

Astrositomlarda Damar Proliferasyonunun Morfometrik Ölçümüyle CD44 ve Fibronektinin İmmun Dokukimyasal Belirlenmesinin Prognostik Önemi (70 Olgu)

Prognostic Role of Morphometric Analysis of Vascularisation and Immunohistochemical Detection of Fibronectin and CD44 in 70 Cases of Astrocytomas

Uzm. Dr. Safiye Aktaş Prof. Dr. M Şerefettin Canda

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Inciraltı - İZMİR

Özet: Astrositomlar intrakranial neoplazilerin çoğunluğunu ve en karmaşık kümesini oluşturmaktadır. Tümörlerde damarlanmanın kantitatif olarak, birçok parametre ile karşılaştırılarak saptanması güncelliğini korumaktadır. CD44 extrasellüler matrikste bulunan hyalüronan için reseptör görevi olan bir integral membran glikoproteinidir. Fibronektin (FN) extrasellüler matriks ve vücut sıvılarında bulunan yüksek moleküler ağırlıklı adeziv glikoproteindir. Bu çalışmada değişik derecelerde 70 astrositom olgusunda damarlanmanın kantitatif ölçümü ile standart CD44 ve FN'in immün dokukimyasal ekspresyonu araştırılmıştır. Ayrıca bu parametrelerin derece, yaş, prognoz, diferansiyasyon, nüks varlığı ile istatistiksel ilişkisi incelenmiştir. VSD derece, prognoz ve diferansiyasyon ile ilişkili; nüks ile ilişkisiz bulunmuştur. NVES diferansiyasyon ile ilişkili saptanırken; derece, prognoz ve nüks varlığı ile ilişkisiz saptanmıştır. VSD astrositomlarda damarlanmanın kantitatif değerlendirilmesinde NVES'e göre daha etkili bir yöntemdir. CD44 42 olguda olumlu (+), 28 olguda olumsuz (-). Ancak CD44 diferansiyasyon ve sağkalım ile ilişkili saptanırken derece ve nüks ile anlamlı ilişki göstermemiştir. Astrositomlar %57 oranda vasküler bazal membranda ve perivasküler alanda FN ekspresyonu göstermişlerdir. Ancak derece, diferansiyasyon, prognoz ya da nüks ile anlamlı ilişki gözlenmemiştir. Astrositomlarda damarlanmanın kantitatif ölçümü, CD44 gibi membran glikoproteinlerinin ve FN gibi ESM

Summary: Astrocytomas constitute the most common and the most serious group of intracranial neoplasms. Quantitative analysis of microvasculature of different tumors is a popular recent subject. CD44 is an integral membrane glycoprotein serving as a cell surface receptor for hyaluronan in extracellular matrix. Fibronectins (FNs) are high-molecular-mass adhesive glycoproteins present in the extracellular matrix (ECM) and in body fluids. This study included 70 astrocytomas in different grades. Morphometric assessment of vascularization, immunohistochemical expression of CD44 and FN were investigated. Statistical relation of these three parameters with grade, differentiation, prognosis, relapse were evaluated. The mean of vascular surface density (VSD) was significantly higher in malignant cases than benign cases. VSD was also related with grade and prognosis but not with relapse. The mean number of vessels per stroma (NVES) was related with differentiation but not with grade, prognosis and relapse. VSD was more effective in assessment of vasculature than NVES in astrocytomas. CD44 was positive in 42 cases and negative in 28 cases. The expression of CD44 was higher in malignant tumors and in cases death of tumor, but CD44 was not related with grade and relapse. Astrocytomas in this series showed FN expression at vascular basement membrane and perivascular compartment in 57 % of cases. FN did not show any relation with any of these parameters. Further

proteinleri ve derece, prognoz ve nüks ile ilişkisinin araştırılması tümör biyogenezinde yeni görüşler açabilecektir.

Anahtar Sözcükler: Astrositom, anjiogenez, CD44, fibronectin

P rimer beyin tümörlerinin %60'ını glial tümörler oluşturur. Bunların çoğunluğu ise astrositomlardır (1, 2). Glial tümörlerde erkek/kadın oranı: 2:1'dir. Prognostik parametrelerden klinik olarak en önemlileri tümör lokalizasyonu ve hasta yaşıdır (3-6). Tüm gliomların 5 yıllık sağ kalım süresi %22'dir (1).

Astrositomların sağkalım süresi erkeklerde, yaşlı hastalarda, yüksek dereceli tümörlerde, temporal ya da parietal yerleşimlerinde azalmaktadır (7, 8). Tanısal biopsi uygulanan hastalarda sağkalım süresi geniş rezeksiyon uygulananlara göre daha kısadır (9).

Düşük dereceli astrositomlardan anaplastiklere ve glioblastom multiform'a (GM) doğru artan dereceyle sağkalım süresi azalma göstermektedir (5). Özellikle GM' de prognoz oldukça kötüdür. Ortalama sağkalım süresi 50 haftadır. Astrositomlarda histolojik değerlendirme ile tümörün biyolojik davranışı genelde ilişkilidir. Ancak kimi tümörlerin davranışı derece ile uyumsuzdur (6). Astrositomlar Daumas-Duport yöntemiyle derecelendirilmektedir (3). Sitolojik atipi, hücre yoğunluğu, mitotik aktivite, mikrovasküler proliferasyon ve nekroz derecelendirilmedeki temel histolojik ölçütlerdir. Stereotaksik biopsilerden sağlanan küçük doku örnekleri aynı tümör-deki ayrı derecelerdeki alanları göstermekte yetersiz kalabilmektedir (10). Benzer histolojik derecedeki astrositomların davranış özelliklerini değerlendirmek için; DNA analizi, p53, c-erbB-2 ekspresyonu, proliferasyon indeksi, sitogenetik analiz gibi parametreler ile ilgili çalışmalar vardır (11-19).

Astrositomlarda derecelendirmenin yapılmasında değerli olan bir bulgu damarsal değişiklikler ve glomerüloid oluşumdur (4). Derecelendirmede temel alınan damar ve endotel proliferasyonunun da gösterdiği gibi vaskülarizasyon bu tümörlerin derecelendirilmesinde ve bunun sonucu prognozunda önemlidir. Ancak astrositomlarda damarlanmanın kantitatif olarak ölçümü ve bunların prognostik parametrelerle karşılaştırılmasına ilişkin çalışmalar az sayıdadır. Tümör vaskülarizasyonunun prognozla ilişkili olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (20).

"Anjiogenez" terimi ilk olarak 1935'te plasentada yeni damar oluşumunu tanımlamak için kullanılmıştır. 1963'lerde başlayan çalışmalarda farelerin izole organlarına ekilen tümör hücreleri yalnızca birkaç milimetre

studies on different types of CD44, FN or other membrane glycoproteins and extracellular matrix proteins may bring new aspects on tumor biogenesis.

Key Words: Astrocytomas, angiogenesis, CD44, fibronectin

büyümüş ve damarlanmamıştır, ancak donör fareye yeniden implante edilince, damarlanıp büyümüştür (21). Bu tür çalışmalar tümörlerin anjiogeneze bağımlı olduğu görüşünü ortaya atmıştır. Tümörler varolan ya da yeni oluşan damarlarla beslenmektedirler. Yeni kapillerlerin küçük venlerden oluştuğu saptanmıştır. Küçük venin bazal membranı bölgesel olarak enzimatik aktivite ile parçalanarak buradan endotel hücreleri anjiogenik uyarana doğru göç eder ve proliferer olur. Her endotel hücresi kavışarak lümen oluşturur (21). Weidler ve ark. (22) invaziv prostat adenokarsinomunda metastazla anjiogenezin ilişkisini araştırmışlardır. Metastazlı olanlarda ortalama kapiller damar sayısı, olmayanlara göre daha yüksek bulunmuş, ayrıca Gleason skoru arttıkça damar sayısında artma görülmüştür.

Doku yapılanmasında ve adezyonunda hücre adezyonu anahtar bir olaydır. Neoplazide hücre-hücre ve hücre-matriks arasındaki ilişkilerdeki değişikliklerin kanser hücrelerinin normal doku sınırlarını aşip daha uzaklara yayılmasında etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotez normal ve neoplastik hücrelerde gösterilmiş adezyon molekülleri üzerine ilgiyi çekmiştir. CD44 adezyon reseptörlerinden birisidir (23). Dokuların gelişim sırasındaki diferansiyasyonları, yangı, onarım, tümör hücresinin invazyon ve metastazında hücre dışı matriksle etkileşimleri bunlar arasındadır (24).

CD44, 90 kd ağırlığında ekstrasellüler matrikste (ESM) bulunan glikan, hyalüronan için reseptör görevi olan bir integral membran glikoproteinidir. Temel olarak standart (CD44s) ve varyant (CD44v) iki izoformu vardır (23). CD44 geni 11. kromozomun kısa kolunda yer alır (25). Ancak günümüze dek 10 alternatif eksondan kaynaklanan en az 20 değişik formda CD44 reseptörü tanımlanmıştır (23). Örneğin hematopoetik varyant (CD44H) lenfosit aktivasyonunda, lenfosit ev sahipliği ve ESM adezyonunda rol almaktadır (23). CD44s saptanamamasının solid tümörlerde metastatik potansiyelle ilişkili olduğu bildirilmektedir (26). B hücreli lenfomada CD44H varlığının metastazı arttırdığı saptanmıştır (23). Kolorektal karsinomlarda tümör evresi arttıkça CD44 ekspresyonu artmaktadır (27). CD44 sadece epitelial hücrelere özgü değildir. Örneğin fibrosarkomlarda CD44 ekspresyonunun metastazla pozitif ilişkisi gözlenmiştir (27). Kemikte CD44 ekspresyonunu inceleyen birkaç immün dokü kimyasal

ve elektron mikroskopik çalışmada CD44'ün sitoplazmik membranda ya da sitoplazmik çıkıntılarda lokalize olduğu ve osteositik diferansiyasyonu gösterebileceği ortaya atılmıştır (28, 29). Bir başka çalışmada plevral sıvıda immunoblot analiz ile mezotel hücrelerinde hyalüronan bağlanması izlenmezken, mezotelioma hücrelerinde izlenmiştir (30). Nöroblastom-larda CD44v'nin malignite ile doğru orantılı olduğu gözlenmiştir (31).

Fox ve ark. (23) normal dokularda ve bazı tümörlerde taze dokuda polimeraz zincir reaksiyonu ile CD44 araştırmışlardır. Tümörlerde CD44 ekspresyonunun heterolog olduğunu ve bazı malign tümörlerin CD44 eksprese etmediğini göstermişlerdir. Yine bu çalışmada normal beyin dokusunda (korteks ve medulla) ve medulla spinaliste total CD44 ekspresyonu gösterilmiştir (23). CD44 adezyon molekülü SSS'nde özellikle beyaz maddede glial hücrelerde 90 kd ağırlığında gözlenir (32). Az sayıda son çalışmalar CD44'ün hem normal hem neoplastik astrositlerde eksprese edildiğini göstermektedir (33). Otopside elde edilen normal ve Alzheimer hastalığı olan insan beyinlerinde immun dokukimyasal olarak CD44 lokalizasyonunun araştırıldığı bir çalışmada gri maddede damarlarla ilişkili hem protoplazmik hem fibröz morfolojide astrositlerle ilişki saptanmıştır (34).

Fibronektin (FN) extrasellüler matriks ve vücut sıvılarında bulunan yüksek moleküler ağırlıklı adeziv glikoproteindir (35). Normal hücre morfolojisinin sağlanması, korunması, hücre göçü, hemostaz, tromboz, yara iyileşmesi ve onkojenik transformasyonda yer alır (35, 36). FN'ler disülfid köprüsü ile bağlanmış 2 eşdeğer, küçük farklılıkları olan moleküllerin oluşturduğu dimerlerdir (36). Tek bir FN primer transkriptinin polimorfizmi ile oluşan IIICS, ED-A ve ED-B olmak üzere 3 türü vardır. ED-B normal erişkin dokuda yoktur. Fetal dokularda ve tümörlerde gözleendiği için ED-B sekansına onkofetal domain denmiştir (35). Onkofetal FN normal dokuda yokken, total FN normal dokuda da eksprese edilebilir (37). FN plasenta oluşumu sırasında endodermal ve mezodermal hücrelerin göçünde yer almaktadır (38). Fizyolojik anjiogenezin bulunduğu endometriumda FN bazal tabaka ve myometriumda negatif iken fonksiyonel tabaka damarlarında pozitifdir (35).

Normal astrositlerde laminin ve kollajen ile birlikte FN'e karşı da bağımsız fokal ya da nokta kontaktlar biçiminde integrin reseptörleri vardır (39). FN vaskülarizasyon ile de ilişkilidir. Endotel hücre kültüründe endotel büyüme faktörü uyarımı ile tübül yapıları oluştuğunda FN'i yansıtan mRNA düzeyinde intrensek değişiklikler gözlenmiştir (40). Erişkin ve fetal böbrek dokularında ED-A, ED-B düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada ED-A erişkin böbrekte izlenirken ED-B gözlenmemiştir (41). FN meme dokusunda epitelial ve myoepitelial

hücrelerde eksprese edilmez. İnterlobüler ve intralobüler bağ dokuyu ve vasküler endotelin bazal membranında izlenir (37, 42). FN ile ilgili değişik hastalık ve dokularda öncü sayılabilecek çalışmalar vardır. Hirschprung hastalığında aganglionik ve geçiş bölgelerinde FN daha yoğun eksprese edilmiştir (43). Orta kulak kolesteatomlarında (44), sinovial sarkomlarda (45), deri eki tümörlerinde (46) kökeni, biyolojik davranışı araştırmaya yönelik; oral skuamöz hücreli karsinomlarda, pigmente deri lezyonlarında (47), agresif bazal hücreli karsinomlarda (48), larinks karsinomlarında (49) malign potansiyeli araştırmaya yönelik çalışmalar bunlardan birkaçıdır. FN schwann hücrelerinde eksprese edilmezken (50), astrositlerde ve glioma hücrelerinde hücre yüzeyinde gözlenmiştir (51).

Bu araştırmanın amacı astrositlerde damarlanmanın kantitatif ölçümü ile CD44 standart formu ve FN immun dokukimyasal ekspresyonunun bu tümörler üzerindeki prognostik etkilerini ve birbirleriyle ilişkilerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada 1985-1996 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda değerlendirilmiş değişik derecelerde 70 astrositom olgusu yer almaktadır. Olguların yaşları 1 ile 74 arasındadır. Oligodendriogliom ya da ependimom komponenti içeren mikst gliomlar çalışma dışı bırakılmıştır.

Tüm olguların hematoksilen eosin boyalı histolojik kesitleri yeniden gözden geçirilmiştir. DSÖ'ye göre sınıflandırılıp (2), dereceleri Daumos-Duport yöntemine göre (3) yeniden yapılmıştır. Olguların 1-10 sayıda blokları arasından, her olgu için, tümörü en iyi örnekleyen immun dokukimya için uygun yeterlilikte doku içeren birer blok seçilmiştir. Çevre dokuyu bulunduran bloklar (25 olguda) ön planda seçilmiştir. Hastaların yaşı, cinsi, patoloji raporlarından, prognozları, sağkalım süreleri, yinleme (nüks) varlığı ya da yokluğu ve hastanın son kontrolündeki durumu Nöroşirürji Anabilim Dalı'ndan ve hasta dosyalarından elde edilmiştir.

Her olgu için, en temsil edici formalin fikse parafine gömülü dokulara ait bir blok seçildikten sonra immun dokukimyasal boyama için 4 µm kalınlıkta kesitler polilizinli lamlara alınmıştır. Birden çok cerrahi girişim yapılan olgulardan, ışın uygulanmasının damarlanmaya olası etkisi düşünülerek, ilk operasyon materyaline ait bloklarda çalışılmıştır. İmmun dokukimyasal boyama için kesitler ksilolde deparafinize edilip, alkol dizilerinde rehidrate edildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için 5 dakika %5'lik hidrojen peroksit uygulanmıştır. Primer antikolar; Faktör 8 (Zymed, 1/100), Fibronectin (Dakopats, 1/200), CD44s (Cymbus-Bioscience, 1/20) oda ısısında bir saat uygulanmıştır.

Sekonder antikor ve Streptavidin- peroksidaz (Dako) 10 dakika uygulandıktan sonra Diaminobenzidine-hidrojen peroxide ile renklendirme sağlanmıştır. Mayer's hematoksilen ile zıt boyama yapılmıştır.

CD44 ve fibronektin için tüm immün boyalı kesitler standart ışık mikroskopunda boyanma paterni, dağılım, yoğunluk ve yaygınlık açısından incelenmiştir. İmmün boyanmanın tümü aynı seansta yapılmadığı için ve dokuların tümünün fiksasyon süresi bilinmediği için boyanma yoğunluğuna bakılmasına karşın, istatistiksel incelemelerde pozitif ve negatiflik temel alınmıştır. Damarlanma Faktör 8 ilişkili antijene karşı antikorla belirgin duruma getirildikten sonra damar yüzey dansitesi (VSD), birim stromaya düşen mikrodamar sayısını (NVES) saptamak için en çok damar içeren en belirgin "hot spot" alan seçilmiştir (20).

Stereolojik Ölçüm:

CCD kamera (Sony) ile monitöre (Sony Trinitron) bağlı mikroskopta (Nikon Labophot) x10 objektifle görüntü elde edilmiştir. Monitörde en belirgin damarlanmanın olduğu görüntü üzerine 121 kesişim noktalı 11 yatay, 11 dikey test çizgileri içeren saydam yerleştirilmiştir. Toplam test çizgisi uzunluğu (LR) 1.1 mm'dir. Yatay ve dikey çizgileri keşen damar sayısı (In) (In = Number of intersections), tüm alan içindeki damar sayısı (N), damar içermeyen tümör parankim alanlarına uyan nokta sayısı (I str) saptanmıştır (20).

$$V \text{ str} = I \text{ str}/121$$

$$VSD = (In \times 2) / (L_R \times V \text{ str})$$

$$NVES = N / V \text{ str}$$

Yukarıdaki formüllerle damar yüzey dansitesi ve stromaya düşen kapiller damar (mikrodamar) sayısı saptanmıştır. Toplam test çizgisi uzunluğunu (LR) hesaplamak için 121 noktalı alanın içerdiği mikroskopik alan ölçülmüştür. VSD'yi hesaplarken Vstr'nin katılmasının nedeni kesit boşlukları gibi alanların oranı bozmasına engel olmaktır. VSD birim doku hacmine düşen vasküler yüzey alanını yansıtmaktadır. NVES mm² stromaya düşen damar sayısını göstermektedir.

İstatistiksel Analiz:

İstatistiksel işlemler SPSS (Scientific Package for Social Sciences) programı ile IBM uyumlu bilgisayarda yapıldı. Tüm verilerin tanımlayıcı ya da dağılımsal değerleri alındı.

İstatistiksel analizde hastanın yaşı, cinsi, sağ ya da ölü olması, ay olarak sağkalım süresi, tümörün histolojik derecesi, nüks varlığı, diferansiyasyonu (Derece I, II = düşük dereceli; Derece III, IV = yüksek dereceli) değerlendirildi. Tüm parametrelerin birbiri ile karşılaştırılmasında Pearson ve Spearman korelasyon testleri;

düşük ve yüksek dereceli olgularda; sağ, ölü olgularda CD44 ve FN ekspresyonlarının karşılaştırılmasında Ki-Kare (Chi-Square) testi, VSD ve NVES'in bu parametrelerde karşılaştırılmasında Mann Whitney Confidence and Interval Test kullanıldı. 0.05'e eşit ya da daha küçük olasılık katsayısı istatistiksel olarak anlamlı sayıldı (p<0.05).

Bulgular

Bu çalışmada araştırılan 70 olgunun 42'si (%60) erkek, 28'i (%40) kadındır. Genel yaş ortalaması 40.89 ± 19.30 (1-74 yaş)'dur. Kadınlarda ortalama yaş 40, erkeklerde 39'dur. Benign olguların (derece I, II) yaş ortalaması 25.5, malign olguların (derece III, IV) yaş ortalaması 49.4'dür. Daumos-Duport yöntemine göre sınıflandırılan ve derece I olan 12 (%17.1); derece II olan 13 (%18.6); derece III olan 18 (%25.7) ve derece IV olan 27 (%38.6) olgu vardır. DSÖ sınıflamasına göre 15 olgu pilositik astrositom tanısı almıştır ve bunlar juvenil olgulardır. 10 olgu diferansiye astrositomdur. 18 olguda (%25.7) nüks gözlenmiştir. Malign olguların %35.6'sında nüks vardır. Benign 2 olguda (%8) nüks saptanmıştır. Ortalama izlem süresi 30.13 ± 37.72 0-145 ay) aydır. Olguların 27'si (%38.6) sağ, 43'ü (%61.4) ölüdür.

Damar Yüzey Dansitesi (VSD):

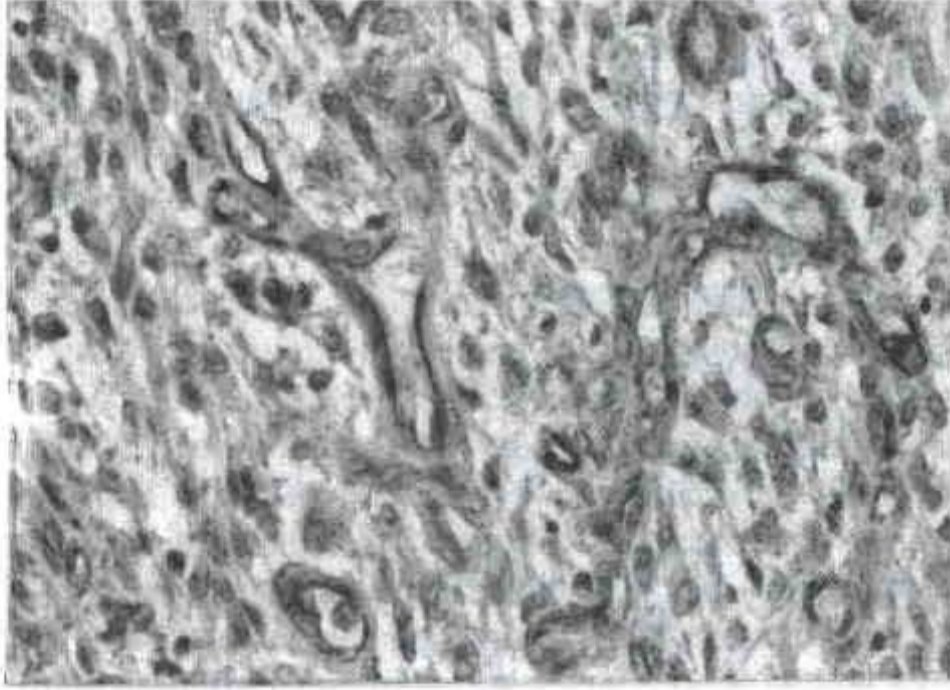
Faktör 8 ile boyalı kesitlerde (Resim 1) sayım yapıldıktan sonra VSD hesaplanmıştır. VSD'nin tüm olgularda ortalaması 25.72 ± 9.87 (5.50-149.60)'dir. Benign olgularda bu ortalama 17.29 ± 8.06 (5.50-33.85), malign olgularda 30.41 ± 22.82 (7.33-149.60)'dir. İstatistiksel analizlerde VSD derece, sağkalım ve diferansiyasyon ile ilişkili (p<0.05), nüks varlığı ile ilişkisiz bulunmuştur (p>0.05).

Birim Stromaya Düşen Kapiller Damar Sayısı (NVES):

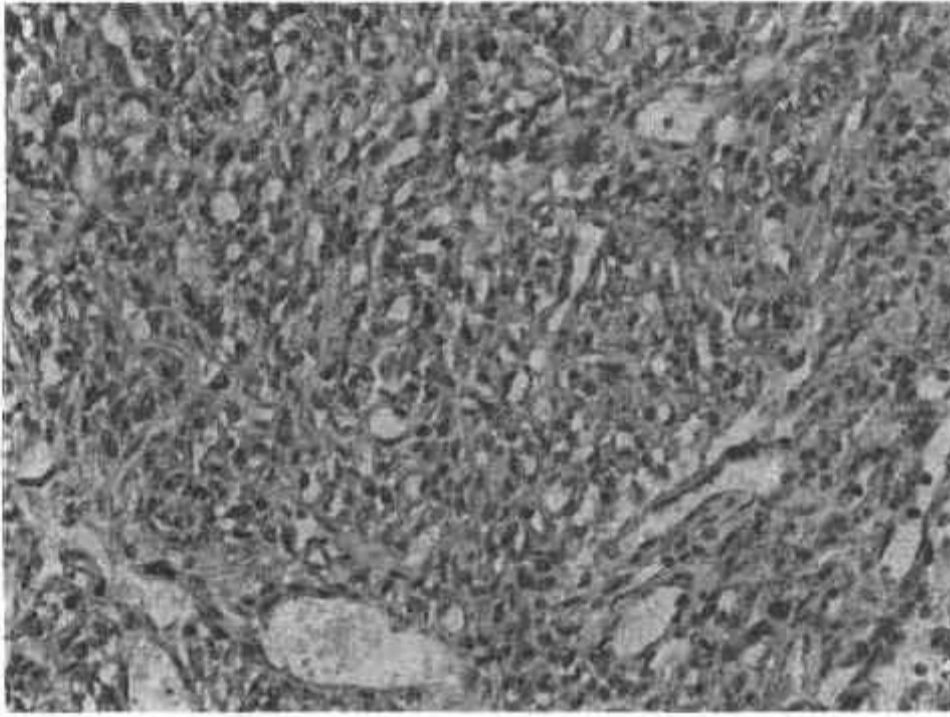
NVES'in tüm olgularda ortalaması 14.70 ± 19.70 (4.03-159.72)'dir. Benign olgularda bu ortalama 9.07 ± 4.51 (4.10-18.62), malign olgularda 17.83 ± 23.86 (4.03-159.72)'dir. İstatistiksel analizde NVES diferansiyasyon ile ilişkili saptanırken (p<0.05), derece, sağkalım ve nüks varlığı ile ilişkisiz bulunmuştur (p>0.05).

CD44:

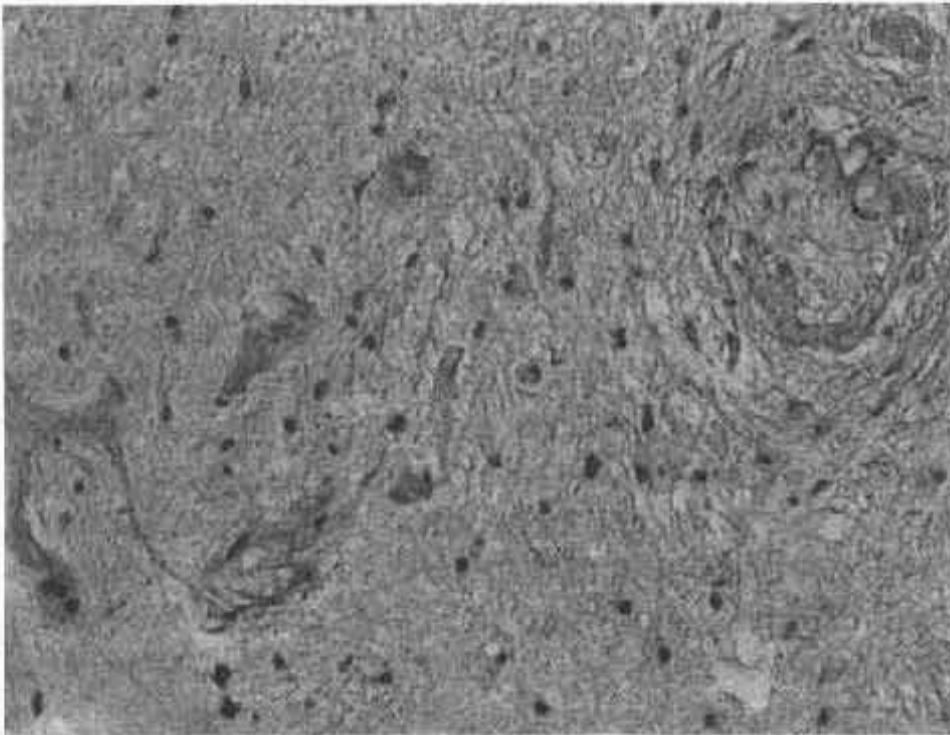
CD44, 42 (%60) olguda genelde yaygın (Resim 2) ve özellikle vasküler yapılar çevresindeki bağ dokusunda daha belirgin olmak üzere pozitif, 28 (%40) olguda negatiftir. Çevre dokuda boyanma gözlenmemiştir. Düşük dereceli olguların %40'ı CD44 ile pozitif, yüksek dereceli olguların %71.1'i pozitiftir. İstatistiksel analizde CD44 olguların düşük ya da yüksek dereceli olma durumuyla, sağkalımla ilişkili bulunmuştur. Yüksek dereceli olgularda (derece III+IV) ve ölen olgularda CD44 eksprese edilme olasılığı daha yüksektir (p<0.05). Ancak nüks ve derece ile anlamlı ilişki gözlenmemiştir.



Resim 1. Anaplastik astroditom olgusunda faktör 8 ile belirginleştirilen vasküler proliferasyon, (5661/ 93, X100).



Resim 2. Glioblastom multiform olgusunda belirgin perisellüler CD44 pozitifliği (2290/96, X100).



Resim 3. Diferansiye astroditom olgusunda vasküler bazal membranda fibronektin immunoreaktivitesi (11445/94, x100).

Tablo I. CD44, FN ekspresyonunun ve NVES, VSD ortalamalarının dereceye göre dağılımları.

| Derece | CD44 | | FN | | VSD ortalama | NVES ortalama |
|--------|---------|---------|---------|---------|--------------|---------------|
| | pozitif | negatif | pozitif | negatif | | |
| I | 5 | 8 | 8 | 8 | 17.65 | 8.57 |
| II | 6 | 7 | 8 | 5 | 16.82 | 9.71 |
| III | 13 | 5 | 12 | 6 | 21.92 | 11.08 |
| IV | 18 | 8 | 12 | 14 | 35.01 | 21.89 |
| Toplam | 42 | 28 | 40 | 30 | 25.72 | 14.70 |
| p | >0.05 | | >0.05 | | <0.005 | >0.05 |

Tablo II. CD44, FN saptanmasının ve NVES, VSD ortalamalarının diferansiyasyona göre dağılımları.

| Diferansiyasyon | CD44 | | FN | | VSD ortalama | NVES ortalama |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|--------------|---------------|
| | pozitif | negatif | pozitif | negatif | | |
| Düşük Dereceli | 11 | 15 | 16 | 10 | 17.29 | 9.07 |
| Yüksek Dereceli | 31 | 13 | 24 | 20 | 30.41 | 17.83 |
| Toplam | 42 | 28 | 40 | 30 | 25.72 | 14.70 |
| p | <0.05 | | >0.05 | | <0.05 | <0.05 |

Fibronektin:

FN, vasküler bazal membran (Resim 3) ve perivasküler alanda boyanma göstermiştir. Ayrıca perivasküler alanda, tümör hücreleri çevresinde ince fibriller şeklinde dağılım gözlenmiştir. 40 (%57.1) olguda pozitifdir. Düşük dereceli olguların % 60'ı, yüksek dereceli olguların %55.6'sı FN ile pozitifdir. İstatistiksel analizde FN Ki-kare analizinde derece, diferansiyasyon, sağkalım ya da nüks ile anlamlı ilişki göstermemiştir ($p>0.05$). Ancak Pearson korelasyon testinde ise CD44 ile ilişki göstermiştir ($p<0.05$). CD44 ve FN ekspresyonları ile VSD ve NVES ortalamalarının derece, diferansiyasyona göre dağılımları sırasıyla Tablo I, II' de gösterilmiştir.

Tartışma

Astroditomlarda izlenen damar değişiklikleri iki türlü olmaktadır. Bunlar ya yalnız damarların sayıca artışı ile endotel ve peritel kalınlaşması biçimindedir, ya da endotel ve peritel proliferasyonu ile birlikte damar lümeninde yeni damarlanmalar ile kendini gösteren ve "glomeruloid" yapıları adı verilen tomurcuklanmalar biçiminde olur (52). Bu tür damar proliferasyonları tüm tümör dokusunda olabildiği gibi nekroz ve kanama alanlarına komşu dokuda daha belirgin olarak izlenmektedir. 1975 ve 1978 yıllarında üzerinde önemle durulan bir bulgu olan astroditom stromasındaki damar proliferasyonu ve "glomeruloid" oluşumu yani tomurcuklanma günümüzde değerini korumaktadır (52). Klinik ve deneysel çalışmalar, solid tümörlerin gelişiminde anjiogenezin önceden olması gerektiğini ortaya koymaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörü astroditomlarda düşük, GM'de yüksek bulunmuştur (53). Glial

tümörlerin yüksek dereceli türlerinde endotel hücre proliferasyonu ve artmış damar dansitesi dikkati çekmektedir. Glioblastomlarda anjiogenezin incelenmesi, yeni sağaltım yöntemlerinin (antianjiogenez) geliştirilmesine öncü olabilir (53). Damarlanmanın kantitatif ölçümü ise astrositlerde prognostik önemi araştırılmaya değer bir konudur.

Hilmas ve ark. (54) deneysel olarak meme karsinomunda, gelişim sırasında ve radyasyon sonrasında vasküler hacim yüzdesi, ortalama damar çapı, ortalama damar uzunluğu ve yüzey alanını birim alanda karşılaştırmışlardır. Radyasyon sonrasındaki damarların morfolojisini gelişime yeni başlayan tümörlerdeki damarlanmaya benzetmişlerdir. Silberman ve ark. (55) radikal prostatektomi sonrasında progresyonu belirlemede mikrodamar dansitesinin bağımsız belirleyici olduğunu ileri sürmüşlerdir. Asaishi ve ark. (56) virüsle oluşturulmuş transplante hamster melanomunda, intravital mikroskop ile birinci günden başlayan gözlem yapmışlar ve kapiller çap ve uzunluğunu, kan akımını hesaplamışlardır. Tanigawa ve ark. (57) 43 özefagus karsinomunda faktör 8 ve CD34 ile belirginleştirilen damarların sayımında tümörün daha derin olduğu alanlarda daha yüksek sayı saptamışlardır. Kendi dizimizde dokular parçalı olduğu için, tümörün değişik yerleşimlerdeki damarlanma ayrımları değerlendirilememiştir.

Tümör damarlanmasını değerlendirmede, yalnız damar sayısını belirlemek yerine, damarları çevresindeki parankimle oranlayıp karşılaştırmak daha yararlı ve pratiktir. Bu işlem doku boşluklarının yaratacağı yanlış sonuçları önler. Damar sayısına göre VSD daha uygundur, çünkü vasküler yüzeyi gösterdiğinden diffüzyon miktarını içeren fizyolojik durumu yansıtmaktadır. Örneğin, prostat karsinomunda derece arttıkça damar sayısında artma, ancak VSD'de düşme saptanmıştır (20). Bu zıtlığı yazarlar değişmiş damar şekli ile açıklamaktadırlar. Prostat karsinomunda normal doku ve düşük dereceli tümörlerde damarların dallanmaları daha iyidir. Bu nedenle damar başına düşen yüzey daha çoktur. Ancak bu çalışmada astrositlerde derece arttıkça hem damar sayısı hem de VSD artmaktadır. Çünkü derece arttıkça damarlarda sayıca artma, endotel proliferasyonu ve dallanmalarda artma birlikte izlenmektedir.

Köhner ve ark. (58) renal hücreli karsinomlarda, derece III tümörlerin derece I, II ve normal dokudan daha düşük VSD içerdiğini bulmuşlardır. Belki de VSD'de, derece arttıkça düşme görülmesi, yüksek dereceli tümörlerde tümör hücrelerinin proliferasyon hızına tümör neovaskülarizasyonunun yetişememesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle tümörlerde tümör hücrelerindeki proliferasyon indeksi ile birlikte tümör damar endotelindeki proliferasyon indeksini karşılaştırmak yararlı olabilir (20). Bunun yanısıra, endotel hücreleri ile ekstrasellüler matriks komponentleri arasındaki etkileşimler, endotel

hücre göçü ve proliferasyonu gibi anjiogenetik olaylarda önem taşır (35). Örneğin, FN küçük kan damarlarının gelişmesinde ESM'in ana komponentlerinden biridir. Ayrıca endotel hücrelerinin göç ve proliferasyon sırasında FN de içeren uygun matriksi ürettikleri gösterilmiştir (35).

İnsan gliomlarında da kan damarlarında FN ekspresyonunun malignite ve diferansiyasyon yitimiyle ilişkisi az sayıda çalışmada tartışılmıştır (35). Highuci ve ark. gliyal tümörlerde malignite ile ters ilişki saptarken Castellani ve ark. tüm GM'lerde hiperplastik endotel hücreleri içeren damarlarda FN'i pozitif saptamışlardır (35). Bu araştırmacılar gliomlardaki anjiogenezis FN'in ilişkili olduğu düşünmektedir. Anjiogenezis sırasında FN'in yüksek düzeyde birikimler yaptığını saptamışlardır. Beyin tümörlerinde malignitenin göstergelerinden birisi tümörün beyni infiltre etme yeteneği, bir diğeri vasküler proliferasyondur. Hücre göçünde ekstrasellüler matriks proteinleri ve hücre adezyon moleküllerinin yeri vardır. Friedlander ve ark. (59), 24 astrositom olgusunda taze dokudan elde edilen tümör hücrelerinin hücre kültüründe adezyon moleküllerine göçünü araştırmışlardır. Astrositlerde, yüksek dereceli olgularda düşük dereceli olgulardan daha kuvvetli göç gözlenmiştir. Hücrelerin uzun, silindirik çıkıntıları hücre gövdesinden daha çok göç göstermiştir (59).

Ekstrasellüler matrikste çok sayıda molekül tümör hücre göçünde uyarıcı olmakla birlikte beyinde kritik önemi olan birkaç reseptör vardır. FN reseptörü bunlardan birisidir (59). Hücre adezyon molekülleri ve ekstrasellüler matriks molekülleri nöral morfogenez ve histogenezde önemli hücrelerel etkileşimlere katılmaktadır. Tümör metastazı ve invazivliği azalan adezyonla ilişkilidir. Beyinde ESM komponentleri (FN, vitronektin, laminin, trombospondin vb.) gelişme sırasında astrositlerden salınarak nöron ve gliaların göç ve tutunmasında etkili olmaktadır, ancak matür beyinde bulunma oranları düşüktür. Bu oran beyin tümörlerinde yeniden artar. FN neoplastik beyin dokusunda kan damarları çevresinde bazal laminada bulunmaktadır. FN ekspresyonu gliyal tümörler içinde GM'de, diferansiye astrositlere (DA) ve anaplastik astrositlere (AA) göre belirgin artış göstermiştir (59). Bu çalışmada FN, perivasküler alanlar yanısıra tümör hücreleri çevresinde de gözlenmiştir. Bu bulgular Umezawa ve ark. bulguları ile uyumludur (51). Gliom hücre kültürlerinde vitronektin ve FN reseptörleri immun dokükimya ile hücre yüzeyinde gösterilmiştir. Ayrıca faz kontrast mikroskobu ile bu reseptörlerin özellikle fokal kontakt alanlarında olduğunu gözlemişlerdir (51). Fizyolojik durumlarda FN'in astrosit yüzeyinde bulunmaması gerekir. Hücre kültüründe FN'in gliom hücreleri üzerine kemotaktik etkisi gözlenmiştir. Tip 1 ve 2 astrositlerde farklı FN heterodimerlerinin ekspresyonu ile ilgili çalışmalar vardır (60).

Neoplazilerde dokuların düzeni bozulmakta ve diferensiyasyonda yeniden düzenlenme olmaktadır. Hücreler arası ve hücre matriks etkileşimleri bozulursa kanser hücreleri normal dokulardan daha kolay ilerleyebilirler. Örneğin, 85-160 kd bir hyalüronik asit reseptörü olan CD44'ün artmış ekspresyonu tümör hücrelerinin hyalüronik asite daha iyi tutunmasını sağlayarak tümör hücrelerinin implantasyonuna yardım etmektedir (24). CD44, Hermes antijeni olarak da bilinmektedir. Yaygın bulunan integral membranoproteindir. Fonksiyonları arasında diğer hücrelere ve hyalüronan, kondroitin sülfat, fibronektin ve kollajen gibi mezenkimal komponentlere tutunma yer almaktadır (25). Non-Hodgkin lenfomaların metastatik formlarında, CD44 ekspresyonu yüksek saptanmıştır. Karsinomlarda normal epitele göre daha çok görülmektedir. Ancak CD44'ün malign fenotipi nasıl belirlediği henüz bilinmemektedir. Etkisi hyalüronik asite bağlanma sonrası belirli intrasellüler sinyaller ile olabilir. Tümör gelişimi ve metastazında birçok faktör söz konusu olduğu için burada yer alan hücre adezyon moleküllerini basit bir şema ile göstermek zordur (61). Tanabe ve ark. (27) polimeraz zincir reaksiyonu analizi ile 49 kolon adenokarsinomu hastanın, normal mukozası ve tümöründe ve 20 hastanın metastazında CD44 araştırmışlardır. Metastatiklerin tümünde, primer tümörlerin çoğunda ve normal mukozanın sadece %22'sinde CD44 ekspresyonu izlenmiştir. CD44 ekspresyonu, genitouriner malignitelerde tümör invazyonu ve malignite ile ilişkili bulunmuştur (62). CD44'ün malign potansiyel ve yineleme riskinde öneminin anlaşılması, klinik uygulamada, örneğin erken saptanmış tümörlerde, tümör biyolojisi ve prognoz hakkında bilgi verebilecektir (25).

Tümör invazyon ve yayılımında hücre adezyonu yanı sıra, denetimsiz hücre çoğalması anjiogenez uyarımı, proteaz üretimi ve dediferensiyasyon gibi değişikliklerin olması gerekmektedir. Tümör progresyonunda hücre adezyon moleküllerinin yerinin anlaşılması yeni sağaltım alanları açabilecektir (61). Anjiogenezde endotel hücrelerinin adeziv proteinleri ile ESM komponentlerinin ilişkisi hücre tutunmasını düzenlemede önemlidir. Trochon ve ark. (63) hücre kültür ortamında CD44 eksprese eden pulmoner arter endotel hücrelerinde proliferasyonun % 30, göçün %25-50 inhibe olduğunu gözlemişlerdir. Anjiogenezde endotel ilişkili CD44'un yerini olduğunu ileri sürmüşlerdir. Tümör büyümesinde önemli rolü olan anjiogenezde uyarılmış endotel hücrelerinin göçü ve kanal oluşturması gerekmektedir. Bu olay ekstrasellüler proteoliz, hücre adezyon ve aktivasyonunun koordine çalışması ile ilişkilidir. Örneğin $\alpha v 3$ integrin molekülünün matrikste vitronektine bağlanmasının önlenmesi endotel hücre apoptozuna neden olmaktadır (63).

Bu çalışmada malign olgularda ve ölen olgularda CD44'ün daha fazla eksprese edildiği saptanmıştır. Ancak CD44 derece ve nüks ile anlamlı ilişki göster-

memiştir. Astroditomlarda temel klinik davranışı belirleyen histolojik etken diferensiyasyondur. Derece I ile II ve derece III ile IV benzer klinik davranış gösterirler. CD44'ün yüksek dereceli astroditomlarda daha çok eksprese edilmesi kaynaklardaki diğer malign tümörlerle uyumludur (24, 26) ve agresiviteyi belirleyen parametrelerden birisi olabileceği söylenebilir. Nüks ile ilişki saptanmamasının nedenini nüks varlığının agresiviteden çok cerrahi girişimin başarısı ile ilgili olması ile açıklayabiliriz.

Gliom invazyonu tümör hücreleri, beyin hücreleri ve ESM ilişkilerini içeren kompleks bir olaydır. Başlangıç olarak gliom hücrelerinin özgün ESM moleküllerini tanınması ve tutunması gerekmektedir. Sonra proteolitik olarak değişmiş matrikse göç eder. Beyin ESM'i diğer dokularla karşılaştırıldığında daha şekilsizdir. Hyalüronan da içeren glikozaminoglikanlar içerir. Radotra ve ark. hücre kültüründe gliom hücreleriyle ESM komponentlerinin ilişkisini araştırmışlardır. Gliomların tümünde CD44 eksprese edildiğini ve bu ekspresyon düzeyinin tümör derecesi ile ilişkisiz olduğunu saptamışlardır. CD44'ün gliom hücrelerinin adezyonuna katıldığını göstermişlerdir (64). Pilkington ve ark. immun dokukimyasal olarak CD44'ün astroditomlarda birçok hücrede varlığını saptamışlardır. Ancak medulloblastom, ependimom ve neuepitelial tümörlerde ekspresyonun yok ya da çok az olduğunu gözlemişlerdir (33).

Tysnes ve ark. gliom hücrelerinin invitro ESM proteinleri ile ilişkisini araştırmışlardır. Laminin tüm ortamlarda, FN filtre ortamda belirgin göç etkisi uyandırmıştır (65). Castellani ve ark. (35), 33 GM olgusunun tümünde, 10 diferansiye astroditomun ise yalnız 3'ünde tümör içi damarlarda frozen kesitlerde immun dokukimyasal olarak FN ekspresyonunu göstermişlerdir. Ayrıca Gress ve ark. pankreas karsinomlarında desmoplastik stromada, insitu hibridizasyon yöntemiyle araştırılan FN ekspresyonunun evre ile ilişkisi saptanmamıştır. Tüm evrelerde FN değişik oranlarda izlenmiştir (66). Farnoud ve ark. hipofiz adenomlarında FN'in her 3 formunu endotel ve vasküler düz kas hücreleri ile ilişkili bulmuşlardır. Adenom anjiogenezinde bağ dokusu kompartmanının remodelasyonunun FN sentez değişiklikleri ile ilişkili olduğu kanısına varmışlardır (36).

Kendi sonuçlarımız astroditomların FN eksprese ettiğini ve bunun immun dokukimyasal olarak gösterilebileceğini göstermektedir. Ancak istatistiksel olarak derece, prognoz ve nüks ile ilişki saptanmamıştır. FN özellikle proliferen yeni damarlarda ve çevresinde gözlenmiştir. Bu durum bağ dokusu kompartmanının aktif FN sentez bölgesi olduğu görüşünü desteklemektedir. ESM protein belirleyicileri, tümörlerin agresivite, metastaz yeteneği gibi klinik davranışlarını belirlemede yardımcı olabilir. FN yeni damarları saptamada, hücre göçü yeteneğini

araştırmada birçok neoplazide yardımcı olabilecektir, bunun yanısıra klinik olarak prognostik, diagnostik ve antianjiogenik terapötik amaçlar için potansiyel araştırma konusudur.

Sonuç olarak, bu araştırmada VSD ve NVES ortalamaları yüksek dereceli olgularda artmış bulunmuştur. Ancak VSD derece ve prognoz ile ilişkili saptanırken, NVES böyle bir ilişki göstermemiştir. Bu nedenle astrositomlarda damarlanmanın kantitatif saptanmasında VSD NVES'e göre daha etkin bulunmuştur. CD44 derece ve nüks ile istatistiksel anlamlı ilişki göstermezken, yüksek dereceli olgularda ve ölen olgularda daha fazla pozitiflik göstermiştir ve kötü prognoz belirleyicisi kabul

edilebilir. FN'in astrositomlarda ESM komponenti olarak varlığı gösterilmiştir, ancak prognostik önem göstermemektedir. Astrositomların değerlendirilmesinde olgunun yaşı, cinsi, lezyonun yerleşimi, kanama ve nekroz alanlarının bulunuşu, tümörün kistik ya da solid oluşu gibi klinik bulgular; klasik histopatolojik bulgular değerlidir. Bunların yanısıra damarlanmanın kantitatif ölçümü, CD44 gibi membran glikoproteinlerinin ve FN gibi ESM proteinlerinin varlığının derece ve prognozla ilişkisinin araştırılması tümör biyogenezinin değerlendirilmesinde yeni görüşler açabilecektir. Yeni dizilerde bu konularda ve değişik membran ve ESM proteinleri ile çalışma yararlı olabilecektir.

Kaynaklar

1. Parisi JE, Scheithauer BW. Glial Tumors. In: Nelson JS, Parisi JE, Schochet SS Jr., editors. Principles and Practice of Neuropathology. St Luis: Mosby 1993; 123-183.
2. Zülch KI. Histological typing of tumours of the central nervous system. International Histological Classification of Tumours. No: 21 Geneva: WHO 1979; 17-57.
3. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. Cancer 1988; 62: 2152-65.
4. Canda MŞ. Daumas-Duport yöntemiyle astrositomların derecelendirilmesi ve glomerüloid görülme oranı (33 olgu). Türk Patol Derg 1989; 5: 59-63.
5. Canda MŞ. Astrositomlar: Histolojik ve prognostik bulgular. Turk J Neopl 1994; 3(1):25-37.
6. Salzman M, Scholtz H, Kaplan RS, Kulik S. Long-term survival in patients with malignant astrocytoma. Neurosurg 1994; 34: 213-220.
7. Burger PC, Vollmer RT. Histologic factors of prognostic significance in the glioblastoma multiforme. Cancer 1980; 46: 1179-1186.
8. Fullig KH, Garcia DM. Anaplastic astrocytoma of the adult cerebrum; Prognostic value of histologic features. Cancer 1985; 55:928-931.
9. Scerrati M, Roselli R, Iacoangeli M, Pompucci A, Rossi GF. Prognostic factors in low grade (WHO grade II) gliomas of the cerebral hemispheres: The role of surgery. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1996; 61: 291-296.
10. Canda MŞ, Canda T, Kabadayı T, Güner EM, Acar DÜ ve ark. Anaplastik astrositom ve glioblastom multiform'un histopatolojik ayırıcı tanısı ve prognostik önemi (33 olgu). Nörol Bil Derg 1991; 8: 24-27.
11. Canda MŞ. Nuclear DNA content of astrocytoma and grading. Aegean Med J 1983; 12: 59-74.
12. Coons SW, Johnson PC, Pearl DK. Prognostic significance of flow cytometry deoxyribonucleic acid analysis of human astrocytomas. Neurosurg 1994; 35: 119-126.
13. Litofsky NS, Hinton D, Raffel C. The lack of a role for p53 in astrocytomas in pediatric patients. Neurosurg 1994; 34: 967-973.
14. Schwedheimer K, Läufler RM, Schmahl W, Knädlseher M, Fischer H, Höfler. Expression of Neu/c-erb-2 in human brain tumors. Hum Pathol 1994; 25: 772-780.
15. Haapasalo HK, Sallinen PK, Helen PT, Rantala IS, Helin HJ, Isola JJ. Comparison of three quantitation methods for PCNA immunostaining: Applicability and relation to survival in 83 astrocytic neoplasms. J Pathol 1993; 171: 207-214.
16. Pollack IF, Campbell JW, Hamilton RL, Martinez AJ, Bozik ME. Proliferation index as a predictor of prognosis in malignant gliomas of childhood. Cancer 1997; 79: 849-856.
17. Lippitz BE, Scheitinger C, Scholz M, Weis J, Gilsbach JM, Füzesi L. Cytogenetic analysis of gliomas by insitu hybridization of stereotactic biopsy material. Acta Neurochir (Wien) 1997; 139: 22-25.
18. Kim DK, Hoyt J, Bacchi C, Keles GE, Mass M et al. Detection of proliferating cell nuclear antigen in gliomas and adjacent resection margins. Neurosurg 1993; 33: 619-626.
19. Salmon I, Kiss R. Relationship between proliferative activity and ploidy level in a series of 530 human brain tumors, including astrocytomas, meningiomas, schwannomas, and metastases. Hum Pathol 1993; 24: 329-335.
20. Barth PJ, Weingartner K, Köhler HH, Bittinger A. Assessment of the vascularization in prostatic adenocarcinoma. A morphometric investigation. Hum. Pathol 1996; 27(12): 1306-1310.
21. Folkman J, Klagsburn M. Angiogenetic factors, Science 1987; 235: 442-447.
22. Weidner N, Carroll PR, Flax R, Blumenfeld W, Fokmend J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. Am J Pathol 1993; 143 (2): 401-409.
23. Fox SB, Fowcett Y, Jackson DG, Collins I, Gatter KC et al. Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. Cancer Res 1994; 54: 4539-4549.
24. Gilcrease MZ, Truong L, Brown RW. Correlation of very late activation integrin and CD44 expression with extrarenal invasion and metastasis of renal cell carcinomas. Hum Pathol 1996; 27(12): 1355-1360.
25. Tarin D, Matsumura Y. Dearranged CD44 gene activity in malignancy. J Pathol 1993; 171: 249-250.
26. Penno MB, August TJ, Brylin SB, Mabry M, Linnoila RI et al. Expression of CD44 in human lung tumors. Cancer Res 1994; 54: 1381-1387.
27. Tanabe KK, Ellis LM, Saya H. Expression of CD44 R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastasis. Lancet 1993; 341: 725-726.
28. Hughes DE, Salter DM, Simpson R. CD44 expression in human bone: A novel marker of osteocytic differentiation. J Bone Miner Res 1994; 9(1): 39-44.
29. Nakamura H, Kenmotsu s, Sakai H, Ozawa H. Localization of CD44, the the hyaluronate reseptor on the plasma membrane of osteocytes and osteoclasts in rat tibiae. Cell-Tissue-Res 1995; 280 (2): 225-233.
30. Teder P, Versnel MA, Heldin P. Stimulatory effects of pleural fluids from mesotelioma patients on CD44 expression, hyaluronan production and cell proliferation in primary cultures of normal and mesothelial on transformed cells. Int J Cancer 1996; 67: 393-398.

31. Gross N, Beretta C, Peruisseau G, Jackson D. CD44 H expression by human neuroblastoma cells: Relation to MYCN amplification and lineage differentiation. *Cancer Res* 1994; 54(15): 4238-4242.
32. Aho R, Jalkanen S, Kalimo H. CD44 hyaluronate interaction mediates in vitro lymphocyte binding to the white matter of the central nervous system. *J Neuropathol- Exp-Neurol* 1994; 53 (3): 295-302.
33. Pilkington GJ, Akinwunmi J, Oginjenovic N, Rogers JP. Differential binding of anti-CD44 on human gliomas in vitro. *Neuroreport* 1993; 4 (3): 259-262.
34. Akiyama H, Tooyama I, Kawamata T, Ikeda K, McGeer PI. Morphological diversities of CD44 positive astrocytes in the cerebral cortex of normal subjects and patients with Alzheimer's disease. *Brain Res* 1993; 632 (1-2): 249-259.
35. Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Niccolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L. The Fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: A marker of angiogenesis. *Int J Cancer* 1994; 59: 612-618.
36. Farnoud MR, Farhadian F, Samyel JL, Derome P et al. Fibronectin isoforms are differentially expressed in normal and adenomatous human anterior pituitaries. *Int J Cancer* 1995; 61: 27-34.
37. Kaczmarek J, Castellani P, Nicolo G, Spina B, Allemani G, Zardi L. Distribution of oncofetal fibronectin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J Cancer* 1994; 58: 11-16.
38. MacLaren LA, Wildeman AG. Fibronectin receptors in preimplantation development: Cloning, expression and localization of the alpha 5 and beta 1 integrin subunits in bovine trophoblast. *Biol Reprod* 1995; 53(1): 153-165.
39. Tawil N, Wilson P, Carbenetto S. Integrins in point contacts mediate cell spreading: Factors that regulate integrin accumulation in point contacts vs focal contacts. *J Cell Biol* 1993; 120: 261-271.
40. Iruela-Arispe ML, Hasselaar P, Sage H. Differential expression of extracellular proteins is correlated with angiogenesis invitro. *Lab Invest* 1991; 64 (2) : 174-186.
41. Laitinen L, Vartio T, Virtanen I. Cellular fibronectins are differentially expressed in human fetal and adult kidney. *Lab Invest* 1991; 64(4): 492-498.
42. Rosa BL, Vielh P, Matsuura H, Clausen H, Cuadrado C, Burtin P. Distrubition of oncofetal fibronectin in human mammary tumors: Immunofluorecence study on histological sections. *Cancer Res* 1990; 50: 1608-1612.
43. Parikh DH, Tam PK, Van-Velzen D, Edgar D. The extracellular matrix components, tenascin and fibronectin, in Hirschprung's disease: An immunohistochemical study. *J Pediatr Surg* 1994; 29(10): 1302-1310.
44. Dallari S, Cavani A, Bergamini G, Girolomini G. Integrin expression in middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol Stockh* 1994; 114(2): 188-192.
45. Guarino M, Christensen L. Immunohistochemical analysis of extracellular matrix components in synovial sarcoma. *J Pathol* 1994; 172(3): 279-286.
46. Mori M, Shrestha P, Takagi H, Ogata K, Takai Y. Immunohistochemical evaluation of tenascin in benign eccrine gland tumors: Comparison with laminin and fibronectin. *J Dermatol Sci* 1995; 9(2):123-128.
47. Van-Duinen CM, Fleuren GJ, Bruijn JA. The extracellular matrix in pigmented skin lesions: An immunohistochemical study. *Histopathol* 1994; 24 (1): 33-40.
48. De-Rosa G, Barra E, Guarino M, Staibano S, Donofrio V, Boscaino A. Fibronectin, laminin, type IV collagen distrubition and myofibroblastic stromal reaction in aggressive and nonaggressive basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 1994; 16(3): 258-267.
49. Jenek R, Kruk-Zagajewska A, Zeromski J. Extracellular matrix proteins expression and incidence of tumor infiltrating cells in laryngeal carcinoma. *Pol J Pathol* 1994; 45(3):179-186.
50. Schmale MC, Gill KA, Cacal SM, Baribeau SD. Characterization of Schwann cells from normal nerves and from neurofibromas in the bicolour demselfish. *J Neurocytol* 1994; 23(11): 668-681.
51. Umezawa K, Asakura S, Jin YM, Matsuda M. Localization of vitronectin and fibronectin receptors on cultured human glioma cells. *Brain Res* 1994; 659(1-2): 23-32.
52. Canda MŞ, Güner EM, Acar ÜD, Mertol T, İçke S. Astroitoimların Daumos-Duport yöntemiyle derecelendirilmesinin prognostik önemi ve glomeruloit görülme oranı (50 olgu). *Ege Tıp Derg* 1991; 30(4): 461-466.
53. Plate KH, Breiar G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992; 359: 845-848.
54. Hilmas DE, Gillette EL. Morphometric analysis of the microvasculature of tumors during growth and after X irradiation. *Cancer* 1974; 33: 103-109.
55. Silberman MA, Partin AW, Veltri RW, Epstein JI. Tumor angiogenesis correlates with progression after radical prostatectomy but not with pathologic stage in Gleason sum 5 to 7 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1997; 79(4): 772-779.
56. Asaishi K, Endrich B, Götz A, Messmar K. Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma, A-Mel-3. *Cancer Res* 1981; 41: 1898-1904.
57. Tanigawa N, Matsumura M, Amaya H, Kitaoka A, Shimamatsuya T, Lu C, et al. Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with eosophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997; 79(2): 220-225.
58. Köhler HH, Barth PJ, Siebel A, Gerharz EW, Bittinger A. Quantitative assessmental vascular surface density in renal cell carcinomas. *Br J Urol* 1996; 77: 650-654.
59. Friedlander DR, Zagzag D, Shiff B, Cohen H, Allen JF et al. Migration of brain tumor cells on extracellular matrix proteins in vitro correlates with tumor type and grade and involves (v and (1 integrins. *Cancer Res* 1996; 56: 1939-1947.
60. Tawil NJ, Wilson P, Carbenetto S. Expression and distrubution of functional integrins in rat CNS glia. *J Neurosci Res* 1994; 39(4): 436-447.
61. Albelda SM. Biology of disease: Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 1993; 68 (1): 4-17.
62. Cohen MB, Griebing TL, Ahaghotu CA, Ridehlin OW, Ross JS. Cellular adhesion molecules in urologic malignancies. *Am J Clin Pathol* 1997; 107: 56-63.
63. Trochon V, Mabilat C, Bertrand P, LegrantY, Joffe FS. Evidence of involvement of CD44 in endotelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro. *Int J Cancer* 1993; 66: 664-668.
64. Radotra B, McCormick D, Crockard A. CD44 plays a role in adhesive interactions between glioma cells and extracellular matrix components. *Neuropathol-Appli-Neurobiol* 1994; 20(4): 399-405.
65. Tysne BB, Larsen LF, Ness GO, Mahesparan R, Edwardsen K et al. Stimulation of glioma-cell migration by laminin and inhibition by anti (3 and anti (1 integrin antibodies. *Int J Cancer* 1996; 67: 777-784.
66. Gress TM, Mall-Pillasch F, Jerch MM, Friess H, Büchler M, Adler G. Expression and insitu localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1997; 62: 407-413.