

(The Turkish Journal of Pathology)

KOLOREKTAL KARSİNOMLARDA İNVAZYON DERİNLİĞİNİN NEOVASKÜLARİZASYON, PERİTÜMÖRAL NK HÜCRESESİ, MAKROFAJ VE EOZİNOFİL LÖKOSİTLERLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Canten Tataroğlu*, Dr. Ayşe Polat**, Dr. Aydanur Kargı***, Dr. Selma Şengiz****, Dr. Handan Çamdeviren*****, Dr. Ali Küpelioglu***

ÖZET: Kolorektal kanserler gelişmiş ülkelerde en sık görülen malignitelere biridir. Anjiyogenez, tümör büyümesi ve metastazi için gereklidir. Çalışmamızda 75 kolorektal adenokarsinom vakasında, prognostik faktör olan invazyon derinliği ve lenf nodu metastaz durumunun, anjiyogenez ve peritümöral inflammatuar hücreler olan makrofaq, eozinofil lökosit ve NK hücreleri ile ilişkisi araştırıldı. Tümör invazyon derinliği ve lenf nodu metastaz durumu ile anjiyogenez ve peritümöral inflammatuar hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ancak anjiyogenez ile makrofaqlar arasında anlamlı ilişki saptanırken (p=0.009), anjiyogenez ile eozinofil lökosit ve NK hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bunun dışında makrofaq ile NK hücresi arasında (p=0.021), ayrıca NK hücresi ve eozinofil lökositler arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (p=0.027). Bu sonuçlar anjiyogenez ve peritümöral inflammatuar hücrelerin etkileri olduğunu ve peritümöral inflammatuar hücrelerin birbirlerini tetikleyen etkileri olduğunu göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Kolorektal kanser, anjiyogenez, makrofaq, eozinofil lökosit, NK hücreleri

SUMMARY: ASSOCIATION OF MACROPHAGES, EOSINOPHIL LEUKOCYTES AND NK CELLS WITH ANGIOGENESIS AND DEPTH OF INVASION IN COLORECTAL CARCINOMAS. Colorectal carcinoma is one of the most frequently observed malignancy in the developed countries. Angiogenesis is essential for tumor growth and metastasis. The associations between peritumoral inflammatory cells and natural killer cells and angiogenesis to depth of invasion and lymph node metastasis were investigated in 75 colorectal adenocarcinoma specimens. There was not any statistically significant correlation between depth of invasion, lymph node metastasis and microvessel density, peritumoral macrophages, eosinophil leucocytes and naturel killer cells. There was a positive correlation between angiogenesis and peritumoral macrophages (p=0.021). Also natural killer cells and eosinophil leucocytes have a positive correlation (p=0.027). The relation between angiogenesis and eosinophil leucocytes and NK cells was insignificant. These data indicate that peritumoral inflammatory cells may contribute to tumor angiogenesis, and the synergistic effect between peritumoral inflammatory cells.

KEY WORDS: Colorectal carcinoma, angiogenesis, macrophages, eosinophil leucocytes, natural killer cells (NK cells)

GİRİŞ

Kolorektal karsinomlar gelişmiş ülkelerde en sık görülen malignitelere biridir. Sağlık için en önemli faktörlerin, lenf nodu metastaz durumu ve invazyon derinliği olduğu bilinmektedir (1). Bunun dışında prognoza etkisi olabilecek diğer parametreler de günümüzde çok yoğun bir şekilde araştırılmaktadır.

Yeni damar oluşumu olarak tanımlanan neovaskülarizasyon, tümör büyümesi ve metastazi için gereklidir (2,3). Vaskülarize olmadığı takdirde tümör birkaç milimetreden daha fazla büyüyemez. Tümör vaskülaritesi ve prognoz arasındaki ilişki çok sayıda solid tümörde araştırılmıştır. Yeni damar oluşumunda anjiyogenik sitokinler, proteolitik enzimler, migratuar faktörler gibi farklı proteinlerin etkin rol aldığı düşünülmektedir. Bunlar tümör hücreleri dahil endotel hücreleri, fibroblastlar ve tümör komşuluğundaki makrofaqlar tarafından salgılanabilmektedir (4). Tümör çevresindeki makrofaqlar, mononükleer fagositer sisteme dahil hücrelerdir ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), nitrik oksit (NO), hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi sitokinlerle tümör hücresine karşı direkt sitotoksik etki gös-

terebilmektedirler (5, 6). Makrofaqlar ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), TNF- α , anjiyogenin, ürokinaz, fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi anjiyogenez stimüle eden çeşitli faktörler salgılayabilmektedir (7-9). Makrofaqlar tüm bunlara ek olarak IL-12 ve IL-18 gibi sitokinler salgılayarak immün sistemi stimüle edebilmektedir (5,6).

NK hücreleri kemik iliğinden köken alan lenfositler olup, viral ve mikrobiyal enfeksiyonların immün cevabında ve tümör immünitesinde etkileri olan hücrelerdir. NK hücreleri ile makrofaqların, immün cevapta yer yer çakışan etkileri olmaktadır (10). Son yıllarda yapılan, NK hücreleri ile anjiyogenez arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda, NK hücrelerinin anjiyogenik faktörler salgıladığı öne sürülmektedir (11,12).

Eozinofil lökositlerin de özellikle allerjik hastalıklarda, anjiyogenezde rolü olduğunu iddia eden çalışmalar bulunmaktadır (13). Eozinofil lökositlerin anjiyogenez dışında tümör immünitesinde etkileri olduğu, baş-boyun tümörleri, servikal ve rektal tümörleri de içeren bir grup kanser türünde gösterilmiştir (14-16).

* Denizli Devlet Hastanesi Patoloji Bölümü

** Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

*** Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

**** M. Kazım Dinç Kandıra Devlet Hastanesi Patoloji Bölümü

***** Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı

Bu çalışmada amacımız tümör çevresindeki NK hücresi, makrofaj ve eozinofil lökositleri içeren inflamatuvar hücre infiltrasyonunun, kolorektal karsinomlarda bilinen en önemli iki prognostik parametre olan lenf nodu metastazı ve invazyon derinliği ile ilişkisini araştırmaktır. Ayrıca inflamatuvar hücrelerin, kendi aralarındaki ve tümör anjiyogenez ile olan ilişkisi de araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya 1999-2003 yılları arasında kolorektal adenokarsinom tanısı alan, 75 vaka alınmıştır. Tümör invazyonu AJCC sistemine göre yapılmıştır (17). Her vakanın Hematoksilin-eozin (H-E) kesitleri tekrar değerlendirilip tümör-normal mukoza ilişkisini gösteren en iyi kesit ve onun parafin bloğu seçilmiştir. Parafin bloklardan hazırlanan beş mikron kalınlığındaki kesitler, lizinli lamlara alınarak immünohistokimyasal olarak sırasıyla CD31 (Klon: JC/70A, Kod: MS-353, Neomarkers, USA), CD68 (Klon: KP1, Kod: MS-397, Neomarkers, USA) ve CD56 (Klon: 56C05, Kod: MS-1221, Neomarkers, USA) antikorları streptavidin biotin immünperoksidaz yöntemiyle uygulanmıştır.

İmmünreaktivitenin Değerlendirilmesi

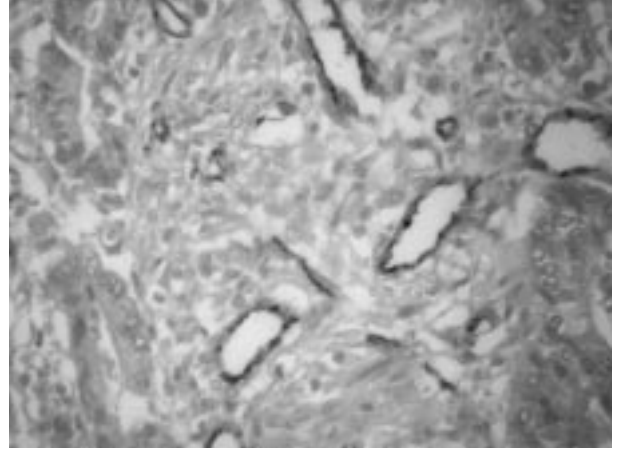
Neovaskülarizasyon için Weidner'in (18) tariflediği "hot spot" yöntemi uygulanmıştır. Peritümöral stromada CD31 ile işaretlenen damarları saptamak için, kesitler önce küçük büyütmede (x40) taranarak damardan yoğun dört alan belirlenmiş, ardından x200 büyütmede bu dört alandaki mikrodamarlar sayılarak ortalama damar yoğunluğu (MVD) hesaplanmıştır (Resim 1). CD68 ile işaretlenmiş makrofajlar, 5 büyük büyütme alanında (BBA) (x400) sayılarak ortalamaları alınmıştır (Resim 2). Aynı şekilde H-E kesitlerde, 5 BBA'da eozinofil lökositler sayılarak ortalamaları alınmıştır. CD56 ile sitoplazmik olarak pozitif boyanan NK hücreleri ise, x200 büyütmede 50 alan sayılarak toplamı alınmıştır (Resim 3). Tüm inflamatuvar hücre sayımları peritümöral stromada yapılmıştır.

İstatiksel Analiz

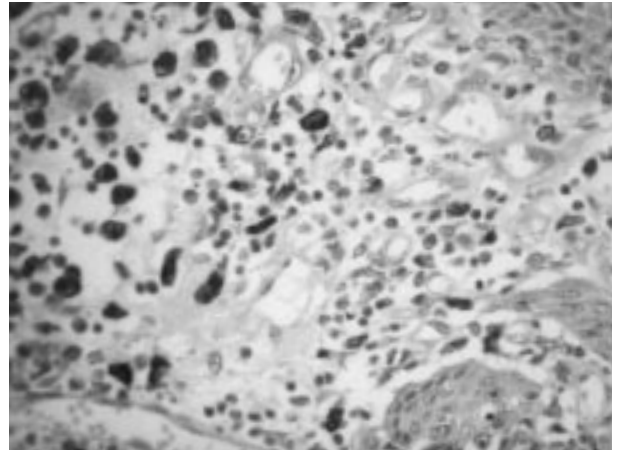
İstatistiksel analizler SPSS (Scientific Package for Social Sciences) programı ile IBM uyumlu bilgisayarda yapıldı. Tüm verilerin tanımlayıcısı ve dağılımsal değerleri alındı. İstatistiksel analizde olgulara ait lezyonların invazyon derinliği, lenf nodu metastaz durumu, neovaskülarizasyon, peritümöral makrofaj, eozinofil lökosit ve NK hücresi infiltrasyonu değerlendirildi. İnvazyon derinliği ile, anjiyogenez ve inflamatuvar hücreler arasındaki ilişkiye bakıldı. Aynı şekilde metastatik lenf nodu varlığı ile anjiyogenez ve inflamatuvar hücreler arasındaki ilişkiye bakıldı. Ayrıca anjiyogenez ve inflamatuvar hücreler arasındaki ilişkiler ve peritümöral inflamatuvar hücrelerin kendi aralarındaki ilişkileri değerlendirildi. Sonuçlar ki-kare ve Pearson korelasyon testi kullanılarak elde edildi. Olasılık katsayısı (p), 0.005'e eşit ya da 0.005'den küçük ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

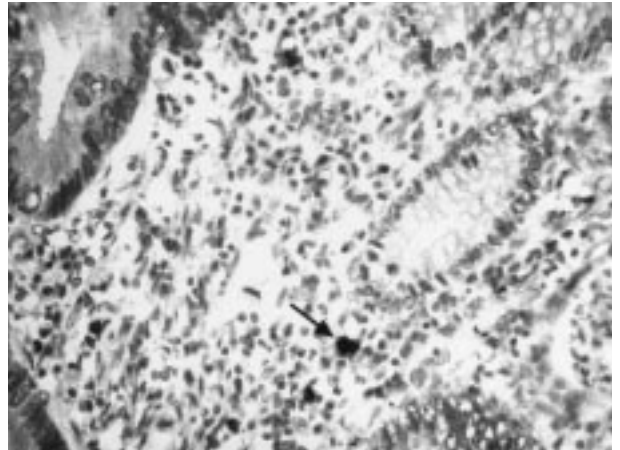
Olguların 48'i (%64) erkek, 27'si (%36) kadındır. Yaş ortalaması 61'dir (26-87). Olguların klinik özellikleri Tablo



Resim 1: Tümör stromasında CD31 ile işaretli mikrodamarlar (x400).



Resim 2: Peritümöral CD68 ile işaretli makrofajlar (x400).



Resim 3: Tümör çevresinde CD56 ile işaretli NK hücreleri (x400).

1'de görülmektedir.

İnvazyon derinliğine göre vakaların 12'si (%16) T2, 50'si (%67) T3 ve 13'ü (%17) T4 tümör olarak gruplandırıldı.

İnvazyon derinliği ile neovaskülarizasyon, eozinofil lökosit, makrofaj ve NK hücresi sayısı arasında istatistiksel

(The Turkish Journal of Pathology)

olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu ölçümlerin invazyon derinliklerine ait tanımlayıcı istatistikleri Tablo II'de verilmiştir. Aynı şekilde lenf nodu metastazı ile neovaskülarizasyon, eozinofil lökosit, makrofaj ve NK hücresi sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak invazyon derinliği ile, metastatik lenf nodu varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0.05$). Buna göre invazyon derinliği bakımından T2 grubunda olanların lenf nodu metastazı, T3 ve T4 grubunda olanlara oranla anlamlı düzeyde daha düşüktür ($p=0.0039$).

Anjiyogenez ve inflamatuvar hücreler arasındaki ilişkiyi değerlendirdiğimizde; neovaskülarizasyon arttıkça peritümöral makrofaj sayısının da anlamlı olarak arttığı gözlenirken ($p=0.009$), neovaskülarizasyon ile eozinofil lökosit arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanamamıştır ($p=0.961$). Buna karşın neovaskülarizasyon arttıkça, NK hücresinin de arttığı gözlenirken aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.067$).

İnflamatuvar hücrelerin kendi aralarındaki ilişkilere bakıldığında; makrofaj sayısı arttıkça NK hücre sayısının arttığı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlenirken ($p=0.021$), eozinofil lökositler ile arasında ilişki saptanamamıştır ($p=0.103$).

NK hücre sayısının artımıyla, eozinofil lökosit sayısının da anlamlı olarak arttığı izlenmiştir ($p=0.027$).

Olgularımızda makrofajlar daha çok anjiyogenezin yoğun olduğu peritümöral alanlarda saptanırken, NK hücrelerinin intratümöral yerleşimleri dikkat çekmiştir.

TARTIŞMA

Biz çalışmamızda kolorektal karsinomlarda, invazyon derinliği ve lenf nodu metastaz durumu ile anjiyogenez arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulmadık. Bu bulgular Nakayama ve arkadaşlarının (19) bulguları ile çelişmektedir. Bu yazarlar, kolorektal karsinomlarda lenf nodu metastazı olan ve daha ileri evre tümörlerde MVD'yi belirgin olarak daha yüksek tespit etmişlerdir. Olgularımızın çoğunun ileri evre olması ve hiç evre 1 olgusunun olmaması bizim çalışmamızda anlamlı ilişki çıkmamasını açıklıyor olabilir.

Anjiyogenez ve tümör çevresindeki inflamatuvar hücrelere bakacak olursak; çalışmamızda tümör anjiyogenez ile tümör çevresindeki makrofaj yoğunluğu arasındaki ilişkiyi anlamlı bulurken, aynı ilişkiyi eozinofil lökositler arasında gösteremedik. Yine NK hücreleri ile anjiyogenez arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamasak da, anjiyogenez arttıkça NK hücre sayısının da arttığını gözlemledik. Makrofajlardan anjiyogenez indükleyen çeşitli sitokinler salınır. TNF- α , VEGF, hipoksiye bağımlı faktör (HIF), FGF ve IL-8 bunlardan bazılarıdır (5-7, 20-23). Aynı zamanda anjiyogenezin inhibe eden trombospodin-1 (TSP-1), transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), IL-1 gibi faktörler de makrofajlar tarafından sentezlenebilmektedir (6). Makrofajlardan salgılanan anjiyogenik faktörlerden biri olan TNF- α 'yı, eozinofil lökositler de içermektedir. Anjiyogenez ile eozinofil lökositler arasında ilişki saptayamamızın nedeni olarak, anjiyogenez indükleyen olayların aslında çok karmaşık olduğu ve ak-

tive-inhibe edici moleküllerin birbirleriyle dengede olması olabileceği düşünülmüştür.

Tümör çevresindeki makrofaj infiltrasyonu bazı tümörlerde anjiyogenez ve prognozla ilişkili bulunurken, bazılarında ilişki saptanamamıştır. Daha önce yaptığımız bir çalışmada, akciğerin küçük hücreli dışı karsinomlarında anjiyogenez ve tümör çevresi makrofajlar arasında anlamlı ilişki saptanamamıştık (24). Leek ile Takanami ve ark. ise (9, 20), meme kanserleri ve pulmoner adenokarsinomlarda peritümöral makrofajların anjiyogenezle ilişkisi olduğunu iddia etmektedir. Nakayama ve ark.'larının (19), kolorektal karsinomlarda tümör çevresi makrofaj infiltrasyonu ile anjiyogenez arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulmadığı halde, yüksek oranda makrofaj infiltrasyonu olan hastaların prognozlarının daha iyi olduğunu saptamıştır. Nakayama ve ark.'larının (19) sonuçları bizim çalışmamızla tamamen çelişmektedir. Çünkü bizim çalışmamızda makrofaj infiltrasyonu ile anjiyogenez arasında anlamlı bir ilişki bulunurken, invazyon derinliği ve lenf nodu metastazı ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır. Bu durum ya kullanılan antikorların farklılığından oluşmaktadır ya da olgularımızın erken evre kolorektal kanserleri içermemesi nedeniyle açıklanabilir.

Eozinofil lökositlerin de birtakım anjiyogenik faktörler içerdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle allerjik hastalıklarda eozinofil lökositlerden eksprese edilen VEGF, bFGF ve anjiyogenin'in, anjiyogenez ile ilişkili olduğu iddia edilmektedir (13, 25). Çalışmamızda eozinofil lö-

TABLO 1: 75 KOLOREKTAL KARSİNOM VAKASININ KLİNİK ÖZELLİKLERİ

Klinik özellikler	Olgu sayısı	Yüzde (%)
Yaş ortalaması	61	-
Cinsiyet (E/K)	48/27	64/36
Yerleşim yeri		
Çıkan kolon	20	26.7
İnen kolon	11	14.6
Sigmoid	23	30.7
Rektum	21	28
Grade		
İyi diferansiye	27	36
Orta derecede diferansiye	27	36
Az diferansiye	21	28
Toplam	75	100

TABLO 2: İNVAZYON DERİNLİKLERİNE GÖRE TANIMLAYICI VERİLER

	T2	T3	T4
Eozinofil	15.2±9.2	12.7±7.5	16.6±10.6
Makrofaj	88.1±30.5	80.6±27.1	64.6±24.7
NK	17.4±21.5	25.8±30	25.2±30.4
MVD	73.7±21.3	67.5±19	64.3±6.1
NK: Doğal öldürücü hücre MVD: Ortalama damar yoğunluğu			

kosit infiltrasyonu ile tümör anjiyogenezi, tümörün invazyon derinliği ve lenf nodu metastazı arasında anlamlı bir ilişki saptamadık. Daha önce kolorektal kansinomlarda eozinofil lökosit infiltrasyonu ile yapılan çalışmalarda, eozinofil lökosit infiltrasyonunun iyi prognostik kriter olduğu iddia edilmiştir (14, 26-29). Ancak malign tümörlerde eozinofil lökosit infiltrasyonu ve anjiyogenez arasındaki ilişkileri araştıran sınırlı sayıda makale vardır.

NK hücreleri kemik iliği kökenli lenfositler olup etkile hücreler ya da tümör hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterebilirler (10). NK hücrelerinin anjiyogenezle ilişkisini araştıran çalışmalarda, NK hücrelerinin VEGF ekspresyonu ederek anjiyogeneze etki ettiği bildirilmektedir (11). Buna karşın Hayakawa ve ark.'ları (30) ise çalışmalarında NK hücrelerinin anjiyogenezi inhibe ettiğini iddia etmektedirler. Çalışmamızda damar yoğunluğu ile NK hücre sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamış olsak da, yüksek mikrodamar yoğunluğu içeren vakalarda NK hücre sayısını daha yüksek olarak gözlemledik. Bu bizim çalışmamızda NK hücrelerinin anjiyogenezi arttırdığı yönünde yorumlanabilir. Ayrıca çalışmamızda NK hücreleri ile invazyon derinliği ve lenf nodu metastaz durumu arasında anlamlı ilişki saptamadık. NK hücreleri, nonspesifik tümör immünitesinde görev almaktadırlar. Ancak NK hücreleri dolaşımdaki lenfositlerin %15'ini oluşturdukları için prognoza bir etkileri olmayabilir. Benzer bir şekilde yapılan bir çalışmada, özofagusun skuamöz hücreli kansinomunda, NK hücrelerinin prognoza etkilerinin olmadığı iddia edilmiştir (31). Halbuki kolorektal kansinomlarda, gastrik kansinomlarda ve akciğerin skuamöz hücreli kansinomunda yapılan çalışmalarda ise, NK hücre infiltrasyonu yoğun olan vakalarda prognoz daha iyi olduğu gösterilmiştir (32-34).

İnflamatuar hücrelerin kendi aralarındaki ilişkilere bakacak olursak, peritümöral makrofaj sayısı arttıkça NK hücrelerinin de arttığını gözlemledik. NK hücrelerinden salgılanan interferon-gama (IFN- γ) makrofajları aktive edebilmektedir (8). Yine Diefenbach ve ark.'nın (10) da gösterdiği gibi tümör hücreleri ya da diğer uyarıcılar NKG2D reseptörü sayesinde NK hücrelerini ve makrofajları aynı anda aktive edebilmektedir. Bizim çalışmamızda da, bu doğrultuda çıkmıştır. Yine çalışmamızda, tümör çevresi NK hücresi ve eozinofil lökosit sayısı arasında pozitif bir korelasyon bulduk. Makrofajlar ve eozinofil lökositler arasında ise anlamlı bir ilişkiye rastlamadık.

Sonuç olarak çalışmamızda, kolorektal kansinomlarda, anjiyogenez ile prognostik parametrelerden invazyon derinliği ve lenf nodu durumu arasında anlamlı bir ilişki bulamadık. Bununla birlikte peritümöral inflamatuvar hücre sayısı ile anjiyogenez arasında pozitif bir korelasyon olduğunu gösterdik. Çalışmamızdaki önemli noktalardan biri de, peritümöral inflamatuvar hücrelerin birbirleriyle olan ilişkileridir. Bu çalışma anjiyogenezin çeşitli aşamalarında peritümöral inflamatuvar hücrelerin birbirini tetikleyen etkileri olduğunu iddia etmektedir. Günümüzde kanser tedavisinde tümör immünitesine yönelik çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Çalışmamızın ileriye yönelik daha ayrıntılı çalışmalara ışık tutabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. The gastrointestinal tract. In: Pathologic Basis of Disease, Kumar V, Abbas Abul K, Fausto N (ed). 7th ed, Philadelphia, Pennsylvania 2005, p 856-866.
2. Wendum D, Boelle VR, Rigau V, Sebbagh N, Olschwang S, Mourra N, et al. Mucinous colon carcinomas with microsatellite instability have a low microvessel density and lower vascular endothelial growth factor expression. *Virchows Arch* 2003; 442: 111-117.
3. Cassano A, Bagala C, Battelli C, Schinzari G, Quirino M, Ratto C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor, mitogen activated protein kinase and p53 in human colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002; 22: 2179-2184.
4. Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JA, Haris AL. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol* 2000; 190: 430-436.
5. Shimura S, Yang G, Ebara S, Wheeler TM, Frolov A, Thompson TC. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. *Cancer Res* 2000; 60: 5857-5861.
6. Hashimoto I, Kodama J, Seki N, Hongo A, Miyagi Y, Yoshinouchi M et al. Macrophage infiltration and angiogenesis in endometrial cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 4853-4856.
7. Ohno S, Inagawa H, Soma GI, Nagasue N. Role of tumor associated macrophage in malignant tumors: should the location of the infiltrated macrophages be taken into account during evaluation? *Anticancer Res* 2002; 22: 4269-4276.
8. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumor associated macrophages in tumour progression: implication for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002; 196: 254-265.
9. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Haris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 4625-29.
10. Diefenbach A, Hsia JK, Hsiung MYB, Raulet DH. A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity. *Eur J Immunol* 2003; 33: 381-391.
11. Chen WS, Kitson RP, Goldfarb RH. Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGF-1. *In vivo* 2002; 16: 439-445.
12. Li XF, Charnock-Jones DS, Zhang E, Hiby S, Malik S, Day K, et al. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(4): 1823-1834.
13. Puxeddu I, Ribatti D, Crivellato E, Levi-Schaffer F. Mast cells and eosinophils: A novel link between inflammation and angiogenesis in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(3): 531-536.
14. Fisher ER, Paik M, Rockette H, Jones J, Caplan R, Fisher B. Prognostic significance of eosinophils and mast cells in rectal cancer. *Hum Pathol* 1989; 20: 159-163.
15. Bethwaite PB, Holloway LJ, Yeong ML, Thornton A. Effect of tumour associated tissue eosinophilia on survival of women with stage IB carcinoma of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 1993; 45: 1016-1020.
16. Leighton SE, Teo JG, Leung SF, Cheung AY, Lee JC, Van Hasselt CA. Prevalence and prognostic significance of tumor associated tissue eosinophilia in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 436-444.
17. Cooper SH. Intestinal neoplasms. In: Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. Mills SE, Carter D, Reuter V, Greenson JK, Stoler MH, Oberman HA (eds). 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2004, p1573.
18. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
19. Nakayama Y, Nagashima N, Minagawa N, Inoue Y, Katsuki T, Onitsuka K, et al. Relationships between tumor associated macrophages and clinicopathological factors in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002; 22: 4291-4296.
20. Takanami I, Takeuchi K, Kodaira S. Tumor associated macrophage infiltration in pulmonary adenocarcinoma: Association with angiogenesis and poor prognosis. *Oncology* 1999; 57: 138-142.
21. Khorana AA, Ryan CK, Cox C, Eberly S, Sahasrabudhe DM. Vascular endothelial growth factor, CD68 and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with stage 2 and stage 3 colon carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 960-967.
22. Barbera-Guilem E, Nyhus JK, Wolford CC, Friece CR, Sampsel JW. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes. *Cancer Res* 2002; 62: 7042-7049.
23. Eerola AK, Soini Y, Paakko P. A high number of tumor infiltrating lymphocytes are associated with small tumor size, low tumor stage and a favorable prognosis in operated small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1875-1881.
24. Tataroğlu C, Kargı A, Özkal S, Eşrefoğlu N, Akkoçlu A. Association of

(The Turkish Journal of Pathology)

- macrophages, mast cells and eosinophil leukocytes with angiogenesis and tumor stage in nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 43: 47-54.
25. Hoshino M, Takahashi M, Aoike N. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 295-301.
 26. Pretlow TP, Keith ET, Cryar AK, Bartolucci AA, Pitts AM, Pretlow TG, et al. Eosinophil infiltration of human colonic carcinomas as a prognostic indicator. *Cancer Res* 1983; 43: 2997-3000.
 27. Shunyakov L, Ryan CK, Sahasrabudhe DM, Khorani AA. The influence of host response on colorectal cancer prognosis. *Clin Colorectal Cancer* 2004; 4(1): 38-45.
 28. Fernandez-Acenero MJ, Galindo-Gallego M, Sanz J, Aljama A. Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma. *Cancer* 2000; 88(7): 1544-1548.
 29. Nielsen HJ, Hansen U, Christensen IJ, Reimert CM, Brunner N, Oesgaard F. Independent prognostic value of eosinophil and mast cell infiltration in colorectal cancer tissue. *J Pathol* 1999; 189(4): 487-495.
 30. Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Smyth MJ, Van Kaer L, Okumura K, et al. IFN-gamma mediated inhibition of tumor angiogenesis by naturel killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Blood* 2002; 100(5): 1728-1733.
 31. Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, Kawarada Y, et al. CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 1555-1559.
 32. Coca S, Piguera JP, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 2320-8.
 33. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 577-83.
 34. Villegas FR, Coca S, Villarubia VG, Jimenez R, Chillon MJ, Jareno J, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating NK cells subset CD57 in patients with squamous cell lung carcinoma. *Lung Cancer*