



Prostatın Benign, Premalign Ve Malign Lezyonlarında; Proliferatif Aktivite, Anjiyogenezis, Bazal Membran Ve Apoptozis'in Immunohistokimyasal Ve Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

¹ Ümran YILDIRIM

² Cemal GÜNDOĞDU

Histopathological And Immunohistochemical Evaluation Of The Proliferative Activity, Angiogenesis, Basement Membrane And Apoptosis In Benign, Premalignant And Malignant Lesions Of The Prostate

ÖZET

Prostat kansinomu (PK) erkeklerde görülen en yaygın kansinomdur. Kanserden ölüm nedenleri içerisinde, akciğer kansinomundan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Son yıllarda tanımlanan prostatik intraepitelial neoplazi (PIN), prostat kansinomunun öncül lezyonları arasında yer almaktadır. Prostat kansinomunda tanı zorluğu oluşturan PIN'in, prostat kansinomu ve benign prostat hiperplazilerinden (BPH) ayrımı önemlidir. Bu çalışmada, PIN'in BPH ve prostat kansinomu olgularında, Ki-67, CD31 ve Laminin immünreaktiviteleri ve apoptozis indeksinin ayrıntılı tanıdaki yerinin araştırılması amaçlandı. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında 1991 – 2001 yılları arasında tanı konan 50 prostat adenokarsinomu, 50 prostatik intraepitelial neoplazi ve 50 benign prostat hiperplazisi olmak üzere 150 olguya ait örnekler çalışmaya alındı. Olgulardan elde edilen parafin kesitlere immunohistokimyasal yöntemle Ki-67, CD31, Laminin uygulandı. Ayrıca apoptotik indeksini değerlendirmek için aynı olgulara ait parafin bloklardan hemotoksilen-eozin boyalı kesitler hazırlandı. Ki-67 için nükleer koyu kahverengi boyanma, CD31 için stoplazmik endotelial hücrelerin boyanması ve Laminin için ise gland epitel altındaki bazal membrandaki kesintisiz lineer boyanma pozitif olarak kabul edildi.

Ki-67 immünreaktivitesi, prostat kansinomunda en yüksek ve BPH'da en düşüktü. Ayrıca prostat kansinomu olgularında Ki-67 immünreaktivitesi, PIN olgularından anlamlı derecede yüksek iken ($p<0.001$), PIN ile BPH arasında $p<0.05$ düzeyindeydi.

CD31 immünreaktivitesi ve apoptotik indeks açısından bakıldığında, değerler en yüksek olarak prostat kansinomunda ve en düşük olarak BPH'ta izlendi. Gruplar kendi içerisinde CD31 ve apoptotik indeks açısından karşılaştırıldığında, prostat kansinomunun hem PIN ($p<0.001$) hem de BPH'tan ($p<0.001$) anlamlı derecede yüksek olduğu izlendi.

Laminin immünreaktivitesinin değerlendirilmesinde ise BPH ile PIN grupları arasında anlamlı bir fark yokken ($p>0.05$), prostat kansinomu hem PIN hem de BPH olgularından anlamlı derecede yüksek değerlere sahipti ($p<0.001$).

Sonuç olarak, PIN'in PK ve BPH'dan ayrımında Ki-67, CD31 ve apoptotik indeksin faydalı olabileceği kanısına varıldı. Laminin'in ise PK'nun, BPH ve PIN olgularından ayrımında faydalı olabileceği fakat BPH ile PIN olgularının ayrımında aynı faydayı sağlamayacağı kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Prostat, Anjiyogenezis, Ki-67, CD31 ve Laminin

ABSTRACT

Prostate carcinoma (PC) is the most common malignancy among males and it is the second most common cause of death due to cancer (after lung cancer) in men. Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) is a premalignant lesion described recently. The differentiation of PIN from BPH or PC is important. In this study, it was aimed to investigate the place of Ki-67, CD31, Laminin immunoreactivities and apoptotic index in the differentiation of PIN (accepted as a precursor lesion of PC) from BPH or PC.

A total of 150 specimens (50 PC, 50 PIN and 50 BPH cases) which were evaluated and diagnosed in the Department of Pathology, Medical Faculty, Atatürk University between 1991 – 2001 were included in the study.

Ki-67, CD31 and Laminin were applied to the paraffin sections with immunohistochemical method. Additionally H&E stained sections were prepared from paraffin blocks from the same cases for the evaluation of apoptotic index. The staining was accepted as positive for Ki-67 if dark-brown stained nucleus is present, for CD31 if cytoplasm of endothelial cells are stained, and for Laminin if continuous linear staining of basal membrane under the prostatic glandular epithelium is observed.

¹ Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Düzce

² Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum

Submitted/Başvuru tarihi:
09.02.2011

Accepted/Kabul tarihi:
23.03.2011

Registration/Kayıt no:
11 02 188

Corresponding Address
/Yazışma Adresi:

Dr. Ümran Yıldırım
Düzce Üniversitesi
Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Düzce
E-Mail:umran25@hotmail.com

© 2012 Düzce Medical Journal
e-ISSN 1307- 671X
www.tipdergi.duzce.edu.tr
duzcetipdergisi@duzce.edu.tr

Ki-67 immunoreactivity was the highest in PC group and the lowest in the BPH group. Moreover, while Ki-67 immunoreactivity was significantly higher in PC group than in PIN group ($p<0.001$), the difference between PIN and BPH was $p<0.05$.

Both CD31 immunoreactivity and apoptotic index were found to be the highest in PC group and the lowest in BPH group. In the comparison of groups, PC group had higher CD31 immunoreactivity and apoptotic index values than in both PIN ($p<0.001$) and BPH ($p<0.001$) did.

As a conclusion, it was suggested that Ki-67, CD31 immunoreactivities and apoptotic index were useful in the differentiation of PIN from BPH and PC. For Laminin, although it may be useful in the differentiation of PIN from PC, it cannot be used for PIN – BPH differentiation.

Key words: Prostat, Angiogenesis, Ki-67, CD31 and Laminin

G R

Prostat karsinomu (PK) erkeklerde en sık görülen kanser olup (50 ya üzerinde %14–46), akci er kanserinden sonra ölümlerin ikinci en sık sebebinin olu turmaktadır. PK nükleuslardaki de i ikliklere ve bez yapısının gösterdi i dizilime göre histolojik olarak çe itli ara tırmalar tarafından derecelendirilmi tir. Günümüzde en sık kullanılan ve tercih edileni Gleason sistemidir (1, 2).

P N son dekatta tanımlanan ve prostat karsinomunun öncül lezyonu oldu u tüm dünyaca kabul edilen bir lezyondur. PK'nun en sık görüldü ü bölgelerde P N lezyonlarının da fazlaca görülmesi ve gerek genotipik gerekse fenotipik yapılan çalı malarda oldukça yakın benzerlikler göstermesi bu teoriyi destekleyen en önemli çalı malardır (3–6).

BPH prostat dokusunun en sık görülen benign lezyonları arasındadır. 60 ya ı üzerindeki erkeklerin %30'unda görülmektedir (1). Çe itli çalı malarda, benign prostat hücrelerine göre malign prostat hücre nükleuslarında Ki–67 ve PCNA gibi proliferatif belirleyicilerin artımı ekspresyonları gösterilmi tir. Yine bu belirleyicilerin artımı ekspresyonları, benign epitelin yanısıra P N lezyonlarında da izlenmi tir. Yüksek dereceli P N'deki ekspresyon invaziv adenokarsinomda gözlenene benzemektedir.

Ba dokusu ile di er dokuların arasında makromoleküllerin de i toku unu sınırlayan veya düzenleyen bariyer bazal membran olarak tanımlanmaktadır. Tümörün invazyonu için bazal membranı parçalaması ve geçmesi önemlidir. BPH ve P N lezyonlarında bazal membran intakt iken PK'da iyi diferansiye olan bir kısım hariç, bazal membran bütünlü ü bozulmu tur (1, 8).

BPH, P N ve PK olguları arasında bazen ciddi ekilde ayırıcı tanı problemlerinin ya anması ve P N lezyonlarının görüldü ü bölgeler kom ulu unda PK odakları bulunma olasılı mın yüksek olması dolayısıyla; lezyonların birbirinden ayrımı veya progresyonun gösterilmesinde Ki–67, CD31, laminin ve apoptotik indeksin yerini ara tırdık.

MATERYAL METOD

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D'ında 1991–2001 yılları arasında BPH 50, P N 50 ve PK'lu 50 olgu de erlendirmeye alınımı olup materyallerin 47 tanesi açık prostatektomi, 39 tanesi Transüretal Rezeksiyon (TUR) ve 64 tanesi tru-cut biyopsi eklindeydi.

Vakalara ait preparatlar ar ivden çıkarılarak tekrar gözden geçirilmi ve histopatolojik tanıları do rulanımı tir. Olguların en iyi örnekleri i preparatlar seçilerek bunlara ait parafin bloklardan 5 mikron kalınlı nda kesitler poli-L-lizin ile kaplı lamlara alınarak immünohistokimyasal boyama için oda ısısında en az 24 saat bekletilmi tir. Ayrıca apoptozisi de erlendirmek için de olgulara ait bloklardan H&E boyalı preparatlar hazırlanımı tir. Hazırladı ımız kesitlere proliferatif aktivite için Ki–67, anjiogenesis için CD31, bazal membran için Laminin antikoları ile immünohistokimyasal boyama uygulanımı tir.

mmunohistokimyasal Boyama

mmün boyama peroksidaz ile i aretlenmi streptavidin-biyotin yöntemi kullanılarak yapılmı tir. mmünohistokimyasal boyama i lemne geçmeden önce, oda ısısında en az 24 saat bekletilen kesitler 20 dk ksilde bekletilerek deparafinize edilmi tir. Daha sonra %96'lık alkolden ba layarak %70'lik alkole dek alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilmi tir. Bu a amadan sonra Ki–67, CD31, Laminin antikoları uygulanacak deparafinize kesitler immünohistokimyasal boyama öncesinde sitrat tampon solüsyonu (10mM, pH 6) içinde özel kaplara yerle tirilerek, mikrodalga fırında 3 kez 5'er dk süreyle kaynatılmı ve böylece epitopun açılma çıkması sa lanımı tir. Kesitler bundan sonra 15–20 dk süre ile oda ısısında so umaya bırakılmı tir. So uma i leminden sonra kesitlerin çevresi damlatılacak antikoların ve solüsyonların dokuların üzerinde kalmasını sa lamak amacıyla sınırları kalemle çerçeve içine alınımı tir. Daha sonra kesitler önceden hazırlanan pH'sı 7.2 phosphate-buffered saline (PBS) solüsyonunda 5 dk yıkanımı tir. Daha sonra ise kesitlerin üzerine %3'lük hidrojen peroksidaz aktivitesi bloke edilmi tir. Böylece primer antikör için hazır hale gelmi tir. Sonrasında izlenen basamaklar ise öyledir:

1. Kesitler üzerine Ki–67, CD31, Laminin primer antikoları damlatılarak tüm kesit yüzeyini kaplaması sa lanımı ve oda ısısında 30 dk beklenmi tir.
2. PBS'de 5 dk yıkanarak ba lanmamı antikoların uzakla ması sa lanımı tir.
3. Kesitlere ba layıcı biyotinize sekonder antikordan damlatılmı 5 dk beklenmi tir.
4. Kesitler 5 dk PBS de bekletilmi tir.
5. Streptavidin peroksidaz solüsyonu kesitler üzerine

damlatılarak 5 dk beklenmi tir.

6. Kesitler 5 dk PBS banyosunda tutulmu tur.

7. Peroksidaz aktivitesini göstermek için kromojen olarak 3,3'diaminobenzidinetetraklorür (DAB) solüsyonundan kesitler üzerine damlatılmı , kahverengi renk gözlenene dek beklenmi , sonra kesitler çe me suyunda yıkanmı tir.

Daha sonra kesitlerde zıt boyama sa lamak için Mayer hematoksilen kullanılmı tir. Çe me suyunda yıkandıktan sonra %70'lik etil alkolden %96'lık alkole kadar dizilerden geçirilerek alkolde 20 dk bekletilmek suretiyle effaflanma sa lanmı ve Entellan (Merc) damlatılarak kapatılmı tir.

mmunreaktivitenin De erlendirilmesi

Ki-67 ndeksinin (Proliferatif Aktivitenin) De erlendirilmesi

Çalı mamızda 150 vaka de erlendirilmı tir. Pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanılmı tir. Uygulanan Ki-67 immunohistokimyasal yöntemiyle koyu-kahverengi nükleer boyanma pozitif olarak de erlendirilmı tir. Yo un boyanma gösteren alanlarda 400'lük büyütmede 10 farklı alanda ortalama 500-1000 hücre sayıldı. Ki-67 indeksini belirlemede pozitif boyanan hücrelerin boyanmayan hücrelere oranları yüzde olarak belirtildi.

CD31 ve Damar Yo unlu unun De erlendirilmesi

Çalı mamıza aldı ımız 50 BPH, 50 P N ve 50 PK olgusuna uygulanan CD31 immunohistokimyasal boyamasında mikrodamar yo unlu u ve mikrodamar sayısı belirlenmeye hazır hale getirilmı tir. Pozitif kontrol olarak kronik iltihabi granülasyon dokusu kullanılmı tir. Sitoplazmik boyanma pozitif olarak kabul edilmı tir. Hazırlanan kesitlerde anjiogenez, Weidner tarafından meme karsinomlarında kullanılmı oldu u metod kullanılarak de erlendirildi. Bu kesitler önce küçük büyütmede (X 100) tarandı. BPH, P N ve intratümöral olarak neovaskülarizasyonun en yo un oldu u alanlar (hot spot) saptanarak X 200 büyütmede (20 x objektif, 10 x oküler; 0,785 mm2) mikrodamar sayısı olarak belirlendi.

Apoptozisin De erlendirilmesi

Seçilen vakalarımıza ait H&E kesitler histopatolojik olarak de erlendirildi. Apoptotik cisimcikler BPH ve P N olgularında bazal tabaka ile luminal hücrelerde de erlendirilirken kanser olgularında histolojik paterne göre de erlendirilmı tir. H&E kesitlerde yukarıda bahsedilen alanlarda görülen apoptotik cisimcik, apoptotik cisimcik fagosite etmi makrofajlar ve yarımam formasyonlu nükleer kondansasyon gösteren hücreler sayılarak 1000 adet hücredeki oranları yüzde olarak hesaplandı.

Bazal Memranın De erlendirilmesi

Çalı mamıza aldı ımız tüm olgulara Laminin

immunohistokimyasal boyası uygulandı. Prostat gland epiteli altında kesintisiz lineer boyanma pozitif olarak kabul edildi.

statistisel nceleme

Tüm olguların de erlendirilmesinde istatistiksel olarak sırasıyla; One-Way ANOVA analiz testi, X2 testi, Kruskal-Wallis, Mann-Withney ve Spearman korelasyon testleri uygulanmı tir.

BULGULAR

ncelenen 50 adet BPH olgusunun ya ortalaması 65.7 olup ya lar 58 ile 82 arasında de i iyordu 50 adet P N olgusunun ya ortalaması 67.2 olup ya lar 60 ile 87 arasında de i iyordu. 50 adet PK olgularının ya ortalaması ise 68.2 olup ya lar 61 ile 83 arasında de i iyordu (Tablo 1).

Çalı mamıza aldı ımız BPH, P N ve PK olgularının 47 tanesi açık prostatektomi, 39 tanesi TUR, 64 tanesi ise tru-cut biyopsi materyallerinden olu maktaydı (Tablo 2).

mmunohistokimyasal Özellikler

Çalı mamızda seçilen olgulara Ki-67, CD31 ve Laminin immunohistokimyasal boyamaları uygulandı.

Ki-67 De erlendirmesi

Çalı mamıza alınan olgulara Ki-67 immunohistokimyasal boyaması uygulandı ve nükleer koyu-kahverengi granüler boyanma pozitif olarak kabul edildi. BPH'de özellikle bazal hücre tabakasında olmak üzere çok az sayıda boyanma tespit edildi. P N olgularında BPH'den biraz daha yüksek oranda olmak üzere, bazal hücreler ile az olarak ta stromal hücrelerde pozitif boyanma izlendi. Yüksek dereceli P N'de ise hem bazal hücre tabakasında hem de luminal hücrelerde pozitif boyanma görülürken stromada da birkaç adet boyanma gösteren hücre tespit edildi. PK olgularında, özellikle iyi diferansiye olanlarda boyanma yüzdesi oldukça dü ük oranda tespit edildi. Orta ve az diferansiye prostat karsinomlarında ise önceki

Tablo 1. Olguların histolojik tanı, sayı, ya ortalamaları ve ya da ılımı

Histolojik Tanı	Olgu Sayısı	Yaş Ortalaması	Yaş Dağılımı
BPH	50	65.7	58-82
PİN	50	67.2	60-87
PK	50	68.2	61-83

BPH: Benign Prostat Hipertrofisi P N: Prostatik ntraepitelial Neoplazi PK: Prostat Karsinomu

Tablo 2. Olguların Alını Yöntemine Göre Da ılımı

Prostat	Açık Prostatektomi	TUR	Tru-cut Biyopsi
BPH	15	13	22
PİN	12	17	21
PK	20	9	21

TUR: Transuretral rezeksiyon, BPH: Benign Prostat Hipertrofisi, P N: Prostatik ntraepitelial Neoplazi, PK: Prostat Karsinomu

Tablo 3. Olguların Ki-67 immunboyanma oranları

Olgu No	BPH	PIN	PK
1	1.9	1.9	7.3
2	0.8	2.3	5.8
3	2.2	3.1	7.0
4	1.8	3.7	11.3
5	0.5	1.8	6.0
6	1.1	2.3	8.2
7	1.7	1.8	30.0
8	1.5	2.1	12.0
9	0.9	1.6	11.2
10	1.2	2.6	15.3
11	0.7	3.2	12.0
12	1.7	3.5	14.6
13	0.6	1.7	19.3
14	2.0	1.8	6.2
15	1.3	2.0	6.5
16	1.1	2.3	8.2
17	0.8	1.7	7.8
18	1.2	2.2	11.5
19	0.7	1.1	13.2
20	1.3	3.0	9.0
21	2.0	2.8	18.6
22	1.2	3.5	12.0
23	0.5	2.2	13.4
24	0.8	3.1	19.8
25	1.0	2.2	10.1
26	0.7	1.3	16.6
27	0.7	3.0	9.0
28	1.0	2.4	15.7
29	0.6	1.7	12.0
30	0.5	1.6	6.2
31	2.0	1.8	8.2
32	1.2	3.5	11.2
33	1.2	2.3	6.5
34	0.7	1.8	12.9
35	1.1	3.5	14.5
36	0.6	2.6	19.5
37	1.2	2.8	12.0
38	1.5	3.0	9.9
39	1.8	2.2	11.2
40	2.0	2.9	13.5
41	0.8	3.5	12.6
42	1.5	2.2	6.8
43	1.3	2.5	10.0
44	1.3	2.1	16.1
45	1.0	1.9	14.4
46	0.6	2.6	13.7
48	1.5	2.9	11.1
49	0.7	2.7	19.1
50	0.5	2.0	9.9
Ortalama Değer	1.13	2.37	11.7

BPH: Benign Prostat Hipertrofisi, PIN:Prostatik ntraepitelial Neoplazi, PK:Prostat Karsinomu

Tablo 4. Prostat Karsinomlu Olguların Ki-67 immunboyanma oranları (PS=Gleason Patern Skoru)

Olgu No	PS 5 (%)	PS 6(%)	PS 7(%)	PS 8(%)	PS 9(%)
1	7.5	11.3	19.5	12.0	30.0
2	5.8	5.5	14.6	14.5	28.0
3	7.0	8.2	15.0	15.0	25.5
4	6.7	6.5	15.3	17.0	28.0
5	6.6	6.2	17.0	14.0	29.0
6	5.6	6.7	13.0	14.0	
7	8.2	5.5	12.5	13.9	
8	6.9	6.0	15.0	13.0	
9	7.1	7.5	12.3	14.5	
10	7.5	8.0	13.3		
11		7.4	13.2		
12		8.7	15.5		
13		6.0	15.0		
Ortalama Değerler	6.89	7.19	14.71	14.24	28.10

gruplara nazaran daha yüksek oranda pozitif boyanma izlendi.

BPH olgularında pozitiflik sergileyen hücrelerin oranı %0.5-2.2 (ortalama değer %1.33±0.55) de erleri arasında bulundu. P N olgularında bu oran %1.6-3.7 (ortalama değer %2.36±0.70) de erleri arasında bulundu.

Prostat karsinomu olgularında ise oran histolojik paterne göre de iklilik göstermekle birlikte %5.5-30 (ortalama değer %11.51±6.54) de erleri arasında tespit edildi (Tablo 3). BPH ve P N olguları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık sergilediği izlendi (p<0.05). Kanserli grubun her iki gruba karşılaştırılmasında ise farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (p<0.001). Gruplar arasındaki Ki-67 indeksinin anlamlılığı One-way ANOVA testi ile araştırıldı ve artışın anlamlı olduğu görüldü (p<0.001).

Tablo 5. BPH, PIN, PK olgularında mikrodamar sayısı

Olgu No	BPH	PIN	PK
1	20	38	75
2	25	45	61
3	18	25	55
4	16	26	59
5	14	29	49
6	10	38	46
7	11	32	44
8	24	35	67
9	19	29	54
10	10	36	67
11	13	34	53
12	15	28	50
13	21	35	51
14	19	44	47
15	17	24	43
16	12	26	66
17	22	19	49
18	17	39	58
19	15	29	69
20	23	41	71
21	16	43	74
22	11	29	56
23	16	43	75
24	18	27	55
25	20	31	59
26	19	26	64
27	21	33	57
28	13	30	42
29	11	25	25
30	10	33	60
31	15	12	59
32	12	45	45
33	18	27	72
34	20	24	39
35	15	32	65
36	16	29	58
37	17	22	71
38	17	30	69
39	19	19	25
40	20	32	54
41	21	40	44
42	19	35	69
43	20	22	71
44	14	30	74
45	21	21	56
46	18	27	75
47	14	33	55
48	17	35	59
49	11	26	64
50	15	19	57
Ortalama Değer	16.50	30.60	57.64

BPH: Benign Prostat Hipertrofisi, PIN:Prostatik ntraepitelial Neoplazi, PK:Prostat Karsinomu

Karsinom olgularında ise diferansiyasyon azaldıkça Ki-67 indeksinin arttığı görüldü (Tablo 4). Bu artışın patern skorunun yüksekliği ile ilgili istatistiksel olarak Spearman Korelasyon testi ile araştırıldı ve proliferasyon aktivitesi ile kanserli dokunun patern skoru arasında güçlü (r=0.80), aynı yönde ve geçerli (p<0.001) bir ilişki saptandı.

CD31 Değerlendirmesi

Çalışmamıza alınan olguların değerlendirilmesi sonucu mikrodamar yoğunluğu BPH olgularında ortalama olarak 16.50 mikrodamar /0.785 mm², P N'de 30.60 mikrodamar /0.785mm², PK'da ise 57.64 mikrodamar /0.785 mm² olarak bulundu (Tablo 5).

Elde edilen sonuçlara göre; BPH ve P N, P N ile PK ve PK ile BPH gruplarının karşılaştırılmalarında tüm gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı olarak bulundu (p<0.001).

Ayrıca mikrodamar yoğunluğu PK olgularında histolojik tipe göre böyle belirlendi: Grade I olgularda 52.1, grade II olgularda 65.3, grade III olgularda 73.0 olarak değerlendirildi. Histolojik grade'in artmasıyla mikrodamar yoğunluğunda artış olmakla birlikte bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Lamininin Değerlendirilmesi

Çalışmamıza alınan olgulara yapılan Laminin immunohistokimyasal boyamasında gland epiteli altında kesintisiz lineer boyanma pozitif olarak kabul edildi.

Tablo 6. BPH, P N ve PK olgularında Laminin De erlendirmesi

Prostat	Laminin			
	Pozitiflik Oranı (%)	(+) Olgu Sayısı	Negatiflik Oranı (%)	(-) Olgu Sayısı
BPH	% 94	47	% 6	3
PIN	% 92	46	% 8	4
PK	% 12	6	% 88	44

BPH:Benign Prostat hipertrofisi, PIN:Prostatik intraepitelial neoplazi, PK:Prostat Karsinomu

Tablo 7. Bazal, ntermedier, Luminal Hücre Tabakalarında Apoptotik Oranları

	Bazal Tabaka	İntermedier Tabaka	Luminal Tabaka
BPH	0.5	0.2	0.1
PIN Low	0.8	0.6	0.5
PIN High	1.1	0.8	0.7
PK cribriform patern	1.8	1.2	0.9
PK solid patern	2.3	2.2	2.2

BPH:Benign Prostat Hipertrofisi, PIN High:Prostatik ntraepitelial Neoplazi Yüksek dereceli, PIN Low:Prostatik ntraepitelial Neoplazi Düşük dereceli, PK:Prostat Karsinomu

mmunohistokimyasal olarak Laminin ile immunboyanma BPH ile P N olgularında kesintisiz lineer ekilde izlenmi olup glandlar çevresindeki bazal membranlar intakt olarak de erlendirilmi tir. Hatta bazı iyi diferansiye karsinomlarda dahi laminin pozitif olarak de erlendirilmi tir. PK olgularında ya hiç boyanma görülmedi veya kesintili ekilde izlendi (Tablo 6). BPH ve P N olgularına ait bulgular benzer özellikte olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamı tır ($p<0.69$). PK ile P N ve BPH olgularının kar ıla tırılmasında tespit edilmi olan fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmu tur ($p<0.001$).

Histopatolojik De erlendirme; Apoptozisin De erlendirilmesi

Elde edilen apoptotik cisimcik yüzdelerinin epiteliyal hücre tabakalarına göre da ılımı ise öyle tespit edildi (Tablo 7). Çalı mamıza aldı ımız olgulara ait hazırlanan H&E kesitlerde, bazal hücre tabakasından luminal hücrelere do ru izlenen apoptotik cisimcikler sayıldı. Tüm hücresele alanlarda apoptotik cisimcik yüzdesi ortalama olarak; BPH olgularında %0.5, P N olgularında %0.9, PK olgularında ise %1.5 olarak de erlendirildi (Tablo 8). Yukarıda elde edilen verilere Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney istatistiksel testleri uygulanmı tır. Kruskal-Wallis'e göre gruplar içerisinde yalnızca PK cribriform paternde anlamlı derecede farklılık izlenirken ($p<0.04$), Mann-Withney analizine göre ise sadece BPH olgularındaki hücre tabakaları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık tespit edilmi tir ($p<0.0001$).

Elde edilen bu sonuçlara göre PK'nun BPH ile PK'nun P N ile ve P N olgularının BPH ile kar ıla tırılmasında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$).

TARTI MA

Prostat karsinomu, ya la birlikte artı göstermekle birlikte erkeklerde kanserden ölümlerin ikinci sık sebebidir (9, 10). Her geçen gün yaygınla an erken

Tablo 8. BPH, PIN, PK olgularında Apoptotik İndeks Yüzdeleri

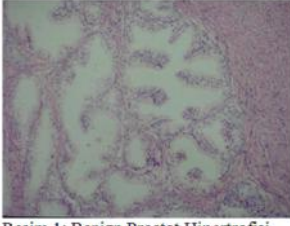
Olgu Sayısı	Apoptotik Cisimcik (%)		
	BPH	PIN	PK
1	0.6	0.9	1.0
2	0.2	0.8	0.9
3	0.5	0.9	2.2
4	0.8	0.9	1.4
5	0.2	1.0	1.3
6	0.5	1.0	2.0
7	0.3	1.0	1.9
8	0.5	0.9	1.2
9	0.7	1.0	1.4
10	0.6	0.8	1.5
11	0.2	0.9	1.7
12	0.4	0.9	2.1
13	0.6	0.8	2.1
14	0.5	0.9	0.9
15	0.3	1.0	0.9
16	0.6	1.0	1.2
17	0.4	1.0	1.0
18	0.5	0.8	1.0
19	0.2	0.9	1.2
20	0.7	0.9	1.0
21	0.1	0.9	1.0
22	0.8	1.0	2.0
23	0.7	1.0	1.4
24	0.4	0.9	1.4
25	0.3	0.8	0.9
26	0.2	0.9	2.2
27	0.5	0.8	2.2
28	0.6	0.8	1.1
29	0.4	1.1	1.0
30	0.6	1.0	1.0
31	0.5	0.9	1.7
32	0.6	0.9	1.4
33	0.5	1.1	1.2
34	0.5	1.0	1.3
35	0.3	1.1	1.7
36	0.5	0.9	1.8
37	0.3	0.8	1.9
38	0.4	0.9	2.0
39	0.5	1.0	2.2
40	0.6	0.9	2.0
41	0.4	1.0	1.7
42	0.5	0.6	1.6
43	0.3	0.7	1.5
44	0.6	0.8	1.4
45	0.6	0.9	1.7
46	0.6	0.9	2.2
47	0.5	0.8	1.9
48	0.5	1.0	2.0
49	0.4	1.0	2.0
50	0.2	1.1	0.9
Ort Değer	0.5	0.9	1.5

tarama ve ileri tanı yöntemleri ile prostat karsinomunun tanınmasının gittikçe daha kolay olması da sıklı ının artmasında önemli bir faktör olarak rol oynar.

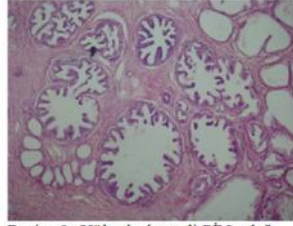
Son yıllarda tanımlanan prostatik intraepitelial neoplazi, prostat karsinomu ile yakın ili kisinden dolayı klinik olarak çok önem kazanmı tır. Günümüzde üroloji prati inde yapılan i ne biyopsilerinin %16.5'dan fazlasında PIN'e rastlanmaktadır (11).

Adenokarsinomun prostatın daha ziyade periferik bölgesinden kaynaklanması ve P N'in de yine bu bölgede çokça ortaya çıkması ayrıca yapılan histokimyasal, immunohistokimyasal ve genetik veriler P N ile karsinom arasında yakın ili ki bulundu unu göstermektedir (12).

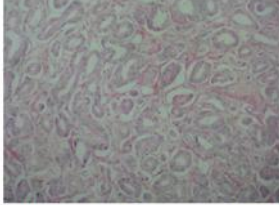
Tümöral olguların proliferasyonunu ara tıran çalı malarda, öncelikle normal dokuya ait hücre davranı ının tanımlanmı olması gerekmektedir. Ancak normal prostat dokusunda proliferasyon hareketlerini ara tıran çok az çalı ma vardır (13–15). P N'li olgularda proliferasyon aktivitesini belirlemeye yönelik kısıtlı sayıda çalı ma yapılmı tır (15–17). Tamboli'nin Ki-67 antikoru ile prostat dokusunda yapmı oldu u çalı manın bir grubunu da P N'li vakalar olu turmaktadır. Ara tırmacı bu grupta %2.5'luk bir Ki-67 indeksi bildirmi tir (16). Yüksek dereceli P N olgularında çalı an Feneley ise proliferasyon oranını %2.58 bulmu tur (15). Biz de



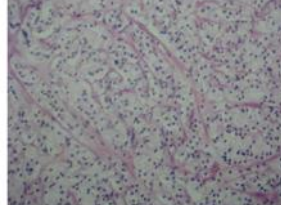
Resim 1: Benign Prostat Hipertrofi



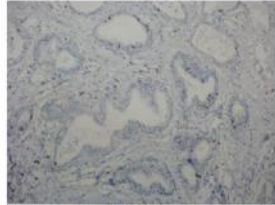
Resim 2: Yüksek dereceli PIN odağı (H&E 4x10)



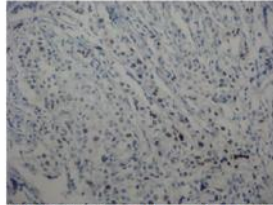
Resim 3: Grade I Prostat Adenokarsinomu H&E (10x10)



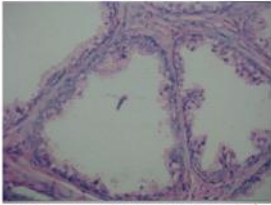
Resim 4: Grade III Prostat Adenokarsinomu H&E (20x10)



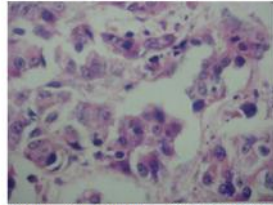
Resim 5: Yüksek dereceli PIN odağında Ki-67 immun reaktivitesi (20x10)



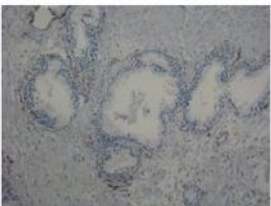
Resim 6: Prostat adenokarsinomunda Ki-67 immun reaktivitesi (20x10)



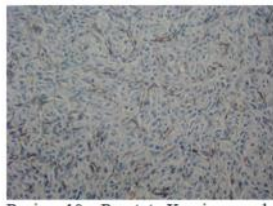
Resim 7: Yüksek dereceli PIN odağında apoptotik hücreler H&E (20x10)



Resim 8: Prostat Karsinomunda apoptotik hücreler H&E (40x10)



Resim 9: Yüksek dereceli PIN'de CD31 immun reaktivitesi



Resim 10: Prostat Karsinomunda CD31 immun reaktivitesi (10x10)

çalışmamızda P N'li olgularda %2.33'lük bir Ki-67 indeksi elde ettik (Tablo 1).

Prostat kanserinin proliferasyon aktivitesinin incelenmesi ve Gleason skoru ile ilişkisinin açıklanmasına yönelik çalışmalarında genel olarak Gleason skoru ile paralel artış gösteren proliferasyon aktivitesi sonuçları bildirilmiştir (18, 19). Gleason patern skoru 5-9 olan prostat kanserli grupta %11.5'lük bir proliferasyon aktivitesi elde edildi ve

Ki-67 indeksinin malignite artışı ile paralellik gösterdiği tespit edildi (Tablo 2).

Bugüne kadar prostat lezyonlarında Ki-67 ile yapılmış olan proliferasyon aktivitesi çalışmaları sonucunda normal prostat dokusunun düşük proliferasyon gösterdiği, buna karşılık malignite derecesinin artışı ile Ki-67 indeksinin yükseldiği kabul edilmektedir. Ancak bu çalışmaların sonucunda ortak bir Ki-67 indeksi belirlenememi ve bunun nedeni olarak uygulanan farklı immunohistokimyasal teknikler gösterilmiştir (19-22).

Çalışmamızda ise P N ile BPH olguları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak tespit edilen anlamlı farklılık, PK'nın, BPH ve P N ile karşılaştırılmasında da izlendi ($p<0.001$). Gleason paternine göre Ki-67 indeksi de değerlendirildiğinde ise, tümör diferansiyasyonu arttıkça indeksin de artışı gösterdiği tespit edildi.

Anjiogenez, yeni damar oluşumu (neovaskülarizasyon) demektir. Birçok solid neoplazilerin büyümesinde ve progresyonunda önemli bir faktördür. Kanser metastazında, tümör hücreleri ve neoplastik olmayan damarsal yapı ile immun sistem ve bağışıklık doku arasında iletişimi etkilemektedir (23).

Tümör anjiogenezinin değerlendirilmesi için tüm vasküler endotel hücrelerine özgü olarak saptanan çeşitli antikorlar bulunmaktadır. CD31'in, hem Faktör VIII hem de CD34'den daha fazla oranda boyanma gösterdiği ve daha duyarlı olduğu saptanmıştır (24). CD31 bir hücre adezyon molekülü olup endo CAM (endothelial cell adhesion molecule) ya da PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule) olarak da bilinmektedir (25). Biz de çalışmamızda daha duyarlı olan CD31'i kullanmayı tercih ettik.

Bostwick ve arkadaşları kanserden sonra prostatın diğer proliferatif lezyonlarında da mikrodamar yoğunluğunu araştırmışlar ve BPH'nin belli histolojik tiplerinde vaskülarizasyonun arttığını tespit etmişlerdir (1). Sonuç olarak BPH'nin epitelyal nodüllerinde yüksek dereceli karsinoma yakın ölçüde neovaskülarizasyonun izlenmesi dolayısıyla, epitelyal nodüllerdeki bu kaydadeğer vaskülarite artısının, anjiogenezin etkisinin BPH'nin erken dönemlerinden itibaren bağlaşılabileceğinin göstergesi olabilir (1).

Biz de çalışmamızda PK olgularında izlenen mikrodamar yoğunluğunun, P N ve BPH olgularına göre daha yüksek sayıda olduğu tespit edildi ($p<0.001$). P N ve BPH olguları arasında da istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulundu ($p<0.001$). Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre CD31'in BPH, PIN ve PK olgularının ayırıcı tanısında faydalı

sa layabilece i sonucuna vardık.

Normal prostat dokusundaki hücre ölümüyle hücre proliferasyonu arasındaki hassas bir denge vardır (26). Apoptotik cisimcikler, prostat duktus ve asinuslarında genel olarak epitel içerisinde intersellüler alanda veya ara sıra da epitelial hücre sitoplazmalarında izlenmektedir (27).

Montironi ve arkadaşları yaptıkları çalışmaları düük dereceli P N'lerdeki apoptotik cisimcikler hemen hemen BPH'a benzer sonuçlar ortaya koyarken, yüksek dereceli P N'lerdeki apoptotik cisimciklerin ise PK'nun bazı tipleriyle yakınlık gösterdi ini ortaya koymu tur (27).

Hausler ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada apoptotik cisimciklerin BPH'da P N ve PK ya göre daha düük oranda olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca yüksek dereceli P N olgularıyla yüksek dereceli PK (Gleason Patern 7-10) olgularının apoptotik indekslerinin aynı olduğunu, düük dereceli P N ile düük dereceli PK olgularının ise hemen hemen benzer sonuçlar gösterdi ini bulmuşlardır (28).

Elde edilen bu değerlere göre BPH olgularında hesaplanan apoptotik indeksinin P N olgularıyla karşılaştırılmasında istatistiksel olarak tespit edilen anlamlı farklılık, P N ve PK olguları ile BPH ve PK olguları arasında da bulunmuştur ($p<0.001$).

Yapılan tüm çalışmalarda ortaya atıldığı gibi prostat glandlarındaki, edinilmiş DNA anomali içeren hücre veya anormal hücre bölünmesinin varlığı yani apoptotik cisimcikler, BPH lezyonlarının P N'e ilerleyişi gösterebileceğini veya P N lezyonlarının karsinoma dönüşümünü gösterebilir (27).

Laminin, aslında vasküler ve epitelial bazal membranlarda bulunan ve parankim hücreleriyle bağ dokusunu birleştiren bir proteindir (29). Tümör hücresinin invazyonunun önemli aşaması bazal membranın penetrasyonudur (30).

Maatta ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaları diffüz gastrik karsinoma ve memenin infiltratif karsinomu hariç birçok karsinomda epitelial tümör hücre kümeleri çevre kesintisiz bir bazal membranla çevrili olarak bulunmakla beraber, hem normal dokularda hem bazı malignansilerin bazal membranlarında sınırlı veya hiç harabiyet olmadığını tespit etmişler. Bunun yanı sıra memenin intraduktal karsinomu, over ve tiroid karsinomlarında bazal membranlarda orta derecede bir harabiyet tespit etmişlerdir. Diğer tip karsinomların (dil, mide ve kolon) ise immunoreaktivite göstermediğini yani lamininin mevcut olmadığını gözlemişlerdir (31).

Hinderman ve arkadaşları ürotelial karsinomlarda yaptıkları bir çalışmada, bazal membranlardaki

laminin kaybının ölüm riski artışı ile ilişkili gösterdiğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak lamininin, ürotelial karsinomların diagnostik bir göstergesi olarak gösterilebileceğini ileri sürmüşlerdir (32).

Prostat dokusunda bazal membranı, normal prostat glandları çevresinde izlerken P N ve çoğu iyi diferansiye adenokarsinomlarda da sağlam olarak görebilmekteyiz (1).

Bostwick, düük ve yüksek dereceli P N olgularında tanısal histopatolojik kriterlerini sıralarken bazal membranın heriki durumda da sağlam olduğunu belirtmiştir. Buna göre bazal membranda meydana gelen bütünlük kaybı invazyon lehine bir bulgudur.

Yaptığımız çalışmada laminin boyamasında BPH ve P N olguları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken, bu iki lezyonun PK ile karşılaştırılmasında ise farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$).

Bu sonuçlara göre P N ve PK olgularının ayırıcı tanısında ya da benign – malign ayrımı yapılamayan olgularda Ki-67, apoptotik indeks, CD31 ve lamininin kullanılması yol gösterici olabilir.

KAYNAKLAR

1. Bostwick DG, McNeal JE. Pathology of the Prostat. London: W. B. Saunders Company; 1998:100.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin. 2009;59:225-49.
3. Braver MK. Prostatic intraepithelial Neoplasia: A Premalignant Lesion. Hum.Pathol. 1992;23:242-8.
4. Montironi R, Schulman CC. Precursors of Prostatic cancer. Progression and Chemoprevention. Eur Urol. 1996;30:133-7.
5. Qian J, Wollan P, Bostwick DG. The extent and multicentricity of high grade prostatic intraepithelial neoplasia in clinically localized prostatic adenocarcinoma. Hum Pathol. 1997;28: 143-8.
6. Galluzi CM, Loda M. Molecular events in the early Phases of prostate carcinogenesis. Eur Urol. 1996;30:167-76.
7. Myers RB, Grizzle WE. Biomarker expression in prostatic intraepithelial neoplasia. Eur Urol. 1996;30:153-66.
8. Maatta M, Virtanen I, Burgeson R, Harmainen HA. Comparative Analysis of the Distribution of Laminin Chains in the Basement Membranes in Some Malignant Epithelial Tumors: The α 1 Chain of Laminin Shows a Selected Expression Pattern in Human Carcinomas. J Histochem Cytochem. 2001;49:711-26.
9. Cotron RS, Kumar V, Robins SL. Male genital system. In pathologic Basis of Disease 4th. Edition. Philadelphia: Saunders Company; 1989:1099-126.
10. Bostwick DG. Grading Prostate cancer. Am J Clin Pathol. 1994;102(suppl):38-56.
11. Bostwick DG, Qian J, Frankel K. The incidence of high grade prostatic intraepithelial neoplasia in needle biopsies. J Urol. 1995;154:1791-4.
12. Bostwick DG. Prospective origins of prostate carcinoma. Cancer. 1996;78:330-3.
13. Epstein JI, Wojno KJ. The prostate and seminal vesicles. In: Sternberg SS, Antonioly DA, Carter D, Mills SE, Oberman HA: Diagnostic Surgical Pathology. 3th edition. New York: 1999:1893-942.

14. Weinstein MH, Epstein J. Significance of High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia on Needle Biopsy. *Hum Pathol.* 1993;24:624-9.
15. Kendi S. Prostat ve Hastalıkları. Ankara: Haceteppe University; 1980:7-45.
16. Petersen RO. Prostate and seminal vesicle: Urologic Pathology, second Ed. Philadelphia: JB Lipincott Company; 1992:575.
17. Weinstein MH, Epstein J. Significance of High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia on Needle Biopsy. *Hum Pathol.* 1993;24:624-9.
18. Emmert-Buck MR, Vocke CD, Pozzatti RO, et al. Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). *Cancer Res.* 1995;55:2959-62.
19. Sakr WA, Macoska JA, Benson P, et al. Allelic loss in locally metastatic multisampled prostate cancer. *Cancer Res.* 1994;15:3273-7.
20. Takahashi S, Qian J, Brown JA, et al. Potential markers of prostate cancer aggressiveness detected by fluorescence in situ hybridization in needle biopsies. *Cancer Res.* 1994;54:3574-9.
21. Taylor CR. The current role of immunohistochemistry in diagnostic pathology. In: Weinstein RS, Graham AR, Anderson RE, Benson ES, Cotron RS, Jarett C et al: *Advances in Pathology and Laboratory Medicine.* St.Luis: Mosby-Year Book Inc; 1994:59-105.
22. Gerdes J. An immunohistological method for estimating cell growth fractions in rapid histopathological diagnosis during surgery. *Int J Cancer.* 1984;35:1710-5.
23. Leong A.S, Wright J. The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. *Histopathology.* 1987;11:1295-305.
24. Sadi MV, Barrack ER. Determination of growth fraction in advanced prostate cancer by Ki-67 immunostaining and its relationship to the time to tumor progression after hormonal therapy. *Cancer.* 1991;67:3065-71.
25. Claus S, Wrenger M, Senge T, Schulze H. Immunohistochemical determination of age related proliferation rates in normal and benign hyperplastic human prostates. *Urol Res.* 1993;21:305-8.
26. Colombel M, Vacherot F, Diez SG, Fontaine E, Buttyan R, Chopin D. Zonal variation of apoptosis and proliferation in the normal prostate and in benign prostatic hyperplasia. *Br J Urol.* 1998;82:380-5.
27. Fenely MR, Young MPA, Chinyama C, Kirby RS, Parkinson MC. Ki-67 expression in early prostate cancer and associated pathological lesions. *J Clin Pathol.* 1996;49:741-8.
28. Cotron RS, Kumar V, Robins SL. Male genital system: In *Robins Pathology Basis of Disease.* 5th.edition. Philadelphia: Saunders Company; 1998:1007-32.
29. Parkinson MC. Preneoplastic lesion of the prostate. *Histopathology.* 1995;27:301-11.
30. Meyer JS, Sufrin G, Martin SA. Proliferative activity of benign human prostate, prostatic adenocarcinoma and seminal vesicle evaluated by thymidine labeling. *J Urol.* 1982;128:1353-6.
31. Gallee MPW, Jong EV, Kate FJWT, Schroder FH, Van Der Kwast TH. Monoclonal antibody Ki-67 defined growth fraction in benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *J Urol.* 1989;142:1342-6.
32. Mc Loughlin J, Foster CS, Price P, Williams G, Abel PD. Evaluation of Ki-67 monoclonal antibody as prognostic indicator for prostatic carcinoma. *Br J Urol.* 1993;72:92-7.
33. Oomens EHGM, Van Steenbrugge GJ, Van Der Kwast TH, Schroder FH. Application of the monoclonal antibody Ki-67 on prostate biopsies to assess the proliferative cell fraction of human prostatic carcinoma. *J Urol.* 1991;145:81-5.
34. Raymond WA, Leong AS, Bolt JW, Milios J, Jose JS. Growth fractions in human prostatic carcinoma determined by Ki-67 immunostaining. *J Pathol.* 1988;156:161-7.
35. Tamboli P, Amin MB, Schultz DS, Linden MD, Kubus J. Comparative analysis of the nuclear proliferative index (Ki-67) in benign prostate, prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 1996;9:1015-9.
36. Weinstein MH. Digital image analysis of proliferative index: Two distinct population of high grade prostatic intraepithelial neoplasia in close proximity to adenocarcinoma of the prostate. *Hum Pathol.* 1998;29:620-6.
37. Bigler SA, Deering RE, Brawer MK. Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum Pathol.* 1993;24:220-6.
38. Weidner N. Tumor Angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diag Pathol.* 1993;10:302-13.
39. Horak ER, Leek R, Leek N, et al. Angiogenesis assess by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet.* 1992;340:1120-4.
40. Abulafia O, Triest WE, Adcock T, Sherer DM. The effect of Medroxyprogesterone acetate on angiogenesis in complex endometrial hyperplasia. *Gynecol Oncol.* 1999;72:193-8.
41. Montie JC. Current Prognostic Factors for Prostate Carcinoma. *Cancer.* 1996;78:341-4.
42. Kyprianou N, Tu H, Jacobs SC. Apoptotic versus proliferative activities in human benign prostatic hyperplasia. *Hum Pathol.* 1996;27:668-75.
43. Montironi R, Magi Galluzzi C, Scarpelli M, Giannulis I, Diamanti L. Occurrence of cell death (apoptosis) in prostatic intra-epithelial neoplasia. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993;423:351-7.
44. Epstein JI. The Evaluation of Radical Prostatectomy Specimens. *Pathology Annual.* 1991;26:159-210.
45. Haussler O, Epstein JI, Amin MB, Heitz PU, Hailemariam S. Cell proliferation, Apoptosis, oncogene, and tumor suppressor gene Status in adenosis with comparison to benign prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia, and cancer. *Hum Pathol.* 1999;30:1077-86.
46. Sohn JH, Kim DH, Choi NG, Park YE, Ro JY. Caspase-3/CPP32 immunoreactivity and its correlation with frequency of apoptotic bodies in human prostatic carcinomas and benign nodular hyperplasias. *Histopathology.* 2000;37:555-60.
47. Özer E, Canda T, Kurto lu B. The role of angiogenesis, laminin and CD44 expression in metastatic behavior of early-stage low-grade invasive breast carcinoma. *Cancer.* 1997;121:119-23.
48. Tawil NJ, Gowri V, Djoneidi M, Nip J, Carbonetto S, Brodt P. Integrin $\beta 1$ can promote adhesion and spreading of metastatic breast carcinoma cells on the lymph node stroma. *Int J Cancer.* 1996;66:703-10.
49. Menard S, Bufalino R, Rile F, Cascinelli N, Veronesi U, Colaghi MI. Prognosis based on primary breast carcinoma instead of pathological nodal status. *Br J Cancer.* 1994;70:709-12.
50. Maatta M, Virtanen I, Burgeson Rand Harmainen HA. Comparative Analysis of the Distribution of Laminin Chains in the Basement Membranes in Some Malignant Epithelial Tumors: The $\alpha 1$ Chain of Laminin Shows a Selected Expression Pattern in Human Carcinomas. *J Histochem Cytochem.* 2001;49:711-26.
51. Henning K, Berndt A, Katenkamp D, Kosmehl H. Loss of laminin-5 in the epithelium-stroma interface: an immunohistochemical marker of malignancy in epithelial lesion of the breast. *Histopathology.* 1999;34:305-9.

- 52.Hindermann W, Berndt A, Haas KW, Wunderlich H, Katenkamp D, Kosmehl H. Immunohistochemical demonstration of the gamma 2 chain of laminin-5 in urinary bladder urothelial carcinoma. Impact of diagnosis and prognosis. *Cancer Detect Prev.* 2003;27:109-15.