

Erken Evre İnvaziv Duktal Karsinomlarda Anjiogenez ve Fibronektin Ekspresyonunun Lenf Dügümü Metastazı ile İlişkisi ve Prognostik Önemi

Prognostic Significance of Angiogenesis and Fibronectin Expression and their Correlation with Lymph Node Metastasis in Early Stage Invasive Ductal Carcinoma

H. Dilek Ak

Tülay Canda

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, İnciraltı/İzmir

Özet: Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malign tümördür. Çalışmalar, erken tanı ve etkili sağaltım ile mortalitenin önemli oranda azaltılabileceğini göstermektedir. Özellikle erken meme kanserlerinde, sağaltımın belirlenmesinde prognostik faktörler önem kazanmaktadır. Bu çalışmada lenf düğümü (LD) metastazı (-) 23 ve (+) 20 olmak üzere toplam 43 erken evre invaziv duktal karsinom olgusunda, anjiogenez ve fibronektin (FN) ekspresyonu incelenmiştir. Anjiogenez ve FN ekspresyonunun metastaz oluşumundaki yeri, yaş, tümör derecesi, östrojen reseptör (ÖR) durumu ile ilişkili olup olmadığını belirlemek amaçlanmıştır. Ayrıca izlemde olan 27 olguda sağkalımla ilişkisi araştırılmıştır. Yaş, ÖR, tümör derecesi ve LD metastazı ile sağkalım arasında ilişki bulunamaması nedeniyle, bu faktörlerin prognozu belirlemede yeterli olmadığı, ancak olgu sayısının az ve izlem süresinin çok kısa olmasının da sonuçta etkili olabileceği düşünülmüştür. VSD (Vascular Surface Density) ve NVES (Number of Vessels), LD metastazı (+) olgulara göre, LD metastazı (-) olgularda artmış, ancak bu artış istatistiksel anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). VSD ve NVES'in tümör derecesi ile ilişkili olması nedeniyle prognostik önemi olabileceği, ancak metastaz oluşumunda tek başına yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır. FN boyanma özelliği LD metastazı, yaş, tümör derecesi, ÖR, VSD, NVES ve sağkalımla ilişkili bulunmamıştır. FN boyanma özelliğinin metastaz ve prognozu belirlemede etkili olmadığı düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Anjiogenez, fibronektin, metastaz, erken evre invaziv duktal karsinom

Erken meme kanserlerinin büyük bir kısmında aksiller LD metastazı görülmemektedir. Bu hastalarda lokal sağaltım yöntemlerine ek olarak sistemik sağaltım uygulanması sağkalım üzerinde olumlu etki göstermektedir. Bununla birlikte yalnız lokal sağaltım ile %70'inde nüks görülmediği bildirilmektedir (1). Bu durumda nüks ve metastaz riski olan hastaları belirlemek, sistemik

Summary: Breast carcinoma is the most malign tumor in women. Studies have shown that early detection and treatment of breast carcinoma significantly reduce breast cancer mortality. Prognostic factors important to determine of therapy, particularly for early breast carcinoma. In this study, angiogenesis and fibronectin (FN) expression in 43 early stage invasive breast carcinomas (20 with metastases and 23 without). The role of angiogenesis and FN expression in metastasis, correlation with age, grade, estrogen reseptor (ER) were investigated. In addition, correlation with survival was investigated in 27 of 43 cases. Age, ER, grade and lymph node (LN) involvement were not related with survival, probability of short follow-up. The mean of VSD (Vascular Surface Density) and NVES (Number of Vessels) were higher in node negative cases than node positive cases, this was not significant statistically ($p > 0.05$). Since the mean of VSD and NVES were correlated grade, angiogenesis may be important for prognosis in breast carcinoma, but it does not guarantee for metastasis. FN staining pattern was not related with LN involvement, age, grade, ER, VSD, NVES and survival. We conclude that FN staining pattern does not important factor in prognosis and metastasis.

Key Words: Angiogenesis, fibronectin, metastasis, early stage invasive ductal carcinoma

sağaltım seçiminde oldukça önem kazanmaktadır. Bilinen prognostik faktörler yanı sıra, yeni güvenilir prognostik faktörlerin belirlenmesi, meme kanserli hastalara uygulanacak sağaltım seçiminde, hastaya özel seçeneklerin belirlenmesinde yardımcı olabilecektir.

Tümör anjiogenezisinin birçok tümörde prognostik önemi olduğunu ve yüksek metastaz riskinin bir göstergesi

olabileceğini bildiren çok sayıda çalışma yapılmıştır (2). Yeni damar oluşumu anlamına gelen anjiogenezis normal olarak plasentada, embriyonik, fetal ve postnatal gelişme ile büyümede gereklidir. Erişkinde ise kontrollü ve siklik olarak ovaryum follikülü, korpus luteum ve postmenstrüel endometrium dışında görülmez (3).

Tümör büyümesinin anjiogeneze bağımlı olduğunu gösteren pek çok çalışma yapılmıştır (4). Damarlanma olmadıkça hücre proliferasyonunun durağan olarak kaldığı ve tümör büyümesinin 2 mm'den daha fazla boyuta ulaşamadığı gözlenmiştir (5). Damarlanma oluştuktan sonra daha hızlı büyüme, lokal invazyon ve sonunda metastaz görülür. Hem primer hem de metastatik tümör büyümesi anjiogeneze bağımlıdır (2). Klinik olarak belirgin metastaz gelişmesi, tümör hücrelerinin kan dolaşımına katılması, dokunun immun yanıtını aşması, bir dokunun kapiller duvarına yapışması ve yeni bir tümör damarlanmasının gelişmesiyle oluşur (1). Damarlanma tümör hücrelerinin dolaşıma girmesi için gereklidir. Ayrıca yeni oluşan damarlarda bazal membran bütün lüğü olmadığından sızıntılı olup, tümör hücrelerinin çıkışına izin vermektedir (2).

İlk olarak malign melanomlarda anjiogenezin metastazın bir göstergesi olabileceği bildirilmiştir (4). Meme kanserinde ise metastaz ve angiogenez ilişkisi ilk olarak Weidner ve ark. çalışmasında gösterilmiştir. Yeni damar oluşumunun en yoğun olduğu alanlardaki mikrodamar sayısının (MDS) lenf düğümü metastazı ve uzak metastaz olan hastalarda bağımsız bir gösterge olabileceğini ileri sürmüşlerdir (6).

Daha sonraları, erken meme kanserlerinde damar sayısının sağkalım ya da hastalısız sağkalım ile ilişkisini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda MDS fazlalığında sağkalım ve hastalısız sağkalım süresinin daha kısa olduğu gözlenmiştir. MDS'nin tümör derecesi, tümör boyutu ve lenf düğümü metastazı ile ilişkili olduğu saptanmış, çok değişkenli analizlerde bağımsız bir gösterge olduğu bildirilmiştir (1). Kimi çalışmalarda ise klinik sonuçlar ile mikrodamar sayısı arasında ilişki gözlenmemiştir (1).

Meme kanseri dışında akciğer, prostat, rektum, testis ve mesane kanserlerinde, baş-boyunun skuamöz hücreli karsinomlarında, malign melanom, over tümörleri, yumuşak doku tümörleri, santral sinir sistemi tümörleri ve multiple myelomda intratümöral mikrodamar yoğunluğunun

(MDY) bilinen prognostik göstergeler ile karşılaştırıldığında, bağımsız bir prognostik gösterge olabileceği bildirilmiştir (2, 4, 7-11).

İnvazyon ve metastaz sürecinde malign hücreler ile stroma arasında çeşitli etkileşimler oluşmaktadır. Malign hücreler bazal membran ve bağ dokuyu yapısal değişikliğe uğratabilecek proteolitik enzimler salgırlar. Aynı zamanda matriks komponentlerinin sentezi, fibroblast ya da myofibroblastların uyarılmasıyla matrikste değişiklikler olur (12). Fibronektin (FN) vücutta yaygın olarak bulunan bir matriks glikoproteini olup, bazal membranda ve matrikste yer almaktadır (13). Hücre-matriks, hücre-hücre adezyonu, hücre migrasyonu, normal hücre morfolojisinde olduğu gibi diferansiyasyon ve onkogenik transformasyonda etkili olduğu bildirilmektedir (14). Fibronektinin iki alt türü tanımlanmıştır. Bunlardan plazma FN (pFN) çözünür olup hepatositlerden sekrete edilmektedir. Hücre FN (cFN) ise fibroblast kültürlerinde perisellüler matrikste ve in vivo olarak da ekstrasellüler matrikste gösterilmiştir (14).

Tek bir FN primer transkriptinden posttranslasyonel değişiklikler sonucu oluşan, ED-A, ED-B ve IIICS olmak üzere, yapısal ve fonksiyonel olarak farklı üç izoformu tanımlanmıştır (15). ED-B normal erişkin dokuda bulunmayıp, fetal dokularda ve tümörlerde gözlenmiştir. ED-B sekansına onkofetal domain adı da verilmektedir. Onkofetal FN (onf FN)'in ise monoklonal antibody (MAb) FCD-6 ve MAb BC-1 ile tanımlanan iki farklı türü bildirilmiştir (15).

In vitro olarak onkogen viruslarla fibroblastların transformasyonunda hücre yüzeylerinden kaybı araştırmacıların ilgisini bu konuya çekmiştir. Bu durum birçok araştırmacı tarafından değişik yöntemlerle, değişik hücrelerde gösterilmiştir. Onkogenik virüslerden başka, kimyasal olarak ya da spontan gelişmiş tümörlerde de aynı durum gözlenmiştir (13). In vitro çalışmalar ile malign tümörlerdeki in vivo çalışmalar arasında, FN kaybı ile ilgili olarak çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (16).

İnvaziv duktal karsinom ve lobüler karsinomda, FN ile desmoplastik stromada yoğun boyanma olduğu bildirilirken (17, 18), invaziv duktal karsinomda intrasitoplazmik ve perisellüler boyanma ile ilgili çelişkili sonuçlara ulaşılmıştır (14). Christensen ve ark. sitoplazmik boyanma gözlemiş olmasına karşın, çalışmaların çoğunda sitoplazmik boyanma, hatta perisellüler boyanma gözlenmemiştir (14, 19).

Kimi çalışmalarda, meme kanserinde FN ekspresyonunda heterojen boyanma bildirilmektedir (12, 20, 21). Bu heterojenite aynı tümör içinde, farklı histolojik türler arasında ve primer tümör ile metastatik tümör arasında gözlenmiştir. Meme tümörlerinde FN boyanma paterninin tümör biolojisindeki rolünü gösteremediği düşünülmüştür (20).

Kimi çalışmalarda ise FN ekspresyonu ve boyanma paterni yaş, tümör boyutu, LD tutulumu ve ÖR gibi prognostik önemi bildirilen faktörlerle ilişkili bulunamamasına karşın, hastalısız sağkalımın, FN (-) olgularda daha iyi olduğu gözlenmiştir (22, 23).

Bu çalışmanın amacı, büyük bir çoğunluğunda LD metastazı görülmeyen erken evre meme kanserlerinde, anjiogenez ve FN ekspresyonunun lenf düğümü metastazındaki yerini, tümör derecesi, ÖR ve yaş gibi prognostik önemi bilinen etkenler yanı sıra, sağkalım ile ilişkisini araştırarak, anjiogenez ve FN ekspresyonunun meme kanserlerinde prognostik önemlerini belirlemektir.

Gereç ve Yöntem

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Patoloji Anabilim Dalı'nda 1993-1998 yılları arasında tanı almış 73 erken evre (T1N0, T1N1) invaziv duktal karsinom olgusundan, LD eksizyonu olan ve parafin blokları elde edilebilen 43 olgu bu çalışmanın gerecini oluşturmuştur. Bunlardan 36'sı eksizyonel biopsi, 7'si modifiye radikal mastektomi materyalidir. Olguların yaş, ÖR durumu ve LD tutulumu patoloji raporlarından elde edilmiştir. İzlem süreleri, lokal nüks, uzak metastaz ve sağkalım bilgileri fakültemizin Medikal Onkoloji ve Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'ndan elde edilmiştir.

Olgulara ait H-E boyalı preparatlar anabilim dalı arşivinden çıkarılarak yeniden incelendi. %10'luk formalinde fikse, parafine gömülü bloklardan tümörü örnekleyenler seçildi. İDK'sal boyama için poly-l-lizin kaplı lamlara 5 mikron kalınlığında kesitler hazırlanarak, oda ısısında en az 24 saat bekletildi.

Hazırlanan kesitlere, anjiogenezi değerlendirmek için F8-RA (DAKO N1505, prediluted) ve fibronektin (DAKO A0245, dilusyon 1:400) antikoları, streptavidin-biotin-immünperoksidaz yöntemi ile çalışıldı.

F8-RA ve Damar Yoğunluğunun Değerlendirilmesi: Tümörlü kesitlerde endotel hücreleri F8-RA ile boyanarak damarlanma belirgin duruma getirildi. Kamera (Sony C CD, Japan) ile monitöre (Sony Trinitron, Japan) bağlı mikroskopta 100X'lik büyütmede sabitlenen kesitlerde 525X'lik bir büyütme elde edildi. 11 yatay, 11 dikey test çizgisi bulunan toplam 121 nokta içeren karelerden oluşan saydam monitöre yerleştirildi (Resim 1). Bu saydam sınırları içinde kalan tümör alanında test çizgileri ile kesişen damarların kesişme nokta sayısı (NI), kesişsin ya da kesişmesin toplam damar sayısı (NV) belirlendi. Tümör içinde 10 farklı alanda aynı işlem yinelenildi. Damar yüzey yoğunluğu (VSD), birim stromaya düşen mikrodamar sayısı (NVES) aşağıdaki formüllere göre hesaplandı (24).

$$VSD = \sum \ln.2/10.34 Vv (STR)$$

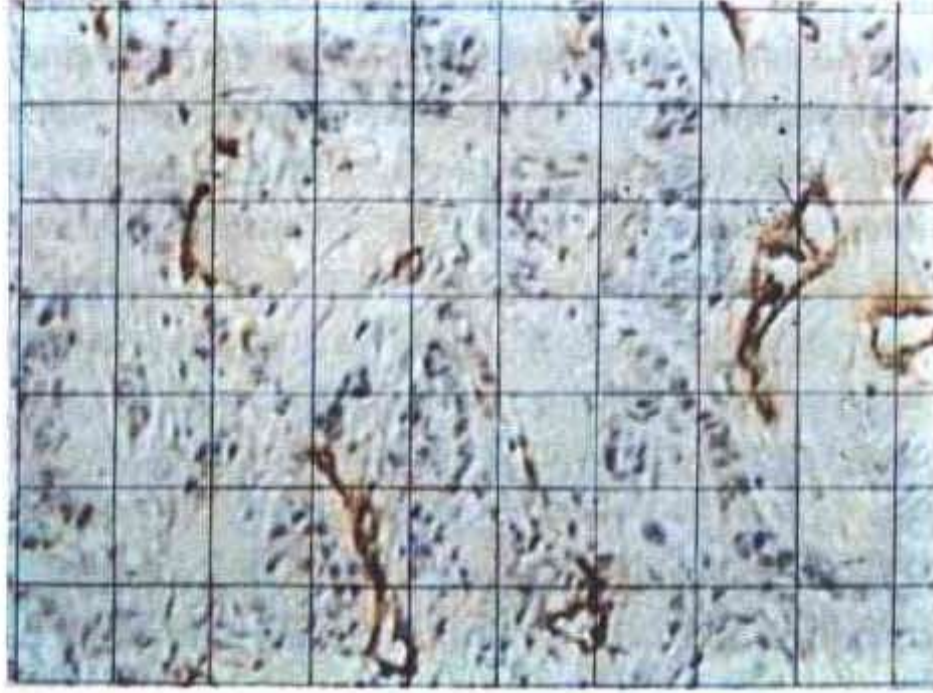
$$NVES = N/Vv (STR)$$

Fibronektin: Işık mikroskopunda tüm olgularda fibronektin için, stromal, sitoplazmik ve perisellüler boyanma (Resim 2, 3) olup olmadığı belirlendi (12, 19).

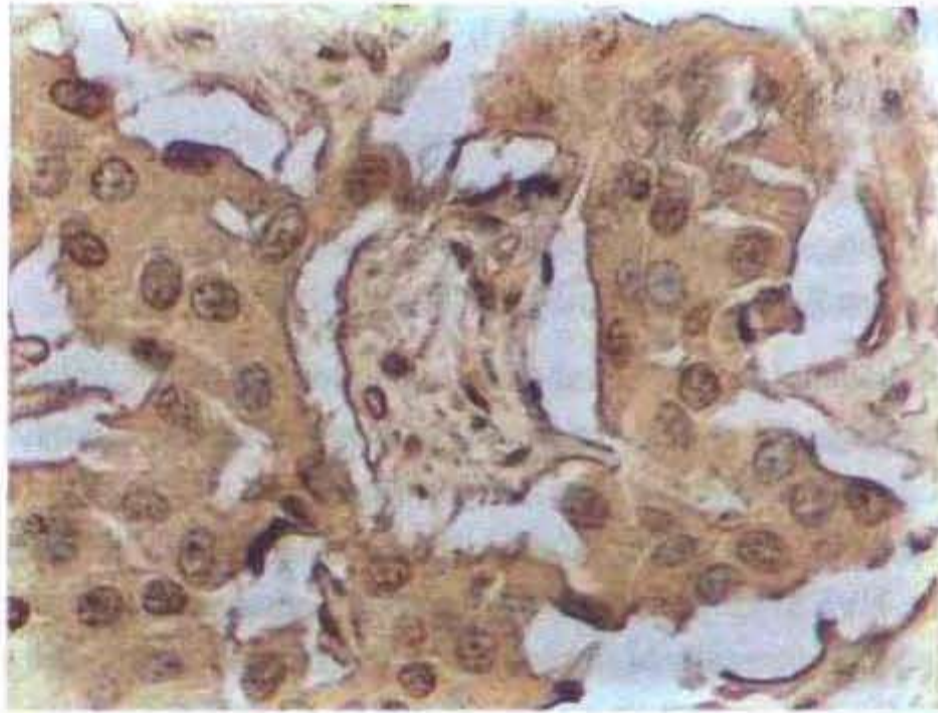
İstatistiksel Analiz: İstatistiksel işlemler SPSS (Scientific Package for Social Sciences) programı ile IBM uyumlu bilgisayarda yapıldı. Lenf düğümü metastazı olan ve olmayan iki grupta yaş, tümör derecesi, ÖR durumu, VSD ve NVES değerleri ile fibronektin ekspresyonu tek değişkenli analizde Chi-Square testi ile karşılaştırıldı. 0.05'e eşit ve küçük olasılık katsayıları istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ($p > 0.05$). Değişkenler (yaş, tümör derecesi, ÖR durumu, VSD, NVES, fibronektin ekspresyonu) arasında doğrusal ilişki olup olmadığı Spearman korelasyon testi ile araştırıldı. Elde edilen r değeri 0.00-0.25 arasında ise korelasyon yok, 0.25-0.50 arasında ise orta derecede, 0.50'den yüksek ise güçlü korelasyon olarak değerlendirildi.

Bulgular

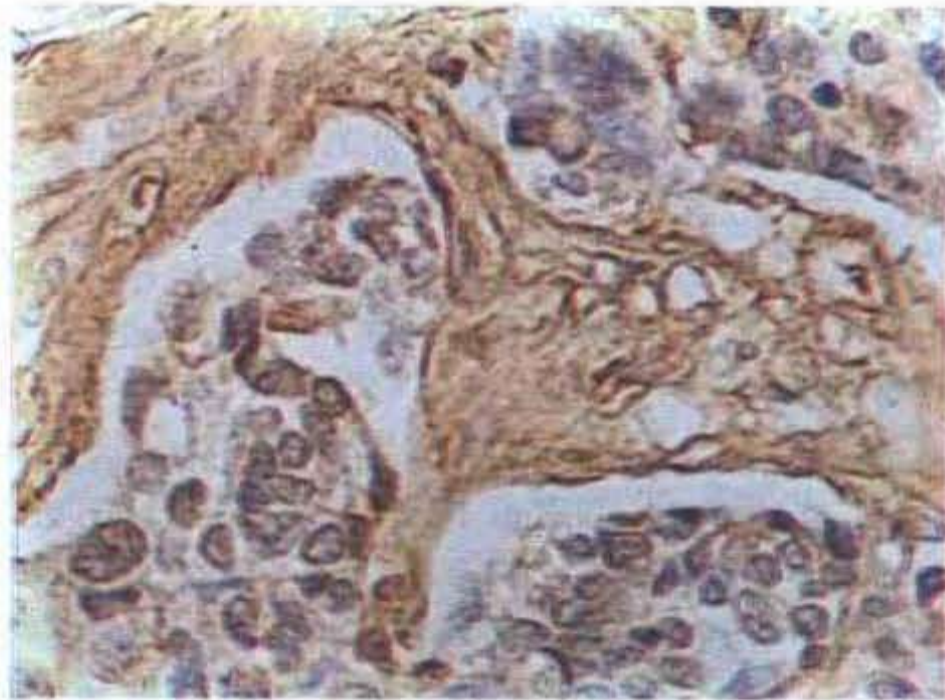
Bu çalışmaya alınan 43 invaziv duktal karsinom olgusunun tümünde tümör boyutu 10-20 mm arasındadır. 23 olguda LD metastazı (-), 20 olguda ise (+)'tir. Olguların yaşları 31-76 arasında olup ortalama yaş 54.41'dir. Temmuz 1999 olarak, yalnız 27 olgu izlemde olup, izlem süreleri 2-59 ay arasında değişmektedir. Ortalama izlem süresi 27.81'dir. Olguların 1'i tümör dışı nedenle, 5'i tümör nedeni ile 3-41 ay arasında değişen süreler



Resim 1.



Resim 2.



Resim 3.

İçinde ex olmuştur. 12-25 ay arasında 6 olguda uzak metastaz izlenmiştir. 15 olgu ise ortalama 30 aydır hastaliksiz yaşamını sürdürmektedir. Tümör nedeniyle ex olan olgulardan 2'si LD metastazı olmayan, derece 2, ÖR (+) ve derece 3, ÖR (+) hastalardır. Ex olan diğer 3. olgunun tümü LD metastazı olan, derece 2, ÖR (-) hastalardır.

LD metastazı (+) ve LD metastazı (-) olguların yaş, tümör derecesi ve ÖR durumu Tablo I'de gösterilmiştir.

LD metastazı (+) ve (-) iki küme arasında, yaş ($p=0.57$), tümör derecesi ($p=0.93$), ÖR ($p=0.92$) durumuna göre istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo I. LD (-) ve LD (+) olguların yaş, tümör derecesi ve ÖR durumuna göre dağılımı.

LD Metastazı	Ortalama Yaş	Tümör Derecesi			ÖR		Olgu Sayısı
		1	2	3	(+)	(-)	
(-)	54.17	8	7	8	13	10	23
(+)	54.70	7	7	6	11	9	20

LD metastazı olan kümede ortalama VSD $20.2 \pm 9.9 \text{ mm}^{-1}$, metastaz olmayan kümede ise ortalama VSD $16.0 \pm 8.6 \text{ mm}^{-1}$ bulunmuştur. Göreceli olarak iki küme arasında fark olmasına karşın, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p=0.14$). Benzer biçimde, ortalama NVES metastatik kümede $84.8 \pm 42.5 \text{ mm}^{-2}$, metastaz olmayan kümede $79.6 \pm 55.7 \text{ mm}^{-2}$ bulunmuştur ve bu fark da istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.73$) (Tablo II).

Tablo II. LD metastazına göre ortalama VSD ve NVES.

	LD(-) (n=23)	LD(+) (n=20)	p
VSD (mm^{-1})	16.0 ± 8.6	20.2 ± 9.9	0.14
NVES (mm^{-2})	79.6 ± 55.7	84.8 ± 42.5	0.73

LD (-) ve LD (+) olguların 41(%95.3)'inde tümör stroması FN ile olumlu boyanmıştır. Yalnız 2 olguda (%4.6) stromal boyanmanın çok hafif olduğu gözlenmiş ve (-) olarak değerlendirilmiştir. Bu 2 olguda sitoplazmik boyanma olumludur. LD (-) olguda perisellüler boyanma olumsuz, LD (+) olguda olumludur.

LD (-) kümede 15 (%65.2) olguda sitoplazmik boyanma olumsuz iken, 8 (%34.7) olguda olumludur. Yine bu

kümede 18 (%78.2) olguda tümör hücreleri ile stroma sınırında, stromaya göre daha koyu boyanma gösteren perisellüler boyanma görülmüş, 5 olguda (%21.7) ise görülmemiştir. LD (+) kümede 14 (%70.6) olguda sitoplazmik boyanma olumsuz, 6 (%30.0) olguda olumludur. Perisellüler boyanma 18 (%90.0) olguda olumlu, 2 (%10.0) olguda olumsuzdur. LD (-) ve LD (+) iki küme arasında, FN boyanma özelliklerine göre istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Fibronektin ekspresyonunda stromal ve sitoplazmik boyanmanın birbiriyle orta derecede ilişkili olduğu görüldü ($r= -0.31$).

İstatistiksel analizde sağkalım ile incelediğimiz parametreler (yaş, LD metastazı, tümör derecesi, ÖR, VSD ve NVES değerleri, FN boyanma özelliği) arasında ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$). Değişkenler kendi aralarında karşılaştırıldığında yaş ve ÖR durumu arasında anlamlı ilişki görülmüştür ($p=0.02$). Yaş arttıkça ÖR (+)'liği artmıştır. Değişkenler arasında Spearman korelasyon testi ile VSD ve NVES arasında güçlü ilişki bulundu ($r=0.88$). Tümör derecesi ve NVES arasında güçlü ($r=0.60$), tümör derecesi ve VSD arasında orta derecede ($r= 0.37$) ilişki görüldü. Yine tümör derecesi ile ÖR durumu orta derecede ($r= -0.31$) ilişkili bulundu. Diğer değişkenler arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır.

Tartışma

Meme kanserinde sağaltım, temel olarak tümör evresine göre belirlenmektedir. Tümör boyutu ve LD tutulumuna göre cerrahi eksizyon ve ek kemoterapi uygulaması değişiklik göstermektedir (25). Tümör boyutu ve LD tutulumu en önemli prognostik faktörler olarak bildirilmektedir (26). ÖR durumu da sağaltımı belirlemede yararlıdır. ÖR (+) hastalarda kemoterapinin 50 yaş ve üzerindeki için sağkalımı uzattığı, 50 yaş altında ise anlamlı etkisi olmadığı gözlenmiştir (26). Kimi çalışmalarda ÖR (+) ise hastalıklı ve hastaliksız sağkalımın, ilk yıllar için daha uzun olduğu, ancak uzun dönemde anlamlı fark görülmediği bildirilmektedir (25). Scarff-Bloom-Richardson tümör derecesi, DNA flow sitometri, morfometri, İDK, proliferasyon belirleyicileri ve diğer etkenlerin prognozda klinik önemleri henüz tam kabul görmemiştir (25).

Bu çalışmada yer alan 43 erken evre invaziv duktal karsinom olgusundan yalnız 27 olgu izlemde olup, ortalama izlem süresi 27.81 aydır. Olgularda yaş, LD metastazı, tümör derecesi ve ÖR durumu ile sağkalım arasında

ilişki görülememiştir. LD metastazı olan ve olmayan iki küme arasında yaş, tümör derecesi, ÖR durumunda istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır. Bu faktörlerin metastaz ve prognozu belirlemede yeterli olamayacağı sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçta olgu sayısının az olması ve izlem süresinin çok kısa olmasının da etkili olabileceği düşünülmüştür. ÖR (+)'liğinin anlamlı olarak yaş arttıkça arttığı, tümör derecesi arttıkça azaldığı gözlenmiştir (sırasıyla $p=0.02$, $r=-0.3$). Bu sonuç kaynak bilgileri ile uyumludur (27). Birçok çalışmada meme tümörlerinde intratümöral anjiogenezin bağımsız bir prognostik faktör olabileceği bildirilmiştir (1, 4, 28). Damarlanmanın yoğun olduğu alanlardaki MDS'nin LD metastazı ve uzak metastaz için bağımsız bir gösterge olabileceği ileri sürülmüştür (6, 29, 30).

Meme kanserlerinde anjiogenezi inceleyen kimi çalışmalarda ise bilinen prognostik faktörlerle ya da sağ kalımla ilişkisi saptanamamıştır (31, 32, 33).

Meme tümörlerinde anjiogenezi inceleyen çalışmaların çoğunda İDK'sal olarak belirlenen damarlar, damar yoğunluğunun en fazla olduğu (hot spot) alanlar belirlenerek sayılmıştır (1, 4, 5, 28). Bu yöntemde damarların belirlenmesinde bası, kıvrımlanmalar, "hot spot" alanların seçiminin subjektif olması gibi olumsuzluklar vardır. Üç boyutlu yapıların değerlendirilmesinde kullanılan VSD'nin stereolojik yöntemlerle değerlendirilmesi ile bu olumsuzluklardan kaçınılabileceği bildirilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda invaziv duktal karsinomlarda anjiogenezi değerlendirmek amacıyla VSD ve NVES belirlenmiştir (24).

Çalışmamızda LD (+) 20 hastada ortalama VSD 16.0 ± 8.6 mm^{-1} iken, LD (-) 23 olguda ortalama VSD 20.27 ± 9.9 mm^{-1} bulunmuştur. LD (-) kümeye göre LD (+) kümede VSD hafif bir yükselme göstermiş olmasına karşın, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.14$). Benzer olarak LD (+) kümede ortalama NVES 84.8 ± 42.5 mm^{-2} iken, LD (-) kümede 79.67 ± 55.7 mm^{-2} bulunmuştur. LD (-) kümeye göre LD (+) kümede NVES değerindeki bu artış da istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.73$). VSD ve NVES'in metastazı belirlemede yeterli olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. VSD ve NVES karşılaştırıldığında güçlü ilişkili olarak bulunmuştur ($r=0.88$). VSD ve NVES, yaş, tümör derecesi, ÖR ve FN ekspresyonu ile karşılaştırıldığında, yalnız tümör derecesi ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. NVES ve tümör derecesi

arasında güçlü ilişki, VSD ve tümör derecesi arasında orta derecede ilişki bulunmuştur ($r=0.60$ ve $r=0.37$). Tümör derecesi ÖR durumu ile orta derecede ters ilişkili bulunmuştur ($r=-0.31$). İncelenen diğer parametreler (yaş, LD tutulumu, tümör derecesi, ÖR, FN ekspresyonu) gibi VSD ve NVES de sağkalım ile ilişkili bulunmamıştır. Tümör derecesi ile ilişkili olmasına karşın, bu parametrelerin klinik olarak prognostik bilgi vermediği görülmüştür. Hasta sayısının az olması ve izlem sürelerinin çok kısa olmasının da sonuçta etkili olabileceği düşünülmüştür.

Tümör hücrelerinin anjiogenetik yetenek açısından heterojen olduğu ve yüksek oranda anjiogenik hücre bulunmasının metastaz oluşumunda önemli olduğu düşünülmektedir. Tümörlerde anjiogenezin metastaz için gerekli, ancak tek başına yeterli olmadığı bildirilmektedir (8).

Kültürlerde yapılan incelemelerde epitelial hücrelerde FN miktarı ve devamlılığının, mezankimal hücrelere göre daha az olduğu gözlenmiştir. Tümörlerde yapılan çalışmalarda kesin olmamakla birlikte kimi zaman FN'in karsinom hücreleri yüzeyinden kaybolduğu gözlenmiştir (13). Birçok araştırmacı malign epitelial meme tümörlerinde FN kaybını bildirmiştir, ancak az sayıda çalışmada kimi tümör hücrelerinin yüzeyinde FN varlığı gözlenmiştir (19).

Christensen ve ark. çalışmalarında, meme tümör hücrelerinde özellikle sitoplazmanın periferinde diffüz ya da granüler boyanma gözlenmiştir. Tümörün anaplazi derecesi ile intrasellüler FN konsantrasyonunun ilişkili olduğunu düşünmüşlerdir (19).

Yoshida ve ark. çalışmasında, benign ve malign meme dokusunda FN ekspresyonunu, İDK ve in situ hibridizasyon ile incelenerek karşılaştırılmıştır. Tümörlerin büyük bir kısmında, hem epitelial hem de stromal hücrelerde ekspresyon gözlenmiştir. Sonuçta FN'in kanser stromasının yapılanmasında olduğu kadar, intraduktal yayılımı ilgili hücre fonksiyonları, kanser hücrelerinin invazyonunda da etkili olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca histolojik türe göre mRNAs ekspresyonunun farklı olduğu bildirilmiştir (34).

Bu çalışmada, 43 invaziv duktal karsinomda İDK'sal olarak FN ekspresyonu incelenmiştir. Olgularda yaygın olarak heterojen boyanma izlenmiştir. Aynı tümör içinde, özellikle sitoplazmik boyanmada belirgin olmak üzere (-) ve (+) boyanma gözlenmiştir. Bu nedenle boyanma yoğunluğu belirlenmemiş, baskın duruma göre, boyanma (-) ya da (+) olarak değerlendirilmiştir. 41 (%95.4) olguda tümör stroması (+) boyanmıştır. Yalnız 2 (%4.6)

olguda çok hafif ve seyrek stromal boyanma olmuş ve (-) olarak değerlendirilmiştir. Bu 2 olguda sitoplazmik boyanma (+) bulunmuştur. Toplam 29 (% 67.4) olguda sitoplazmik boyanma (-), 14(% 32.5) olguda (+) olarak değerlendirilmiştir. Perisellüler boyanma ise 36 (% 83.7) olguda (+), 7 (% 16.2) olguda (-)'dir.

Meme kanserlerinde FN ekspresyonunun prognostik önemini araştıran çalışmalarda sonuçlar çelişkilidir (35, 36, 37).

Arihiro ve ark. çalışmasında, 76 olgunun %99'unda İDK'sal olarak stromada yoğun FN ekspresyonu gözlenmiştir. Histolojik tür, diferansiyasyon derecesi, yaş, tümör çapı, LD metastazı, ÖR ve PR durumu ile FN ekspresyonu arasında ilişki bulunamamıştır (35).

Christensen ve ark., 77 invaziv meme tümöründe, periferik stromal FN boyanma paterni ile tümör davranışı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Metastatik potansiyel için stromal boyanmanın bir parametre olabileceği sonucuna varmışlardır. Mekanizma tam olarak açıklanamamıştır. Olasılıkla FN'in granülasyon dokusu ve embriyonik gelişmede olduğu gibi stromal morfogenetik hareketi tetikleyici, belki de immunolojik bir yanıt oluşturabileceği ve bunun tümörlerde kaybolduğu düşünülmüştür (36). Rosa ve ark.'nın çalışmasında İF yöntemiyle, MAb FDC-6 ile reaksiyon veren onfFN ve vermeyen norFN ekspresyonu incelendiğinde, normal bezler, benign ve malign tümörlerde norFN diffüz (+) bulunmuştur. onfFN ise normal bezler ve benign tümörlerde (-) iken, malign tümörlerde %60 olguda (+) bulunmuştur. onfFN ekspresyonu ile prognostik önemi bilinen histolojik derece arasında, orta ve yüksek dereceli tümörlerde anlamlı ilişki gözlenmiş, ancak düşük dereceli tümörlerde anlamlı ilişki görülmemiştir. onfFN'in meme kanserlerinde yeni bir prognostik faktör olabileceğini düşünmüşlerdir (37).

Çalışmamızda, LD (+) ve LD (-) iki kümede, FN boyanma özellikleri istatistiksel anlamlı fark göstermemiştir. FN boyanma özelliği sağkalımla karşılaştırıldığında anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$). Ayrıca incelenen diğer parametrelerden (yaş, tümör derecesi, ÖR, VSD, NVES) hiçbiri ile anlamlı ilişki bulunamamıştır. FN stromal ve sitoplazmik boyanma, birbiriyle orta derecede ilişkili bulunmuştur ($r=-0.13$). FN sitoplazmik (-) olgularda, stromal (+) boyanmanın daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuç meme kanserlerinde tümör hücreleri yüzeyinde FN kaybı, stromada ise yoğun boyanma olduğunu bildiren çalışmalarla uyumlu olarak düşünülmüştür. Ancak FN ekspresyonunun prognostik önemi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Kaynaklar

1. Craft PS, Harris AL. Clinical prognostic significance of tumour angiogenesis. *Annals of Oncology* 1994; 5: 305-311.
2. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothernber ML, Merino MJ. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147: 33-41.
3. Norrby K. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS* 1997; 105: 417-437.
4. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995; 147: 9-19.
5. Weidner N. Tumor angiogenesis: Review of current applications in tumor prognostication. *Sem Diag Pathol* 1993; 10: 302-313.
6. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invazive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8
7. Wakui S, Furusato m, Itoh t, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshita I, Asano K, Tokuda T, Aizawa S, Ushigome S. Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: A morphometric study. *J Pathol* 1992; 168: 257-262.
8. Weidner I, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 401-409.
9. Brawer MK. Quantitative microvessel density: A staging and prognostic marker for human prostatic carcinoma. *Cancer* 1996; 78: 345-349.
10. Brawer MK, Deering RE, Brown M, Preston SD, Bigler SA. Predictor of pathologic stage in prostatic carcinoma: The role of neovascularity. *Cancer* 1994; 73: 678-687.
11. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *The Lancet* 1992; 340: 145-146.
12. Gorczyca W, Holm R, Nesland JM. Laminin production and fibronectin immunoreactivity in breast carcinomas. *Anticancer Research* 1993; 13: 851-858
13. D'Ardenne AJ, McGee JO'D. Fibronectin in disease. *J Pathol* 1984; 142: 235-251.
14. Koukoulis GK, Howeedy AA, Korhonen M. Distribution of tenascin, cellular fibronectins and integrins in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1993; 25 (2): 285-295.
15. Kaczmarek J, Castellani P, Nicolo G, Spina B, Allemanni G, Zardi L. Distribution of oncofetal fibronectin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J cancer* 1994; 58: 11-16.
16. Lorke D, Möller P. The early appearance of fibronectin in the course of metastatic tumor growth in lymph nodes. *J Cancer Res Clin Oncol* 1985; 109: 65-71.
17. Yang NS, Kirkland W, Jorgensen T, Furmanski P. Absence of fibronectin and presence of plasminogen activator in both normal and malignant human mammary epithelial cells in culture. *J Cell Biol* 1980; 84: 120-130.
18. Alon Y, Horowitz AT, Biran S, Weis DW, Doljanski F. Immunofluorescent characterization of fibronectin, laminin, and keratin in normal and neoplastic human mammary epithelial cells in culture and in breast tissue sections. *Int J Tiss Reac* 1986; 8 (5): 401-410.
19. Christensen L, Nielsen M, Holund B, Clemmensen I. In vivo demonstration of cytoplasmic fibronectin in human breast carcinomas. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1985; 407: 337-346.
20. Natali PG, Giacomini P, Bigotti G, Nicotra MR, Bellocchi M, Martino CD. Heterogeneous distribution of actin, myosin, fibronectin and basement membrane antigens in primary and metastatic human breast cancer. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1984; 405: 69-83.
21. D'Ardenne AJ, Barnard NJ. Paucity of fibronectin in invasive lobular carcinoma of breast. *J Pathol* 1989; 157: 219-224.
22. Takei H, Iino Y, Horiguchi J, Yokoe T. Immunohistochemical fibronectin staining pattern and prognosis in invasive breast carcinoma. *Oncol* 1995; 52: 106-111.
23. Takei H, Iino Y, Horiguchi J, Maemura M, Koibuchi Y, Nagaoka H, Yokoe T, Oyama T, Morishita Y. Angiogenesis and stromal fibronectin expression in invasive breast carcinoma. *Int J Onc* 1998; 12: 517-523.
24. Barth PJ, Weingardner K, Köhler HH, Bittinger A. Assessment of the vascularization in prostatic carcinoma. A morphometric investigation. *Hum Pathol* 1996; 27: 1306-1310.
25. Biesterfeld S, Noll I, Noll E, Noll E, Wohltmann D, Böcking A. Mitotic frequency as a prognostic factor in breast cancer. *Hum Pathol* 1995; 26: 47-52.
26. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer* 1994; 74: 381-400.
27. Habel LA, Stanford JL. Hormone receptors and breast carcinoma. *Epidemiologic Reviews* 1993; 15: 209-219.
28. Heimann R, Ferguson DJ, Hellman S. The Relationship between nm23, angiogenesis, and the metastatic proclivity of node-negative breast cancer. *Cancer Research* 1998; 58: 2766-2771.
29. Özer E, Canda T, Kurtoğlu B. The role of angiogenesis, laminin and CD44 expression in metastatic behavior of early-stage low-grade invasive breast carcinomas. *Cancer Letters* 1997; 121: 119-123.
30. Horak ER, Leek R, Klenk N, Lejeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris A. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-1124.

31. Goulding H, Rashid Abdul NF, Robertson JF, Bell JA, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO. Assessment of angiogenesis in breast carcinoma: An important factor in prognosis? *Hum Pathol* 1995; 26: 1196-1200.
32. Charpin C, Devictor B, Bergeret D, Andrac L, Boulat J, Horschowski N, Lavaut MN, Piana L. CD31 Quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 443-448.
33. Costello P, McCann A, Carney DN, et al. Prognostic significance of microvessel density in lymph node negative breast carcinoma. *Hum Pathol* 1995; 26: 1181-1184.
34. Yoshida T, Matsumoto E, Hanamura N, Kalembeiyi I, Katsuta K, Ishihara A, sakakura T. Co-Expression of tenascin and fibronectin in epithelial and stromal cells of benign lesions and ductal carcinomas in the human breast. *J Pathol* 1997; 182: 421-428.
35. Arihiro K, Inai K, Kurihara K, Takeda S, Kaneko M. Distribution of laminin, type IV collagen and fibronectin in the invasive component of breast carcinoma. *Act Pathol Jap* 1993; 43: 758-764.
36. Cristensen L, Nielsen M, Andersen J, Clemmensen I. Stromal fibronectin staining pattern and metastasizing ability of human breast carcinoma. *Cancer Research* 1988; 48: 6227-6233.
37. Rosa BL, Vielh P, Matsuura H, Clausen H, Cuadrado C, Burtin P. Distribution of oncofetal fibronectin in human mammary tumors: Immunofluorescence study on histological sections. *Cancer Res* 1990; 50: 1608-1612.

Yazışma Adresi:

Dr. Dilek Ak
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
İnciraltı/İzmir
Tel: (0232) 259 59 59 / 34 01
