu ile ilişkisinin araştırıldığı bu çalışmada şu sonuçlar elde edildi:

1. Hasta gruplarında obez ve preobezlerde sağ kalım oranları normal vücut kitle indeksine sahip bireylerle karşılaştırıldığında daha düşük saptandı. Normal vücut kitle indeksine sahip bireylerde sağ kalım %100 iken, preobezlerde sağ kalım %53, obezlerde %35 olarak saptandı. Obezlerde ölüm oranı daha yüksek saptanmasına rağmen örneklem genişliğine göre istatistiksel anlamlı fark bulunmadı.

2. Tümör hücrelerindeki apelin ve APJ immünreaktivitesi obezite durumu ile karşılaştırıldığında obez ve preobez olan hastalarda, tümör hücrelerinde apelin immünreaktivitesi vücut kitle indeksi normal olan hastalardan daha şiddetli olarak saptandı. Benzer şekilde, analiz sonuçlarına göre vücut kitle indeksi normal olanlarda tümörde apelin immünreaktivitesi hafif şiddette olarak bulundu. Obez ve preobez olan hastalarda, seröz karsinom hücrelerinde artmış apelin immünreaktivitesi ilk kez gösterilmiştir.

3. Analiz edilen kesitlerde obezite durumu ile tümör hücrelerindeki APJ reseptörü immünreaktivitesi arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

4. Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan gruplarda apelin ve APJ immünreaktivitesi ortadan şiddetliye pozitif reaksiyon gösterdiği saptandı. Lenf nodu tutulumu olan grupta apelinin şiddetli ve orta şiddette immünreaktivite saptanan alanların yüzdeleri arasında sırasıyla %1 ve %2 daha fazladır. Hafif immünreaktivite olan alanlar lenf nodu tutulumu olmayan grupta %2 daha fazladır. Bu oranlar klinik açıdan anlamlı olabilir ancak yapılan analizde istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

5. Tümör/stroma oranına göre stromadan zengin olan grupta daha fazla lenf nodu tutulumu meydana gelmiştir ve gruplar arasındaki fark klinik açıdan anlamlıdır.

6. Stromadan zengin grupta sağ kalım oranı %42, stromadan fakir grupta ise %75'tir. Stromadan zengin grupta sağ kalım oranında istatistik fark bulunmamıştır. Çalışma süresince ex olan toplam 8 vakadan 7'si stromadan zengin olan grupta yer almaktadır ve sağ kalım oranının stromadan zengin grupta düşük olması klinik açıdan anlamlıdır.

## KAYNAKLAR

- 1 Ölüm Nedeni İstatistikleri. (2017) *Türkiye İstatistik Kurumu* , Sayı: 24572  
<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=24572>
- 2 Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A. (2014) Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64 (1), 9-29.
- 3 Tingulstad, S., Skjeldestad, F.E., Halvorsen, T.B., Jørn Hagen, B. (2003) Survival and prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Obstetrics & Gynecology*, 101 (5), 885-891.
- 4 Zhang, G., Ahmed, N., Riley, C., Oliva, K., Barker, G., Quinn, M. ve diğerleri. (2005) Enhanced expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in epithelial ovarian carcinoma. *British journal of cancer*, 92 (1), 113-119.
- 5 Altinkaya, S.O., Nergiz, S., Küçük, M., Yüksel, H. (2015) Apelin levels are higher in obese patients with endometrial cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 41 (2), 294-300.
- 6 Berta, J., Hoda, M.A., Laszlo, V., Rozsas, A., Garay, T., Torok, S. ve diğerleri. (2014) Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncotarget*, 5 (12), 4426.
- 7 Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M. ve diğerleri. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136 (5).
- 8 Gültekin, M., Boztaş, G. (2014) Türkiye kanser istatistikleri. *Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu*, 43.
- 9 Whittemore, A., Balise, R., Pharoah, P., Dicioccio, R., Oakley-Girvan, I., Ramus, S. ve diğerleri. (2004) Oral contraceptive use and ovarian cancer risk among carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *British journal of cancer*, 91 (11), 1911-1915.
- 10 Fathalla, M.F. (1971) Incessant ovulation—a factor in ovarian neoplasia? *The Lancet*, 298 (7716), 163.
- 11 Fraumeni Jr, J.F., Lloyd, J.W., Smith, E.M., Wagoner, J.K. (1969) Cancer mortality among nuns: role of marital status in etiology of neoplastic disease in women. *Journal of the National Cancer Institute*, 42 (3), 455-468.
- 12 Tone, A.A. (2017) Taking the Tube: From Normal Fallopian Tube Epithelium to Ovarian High-grade Serous Carcinoma. *Clinical obstetrics and gynecology*, 60 (4), 697-710.
- 13 Wooster, R., Neuhausen, S.L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N. ve diğerleri. (1994) Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, 265 (5181), 2088-2091.
- 14 BRCA, S.G. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266, 7.
- 15 Piek, J.M., van Diest, P.J., Zweemer, R.P., Jansen, J.W., Poort-Keesom, R.J., Menko, F.H. ve diğerleri. (2001) Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian

- tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *The Journal of pathology*, 195 (4), 451-456.
- 16 Carcangiu, M.L., Radice, P., Manoukian, S., Spatti, G., Gobbo, M., Pensotti, V. ve diğ erleri. (2004) Atypical epithelial proliferation in fallopian tubes in prophylactic salpingo-oophorectomy specimens from BRCA1 and BRCA2 germline mutation carriers. *International Journal of Gynecological Pathology*, 23 (1), 35-40.
  - 17 Medeiros, F., Muto, M.G., Lee, Y., Elvin, J.A., Callahan, M.J., Feltmate, C. ve diğ erleri. (2006) The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *The American journal of surgical pathology*, 30 (2), 230-236.
  - 18 Perets, R., Drapkin, R. (2016) It's totally tubular... riding the new wave of ovarian cancer research. *Cancer research*, 76 (1), 10-17.
  - 19 Mills, A.M., Longacre, T.A. (2016) Lynch syndrome: female genital tract cancer diagnosis and screening. *Surgical pathology clinics*, 9 (2), 201-214.
  - 20 Köbel, M., Kalloger, S.E., Boyd, N., McKinney, S., Mehl, E., Palmer, C. ve diğ erleri. (2008) Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS medicine*, 5 (12), e232.
  - 21 Ahn, G., Folkins, A.K., McKenney, J.K., Longacre, T.A. (2016) Low-grade Serous Carcinoma of the Ovary: Clinicopathologic Analysis of 52 Invasive Cases and Identification of a Possible Noninvasive Intermediate Lesion. *The American journal of surgical pathology*, 40 (9), 1165-1176.
  - 22 Christofori, G. (2003) Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *The EMBO journal*, 22 (10), 2318-2323.
  - 23 Lu, P., Weaver, V.M., Werb, Z. (2012) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, 196 (4), 395-406.
  - 24 Chen, Y., Zhang, L., Liu, W., Liu, X. (2015) Prognostic significance of the tumor-stroma ratio in epithelial ovarian cancer. *BioMed research international*, 2015.
  - 25 de Kruijf, E.M., van Nes, J.G., van de Velde, C.J., Putter, H., Smit, V.T., Liefers, G.J. ve diğ erleri. (2011) Tumor–stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast cancer research and treatment*, 125 (3), 687-696.
  - 26 Ma, W., Wang, J., Yu, L., Zhang, X., Wang, Z., Tan, B. ve diğ erleri. (2012) Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 7 (9), 1457-1461.
  - 27 Nathanson, S., Shah, R., Rosso, K. (2015). Sentinel lymph node metastases in cancer: causes, detection and their role in disease progression [Bildiri]. *Seminars in cell & developmental biology*.
  - 28 Podgrabinska, S., Skobe, M. (2014) Role of lymphatic vasculature in regional and distant metastases. *Microvascular research*, 95, 46-52.
  - 29 Pereira, E.R., Jones, D., Jung, K., Padera, T.P. (2015). The lymph node microenvironment and its role in the progression of metastatic cancer [Bildiri]. *Seminars in cell & developmental biology*.

- 30 Schmid-Schonbein, G.W. (1990) Microlymphatics and lymph flow. *Physiological reviews*, 70 (4), 987-1028.
- 31 Ruddle, N.H. (2014) Lymphatic vessels and tertiary lymphoid organs. *The Journal of clinical investigation*, 124 (3), 953.
- 32 Stacker, S.A., Williams, S.P., Karnezis, T., Shayan, R., Fox, S.B., Achen, M.G. (2014) Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 14 (3), 159-172.
- 33 Padera, T.P., Kadambi, A., di Tomaso, E., Carreira, C.M., Brown, E.B., Boucher, Y. ve diğerleri. (2002) Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*, 296 (5574), 1883-1886.
- 34 Hoshida, T., Isaka, N., Hagendoorn, J., di Tomaso, E., Chen, Y.-L., Pytowski, B. ve diğerleri. (2006) Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications. *Cancer research*, 66 (16), 8065-8075.
- 35 Karpanen, T., Egeblad, M., Karkkainen, M.J., Kubo, H., Ylä-Herttuala, S., Jäätelä, M. ve diğerleri. (2001) Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer research*, 61 (5), 1786-1790.
- 36 Issa, A., Le, T.X., Shoushtari, A.N., Shields, J.D., Swartz, M.A. (2009) Vascular endothelial growth factor-C and CC chemokine receptor 7 in tumor cell-lymphatic cross-talk promote invasive phenotype. *Cancer research*, 69 (1), 349-357.
- 37 Zheng, W., Aspelund, A., Alitalo, K. (2014) Lymphangiogenic factors, mechanisms, and applications. *The Journal of clinical investigation*, 124 (3), 878.
- 38 Proulx, S.T., Luciani, P., Christiansen, A., Karaman, S., Blum, K.S., Rinderknecht, M. ve diğerleri. (2013) Use of a PEG-conjugated bright near-infrared dye for functional imaging of rerouting of tumor lymphatic drainage after sentinel lymph node metastasis. *Biomaterials*, 34 (21), 5128-5137.
- 39 Kwon, S., Agollah, G.D., Wu, G., Sevick-Muraca, E.M. (2014) Spatio-temporal changes of lymphatic contractility and drainage patterns following lymphadenectomy in mice. *PLoS one*, 9 (8), e106034.
- 40 Harrell, M.I., Iritani, B.M., Ruddell, A. (2007) Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis. *The American journal of pathology*, 170 (2), 774-786.
- 41 Qian, C.-N., Berghuis, B., Tsarfaty, G., Bruch, M., Kort, E.J., Ditlev, J. ve diğerleri. (2006) Preparing the "soil": the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells. *Cancer research*, 66 (21), 10365-10376.
- 42 Leong, S., Peng, M., Zhou, Y.-M., Vaquerano, J.E., Chang, J. (2002) Cytokine profiles of sentinel lymph nodes draining the primary melanoma. *Annals of surgical oncology*, 9 (1), 82-87.
- 43 Alb, M., Sie, C., Adam, C., Chen, S., Becker, J.C., Schrama, D. (2012) Cellular and cytokine-dependent immunosuppressive mechanisms of grm1-transgenic murine melanoma. *Cancer immunology, Immunotherapy*, 61 (12), 2239-2249.

- 44 Kohrt, H.E., Nouri, N., Nowels, K., Johnson, D., Holmes, S., Lee, P.P. (2005) Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS medicine*, 2 (9), e284.
- 45 Zhang, W., Zhang, C., Li, W., Deng, J., Herrmann, A., Priceman, S.J. ve diğerleri. (2015) CD8+ T-cell immunosurveillance constrains lymphoid premetastatic myeloid cell accumulation. *European journal of immunology*, 45 (1), 71-81.
- 46 Samet, A., Gilbey, P., Talmon, Y., Cohen, H. (2001) Vascular transformation of lymph node sinuses. *The Journal of Laryngology & Otology*, 115 (9), 760-762.
- 47 Chovatiya, R., Medzhitov, R. (2014) Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Molecular cell*, 54 (2), 281-288.
- 48 Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., Keshet, E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359 (6398), 843-845.
- 49 Sonveaux, P., Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M.C., Verrax, J., Rabbani, Z.N. ve diğerleri. (2008) Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118 (12), 3930.
- 50 Guillaumond, F., Leca, J., Olivares, O., Lavaut, M.-N., Vidal, N., Berthezène, P. ve diğerleri. (2013) Strengthened glycolysis under hypoxia supports tumor symbiosis and hexosamine biosynthesis in pancreatic adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (10), 3919-3924.
- 51 Das, S., Sarrou, E., Podgrabinska, S., Cassella, M., Mungamuri, S.K., Feirt, N. ve diğerleri. (2013) Tumor cell entry into the lymph node is controlled by CCL1 chemokine expressed by lymph node lymphatic sinuses. *Journal of Experimental Medicine*, jem. 20111627.
- 52 Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E. ve diğerleri. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410 (6824), 50-56.
- 53 Wolin, K.Y., Carson, K., Colditz, G.A. (2010) Obesity and cancer. *The oncologist*, 15 (6), 556-565.
- 54 Jones, D.H., Nestore, M., Henophy, S., Cousin, J., Comtois, A.S. (2014) Increased cardiovascular risk factors in breast cancer survivors identified by routine measurements of body composition, resting heart rate and arterial blood pressure. *SpringerPlus*, 3 (1), 150.
- 55 Booth, A., Magnuson, A., Fouts, J., Foster, M. (2015) Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 21 (1), 57-74.
- 56 Arnold, M., Pandeya, N., Byrnes, G., Renehan, A.G., Stevens, G.A., Ezzati, M. ve diğerleri. (2015) Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study. *The Lancet Oncology*, 16 (1), 36-46.
- 57 Lago, F., Dieguez, C., Gómez-Reino, J., Gualillo, O. (2007) Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nature clinical practice Rheumatology*, 3 (12), 716-724.

- 58 Medhurst, A.D., Jennings, C.A., Robbins, M.J., Davis, R.P., Ellis, C., Winborn, K.Y. ve diğerleri. (2003) Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *Journal of neurochemistry*, 84 (5), 1162-1172.
- 59 Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M.-X. ve diğerleri. (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 251 (2), 471-476.
- 60 Yang, Y., Lv, S.-Y., Ye, W., Zhang, L. (2016) Apelin/APJ system and cancer. *Clinica Chimica Acta*, 457, 112-116.
- 61 O'Dowd, B.F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H.H., Tsui, L.-C., Kennedy, J.L. ve diğerleri. (1993) A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene*, 136 (1), 355-360.
- 62 Ostrom, R.S., Insel, P.A. (2004) The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: Implications for molecular pharmacology. *British journal of pharmacology*, 143 (2), 235-245.
- 63 Pitkin, S.L., Maguire, J.J., Bonner, T.I., Davenport, A.P. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIV. Apelin receptor nomenclature, distribution, pharmacology, and function. *Pharmacological reviews*, 62 (3), 331-342.
- 64 Shimizu, T., Kosaka, N., Murayama, C., Tetsuka, M., Miyamoto, A. (2009) Apelin and APJ receptor expression in granulosa and theca cells during different stages of follicular development in the bovine ovary: Involvement of apoptosis and hormonal regulation. *Animal reproduction science*, 116 (1), 28-37.
- 65 Schilffarth, S., Antoni, B., Schams, D., Meyer, H.H., Berisha, B. (2009) The expression of apelin and its receptor APJ during different physiological stages in the bovine ovary. *Int J Biol Sci*, 5 (4), 344-350.
- 66 Leeper, N.J., Tedesco, M.M., Kojima, Y., Schultz, G.M., Kundu, R.K., Ashley, E.A. ve diğerleri. (2009) Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 296 (5), H1329-H1335.
- 67 Rak, A., Drwal, E., Rame, C., Knapczyk-Stwora, K., Słomczyńska, M., Dupont, J. ve diğerleri. (2017) Expression of apelin and apelin receptor (APJ) in porcine ovarian follicles and in vitro effect of apelin on steroidogenesis and proliferation through APJ activation and different signaling pathways. *Theriogenology*, 96, 126-135.
- 68 Roche, J., Ramé, C., Reverchon, M., Mellouk, N., Cornuau, M., Guerif, F. ve diğerleri. (2016) Apelin (APLN) and Apelin Receptor (APLNR) in Human Ovary: Expression, Signaling, and Regulation of Steroidogenesis in Primary Human Luteinized Granulosa Cells 1. *Biology of Reproduction*, 95 (5), Article 104, 101-112.
- 69 Kasai, A., Shintani, N., Oda, M., Kakuda, M., Hashimoto, H., Matsuda, T. ve diğerleri. (2004) Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 325 (2), 395-400.
- 70 Kälén, R.E., Kretz, M.P., Meyer, A.M., Kispert, A., Heppner, F.L., Brändli, A.W. (2007) Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Developmental biology*, 305 (2), 599-614.



- 71 Masri, B., Morin, N., Cornu, M., Knibiehler, B., Audigier, Y. (2004) Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *The FASEB journal*, 18 (15), 1909-1911.
- 72 Cox, C.M., D'Agostino, S.L., Miller, M.K., Heimark, R.L., Krieg, P.A. (2006) Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Developmental biology*, 296 (1), 177-189.
- 73 Inui, M., Fukui, A., Ito, Y., Asashima, M. (2006) Xapelin and Xmsr are required for cardiovascular development in *Xenopus laevis*. *Developmental biology*, 298 (1), 188-200.
- 74 Kidoya, H., Kunii, N., Naito, H., Muramatsu, F., Okamoto, Y., Nakayama, T. ve diğerleri. (2012) The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene*, 31 (27), 3254-3264.
- 75 Principe, A., Melgar-Lesmes, P., Fernández-Varo, G., del Arbol, L.R., Ros, J., Morales-Ruiz, M. ve diğerleri. (2008) The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease. *Hepatology*, 48 (4), 1193-1201.
- 76 Tiani, C., Garcia-Pras, E., Mejias, M., De Gottardi, A., Berzigotti, A., Bosch, J. ve diğerleri. (2009) Apelin signaling modulates splanchnic angiogenesis and portosystemic collateral vessel formation in rats with portal hypertension. *Journal of hepatology*, 50 (2), 296-305.
- 77 Eyries, M., Siegfried, G., Ciumas, M., Montagne, K., Agrapart, M., Lebrin, F. ve diğerleri. (2008) Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circulation research*, 103 (4), 432-440.
- 78 Sorli, S.C., Le Gonidec, S., Knibiehler, B., Audigier, Y. (2007) Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene*, 26 (55), 7692-7699.
- 79 Feng, M., Yao, G., Yu, H., Qing, Y., Wang, K. (2016) Tumor apelin, not serum apelin, is associated with the clinical features and prognosis of gastric cancer. *BMC cancer*, 16 (1), 794.
- 80 Peng, X., Li, F., Wang, P., Jia, S., Sun, L., Huo, H. (2015) Apelin-13 induces MCF-7 cell proliferation and invasion via phosphorylation of ERK1/2. *International journal of molecular medicine*, 36 (3), 733-738.
- 81 Picault, F.-X., Chaves-Almagro, C., Projetti, F., Prats, H., Masri, B., Audigier, Y. (2014) Tumour co-expression of apelin and its receptor is the basis of an autocrine loop involved in the growth of colon adenocarcinomas. *European Journal of Cancer*, 50 (3), 663-674.
- 82 Yi, Y., Tsai, S.-H., Cheng, J.-C., Wang, E.Y., Anglesio, M.S., Cochrane, D.R. ve diğerleri. (2017) APELA promotes tumour growth and cell migration in ovarian cancer in a p53-dependent manner. *Gynecologic oncology*, 147 (3), 663-671.
- 83 Park, S.-H., Kim, K.-Y., An, B.-S., Choi, J.-H., Jeung, E.-B., Leung, P.C. ve diğerleri. (2009) Cell growth of ovarian cancer cells is stimulated by xenoestrogens through an estrogen-dependent pathway, but their stimulation of cell growth appears not to be involved in the activation of the mitogen-activated protein kinases ERK-1 and p38. *Journal of Reproduction and Development*, 55 (1), 23-29.

- 84 Zuurbier, L., Rahman, A., Cordes, M., Scheick, J., Wong, T.J., Rustenburg, F. ve diğeri. (2017) Apelin: A putative novel predictive biomarker for bevacizumab response in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8 (26), 42949.
- 85 Koda, M., Sulkowska, M., Kanczuga-Koda, L., Surmacz, E., Sulkowski, S. (2007) Overexpression of the obesity hormone leptin in human colorectal cancer. *Journal of clinical pathology*, 60 (8), 902-906.
- 86 Fazeli, M.S., Dashti, H., Akbarzadeh, S., Assadi, M., Aminian, A., Keramati, M.R. ve diğeri. (2013) Circulating levels of novel adipocytokines in patients with colorectal cancer. *Cytokine*, 62 (1), 81-85.
- 87 Wang, X.Y., Garibaldi, J., Ozen, T. (2003). Application of the fuzzy C-means clustering method on the analysis of non pre-processed FTIR data for cancer diagnosis [Bildiri]. Internat. Conf. on Australian and New Zealand Intelligent Information Systems (ANZIIS).
- 88 Sundstrom, A., Grabocka, E., Bar-Sagi, D., Mishra, B. (2016) Histological image processing features induce a quantitative characterization of chronic tumor hypoxia. *PloS one*, 11 (4), e0153623.
- 89 Petushi, S., Garcia, F.U., Haber, M.M., Katsinis, C., Tozeren, A. (2006) Large-scale computations on histology images reveal grade-differentiating parameters for breast cancer. *BMC medical imaging*, 6 (1), 14.

## EKLER

## Ek 1. Etik Kurul



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -1638

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 10 EKİM 2017 SALI  
**Toplantı No** : 2017/22  
**Proje No** : GO 16/508(3 ncü Onay Tarihi : 29.03.2017)  
**Karar No** : GO 16/508- 19

Kurulumuzun 26 Temmuz 2016 tarihinde GO 16/508 kayıt numarası ile Etik Kurul onayı alan Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Ali Celalettin Sinan YÜRÜKER' in sorumlu araştırmacı olduğu, "**Yüksek Dereceli Over Seröz Karsinomlarında Lenf Nodu Tutulumu Olan ve Olmayan Olgularda Matriks Metalloproteinaz, Apelin/APJ Reseptörü ve Tümör İlişkili Makrofaj Doku Dağılımlarının Araştırılması**" başlıklı projeniz için vermiş olduğunuz 27.09.2017 tarihli araştırmacı eklenmesi, araştırmacı revizyonu ve başlık değişikliği dilekçeniz, Kurulumuzun 10.10.2017 tarihli toplantısında değerlendirilmiş olup araştırmaya Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Naciye Dilara ZEYBEK' in sorumlu araştırmacı olarak dahil edilmesi **uygun bulunmuştur**. Araştırma ekibi Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Naciye Dilara ZEYBEK' in sorumlu araştırmacı olduğu Doç. Dr. Celalettin Sinan YÜRÜKER, Prof. Dr. Alp USUBÜTÜN, Doç. Dr. Nejat ÖZGÜL, Uzm. Dr. Gökhan BOYRAZ, , Arş. Gör. Dr. G. Elif Taşar KAPAKLI ve Arş. Gör. Dinçer GÖKSÜLÜK ile birlikte çalışacakları, Arş. Gör. Dr. Işık ÜNAL' in uzmanlık tezi olan ve "**Yüksek Dereceli Over Seröz Karsinomlarında Lenf Nodu Tutulumu Olan ve Olmayan Olgularda Apelin ve APJ Reseptörü Doku Dağılımlarının Araştırılması**" olarak değiştirilmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir.

- |  |  |
|--|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan)            | 10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)          |
| 2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Üye)          | 11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye)              |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldıran SARA (Üye)            | 12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)                |
| 4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)               | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)            |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU İZİNLİ (Üye) | 14. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)               |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye)             | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖZ (Üye)     |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)             | 16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye)             |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye)           | 17. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN İZİNLİ (Üye) |
| 9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye)         | 18. Av. Meltem ONURLU (Üye)                    |