

PROSTAT KARSİNOMUNDA PATOLOJİK EVRE VE GRADE İLE ANJİOGENETİK AKTİVİTENİN İLİŞKİSİ

Işın KILIÇASLAN*, Mine G. GÜLLÜOĞLU*, Faruk ÖZCAN**, Tarık ESEN**, Afife KAYA*, Veli UYSAL*

ÖZET

Bu çalışmada Anabilim Dalımızda incelenmiş ve random olarak seçilmiş 63 radikal prostatektomi materyalinde tümör mikrodamar yoğunluğunun patolojik evre parametreleri ve grade ile korelasyonu araştırıldı. İmmünohistokimyasal yöntemle anti-CD34 antikorunu kullanılarak işaretlenen mikrodamarlar en sık oldukları bölgede 5 büyük büyütme alanında sayılıp, ortalama değer alınarak anjiogenez indeksi (Aİ) belirlendi. Kapsül invazyonu görülen vakalarda (n=47) Aİ ortalaması 58.4±20.01, kapsül negatif vakalarda (n=16) 52.3±29.9 olarak belirlendi (p=0.02). Vezikula seminalis invazyonu gösteren 15 vakada 66.1±18.5 olarak saptanan Aİ ortalaması, invazyon olmayan 48 vakada 54.0±23.5 olarak saptandı (p=0.048). Sonuç olarak Aİ ile kapsül invazyonu arasında anlamlı bir ilişki olduğu, vezikula seminalis invazyonu ile Aİ arasındaki korelasyonun ise sınırdan anlamlı olduğu belirlendi. Diğer taraftan cerrahi sınır ve lenf ganglionu pozitivitesinin Aİ'den bağımsız olduğu sonucuna varıldı. Gleason skoru 6 ve altında olan grup ile 7 ve üstünde olan grubun anjiogenetik aktiviteleri arasında korelasyon saptanmadı. Değişik çalışmalarda evre ve grade ile Aİ arasında ilişki saptanırken, bu yönde çelişkili sonuçlar elde eden çalışmalar da vardır. Birçok çalışmada ise Aİ ile radikal prostatektomi sonrası progresyon arasında korelasyon saptanmıştır. Bu grubu içeren hastaların prognozları ile ilişki bu ön çalışmanın devamı niteliğinde sürdürülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Prostat karsinomu, angiogenesis.

SUMMARY

The relationship between the tumor angiogenesis, pathologic stage and the tumor grade in prostate carcinoma. In this research, the correlation between the tumor microvessel density and the parameters of the pathologic stage and grade of the prostate carcinoma was investigated on 63 radical prostatectomy materials examined and reported in our department. The tumoral microvessels were immunohistochemically highlighted using anti-CD34 antibody, and counted in 5 high power field in which they were most intense. We determined the angiogenesis index (Aİ) by taken their mean values. The mean Aİ value was 58.4±20.1 in tumors with capsule invasion (n=47), and 52.3±29.3 in tumors without capsule invasion (n=16) (p=0.02). In 15 cases with seminal vesicle invasion, the mean Aİ value was 66.1±18.5 whereas in 48 cases without invasion the mean was 54.0±23.5 (p=0.048). We conclude that there is a significant relation between the angiogenesis and the capsule invasion of the tumor. We found a quiet significance between the Aİ and the seminal vesicle invasion. The both surgical margin positivity and the lymph node positivity were found to be independent from the Aİ. There was no correlation between the mean Aİ values of the group which had a Gleason score of 6 and under and that of the group having a Gleason score of 7 and above. It has been revealed that the mean Aİ value correlated with the tumor grade and the tumor stage in various research. However there are others reporting conflicting results on the same ground. On the other hand, many authors have found that there was a correlation between the Aİ and tumor progression after radical prostatectomy. This preliminary study is being followed by a new one in which the relationship between the Aİ and the survival of the same patient population is further investigated.

Key Words: Prostate carcinoma, angiogenesis.

GİRİŞ

Erkeklerde en sık rastlanan malign tümör olan prostat karsinomunun insidansı yaşla birlikte artmaktadır. Gerek toplum nüfusunun yaşlanması gerekse her geçen gün biraz daha gelişen tarama yöntemleri sayesinde, bu tümör çok erken evrelerde de saptanmaya başlamıştır. Tanı veya tedavi sonrası çoğu hastada tümör progresyonu gözlenmezken, bir grup hastada ise hızlı ve erken progresyon görülmektedir. Bu farklılıkları açıklayabilmek için denenen prognostik parametrelerden biri de anjiogenetik aktivitedir. Anjiogenetik aktivitenin özellikle evreleme ve prognoz ile ilişkisi ve bu parametrelerin iğne biyopsilerinde de kullanılarak tedaviyi yönlendirmeye katkısı belirlenmeye çalışılmaktadır (4,8). Çalışmamızda anjiogenetik aktivitenin histolojik grade ve radikal prostatektomide saptanan patolojik evre parametreleri ile ilişkisi araştırılmaktadır.

MATERYAL ve METOD

1995-1998 yılları arasında incelemeleri anabilim dalımızda yapılmış radikal prostatektomi materyalleri arasından randomize olarak seçilen 63 vaka çalışma kapsamına alındı. Çalışmaya dahil edilen vakaların, daha önceden rutin incelemesi yapılmış olan Hematoksilen-Eozin boyalı preparatları arşivden çıkarılarak 40X ve 100X büyütmelelerde yeniden incelendi. Tümördeki damar yoğunluğunun en fazla olduğu gözlemlenen dokuları içeren parafin bloklar, arşivden çıkarılarak, poly-L-lizin ile kaplı lamalara 3-4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Deparfinizasyon ve dehidratasyonun ardından, antijen unmasking amacıyla pH6 sitrat solüsyonu içerisinde 2 dakika süreyle 1 atm basınçta kaynatılan kesitler, daha sonra dokudaki endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek amacıyla % 3 hidrojen peroksit ile 20 dakika işlemden geçirildi. Bu kesitler

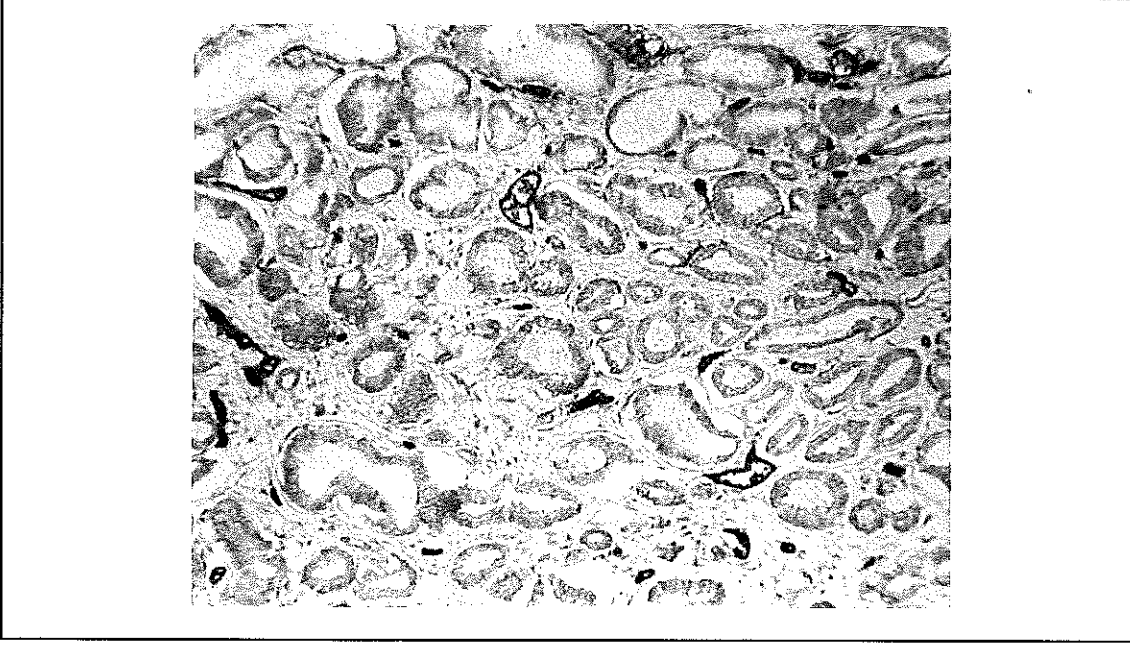
endotel hücre belirleyicisi olan antiCD34 monoklonal antikoru (QB-End/10; Nova-Castra Lab, Newcastle, İngiltere) ile 1/25 dilüsyonda, oda sıcaklığında, 1 saat süreyle inkübe edildi. 25 dakikalık sekonder antikor, biotinlenmiş keçi anti-fare immunglobulin (UltraVision, LabVision Corp, Union City, CA, ABD) ve 25 dakikalık peroksidaz konjuge streptavidin (UltraVision Streptavidin/HRP, LabVision Corp. Union City, CA, ABD) inkübasyonunun ardından, kesitler AEC (3-amino 9-etilkarbazol) kromojen sistemi (LabVision Corp, Union City, CA, ABD) ile renklendirildi. Tüm aşamalar arasında kesitler PBS (phosphate-buffered saline) solüsyonu ile yıkandı. Zıt boya olarak Mayer Hematoksilen kullanıldı.

Damarlar antiCD34 monoklonal antikoru ile immuhistokimyasal olarak işaretlendikten sonra, kesitlerin geneli 40X ve 100X büyütmeleleri ile incelenerek en fazla damar içeren tümör alanları (sıcak noktalar) belirlendi. Bu bölgelerde bulunan damarlar 400X büyütme ile 5 alanda sayıldı. Çift başlı mikroskop ile iki araştırmacı (IK, MGG) tarafından aynı anda yapılan sayım sırasında lümen varlığına bakılmaksızın pozitif boyanma gösteren hücreler ve hücre toplulukları değerlendirildi. Daha sonra her alanın sayım sonucu toplanarak ortalama değer alındı. Bu değer anjiogenez indeksi (AI) olarak kabul edildi. İnceleme Olympus BH-2 model çift başlı mikroskop ile yapıldı. Bu modelde bir büyük büyütme alanı (1 BBA=40X objektif + 10X oküler=400X) 0.2 mm²'ye eşittir. Toplam 5 BBA'ndaki damarlar sayıldığından değerlendirme 1 mm²'lik bir bölgede yapılmıştır.

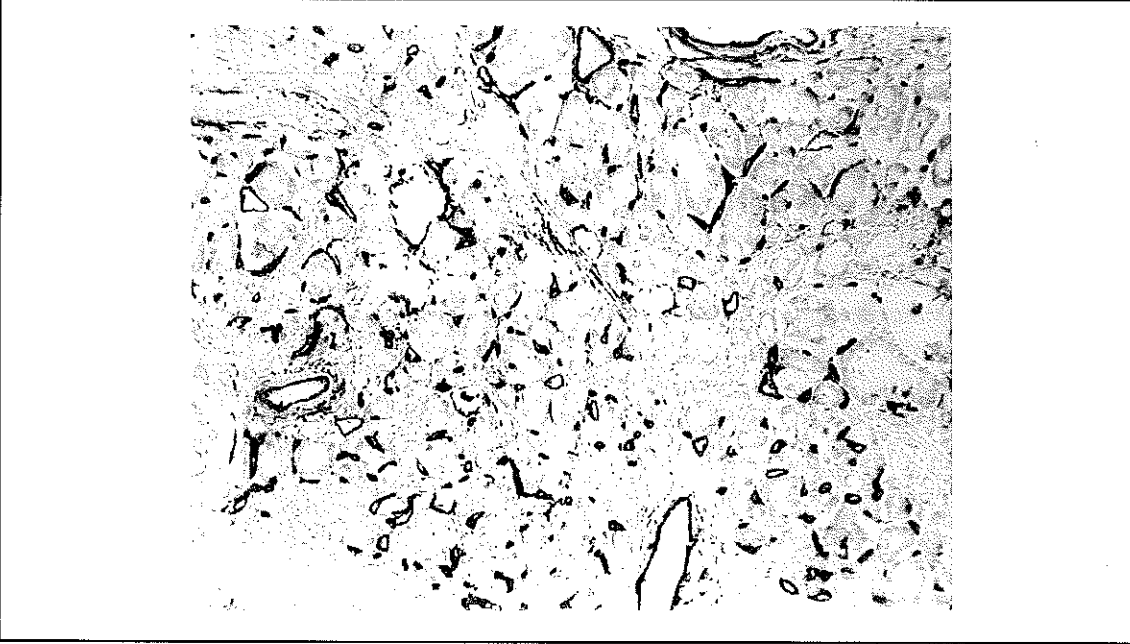
BULGULAR

Yaş ortalaması 65.5 olan 63 hastanın yaş dağılımı 49 ile 84 arasında değişmekteydi. 63 vakanın tamamı değerlendirildiğinde, 20.1 ile 117.6 arasında değişen AI'nin ortalaması

Resim 1. Anjiogenez indeksi ortalamasının altında olan bir vakaya ait örnek alan (Anti CD34 antikorü x125).



Resim 2. Anjiogenez indeksi ortalamasının üstünde olan bir vakaya ait örnek alan (Anti CD 34 antikorü x125).



56.89±22.92 idi. En sık rastlanan Gleason paterni 3 (n=54, % 85.7) olup, 5 ile 9 arasında değişen patern skoru, vakaların 25'inde (% 39.68) 6 idi. Patern skorunun 41 (% 65) vakada 6 ve altında olduğu dikkati çekmekteydi. Bu grupta Aİ ortalaması 56.15±20.7 iken, patern skorunun 7 ve üzerinde olduğu

22 vakalık grupta Aİ ortalaması 60.09±26.1 idi. İki grup arasında angiogenetik aktivite açısından anlamlı fark saptanmadı (p>0.05). Aİ ortalaması, kapsül invazyonu saptanmış olan 47 vakada 58.4±20.1, kapsül pozitivitesi olmayan 16 vakada 52.3±29.9 olarak belirlendi (p=0.02). Cerrahi sınır pozitifliği

saptanan 16 vakada 61.5 ± 19.5 olan Aİ ortalaması, cerrahi sınırları negatif olan 47 vakada 55.3 ± 23.9 idi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$). Vesikula seminalis invazyonu belirlenen 15 vakada, 66.1 ± 18.5 olan Aİ ortalaması, invazyon görülmeyen 48 vakada 54 ± 23.5 olarak saptandı ($p = 0.48$). Bu sonuç sınırdan anlamlı kabul edildi. Aİ ortalaması, lenf gangliyonu metastazı gösteren 4 vakada 50.1 ± 25.8 iken, metastazı olmayan 59 vakada 57.3 ± 22.8 idi ($p > 0.05$).

TARTIŞMA

Kanser nedeni ölümlerden sorumlu tümörler arasında ikinci sırada gelen prostat karsinomu erkeklerde en sık saptanan malign tümördür. Bu kadar önemli bir yerde bulunmakla birlikte, gerçekte çok daha sık oranlarda bulunduğu kabul edilmektedir. Otopsi serilerinde 80-89 yaş arasındaki kişilerde % 71 oranında prostat karsinomu belirlenmektedir (5,8,11). Tümörlerin çoğu, tarama programları çerçevesinde erken dönemde insidental olarak belirlenmekte ve bu tümörlerin malignite potansiyeli kesin olarak bilinmemektedir. Bu vakalarda gereksiz tedavileri önlemek ve bazen çok agresif seyrebilen tümörleri ayırabilmek için yeni metodlara gerek duyulmaktadır. Patolojik evre mükemmel bir prognoz göstergesi olmasına karşın preoperatif tam olarak değerlendirilememektedir. Özellikle ekstraprostatik yayılım, ancak radikal prostatektomi materyalinde belirlenebilmekte ve diğer görüntüleme yöntemleri bunu kesin olarak gösterememektedir. Malign potansiyeli saptayabilmek için değişik parametreler kullanılmaktadır. Ancak bunlar da tek tek hastalar için yeterli olamamaktadır. Tümör anjiogenezi yeni bir prognostik belirleyici olarak henüz deneme aşamasındadır.

Tümör büyüme ve metastazı tümör anjiogenezi ile ilişkilidir. Neovaskularizasyon,

tümör hücrelerinden, tümörle ilişkili inflamatuvar hücrelerden ve ekstrasellüler matrissten salınan faktörlerle uyarılmaktadır (2,7,8).

İlk kez melanomlarla ilgili bir çalışmada anjiogenezin metastaz ile ilişkisi vurgulanmıştır. Daha sonra meme karsinomlarında mikrodamar yoğunluğu ile metastaz sıklığı arasında korelasyon olduğu saptanmıştır. Bu çalışmaları mesane ve serviks ile ilgili olanlar izlemiştir (11).

Çalışmamızda arşiv materyalimiz arasından random olarak seçilen 63 vaka değerlendirilmiştir. Vakalarda mikrodamar yoğunluğunun patolojik evre ve histolojik grade ile ilişkisi araştırılmıştır. Gleason sınıflaması kullanılan vakalarda Gleason skoru 2,3 ve 4 olanlar düşük, 5,6 ve 7 olanlar orta ve 8,9 ve 10 olanlar yüksek skorlu gruplar olarak değerlendirilmektedir. Ancak son yıllardaki çalışmalarda özellikle patern 4'ün de gözlemlendiği vakalarda prognozun belirgin biçimde kötüleştiği, bu nedenle skoru 7 olan vakaların ayrıca değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (4). Çalışmamızda bu nedenle vakaları skor 6 ve 6'nın altında olanlar (41 vaka) ile 7 ve 7'nin üzerinde olanlar (22 vaka) olarak iki grupta inceledik. Bu iki grubun anjiogenetik aktiviteleri arasında istatistiksel değerlendirmede anlamlı sonuç elde edilmedi. Bu sonucu, ilk grupta vakaların büyük çoğunluğunda skorun 6 olmasına, skoru 5'in altında hiçbir vakanın gruba alınmamış olmasına ve grupta skoru 8 ve 9 olan iki vaka bulunmasına bağlamaktayız. Wakui ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da yüksek ve orta dereceli skorlu olan metastatik vakalarda kemik iliğinde mikrodamar yoğunluğu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (10). Metastatik olmayan vakalarda primer tümörde yüksek skor ile orta ve düşük skor arasında ise anlamlılık saptanmıştır. Bu nedenle düşük ve orta skorlu vakalarda yüksek mikrodamar yoğunluğunun metastaz için iyi bir gösterge

olabileceği belirtilmiştir ⁽¹⁰⁾. Weidner ve arkadaşları ise Gleason skoru 4-5, 6-7 ve 8-9-10 olan gruplar arasında anlamlı farklılık saptamış ve mikrodamar yoğunluğunun özellikle yüksek grade ile giderek arttığına dikkat çekmiştir. Gleason skoru metastaz ile korele olmakla birlikte, multivariate analizlerde Gleason skorunun metastaz için mikrodamar yoğunluğuna ek bir bilgi sağlamadığı belirtilmektedir ⁽¹¹⁾. Yine bir çalışmada ise tümör grade' i % 90 oranında organ sınırlı tümörü tanımlayabilirken, organ sınırlı olmayan tümörü % 53 oranında tanımlamaktadır. Mikrodamar yoğunluğu bu veriye eklendiğinde ise bu oran % 85' e ulaşmaktadır. Patolojik evre ile ilgili çalışmalarda organ sınırlı karsinomu olan ve organ sınırlı karsinomu olmayan gruplar arasında parametrelere mikrodamar yoğunluğu eklendiğinde anlamlılık artmaktadır ⁽²⁾.

Silbermann ve ark'ın geniş bir seriyi içeren çalışmasında da Gleason skoru 5 ile 7 arasındaki gruplarda patolojik evreler ile anjiogenetik aktivite arasında korelasyon saptanmamıştır, ancak radikal prostatektomi sonrası progresyon ile ileri derecede anlamlılık belirlenmiştir ⁽⁹⁾.

Çalışmamızda kapsül pozitifliği gösteren ve göstermeyen gruplar arasındaki anjiogenez indeksi karşılaştırmalarında anlamlı sonuç elde edildi. Vezikula seminalis invazyonu olan ve olmayan gruplar arasında ise sınırda anlamlılık saptandı. Cerrahi sınır pozitifliğinin değerlendirildiği grupta ise anlamlılık belirlenmedi. Bu sonucun, cerrahi sınır değerlendirilmesindeki yorum sorunlarından ve bir kısım vakada da uygulanan cerrahi teknikten kaynaklandığını düşünmekteyiz. Lenf gangliyonu pozitifitesi saptanan grubumuz çok küçük olması nedeniyle de bu grubun sonuçlarının tam olarak gerçeği yansıtmayacağı görüşündeyiz.

Çalışmamızda HE boyalı tüm kesitler ince lenerek mikrodamar yoğunluğunun en yük-

sek olduğu sıcak noktalar belirlenmiş ve bu alanları içeren bloklara immünohistokimyasal inceleme uygulanmıştır. Preoperatif bir gösterge olarak kullanılması planlanan bu yöntemde iğne biyopsisi ile örneklenen alanın en yoğun alanı içerip içermediği konusunda soru işaretleri uyanmaktadır. Tümörün ne kadar farklı diferansiyasyon alanları da içerdiği düşünüldüğünde kuşklar daha da artmaktadır. Ancak Brawer iğne biyopsisi sonuçları ile radikal prostatektomide saptanan sonuçların korele olduğunu belirtmektedir ^(1,2).

Ayrıca değişik çalışmalarda kullanılan yöntemler farklılıklar içermektedir ⁽⁶⁾. Kullanılan farklı antikorlar, image analysis veya manuel yöntemlerin kullanılması, farklı gözlemciler, kesit kalınlığı farkları, kullanılan değişik model mikroskoplar gibi faktörler standart sayılar ve sonuçlar verilmesini olanaksız hale getirmektedir. Bu nedenle aynı laboratuvarlar, aynı kişiler ve ekip ile o bölümün standardizasyonunu geliştirmesi önem taşımaktadır.

Sonuç olarak; patolojik evrelemeye ek katkısı olabilecek bu parametrenin, özellikle vurgulanan prognostik katkısını kendi vakalarımızda gözlemlemek üzere, bu grubun sürvi ile ilgili sonuçları çalışmanın ikinci ayağı olarak devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Brawer MK, Deering RE, Brown M, Preston SD, Bigler SA: Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma. The role of neovascularity. *Cancer* 73:678 (1994).
2. Brawer MK: Quantative microvessel density. A staging and prognostic marker for human prostatic carcinoma. *Cancer* 78: 345 (1996).
3. Bigler S, Deering RE, Brawer MK: Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum Pathol* 24:220 (1993).
4. Deskmukh N, Foster CS: Grading Prostate Cancer, Pathology of the Prostate, editörler: Foster CS, Bostwick DG, WB Saunders Comp, 1 Basım (1998) sf.191.
5. Gao X, Porter AT, Grignon DJ, Pontes JE, Honn KV: Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer. *Prostate* 31:264 (1997).

6. Hansen S, Grabau DA, Rose C, Bak M, Sorensen FB: Angiogenesis in breast cancer: A comparative study of the observer variability of methods for determining microvessel density. *Lab Invest* 78:1563 (1998).
7. Norby K: Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS* 105:417 (1997).
8. Siegal JA and Brawer MK: Significance of Neovascularity in Human Prostate Carcinoma, *Pathology of the Prostate*, editörler: Foster CS, Bostwick DG, WB Saunders Comp. 1 Basım (1998) sf. 384.
9. Silbermann MA, Partin AW, Viltri RW, Epstein JI: Tumour angiogenesis correlates with progression after radical prostatectomy but not with pathologic stage in Gleason sum 5 to 7 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 79:772 (1997).
10. Wakui S, Furusato M, Takaaki I, Sasaki H: Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: A morphometric study. *J Pathol* 168:257 (1992).
11. Weidner N, Carrol PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J: Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 143:401 (1993).