

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**MEMEDE BENİGN ve MALİGN KİTLE TESPİT
EDİLEN KADINLARDA DOKU ve SERUM
S100A4, VEGF-A, ENDOSTATİN DÜZEYLERİ
ARASINDAKİ İLİŞKİ**

DR. YILMAZ ÖZALP

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**MEMEDE BENİGN ve MALİGN KİTLE TESPİT
EDİLEN KADINLARDA DOKU ve SERUM
S100A4, VEGF-A, ENDOSTATİN DÜZEYLERİ
ARASINDAKİ İLİŞKİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. YILMAZ ÖZALP

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Prof. Dr. Banu ÖNVURAL

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 2008.KB.SAG.036
sayılı proje desteği ile gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

Tablo Listesi.....	i
Şekil Listesi.....	ii
Grafik Listesi.....	iii
Kısaltmalar.....	iv
Teşekkür.....	vii
Özet.....	1
Summary.....	3
<u>1. GİRİŞ VE AMAC</u>	5
<u>2. GENEL BİLGİLER</u>	7
2.1. MEME KANSERİ	7
2.1.1. MEME KANSERİ EPİDEMİYOLOJİSİ	7
2.1.2. MEME KANSERİNDE ETYOLOJİ	7
2.2. MEME KANSERİNİN HİSTOLOJİK TİPLERİNE GÖRE DAĞILIMI	8
2.2.1. NONİNVAZİV (İN SİTU) KARSİNOM	9
2.2.1.1. Duktal Karsinoma İn Situ (DKİS)	9
2.1.1.2. Lobüler Karsinoma İn Situ (LKİS)	9
2.2.2. İNVAZİV KARSİNOM	9
2.2.2.1. İnvaziv Duktal Karsinom, No Special Type (NST)	10
2.2.2.2. İnvaziv Lobüler Karsinom	10
2.3. PROGNOSTİK ve PREDİKTİF FAKTÖRLER	10

2.3.1. İnvaziv Karsinom veya İn Situ Karsinom.....	11
2.3.2. Uzak Metastaz.....	11
2.3.3. Lenf Nodu Metastazı.....	11
2.3.4. Tümör Boyutu.....	11
2.3.5. Lokal Olarak İlerlemiş Hastalık.....	12
2.3.6. İnflamatuvar Karsinom.....	12
2.4. MİNÖR PROGNOTİK FAKTÖRLER.....	12
2.4.1. Histolojik Alt Tip.....	12
2.4.2. Tümör Derecesi.....	13
2.4.3. Östrojen ve Progesteron Reseptörü Varlığı ya da Yokluğu.....	13
2.4.4. HER2/neu.....	13
2.4.5. Lenfovasküler İnvazyon.....	14
2.4.6. Proliferatif Hız.....	14
2.4.7. DNA İçeriği.....	14
2.5. TNM SINIFLAMASI.....	14
2.6. ANJİYOGENEZ- Tümör İnvazyonu ve Anjiyogenez.....	17
2.7. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF).....	23
2.7.1. VEGF'in Fonksiyonu	25
2.7.2. VEGF Ekspresyonunun Düzenlenmesi.....	26
2.7.3. VEGF ve Kanser.....	27
2.7.4. VEGF ve Meme Kanseri.....	27
2.8. ENDOSTATİN: Endojen Anjiyogenez İnhibitörü.....	28

2.8.1. Yapısal Özellikleri.....	29
2.8.2. Endostatinin Hücre Yüzey Reseptörleri.....	30
2.8.3. Endostatinin Etki Mekanizması.....	30
2.8.4. Endostatin ve Kanser.....	31
2.9. S100A4 PROTEİNİ ve S100 PROTEİN AİLESİ.....	32
2.9.1. S100A4 Proteininin Biyokimyasal Özellikleri.....	32
2.9.2. S100A4 Doku Lokalizasyonu.....	33
2.9.3. S100A4; İntraselüler Rolü ve Hedef Proteinleri.....	33
2.9.4. S100A4; Extraselüler Rolü ve Hedefleri.....	34
2.9.5. S100A4 Ekspresyonunun Kanser Hastalarının Prognozu ile İlişkisi.....	35
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	36
3.1. ARAÇ ve GEREÇLER.....	36
3.1.1. Cihazlar ve Kitler.....	37
3.2. OLGULARIN SEÇİMİ, ÖRNEKLERİN TOPLANMASI ve SAKLANMASI.....	37
3.2.1. Olguların Seçimi.....	37
3.2.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması.....	38
3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER.....	39
3.3.1. VEGF-A ELISA Analizi	39
3.3.1.1. Ölçüm Yöntemi.....	39
3.3.1.2. Analiz Aşamaları.....	39
3.3.2. Endostatin ELISA Analizi.....	42

3.3.2.1. Ölçüm Yöntemi	42
3.3.2.2. Analiz Aşamaları.....	42
3.3.3. S100A4 ELISA Analizi.....	45
3.3.3.1. Ölçüm Yöntemi.....	45
3.3.3.2. Analiz Aşamaları.....	45
3.4. İmmunohistokimya (İHK) Çalışmaları.....	48
3.4.1. İmmunohistokimyasal VEGF-A, ES, S100A4 Protein Boyama Tekniği.....	48
3.4.2. İmmunoreaktivitenin Değerlendirilmesi.....	49
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	50
3.5.1. Verilerin Kaydedilmesi	50
3.5.2. Verilerin Analizi ve Tablolar ile Gösterilmesi.....	50
<u>4. BULGULAR</u>	51
4.1. TANIMLAYICI BULGULAR	51
4.1.1. Çalışma Grubu.....	51
4.1.2. Gruplardaki Olguların Yaş Ortalamaları	52
4.1.3. Menapoz Durumu.....	53
4.1.4. Patolojik Tanı.....	54
4.2. SERUM VEGF-A, ES, S100A4 DÜZEYLERİ ve VEGF-A/ES	55
4.2.1. Hasta Gruplarında Serum VEGF-A Düzeyleri.....	55
4.2.2. Hasta Gruplarında Serum Endostatin Düzeyleri.....	56
4.2.3. Hasta Gruplarında Serum S100A4 Düzeyleri.....	57
4.2.4. Serum VEGF-A/ES (Anjiyogenik Denge).....	58

4.3. KANSERLİ ve BENİGN HASTALIKLI MEME DOKUSUNDA VEGF-A, ES ve S100A4 EKSPRESYONU.....	60
4.4. SERUM ve DOKU PARAMETRELERİNİN KORELASYON SONUÇLARI..	62
4.5. YAŞ, MENAPOZ ve PATOLOJİK TANI İLE, ARAŞTIRILAN SERUM ve DOKU PARAMETRELERİNİN İLİŞKİSİ.....	64
4.6. KLİNİKOHİSTOPATOLOJİK DEĞİŞKENLER ve ARAŞTIRILAN PARAMETRELER İLE İLİŞKİLERİ.....	64
4.6.1. Patolojik Evre.....	64
4.6.2. Tümör Boyutu.....	68
4.6.3. Hasta Gruplarında ER, PR ve c-erbB2 Ekspresyonu.....	69
4.6.4. Hasta Gruplarında Histolojik Grade, Mitoz Derecesi, Nükleer Derece Durumları.....	71
4.6.5. Hasta Gruplarında Lenfovasküler İnvazyon ve Kan Damarı İnvazyon Durumları	72
4.6.6. Metastatik Lenf Nodu Sayısı	74
4.7. DOKUDA ARAŞTIRILAN PARAMETRELERE AİT İHK'SAL GÖRÜNTÜLER.....	75
4.7.1. Dokuda VEGF-A Ekspresyonu	75
4.7.2. Dokuda Endostatin Ekspresyonu	76
4.7.3. Dokuda S100A4 Ekspresyonu	77
<u>5. TARTIŞMA</u>	78
<u>6. KAYNAKLAR ve EKLER.....</u>	94
6.1. KAYNAKLAR.....	94
6.2. EKLER.....	105

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Meme kanserinin histolojik tiplerine göre dağılımı.....	8
Tablo 2. 2006 AJCC TNM sınıflaması.....	15
Tablo 3. Anjiyogenezi uyaran ve inhibe eden bazı önemli endojen maddeler.....	22
Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi.....	36
Tablo 5. Tez çalışmasında kullanılan kitlerin listesi.....	36
Tablo 6. Gruplardaki olguların yaş ortalamaları, minumum ve maksimum değerleri.....	52
Tablo 7. Hasta gruplarında menapoz durumunun karşılaştırılması.....	53
Tablo 8. Üç grupta serum VEGF-A, ES, S100A4 düzeylerinin ve VEGF-A/ES'nin karşılaştırılması.....	59
Tablo 9. Hasta gruplarında VEGF-A, ES, S100A doku ekspresyon durumlarının karşılaştırılması.....	61
Tablo 10. Hasta gruplarında doku VEGF-A boyanma yoğunluğu.....	62
Tablo 11. Malign grupta doku VEGF-A, ES, S100A4 ekspresyonları arasındaki korelasyon.....	62
Tablo 12. Hasta gruplarında VEGF-A, ES, S100A4, VEGF-A/ES'nin serum düzeyleri ile doku ekspresyonlarının korelasyonları	63
Tablo 13. Hasta gruplarında farklı patolojik evrelerdeki hasta sayı ve yüzdesi.....	65
Tablo 14. Erken ve geç patolojik evrede serum VEGF-A düzeylerinin karşılaştırılması.....	65
Tablo 15. Hasta gruplarında tümör boyutu.....	68
Tablo 16. Hasta gruplarında ER, PR, c-erbB2 ekspresyonları.....	69
Tablo 17. c-erbB2, ER, PR ekspresyon durumlarının tutarlılığı.....	70
Tablo 18. Hasta gruplarında histolojik grade, mitoz derecesi, nükleer derece durumu.....	71

Tablo 19. Hasta gruplarında lenfovasküler invazyon, kan damarı invazyonu durumu.....72

Tablo 20. Lenfovasküler invazyon ile serum VEGF-A düzeyleri ve doku VEGF-A ekspresyonlarının karşılaştırılması.....73

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Anjiyogenez: Yeni kan damarlarının oluşum mekanizması.....20

Şekil 2. VEGF izoform-reseptör ilişkisi ve etki mekanizmaları.....25

Şekil 3. Anjiyogenezde VEGF yolağı.....26

Şekil 4. VEGF'nin tümörün oluşum evrelerindeki yeri.....28

Şekil 5. Kollajen Tip XVIII NC1 bölgesi.....29

Şekil 6. EC ilişkili integrinlerin anjiyogenik inhibitörle etkileşimi ve ileti yolağı31

Şekil 7. S100A4 protein hedefleri ile kalsiyum bağımlı etkileşimi34

Şekil 8. Hastaların gruplara göre dağılımı51

Şekil 9. Hastaların patolojik tanılara göre dağılımı.....54

Şekil 10. Hasta gruplarında serum VEGF-A düzeylerinin karşılaştırılması.....55

Şekil 11. Hasta gruplarında serum endostatin düzeylerinin karşılaştırılması.....56

Şekil 12. Hasta gruplarında serum S100A4 düzeylerinin karşılaştırılması.....57

Şekil 13. Hasta gruplarında VEGF-A/ES'nin karşılaştırılması.....58

Şekil 14. Erken ve geç patolojik evrede serum VEGF-A düzeylerinin karşılaştırılması.....66

Şekil 15. Serum VEGF-A/ES ile, kategorize edilmiş patolojik evre karşılaştırılması.....67

Şekil 16. Serum VEGF-A düzeyleri ve metastatik lenf nodu sayısı arasındaki korelasyon.....74

Şekil 17. VEGF-A ekspresyonu (x200 büyütme) (pozitif sonuç).....75

Şekil 18. VEGF-A ekspresyonu (x400 büyütme) (negatif sonuç).....75

Şekil 19. ES ekspresyonu (x200 büyütme) (pozitif sonuç).....	76
Şekil 20. ES ekspresyonu (x200 büyütme) (negatif sonuç).....	76
Şekil 21. S100A4 ekspresyonu (x200 büyütme) (pozitif sonuç).....	77
Şekil 22. S100A4 ekspresyonu (x200 büyütme) (negatif sonuç).....	77

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. VEGF-A standart eğrisi.....	41
Grafik 2. Endostatin standart eğrisi.....	44
Grafik 3. S100A4 standart eğrisi.....	47

KISALTMALAR

AJJC	: American Joint Commitee on Cancer
ark.	: arkadaşları
BBD	: Benign Meme Hastalığı
BRCA-1	: Breast Cancer-1
bFGF	: Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
CAL	: Koroner Arter Lezyonu
c-erbB2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör 2
CK2	: Kazein Kinaz 2
DAB	: Diaminobenzidin
DKİS	: Duktal Karsinoma İn Situ
DNA	: Deoksiribonükleik asid
EC	: Endotelyal Hücre
EH	: Endometriyal Hiperplazi
ELISA	: Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay- Enzim Bağlı İmmnosorbent Ölçüm
ER	: Östrojen Reseptörü
ES	: Endostatin
FGF-4	: Fibroblast Büyüme Faktörü-4
FAK	: Fokal Adezyon Kinaz
Her2/neu	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör 2
HIF-1α	: Hipoksi ile İndüklenebilen Faktör-1 α
HIF-1β	: Hipoksi ile İndüklenebilen Faktör-1 β

İHK	: İmmunohistokimya
İLK	: İnvaziv Lobüler Karsinom
IL-1β	: İnterlökin-1 β
IL-6	: İnterlökin-6
IL-10	: İnterlökin-10
IL-13	: İnterlökin-1 β
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
LKİS	: Lobüler Karsinoma İn Situ
MAPK-1,2	: Mitojen Aktive Protein Kinaz-1,2
MHC	: Myozin Ağır Zinciri
MI	: Mitotik İndeks
MLN:	: Metastatik Lenf Nodu
MMP-2,9,13	: Matriks Metalloproteinaz 2,9,13
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MT1-MMP	: Membran Tip 1-Matriks Metalloproteinaz
MVD	: Mikrovasküler Dansite
NO	: Nitrik Oksit
PD-ECGF	: Trombosit Kaynaklı- Endotelial Hücre Büyüme Faktörü
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PI3 Kinaz	: Fosfoinozitol-3 Kinaz
PIGF	: Plasental Büyüme Faktörü
PKB	: Protein Kinaz B

PKC	: Protein Kinaz C
PR	: Progesteron Reseptörü
proMMP	: pro-Matriks Metalloproteinaz
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TGF-β1	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TIMP-1	: Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörü-1
TMB	: Tetrametilbenzidin
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü- α
TNM	: T: Tümör büyüklüğü; N: Bölgesel lenf bezleri tutulumu; M: Uzak metastaz
VEGF-A	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-A
VHL	: Von Hippeau Lindau

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyokimya uzmanlık eğitimim süresince mesleki eğitimimin yanında her konuda desteğini gördüğüm, örnek aldığım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Canan ÇOKER'e ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine;

Eğitimimde büyük emeği geçen bilgi ve tecrübesini aktaran, tez çalışmalarımnda bana yol gösteren, kolaylık sağlayan ve desteğini hiç esirgemeyen, unutamayacağım canım hocam Sayın Prof. Dr. Banu ÖNVURAL'a,

Asistanlık süresince ve özellikle tezimin zor geçen günlerinde hep moral veren, beni hiç geri çevirmeyen, bilgisiyle çok yardımcı olan güler yüzlü Sayın Doç. Dr. Sezer UYSAL'a,

Tezimin Patoloji ayağını yürüten Sayın Prof Dr. Tülay CANDAN, Uzman Dr. Merih GÜRAY DURAK ve immunohistokimya çalışmalarını yapan teknisyen arkadaşım Ayşen ÇAYAN'a,

Asistanlığım süresince bilgisi ve yaklaşımları ile örnek aldığım çalışma azimlerini bana yansıtan, her zaman yanımda hissettiğim Sayın Yard. Doç. Dr. Ali Rıza ŞİSMAN'a ve Yard. Doç. Dr. Tuncay KÜME'ye,

Dört yıl boyunca Tıbbi Biyokimya AD.'da birçok paylaşımda bulunduğumuz başta yakın arkadaşlarım Dr. Eylem Seçkin BOZKURT ve Dr. Öznur BİLEN olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

Tezim için bize hasta sağlayan Genel Cerrahi AD. 'Meme cerrahisi' ekibi değerli öğretim üyeleri ve asistanlarına,

Örnek toplama ve analiz aşamasında emeği geçen tüm Dokuz Eylül Üniversitesi Gündüz Hastanesi ve ARLAB çalışanlarına,

Tez ve diğer tüm evraklarımın takibinde büyük duyarlılık gösteren anabilim dalı sekreterimiz Eda OLUM'a,

Yaşamımın her anında olduğu gibi, bu süreçte de destekleri, sevgileri ve güvenleri için eşim ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Yılmaz ÖZALP

2010

ÖZET

Meme kanseri gibi solid tümörlerin gelişim, invazyon ve metastaz yeteneğine sahip olabilmeleri, anjiyogenez varlığına bağlıdır. Anjiyogenezin düzenleyicileri arasında en önemli olanlarının vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A) ve endostatin (ES) olduğu bildirilmektedir. S100A4'ün anjiyogenez ve tümör invazyonunu kolaylaştırarak tümörün ilerlemesine ve metastaza yol açması nedeniyle meme kanserinde prognostik faktör olabileceği bildirilmektedir. Bu çalışmanın amacı, benign meme hastalıklı, aksiller metastaz yapmış ve yapmamış meme kanseri hastalarında VEGF-A, ES, S100A4 proteinlerinin doku

.....
.....
.....eğişkenler ile olan ilişkisinin saptanması ve anjiyogenik dengenin metastazı öngörmedeki yararını araştırmaktır.

Çalışma grupları benign meme hastalığı olan 32 hasta, aksiller lenf nodu metastazı olmayan 39 meme kanseri hastası ve aksiller metastazı olan 18 meme kanseri hastasından oluşmaktaydı. VEGF-A, ES, S100A4 proteinlerinin doku ekspresyonları immunohistokimyasal (İHK) yöntemle, serum düzeyleri ELISA ile saptandı. Ayrıca elde edilen sonuçlar tümörün klinikohistopatolojik değişkenleri ile (yaş, menopozal durum, patolojik tanı ve evre, tümör boyutu, östrojen reseptörü, progesteron reseptörü, insan epidermal büyüme faktörü reseptör-2 (c-erbB2), histolojik grade, mitoz derecesi, nükleer derece, lenfovasküler invazyon ve kan damarı invazyonu) karşılaştırıldı.

VEGF-A, ES, ve S100A4'ün doku ekspresyonlarında hasta grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Serum VEGF-A ve VEGF-A/ES metastazlı grupta benign gruba göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0,006$ ve $p=0,010$). Ayrıca serum VEGF-A/ES metastazlı grupta, malign gruptan anlamlı yüksek idi ($p=0,048$). Serum VEGF-A ve VEGF-A/ES geç evrede olan hastalarda erken evre hastalara göre anlamlı yüksek saptandı ($p=0,033$ ve $p=0,014$). Metastatik lenf nodu sayısı ile serum VEGF-A düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($r=0,596$; $p=0,012$). Serum VEGF-A düzeyleri lenfovasküler invazyon olanlarda anlamlı yüksek saptandı ($p=0,034$). Lenfovasküler invazyon olmayanlarda dokuda VEGF-A immun boyanması anlamlı yüksek idi ($p=0,015$). Serum ES ve S100A4 düzeylerinde hasta grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Lenf nodu (-) olan malign grupta her üç parametrenin doku ekspresyonları birbirleri ile korele bulundu. Doku VEGF-A, ES, S100A4

ekspresyonları ile serum düzeyleri arasında korelasyon bulunmadı. Doku VEGF-A, ES ve S100A4 ekspresyonları ve serum düzeyleri ile diğer klinikohistopatolojik değişkenler arasında ilişki saptanmadı.

Sonuç olarak, serum ve doku S100A4 düzeylerinin memede kitle saptanan hastalar için hastalığın durumunu (metastaz olup olmadığını) belirlemede kullanılamayacağını; bu amaçla serum VEGF-A/ES'nin kullanılabileceğini, artmış serum VEGF-A düzeylerinin metastatik sürece geçişin bir göstergesi olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, anjiyogenez, VEGF-A, ES, VEGF-A/ES, S100A4, immunohistokimya.

SUMMARY

Growth, invasion and metastase potential of solid tumours like breast cancer depends on the presence of angiogenesis. Among the regulators of angiogenesis, VEGF-A and ES are reported to be the most important ones. Since S100A4 leads to tumour progression and metastasis by facilitating angiogenesis and tumour invasion, it is proposed to be a prognostic factor in breast cancer. The purpose of this study is to investigate the tissue expression of VEGF-A, ES, and S100A4 and to determine their serum values in patients with benign breast disease, breast cancer with axillary metastasis and breast cancer without axillary metastasis; and to evaluate if these parameters showed any difference between the groups. We also investigated if serum parameters correlated with their corresponding tissue expression. Correlation of tissue and serum parameters with clinicohistopathological variables and angiogenic balance in predicting metastasis were also investigated.

The study was conducted on 32 patients with benign breast diseases, 39 patients with breast cancer without axillary node metastases and 18 patients with breast cancer having axillary node metastases. Tissue expression of VEGF-A, ES, S100A4 proteins were determined by immunohistochemistry and serum levels by ELISA. Also results were compared with clinicohistopathological variables (age, menopausal status, pathological diagnosis and stage, tumour size, estrogen receptor, progesterone receptor, c-erbB2, histological grade, mitosis degree, nuclear degree, lymphovascular invasion and blood vessel invasion).

No significant difference was found for tissue expression of VEGF-A, ES, and S100A4 between the patient groups. Serum VEGF-A and VEGF-A/ES were significantly increased in the metastasis group when compared with the benign group ($p=0,006$; and $p=0,010$). Also serum VEGF-A/ES was significantly higher in the metastasis group than the malign group ($p=0,048$). Serum VEGF-A and VEGF-A/ES were significantly increased in advanced stage patients ($p=0,033$; $p=0,014$). A significant positive correlation existed between the number of involved lymph nodes and serum VEGF-A levels ($r=0,596$; $p=0,012$). Serum VEGF-A levels were significantly increased in those who had lymphovascular invasion ($p=0,034$). Tissue VEGF-A immunostaining was significantly increased in patients without lymphovascular invasion ($p=0,015$). There wasn't any significant difference between

the groups for serum ES and S100A4 levels. Tissue expression of all three parameters were correlated with each other in node negative cancer group. Correlation did not exist between the tissue expression and serum levels of VEGF-A, ES, and S100A4. Also tissue expression and serum levels of VEGF-A, ES, and S100A4 had no correlation with the clinicohistopathological variables.

In conclusion, we think that S100A4 could not be used as a marker showing disease state (differentiating metastasis from non-metastasis) in breast tumours. However serum VEGF-A/ES could be used for this purpose and increased serum VEGF-A levels could be an indicator for proceeding to metastatic process.

Key Words: Breast cancer, angiogenesis, VEGF-A, ES, VEGF-A/ES, S100A4, immunohistochemistry.

1. GİRİŞ ve AMAC

Meme kanseri tüm kanserler içinde kadınlarda en sık görülen kanser tipidir ve dünyada her yıl yaklaşık 500,000 ölümden sorumludur (1). Amerikan Kanser Birliği 2009 yılında 192,370 invaziv meme kanseri görüleceği tahmininde bulunmuştur. Buna ek olarak 62,280 kadının in situ meme kanseri tanısı alacağı (~ %85 duktal karsinoma in situ), aynı yıl içinde 40,610 kadının meme kanserinden öleceği rapor edilmiştir (2). Türkiye’de de kadınlar arasında en sık görülen 10 kanser türü içersinde meme kanseri birinci sırada yer almaktadır (3). Meme kanserinden kaynaklanan ölümleri azaltmak için en önemli strateji, erken tanı ve tedavidir (4). Lezyonların erken dönemlerde saptanması, lenfatik ya da uzak metastaz yapmadan önce yakalanması, yaşam süresinde iyi yönde değişiklikler meydana getirmektedir (5). Anjiyogenez, mevcut damarlardan yeni damarların oluştuğu bir süreç olarak tanımlanmaktadır (6). Anjiyogenez, anjiyogenezi uyaran ve önleyen çok sayıda faktör tarafından kontrol edilen, son derece karmaşık ve dinamik bir olaydır (7). Bir grup tümör hücresinin anjiyogenik özellik kazanmasının tümörün malign potansiyelinin gelişiminde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Bu özellik anjiyogenezi uyaran ve önleyen faktörler arasındaki dengenin uyarıcı faktörler lehine bozulması ile ortaya çıkmaktadır (8). Anjiyogenez, solid tümörlerin lokal olarak büyümesinin ardından, uzak bölgelere yayılımında ve hedef organa yerleşebilmesinde de kritik rol oynamaktadır (9). Özetle; tümörün anjiyogenik fenotipi biyolojik davranışının temel belirleyicisidir (10-12). Tümörden salınan çok sayıda anjiyogenik faktörlerin yanında anti-anjiyogenik sitokinler de bulunmaktadır (13).

Vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A) tümör anjiyogenezinde ve progresyonunda önemli rol oynamaktadır. Çok sayıda çalışmada VEGF’nin meme kanserinde prognostik değeri gösterilmiştir (14, 15). Endostatinin (ES) ise endotelial hücre proliferasyonunu, tümör büyümesini ve metastazı suprese ettiği, hücre kültürü ve hayvan çalışmalarıyla gösterilmiştir (16).

S100A4, kalsiyum bağlayıcı proteinlerden S100 ailesinin bir üyesidir (17, 18). İntraselüler ve ekstraselüler fonksiyonları olan S100A4’ün, ekstraselüler matriksin yeniden düzenlenmesine, anjiyogenez ve tümör invazyonunu kolaylaştırarak tümörün ilerlemesine ve metastaza yol açması nedeniyle çeşitli tümörlerde prognostik faktör olabileceği

düşünülmektedir (19, 20). S100A4'ün erken evre meme kanserinde, metastatik potansiyeldeki kritik değişikliklerin belirleyicisi olabileceği bildirilmektedir (21).

Literatürde bu üç parametrenin meme kanserinde (VEGF-A, ES, S100A4) dokuda ve serumda birlikte incelendiği, ayrıca serumda S100A4'ün araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada;

- 1) Benign meme hastalıklarında, aksiller metastaz yapmış ve yapmamış meme kanserlerinde S100A4, VEGF-A, ES proteinlerinin herbirinin ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak belirlenmesi, gruplar arası farkın anlamlılığını belirlemede ve metastazı öngörmeye yarar sağlayıp sağlamadığı,
- 2) Her üç parametrenin doku ekspresyon durumlarının seruma yansıyor yansımadığı,
- 3) Doku S100A4 ekspresyonunun anjiyogenik düzenleyicilerden doku ve serum VEGF-A, ES ve serum VEGF-A/ES ile ilişkisi,
- 4) Serum S100A4, VEGF-A, ES ve VEGF-A/ES'nin her üç çalışma grubumuzda klinikohistopatolojik parametrelerle olan ilişkisinin belirlenmesi, anjiyogenik dengenin prognozu öngörmedeki yararı araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEME KANSERİ

Meme kanseri, meme duktus ve lobüllerinden köken alan epitel hücrelerinin kontrolsüz büyümesidir. Bu hastalık erken duktal karsinoma in situ ve lobüler karsinoma in situ gibi **noninvaziv meme kanseri**, meme stromasına yayılan **primer invaziv meme kanseri**, lenf nodlarına ve uzak organlara yayılmış **ilerlemiş-metastatik meme kanserini** içerir. Meme kanserleri fibroadenoma, fibrokistik değişiklikler ve benign hiperplazi gibi benign meme patolojilerinden de farklılaşırlar (22).

2.1.1. MEME KANSERİ EPİDEMİYOLOJİSİ

Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen kanser olup, kansere bağlı ölümlerin ikinci sıradaki nedenidir (23, 24). Meme kanseri, kadınlarda görülen kanserlerin %22'sini, kanser ölümlerinin %15'ini oluşturmaktadır (25). Amerikan Kanser Birliği 2009 yılında 192,370 invaziv meme kanseri vakası görüleceği tahmininde bulunmuştur. Buna ek olarak 62,280 kadının in situ meme kanseri tanısı alacağı (~ %85 duktal karsinoma in situ), aynı yıl içinde 40,610 kadının meme kanserinden öleceği öngörülmüştür (2). Geçen 20 yıl içinde meme kanseri insidansında artış olmasına rağmen mortalitede düşüş gözlenmiştir. Erken tanı yöntemlerinin geniş insan popülasyonlarında etkin şekilde uygulanması ölüm oranlarının düşmesinde en önemli nedendir. Hedefe yönelik tedavi seçeneklerinde başarılı sonuçlar da bu iyileşmeye katkıda bulunmaktadır (26).

2.1.2. MEME KANSERİNDE ETYOLOJİ

Meme kanserinde etyoloji tam olarak ortaya konamamasına rağmen genetik, hormonal, çevresel faktörler suçlanmaktadır (27).

Meme kanseri belirli ailesel vakalar dışında 25 yaş öncesi seyrekdir. İnsidans yaşam boyu giderek artar. Meme kanseri vakalarının %78'i 50 yaş üzerindedir. Tanı anında ortalama yaş 64'tür. Birinci derece yakınlarında meme kanseri olan kadınlarda risk 2-4 kat artmaktadır. 17. kromozom üzerindeki BRCA1 tümör supresör genindeki mutasyon sonucu meme kanseri gelişim riski yaklaşık %70-75'tir. BRCA1 mutasyonları tüm meme kanserlerinde %5'in altında bulunur. BRCA1 mutasyonu olan kadınlarda gelişen meme kanserleri karakteristik olarak erken yaşta görülme özelliğinde olup genellikle triplet negatif kötü diferansiye

histopatolojik özellik gösterirler (28). Meme kanserinin çoğunluğunu **sporadik** meme kanserleri oluştururken sadece %5-10 kadarını **herediter** meme kanserleri oluşturmaktadır (29). Onüçüncü kromozom üzerinde yer alan BRCA2 genindeki mutasyon da meme kanseri ile ilişkilidir. Benign meme hastalıkları, özellikle atipik hiperplazi, meme kanserine dönüşebilmektedir. Mamografide meme dansitesinde artış gözlenen kadınlarda meme kanseri 4-6 kat artmıştır. Meme kanserinde hormonal faktörler de önemlidir. Erken menarş ve geç menapoz kanser gelişiminde risk oluşturmaktadır. 35 yaş öncesi hamilelik, riski azaltmasına karşın, östrojen hormonu içeren oral kontraseptifler meme kanseri riskini artırmaktadır. Obezite, diyetle yüksek yağ oranı, postmenapozal dönemde ekzojen östrojen kullanımı ile meme kanseri arasında direkt korelasyon bulunmuştur. Ayrıca alkol kullanımı ve iyonize radyasyona maruziyet meme kanseri gelişimini artırmaktadır (30).

2.2. MEME KANSERİNİN HİSTOLOJİK TİPLERİNE GÖRE DAĞILIMI

Meme kanserleri, sınırlayıcı bazal membranı aşmayan (non-invaziv) ve aşanlar (invaziv) olmak üzere sınıflandırılırlar (Tablo 1) (31).

Tablo 1. Meme kanserinin histolojik tiplerine göre dağılımı (31).

Total Kanserler	Yüzde Dağılımı
Noninvaziv Karsinoma (Karsinoma İn Situ)	15-30
Duktal Karsinoma İn Situ	80
Lobüler Karsinoma İn Situ	20
İnvaziv Karsinoma	70-85
İnvaziv duktal karsinom (No special type carcinoma)	79
Lobüler karsinom	10
Tübüler/Kribriform karsinom	6
Müsinöz karsinom	2
Medüller karsinom	2
Papiller karsinom	1
Metastatik karsinom	<1

2.2.1. NONİNVAZİV (İN SİTU) KARSİNOM

İki tip noninvaziv meme karsinomu vardır. Duktal karsinoma in situ (DKİS) ve lobüler karsinoma in situ (LKİS). Her ikisi de bazal membran ile sınırlı olup stromaya ve lenfovasküler kanallara yayılım göstermezler (31).

2.2.1.1. Duktal Karsinoma İn Situ (DKİS)

Bu lezyonlar meme duktusunun içinde çoğalarak duktus boyunca yayılırlar ve bazal membranı aşmazlar (24). DKİS çeşitli morfolojik ve biyolojik özellikte heterojen lezyon grupları içerebilmektedir. DKİS'in histolojik karakteristiklerinin metastatik olmadığı bilinmektedir. Bununla birlikte saf DKİS tanısı alan %1-2 hastada ya gizli bir invazyon ya da şüphelenilmemiş rezidü hastalık sonucu metastaz gelişebilmektedir (24). Nadiren memede ele gelen kitle ve radyolojik olarak ortaya çıkarlar. İyi diferansiye tümörlerde hücreler, östrojen reseptörü daha az, progesteron reseptörü daha fazla eksprese ederler. Prognozu mükemmel olup basit mastektomi sonrası uzun dönem sağkalım %97'nin üzerindedir. Bazı kadınlarda lokal rekürrens olmadan uzak metastazlar gelişebilmektedir (30).

2.2.1.2. Lobüler Karsinoma İn Situ (LKİS)

Memenin terminal duktal lobüler hücrelerinin noninvaziv, anormal proliferasyonudur. LKİS'e komşu stroma içerisinde görülen mikrokalsifikasyonlar çok tipik bulgusudur (32). Menapoz sonrası lobüllerin atrofiye olması nedeniyle LKİS genellikle premenapozal eğilimlidir. Çoğu nonpalpabl olup mammografik olarak da gözden kaçma ihtimali yüksektir. Bu yüzden genellikle tanı tesadüfen konur. Multisentrik ve sıklıkla bilateraldir (31, 33).

2.2.2. İNVAZİV KARSİNOM

Malign hücrelerin meme stromasına invazyon gösterdiği tümörlerdir. Bu tümörlerde aynı zamanda in situ tümöral lezyon da bulunabilir (31).

2.2.2.1. İnvaziv Duktal Karsinom, No Special Type (NST)

Tanımlanmış olan özel tiplerin herhangi biri içinde sınıflandırılmayan tüm kanserler için kullanılan bir terimdir. Özgün olmayan tip ya da başka bir özelliği olmayan karsinomlar duktal karsinomun sinonimleri olarak kullanılırlar. Kanserlerin büyük bir bölümü (%70-80'i) bu grup içine girmektedir. Bu tip kanserler genellikle DKİS ile birlikte, fakat nadiren LKİS ile birlikte olabilirler. Lenfovasküler alanlara ya da sinirlere invazyon gözlenebilir. İlerlemiş kanserler deride çukurlaşmaya, meme başında retraksiyona, göğüs duvarına fiksasyona yol açarlar. Ortalama üçte ikisi östrojen reseptörü ya da progesteron reseptörü eksprese eder, ortalama üçte bir vakada HER2/neu'nin overekspresyonu söz konusudur (30).

2.2.2.2. İnvaziv Lobüler Karsinom

Çoğu, ele gelen kitleler veya mammografide saptanan kitleler olarak izlense de bazıları desmoplastik yanıt yaratmadan klinik olarak gizli kalabilirler. İnvaziv lobuler karsinom (İLK)'ların daha sık multisentrik ve bilateral olduğu bildirilmektedir. İyi ve orta diferansiye İLK'ler genellikle diploid, hormon reseptörü eksprese eden çoğunluğu LKİS ile ilişkili tümörlerdir. HER2/neu ekspresyonu çok azdır ya da hiç yoktur. Bu tümörler meme karsinomlarının %20'sinden azını oluşturur (30).

İnvaziv karsinomun diğer tipleri seyrek görülmektedir.

2.3. PROGNOSTİK ve PREDİKTİF FAKTÖRLER

Meme kanseri olan kadınların akıbetleri farklılık göstermektedir. Bazılarının ortalama ömürleri meme kanseri olmayanlarla benzerdir. Diğerlerinin ise beş yıllık yaşama şansı %13'lerde kalır. Uzak metastaz veya inflamatuvar karsinomlu az sayıda (<%10) kadının dışında prognoz, primer karsinoma ve aksiller lenf nodu tespiti, patolojik inceleme ile belirlenir. Bu bilgi hasta akıbetine rehberlik eder, uygun tedavi seçiminde ve aynı klinik durumdaki hastaların doğru sınıflandırılmasında önemlidir. Major prognostik faktörler meme kanserinden ölümlerin güçlü prediktörleridir ve Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (American Joint Committee on Cancer; AJCC) evreleme sistemine dahil edilmiştir. Prediktif faktörler ise belirli tedavilerin olası cevabının saptanmasında kullanılmaktadır. Major prognostik faktörler aşağıda sıralanmıştır (31).

2.3.1. İnvaziv Karsinom veya İn Situ Karsinom

İn situ karsinom duktal sistemle sınırlıdır, metastaz yapmaz. Yeterli tedavi almış DKİS'li kadınların büyük çoğunluğu iyileşmektedir. Buna karşılık invaziv karsinomluların yarısına yakını tanı anında yakın ve uzak bölgelere metastaz yapmış olurlar (31).

2.3.2. Uzak Metastaz

Özellikle hormona cevap veren tümörlerde uzun dönem remisyon ve palyasyon sağlanmasına rağmen, uzak metastazlar bulunuyorsa iyileşme mümkün görülmemektedir. Metastaz potansiyeli primer karsinomda gen ekspresyon paterniyle kendini gösterebilmektedir. Aksiller lenf nodu ile ilişkili patern, uzak metastazla ilişkili paternden farklılık gösterebilmektedir (30).

2.3.3. Lenf Nodu Metastazı

Aksiller lenf nodu durumu en önemli prognostik faktördür. Lenf nodu durumunun klinik olarak değerlendirilmesi, hem palpabl reaktif nodlara bağlı yanlış pozitif sonuçlar, hem de küçük metastatik odaklara bağlı yanlış negatif sonuçlar nedeniyle hatalı olabilmektedir. Bu yüzden doğru değerlendirme için biyopsi gereklidir. Aksiller lenf nodu metastazı olmayan olgularda beş yıllık sağkalım %90'lara yaklaşmaktadır. Sağkalım oranı tutulan her lenf nodu ile birlikte düşmekte olup 16 ve üzeri lenf nodu metastazlarında bu oran %50'nin altındadır. Daha az morbid olan ve tam aksiller lenf nodu diseksiyonu yerine geçebilecek alternatif bir prosedür sentinel lenf nodu biyopsisidir. Boya veya radyoopak madde ya da her ikisi kombine kullanılarak drenajın olduğu ilk bir veya iki lenf nodu saptanır. Sentinel lenf nodunun negatif olması gerideki lenf nodlarında metastatik karsinomun olmadığı yönünde yüksek oranda belirleyicidir. Makrometastazlar (>0,2 cm) kanıtlanmış prognostik öneme sahiptir. Ancak klinik açıdan, saptanan mikrometastazların (0,2 cm'den küçük metastatik odaklar) önemi hala bilinmemektedir (30).

2.3.4. Tümör Boyutu

Tümör boyutu ikinci en önemli prognostik faktördür ve lenf nodu durumundan bağımsızdır. Bununla birlikte, aksiller lenf nodu metastazı riski karsinomun boyutu ile artmaktadır. Lenf nodu negatif kadınlarda, tümör boyutu 1 cm'nin altında olduğunda prognoz meme kanseri olmayan kadınlara yaklaşmaktadır. Bu kadınların tedavisiz 10 yıllık sağkalım

oranları yaklaşık %90'dır. Diğer yandan meme kanserli kadınların yarısından fazlası meme kanserine yenik düşerler; bunlar lenf nodu metastazı olup 2 cm üzerinde tümörü olan kadınlardır (31).

2.3.5. Lokal Olarak İlerlemiş Hastalık

Deriye ve iskelet kasına yayılım sıklıkla eş zamanlı ve uzak metastaz sonucu meydana gelir. Meme kanserinin saptanmasında artan yenilikler ve farkındalık böyle vakaların sıklığını azaltmaktadır. Bunlar artık daha seyrek olarak görülmekte ve erken dönemde tanı alabilmektedirler (31).

2.3.6. İnflamatuvar Karsinom

Genellikle klinik açıdan ele gelen kitle olmadan memenin büyüdüğü, ödemli ve eritematöz görünüm ile karakterizedir. Altta bulunan karsinom kötü diferansiye olup meme dokusunun her tarafına yayılmıştır. Bu tümörlerin çoğunda uzak metastaz vardır ve prognoz kötüdür. Üç yıllık sağkalım %3-10'dur (31).

2.4. MİNÖR PROGNOSTİK FAKTÖRLER

Lenf nodu tutulumu ve\veya tümör boyutu 1 cm üzerinde olan çoğu kadın bazı sistemik tedavi şekillerinden yarar sağlamaktadır. Bu grup hastalarda, minör prognostik faktörler, hormonal tedaviler ve kemoterapi kürleri arasında karar vermek için kullanılabilir. Küçük tümörlü, lenf nodu negatif olan kadınlarda bu faktörler, sistemik tedaviden muhtemel en iyi yararın belirlenmesinde, herhangi bir ek tedavi gerekip gerekmediğine karar verilmesinde yarar sağlamaktadır. Östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve HER2/neu, spesifik terapötik ajanlara cevapta kullanılan en yararlı prediktif faktörlerdir (30, 31).

2.4.1. Histolojik Alt tip

Meme karsinomunun tüm özel tipleri (tubuler, medüller, kribriform, adenoid kistik ve müsinöz) özel olmayanlara oranla ("duktal karsinom") daha iyi prognoza sahiptir (30).

2.4.2. Tümör Derecesi

Yaşam süresi üzerine olan etkisi en iyi araştırılmış parametre tümörün 'histolojik grade'idir (34). Yaygın olarak tümör differansiyasyonunu değerlendirmede kullanılan derecelendirme sistemi (*Scarff Bloom Richardson*) nükleer derece, tübül formasyonu ve mitotik oranı içermektedir. İyi diferansiye tümörler, grade I, %80; orta diferansiye tümörler, grade II, %60; kötü diferansiye tümörler, grade III, %15 oranında bulunur (31).

2.4.3. Östrojen ve Progesteron Reseptörü Varlığı ya da Yokluğu

Hormon reseptörlerinin varlığı, az da olsa iyi prognozu göstermektedir. Ancak araştırılma nedenleri, tedaviye yanıt belirleyici olmalarıdır. Antiöstrojen tedaviye (oofektomi veya tamoksifen) en iyi yanıt (yaklaşık %80) her iki reseptör ekspresyonunu gösteren tümörlerde alınır. Eğer sadece bir reseptör pozitifliği varsa daha düşük oranda (%25-45) yanıt alınır. Her iki reseptörün negatif olduğu durumlarda yanıt oranı çok düşüktür (%10'un altında) (30, 31).

2.4.4. HER2/neu

HER2/neu (human epidermal growth factor receptor 2 veya c-erbB2 veya neu) hücre büyümesinin kontrolünde yer alan transmembran bir glikoproteindir. HER2/neu'nun spesifik bir ligandı bulunmamaktadır ancak birçok büyüme faktörünün ko-reseptörlüğünde rol oynar. HER2/neu meme kanserinde %20-30 oranında eksprese olur (31). Birçok çalışmada özellikle lenf nodu pozitif olan hastalarda HER2 amplifikasyon/overekspresyonunun hastaliksız yaşam ve sağkalım süresi üzerine negatif etkisi olduğu bildirilmiştir. Yani HER2 pozitifliği tümörün agresif davranışı ve kötü prognoz ile yakından ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda HER2'nin tedavi rejimlerinin belirlenmesinde kullanılabileceğinden ve bu tedavi rejimlerine cevapta prediktif rolünden söz edilmektedir. Lenf nodu tutulumu olmayan hastalarda HER2 amplifikasyon /overekspresyonu mevcut ise rekürrens ve metastaz riskinin yüksek olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. HER2 durumu adjuvan kemoterapi uygulanacak hastanın seçimine yardımcı olabilmektedir (34, 35).

2.4.5. Lenfovasküler İnvazyon

Tümör hücreleri, tümörü çevreleyen vasküler boşlukta (lenfatik ve küçük kapiller) görülebilir. Bu bulgu lenf nodu metastazı ile güçlü ilişkilidir ve lenf nodu metastazı olmayan kadınlarda kötü prognostik bir faktördür (31). Aksiller lenf nodu (+) olan 33 hastanın %69'unda ve aksiller lenf nodu negatif olan 30 hastanın sadece %26'sında vasküler invazyon görülmüştür (34).

2.4.6. Proliferatif Hız

Tümör hücrelerinin proliferasyon hızını gösteren mitotik indeks (MI), timidin işaretleme indeksi, akım sitometrisi ile S fazı ölçümü, Ki-67, proliferatif hücre nükleer antijeni gibi ölçümlerin prognostik öneminin olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Proliferasyon, mitoz sayısı, flow sitometri veya hücre siklus proteinlerinin immunohistokimyasal olarak saptanması ile ölçülür. Mitotik sayım, derecelendirme sisteminin bir parçasıdır. Yüksek proliferasyon oranları kötü prognoza eşlik etmektedir (30, 31).

2.4.7. DNA İçeriği

Anormal DNA içeriği (aneuploidi) olan karsinomların prognozları daha kötüdür (30).

Diğer prognostik ve prediktif faktörler arasında mutant p53, nm23, katepsin D ve anjiyogenez belirleyicileri (VEGF ailesi) gösterilmektedir.

2.5. TNM SINIFLAMASI

Meme kanseri tanısı konduktan sonra evresinin saptanması, kanserin hangi aşamada olduğu, nasıl seyredeceği, tedavi yaklaşımlarından hangisinin seçileceği konusunda önemli bilgiler sunmaktadır. Evrelemede American Joint Committee on Cancer (AJCC)'in TNM sınıflaması kullanılmaktadır. T: tümör büyüklüğü; N: bölgesel lenf bezleri tutulumu; M: uzak metastazları göstermektedir (36).

Tablo 2. 2006 AJCC TNM sınıflaması (36).

Primer Tümör	Tümörün makroskopik görünümü
Tx	Değerlendirilemeyen primer tümör
T0	Primer tümöre ait bulgu yok
Tis	İn situ karsinom
Tis (DCIS)	Duktal karsinoma in situ
Tis (LCIS)	Lobüler karsinoma in situ
Tis (Paget)	Meme başının Paget hastalığı (primer başka tümör yok)
T1	En büyük çapı < 2 cm tümör
T1mik	Mikroinvazyon; en büyük çapı < 0,1 cm tümör
T1a	0,1 cm < Tümör çapı < 0,5 cm
T1b	0,5 cm < Tümör çapı < 1,0 cm
T1c	1 cm < Tümör çapı < 2 cm
T2	2 cm < Tümör çapı < 5 cm
T3	Tümör çapı > 5 cm
T4	Aşağıda belirtilen dokulara direkt yayılımı olan herhangi büyüklükte tümör: A. Göğüs duvarı B. Cilt
T4a	Pektoralis majör kası dışında göğüs duvarına yayılım
T4b	Ödem, "peau d'orange", cilt ülserasyonu veya satellit cilt nodülleri
T4c	T4a ve T4b
T4d	İnflamatuvar karsinom

Bölgesel Lenf Nodları (Klinik Sınıflama)

Nx	Değerlendirilemeyen nodal tutulum (e.g.daha önce çıkarıldığı için)
No	Bölgesel lenf nodu tutulumu yok
N1	Hareketli, ipsilateral bölgesel lenf nodu metastazı
N2	Komsu dokulara yapışık ipsilateral aksiller lenf nodu metastazı veya aksiller metastaz olmaksızın klinik veya radyolojik olarak (lenfosintigrafi dışında) görülebilen ipsilateral internal mammaryan nodal metastaz
N2a	Birbirlerine veya komşu dokulara yapışık ipsilateral aksiller lenf nodu metastazı
N2b	Aksiller metastazı olmaksızın klinik veya radyolojik olarak görülebilen ipsilateral internal mammaryan nodal metastaz
N3	İpsilateral infraklaviküler lenf nodu metastazı veya klinik ve radyolojik (lenfosintigrafi dışında) olarak görülebilen ipsilateral internal mammaryan lenf nodu metastazı + aksiller lenf nodu metastazı veya supraklaviküler lenf nodu metastazı
N3a	İpsilateral infraklaviküler lenf nodu metastazı + aksiller lenf nodu metastazı
N3b	Klinik ve radyolojik (lenfosintigrafi dışında) olarak görülebilen ipsilateral internal mammaryan lenf nodu metastazı + aksiller lenf nodu metastazı
N3c	İpsilateral supraklaviküler lenf nodu metastazı

Tablo 2'nin devamı; Bölgesel lenf nodları (Patolojik Sınıflama)

Bölgesel Lenf Nodları

<i>pNx</i>	Değerlendirilemeyen bölgesel lenf nodları
<i>pN0</i>	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
<i>pN0(i-)</i>	Bölgesel lenf nodu metastazı yok, İHK(-)*
<i>pN0(i+)</i>	Bölgesel lenf nodu metastazı yok, İHK(+), ancak tümör infiltrasyon alanı < 0,2 mm
<i>pNo(mol-)</i>	Bölgesel lenf nodu metastazı yok, RT-PCR** (-)
<i>pNo(mol+)</i>	Bölgesel lenf nodu metastazı yok, RT-PCR (+)
<i>pN1</i>	Mikrometastaz, (tümör infiltrasyon alanı > 0,2 mm, < 2,0 mm) 1-3 aksiller lenf nodu tutulumu ve/veya klinik veya radyolojik olarak görüntülenemeyen, ancak sentinel biyopside saptanan internal mammaryan lenf nodunda mikrometastaz
<i>pN1mik</i>	Mikrometastaz, (tümör infiltrasyon alanı > 0,2 mm, < 2,0 mm)
<i>pN1a</i>	1-3 aksiller lenf nodu tutulumu
<i>pN1b</i>	Klinik veya radyolojik olarak görüntülenemeyen, ancak sentinel biyopside saptanan internal mammaryan lenf nodunda mikrometastaz
<i>pN1c</i>	1-3 aksiller lenf nodu tutulumu ve klinik veya radyolojik olarak görüntülenemeyen, ancak sentinel biyopside saptanan internal mammaryan lenf nodunda mikrometastaz
<i>pN2</i>	4-9 aksiller lenf nodu metastazı veya aksiller tutulum olmaksızın internal mammaryan lenf nodlarında klinik ve radyolojik (lenfosintigrafi dışında) olarak görüntülenebilen tutulum
<i>pN2a</i>	4-9 aksiller lenf nodu metastazı, en küçük tümör infiltrasyon alanı >2,0mm
<i>pN2b</i>	Aksiller tutulum olmaksızın internal mammaryan lenf nodlarında klinik ve radyolojik (lenfosintigrafi dışında) olarak görüntülenebilen tutulum
<i>PN3</i>	10 veya daha fazla aksiller lenf nodu metastazı veya infraklaviküler lenf nodu metastazı veya klinik ve radyolojik (lenfosintigrafi dışında) olarak belirgin internal mammaryan lenf nodu metastazı + en az 1 aksiller lenf nodu metastazı veya sentinel biyopsi ile tanısı konan mikroskopik internal mammaryan lenf nodu metastazı + 3'den fazla aksiller lenf nodu metastazı
<i>pN3a</i>	10 veya daha fazla aksiller lenf nodu metastazı, en küçük tümör infiltrasyon alanı > 2,0 mm veya infraklaviküler lenf nodu metastazı
<i>pN3b</i>	Klinik ve radyolojik (lenfosintigrafi dışında) olarak belirgin internal mammaryan lenf nodu metastazı + en az 1 aksiller lenf nodu metastazı veya sentinel biyopsi ile tanısı konan mikroskopik internal mammaryan lenf nodu metastazı + 3'den fazla aksiller lenf nodu metastazı
<i>pN3C</i>	İpsilateral supraklaviküler lenf nodu metastazı

Uzak Metastaz

Mx	Değerlendirilemeyen uzak metastaz
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

Tablo 2'nin devamı; Meme Kanserinde Evreleme Sistemi (AJCC)

Evre	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	Tmik	N0	M0
	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
IIB	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
IIIB	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
IIIC	T4	N2	M0
	T1-4	N3	M0
IV	T1-4	N0-3	M1

*İHK, immünohistokimyasal yöntem

**RT- PCR, "Reverse transcriptase- polymerase chain reaction "

2.6. ANJİYOGENEZ-Tümör İnvazyonu ve Anjiyogenez

Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişimi anlamına gelen anjiyogenez, vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojik de olabilir. Fizyolojik anjiyogenez; embriyogenez, yara iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde gözlenir (37). Proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiyogenez kontrol edilemez. Anjiyogenezin patolojik olarak ortaya çıktığı durumlar inflamatuvar hastalıklar (artrit, kronik inflamasyon, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, psöriazis), çeşitli kanserler (meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, uterus, serviks, glioblastom) ve göz hastalıklarıdır (yaşla ilişkili makuler dejenerasyon, proliferatif retinopati) (7, 38).

Anjiyogenez, premalign bir lezyonun kansere dönüşümünden metastatik lezyonların gelişimine kadar uzanan tümör gelişim basamaklarının her birinde rol oynamaktadır (8). Folkman tarafından ilk kez 1971 yılında ortaya atılan ve yeterli kan dolaşımı olmadığı durumda solid tümörlerin birkaç mm³'den daha fazla büyüyemeyeceği hipotezi ile anjiyogenez alanında başlayan araştırmalarda, tümör gelişiminin anjiyogenez bağımlı olduğu kanıtlanmış ve anjiyogenez tümör biyolojisinin en önemli alanlarından biri haline gelmiştir.

Anjiyogenez ile oksijen, besinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve proteolitik enzimler dokulara ulaştırılırken koagülasyon sistemi ve fibrinolitik sistemin kontrolünü sağlayan hemostatik faktörler kontrol altında tutulur, tümör hücrelerinin uzak bölgelere erişimi sağlanır. Anjiyogenez, anjiyogenezi uyaran ve önleyen çok sayıda faktörler tarafından kontrol edilen, son derece karmaşık ve dinamik bir olaydır. Bir grup tümör hücresinin anjiyogenik özellik kazanmasının tümörün malign potansiyelinin gelişiminde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Bu özellik anjiyogenezi uyaran ve önleyen faktörler arasındaki dengenin uyarıcı faktörler lehine bozulması ile ortaya çıkmaktadır (8, 39).

Tümör hücrelerinin köken aldıkları bölgede büyümesi ve uzak organlara metastaz yapabilmesi için yeni damar oluşumu şarttır. Deneysel koşullarında avasküler bir bölgede implante edilen tümör hücreleri en fazla 1-2 mm'lik çapta kitle oluşturabilir. Çünkü oksijenin difüzyon mesafesi 100-200 mikrondur. Bu yüzden tümör hücresi kapillerlere daha uzak ise anoksik kalacak ve yaşamını idame ettiremeyecektir. Bu da anjiyogenezin tümörün başlangıç, proliferasyon, invazyon ve metastazında ne kadar önemli bir köşe taşı olduğunu gösteren ciddi bir delildir. Bu hipoteze göre anjiyogenez; karsinogenezin erken evrelerinde başlamaktadır. Meme, serviks ve melanositlere ait premalign lezyonlarda mikrovasküler dansitenin (MVD) artmış olması bunun önemli bir delilidir. Tümör hücrelerinde ortaya çıkan birtakım genetik değişiklikler sonrası, hücreler anjiyogenik fenotip kazanırlar. Bunun sonucunda tümör hücrelerinden anjiyogenik faktörler (özellikle VEGF ailesi) salınmaya başlar. Anjiyogenik faktörler sadece tümör hücrelerinden salgılanmaz. Ayrıca tümörün stromasındaki fibroblastlar ve tümörü infiltre eden makrofajlar da önemli kaynaklardır. Tümörü infiltre eden makrofajlar (TIM) iki şekilde anjiyogenik faktör üretir:

- a) Tümör ilişkili antijenleri endositoz ile aldığı anda aktive olur, bu işlevini gerçekleştirir.
- b) Anoksi ve nitrik okside maruziyet. Bu şartlarda yoğun olarak anjiyogenik faktör salgırlar.

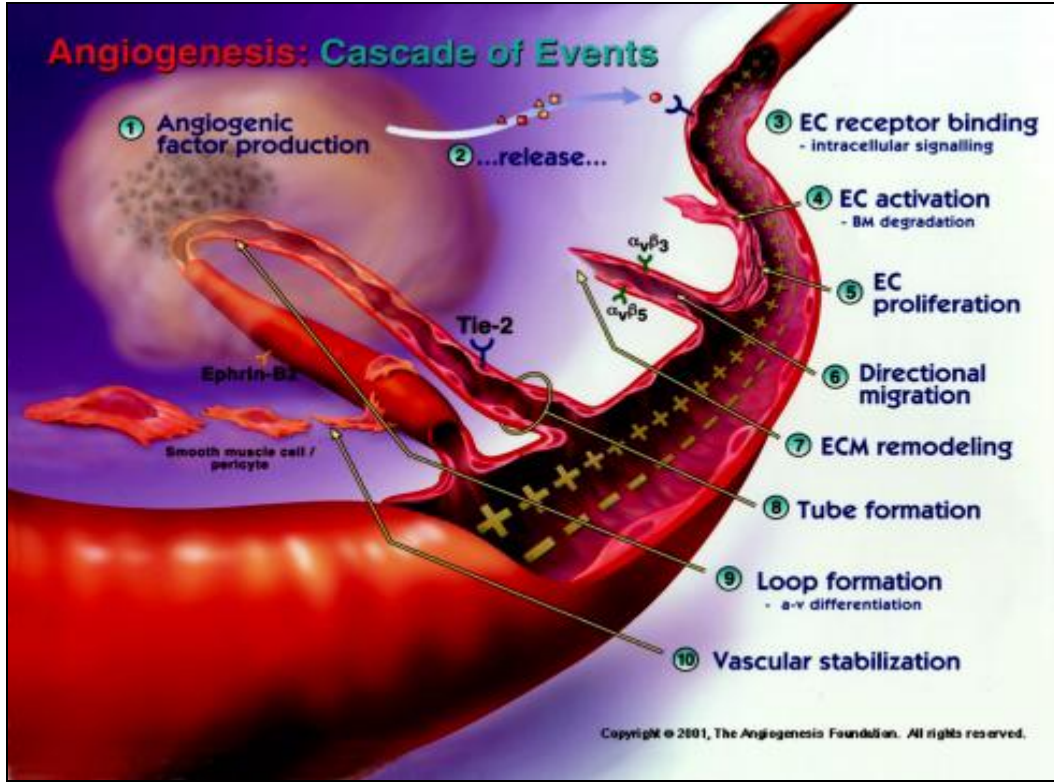
Tüm bunlardan çıkarılacak sonuç: Tümör kaynaklı anjiyogenik faktörler gerekli, ancak yeterli değildir. Tümörler anjiyogenik fenotipe dönüşümünden önce yıllarca sessiz kalabilir. Bu dönüşüm anjiyogenik geçiş (**angiogenic switch**) olarak tanımlanmaktadır (40). Anjiyogenik fenotip kazanmanın erken tümör gelişiminde kilit bir basamak olduğu düşünülmektedir. Bu özelliğin, tümörün mikroskopik bir lezyondan hızlıca yayılan metastatik tehdit haline gelene kadarki dönemde etkin olduğu bildirilmektedir (10, 11, 41, 42).

Anjiyogenez, koordineli, sıralı, birbiriyle ilişkili basamaklardan oluşmaktadır (43).

Anjiyogenez aşamaları şu şekilde sayılabilir:

- § Endotel hücre aktivasyonu ve bazal membran yıkımı,
- § Endotel hücre göçü,
- § Ekstraselüler matriks invazyonu,
- § Endotel hücre proliferasyonu,
- § Kapiller lümen (tüp) oluşumu.

Tümör hücrelerinden salınan anjiyogenik faktörlerin endotel hücre reseptörlerine bağlanması anjiyogenez sürecini başlatır. Anjiyogenez oldukça düzenli moleküler ve hücresele olaylar serisidir. Bu olaylar migrasyon, proliferasyon, farklılaşmış endotel hücrelerinin yeni kapiller içine geçişini izleyen matür damar oluşumu ile sonlanır. Anjiyogenik kaskad hem aktivasyon hem de rezolüsyon fazını içerir. Endotel hücreleri büyümek için uyarıldığında, proteaz, heparinaz ve bazal membranları sindirebilen sindirim enzimlerini sekrete ederler. Ekstraselüler matriksteki bozulma matriksten proanjiyogenik faktörlerin salımına neden olur. Endotel hücreleri arasındaki bağlantı bölgeleri gevşek hal alır, yeni oluşmuş damar filizlenmesi, uyarıcı kaynağa doğru büyür. Endotel hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonu yanında, hematopoietik endotel progenitör hücrelerin de kapiller lümen oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Rezolüsyon fazı, yeni oluşmuş damarlarda perisit oluşumu, bazal membranın yeniden yapılanması, endotel hücreleri arası kompleks yapının oluşumu sonunda matür damarların stabilizasyonu ile sonlanır. Ancak tümör damar yapılanmasında rezolüsyon fazı tamamlanmamıştır. Düzensiz ve kıvrımlı damarlar, kısmi endotel hücre hattı, artmış mikrodamar geçirgenlik yanında fragmente bazal membran meydana gelir. Tümör damar yapısında dolaşım normalden farklıdır. Düzensiz dağılım, değişen damar boyutları, yetersiz damar diferansiyasyonu mevcuttur (41). Yeni gelişen damarların bütünlüğünün iyi olmaması nedeniyle intertisyel aralığa sıvı ve makromoleküller birlikte sızar. Buna bağlı olarak tümör dokusunda intertisyel sıvı basıncıyla onkotik basınç yükselir. Ayrıca tümör dokularının lenfatik drenajlarının iyi olmaması da bu duruma katkıda bulunur. Ekstraselüler matriks jelatinöz hal alır. Bunun sonucunda anti-kanser ilaçların bu bölgelere penetrasyonu güçleşir ve kanser dokusu kendini korumaya almış olur (11, 44).



Şekil 1. Anjiyogenez: Yeni kan damarlarının oluşum mekanizması (7).

Anjiyogenezin tümörün yayılmasındaki rolünün yanı sıra metastazı kolaylaştırdığı varsayımını destekleyici, deneysel ve klinik kanıtlar bulunmaktadır (45, 46). Bir tümör hücresi metastaz yapabilmek, damar sistemine girmek, dolaşımda canlı kalabilmek, damar sisteminden dışarı çıkabilmek, hedef organda büyüebilmek ve anjiyogenezi uyarmak için çeşitli bariyerleri aşabilmelidir. Deneysel çalışmalarda, yeniden damarlanmadan önce, tümör hücrelerinin nadiren dolaşıma girdikleri gösterilmiştir. Tümör hücresi anjiyogenik iken metastaz yaparsa, saptanabilir tümör oluşturma ihtimali daha fazladır. Metastatik kaskadın başında olduğu kadar sonunda da anjiyogeneze ihtiyaç vardır. Tümör hücresi başarıyla metastaz yapmış olsa bile hedef organda hemen damarlanmayabilir ve mikroskopik düzeyde kalabilir. Klinik veriler metastatik özelliğin anjiyogenezin şiddetine bağlı olduğunu göstermektedir (7, 47). Özetle; tümörün anjiyogenik fenotipi biyolojik davranışının temel belirleyicisidir. Uzun süre klinik olarak sessiz kalan tümörde anjiyogenez ve anjiyogenik stimülasyon hafif düzeyde iken, anjiyogenik geçişin hızlı ve yoğun olduğu tümörler kısa zamanda metastatik hastalık olarak kliniğe yansımaktadır. Tümör dokusunda pro-anjiyogenik faktörlerin (özellikle VEGF-A) anti-anjiyogenik faktörlere baskın gelmesi sonucu, klinik olarak sessiz seyreden tümörün agresif davranış özelliği sergilediği gösterilmiştir (11, 12, 44).

Anjiyogenik faktörlerin aksine, fizyolojik ve patolojik koşullarda salgılanan bazı moleküller anti-anjiyogenik etki göstermektedir (Tablo 3). Antianjiyogenik faktörler olarak adlandırılan bu proteinler gerek normal hücrelerden gerekse tümör hücrelerinden salgılanabilmektedir. Anjiyogenik fenotip, bu iki farklı grup proteinlerin dengesine bağlı olarak belirlenir. Hangi taraf baskın ise sonucu o belirler. Eğer anjiyogenik faktörler baskın ise tümör anjiyogenez yeteneğine sahip olarak agresif bir davranış sergileyecektir. Tam tersi durumda ise, antianjiyogenik faktörler egemen olacak ve tümör klinik olarak sessiz ve lokal kalacaktır (cilt, oral mukoza, ve serviks tümörlerinde olduğu gibi). İlginç olarak meme, akciğer, kolon vb. bazı tümörler belirgin ölçüde antianjiyogenik faktörler salgılayabilmektedir. Bazı olgularda primer tümörün lokal tedavi (cerrahi ± radyoterapi) ile vücuttan uzaklaştırılması halinde kısa süre sonra hastalarda klinik olarak aşikar metastazlar ortaya çıkabilmektedir. Malign melanom gibi bazı tümörlerde ise antianjiyogenik protein hiç salgılanmadığı için anjiyogenik faktörler egemendir ve hastaların metastaz potansiyeli çok yüksektir (10, 11, 48).

Tablo 3. Anjiyogenezi uyaran ve inhibe eden bazı önemli endojen maddeler (40).

Proanjiyogenik faktörler	Anti-anjiyogenik faktörler
α -5 integrin	Anjiyostatin (Plazminojen fragment)
Angiyogenin	Antianjiyogenik antitrombin III
Anjiyopoietin I,II	Kalretikulin
Siklooksijenaz-2	Kartilaj-türevli inhibitör
Del-1	CD59 kompleman fragment
bFGF ve asidik FGF	Endostatin (Kollajen XVIII fragment)
Follistatin	Fibronektin Fragment
G-CSF	Gro- β
Hepatosit Büyüme Faktörü	Heparinaz
IL-8	Heparin Hegza Sakkarid Fragment
Leptin	HCG
MMP'ler	İnterferon α , β , γ
Nitrik oksid	IL-4, IL-12, IL-18
Platelet-derived endothelial cell	Metalloproteinaz inhibitörleri
PDGF-BB	Plasental ribonükleaz inhibitör
Pleotrofin	Plazminojen aktivatör inhibitör
Proliferin	Platelet faktör 4(PF4)
Tie-2	Prolaktin (16 Kd fragment)
TGF- α	Proliferin ilişkili protein
TGF- β	Retinoid
TNF- α	SPARC fragment
VEGF	Tetrahidrookortizol-S
Trombospondin-I	
TGF- β	
Vasculostatin	
Vasostatin	

2.7. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)

Solid tümörlerin gelişim, invazyon ve metastaz yeteneğine sahip olabilmeleri, anjiyogenez varlığına bağlıdır. Tümör hücresi anjiyogenik fenotipe ulaştığında mikrovasküler gelişim başlar. Endotel büyüme faktörleri bu süreçte rol oynarlar. Bunlar arasında en önemlisi VEGF'dir. VEGF normal ve patolojik koşullarda görülen anjiyogenezde temel indükleyicidir. VEGF eksprese eden hücreler, nötrofiller, makrofajlar, trombosit, tümör hücresi ve/veya tümörün stromal hücreleri, yani fibroblastlardır (7, 10, 11).

VEGF bilinen en etkili anjiyogenezi uyarıcı faktörlerden biridir ve anjiyogenezin kontrolünde önemli rol oynar. Anjiyogenezi ve lenfanjiyogenezi uyarıcı büyüme faktörlerini kodlayan VEGF gen ailesi tarafından altı farklı glikoprotein kodlanmaktadır: VEGF-A, B, C, D, E ve Plasental büyüme faktörü-1 (PlGF-1). Bunlar VEGF ile aminoasit dizilim benzerliği gösteren, VEGF ile aynı reseptörleri paylaşan proteinlerdir (39, 49, 50). VEGF-A (genellikle VEGF olarak adlandırılır) ilk kez Dvorak ve arkadaşları tarafından tümör hücrelerinden salgılanan vasküler geçirgenliği artırıcı faktör olarak tanımlanmıştır. Daha sonra Ferrara ve arkadaşları VEGF-A'yı endotel hücrelerine özgü bir mitojen olarak izole etmişlerdir (39).

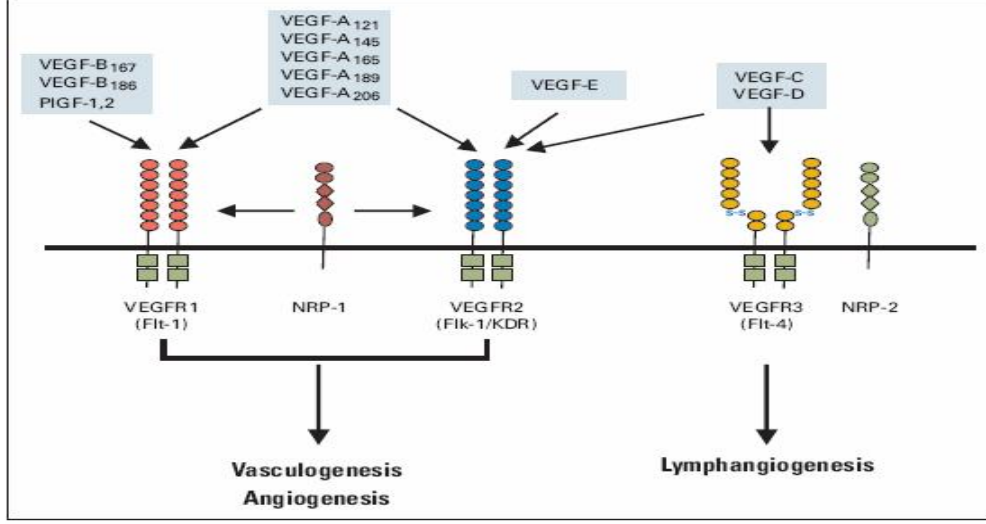
VEGF; 45-kDa molekül ağırlığında, bazik yapıda, heparine bağlanma özelliği ve birden fazla anjiyogenezi uyarıcı etkisi olan homodimerik bir glikoproteindir (39, 49). VEGF-A mRNA'sının farklı kodlanması ile aminoasit içerik ve sayıları farklı olan 5 izoform sentezlenir: VEGF-121, 145, 165, 189 ve 206. Kısa aminoasit zinciri içeren izoformlar (VEGF-121 ve 145) hücre dışına salgılanıp serumda serbest formda bulunurken, daha uzun aminoasit zinciri içeren izoformlar (VEGF-189 ve VEGF-206) hücre dışı matrikste yer alırlar. Proteolitik enzim reaksiyonları sonrasında aktif hale gelirler. Baskın form olan ve pek çok solid tümörde artışı saptanan VEGF-165 ise hem serumda serbest formda hem de hücre dışı matriks proteinlerine bağlı olarak bulunur. Bu izoformların aktif formları disülfid bağları ile bağlı homodimerler şeklindedir. Yapılan araştırmalar belirli VEGF izoformlarının dokuya spesifik olduğunu, vaskülogenezde ve tümör anjiyogenezinde etkin rol oynadıklarını göstermiştir. Ayrıca artrit, psöriasis, maküler dejenerasyon, diyabetik retinopati ve tümörler gibi patolojik anjiyogenezin görüldüğü durumlarda da VEGF ekspresyonunda artış olduğu saptanmıştır (51). VEGF, embriyonal gelişim sürecinde aktif olan fizyolojik vaskülogenez yanında, postnatal dönemde yara iyileşmesi, ovulasyon, menstruasyon, kan basıncının

regulasyonu ve gebelik gibi pek çok olayda da anjiyogenezin kontrolünde etkin rol oynamaktadır (52).

VEGF ailesine dahil olan moleküller farklı reseptörler aracılığı ile anjiyogenik etkilerini göstermektedirler. VEGF'nin bağlandığı 3 farklı tirozin kinaz reseptörü tanımlanmıştır: VEGFR-1 (fms benzeri tyrosine kinase; flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) ve VEGFR-3 (Flt-4). Bu reseptörler endotelial hücrelere özel olmayıp, vasküler düz kas hücrelerinde ve monosit/makrofajlarda da bulunmaktadır. VEGF reseptörleri ‘‘7-Ig’’ ya da flt gen ailesine dahil olup, yedi adet hücre dışı immünglobulin benzeri yapı, bir membranöz kısım ve bir de tirozin kinaz aktivitesi taşıyan hücre içi kısımdan oluşurlar (39, 53).

VEGFR-1, VEGF bağlama potansiyeli en yüksek olan reseptör olmasına rağmen endotelial hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu uyarıcı etkisi yoktur. Sitoskeletal sistem üzerinde de direkt etkisi saptanmamıştır. VEGF bağlama potansiyeli daha düşük olan VEGFR-2'ye VEGF'nin bağlanması ile endotelial hücrelerde mitogenez, kemotaksis ve şekil değişiklikleri başlar. Bu reseptör, özellikle aktif olarak çoğalan endotelial ve hemapoietik öncü hücrelerin membranlarında bulunur (54). VEGFR-3 ise genellikle erişkin lenfatik damar endotelinde yer alır ve lenfanjiyogenezin uyarılmasından sorumlu olan VEGF-C ve VEGF-D molekülleri bu reseptöre bağlanır.

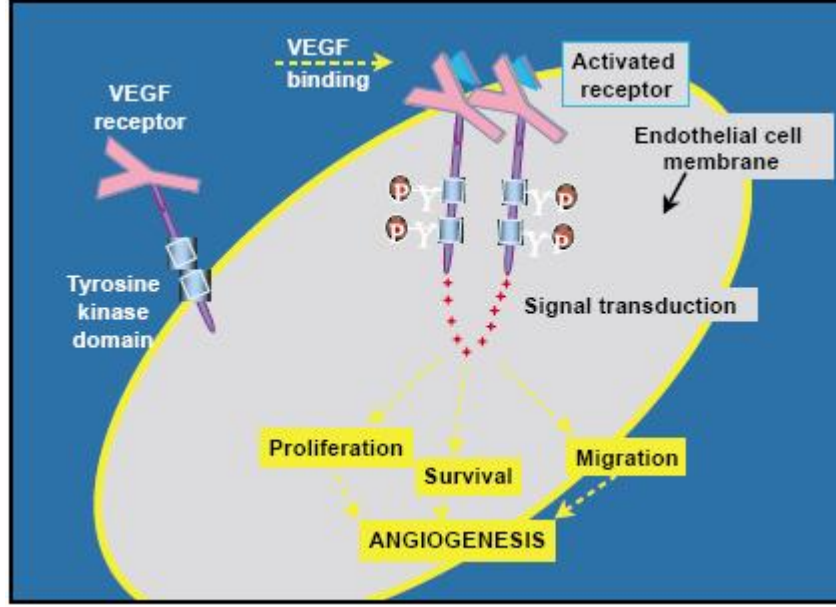
Flt gen ailesi tarafından kodlanmayan ve VEGF bağlayabilen bir başka reseptör ise nörofilindir. Bir nöronal reseptör olan nörofilin-1 normal endotelial hücrelerin yüzeylerinde bulunur ve VEGF-165 ile bağlanarak anjiyogenezin uyarılmasında rol oynar. VEGF ailesine dahil olan moleküllerden birisi de plasental büyüme faktörüdür (PlGF-1). PlGF-1, VEGFR-1 ya da nörofilin reseptörlerine bağlanarak sinerjik etki ile uyarıcı VEGF sinyalini artırır. VEGF-B endotelial hücreler için mitojenik olup, VEGF-A ile heterodimer oluşturarak, onun anjiyogenik etkisini artırır. VEGFR-2 ve 3 aracılığı ile etkisini gösteren VEGF-C ve VEGF-D molekülleri ise embriyonal ve postnatal dönemde lenfanjiyogenezde rol oynarlar. Parapoks virus ailesinden olan Orf virusu tarafından sentezlenen VEGF-E ise VEGFR-2'ye bağlanarak anjiyogenezi uyarır (53).



Şekil 2. VEGF izoform-reseptör ilişkisi ve etki mekanizmaları (39).

2.7.1. VEGF'nin Fonksiyonu

VEGF, anjiyogenezin farklı basamaklarında etkili olup çok fonksiyonludur (39). VEGF, anjiyogenezi çeşitli mekanizmalar yoluyla geliştirir. Bunlar; endotel hücre (EC) permeabilite ve sağkalım artışı, EC göçü, invazyon ve EC proliferasyonunun düzenlenmesidir. VEGF'in EC büyümesi ve EC göçünün uyarılması, hücre iskeleti değişiklikleri, EC morfolojisindeki değişiklikler gibi vasküler endotel üzerine çok sayıda etkileri bulunmaktadır. EC'de, VEGF; EC göçü ve invazyonunda yer alan prokoagülan doku faktörü, ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü, doku-tip plazminojen aktivatör, spesifik MMP'ler, nitrik oksit sentaz ve integrinlerin ekspresyonlarını artırmaktadır. VEGF, apoptotik yolağın inhibisyonu ile EC'de bir sağkalım faktörü olarak rol oynar. Bu etkiye Bcl-2 ve Bcl-A1 gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonlarının indüklenmesi aracılık eder. Bununla beraber fosfoinositol 3-kinaz/Akt yolağının regülasyonu, fokal adezyon kinazın fosforilasyonunun artışı, NO ve prostaglandin I₂'nin EC üretimini stimülasyonu bu etkiye katkıda bulunmaktadır. VEGF, vasküler yatağın büyümesine katkıda bulunan kemik iliği türevli EC prekürsör hücreleri için bir kemokin olarak da görev yapmaktadır (40, 55).



Şekil 3. Anjiyogenezde VEGF yolağı (7).

2.7.2. VEGF Ekspresyonunun Düzenlenmesi

Anjiyogenezde kilit molekül konumundaki VEGF'in düzenlenmesi karmaşık bir süreç olup bu süreçte hipoksi, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde bozukluklar, transkripsiyon faktörleri, inflamatuvar araçlar ve hatta mekanik güçler gibi pek çok değişken rol alır. Bunlar arasında, hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α önemli bir moleküldür. Büyük bir tümörün derinliklerinde olduğu gibi, hipoksik şartlar altında HIF-1 α ve HIF-1 β birleşerek transkripsiyon faktörü özelliği taşıyan bir dimer oluştururlar. HIF-1 α , VEGF geninin promoter bölgesine bağlanarak anjiyogenik faktörlerin salınımına yol açar (56). Oksijen basıncının normal olduğu şartlarda, VEGF proteinin yıkılıp yer alan ve bir tümör supresör gen olarak bilinen von Hippel-Lindau (VHL) gen ürünüyle VEGF suprese edilir (57). VHL geninde fonksiyon kaybına yol açan mutasyonların renal hücre karsinomu ve başka vasküler tümörlerin gelişimine yol açtığı bilinmektedir. Bu haliyle VHL, anjiyogenez regülasyonunda önemli rol oynayan bir moleküldür (58). Nitrik oksit (NO) de anjiyogenezin VEGF-bağımlı bir mediyatörüdür. VEGF'in NO sentaz üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu oluşan NO, damar gelişmesi ve endotel hücre migrasyonunda yer alır (59). Başta RAS, SRC, ve HER-2 onkogenleri olmak üzere, VEGF düzeyi; p53 gen mutasyonu, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, FGF-4, PDGF, TGF- β , IGF-1, TNF- α ve NO gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmekte ve tümör

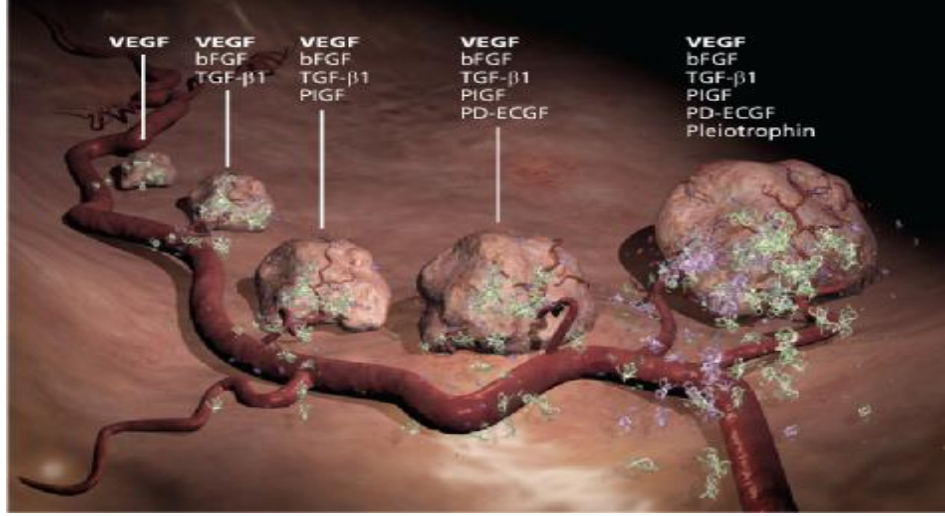
hücrelerinde VEGF ekspresyonu artmaktadır (60). VEGF'nin inhibisyonu ile tümör büyümesinin supresyonu in vivo gösterilmiştir (61).

2.7.3. VEGF ve Kanser

Tümör anjiyogenezinin kontrolünde önemli rolü olan VEGF'nin serum düzeyinin kanserli hastalarda sağlıklı bireylerdekinden daha yüksek olduğu ilk kez 1994'te Kondo ve ark. tarafından bildirilmiştir (62). Yamamoto ve ark. farklı kanser tiplerinde serum VEGF düzeyi ile tümör evresi, MVD ve tümör dokusunda VEGF ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon saptamışlardır (63, 64). Bir başka araştırmada ise farklı histolojik kanser tiplerinde, serum VEGF düzeylerinin, yaygın hastalığı olanlarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (65). Meme, akciğer, gastrointestinal sistem, üriner sistem kanserleri, yumuşak doku sarkomları, baş-boyun kanserleri, jinekolojik kanserler, hematolojik kanserlerde yüksek serum ya da plazma VEGF düzeyi ile ileri tümör evresi ve kötü sağkalım hızı arasında ilişki bulunmuştur (40, 61, 64, 66, 67).

2.7.4. VEGF ve Meme Kanseri

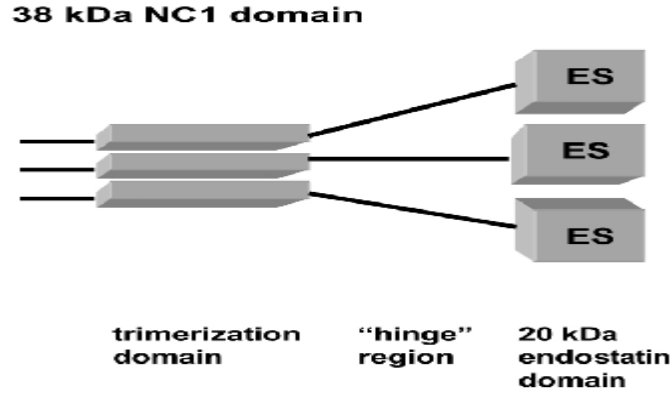
İn situ ve invaziv meme kanserleri bir çok anjiyogenik faktör eksprese ederler. Bu faktörler tümör gelişiminin farklı evrelerinde çeşitleri artarak eksprese olurlar (Şekil 4). VEGF, tümörün tüm evreleri boyunca eksprese olmasına karşın, örneğin timidin fosforilaz (pleiotrophin) sadece in situ ve T1 meme tümöründe eksprese olur (39, 43, 68). VEGF'nin tümörde (sitozolda) ekspresyonu meme kanseri olan kadınlarda hasta sağkalımı ile korele bulunmuştur (69-71). VEGF ekspresyonunun tedavi kararında ve tedaviye cevabın değerlendirilmesinde yararlı olabileceği bildirilmektedir. Lenf nodu negatif meme kanserli kadınlarda VEGF ile ER, PR, tümör boyutu arasında anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir. (69, 70, 72). Lenf nodu pozitif meme kanserli kadınlarda da nüksüz sağkalım ve toplam sağkalımı öngörebileceği bildirilmiştir. Çok değişkenli analizle yapılan bir çalışmada VEGF ekspresyonunun toplam sağkalımın bağımsız bir prediktörü olduğu gösterilmiştir (7). Yüksek VEGF düzeylerinin ileri evre meme kanserinde kemoterapi, radyoterapi ve hormonal terapide artmış direnç gelişimine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (40).



Şekil 4. VEGF'nin tümörün oluşum evrelerindeki yeri (73).

2.8. ENDOSTATİN: Endojen Anjiyogenez İnhibitörü

Endostatin ilk kez O'Reilly ve arkadaşları tarafından 1996 yılında, kollajen tip XVIII'in 20 kDa'luk proteolitik fragmanı olarak mürine hemanjiyoendotelyoma (EOMA) hücrelerinden izole edilmiştir (74-76). Kollajen tip XVIII bazal membranlarda, hücre dışı matrikste ve özellikle karaciğerde yoğun olarak bulunur. İnsan tip XVIII kollajeni N-terminali en az iki farklı bağlantı bölgesi, bunu izleyen bölümde merkezi triple helikal bölge ve endostatinin olduğu non-kollajenöz (NC1) bir C-terminal bölgeden oluşmaktadır (77) (Şekil 5). İn vitro ortamlarda proteinazlar aracılığı ile kollajen tip XVIII'den elde edilen endostatinin, in vivo ortamlarda elde edilmiş mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (78). Rekombinant endostatinin etkin şekilde anjiyogenezini bloke ettiği ve primer tümörün büyümesini ve metastazı deneysel hayvan modellerinde açık yan etkiler, toksisite ve ilaç direnç gelişimi olmaksızın suprese ettiği bildirilmiştir (74, 79). Faz I-II çalışmalarında ise deneysel çalışmalara karşılık endostatinin etkinliği düşük düzeyde saptanmıştır (80).



Şekil 5. Kollajen Tip XVIII NC1 bölgesi. Üç segment içerir: N-terminal trimerizasyon bölgesi, merkezi proteaz duyarlı menteşe bölgesi, endostatin olarak adlandırılan 20-kDA C-terminal bölge (81).

2.8.1. Yapısal Özellikleri

Endostatin Tip XVIII kollajenin trimerize olmuş C-terminalinin bölünmesi ile oluşmaktadır. Bu parçalanmanın sistein proteinaz grubu enzimlerden katepsin L, serin proteinaz, elastaz ve MMP'lerin aracılığı ile olabileceği gösterilmiştir. MMP'ler dışında da diğer proteazlar endostatinin hem oluşumunda hem de stabilitesini sağlamada görev alırlar (82, 83). Endostatin; heparan sülfat proteoglikan ve perlekan ile birlikte vasküler bazal membranda lokalize olmaktadır (84). Endostatinin yapısı ile ilgili çalışmalarda, endostatinin kompakt globüler yapıda, arjininden zengin heparin bağlama bölgesi içerdiği gösterilmiştir. Endostatinin N-terminalinde bir Zn^{+2} atomu yer almaktadır. Zn^{+2} bağlanmasının endostatinin antianjiyogenik mekanizması için esansiyel olduğu düşünülmüştür. Ancak daha sonraki çalışmalar çinko bağlanmasının endostatinin fonksiyonel rolünden ziyade yapısal bir özelliği olduğu gösterilmiştir (85, 86). Endostatin dışında endostatin benzeri birçok kollajen türevi de bulunmuştur. Bunlardan biri kollajen Tip XVIII'le %70 homoloji gösteren 22 kDA'luk endostatin benzeri fragman, kollajen Tip XV'tir. Kollajen Tip XV'in sistemik olarak verilmesinin ksenograft renal karsinoma modelinde tümör büyümesini suprese ettiği, endotel hücrelerinin göçünü inhibe ederken proliferasyonu üzerine etkisinin olmadığı görülmüştür. Tip XV kollajenin NC-1 bölgesinin proteolitik fragmanının da antianjiyogenik aktiviteye sahip olduğu, fakat etkisinin endostatinden daha az olduğu gösterilmiştir (74, 84).

2.8.2. Endostatinin Hücre Yüzey Reseptörleri

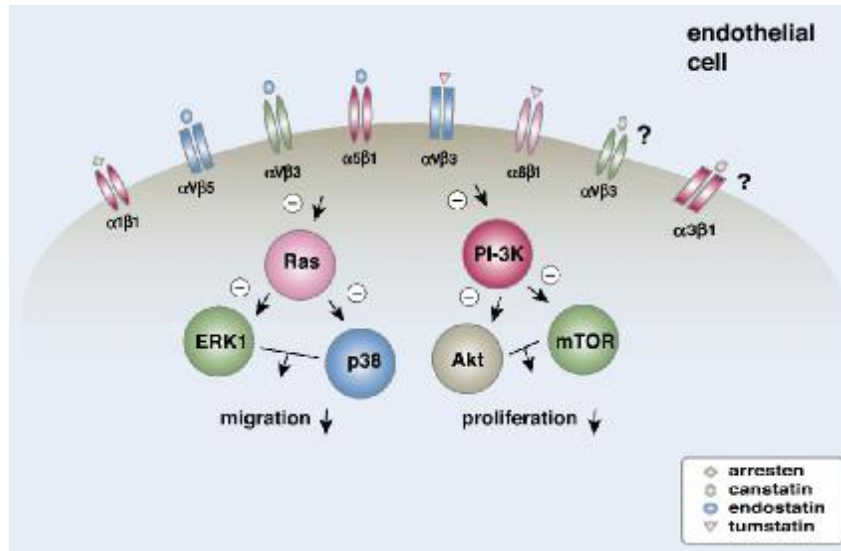
Endostatinin etkileşime girdiği çok sayıda hücre yüzey proteini tanımlanmıştır. Bunlar; $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, glypican-1,4 gibi hücre adezyon ve migrasyonu ile ilişkili integrinlerdir (87). Endostatinin, hücre adezyonunu $\alpha_5\beta_1$ integrinler aracılığı ile gösterdiği bildirilmektedir. Endostatin ve $\alpha_5\beta_1$ arasındaki etkileşimin bloke edildiği bir çalışmada endotel hücre göçü inhibisyonunun kaybolduğu gösterilmiştir. Bunun sonucunda da $\alpha_5\beta_1$ integrinin endostatin için fonksiyonel bir reseptör olduğu kabul edilmiştir (74).

Endostatin aynı zamanda heparine bağlanan bir proteindir. Endostatin yüzeyinde arjinin rezidüsünde meydana gelen nokta mutasyonun heparine bağlanmayı engellediği ve dolayısıyla endostatin fonksiyon kaybının meydana geldiği gösterilmiştir. Endostatinin düşük afinite ile endotel hücrelerinde eksprese edilen hücre yüzey heparan sülfat proteoglikanlarından olan glypican-1 ve 4'e de bağlandığı bildirilmektedir. Endostatin glikozaminoglikanlar için de oldukça spesifik tanıma motiflerine sahiptir. Bu durumda endostatinin hangi hücre spesifik yüzey proteoglikan türlerine bağlanacağı afinitesi ile ilişkilidir. Endostatin, ayrıca VEGFR-2'ye yarışmalı olarak bağlanarak reseptör aktivitesinde inhibisyon oluşturur (88, 89).

2.8.3. Endostatinin Etki Mekanizması

Hücre kültürü çalışmalarıyla endotel hücrelerinde endostatinin $\alpha_5\beta_1$ integrine bağlanarak Ras ve Raf aracılı yolağı ve daha ileriki ERK1 veya p38 ileti yolağını bloke etmesi sonucu endotel hücre migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Şekil 6) (90). Bu etkilerin endostatinin hücre iskeletinin organizasyonunda yer alan aktin monomerlerinin birbirinden ayrılmasına, hücre-matriks etkileşimlerinin bozulmasına ve endotel hücre migrasyonunun yavaşlamasına neden olduğu, bunlara bağlı olarak da anjiyogenezi baskıladığı gösterilmiştir (89, 91, 92). Endotel hücrelerinin proliferasyonunu önleyici direkt etkisi yanında, VEGF sentez ve sekresyonunu azaltarak ya da VEGFR-2 ile etkileşip VEGF sinyal iletimini bozarak da anjiyogenezi ve tümör gelişimini önlemektedir (93). Bununla beraber endostatin, belirli matriks metalloproteinazların aktivasyonunu inhibe etmektedir (MMP'ler; MMP-2, 9, 13 ve MT1-MMP). Özellikle matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) ile stabil kompleks oluşturup MMP-2'nin katalitik bölgesini maskeleyerek aktivitesini inhibe eder (74, 76, 94). Yapılan

çalışmalarda endostatinin fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) aracılı sinyal iletimi ve EC motilitesini engellediği, apoptozisi uyardığı, cyclin-D1 promotor transkripsiyonel aktivitesini inhibe ederek hücre siklusunda G1/S geçişini bloke ettiği bildirilmektedir. Ayrıca erken cevap genleri, hücre siklusu ile ilişkili genleri, apoptozis inhibitörlerini düzenleyen genleri, MAPK ve FAK'ları, G-protein bağlı reseptör aracılı EC büyümesini, mitojenik faktörleri, adezyon moleküllerini ve hücre yapısal bileşenlerini de downregüle etmektedir. Mikrovasküler endotelde proanjyogenik aktivite ile ilişkili birçok sinyal yolağını inhibe etmesinin yanında çoğu antianjyogenik genleri de upregüle etmektedir (74).



Şekil 6. EC ilişkili integrinlerin anjyogenik inhibitörle etkileşimi ve ileti yolağı (74).

2.8.4. Endostatin ve Kanser

Solid tümörlü hastalarda yapılan klinik çalışmalarda akciğer kanseri, yumuşak doku sarkomu ve renal tümörü olan hastalarda serum endostatin düzeylerinin kontrol grubundaki bireylerden daha yüksek olduğu bulunmuştur (13, 95, 96). Zhao ve ark.'nın çalışmasında serum endostatin seviyeleri preoperatif meme kanseri hastalarında benign meme hastalıkları ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı yüksek tespit edilmiştir (97). Tümörlü hastalarda cerrahi sonrası ölçülen serum endostatin düzeylerinin kanser tipine göre değiştiği bildirilmektedir (97). Hücre kültürü çalışmalarında ortama rekombinant endostatin eklenmesi ile hücrelerin invazyon yeteneklerinin azaldığı gösterilmiştir (89).

2.9. S100A4 PROTEİNİ ve S100 PROTEİN AİLESİ

S100A4, (mts1, pEL-98,18A2, P9Ka, CAPL, Calvasculin Fspl olarak da bilinir) kalsiyum bağlayıcı proteinlerden S100 ailesinin bir üyesidir. Bu aile, 9-12 kDa molekül ağırlığında, 20'nin üzerinde üyesi olan, hücre ve dokuya spesifik olarak eksprese edilen asidik, küçük proteinlerdir (17, 18). S100 protein ailesi ismini beyin dokusunda pürifiye edilmesi ve %100 doymuş amonyum sülfat çözeltisinde çözünebilir olmasından almıştır. S100 proteinleri yüksek derecede sekans homolojisi ve ortak üç boyutlu yapıyı paylaşırlar. Çoğu S100 proteini homodimer veya heterodimer yapıdadır, her monomer başına iki EF-el bölgesi içerirler. Hücre biyolojisinin her alanına (hücre metabolizması, motilite, transkripsiyon, sinyal iletimi, hücre bölünmesi ve apoptosis) etki eden fonksiyonel çeşitlilik gösterirler. Kalsiyum bağlanması ile S100 proteinleri aktive olur, hedef proteinleri ile etkileşimlerini kontrol ederler. S100 proteinlerinin büyük çoğunluğunun overekspresyonu otoimmün hastalıklar, kardiyomyopatiler, kanser, nörolojik bozukluklar ve inflamasyonu içeren patolojik durumlarla ilişkilidir (17).

2.9.1. S100A4 Proteininin Biyokimyasal Özellikleri

S100A4 proteini 101 aminoasitten oluşmuştur. Diğer S100 proteinleri genel yapısına uygun olarak her biri kalsiyum bağlayabilen iki EF-el motifi içerir (18). S100A4'ün kalsiyum bağımlı regülasyonu, iki EF-el motifine non-kooperatif olarak kalsiyum bağlanması ile konformasyonel değişikliğe uğrayarak gerçekleşir. Bu değişim S100A4'ün bilinen protein partnerleri ile etkileşimi için gereklidir. S100A4 homodimer olması yanında, S100A1 ile heterodimer olabilmektedir. Kalsiyum varlığında bu durum artış gösterir. Kalsiyum bağlanmasının homodimerizasyon için gerekli olup olmadığı ve homodimerizasyonun S100A4 proteininin hedef proteinleri ile etkileşimi, etkileşimin uzaması ve fonksiyonu için gerekliliği henüz net olarak bilinmemektedir (98).

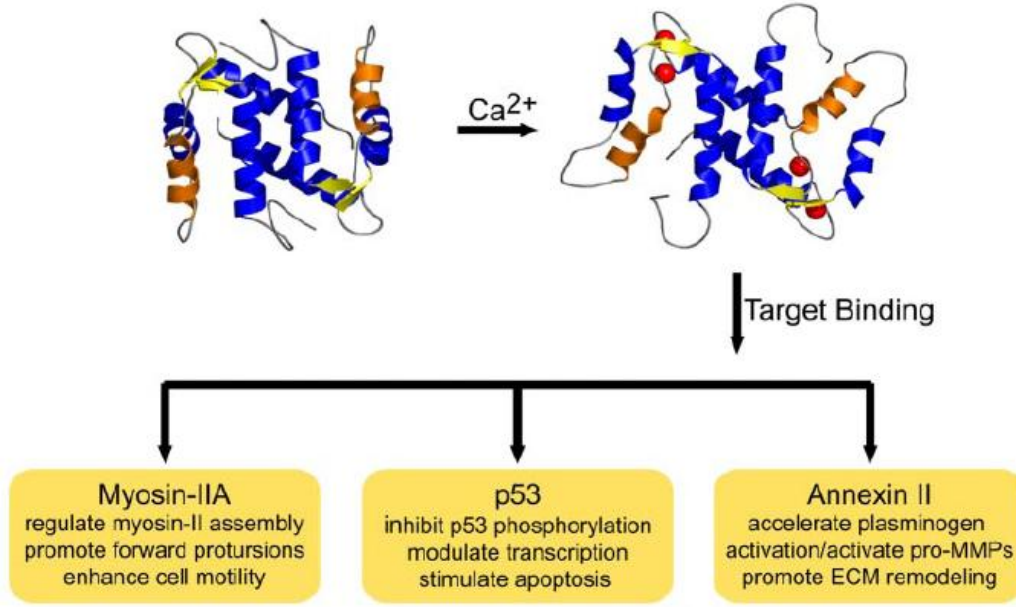
2.9.2. S100A4 Doku Lokalizasyonu

S100A4 gen ekspresyonunun dokuya spesifik olduğu bilinmektedir. T-lenfosit, makrofaj ve granüositler gibi aktif hareket kabiliyetine sahip hücrelerde motilite ile artmış S100A4 ekspresyon düzeyi uyumlu bulunmuştur. İntraselüler S100A4, beyaz cevher astrositlerde, periodental ligament fibroblastlarında, çeşitli epidermal doku keratinositlerinde, yumuşak kas doku hücrelerinde, karaciğer, dalak, lenf nodları, kemik iliği ve kanda immün sistem hücrelerinde saptanmıştır. Bu hücrelerin, S100A'ü içeren sinyal yolağını bulundurabilecekleri düşünülmektedir (18, 99).

2.9.3. S100A4; İntraselüler Rolü ve Hedef Proteinleri

S100A4 hedef proteinleri arasında liprin β 1, metiyonin aminopeptidaz, p53 tümör supresör proteini yanısıra hücre iskeletinin düzenlenmesi ve hücre motilitesinde görevli F-aktin, tropomyozin, kas dışı myozin II ağır zinciri bulunmaktadır (19, 98). S100A4'ün hedef proteinlerle etkileşimi intraselüler kalsiyum konsantrasyonuna bağlı olarak kalsiyumun iki EF-el motifine bağlanması ve dimerizasyonu ile ilişkilidir. S100A4'ü de içeren çeşitli S100 proteinleri tümör supresör protein p53'ün regülasyonunda rol oynar. S100B'ye benzer olarak S100A4 de p53'ün C terminali ile etkileşerek protein kinaz C (PKC)'nin p53'ü fosforillemesini inhibe eder ve DNA'ya bağlanmasını engeller. Bu şekilde, S100A4'ün p53'ün fonksiyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir (19, 100).

İntraselüler S100A4'ün hücre iskeleti komponentlerinden kas dışı myozin ağır zincirine (MHC) bağlanması, protein kinaz C ve kazein kinaz 2 bağımlı MHC fosforilasyonunun inhibisyonuna neden olmaktadır. Bu etkileşim çözünebilir myozini arttırarak hücre iskeleti dinamiklerini düzenlemektedir. Benzer olarak S100A4'ün kas dışı tropomyozine bağlanmasının aktin filamentlerinin ayrılmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Metastatik hücrelerde görülen bir başka özellik de hücre-hücre adezyonudur. S100A4'ün, kalsiyum aracılı hücre-hücre adezyonuna aracılık eden transmembran bir glikoprotein olan E-cadherin ile ters korelasyonu gösterilmiştir. Bu bulgular S100A4'ün tümörün invaziv özelliklerini modüle ettiğini düşündürmektedir (19, 20, 100).



Şekil 7. S100A4 protein hedefleri ile kalsiyum bağımlı etkileşimi (19).

2.9.4. S100A4; Ekstraselüler Rolü ve Hedefleri

S100A4'ün ekstraselüler ortama salındığında, anjiyogenez, hücre motilitesinin stimülasyonu, matriks metalloproteinazların salınımı, tümörle ilişkili transkripsiyonal faktörlerin up regülasyonu ve güçlü bir stromal faktör olarak tümör progresyonunu birçok yönden etkilediği bildirilmektedir. Tümör hücreleri ve/veya aktive stromal hücrelerden belirlenemeyen bir mekanizma ile salınan S100A4'ün prometastatik kaskadı tetiklediği öne sürülmektedir (101, 102). S100A4'ün hücreden nasıl salındığı henüz bilinmemektedir. S100A4'ün tümör progresyonundaki ekstraselüler önemi *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla araştırılmış ve S100A4'ün proanjiyogenik kapasitesi *in vivo*, endotel hücrelerinin motilitesi üzerine etkisi *in vitro* gösterilmiştir (21, 101). S100A4'ün anjiyogenezdeki rolünü, özellikle trombospondin 1 ve MMP'lerin ekspresyonlarının modülasyonu yoluyla gösterdiği bulunmuştur. Trombospondin 1, tümör progresyonunu önleyebilen antianjiyogenik etkili ekstraselüler matriks glikoproteinler sınıfındandır. Tümör ve endotel hücrelerinin S100A4'e maruz bırakılması trombospondin 1 gen ekspresyonunu downregüle etmektedir (20). S100A4'ün anjiyogenik fonksiyonu, MMP'lerin birçoğunun ekspresyonunun upregülasyonu (özellikle MMP-13) ve inhibitörlerinin (TIMPs) downregülasyonu ile ilişkilidir. Tümör hücrelerinde S100A4'ün inhibe edilmesinin invaziv özelliklerin downregüle olmasına, ayrıca MMP ve TIMP ekspresyonlarının azalmasına neden olduğu bildirilmektedir (19, 102).

Ambartsumian ve ark. S100A4 overeksprese eden transgenik farelerde yüksek hemanjioma insidansına dikkat çekmişlerdir. Bu hayvanlarda tümör insidansının serum S100A4 düzeyi ve yaşla paralel olarak arttığı, tümörlerin yüksek vasküler dansiteli olduğu gözlenmiştir (19, 21).

Ekstraselüler S100A4'ün endotelial plazminojen ko-reseptör anneksin II'ye bağlandığı gösterilmiştir. Bu etkileşim plazminojen aktivasyonunu artırarak proMMP'leri aktive ettiği bilinen plazmin üretimini artırır (103). Sonuçta intraselüler ve ekstraselüler fonksiyonları olan S100A4'ün, ekstraselüler matriksin yeniden düzenlenmesine, anjiyogenez ve tümör invazyonunu kolaylaştırarak tümörün ilerlemesine ve metastaza yol açması nedeniyle çeşitli tümörlerde prognostik faktör olabileceği düşünülmektedir (19, 20).

2.9.5. S100A4 Ekspresyonunun Kanser Hastalarının Prognozu ile İlişkisi

S100A4 son zamanlarda, yüksek prognostik önemi olan, metastatik potansiyele sahip gerçek bir moleküler markır olmak için güçlü bir aday haline gelmiştir. Bir çalışmada, 349 primer tümörlü invaziv, ancak opere edilebilir, evre I ve evre II meme kanseri hastasında hasta akıbetine yönelik, S100A4'ü prognostik markır olarak destekleyen, dikkati çeken sonuçlar rapor edilmiştir. Başlangıçta tümörler S100A4 protein varlığı (%11'i S100A4 (+)) ve yokluğuna (%80'i S100A4 (-)) göre sınıflandırılmıştır. 19 yıllık izlem sonucunda hastaların median sağkalımı S100A4 (+) hastalarda 47 ay iken S100A4 (-) hastalarda 228 ayın üzerinde olduğu bildirilmiştir ($p < 0,0001$) (21, 104).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. ARAÇ ve GEREÇLER

3.1.1. Cihazlar ve Kitler

Kullanılan cihaz ve kitlerin listesi Tablo 3 ve 4'te yer almaktadır.

Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi.

Cihaz Adı	Marka	Model	Üretici Firma
ELISA plak okuyucusu	BioTek	KC4	BioTek, USA
ELISA plak yıkayıcısı	Thermo	Wellwash 4MK2	Thermo, USA
Saf su cihazı	Milipore Mili-Q	ZLX55003Y	Hettich Co, Almanya
Santrifüj	Hettich	Rotina 35	Hettich Zentrifugen, Almanya
Derin Dondurucu	Thermo	VLT1740-5-V40	Thermo Electron Corporation, USA
Otomatik Pipetler	Finnpipette		

Tablo 5. Tez çalışmasında kullanılan kitlerin listesi.

Kit Adı	Yöntem	Katalog No	Firma
Human VEGF-A	Enzim İmmunassay	BMS277/2 ve BMS277/2TEN	Bender MedSystems
Human Endostatin	Enzim İmmunassay	DNST0	Quantikine®
S100A4 ELISA Kit	Enzim İmmunassay	CY-8059	CircuLex™
Monoclonal Mouse Anti-Human Clone VG1 VEGF-A	İmmunohistokimya	M7273	DakoCytomation
Endostatin Ab	İmmunohistokimya	ab3453	Abcam®
Polyclonal Rabbit Anti-Human S100A-4	İmmunohistokimya	A5114	DakoCytomation

3.2. OLGULARIN SEÇİMİ, ÖRNEKLERİN TOPLANMASI ve SAKLANMASI

3.2.1. Olguların Seçimi

DEÜTF Hastanesi Genel Cerrahi polikliniğine memede kitle ön tanısıyla gelen, elektif şartlarda meme biyopsisi planlanan kadın hastalar randomize seçilerek, bu hastalardan operasyon günü serum ve biyopsi materyalinden doku örneği alındı. Daha sonra bu hastalar histopatolojik olarak değerlendirilerek primer tanıda benign lezyon tespit edilen 32 hasta, aksiller metastaz saptanmamış 39 meme kanseri hastası ve aksiller metastaz saptanmış 18 meme kanseri hastası olmak üzere 3 grup oluşturularak toplam 89 hasta çalışmaya dahil edildi. Daha önce meme kanseri öyküsü olan, neoadjuvan kemoterapi ve radyoterapi alanlar çalışmaya alınmadı.

Etik kurul raporu alındıktan sonra başlatılan çalışma için örnek alınacak tüm hastalar yazılı olarak bilgilendirilip imzalı onam formları alındı (**EK 3**).

Hastaların klinikopatolojik verileri hastane bilgi işlem sisteminden alındı. Klinikopatolojik veriler olarak yaş, menapozal durum, tümör evresi, tümör boyutu (en büyük tümör çapı), tümörün histolojik tipi, histolojik grade'i, nükleer ve mitoz derecesi, metastatik lenf nodu sayısı, kan damarı invazyon varlığı, lenfovasküler invazyon varlığı, tümörün ER, PR, c-erbB2 durumu değerlendirildi.

Hastaların patolojik evrelendirilmesi AJCC'nin altıncı baskısında yer alan son evreleme sistemine göre yapıldı (Tablo 2) (36).

Menapozal durum, iki farklı evrede ele alındı. En az bir yıldır menstrüel siklusu olmayan hastalar postmenapozal, diğerleri de premenapozal evre olarak değerlendirildi.

Histolojik grade, mitoz ve nükleer derece 'Scarf Bloom Richardson' dereceleme sistemine göre değerlendirildi.

Dokuda östrojen ve progesteron reseptörü ve c-erbB2 ekspresyonu, doku S100A4, VEGF-A, endostatin ekspresyonu immunohistokimyasal yöntemlerle saptandı.

ER ve PR \geq 10 olan olgular pozitif olarak kabul edildi (105). c-erbB2, gen ürünü olan proteinin membranöz boyanma paternine göre 0-1 negatif, 2-3 pozitif olarak kategorize edildi (106).

TNM evreleme sistemine göre metastatik lenf nodu sayısı da 1-3, 4-9, >9 olarak kategorize edildi.

3.2.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

DEÜTF Gündüz Hastanesi'ne gelen, elektif şartlarda meme biopsisi yapılacak hastaların anestezi öncesi, periferik venlerinden damar yolu açılırken kırmızı kapaklı düz tüpe bir kez olmak üzere 6-8 ml kan alındı. Alınan kan örnekleri en kısa sürede laboratuvarında 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip çalışılacak her test için birer yedek olmak üzere 6 ependorf tüpe ayrılarak çalışılincaya kadar -40⁰C'de saklandı. Biyopsi doku örneklerinin alınması, patoloji laboratuvarına iletilmesi, dokunun takibi ve saklanması ise standart patolojik işlemlere göre yapıldı.

3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

3.3.1. VEGF-A ELISA Analizi

3.3.1.1. Ölçüm Yöntemi

Patolojik olarak tanı almış 32 benign, 39 malign (aksiller metastaz yapmamış) ve 18 aksiller metastazla gelen meme hastasının serumlarında VEGF-A düzeyi ölçümü Bender MedsSystems marka ELISA kiti ile gerçekleştirildi.

Test prensibi: İlk inkübasyon süresinde, standart ya da örnek içerisinde bulunan insan VEGF-A, daha önceden kuyucuklara kaplanmış olan antikor tarafından tutulur. Yıkama aşamasında bağlanmamış biyolojik komponentler uzaklaştırılır. Daha sonra VEGF-A'ya spesifik biotinlenmiş spesifik monoklonal antikor eklenir. İkinci inkübasyon süresince, bu antikor standart ya da örnekteki insan VEGF-A'ya bağlanır. Bağlanmayan sekonder antikorların uzaklaştırılması amacıyla yapılan yıkama işleminden sonra, streptavidin-HRP işaretli enzim ilave edilir. Bu enzim biotinlenmiş antikora bağlanır. Bağlanmayan fazla enzim yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Ortama substrat eklenir, enzim-substrat reaksiyonu sonucu oluşan rengin yoğunluğu, örnekte bulunan VEGF-A miktarı ile doğru orantılıdır. Reaksiyon ortama asit ilavesi ile sonlandırılır ve 450 nm'de ölçüm yapılır. Hazırlanan 7 insan VEGF-A standart dilüsyonlarından standart eğri ve VEGF-A örnek konsantrasyonları saptanır.

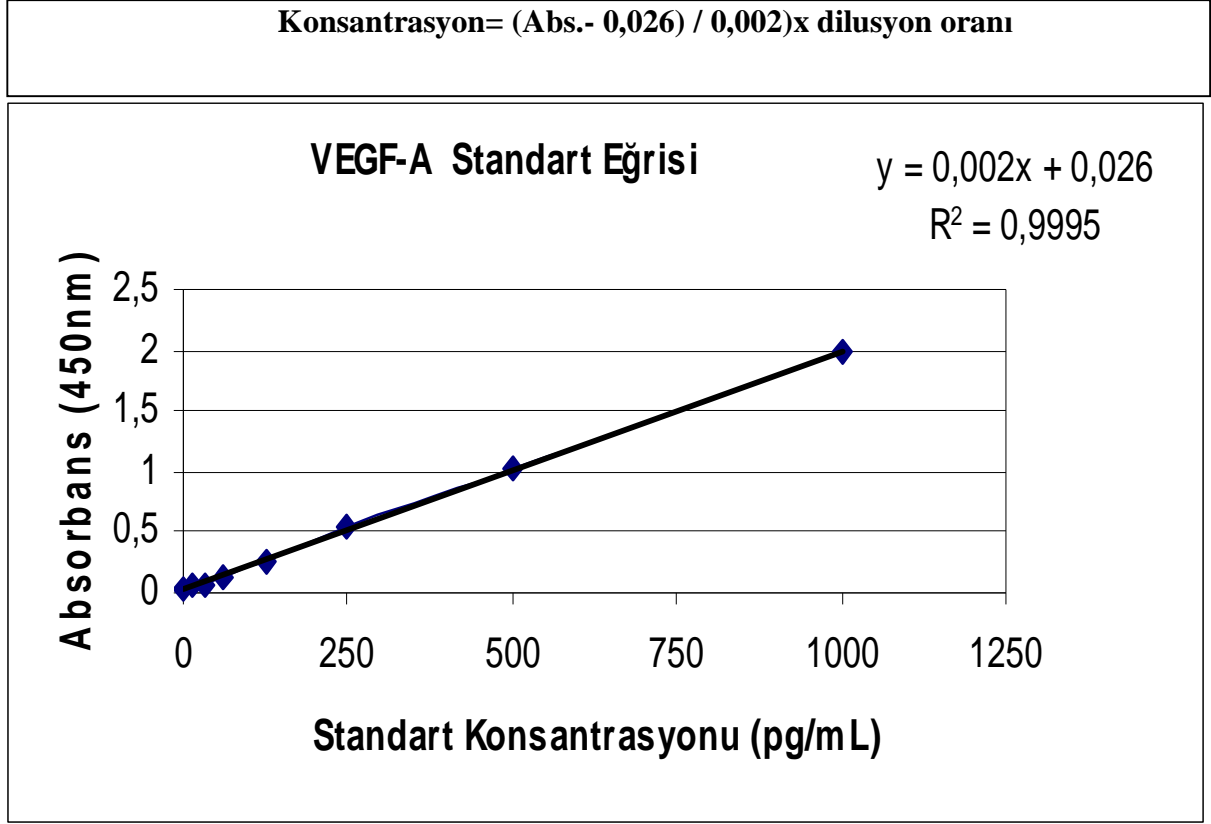
Ölçüm aralığı: 7,9– 1000 pg/mL

3.3.1.2. Analiz Aşamaları

- Hastalar iki ayrı günde çalışıldı.
- Analize başlamadan önce kit içinde bulunan tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.
- Liyofilize standart, üzerinde yazan miktar kadar (1300 µl) distile su ile çözülerek 2000 pg/ml'lik stok solusyon hazırlandı. Standardın iyice çözünmesi için bir süre beklendi. (10-30 dk). 2000 pg/ml stok solusyonundan 225 µl alınarak, daha önceden içerisine 225 µl örnek dilüent konmuş 7 eppendorf tüpte 1:2 seri dilüsyonlar yapılarak 7 farklı konsantrasyonda standart hazırlandı (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6 pg/ml).

- Çalışılacak 96'lık ELISA plağı prosedüre uygun olarak iki kez (300 µl) yıkama tamponu ile yıkandı.
- Hazırlanan 7 farklı konsantrasyonda standart (ilk 14 kuyucuğa) çift olarak kuyucuklara 100'er µl kondu.
- Kör kuyucuklar için 100'er µl örnek diluenti pipetlendi.
- İlk gün benign hastalar (23 hasta) 1:2 dilüsyon, malign aksiller metastaz yapmamış hastalar 1:3 dilüsyon, malign aksiller metastazlı hastalar 1:5 dilüsyon yapılarak dilüe edilmiş örneklerden 100'er µl pipetlendi. İkinci gün kalan benign hastalar çalışılırken, ilk gün çalışılan hastalar da tekrar edildi.
- 2 saat boyunca oda sıcaklığında ve 100 rpm'de ELISA plak çalkalayıcıya bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda plak 6 kez 300'er µl yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 100 µl biyotin konjugatı eklendi.
- 1 saat boyunca oda sıcaklığında ve 100 rpm'de ELISA plak çalkalayıcıya bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda plak 6 kez 300'er µl yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 100 µl streptavidin-HRP eklendi.
- 1 saat boyunca oda sıcaklığında ve 100 rpm'de ELISA plak çalkalayıcıya bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda plak 6 kez 300'er µl yıkama tamponu ile yıkandı.
- 100 µl TMB substrat solusyonu tüm kuyucuklara eklendi.
- 10 dk boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı.
- 1. standarttan (1000 pg/ml) 620 nm dalga boyunda 0,9-0,95 absorbans alınıncaya kadar bir süre daha beklendi (koyu mavi olasıya kadar).
- İnkübasyon sonunda bu absorbans alınca tüm kuyucuklara 100 µl reaksiyon sonlandırma solusyonundan eklendi.
- Tüm kuyucuklarda oluşan rengin absorbansı 450 nm'de ölçüldü.

- VEGF-A konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Bakınız Grafik 1).



Grafik 1. VEGF-A standart eğrisi.

- Serum VEGF-A ELISA çalışmasında 9 benign hasta hariç örnekler çift çalışılmıştır.

3.3.2. Endostatin ELISA Analizi

3.3.2.1. Ölçüm Yöntemi

Serum Endostatin düzeyi ölçümü R&D Quantikine Human Endostatin İmmunoassay (Katolog No: DNST0) marka ELISA kiti ile gerçekleştirildi. Endostatin ölçüm prensibi, serumdaki endostatini direkt saptayan kantitatif sandviç enzim immünassay tekniğine dayanmaktadır.

İlk inkübasyon süresinde, standart ya da örnek içerisindeki insan endostatini, daha önceden kuyucuklara kaplanmış olan endostatine spesifik monoklonal antikor tarafından tutulur. Yıkama aşamasında bağlanmamış biyolojik komponentler uzaklaştırılır. Daha sonra yine endostatine spesifik enzim bağlı endostatin monoklonal antikoru eklenir. İkinci inkübasyon süresince, bu antikor standart ya da örnekteki insan endostatine bağlanır. Bağlanmayan sekonder antikorların uzaklaştırılması amacıyla yapılan yıkama işleminden sonra, substrat solusyonu ilave edilir. İlk basamakta bağlanan endostatin miktarı ile orantılı renk oluşur. Renk oluşumu ortama reaksiyon sonlandırma solusyonu ilavesi ile sonlandırılır ve 450 nm'de (referans dalga boyu 540 nm) ölçüm yapılır. Oluşan rengin yoğunluğu, örnekte bulunan endostatin miktarı ile doğru orantılıdır. İnsan endostatininden hazırlanan 7 farklı dilüsyondaki standarttan standart eğri çizilerek, örnekteki endostatin konsantrasyonları hesaplanır.

Ölçüm aralığı: 0,023- 10 ng/mL

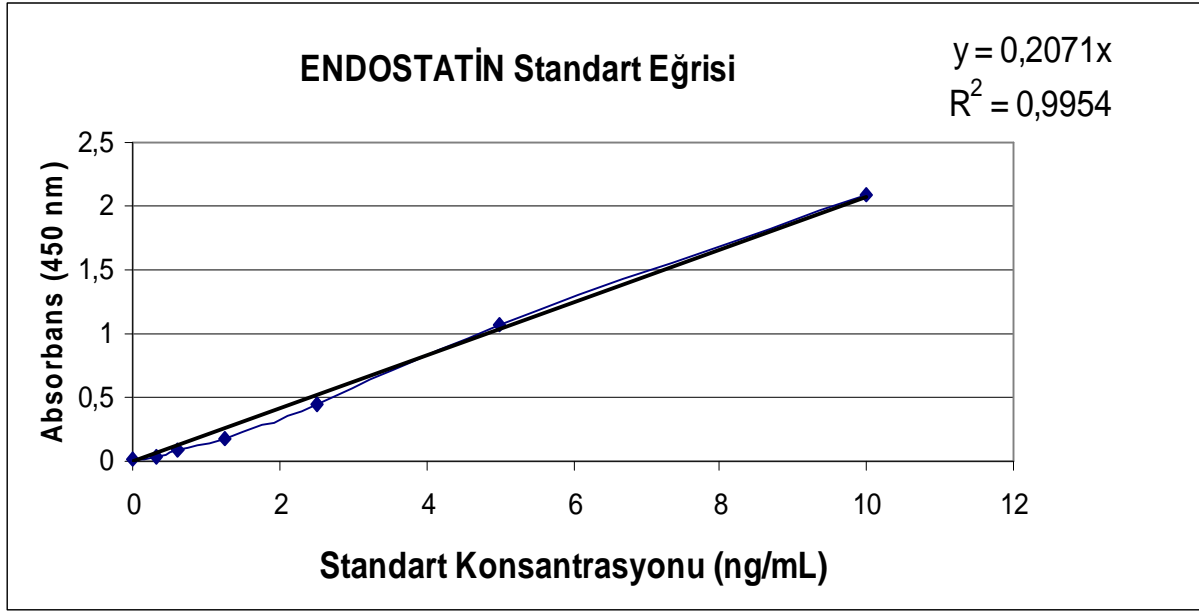
3.3.3.2. Analiz Aşamaları

- Hastalar iki ayrı günde çalışıldı.
- Endostatin ELISA ölçümü oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Analize başlamadan önce kit içinde bulunan tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilerek çalışıldı.
- Stok standart, konsantrasyonu 100 ng/mL olacak şekilde 1 mL distile su ile hazırlandı. Stok standart solusyondan 100 µl, kalibratör dilüentten 900 µl alınıp 1:10 dilüsyonla 10 ng/mL'lik 1. tüp hazırlandı. Sonrasında seri dilüsyon yapılarak 5; 2,5; 1,25; 0,62;

0,31 ng/mL konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Yedinci tüpe kör olarak dilüsyon tamponu eklendi.

- Tüm kuyucuklara 100 µl assay dilüent eklendi.
- Hazırlanan 7 farklı konsantrasyonda standartlar çift olarak ilk 14 kuyucuğa, kontrol ve örnekler sonraki kuyucuklara 50'şer µl pipetlendi.
- 2 saat boyunca oda sıcaklığında üstü kapalı olarak ELISA plağı yatay çalkalayıcıya (500 ± 50 rpm) bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda içerik aspire edilip plak 4 kez 400'er µl yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 200 µl endostatin konjugatı eklendi.
- 2 saat boyunca oda sıcaklığında üstü kapalı olarak ELISA plağı yatay çalkalayıcıya (500 ± 50 rpm) bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda içerik aspire edilip plak 4 kez 400'er µl yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 200 µl substrat solusyonu eklendi.
- 30 dk boyunca oda sıcaklığında ışıktan koruyarak (karanlık ortamda) inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklara 50 µl reaksiyon sonlandırma solusyonundan eklendi.
- Tüm kuyucuklarda oluşan renk yoğunluğu 450 nm'de (referans dalga boyu 540 nm) ölçüldü.
- Hasta serumundaki endostatin konsantrasyonları elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplandı (Bakınız Grafik 2). Dilüsyon yapılan tüm örnekler dilüsyon oranları ile çarpıldı.
- Kontrol absorbansı 0,770 bulundu. Formülde yerine konulduğunda 3,718 ng/mL bulundu (Beklenen değer: 3,27- 5,33).

$$\text{Konsantrasyon} = (\text{Abs.} / 0,2071) \times \text{dilasyon oranı}$$



Grafik 2. Endostatin standart eğrisi.

- Serum ES ELISA çalışmasında 13 benign hasta hariç örnekler çift çalışılmıştır.

3.3.3. S100A4 ELISA Analizi

3.3.3.1. S100A4 Ölçüm Yöntemi

Ölçüm için CircuLex's S100A4 ELISA kiti kullanıldı. S100A4 ölçüm prensibi, serumdaki S100A4'ü direkt tespit eden kantitatif sandviç enzim immünassay tekniğine dayanır. Bu teknikte standartlar ve hasta örnekleri S100A4'e spesifik poliklonal antikorla kaplı kuyucuklara ekilir. İlk inkübasyon sonunda bu antikorlar hastalardaki antijenleri yakalar. Yıkama ile uzaklaştırılan bağlanmayan komponentlerin ardından ortama peroksidaz ile konjüge edilmiş S100A4'e spesifik poliklonal antikor (HRP conjugate) ilave edilir. İkinci inkübasyon sonunda yıkama ile bağlanmamış antikorlar ortamdan uzaklaştırılır. H₂O₂-Tetrametilbenzidin (TMB), peroksidazın substratı olarak ortamda kalan HRP conjugate ile reaksiyona girerek sarı renkli ürün oluşturur. Reaksiyonu sonlandırmak için son basamakta asidik solüsyon kullanılır. Oluşan sarı renkli ürünün absorbansı örnekteki S100A4 konsantrasyonu ile direkt orantılıdır. 450 nm'de standartlar yardımıyla elde edilen absorbans-konsantrasyon eğrisinden örneklerin konsantrasyonları hesaplanır.

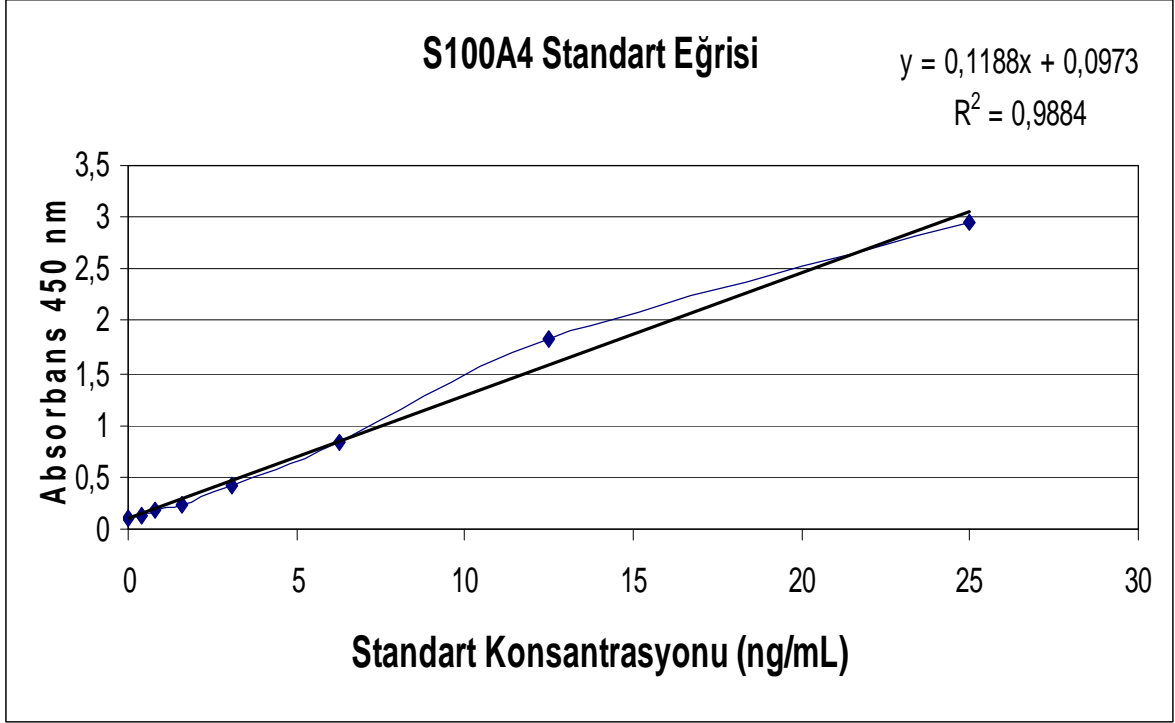
Ölçüm aralığı: 0,282- 25 ng/mL

3.3.3.2. Analiz Aşamaları

- Analize başlamadan önce kit içinde bulunan tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Hazır reaktifler karıştırıldı. Liyofilize standart mikrosantrüfjle santrifüj edilerek etraftaki toz parçacıkların dibe toplanması sağlandı.
- Liyofilize standart, üzerinde yazan miktar kadar (600 µl) distile su ile çözülerek 100 ng/ml'lik stok solüsyon hazırlandı. Standardın iyice çözünmesi için bir süre beklendi (10-30 dk). 100 ng/ml stok solüsyonundan 150 µl alınarak, daha önceden içerisine 450 µl örnek dilüent konmuş bir eppendorf tüpte 1:4 dilüsyon yapıldı. Sonraki 6 eppendorfa 300 µl örnek dilüent konarak, hazırlanmış olan ilk eppendorftan 1:2 seri dilüsyonlar yapılarak 7 farklı konsantrasyonda standart hazırlandı (25; 12,5; 6,5; 3,1; 1,6; 0,78; 0,39 ng/mL).
- Hazırlanan 7 farklı konsantrasyonda standart (ilk 14 kuyucuğa) çift olarak kuyucuklara 100'er µl pipetlendi.

- K r kuyucuklar için 100'er  l örnek diluent konu.
- Serum  rnekleri 100  l pipetlendi. (Dilasyon gerektiren örnekler 1:2, 1:4, 1:8 dilue edilerek kullanıldı).
- 1 saat boyunca oda sıcaklığında ve 300 rpm'de orbital ELISA plak çalkalayıcıya bırakıldı.
-  nkubasyon sonunda içerik aspire edilip plak 4 kez 350'er  l yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 100  l streptavidin-HRP konjugatı eklendi.
- 1 saat boyunca oda sıcaklığında ve 300 rpm'de orbital ELISA plak çalkalayıcıya bırakıldı.
-  nkubasyon sonunda içerik aspire edilip plak 4 kez 350'er  l yıkama tamponu ile yıkandı.
- 100  l TMB substrat solusyonu tüm kuyucuklara eklendi.
- 10 dk boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda inkubasyona bırakıldı.
- 1. standarttan (25 ng/ml) mavi renk dalga boyunda (600-620 nm) 2,5 absorbans alınıncaya kadar bir süre daha beklendi (koyu mavi olasıya kadar).
-  nkubasyon sonunda bu absorbans alınınca tüm kuyucuklara 100  l reaksiyon sonlandırma solusyonundan eklendi.
- Tüm kuyucuklarda oluşan renk yoğunluğu 450 nm'de ölçüldü.
- S100A4 konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Bakınız Grafik 3).

$$\text{Konsantrasyon} = (\text{Abs.} - 0,0973) / 0,1188 \times \text{dilasyon oranı}$$



Grafik 3. S100A4 standart eğrisi.

- Serum S100A4 ELISA çalışmasında her hasta örneği çift çalışılmıştır.

3.4. İMMUNOHİSTOKİMYA (İHK) ÇALIŞMALARI

İHK, temel olarak antijen-antikor etkileşiminden faydalanılarak doku kesitlerinde protein lokalizasyonunu belirlemek amacıyla kullanılan bir tekniktir. Bu antijen-antikor etkileşimini görüntülemek için farklı teknikler geliştirilmiştir. En yaygın görüntüleme tekniği, antikora bağlı formda bulunan ve renk oluşturan bir reaksiyonu katalizleyen peroksidaz gibi bir enzimin kullanımınıdır (107).

3.4.1. İmmunohistokimyasal VEGF-A, ES, S100A4 Proteini Boyama Tekniği

Çalışmaya dahil edilen 3 grupta toplam 89 hastanın doku örneğinde VEGF-A, S100A4, ES proteinlerinin ekspresyonları aşağıdaki prosedüre göre immunohistokimyasal yöntemle çalışıldı.

- Parafin bloklardan 2-3 mikron kalınlığında kesilen doku örnekleri etüvde 40⁰C'de 1 gece bekletildi.
- Ksilolde 20 dakika bekletildikten sonra azalan alkol serilerinden geçirilerek (%96-%90-%80-%70) suda yıkandı.
- İHK'de kullanılan antikorlar farklı dilüsyon oranlarıyla aşağıdaki gibi hazırlandı. Daha sonra boyama tekniğinde üç parametre için ortak prosedür izlendi.
- VEGF-A antikoruna (VG-1, Dako) 1/50 dilüsyon oranında, S100A4 antikoruna (Dako) 1/200 dilüsyon oranında, Endostatin antikoruna (Abcam, Ab 5702) 1/60 dilüsyon oranında hazırlandı.
- VEGF-A için hazırlanan kesitler EDTA tamponda (pH:8), S100A4 için sitrat tamponda (pH:6) düdüklü tencerede 5 dakika kaynatıldı. Endostatin için hazırlanan kesitlere ön işlem uygulanmadı.
- Kesitler tris tampona alındı.
- Kesitler üzerine %3'lük H₂O₂ damlatıldı. 15 dakika bekletildi. Süre sonunda tris tampon ile yıkandı.
- Kesitler üzerine Scytek (lot: 17014) süper blok damlatıldı. 5-7 dakika bekletildi.
- Yıkama yapılmadan, hazırlanan antikorlar blok solüsyonu silkelenerek kesitler üzerine damlatıldı. 1 saat inkübe edildi. Tris tampon solüsyonu ile yıkandı.

- Scytek biotin solusyonu kesitlere damlatıldı. 20 dakika bekletildi. Tris tampon solusyonu ile yıkandı.
- Scytek streptavidin solusyonu damlatıldı. 20 dakika bekletildi. Tris buffer solusyonu ile yıkandı.
- **Spring** DAB (Diaminobenzidin) substrat ile Spring DAB kromojen karıştırılarak hazırlandı. Kesitler üzerine damlatıldı. 7-10 dakika bekletildi. Suda yıkandı.
- 1 dakika Mayer's hematoksilen (**Biooptica**) ile zıt boyama yapıldı. Suda yıkandı.
- Yükselen alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika ksilolde bekletildi.
- Kapatma işlemi yapıldı.

3.4.2. İmmunoreaktivitenin Değerlendirilmesi

İmmunohistokimyasal yöntemle çalışılan S100A4, VEGF-A, endostatin proteinlerinin boyanması x100, x200, x400 büyütme ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi. S100A4 için tümör hücrelerinin sitoplazmik ve nükleer boyanması, ES ve VEGF-A için sitoplazmik boyanma derecesi dikkate alındı. Stromal alanlar değerlendirilmedi. Boyama sonrasında dokular boyanmanın yaygınlığına ve yoğunluğuna göre skorlanarak değerlendirildi (108). Boyanma yaygınlığı değerlendirilirken boyayı pozitif olarak tutan bölgenin tüm preparat yüzeyine olan oranı esas tutuldu. Buna göre bu oran;

- i) % 0 ise '0' (Şekil 18, 20),
- ii) % 1-25 ise '1' (Şekil 19),
- iii) % 26-50 ise '2' (Şekil 17),
- iv) % 51-75 ise '3' (Şekil 21),
- v) % 76-100 ise '4' olarak değerlendirildi.

Boyanma yoğunluğu ise;

- i) Hiç boyanma olmamışsa '0' (Şekil 18, 22),
- ii) Zayıf boyanma olmuşsa '1',
- iii) Orta şiddette boyanma olmuşsa '2' (Şekil 17),
- iv) Güçlü boyanma olmuşsa '3' olarak değerlendirildi (Şekil 21).

Boyanma yaygınlığı ve boyanma yoğunluğu skorlarının toplamı 0, 1, 2 ise negatif, 2'nin üzerinde ise S100A4, VEGF-A, ve endostatin ekspresyonu pozitif boyanmış olarak

değerlendirildi (108). Değerlendirmenin tamamı tek bir uzman patoloğ tarafından yapıldıktan sonra her gruptan rastgele seçilen hastalar (toplamın %22,5'i) ikinci bir uzman patoloğ tarafından tekrar değerlendirildi. %90'nın üzerinde tutarlılık olduğu gözlemlendi.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

3.5.1. Verilerin Kaydedilmesi

Analizlerden elde edilen veriler 'Microsoft Office Excel 2003' programı kullanılarak kaydedildi.

3.5.2. Verilerin Analizi ve Tablolar ile Gösterilmesi

İstatistiksel değerlendirmeler ve tablo hazırlama amacıyla 'SPSS for Windows 15.0' programı kullanıldı. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi için öncelikle ortalama değer ve standart sapmaları hesaplandı. Grupların normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Grupların ortanca değerlerinin birbirinden farklı olup olmadıklarını belirlemek için nonparametrik Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis analizi ile anlamlı farklılık görülen parametreler için ikili grup analizi, Mann Whitney U testi ve kategorize edilen nonparametrik parametreler için Ki kare testi yapıldı. Grup parametreleri arasındaki korelasyonu belirlemek için Spearman Korelasyon testi kullanıldı. $p < 0,05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

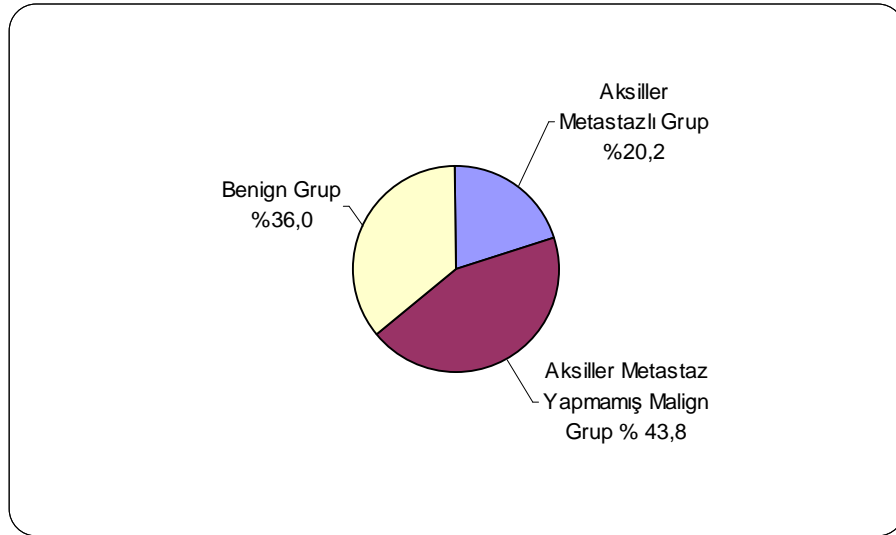
İHK bulgularının serum parametreleriyle korelasyonu araştırılırken iki skorun toplamı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. TANIMLAYICI BULGULAR

4.1.1. Çalışma Grubu

Çalışmaya dahil edilen hastalar (tamamı kadın), histopatolojik sonuçlarına göre üç grupta incelendi. Hasta grupları aksiller metastaz yapmış (**metastazlı grup**) 18 meme kanseri hastası (%20,2), aksiller metastaz yapmamış (**malign grup**) 39 meme kanseri hastası (%43,8), benign meme hastalığı olan 32 hasta (**benign grup**) (%36,0) olmak üzere toplam 89 hastadan oluşmaktaydı (Şekil 8).



Şekil 8. Hastaların gruplara göre dağılımı.

4.1.2. Gruplardaki Olguların Yaş Ortalamaları

Metastazlı grubun, malign grubun ve benign grubun yaş ortalamaları (minumum ve maksimum değerleri) sırasıyla 47,7±9,3 (31-63); 55,8±9,9 (34-76); 41,0±12,3 (15-64) olarak saptandı (Tablo 6).

Üç grubun yaş ortalamaları arasında anlamlı fark saptandı (p=0,000). Metastazlı grubun yaş ortalaması malign gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (p=0,009). Malign grubunun yaş ortalaması benign gruba göre anlamlı yüksek saptandı (p=0,000).

Tablo 6. Gruplardaki olguların yaş ortalamaları, minumum ve maksimum değerleri.

Hasta grupları	n	Ort± ss (Yaş)	Minimum	Maksimum
Metastazlı grup	18	47,7±9,3	31	63
Malign grup	39	55,8±9,9	34	76
Benign grup	32	41,0±12,3	15	64
Toplam	89			

4.1.3. Menapoz Durumu

Menapoz durumlarına göre değerlendirildiğinde 89 hastanın 51'i (%57,3) premenapoz, 38'i (%42,7) ise postmenapozda idi. Meme kanseri hastalarının 25'i (%43,8) premenapoz, 32'si (%56,2) postmenapozal dönemde idi.

Premenapozdaki hasta oranı metastazlı grupta malign gruba göre daha yüksek bulundu ($p=0,019$) (Tablo 7). Aynı zamanda malign gruptaki premenapozdaki hasta oranı benign gruptakinden anlamlı düşük saptandı ($p=0,000$) (Tablo 7).

Tablo 7. Hasta gruplarında menopoz durumunun karşılaştırılması.

	Menapoz Durumu			
	Premenapoz		Postmenapoz	
	Sayı	%	Sayı	%
Metastazlı Grup	12	66,7 ^a	6	33,3
Malign Grup	13	33,3 ^{a,b}	26	66,7
Benign Grup	26	81,3 ^b	6	18,8
Toplam	51		38	

^a : $p= 0,019$

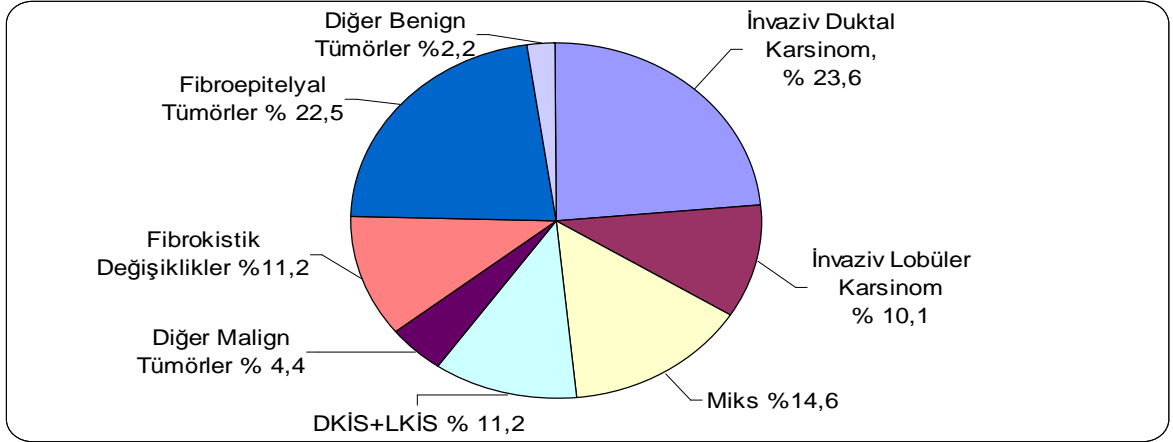
^b : $p= 0,000$

4.1.4. Patolojik Tanı

Toplam 89 hasta değerlendirmeye alındı.

Üç grup birlikte değerlendirildiğinde;

21'i (%23,6) invaziv duktal karsinom, 9'u (%10,1) invaziv lobüler karsinom, 13'ü (%14,6) miks (invaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom) veya farklı bir tümörle birlikte, 10'u (%11,2) DKİS veya LKİS, 4'ü (%4,4) diğer tümörler, 10'u (%11,2) fibrokistik değişiklikler, 20'si (%22,5) fibroepitelyal tümörler, 2'si (%2,2) diğer benign tümörlerden oluşmakta idi.



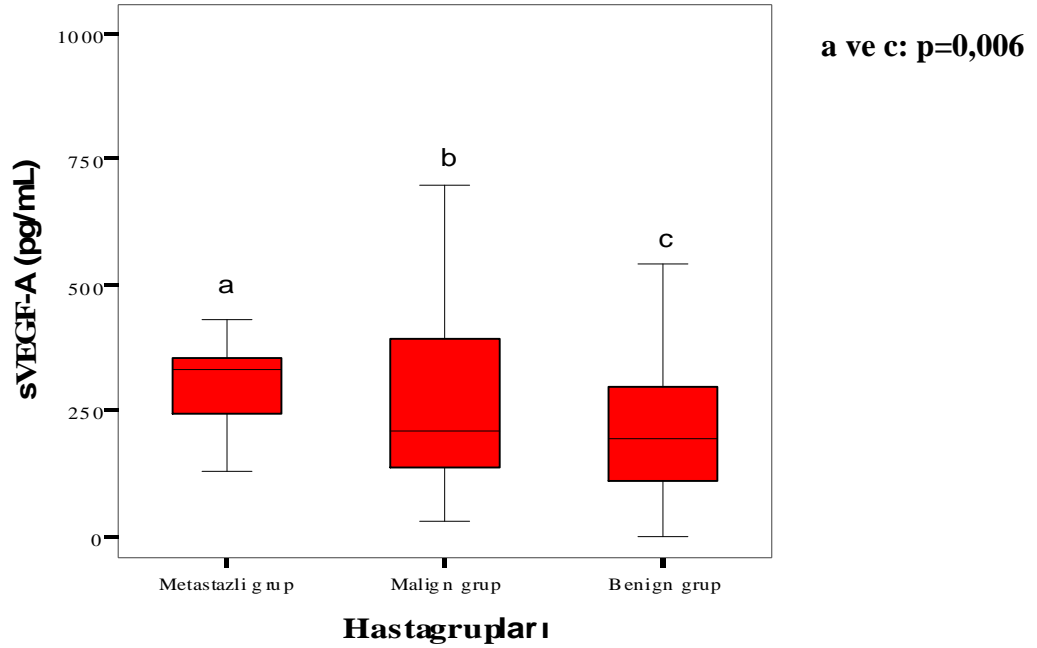
Şekil 9. Hastaların patolojik tanılarına göre dağılımı.

4.2. SERUM VEGF-A, ES, S100A4 DÜZEYLERİ ve VEGF-A/ES

4.2.1. Hasta Gruplarında Serum VEGF-A Düzeyleri

Serum VEGF-A düzeyleri ortancaları metastazlı grupta 331,2 pg/mL, malign grupta 208,3 pg/mL, benign grupta 193,5 pg/mL olarak saptandı (Tablo 8).

Üç farklı hasta grubundaki serum VEGF-A düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark olduğu saptandı ($p=0,042$) (Kruskal Wallis). İkili karşılaştırmalar yapıldığında serum VEGF-A düzeyleri metastazlı grupta benign gruba göre anlamlı yüksek bulundu (a ve c: $p=0,006$) (Tablo 8) ve (Şekil 10).

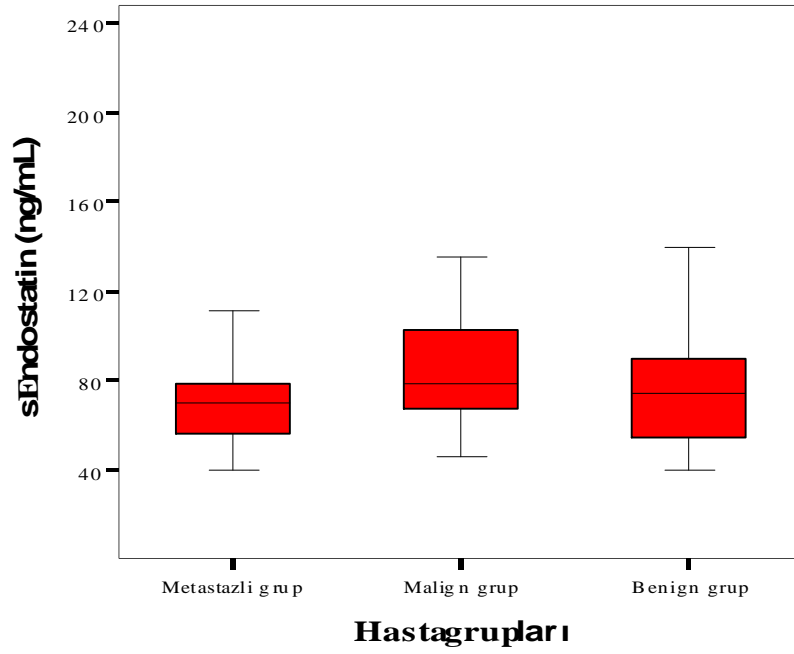


Şekil 10. Hasta gruplarında serum VEGF-A düzeylerinin karşılaştırılması.

4.2.2. Hasta Gruplarında Serum Endostatin Düzeyleri

Serum endostatin düzeyleri ortancaları metastazlı grupta 69,6 ng/mL, malign grupta 78,7 ng/mL, benign grupta 74,3 ng/mL olarak saptandı (Tablo 8).

Üç farklı hasta grubundaki serum endostatin düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Şekil 11).

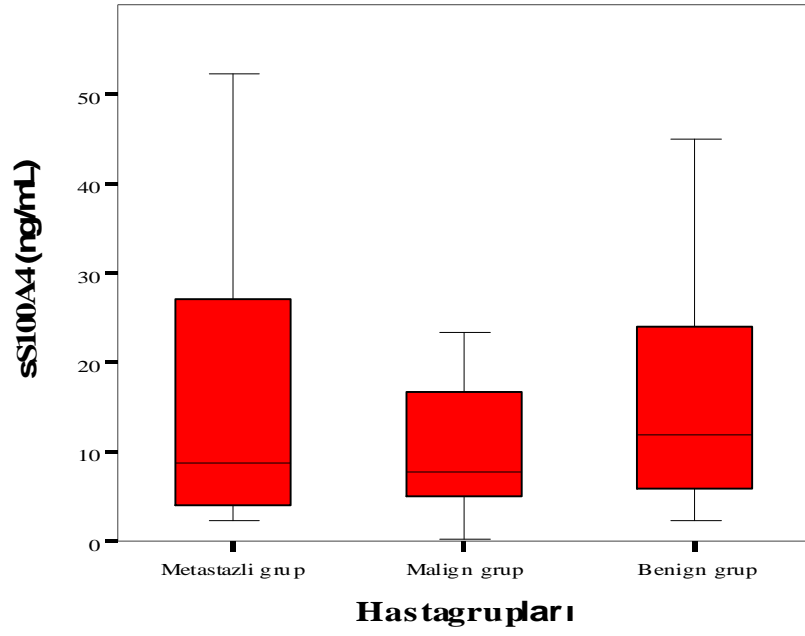


Şekil 11. Hasta gruplarında serum endostatin düzeylerinin karşılaştırılması.

4.2.3. Hasta Gruplarında Serum S100A4 Düzeyleri

Serum S100A4 düzeyleri ortancaları metastazlı grupta 8,7 ng/mL, malign grupta 7,8 ng/mL, benign grupta 12,0 ng/mL olarak saptandı (Tablo 8).

Üç farklı hasta grubundaki serum S100A4 düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (Şekil 12).

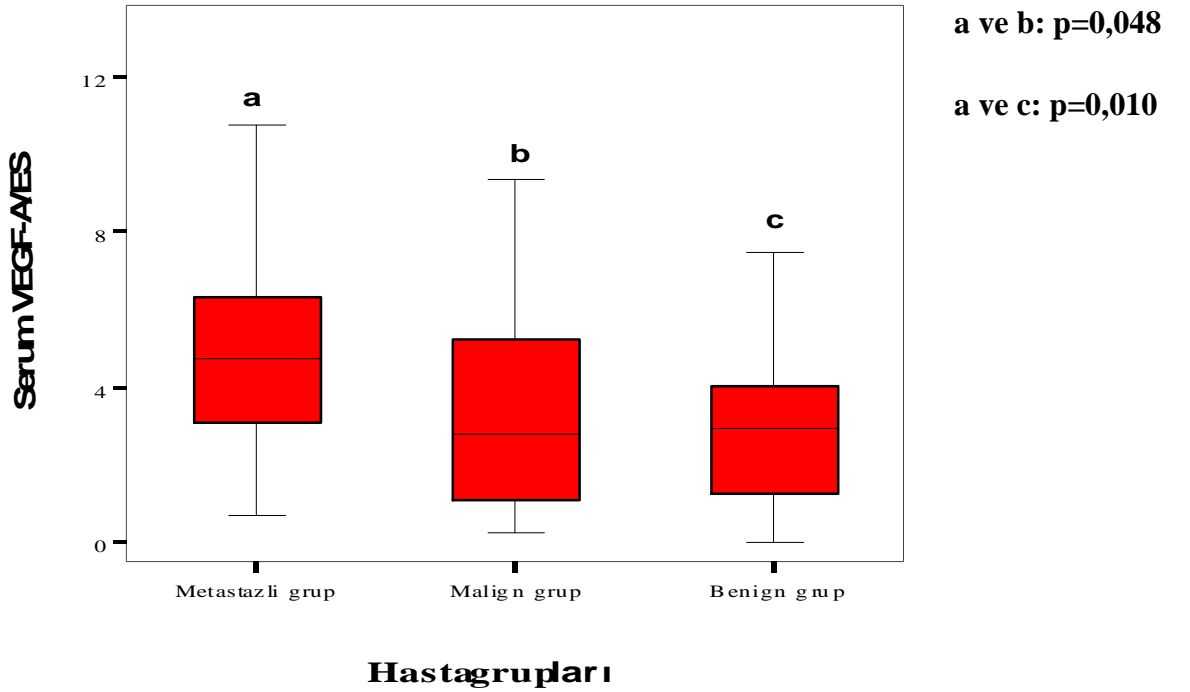


Şekil 12. Hasta gruplarında serum S100A4 düzeylerinin karşılaştırılması.

4.2.4. Serum VEGF-A/ES (Anjiyogenik Denge)

Serum VEGF-A konsantrasyonu ES konsantrasyonuna oranlanarak (VEGF-A/ES) anjiyogenik denge değerlendirildi. Metastazlı grupta serum VEGF-A/ES 4,7; malign grupta 2,7; benign grupta 2,9 olarak saptandı (Tablo 8).

Üç farklı hasta grubundaki serum VEGF-A/ES'ler karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark olduğu saptandı ($p=0,042$) (Kruskal Wallis) (Tablo 8). İkili karşılaştırmalar yapıldığında serum VEGF-A/ES metastazlı grupta, malign grup ve benign gruptan anlamlı yüksek bulundu (a ve b: $p=0,048$; a ve c: $p=0,010$) (Tablo 8) ve (Şekil 13).



Şekil 13. Hasta gruplarında VEGF-A/ES'nin karşılaştırılması.

Tablo 8. Üç grupta serum VEGF-A, ES, S100A4 düzeylerinin ve VEGF-A/ES'nin karşılaştırılması.

	Metastazlı grup			Malign grup			Benign Grup			p*
	ort±ss	Ortanca	% 25-75	ort±ss	Ortanca	% 25-75	ort±ss	Ortanca	%25-75	
S100A4 (ng/mL)	23,73±43,4	8,7	4,02-28,6	13,68±13,87	7,8	4,84-17,82	17,85± 20.6	12,0	5,87- 24,1	0,568
VEGF-A (pg/mL)	326,3±131,8	331,2^a	240,6-372,4	287,1±218,8	208,3	130,8-410,0	214,1±142,4	193,5^a	109,5- 300,4	0,042
ES (ng/mL)	72,8±21,7	69,6	55,9-79,7	89,9±36,4	78,7	66,6-102,8	79,98±35,7	74,3	54,8- 93,8	0,111
VEGF-A/ES	4,9± 2,6	4,7^{b,c}	3,0-6,3	3,5± 2.8	2,7^b	1,0-5,2	3,1±2.3	2,9^c	1,2-4,0	0,042

* Kruskal Wallis test sonucu

Mann Whitney U testi sonucu

^a : p=0,006

^b : p=0,048

^c : p=0,010

4.3. KANSERLİ ve BENİGN HASTALIKLI MEME DOKUSUNDA VEGF-A, ES ve S100A4 EKSPRESYONU

Dokuda çalışılan parametrelerin ekspresyonları değerlendirilirken boyama yoğunluğu ve boyama yaygınlığı olmak üzere iki skorlama yapıldı. Her bir parametre için her iki skorun toplamı > 2 ise ekspresyon pozitif olarak değerlendirildi (Bakınız: sayfa 49).

Doku ekspresyonları toplam 88 hastada değerlendirildi. Bir hasta primer doku kesitlerinin hasta tarafından alınması nedeniyle değerlendirilemedi.

Doku VEGF-A ekspresyonu tüm hastaların %72,7'sinde pozitif, doku ES ekspresyonu tüm hastaların %44,3'ünde pozitif, doku S100A4 ekspresyonu ise tüm hastaların %52,7'sinde pozitif saptandı.

Doku VEGF-A ekspresyonu metastatik grupta %70,6 pozitif, malign grupta %71,8 pozitif, benign grupta %75,0 pozitif saptandı (Tablo 9).

Doku ES ekspresyonu metastatik grupta %35,3 pozitif, malign grupta %48,7 pozitif, benign grupta %43,8 pozitif saptandı (Tablo 9).

Doku S100A4 ekspresyonu metastatik grupta %41,2 pozitif, malign grupta %53,8 pozitif, benign grupta %56,3 pozitif saptandı (Tablo 9).

Doku VEGF-A, ES, S100A4 ekspresyon durumları hasta gruplarında farklı bulunmadı (Tablo 9).

Seksen sekiz hastada değerlendirilen doku VEGF-A boyanma yoğunluğu dikkate alındığında metastazlı grupta 9 hastada (%52,9) 'zayıf', 8 hastada (%47,1) 'orta' boyanma yoğunluğu saptandı. Malign grupta 5 hastada (%12,8) boyanma görülmez iken, 28 hastada (%71,8) 'zayıf', 6 hastada (%15,4) 'orta' boyanma yoğunluğu gözlemlendi. Benign grupta ise 2 hastada (%6,3) boyanma görülmez iken, 14 hastada (%43,8) 'zayıf', 10 hastada (%31,3) 'orta' boyanma yoğunluğu saptandı (Tablo 10).

Doku VEGF-A boyanma yoğunluğuna göre gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p=0,002$). Gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında, metastazlı grubun doku VEGF-A yoğunluğu malign gruba göre anlamlı yüksek saptandı ($p=0,006$). Benign grupta doku VEGF-A yoğunluğu malign gruptan anlamlı yüksek saptandı ($p=0,002$). Benign grup ile metastazlı

grup arasında anlamlı fark bulunmadı. Güçlü boyanma sadece benign grupta görülmüş olup metastazlı ve malign grupta görülmemiştir. Benign grupta güçlü boyanma bu grubun %18,8'inde gözlemlendi (Tablo 10).

Tablo 9. Hasta gruplarında VEGF-A, ES, S100A4 doku ekspresyon durumlarının karşılaştırılması.

Hasta grupları	Doku VEGF-A Ekspresyonu				*
	Negatif		Pozitif		p
	Sayı	%	Sayı	%	
Metastazlı Grup (n=17)	5	29,4	12	70,6	0,903
Malign Grup (n=39)	11	28,2	28	71,8	
Benign Grup (n=32)	8	25,0	24	75,0	
Toplam (n=88)	24		64		
	Doku Endostatin Ekspresyonu				
	Negatif		Pozitif		
	Sayı	%	Sayı	%	0,647
Metastazlı Grup (n=17)	11	64,7	6	35,3	
Malign Grup (n=39)	20	51,3	19	48,7	
Benign Grup (n=32)	18	56,3	14	43,8	
Toplam (n=88)	49		39		
	Doku S100A4 Ekspresyonu				
	Negatif		Pozitif		
	Sayı	%	Sayı	%	0,582
Metastazlı Grup (n=17)	10	58,8	7	41,2	
Malign Grup (n=39)	18	46,2	21	53,8	
Benign Grup (n=32)	14	43,8	18	56,3	
Toplam (n=88)	42		46		

*Ki- Kare testi

Tablo 10. Hasta gruplarında doku VEGF-A boyanma yoğunluğu.

	Doku VEGF-A boyanma yoğunluğu					
	Metastazlı Grup		Malign Grup		Benign Grup	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Yok	-	-	5	12,8	2	6,3
Zayıf	9	52,9	28	71,8	14	43,8
Orta	8	47,1	6	15,4	10	31,3
Güçlü	-	-	-	-	6	18,8

4.4. SERUM ve DOKU PARAMETRELERİNİN KORELASYON SONUÇLARI

Serum VEGF-A, ES, S100A4 konsantrasyonları arasında anlamlı korelasyon saptanmadı. Doku ekspresyonları incelendiğinde sadece malign grupta her üç parametrenin birbiri ile korele olduğu gözlemlendi (Tablo 11).

Tablo 11. Malign grupta doku VEGF-A, ES, S100A4 ekspresyonları arasındaki korelasyon.

		VEGF-A	S100A4
VEGF-A	r	1,000	0,420
	p	-	0,008
ES	r	0,512	0,412
	p	0,001	0,009

Hasta gruplarında VEGF-A, ES, S100A4'ün serum düzeyleri ile doku ekspresyonlarının korelasyonları araştırıldı. Korelasyon araştırılırken her üç parametrenin boyanma yoğunluğu ve yaygınlığının toplam skoru esas alındı (Tablo 12).

Tablo 12. Hasta gruplarında VEGF-A, ES, S100A4, VEGF-A/ES'nin serum düzeyleri ile doku ekspresyonlarının korelasyonları (Spearman rho).

	Serum		Doku VEGF-A	Doku ES	Doku S100A4
	Metastazlı Grup (n=17)	VEGF-A	r	0,132	-0,126
p			0,614	0,631	0,453
ES		r	0,237	0,390	-0,452
		p	0,359	0,122	0,069
S100A4		r	-0,079	0,176	0,0
		p	0,763	0,500	1,000
VEGF-A/ES		r	0,01	-0,289	0,629
		p	0,996	0,261	0,007***
Malign Grup (n=39)	VEGF-A	r	-0,246	0,027	0,270
		p	0,132	0,869	0,097
	S100A4	r	-0,210	-0,141	0,071
		p	0,199	0,391	0,668
	ES	r	-0,360	-0,294	-0,078
		p	0,025**	0,069	0,638
	VEGF-A/ES	r	-0,210	0,006	-0,295
		p	0,199	0,72	0,068
Benign Grup (n=32)	VEGF-A	r	0,102	-0,055	0,212
		p	0,580	0,767	0,245
	S100A4	r	0,285	0,368	-0,174
		p	0,113	0,038*	0,341
	ES	r	0,154	0,104	-0,082
		p	0,401	0,571	0,656
	VEGF-A/ES	r	0,067	-0,049	0,012
		p	0,715	0,792	0,950

*** Metastazlı grupta serum VEGF-A/ES değerleri ile doku S100A4 ekspresyonu (toplam skoru) arasında iyi derecede, anlamlı pozitif korelasyon saptandı.

** Malign grupta serum endostatin düzeyleri ile doku VEGF-A ekspresyonu (toplam skoru) arasında zayıf-orta derecede, negatif korelasyon saptandı.

* Benign grupta serum S100A4 düzeyleri ile doku ES ekspresyonu (toplam skoru) arasında zayıf-orta derecede pozitif korelasyon saptandı.

4.5. YAŞ, MENAPOZ ve PATOLOJİK TANI İLE, ARAŞTIRILAN SERUM ve DOKU PARAMETRELERİNİN İLİŞKİSİ

Tüm hastalarda ve hasta gruplarında yaş ile serum VEGF-A, S100A4 düzeyleri ve VEGF-A/ES arasında korelasyon bulunmaz iken, tüm hastalarda serum ES düzeyleri arasında zayıf, anlamlı korelasyon saptandı ($r=0,227$; $p=0,033$). Metastazlı grupta ise yaş ile olan bu korelasyon artmıştır ($r=0,520$; $p=0,027$). Tüm hastalarda ve hasta gruplarında üç parametrenin yaş ile doku ekspresyonları arasında korelasyon saptanmadı.

Premenapozlu hastalarla postmenapozdaki hastaların VEGF-A, ES, S100A4'ün serum düzeyleri, doku ekspresyonları ve serum VEGF-A/ES arasında anlamlı fark saptanmadı.

Farklı patolojik tanılarda, VEGF-A, ES, S100A4'ün serum düzeyleri, doku ekspresyonları ve serum VEGF-A/ES'de anlamlı fark saptanmadı.

4.6. KLİNİKOHİSTOPATOLOJİK DEĞİŞKENLER ve ARAŞTIRILAN PARAMETRELER İLE İLİŞKİLERİ

Klinikohistopatolojik değişkenler olarak patolojik evre, tümör boyutu, ER, PR, c-erbB2 ekspresyonları, histolojik grade, mitoz ve nükleer derece, lenfovasküler invazyon, kan damarı invazyonu ve metastatik lenf nodu sayısı değerlendirildi.

4.6.1. Patolojik Evre

55 hastada patolojik evrelendirme yapıldı ve 29 hasta (%52,8) evre I, 14 hasta (%25,4) evre II, 11 hasta (2) evre III, 1 hasta (%1,8) evre IV olarak değerlendirildi (Tablo 13). Metastazlı ve malign grupta hastaların evrelere göre dağılımı aynı tabloda yer almaktadır. Malign grupta hastaların %78,4'ü evre I idi. Metastazlı hastalarda sadece bir hasta evre IV'te yer almakta idi.

Patolojik evre, erken evre (evre I-II) ve geç evre (evre III-IV) olarak kategorize edildiğinde, erken evrede bulunan hastaların serum VEGF-A düzeyleri ortancası 228,7 pg/mL, geç evrede bulunan hastaların VEGF-A düzeyleri ortancası 343,7 pg/mL saptandı.

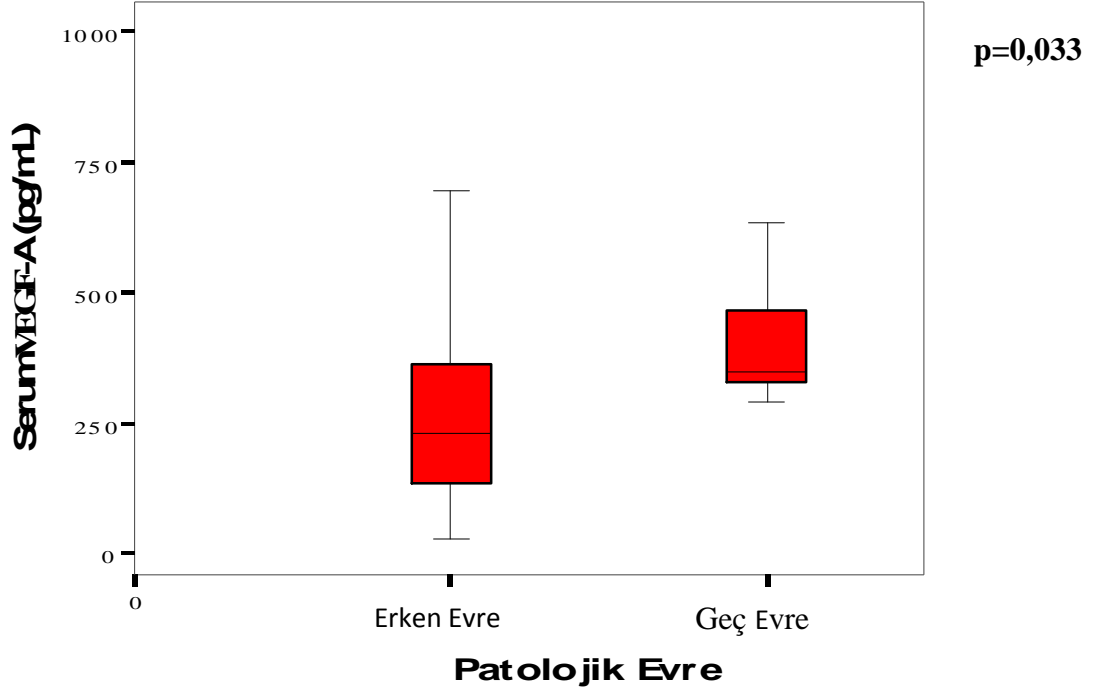
Geç evrede olan hastalarda serum VEGF-A düzeyleri erken evre hastalarına göre anlamlı yüksek idi ($p=0,033$) (Tablo 14) ve (Şekil 14). Hastaların erken veya geç evrede olmaları doku ekspresyonlarında anlamlı farklılık oluşturmadı.

Tablo 13. Hasta gruplarında farklı patolojik evrelerdeki hasta sayısı ve yüzdesi.

Evre	Gruplar					
	Metastazlı Grup		Malign grup		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Evre I	-	-	29	78,4	29	52,8
Evre II	7	38,9	7	18,9	14	25,4
Evre III	10	55,6	1	2,7	11	20,0
Evre IV	1	5,6	-	-	1	1,8

Tablo 14. Erken ve geç patolojik evrede serum VEGF-A düzeylerinin karşılaştırılması.

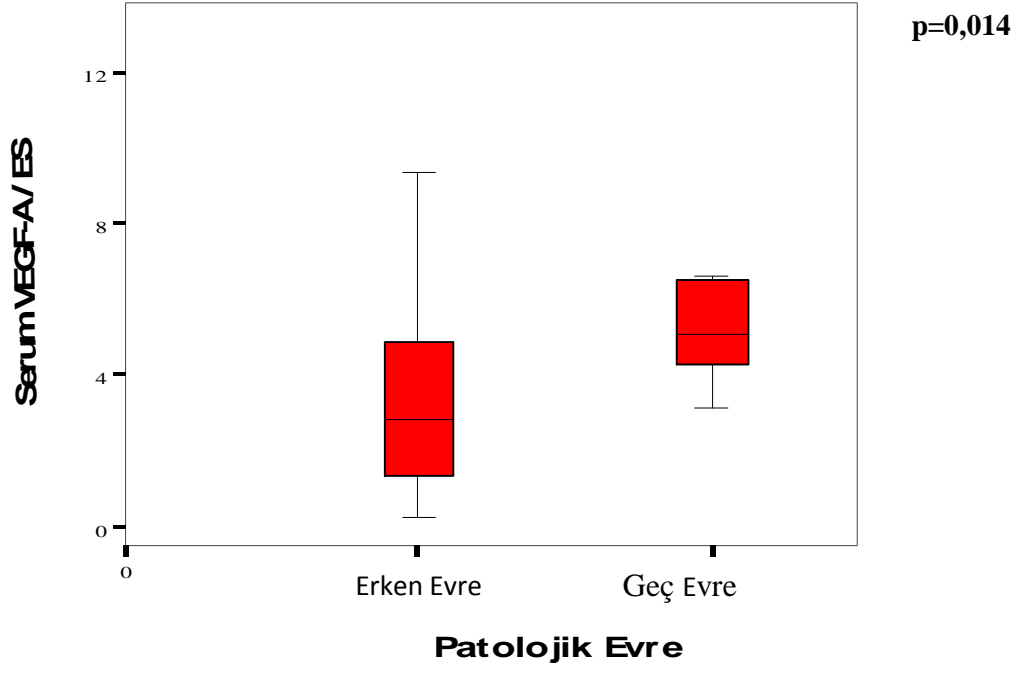
	Serum VEGF-A pg/mL (ortanca)	p
Erken Evre	228,7	0,033
Geç Evre	343,7	



Şekil 14. Erken ve geç patolojik evrede serum VEGF-A düzeylerinin karşılaştırılması.

Erken evrede bulunan hastaların serum VEGF-A/ES ortancası 2,81; geç evredeki hastaların serum VEGF-A/ES ortancası 5,07 olarak bulundu.

Geç evredeki hastaların serum VEGF-A/ES'leri erken evredeki hastalardan anlamlı yüksek bulundu ($p=0,014$) (Şekil 15). Ayrıca patolojik evre (I, II, III, IV) ile serum VEGF-A/ES arasında zayıf-orta derecede anlamlı, pozitif korelasyon saptandı ($r=0,329$; $p=0,014$).



Şekil 15. Serum VEGF-A/ES ile, kategorize edilmiş patolojik evre karşılaştırılması.

4.6.2. Tümör Boyutu

Tümör boyutu metastazlı ve malign grupta bulunan toplam 50 hastada değerlendirildi. Tümör boyutu olarak, çıkarılan tümör dokusunda en büyük çap dikkate alındı. Tümörler TNM sınıflamasına uygun olarak boyutları < 2 cm, 2-5 cm olmak üzere iki gruba ayrıldı. Tümör boyutu 5 cm'in üzerinde hasta yoktu.

Metastazlı ve malign grupta tümör boyutu değerlendirmeye alınan 50 hastanın 37'si (%74,0) < 2 cm, 13'ü (%26,0) 2-5 cm arasında bulunmakta idi (Tablo 15).

Tümör boyutunun <2 cm veya 2-5 cm arasında olması durumunda, VEGF-A, ES, S100A4'ün serum düzeylerinde, VEGF-A/ES'de ve doku ekspresyonlarında farklılık bulunmadı.

Tablo 15. Hasta gruplarında tümör boyutu.

Tümör Boyutu	Metastazlı Grup		Malign Grup		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
< 2cm	10	62,5	27	79,4	37	74,0
2-5 cm	6	37,5	7	20,6	13	26,0
Toplam (n=50)	16		34		50	100,0

4.6.3. Hasta Gruplarında ER, PR ve c-erbB2 Ekspresyonu

Östrojen ve progesteron reseptörlerinin doku ekspresyonu toplam 57 hastada değerlendirildi. Doku c-erbB2 ekspresyonu ise 50 hastada değerlendirildi. Benign meme hastalıklarında ER, PR ve c-erbB2 ekspresyonu değerlendirilmemektedir.

Hastaların %73,7'sinde ER (+), %59,6'sında PR (+), %14,0'ünde c-erbB2 (+) saptandı (Tablo 16).

Metastazlı ve malign grup karşılaştırıldığında, ER ve PR'nin ve c-erbB2'nin doku ekspresyonlarında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 16).

Ayrıca, ER ve PR'nin (+) veya (-) oluşu, serum VEGF-A, ES, S100A4 düzeylerini ve VEGF-A/ES'yi etkilememiştir. c-erbB2 ekspresyonunun (+) veya (-) oluşu ile VEGF-A, ES, S100A4, VEGF-A/ES'nin serum düzeylerinde ve doku ekspresyonlarında anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

Tablo 16. Hasta gruplarında ER, PR, c-erbB2 ekspresyonları.

	ER				p
	Negatif		Pozitif		
	Sayı	%	Sayı	%	
Metastazlı Grup	6	33,3	12	66,7	0,521*
Malign Grup	9	23,1	30	76,9	
Toplam (n=57)	15	26,3	42	73,7	
	PR				0,313
	Negatif		Pozitif		
	Sayı	%	Sayı	%	
Metastazlı Grup	9	50,0	9	50,0	
Malign Grup	14	35,9	35	64,1	
Toplam (n=57)	23	40,4	44	59,6	
	c-erbB2				0,692*
	Negatif		Pozitif		
	Sayı	%	Sayı	%	
Metastazlı Grup	15	83,3	3	16,6	
Malign Grup	28	87,5	4	12,5	
Toplam (n=50)	43	86,0	7	14,0	

* Fisher'in kesin testi sonucu

ER ve PR'nin c-erbB2 ile arasındaki tutarlılık incelendiğinde (ER, PR pozitifliği, c-erbB2 negatifliği) tutarlılık sırasıyla 0,38 ve 0,39 bulundu. Bu değer zayıf düzeyde uyumu göstermekte idi.

Tablo 17. c-erbB2, ER, PR ekspresyon durumlarının tutarlılığı.

		c-erbB2				Kappa
		Pozitif		Negatif		
		Sayı	%*	Sayı	%*	
ER	Negatif	5	10,0	8	16,0	0,38
	Pozitif	2	4,0	35	70,0	
PR	Negatif	7	14,0	13	26,0	0,39
	Pozitif	0	0,0	30	60,0	

*toplam yüzdesi

4.6.4. Hasta Gruplarında Histolojik Grade, Mitoz Derecesi, Nükleer Derece Durumları

Histolojik grade, 49 hastada değerlendirildi. 5 hasta (%10,2) grade 1, 11 hasta (%22,4) grade 2, 33 hasta (%64,5) grade 3 olarak sınıflandırıldı (Tablo 18).

Mitoz derecesi, 48 hastada değerlendirildi. 31 hasta (%64,6) 1. derece, 14 hasta (%29,2) 2.derece, 3 hasta (%6,3) 3.derece olarak sınıflandırıldı (Tablo 18).

Nükleer derece, 49 hastada değerlendirildi. Nükleer derece 2 olanlar 11 hasta (%22,4), nükleer derece 3 olanlar 38 hasta (%77,6) idi (Tablo 16).

Bu üç parametre benign hastalarda değerlendirilmemiştir.

Metastazlı ve malign grup, histolojik grade, mitoz derecesi ve nükleer derece açısından karşılaştırıldığında bu gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. Farklı histolojik grade'lerde, mitoz ve nükleer derecelerinde serum VEGF-A, ES, S100A4 düzeyleri, VEGF-A/ES ve doku ekspresyonları arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 18).

Tablo 18. Hasta gruplarında histolojik grade, mitoz derecesi, nükleer derece durumu.

Histolojik Grade					p
	Metastazlı Grup		Malign Grup		
	Sayı	%	Sayı	%	
Grade 1	2	11,1	3	9,7	0,651
Grade 2	3	16,7	8	25,8	
Grade 3	13	72,2	20	64,5	
Toplam (n=49)	18		31		
Mitoz derecesi	Metastazlı Grup		Malign Grup		0,742
	Sayı	%	Sayı	%	
	1.derece	11	61,1	20	
2.derece	6	33,3	8	26,7	
3.derece	1	5,6	2	6,7	
Toplam (n=48)	18		30		
Nükleer Derece	Metastazlı Grup		Malign Grup		0,464
	Sayı	%	Sayı	%	
	1	-	-	-	
2	3	16,7	8	25,8	
3	15	83,3	23	74,2	
Toplam (n=49)	18		31		

4.6.5. Hasta Gruplarında Lenfovasküler İnvazyon ve Kan Damarı İnvazyon Durumları

Lenfovasküler invazyon 57 hastada değerlendirildi. Benign meme hastalarında lenfovasküler invazyon ve kan damarı invazyonu değerlendirilmemektedir. Elliye yedi hastanın 35'inde (%61,4) lenfovasküler invazyon bulunmaz iken, 22 hastada (%38,6) lenfovasküler invazyon varlığı saptandı.

Metastazlı (aksiller lenf nodu (+) olan) 18 hastanın %55,6'sında (10 hasta) ve malign grupta (aksiller lenf nodu (-) olan) 39 hastanın sadece %30,8'inde (12 hasta) lenfovasküler invazyon gözlemlendi (Tablo 19).

Kan damarı invazyonu 57 hastada değerlendirildi. 53 hastada (%93,0) kan damarı invazyonu bulunmaz iken, 4 hastada (%7,0) kan damarı invazyonu vardı.

Metastazlı (aksiller lenf nodu (+) olan) 18 hastanın %88,9'unda (16 hasta) ve malign grupta (aksiller lenf nodu (-) olan) 39 hastanın %94,9'inde (37 hasta) kan damarı invazyonu bulunmamakta idi (Tablo 19).

Kan damarı invazyon durumuna bağlı olarak (metastaz olup olmadığına bakılmaksızın) VEGF-A, ES, S100A4'ün serum düzeylerinde, VEGF-A/ES'de ve doku ekspresyonlarında anlamlı fark saptanmadı.

Lenfovasküler invazyon ve kan damarı invazyonunun varlığı ya da yokluğu gruplar arasında anlamlı farklı bulunmadı.

Tablo 19. Hasta gruplarında lenfovasküler invazyon, kan damarı invazyonu durumu.

Lenfovasküler İnvazyon					p
	Metastazlı Grup		Malign Grup		
	Sayı	%	Sayı	%	
Yok	8	44,4	27	69,2	0,088
Var	10	55,6	12	30,8	
Toplam (n=57)	18		39		
Kan Damarı İnvazyonu					p
	Metastazlı Grup		Malign Grup		
	Sayı	%	Sayı	%	
Yok	16	88,9	37	94,9	0,584*
Var	2	11,1	2	5,1	
Toplam (n=57)	18		39		

* Fisher'in kesin testi sonucu

Metastaz olup olmadığına bakılmaksızın malign hastalarda, lenfovasküler invazyon varlığında serum VEGF-A düzeyleri ortancası 343,4 pg/mL, lenfovasküler invazyon yokluğunda serum VEGF-A düzeyleri ortancası 225,0 pg/mL olarak saptandı; yine aynı hastalarda doku VEGF-A (+) ekspresyonu (%52,4), lenfovasküler invazyon yokluğunda doku VEGF-A (+) ekspresyonu (%82,9) olarak bulundu (Tablo 20).

Lenfovasküler invazyon varlığında VEGF-A'nın serum düzeyleri anlamlı yüksek saptandı ($p=0,034$) (Tablo 20). Lenfovasküler invazyon yokluğunda doku VEGF-A ekspresyonu pozitifliği anlamlı yüksek bulundu ($p=0,015$) (Tablo 20).

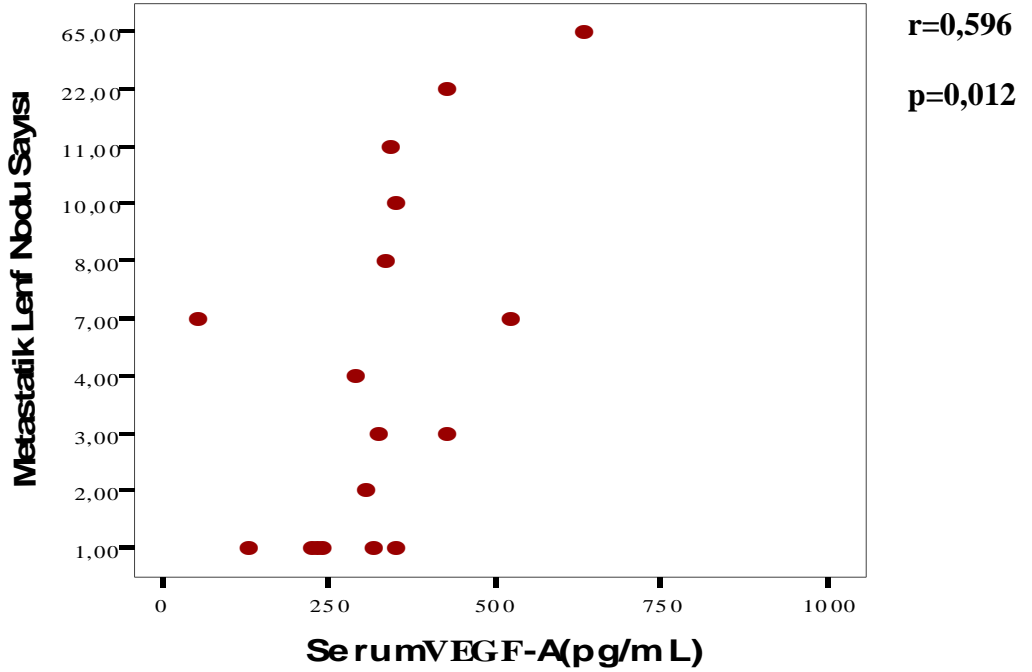
Tablo 20. Lenfovasküler invazyon ile serum VEGF-A düzeyleri ve doku VEGF-A ekspresyonlarının karşılaştırılması.

Lenfovasküler İnvazyon	Serum VEGF-A pg/mL (ortanca)	Doku VEGF-A Ekspresyonu (+) %
Yok	225,0	82,9
Var	343,4	52,4
p	0,034	0,015

4.6.6. Metastatik Lenf Nodu Sayısı

Metastatik lenf nodu (MLN) sayısı metastazlı gruptaki 17 hastada değerlendirmeye alındı. Bir hastada uzak metastaz nedeniyle metastatik lenf nodu sayısı değerlendirilmedi. Onyedisi hastada MLN sayısı 1 ile 65 arasında değişmekteydi. MLN sayısı 1-3 ve 4-9 ve >9 olmak üzere kategorize edildi.

Kategorize edilen gruplarda VEGF-A, ES, S100A4, VEGF-A/ES'nin serum düzeyleri ve doku ekspresyonları arasında fark saptanmadı. Ancak MLN sayısı ile serum VEGF-A düzeyleri arasında iyi derecede, anlamlı, pozitif korelasyon saptandı ($r=0,596$; $p=0,012$) (Şekil 16).

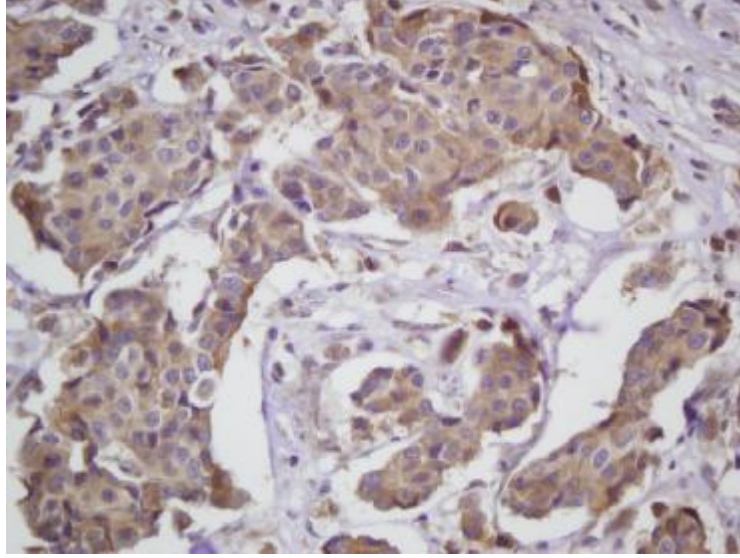


Şekil 16. Serum VEGF-A düzeyleri ve metastatik lenf nodu sayısı arasındaki korelasyon.

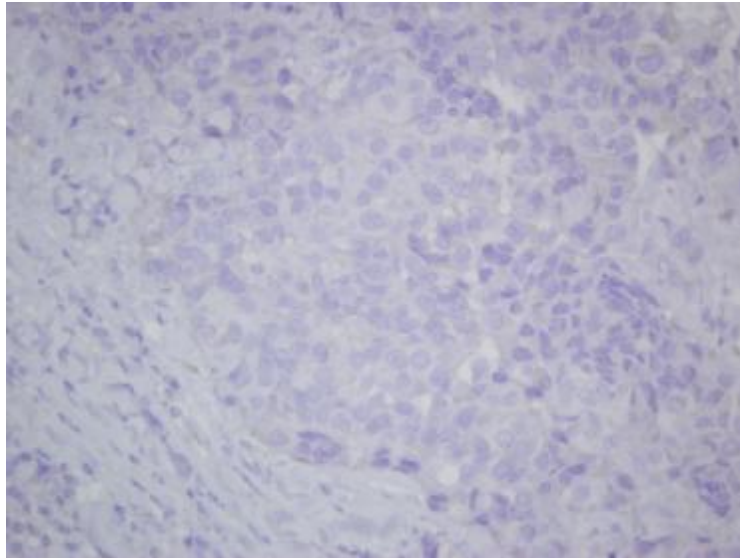
4.7. DOKUDA ARAŞTIRILAN PARAMETRELERE AİT İHK'SAL GÖRÜNTÜLER

4.7.1. Dokuda VEGF-A Ekspresyonu

VEGF-A'nın doku ekspresyonunun pozitif (Şekil 17) ve negatif (Şekil 18) olarak değerlendirildiği immunohistokimya preparatlarının mikroskopik görüntülerinden birer örnek aşağıda gösterilmiştir.



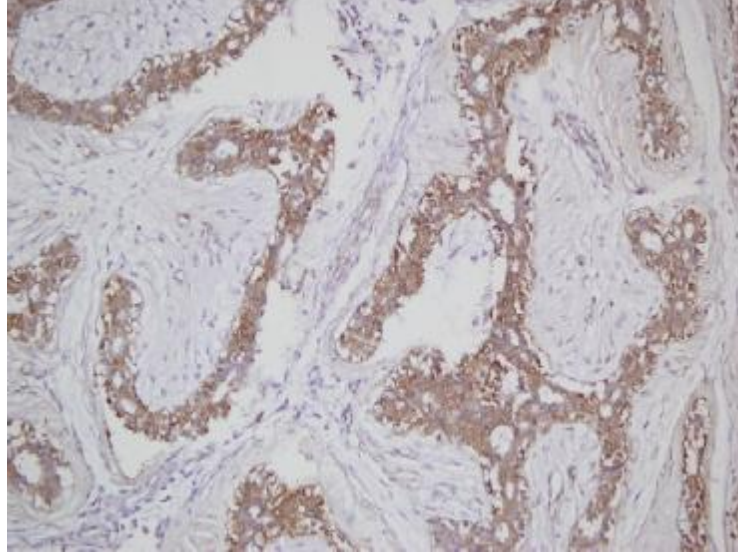
Şekil 17. VEGF-A ekspresyonu (x200 büyütme) (pozitif sonuç). (Boyanma yoğunluğu: orta şidette=2, boyanma yaygınlığı: %25-50=2; toplam skor: 2+2=4: pozitif). Biyopsi no: 6132/09



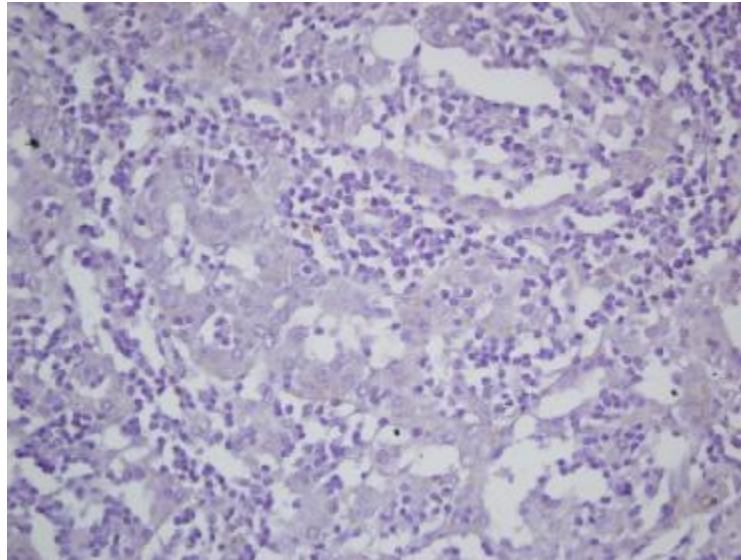
Şekil 18. VEGF-A ekspresyonu (x400 büyütme) (negatif sonuç). (Boyanma yoğunluğu: hiç boyanma yok=0, boyanma yaygınlığı: %0=0; toplam skor: 0+0=0: negatif). Biyopsi no: 35018/08

4.7.2. Dokuda Endostatin Ekspresyonu

Endostatinin doku ekspresyonunun pozitif (Şekil 19) ve negatif (Şekil 20) olarak değerlendirildiği immunohistokimya preparatlarının mikroskopik görüntülerinden birer örnek aşağıda gösterilmiştir.



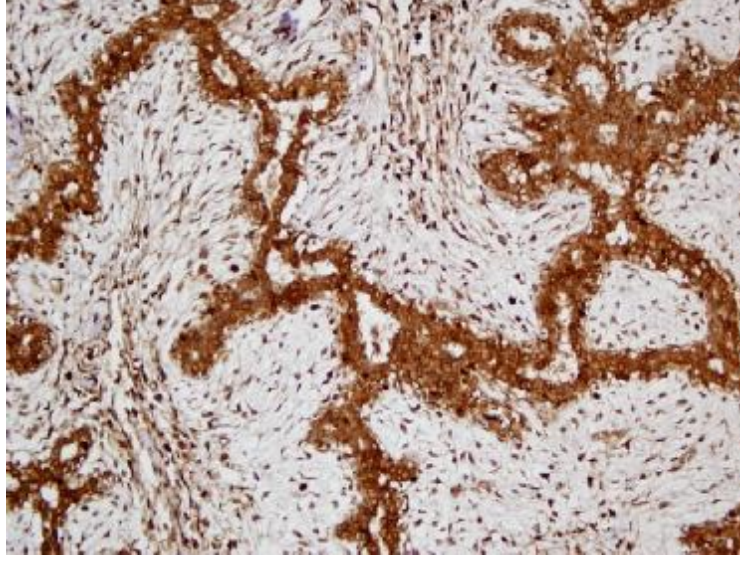
Şekil 19. Endostatin ekspresyonu (x200 büyütme) (pozitif sonuç). (Boyanma yoğunluğu: güçlü boyanma=3, boyanma yaygınlığı: %1-25=1; toplam skor: 3+1=4: pozitif). Biyopsi no: 16843/09



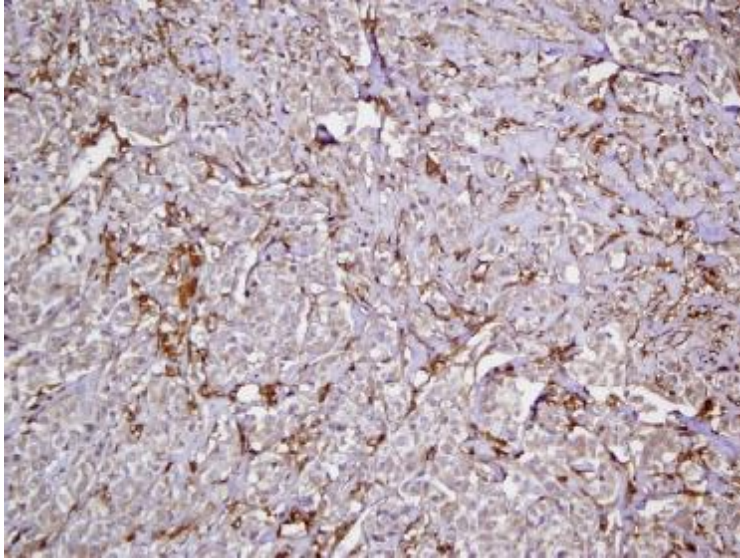
Şekil 20. Endostatin ekspresyonu (x400 büyütme) (negatif sonuç). (Boyanma yoğunluğu: hiç boyanma yok=0, boyanma yaygınlığı: %0=0; toplam skor: 0+0=0 negatif). Biyopsi no: 9573/09

4.7.3. Dokuda S100A4 Ekspresyonu

S100A4'ün doku ekspresyonunun pozitif (Şekil 21) ve negatif (Şekil 22) olarak değerlendirildiği immunohistokimya preparatlarının mikroskopik görüntülerinden birer örnek aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 21. S100A4 ekspresyonu (x200 büyütme) (pozitif sonuç). (Boyanma yoğunluğu: güçlü boyanma=3, boyanma yaygınlığı: %51-75=3; toplam skor: 3+3=6: pozitif). Biyopsi no: 16843/09



Şekil 22. S100A4 ekspresyonu (x200 büyütme) (negatif sonuç). (Boyanma yoğunluğu: hiç boyanma yok=0, boyanma yaygınlığı: %0=0; toplam skor: 0+0=0 negatif). Biyopsi no:2589/09

5. TARTIŞMA

Kadınlar arasında en sık görülen ve kansere bağlı ölümlerin ikinci sıradaki nedeni olan meme kanseri (23, 24) esas olarak postmenapozal dönemin bir hastalığıdır. Meme kanserinde yaş, cinsiyetten sonra en önemli risk faktörüdür. İncelemeler meme kanserli kadınların %77'sinin 50 yaşın üstünde olduğunu göstermiştir (109). Genç yaş meme kanserleri ile ileri yaş meme kanserleri arasında prognoz farklılığı açısından literatürde tam bir fikir birliği olmadığı belirtilmektedir (110). Ancak genç yaştaki hastalarda görülen meme kanserlerinin az diferansiye (grade III) karsinoma olduğu, oranlarının daha yüksek görüldüğü ve bu nedenle daha agresif seyrettiği bildirilmektedir (110, 111). **Çalışmamızda lenf nodu metastazı gösteren grubun yaş ortalamasının metastaz bulunmayan malign gruptan anlamlı düşük bulunması, her ne kadar hasta sayımız az olsa da, genç yaştaki hastalarda meme kanserinin daha agresif seyrettiğini desteklemektedir. Metastazlı grupta premenapozal hasta oranı da daha yüksek bulunmuştur. Bu durum ovarian steroidlerin (östrojenler ve progestinler) meme kanserindeki rolünü yansıtmaktadır.**

Anjiyogenez tümörün biyolojik davranışını belirleyen, premalign lezyonların karsinomaya ilerlemesi, tümör hücrelerinin dolaşıma geçmesi, mikrometastazların aşikar metastatik lezyonlara dönüşümünde gerekli olan bir süreçtir (11, 13, 112). Bir tümörün anjiyogenik aktivasyonunun anjiyogenezin pozitif ve negatif düzenleyicileri arasındaki net dengenin sonucu olduğu yaygın olarak kabul görmektedir (97, 113). Yapılan çalışmalarla tümör anjiyogenezini düzenleyen çok sayıda büyüme faktörü tanımlanmıştır. Tümör anjiyogenezinde kritik rolü olan en önemli anjiyogenik sitokin VEGF-A (VEGF olarak da adlandırılır) proteindir (39, 114). Kanser hücrelerinde VEGF-A ekspresyon miktarı çoğu tümör tipinde kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (115-121). Çalışmalarda VEGF-A, immunohistokimya, in situ hibridizasyon, kantitatif immunassay, Western Blotting, RT-PCR gibi farklı yöntemlerle değerlendirilmiştir (114). Bu çalışmalarda VEGF-A tümör boyutu, metastaz, sağkalım gibi bir ya da daha fazla prognostik parametre ile ilişkili bulunmuştur (7, 70, 122). Tümör dokusunda VEGF ekspresyonunun meme ve serviks karsinomları gibi bazı tümörlerde intratümöral mikrovasküler dansite (MVD) ile direkt ilişkili olduğu, tümör anjiyogenezinin ilerlemesine katkısı olduğu gösterilmiştir (97, 122). Metastazlı dokunun da primer kanser dokusu gibi VEGF-A'yı aşırı eksprese ettiği bildirilmiştir (114).

VEGF-A ekspresyonunun sadece invaziv kanser hücrelerinde değil aynı zamanda bazı kanserlerin premalign lezyonlarında da (meme, serviks ve kolon kanserlerinin prekürsör lezyonları) artış gösterdiği bildirilmektedir (123, 124). Yüksek vasküler dansiteli fibrokistik lezyonlar meme kanserinde artmış riskle ilişkili bulunmuştur (125). Dahası benign tümörlerdeki VEGF-A ekspresyonlarındaki artış malign sürece geçiş ile paralellik göstermektedir. Benign tümör ve VEGF-A ekspresyonu arasındaki ilişki benign lezyonlu hastalarda az çalışma yapılması nedeniyle yeterince ortaya konamamıştır (114). **Çalışmamızda benign meme hastaları grubunda doku VEGF-A ekspresyonları meme kanseri olanlarla benzer saptanmıştır.** Bu sonuç Boneberg ve arkadaşlarının sonuçlarına benzemektedir (126).

VEGF'nin prognostik değerinin nod (-), nod (-)/(+), radyoterapi alan ve almayan çeşitli hasta gruplarında araştırıldığı bazı çalışmalarda tümör sitozolik VEGF konsantrasyonunun prognostik değeri olduğu sonucuna varılmıştır (47, 69, 70, 127).

Gasparini ve ark. 260 lenf nodu (-) meme kanseri hastasında ölçülen sitozolik VEGF düzeylerinin tek başına bağımsız prognostik faktör olduğunu rapor etmişlerdir (69). Sitozolik VEGF düzeylerinin araştırıldığı diğer çalışmalardan biri bu sitokini sınırdan anlamlı prognostik faktör olarak bulurken diğeri bulamamıştır (69, 128). Ludovini ve De Paola'nın İHK'sal yöntemle doku VEGF ekspresyonunu değerlendirdikleri çalışmalarında VEGF prognostik faktör olarak uygun bulunmamıştır (128, 129). Fuckar ve ark. (130) İHK çalışmalarında meme kanseri biyopsi örneklerinde 222/233 (%95) VEGF pozitifliği saptamışlardır. Ancak ekspresyonda heterojeniteden söz edilmektedir. İki yüz yirmi iki hastanın 79'u (%35,5) güçlü pozitif olup homojen ekspresyon gözlenirken geri kalanlarda fokal boyanma gözlenmiştir. Bizim çalışmamıza benzer olarak VEGF ekspresyonu noninvaziv lezyonlarda da gözlenmiştir (130). Toi ve ark.'nın (131) çalışmasına benzer olarak, Ludovini ve ark. (128) primer meme kanseri vakalarında VEGF ekspresyonunu 64/228 (%28) oranında saptamışlardır. **Çalışmamızda ise VEGF-A ekspresyonu aksiller metastazlı grupta %70,6; metastazsız malign grupta %71,8; benign grupta %75,0 saptanmıştır. Hasta gruplarında VEGF-A ekspresyonları arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 10). Doku VEGF-A ekspresyonunun skorlamasında boyanma yoğunluğu ve boyanma yaygınlığından yararlanılmıştır. Sadece boyanma yoğunluğunu dikkate aldığımızda metastazlı grupta doku VEGF-A ekspresyonu metastazsız malign gruptan anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (p=0,006). Benign grupta da benzer bulgu saptanmıştır. Benign grupta**

VEGF-A boyanma yoğunluğu malign gruptan anlamlı yüksek bulunmuştur (p=0,002). Bilindiği gibi VEGF sadece tümör hücrelerinden değil aynı zamanda stromal hücrelerden de (makrofaj, fibroblast gibi) salgınmaktadır. Benign hastalardaki VEGF yüksekliği bu şekilde açıklanabilir. Bu durum doku VEGF ekspresyonunun hastalık için metastatik, metastazsız malign veya benign ayırımı yapmada bir yararı olamayacağına işaret etmektedir.

Anjiyogenik faktörlerin tümörlerde normal dokuya göre yüksek miktarda üretildiğini desteklemeyen çalışmalar da vardır. Boneberg ve ark. (126) 35 meme kanseri hastası ve 72 sağlıklı kontrolün dahil edildiği bir çalışmada dokuda çeşitli anjiyogenik faktörleri kantitatif RT-PCR ile incelemişlerdir. Primer kanser dokusu sonuçları komşu sağlıklı doku ile ve kanser olmayan sağlıklı kadınların meme dokusu ile karşılaştırılmıştır. RT-PCR ile yapılan bu kantitatif analiz sonuçları birçok çalışmanın aksine, meme tümörlerinde anjiyogenik faktörlerin artmış düzeyde olmadıklarını göstermiştir. Çalışmadaki bulgular, primer meme tümörlerinin anjiyogenik faktörlerin önemli bir kaynağı olmadığını göstermiştir (126). Aynı çalışmada kanserli dokuda çalışılan anjiyogenik faktörlerin mRNA ekspresyonları sağlıklı doku ile karşılaştırıldığında, VEGF-A haricindeki faktörlerin downregüle olduğu bulunmuştur. VEGF-A'nın da kanserli dokudaki mRNA ekspresyonları normal doku ekspresyonları ile benzer bulunmuştur (126). Greb ve ark. çalışmalarında benign ve malign meme hastası doku VEGF-A ekspresyonlarını benzer bulmuşlardır (132). Tümörün farklı bölgelerinde anjiyogenik aktivitenin heterojen olması, tümör dokusunda anjiyogenezin değerlendirilmesinde doğruluğu sınırlayabilmektedir. Örneğin VEGF ekspresyonunun tümör yakınında nekrotik bölgelerdeki hipoksik alanlarda en yüksek olduğu bilinmektedir. Bu yüzden VEGF ekspresyonunun değerlendirilmesinde, incelenen tümör dokusu bölgesi sonuçları etkileyebilir (61, 97). Bu faktörler anjiyogenik faktörlerin tümör ekspresyonlarını değerlendiren çalışmaların sonuçlarında farklılığa neden olmaktadır (61).

Tümör dokusunda ekspresyonları incelenen bu faktörlerin ölçümünde indirekt bir yol da damar içine salınan proteinlerin kantitasyonudur. Dolaşımda yer alan proteinlerin kanser hastalarında ölçümü hem pratik hem de non invaziv bir yöntemdir (133). VEGF-A düzeylerinin tümör homojenatından ziyade vücut sıvılarında ölçümünün daha uygun olabileceği bildirilmektedir. Tümör yükü artmış, yaygın metastazı olan hastalarda ELISA ve diğer yöntemlerle dolaşımdaki VEGF-A miktarının artışı doğrulanmıştır (114). Bu

çalışmalarda kanser hastalarında yüksek serum VEGF-A düzeyleri hastalık progresyonu, kemoterapiye kötü cevap, kötü sağkalım ile ilişkili bulunmuştur (105, 134, 135). Meme kanserli bir hastada serum VEGF-A düzeylerinin artışı tümörün büyümesi, rekürrensi, metastatik yayılımı işaret etmede klinik olarak yararlı olabileceği ancak minimal hastalığı olan kişilerde tarama aracı olarak serum VEGF-A ölçümünün yardımcı olamayacağı bildirilmektedir (114). Çeşitli kanser tiplerinde bu proteinlerin serum düzeylerinin artışına rağmen bunların klinik önemi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Meme kanseri hastalarında da serum seviyeleriyle ilgili sınırlı bilgi bulunmaktadır. Ogura ve ark. (136) serum VEGF'nin erken evre meme kanserinde rekürrens riskini öngördüğünü rapor etmişlerdir. Farklı olarak, Granato ve ark. (137) sağlıklı kadınlarda ve meme kanseri hastalarında saptanan serum VEGF düzeylerinin benzer olması nedeniyle meme kanserinde tanısal bir marker olarak yararlı olamayacağını bildirmişlerdir. Duranyıldız ve ark. (133) evre I-II 90 meme kanseri hastası, 75 sağlıklı kontrolle yaptıkları çalışmada, meme kanseri hastalarda serum VEGF seviyelerini sağlıklı kontrollere göre yüksek bulmuşlar, ancak istatistiksel anlamlılık bulamamışlardır. Bu araştırmacılar da Granato ve ark. gibi serum VEGF'nin erken evre meme kanserinde tanısal bir parametre olarak kullanılamayacağını bildirmişlerdir.

Salven ve ark. (66) benign meme tümörlü, lokalize ve metastatik meme kanseri hastalarında (105 hasta) serum VEGF düzeyi ortancalarını sırası ile 57, 104, 186 pg/mL saptamışlardır. Ayrıca serum VEGF düzeyleri lokalize duktal kanserlerde lobüler kanser ve benign meme tümörlü hastalara göre yüksek bulunmuştur. Metastatik meme kanseri olanlarda bu iki histolojik tip arasında anlamlı fark saptanmamıştır (66). Başka bir çalışmada benign lezyonlularda VEGF ortalaması 52,2 pg/mL, malign hastalarda 2136,3 pg/mL saptanmıştır (138). **Çalışmamızda üç grubun ortancaları arasında anlamlı fark bulunmuştur; benign grupta 193,5 pg/mL, metastazsız malign grupta 208,3 pg/mL, metastazlı malign grupta 331,2 pg/mL saptanmıştır. Metastazlı grubun serum VEGF-A düzeyleri benign gruptan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0,006). İnvaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinomlu hastalarda VEGF-A düzeyleri benzer saptanmıştır. Serum VEGF-A düzeylerinin aksiller metastazlı hastalarda benign hastalara göre artmış olması, ayrıca metastatik lenf nodu sayısı ile korele bulunması prognostik faktör olarak kullanılabileceğini, VEGF'nin metastatik süreçte rolü olabileceğini desteklemektedir.**

Tümör dokusu VEGF-A ekspresyonlarının (İHK) serum düzeyleri (ELISA) ile korelasyonunu araştıran farklı çalışmalarda korelasyon saptanmamıştır (105, 137, 139). **alışmamızda da doku VEGF-A ekspresyonları ve serum düzeyleri arasında korelasyon bulunmamıştır.**

VEGF plazmada da çalışılmıştır. Dolaşımdaki VEGF düzeylerinin şüpheli benign lezyonlarda cerrahi biopsi öncesi malignansiyi öngörmesinde kullanılıp kullanılmayacağını araştıran bir çalışmada, plazma VEGF konsantrasyonlarının meme kanserli (n=22) hastalarda benign lezyonu olanlardan (n=26) düşük olduğu saptanmıştır. Aynı alışmada İHK'sal olarak belirlenen VEGF ekspresyonlarının plazma VEGF düzeyleri ile korele olmadığı bulunmuştur. Dahası plazma VEGF konsantrasyonlarının hasta gruplarında örtüştüğu (overlapping) saptanmıştır. Sonuçta İHK'nin tümör hücrelerinin biyolojik özelliklerinin ve anjiyogenik kapasitesinin in situ analizinde plazmaya göre daha objektif bir metod olduğunu rapor etmişlerdir (140). Semikantitatif immunohistokimyasal boyama tekniğinin kullanılmasının araştırmacı bağımlı değişkenlikler yaratabileceği hatırd tutulmalıdır (61). Solid tümörlerdeki VEGF-A ekspresyonlarının kantitatif ölçümünde kullanılan tekniklerin henüz rutin hale gelmemesi nedeniyle sayıları sınırlıdır. Bu kantitatif çalışmalar yaygınlaştırıldığında VEGF-A ekspresyonunun hastaların klinik sonuçlarını öngörmede daha yararlı olabileceği bildirilmektedir (114).

Literatürde dolaşımda VEGF'nin ölçümünde hangi örneğin (serum, plazma, tam kan) kullanılması gerektiği konusu tartışmalıdır (61). Serum VEGF düzeylerinin çoğunun pıhtılaşma sırasında trombositlerden kaynaklandığı, plazma VEGF'nin serum düzeylerinden daha düşük olduğu gösterilmiştir (141, 142). Serum düzeylerinin sadece tümör orjinli VEGF-A'yı değil aynı zamanda kanın pıhtılaşması sırasında trombosit ve lökositlerden salınan VEGF-A'yı da yansıttığı için normal değer aralıklarını saptamanın oldukça güç olduğu bildirilmektedir (114). Bu nedenle bazı araştırmacılar dolaşımda VEGF ölçümünde serum yerine plazmanın kullanılmasını önermektedirler (114). Bununla birlikte çalışmaların büyük çoğunluğunda serum örneği kullanılmıştır ve tümör evresi ve sağkalımla arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (61). Kanser hastalarında VEGF düzeyleri ile trombosit sayıları arasında anlamlı korelasyon bulunmuştur ve trombositlerde VEGF'nin depolandığı, bu nedenle pıhtılaşma sırasında trombositlerden salınan VEGF'nin saptanabildiği serum ya da

tam kan örneklerinin plazma yerine kullanılmasının daha uygun olacağı ifade edilmektedir (114).

Anjiyogenezin regülasyonunda antianjiyogenik moleküller de yer almaktadır (97, 126). Boneberg ve ark.'nın (126) çalışmalarında antianjiyogenik faktörlerin meme kanserinde upregüle olduğu ve anjiyogenez düzenleyici faktörlerin mRNA ekspresyon profilinin tümör dokusu mikroçevresinde antianjiyogenez yönüne kaydığı ileri sürülmüştür. Önemli anjiyostatik moleküllerden biri olan ES, endotelial proliferasyonun ve anjiyogenezin spesifik, güçlü bir inhibitörüdür (143). Anjiyogenezin negatif düzenleyicilerinin, özellikle ES'nin, klinik önemi, kaynağı, salınım mekanizması net bilinmemektedir (143-145). Bir çalışmada dolaşımdaki endostatin seviyeleri primer meme kanserli hastalarda sağlıklı kontrollere göre yüksek (1.4 kat) bulunurken, benign meme hastalığı olanlardan farklı olmadığı bildirilmiştir (144). Zhao ve ark. (97) ise preoperatif meme kanseri hastalarında serum endostatin seviyelerini hem benign meme hastalığı olanlardan hem de sağlıklı kontrollerden anlamlı yüksek bulmuşlardır. İki çalışma arasındaki küçük farklılığın metodolojik ve histolojik çeşitlilikten kaynaklanabileceği rapor edilmiştir. **Çalışmamızda ise serum endostatin düzeyleri her üç grupta benzer bulunmuştur. Ayrıca, klinikopatolojik parametreler ile herhangi bir ilişki saptanmamıştır.** ES de VEGF gibi trombositler tarafından tutulur. Bu nedenle plazma ve serum konsantrasyon farklılıkları bulunmaktadır (80). Tümör dokusunda ES ekspresyonu farklı kanser tiplerinde çalışılmıştır (146, 147). Henüz tip XVIII kollajenden ayrılan ES fragmanına spesifik antikor olmaması nedeniyle İHK çalışmalarındaki doku boyanmasının ya ana molekül tip XVIII kollajene bağlı ES'den, ya da ayrılmış ES fragmanından ileri gelebildiği ifade edilmektedir (146). Birçok kanser için tipik boyanma paterni tümör stromasının diffüz boyanması şeklinde olmakta, ayrıca tümörün damarsal yapısı da boyanmaktadır. Normal dokularda ise bazal membranın ayrı boyanma paterni vardır. Büyük olasılıkla, diffüz boyanma bazal membran yıkım derecesi ile ilişkilidir ve bu nedenle tümör invazivliğinin göstergesi olabilir. Yüksek ES ekspresyonu tümör yükü artışı ve stromal yeniden düzenlenme ile ilişkili bulunmuştur (80). **Bu aşamada çalışmamızda ES için stromal değerlendirilme yapılmamıştır. Çalışmamızda doku ekspresyonları her üç grupta benzer bulunmuştur. ES doku ekspresyonları ile serum düzeyleri arasında korelasyon bulunmamıştır. Ayrıca, klinikopatolojik parametreler ile herhangi bir ilişki saptanmamıştır.**

Kuroi ve ark. (148) serum VEGF ve ES seviyelerinin preoperatif meme kanseri hastalarında korele olduğu ve yükseldiği, ancak tümörün çıkarılmasından sonra VEGF düzeylerinde azalma olurken ES seviyelerinde bir değişiklik olmadığını göstermişlerdir. İlginç olarak renal hücreli kanserde tümörün çıkarılmasından sonra serum VEGF ve ES düzeyleri anlamlı olarak yüksek kalırken, endometrial kanserde her ikisi de azalmıştır (64, 149). Hepatoselüler karsinomada tümörün çıkarılmasından sonra ise serum VEGF düzeylerinde değişiklik olmaz iken ES düzeylerinde azalma gözlenmiştir (150). Çalışmacılar VEGF ve ES serum düzeylerinin tümöre spesifik tarzda düzenlendiğini, her bir spesifik tümörün anjiyogenik dengesinin araştırılmasının operasyon sonrası prognozun öngörülmesi ve antianjiyogenik tedavinin yararı açısından önemli olabileceğini ileri sürmüşlerdir (97).

ES'nin ve dolaşımdaki anjiyogenez aktivatör/inhibitör oranlarının meme kanserinde klinik önemi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (13, 143, 144). Anjiyogenik denge olarak ifade edebileceğimiz VEGF/ES, meme kanseri dışında birkaç farklı çalışmada kullanılmıştır. Takeshita ve ark. koroner arter lezyonu (CAL) olan Kawasaki hastalarında anjiyogenik dengenin aktivatörler lehine değiştiğini ve yüksek VEGF/ES'nin bu hastalıkta vaskülitin şiddetini yansıtabileceğini bildirmişlerdir (151). Shaarawy ve ark. da VEGF/ES'yi ileri evre endometriyal karsinomada erken evreye göre daha yüksek bulmuşlardır. Anjiyogenezi uyaran ve önleyen moleküller arasındaki dengenin (VEGF/ES) tümörün ilerlemesinin değerlendirilmesinde ve metastazın kontrolünde yeni ve değerli bir gösterge olabileceğini ileri sürmüşlerdir (64). **Çalışmamızda tedavi öncesi varolan anjiyogenik denge 'VEGF-A/ES'nin' aksiller metastazlı grupta, metastazsız malign ve benign gruba göre anlamlı olarak yükselmesi bu durumu desteklemektedir. Metastazlı malign ve metastazsız malign grupta anjiyogenik denge anjiyogenezi uyaranlar lehinde saptanmıştır. Çalışmamızda VEGF-A/ES aynı zamanda geç evrede bulunan hastalarda erken evredekilere göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Tüm hastalarda ve üç ayrı hasta grubunda serum VEGF-A ve ES düzeyleri arasında korelasyon saptanmamıştır.**

Birçok çalışmada tek bir anjiyogenik faktör, genellikle VEGF-A seviyesi araştırılmıştır (66, 97). Ancak tümörlerin çeşitli proanjiyogenik faktörler üretebildiği bilinmektedir (152, 153). Bunların zamana bağlı rölatif olarak ekspresyonlarının değişebileceğinden bahsedilmektedir. Meme kanserinde anjiyogenik faktörlerin ekspresyonları tarandığında başlangıçta sadece VEGF-A ve asidik FGF eksprese olurken

sonrasında zamana bağılı evolusyon göstererek 6 farklı anjiyogenik faktörü eksprese ettiği bildirilmiştir (153, 154).

Tümör hücrelerinin yayılımını engellemek için anjiyogenez ve lenfanjiyogenezi hedef alan kanser tedavilerinin umut verici olabileceği bildirilmektedir. Antianjiyogenik tedaviler son yıllarda prelinik çalışmalardan klinik uygulamalara geçiş göstermiştir (155, 156). Ancak bunların klinik etkinliği zayıf düzeydedir. Antianjiyogenik tedavilerin tek başlarına kullanıldığında sitostatik cevaplarının sınırlı olduğu (~%10), bu yüzden neoplastik hücrelerin proliferasyonuna etkili kemoterapötiklerle kombine edilmesi gerektiği bildirilmektedir (39). Antianjiyogenik tedavilerin klinik başarısının kısıtlı olması ve tümörde anjiyogenik faktörlerin upregüle olduğuna dair çelişkili bulguların olması göz önüne alındığında, tümörlerin aktif anjiyogenezin görüldüğü yerler olduğu paradigmasının dikkatlice tekrar gözden geçirilmesi gerektiği bildirilmiştir (126). Yine bu çalışmacılar tümörlerde anjiyogenik faktörlerin ekspresyonlarının analizindeki verilerin çelişkili olmasında, kullanılan yöntemlerin (İHK, RNase protection assays, northern blotting, konvansiyonel RT-PCR) semikantitatif ve subjektif kriterlere dayanmasının önemli bir faktör olduğu öne sürmektedirler (126).

Meme kanseri anjiyogenez araştırmalarında anjiyogenik faktörlerin serum düzeyleri ve doku ekspresyonları yanısıra bunların yaş, menapozal durum, patolojik tanı ve evre, tümör boyutu, ER, PR, c-erbB2, histolojik grade, mitoz derecesi, nükleer derece, lenfovasküler invazyon ve kan damarı invazyonu, lenf nodu metastazı gibi çeşitli klinikohistopatolojik parametreler ile ilişkisi de araştırılmıştır.

Ludovini ve ark. (128) meme kanseri hastalarında yaş ile VEGF'nin doku ekspresyonunu; Zhao ve ark. (97) ise yaşla serum düzeylerini korele bulmamışlardır. Manders ve ark. (47) ise serum VEGF düzeylerini yaşla pozitif korele bulmuşlardır. De Paola ve ark. (129) yaptıkları çalışmada 242 lenf nodu negatif meme kanseri hastasını <60 yaş ve ≥60 yaş olarak ayırmışlar ve <60 yaş olanlarda doku VEGF ekspresyonunu anlamlı olarak yüksek saptamışlardır. **Çalışmamızda doku VEGF-A ekspresyonları ve serum VEGF-A düzeyleri ile yaş arasında korelasyon saptanmamıştır.**

Çalışmalarda VEGF düzeyleri ile menapozal durum arasında farklı sonuçlar bulunmuştur. Greb ve ark. (132) çalışmalarında nonneoplastik meme dokusunda VEGF ekspresyonlarını premenapozal kadınlarda postmenapozal kadınlara göre yüksek bulmuşlardır.

Bu durum östrojen ve progesteronun VEGF düzenlenmesinde yer aldığı hipotezini desteklemektedir. Kanserli dokuda ise menapozal durumun VEGF-A ekspresyonu üzerine etkisinin olmadığı, dolayısıyla VEGF'nin hormonal düzenlenmesinin meme kanserli kadınlarda kaybolduğu ifade edilmiştir. Endojen ya da terapötik verilen hormonal steroidlerin memede anjiyogenik fenotipte değişikliklere neden olabileceği bildirilmiştir (132). İki ayrı çalışmada VEGF ekspresyonunun meme kanserli premenapozal hastalarda anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir (130, 132). Bu verilerin aksine Nishimura ve ark. (157) çalışmalarında menapoz ile yüksek plazma VEGF düzeyleri ve VEGF/Flk-1 reseptörü arasında ilişki bulmuşlardır. **Çalışmamızda menapozal durumun serum VEGF-A düzeylerini ve doku ekspresyonlarını etkilemediği saptanmıştır.**

Bazı araştırmacılar tümörün histolojik ve nükleer grade'i ile serum VEGF düzeyleri (97, 158) ve doku VEGF ekspresyonları (126, 130) arasında korelasyon bulamaz iken (97, 130, 158), Adams ve ark. serum VEGF düzeylerini histolojik grade'in artışı ile negatif korele bulmuşlardır (138). Shivakumar ve ark.'nın (138) çalışmalarında ise serum VEGF düzeyleri histolojik grade ile pozitif korele saptanmıştır. **Çalışmamızda histolojik ve nükleer grade ile doku VEGF-A ekspresyonları ve serum düzeyleri arasında korelasyon saptanmamıştır.**

Bir grup araştırmacı tümör evresi ve lenf tutulumu ile serum VEGF düzeyleri (97, 158) ve tümör dokusu VEGF ekspresyonu (126) arasında korelasyonu araştırmışlar ancak korelasyon bulamamışlardır. Callagy ve ark. da (159) tümör evresi ile hem serum VEGF düzeyleri hem de tümör VEGF ekspresyonu arasında korelasyon saptayamamıştır. Shivakumar ve ark. (138) çalışmalarında tümör evresi ve lenf nodu tutulumu ile serum VEGF düzeyleri arasında korelasyon saptamışlardır. **Çalışmamızda serum VEGF-A düzeyleri tümör evresi ile ilişkili bulunmuştur. İleri evre hastalarda ve lenf nodu metastazlı hastalarda hem serum VEGF-A, hem de VEGF-A/ES yüksek bulunmuştur (p=0,033; p=0,014). Bu sonuçlar serum VEGF-A ve VEGF-A/ES'nin hastalık progresyonu ile ilişkili olduğunu desteklemektedir. Öte yandan doku VEGF-A ekspresyonlarının lenf nodu tutulumu ve tümör evresi ile ilişkisi bulunmamıştır.**

İki ayrı çalışmada (126, 137) doku VEGF ekspresyon artışı ile tümör boyutu arasında ilişki araştırılmış, ancak bir ilişki saptanmamıştır. Manders ve ark. (47) çalışmalarında sitozolik VEGF düzeylerini tümör boyutu ile pozitif korele bulmuşlardır. **Çalışmamızda VEGF-A'nın (ne dokuda ne de serumda) tümör boyutu ile korelasyonu bulunmamıştır.**

Granato ve ark. (137) çalışmalarında doku VEGF ekspresyonunu duktal meme kanserinde, diğer histolojik tip tümörlerden anlamlı yüksek bulurken, serum VEGF düzeylerini Zhao ve ark.'ın (97) çalışmalarıyla uyumlu olarak, tüm histolojik tiplerde benzer bulmuşlardır. Salven ve ark. (66) ise serum VEGF düzeylerini lokalize meme duktal kanserlerde hem lobuler kanserlerden hem de benign tümörlerden anlamlı yüksek saptamışlardır. **Çalışmamızda serum VEGF-A düzeyleri ve doku ekspresyonları ile tümörün farklı histolojik tiplerinde anlamlı farklılık saptanmamıştır.**

Meme kanserlerinde %20-25 oranında overeksprese olan c-erbB2, VEGF upregülasyonu ile ilişkili bulunmuştur (160). Meme kanseri olan 611 kadının tümör dokularının incelenmesi sonucunda, c-erbB2 overeksprese tümörlerin (611 hastanın 114'ü) c-erbB2 overeksprese olmayan tümörlere göre daha fazla VEGF proteini eksprese ettiği gösterilmiş ve c-erbB2 ve VEGF overekspresyonu birlikteliğinin tümörlerin agresif fenotipine katkıda bulunabileceği rapor edilmiştir (160, 161). Fuckar ve ark. (130) c-erbB2 ve VEGF ekspresyonunun anlamlı pozitif korelasyonunu sadece postmenapozal hastalarda göstermişlerdir. Araştırmacılar c-erbB-2 ekspresyonunu ER ve PR ile ters orantılı bulmuşlardır (130, 162). **Çalışmamızda c-erbB2 ekspresyonunun pozitifliği ile ER ve PR negatifliğinin uyumu düşük düzeyde bulunmuştur (Tablo 17). Çalışmamızda c-erbB2 ekspresyonunun serum ve dokuda çalışılan VEGF, ES, S100A4 parametreleri ile korelasyonu bulunmamıştır.**

ER ve anjiyogenik faktörlerle ilgili literatür bilgisi çelişkilidir (130). Deneysel çalışmaların bir kısmında meme kanseri hücre hattında ER overekspresyonunun VEGF down regülasyonuna neden olduğu bildirilirken diğerlerinde ise ER'lerin VEGF ekspresyonunu indüklediği bildirilmiştir (163, 164). Takei ve ark.'nın in vitro çalışmalarında antiöstrojenlerin anjiyogenezi inhibe edebileceği gösterilmiştir (130). Klinik çalışmalarda da bilgiler çelişmektedir. İki çalışmada doku VEGF ekspresyonları ve ER durumu arasında ters bir ilişki bulunmuştur. Yani, doku VEGF pozitif tümör hücreleri ER(-) tümörlerde yüksek oranda saptanmıştır (165, 166). Bu sonuç daha önceden de belirtildiği gibi, anjiyogenezin meme kanserinde hormona bağımlı olmadığını düşündürmektedir (130). Buna karşın serum VEGF düzeylerini ER durumu ile ilişkili bulan araştırmacılar da vardır (105, 158). Araştırmacılar, bir tümörün genetik durumunun östrojenin VEGF ekspresyonunu stimüle edip etmeyeceğinin belirleyicisi olabileceğini öne sürmüşlerdir (128, 158). PR durumu ile çalışmalarda

korelasyon saptanmamıştır (69, 130). **Bizim çalışmamızda ER veya PR'nin durumu serum VEGF düzeylerini ve doku ekspresyonlarını etkilememiştir. Sonuçlar, kullanılan örneklerin ve yöntemlerin (semikantitatif ve kantitatif) farklılığı göz önüne alınarak yorumlanmalıdır.**

Tümörler anjiyogenezi uyarması yanında yeni lenfatik damarların oluşumu, yani lenfanjiyogenezi de uymaktadır. Lenfanjiyogenez başlıca VEGF-C, VEGF-D tarafından ve ayrıca VEGF-A ile de uyarılmaktadır (114, 167, 168). Meme kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada serum VEGF-C düzeyleri hastaların %77'sinde artış gösterirken VEGF-A sadece 4 hastada yüksek bulunmuştur (169). Kamal ve ark.'nın (158) çalışmalarında ise serum VEGF düzeyleri ile lenfovasküler yayılım (permeation) arasında ilişki saptanmamıştır. **Çalışmamızda serum VEGF-A meme kanseri hastalarında (metastatik+metastazsız malign grup) lenfovasküler invazyonu olanlarda olmayanlardan anlamlı yüksek çıkmıştır. Serum VEGF-A damar invazyonu olanlarda, olmayanlardan anlamlı farklı bulunmamıştır. Aksiller metastazlı grupta 18 hastanın 10'unda lenfovasküler invazyon gözlenirken kan damarı invazyonu sadece ikisinde görülmüştür. Bütün bunlar dikkate alındığında çalışılan hasta grubunda meme kanserinin kan damarı yolundan ziyade lenfatik yolla yayılım gösterdiğini ve VEGF-A'nın lenfanjiyogenezi uyardığını düşünmekteyiz. Bu nedenle lenfanjiyogenezin uyarılmasından sorumlu diğer moleküllerin (VEGF-C, VEGF-D ve reseptörleri VEGFR-3) çalışılması bu konuya netlik kazandıracaktır. Literatürde iki ayrı çalışmada, bizim sonuçlarımıza benzer şekilde, serum VEGF düzeyleri vasküler invazyonla ilişkili bulunmamıştır (130, 158).**

Çalışmamızda doku ES ekspresyonu ve serum düzeyleri ile menapozal durum, patolojik tanı ve evre, tümör boyutu, ER, PR, c-erbB2, histolojik grade, mitoz derecesi, nükleer derece, lenfovasküler invazyon, kan damarı invazyonu, lenf nodu tutulumu arasında ilişki araştırılmış ancak bulunamamıştır. Sadece metastazlı grupta serum ES düzeyleri ile yaş arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (r=0,520; p=0,027). Zhao ve ark. (97) tanı anında yaş ile serum ES düzeyleri arasında ilişki bulamamışlardır.

Çalışmamızda serum düzeyleri ve doku ekspresyonları saptanan, diğer anjiyogenik moleküllerle ilişkisi araştırılan ve klinikohistopatolojik parametrelerle karşılaştırdığımız bir diğer parametre olan S100A4, S100 kalsiyum bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir ve metastazla ilişkili bir protein olarak kabul görmektedir. S100A4 proteininin fonksiyonu ve

tümör metastazındaki rolü net olarak bilinmemektedir (170). Ebralidze ve ark. (171) ilk olarak çeşitli hücre hatlarında metastatik potansiyel ile S100A4 mRNA ekspresyon düzeyleri arasında uyum olduğunu göstermişlerdir. Daha sonraki çalışmalarda insan veya rat S100A4 DNA'sının metastatik olmayan meme tümör hücrelerine transfeksiyonu sonucu hücrelerin metastatik fenotipini arttırdığı, buna karşın metastatik hücrelerde S100A4 inhibisyonunun daha az metastatik fenotipe yol açtığı bildirilmiştir (172). S100A4'ün kendisinin tümörojenik olmadığı, belirli bir tümörojenik zeminde metastazı arttırıcı potansiyeli olduğu ileri sürülmüştür (21). İlk kez erken evre meme kanseri hastalarında yapılan iki çalışma ile S100A4'ün prognostik markır olabileceği destek bulunmuştur. Platt-Higgins ve ark. (172) 349 opere edilebilir evre I-II meme kanseri hastasında İHK yöntem ile S100A4 ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. Malign hücrelerin S100A4 antikoruna ile boyanma yaygınlığı eşik değeri %1 olarak alındığında hastaların %56'sı S100A4 (+), %44'ü S100A4 (-) saptanmıştır. S100A4(+) boyanma ile hasta ölümü arasında oldukça anlamlı ilişki bulunmuştur ($p < 0,0001$). Rudland ve ark.'nın (104) çalışmasında, invaziv ancak opere edilebilir evre I-II meme kanseri hastalarının tümör dokularında S100A4 ekspresyonu göz önüne alınıp hastalar sınıflandırılmış ve 19 yıllık izlem sonucu sağkalım analizi yapılmıştır. Bu çalışmada hastaların %80'i S100A4 negatif, %11'i S100A4 pozitif olarak saptanmıştır. Bu iki grup arasında sağkalım analizinde anlamlı fark elde edilmiştir. Medyan sağkalım S100A4 negatif grupta >228 ay olmasına karşın S100A4 pozitif grupta 47 ay olarak saptanmıştır. Aynı grubun takip eden çalışmalarında erken evre meme kanserli hastalarda S100A4'ün metastaz ve mortalitenin güçlü bir prediktörü olduğu doğrulanmıştır (21, 98). Lee ve ark.'nın (173) yaptığı çalışmada S100A4 pozitif erken evre meme tümörlü hastalarda sağkalımın S100A4 negatif tümörlü hastalara göre 10 yıl daha kötü olduğu bildirilmiştir.

Bu verilerin aksine Pedersen ve ark. (174) S100A4 ekspresyonu ile hasta akıbeti arasında bir korelasyon bulamamışlardır. Pedersen ve ark. çalışmalarında 62 meme kanserli evre I-IV hastasında S100A4 ekspresyonu ile histolojik grade ve östrojen reseptör yokluğu arasında anlamlı korelasyon bulurken uzak metastaz ve hasta sağkalımı ile korelasyon bulamamışlardır. Rudland ve ark.'nın (104) çalışması ile çelişen bu sonuçların örnek sayısının azlığı, ileri evrelerdeki hastaların da dahil edilmesi, kısa izlem süresi, örnek saklama ve fiksasyon metodlarının farklılıklarından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (21). S100A4, meme kanseri dışındaki kanserlerde de çalışılmış olup, kolorektal, safra kesesi, mesane, özafagus, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mide kanseri, medülloblastom, pankreatik

ve hepatoselüler kanserlerde S100A4 protein ekspresyonundaki artış kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (99, 104, 175-177). **Çalışmamızda ise doku S100A4 protein ekspresyonu metastazlı grup (LN (+)), metastazsız malign grup (LN(-)) ve benign grupta anlamlı fark göstermemiştir. Ayrıca doku ekspresyonları ile serum S100A4 düzeyleri arasında korelasyon saptanmamıştır. Öte yandan, metastazlı grupta serum VEGF-A/ES ile doku S100A4 protein ekspresyonu arasında iyi derecede, pozitif korelasyon saptanmıştır (r=0,629; p=0.007). Bu durum, metastazlı grupta varolan anjiyogenik denge ile yine anjiyogenik fonksiyonu olduğu düşünülen S100A4 proteininin uyumlu olduğunu göstermektedir.** Bu bulgumuz Ambartsumian ve ark.'nın (101) S100A4'ün tümör progresyonunu anjiyogenezi uyararak indüklediği görüşleri doğrultusundadır.

S100A4 proteininin overekspresyonu lenf nodu metastazı gibi tümör agresifliğinin birçok fonksiyonuyla yakın ilişkili bulunmuştur (170, 178). Meme, kolorektal, akciğer, tiroid kanseri gibi çeşitli kanserlerde S100A4 ekspresyonunun lenf nodu metastazı ile anlamlı korelasyonu saptanmıştır (104, 179-181). Merzak ve ark. (182) S100A4 ekspresyonu ile in vitro glioma hücrelerinin invazivliğinin korele olduğunu rapor etmişlerdir. Ismail ve ark.'nın (170) S100A4 protein ekspresyonunu inceledikleri çalışmalarında, lenf bezi tutulumu olmayan invaziv duktal karsinom ve invaziv lobuler karsinomlu hastaların ekspresyon düzeyleri benzer bulunmuştur (sırasıyla %45,1 ve %48,8). Normal meme dokusunda ise S100A4 boyanmasının olmadığını bildirmişlerdir. Lenf nodu (+) invaziv duktal karsinom hastalarının S100A4 ekspresyonu primer kanser dokusunda %13,5 iken, eşlenik metastatik lenf nodunda %35,1 saptanmıştır. **Çalışmamızda S100A4 ekspresyonu metastazlı grupta %41,2; malign grupta %53,8; benign grupta %56,3 saptanmıştır. Gruplarda S100A4 ekspresyonunda anlamlı farklılık yoktur. S100A4'ün metastazı artırıcı potansiyelinin olduğu, tümör agresifliğinin birçok fonksiyonu ile ilişkili bulunması, lenf nodu metastazı ile korelasyonu olduğunun bildirilmesi nedenleri ile, S100A4 ekspresyonunun pozitif saptandığı benign gruptaki hastalarımızın maligniteye dönüşüm açısından ve malign grup hastalarımızın da metastaz gelişimi yönünden yakın izlenmeleri gerektiğini düşünmekteyiz.**

Ai ve ark.'nın (183) pankreatik kanserde İHK'sal yöntem ile S100A4 ve VEGF ekspresyonlarını birlikte değerlendiren çalışmalarında 38/62 (%61,3) S100A4(+), 37/62 (%59,7) VEGF(+) ekspresyonu saptamışlardır. S100A4 ve VEGF ekspresyonları korele

bulunmuştur. Aynı araştırmacılarının çalışmalarında S100A4 overekspresyonu tümör büyüklüğü, ileri TNM evresi ve kötü prognozla korele bulunmuştur. Bu bulgular, S100A4 overekspresyonunun hücre motilitesini ve invazivliğini artırmış olabileceğini düşündürmektedir. **Çalışmamızda doku ekspresyonları hasta gruplarında karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Ancak gruplar ayrı ayrı incelendiğinde sadece malign grupta her üç parametrenin doku ekspresyonunun birbiri ile korele olduğu bulunmuştur (Tablo 11). Bu birliktelik malign süreçte anjiyogenik dönüşümünün varlığını yansıtır olabilir.**

Mazzucchelli ve ark. (99) S100A4 boyanması ile lenf nodu metastazı varlığı ve c-erbB2 pozitifliği arasında zayıf, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Buna karşın S100A4 protein ekspresyonu ile tümör boyutu, histolojik grade, menapozal durum, hormon reseptör boyanması gibi değişkenler arasında net bir ilişki bulunmamıştır.

El-Abd ve ark. (184) 15 sağlıklı kontrol, 15 benign meme hastası ve 20 meme karsinomu hastasından oluşan üç grupta RT-PCR yöntemi ile serumda S100A4 mRNA varlığının muhtemel bir non-invaziv tarama markırı olup olamayacağını araştırmışlardır. Serum S100A4 mRNA varlığının meme kanseri hastalarında yüksek duyarlılık (%85) ve özgüllükte (%100) bir belirleyici olduğu saptanmıştır. Az sayıda lenf nodu bulunanlar ile (1-9), çok sayıda lenf nodu bulunanlar (>10) arasında serum S100A4 mRNA pozitifliği anlamlı farklı bulunmuştur (p=0.05). Aynı zamanda yüksek serum S100A4 mRNA ekspresyonu olan hastaların düşük olanlara göre 6 kat daha kötü prognoza sahip olduğu görülmüştür (184). Yine bu çalışmada sağlıklı bireylerde S100A4 ekspresyonu saptanmamıştır. Benign lezyonlu grupta saptanma oranı %13,3 iken meme karsinomalı grupta %85 bulunmuştur. El-Abd ve ark. (184) rastgele seçilen 9 meme tümörlü hastaya ait kanserli doku örneklerinde S100A4 mRNA ekspresyonunu araştırmışlar ve serum S100A4 mRNA düzeyleri ile karşılaştırıp uyumlu olduğunu görerek serum S100A4 mRNA düzeylerinin hiperplastik aktivitenin gözleminde ve/veya yeni non-invaziv bir yaklaşım olarak kanser taramasında kullanılabileceğini bildirmişlerdir. **Çalışmamızda önceden belirtildiği gibi, S100A4 proteininin doku ekspresyonları ve ELISA ile çalışılan serum düzeyleri arasında korelasyon saptanmamıştır.** Meme tümöründe S100A4 proteininin tümör hücreleri yanı sıra, makrofaj, fibroblast, aktive lenfositlerden de salınabildiği ve tümör mikroçevresinde bulunduğu

gösterilmiştir (185). Spesifik ELISA yöntemi ile yapılan bu çalışmada tümör interstisyel sıvısında S100A4 ekspresyonunun eşlenik doku normal interstisyel sıvısına göre oldukça yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0,0008$). S100A4 protein ekspresyonunun kontrol bireylerinde yokluğu nedeniyle hastalıklı ve sağlıklıyı ayırmada özel bir rolünün olduğu ileri sürülmüştür (185). **Literatür tarandığında insanda serum S100A4 düzeylerinin ELISA yöntemi ile çalışıldığı bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda serumda ölçülen S100A4 düzeyleri metastazlı grup (LN (+)), metastazsız malign grup (LN(-)) ve benign grupta anlamlı fark göstermemiştir. Serum S100A4 düzeyleri ve doku ekspresyonları ile, değerlendirilen klinikohistopatolojik parametreler arasında da korelasyon bulunmamıştır.**

İmmunohistokimyasal çalışmalarda immunoreaktivitenin değerlendirilmesinde farklı kriterler kullanılmıştır. Ai ve ark.'nın (183) çalışmasında bizim çalışmamıza benzer şekilde S100A4 için boyanma yaygınlığı (0:<%5; 1:%5-25; 2:%26-50; 3:%51-75; 4:>%76) ve yoğunluğu (1:hafif; 2:orta; 3:güçlü boyanma) değerlendirilmiştir. Bu iki skorun çarpımı ≥ 2 ise pozitif kabul edilmiştir. Bir başka çalışmada S100A4'ün boyanma yaygınlığı >%5 ise pozitif kabul edilirken, diğerinde eşik değer %1 olarak alınmıştır (104, 170). VEGF boyanma yaygınlığı bir çalışmada >%10 pozitif değerlendirilirken, Fuckar ve ark.'nın (130) çalışmalarında VEGF pozitifliği 0, <%25, %25-75, >%75 ve %25 altında ve üstünde pozitif hücreler olmak üzere iki kategorizasyon yapılmıştır. **Çalışmamızda VEGF, ES, S100A4 proteinleri için tek bir değerlendirme kriteri kullanılmıştır (bakınız sayfa 49).**

Çalışmanın Kısıtlılıkları ve Öneriler;

Çalışmaya dahil edilen hasta sayısı toplamda yeterli olsa da olguların dağılımındaki heterojenite ve bazı hastalarda histopatolojik verilerin elde edilememiş olmasının sonuçlarımızı etkilemiş olabileceğini düşünmekteyiz. Anjiyogenezle ilişkili İHK'sal çalışmalarda rapor edilen çelişkili sonuçların, değerlendirme kriterlerinin standardize edilememiş olmasından ve değerlendirmedeki subjektiviteden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle doku ekspresyonları ile serum düzeyleri arasında ilişki bulamamış olabiliriz. Bu konuda standardizasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Skor belirlenmesinde konsensus sağlanıp yapılacak çalışmaların buna göre değerlendirilmesi daha uygun olabilir. Bu alanda daha geniş ve homojen hasta gruplarında standart ve uygun metodoloji ile yapılacak multidisipliner, ileriye yönelik

çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmanın kısıtlılıklarından biri de dahil edilen meme kanseri hastalarının tümör boyutunun küçük olması ve tüm evrelerde aynı sayıda hasta bulunmamasıdır. Aksiller metastazlı grupta farklı bulduğumuz parametrelerin tanısal amaçlı kullanılması için geniş hasta gruplarında eşik değerlerinin belirlenerek tanısal duyarlılık ve özgüllük çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca metastaz olmayan malign grupta yüksek serum VEGF-A/ES'ye sahip hastaların metastaz gelişimi açısından izlendiği, bu oranın tedaviye cevaptaki öneminin değerlendirildiği (prognosa yönelik) çalışmalar yapılması uygun olacaktır.

Sonuç olarak,

Bu çalışmada memede benign ve malign kitle tespit edilen kadınlar patolojik tanılarına göre üç gruba ayrılarak dokuda VEGF-A, ES, S100A4 ekspresyonları ve serum düzeyleri saptandı. Aynı zamanda bu parametrelerin çeşitli klinikohistopatolojik değişkenlerle ilişkisi araştırıldı. VEGF-A, ES ve S100A4'ün doku ekspresyonlarında ve ES ve S100A4'ün serum düzeylerinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Buna ek olarak, bu parametrelerin doku ekspresyonları ile serum düzeyleri arasında korelasyon bulunmadı. Bildiğimiz kadarı ile serumda ELISA yöntemi ile insanda ilk kez bu çalışmada çalışılan S100A4'ün metastazı öngörmede bir değer taşımadığı sonucuna varıldı. Serum VEGF-A ve VEGF/ES'nin metastazlı grupta benign gruba göre yüksek bulunması, ayrıca geç evre hastalarda artışı, serum VEGF/ES'nin metastazlı grupta, malign gruptan yüksek saptanması, VEGF-A'nın metastatik süreçte rol aldığını ve özellikle serum VEGF-A/ES'nin memede kitle tespit edilen hastalar için metastazlı, malign ve benign ayırımını yapmada kullanılabileceğini düşündürmektedir.

6. KAYNAKLAR ve EKLER

6.1. KAYNAKLAR

1. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000;321:624-8.
2. http://www.cancer.org/downloads/STT/F861009_final%209-08-09.pdf.
3. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999;49:33-64, 1.
4. Sadıkoğlu G. Birinci basamakta Meme Kanserli Hastaya Yaklaşım. Vol.: [http:// ailehekimligi.uludag.edu.tr/seminer17.html](http://ailehekimligi.uludag.edu.tr/seminer17.html), (Erişim Tarihi: Aralık 2003).
5. Jacquilat C, Weil M, Bailet F. Result of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in breast conserving treatment of 250 patients with all stages of infiltrative breast cancer. *Cancer* 1990;66:119.
6. Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr Cancer Ther* 2005;4:315-21.
7. Rosen LS. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control* 2002;9:36-44.
8. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.
9. Schneider BP, Radovich M, Sledge GW, Robarge JD, Li L, Storniolo AM, et al. Association of polymorphisms of angiogenesis genes with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;111:157-63.
10. Folkman J. Tumor Angiogenesis. In: *Cancer Medicine 2000*;Canada: BC Decker Inc:132-52.
11. Sledge GW, Jr., Miller KD. Angiogenesis and antiangiogenic therapy. *Curr Probl Cancer* 2002;26:1-60.
12. Hoar FJ, Chaudhri S, Wadley MS, Stonelake PS. Co-expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and c-erbB2 in human breast carcinoma. *Eur J Cancer* 2003;39:1698-703.
13. Bono P, Teerenhovi L, Joensuu H. Elevated serum endostatin is associated with poor outcome in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* 2003;97:2767-75.
14. Balasubramanian SP, Cox A, Cross SS, Higham SE, Brown NJ, Reed MW. Influence of VEGF-A gene variation and protein levels in breast cancer susceptibility and severity. *Int J Cancer* 2007;121:1009-16.
15. Toi M, Matsumoto T, Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol* 2001;2:667-73.
16. Liby K, Neltner B, Mohamet L, Burd C, Ben-Jonathan N. Endostatin expression by MDA-MB-435 breast cancer cells effectively inhibits tumor growth. *Cancer Biol Ther* 2003;2:48-52.
17. Jae E, Kim H. Characterization of the Calcium Binding-and Dimerization-dependent Roles for the Metastasis-associated Protein S100A4 [Doctor of Philosophy in Genetics]: Stony Brook University, 2003.
18. Koshelev Iu A, Georgiev GP, Kibardin AV. [Functions of protein MTS1 (S100A4) in normal and tumor cells]. *Genetika* 2008;44:149-62.
19. Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* 2006;281:677-80.

20. Oslejskova L, Grigorian M, Gay S, Neidhart M, Senolt L. The metastasis associated protein S100A4: a potential novel link to inflammation and consequent aggressive behaviour of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1499-504.
21. Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M. The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* 2005;92:1955-8.
22. Carbone PP, Jordan VC, Bonodonna G. *Neoplasms of the Breast*. 2 ed: McGraw-Hill,Inc., New York, 1993:819-49pp.
23. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007;18:581-92.
24. Wiechmann L, Kuerer HM. The molecular journey from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. *Cancer* 2008;112:2130-42.
25. Ergul E, Sazci A, Utkan Z, Canturk NZ. Polymorphisms in the MTHFR gene are associated with breast cancer. *Tumour Biol* 2003;24:286-90.
26. Winer EP, Morrow M, Osborne CK, Harris JR. *Malignant Tumors of the Breast*. In: *Cancer Principles and Practice of Oncology*, Vol. 6 ed. Philadelphia: A Wolters Kluwer Company, 2001:1651-717.
27. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004;54:8-29.
28. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003;302:643-6.
29. Couch FJ, DeShano ML, Blackwood MA, Calzone K, Stopfer J, Campeau L, et al. BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1997;336:1409-15.
30. Kumar V, K.Abbas A, Fausto N, Mitchell RN. *Robbins Temel Patoloji*. 8 th ed: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008:739-50pp.
31. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. *Robbins Basic Pathology*. 7th ed, 2005:1119-51pp.
32. Aydiner A, Topuz E, Aykan F. *Meme Kanseri Tanı-Tedavi-Takip İstanbul Konsensusu* .Nobel Tıp Kitabevleri, 2006:1-85pp.
33. Moyak D. Breast: Locally Advanced (T3 and T4) and Recurrent Tumors. In: Perez CA, Brady LW, eds. *Principles and Practice of Radiation Oncology*, Vol. 2nd ed. Philadelphia: J.B Lippincott Company, 1992:877-969.
34. Fındık S. *Meme Kanseri Olgularında HER2/neu Tespitinde İmmunohistokimya ve Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemlerinin Karşılaştırılması*. Uzmanlık Tezi, Konya, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fak. Patoloji A.D. 2007.
35. Kakar S, Puangsuvan N, Stevens JM, Serenas R, Mangan G, Sahai S, Mihalov ML. HER-2/neu assessment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization: comparison of results and correlation with survival. *Mol Diagn* 2000;5:199-207.
36. Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* 2006;56:37-47; quiz 50-1.
37. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9:653-60.
38. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401-10.
39. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011-27.

40. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 2004;9 Suppl 1:2-10.
41. Eichhorn ME, Kleespies A, Angele MK, Jauch KW, Bruns CJ. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbecks Arch Surg* 2007;392:371-9.
42. Streit M, Detmar M. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene* 2003;22:3172-9.
43. Fox SB, Generali DG, Harris AL. Breast tumour angiogenesis. *Breast Cancer Res* 2007;9:216.
44. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002;29:10-4.
45. Fernandez PM, Rickles FR. Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr Opin Hematol* 2002;9:401-6.
46. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 2003;22:6549-56.
47. Manders P, Beex LV, Tjan-Heijnen VC, Geurts-Moespot J, Van Tienoven TH, Foekens JA, Sweep CG. The prognostic value of vascular endothelial growth factor in 574 node-negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic therapy. *Br J Cancer* 2002;87:772-8.
48. Chang L, Kaipainen A, Folkman J. Lymphangiogenesis new mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 2002;979:111-9.
49. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005;9:777-94.
50. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004;56:549-80.
51. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
52. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996;32A:2413-22.
53. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C947-70.
54. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269:26988-95.
55. Grothey A, Ellis LM. Targeting angiogenesis driven by vascular endothelial growth factors using antibody-based therapies. *Cancer J* 2008;14:170-7.
56. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-32.
57. Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology* 2005;69 Suppl 3:11-6.
58. Muci E., Dedeoğlu B., Suzer. Ö. 19 Türk Farmakoloji Derneği , 19 Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2 Klinik Toksikolojik Sempozyumu , 3 Klinik Farmakolojik Sempozyumu, Vol., 2007:139-40.
59. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol* 2001;2:149-56.
60. Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999;99:1726-32.
61. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001;19:1207-25.

62. Kondo S, Asano M, Matsuo K, Ohmori I, Suzuki H. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients. *Biochim Biophys Acta* 1994;1221:211-4.
63. Yamamoto Y, Toi M, Kondo S, Matsumoto T, Suzuki H, Kitamura M, et al. Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 1996;2:821-6.
64. Shaarawy M, El-Sharkawy SA. Biomarkers of intrinsic angiogenic and anti-angiogenic activity in patients with endometrial hyperplasia and endometrial cancer. *Acta Oncol* 2001;40:513-8.
65. Salven P, Manpaa H, Orpana A, Alitalo K, Joensuu H. Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:647-51.
66. Salven P, Perhoniemi V, Tykka H, Maenpaa H, Joensuu H. Serum VEGF levels in women with a benign breast tumor or breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1999;53:161-6.
67. Fontanini G, Vignati S, Boldrini L, Chine S, Silvestri V, Lucchi M, et al. Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997;3:861-5.
68. Folkman J. *Cancer: Principle and Practice of Oncology*. 7th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2005:2865-82pp.
69. Gasparini G, Toi M, Gion M, Verderio P, Dittadi R, Hanatani M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:139-47.
70. Linderholm B, Grankvist K, Wilking N, Johansson M, Tavelin B, Henriksson R. Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2000;18:1423-31.
71. Linderholm B, Lindh B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. p53 and vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 2000;89:51-62.
72. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Does vascular endothelial growth factor (VEGF) predict local relapse and survival in radiotherapy-treated node-negative breast cancer? *Br J Cancer* 1999;81:727-32.
73. Folkman J. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. In: Devita VT, Hellmann S, Rosenberg SA, eds., Vol. 2. 7th ed: Lippincott Williams & Wilkins, 2005:2865-82.
74. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* 2005;65:3967-79.
75. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-85.
76. Ribatti D. Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. *Leuk Res* 2009;33:638-44.
77. Saarela J, Ylikarppa R, Rehn M, Purmonen S, Pihlajaniemi T. Complete primary structure of two variant forms of human type XVIII collagen and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts. *Matrix Biol* 1998;16:319-28.
78. Saarela J, Rehn M, Oikarinen A, Autio-Harmainen H, Pihlajaniemi T. The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans. *Am J Pathol* 1998;153:611-26.

79. Clamp AR, Jayson GC. The clinical potential of antiangiogenic fragments of extracellular matrix proteins. *Br J Cancer* 2005;93:967-72.
80. Sund M, Kalluri R. Tumor stroma derived biomarkers in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:177-83.
81. Marneros AG, Olsen BR. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biol* 2001;20:337-45.
82. Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaisse J. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett* 2000;486:247-51.
83. Felbor U, Dreier L, Bryant RA, Ploegh HL, Olsen BR, Mothes W. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J* 2000;19:1187-94.
84. Sasaki T, Hohenester E, Timpl R. Structure and function of collagen-derived endostatin inhibitors of angiogenesis. *IUBMB Life* 2002;53:77-84.
85. Hohenester E, Sasaki T, Mann K, Timpl R. Variable zinc coordination in endostatin. *J Mol Biol* 2000;297:1-6.
86. Zatterstrom UK, Felbor U, Fukai N, Olsen BR. Collagen XVIII/endostatin structure and functional role in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2000;25:97-101.
87. Tabruyn SP, Griffioen AW. Molecular pathways of angiogenesis inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355:1-5.
88. Bix G, Iozzo RV. Matrix revolutions: "tails" of basement-membrane components with angiostatic functions. *Trends Cell Biol* 2005;15:52-60.
89. Çavdar Z. Kolon ve Rektum Kanserlerinde Endostatin'in Matriks Metalloproteinaz-2 Üzerine Gösterdiği Etkinin Araştırılması. Doktora Tezi, İzmir, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya AD. 2008.
90. Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, Lively J, Zeisberg M, Kalluri R. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4766-71.
91. Abdollahi A, Hahnfeldt P, Maercker C, Grone HJ, Debus J, Ansorge W, et al. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Mol Cell* 2004;13:649-63.
92. Digtyar AV, Pozdnyakova NV, Feldman NB, Lutsenko SV, Severin SE. Endostatin: current concepts about its biological role and mechanisms of action. *Biochemistry (Mosc)* 2007;72:235-46.
93. Hajitou A, Grignet C, Devy L, Berndt S, Blacher S, Deroanne CF, et al. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *FASEB J* 2002;16:1802-4.
94. Lee SJ, Jang JW, Kim YM, Lee HI, Jeon JY, Kwon YG, Lee ST. Endostatin binds to the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2. *FEBS Lett* 2002;519:147-52.
95. Feldman AL, Pak H, Yang JC, Alexander HR, Jr., Libutti SK. Serum endostatin levels are elevated in patients with soft tissue sarcoma. *Cancer* 2001;91:1525-9.
96. Feldman AL, Tamarkin L, Paciotti GF, Simpson BW, Linehan WM, Yang JC, et al. Serum endostatin levels are elevated and correlate with serum vascular endothelial growth factor levels in patients with stage IV clear cell renal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:4628-34.
97. Zhao J, Yan F, Ju H, Tang J, Qin J. Correlation between serum vascular endothelial growth factor and endostatin levels in patients with breast cancer. *Cancer Lett* 2004;204:87-95.

98. Kim EJ, Helfman DM. Characterization of the metastasis-associated protein, S100A4. Roles of calcium binding and dimerization in cellular localization and interaction with myosin. *J Biol Chem* 2003;278:30063-73.
99. Mazzucchelli L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *Am J Pathol* 2002;160:7-13.
100. Tarabykina S, Griffiths TR, Tulchinsky E, Mellon JK, Bronstein IB, Kriaievska M. Metastasis-associated protein S100A4: spotlight on its role in cell migration. *Curr Cancer Drug Targets* 2007;7:217-28.
101. Ambartsumian N, Klingelhofer J, Grigorian M, Christensen C, Kriaievska M, Tulchinsky E, et al. The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* 2001;20:4685-95.
102. Schmidt-Hansen B, Klingelhofer J, Grum-Schwensen B, Christensen A, Andresen S, Kruse C, et al. Functional significance of metastasis-inducing S100A4(Mts1) in tumor-stroma interplay. *J Biol Chem* 2004;279:24498-504.
103. Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, et al. Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *J Biol Chem* 2005;280:20833-41.
104. Rudland PS, Platt-Higgins A, Renshaw C, West CR, Winstanley JH, Robertson L, Barraclough R. Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res* 2000;60:1595-603.
105. Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res* 2000;60:2898-905.
106. Lourenco HM, Pereira TP, Fonseca RR, Cardoso PM. HER2/neu detection by immunohistochemistry: optimization of in-house protocols. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009;17:151-7.
107. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons;. 2003.
108. Masunaga R, Kohno H, Dhar DK, Ohno S, Shibakita M, Kinugasa S, et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2000;6:4064-8.
109. Falkenberry SS, Legare RD. Risk factors for breast cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002;29:159-72.
110. Winchester DP, Osteen RT, Menck HR. The National Cancer Data Base report on breast carcinoma characteristics and outcome in relation to age. *Cancer* 1996;78:1838-43.
111. Rabau MY, Avigad I, Dreznik Z, Wolfstein I. Carcinoma of the breast in women 30 years of age or younger. *Am Surg* 1980;46:548-50.
112. Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol* 2002;29:3-9.
113. Hyder SM. Sex-steroid regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:667-87.
114. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002;20:4368-80.
115. Boss EA, Massuger LF, Thomas CM, Geurts-Moespot A, Boonstra H, Sweep CG. Vascular endothelial growth factor in ovarian cyst fluid. *Cancer* 2001;91:371-7.

116. Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, Roesel JL, Benz C, Mueller H, et al. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998;16:3129-36.
117. Bian XW, Du LL, Shi JQ, Cheng YS, Liu FX. Correlation of bFGF, FGFR-1 and VEGF expression with vascularity and malignancy of human astrocytomas. *Anal Quant Cytol Histol* 2000;22:267-74.
118. Ohta Y, Endo Y, Tanaka M, Shimizu J, Oda M, Hayashi Y, et al. Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:1411-6.
119. Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in malignancies of the female genital tract. *Gynecol Oncol* 1999;72:220-31.
120. Hazelton D, Nicosia RF, Nicosia SV. Vascular endothelial growth factor levels in ovarian cyst fluid correlate with malignancy. *Clin Cancer Res* 1999;5:823-9.
121. Tjalma W, Weyler J, Weyn B, Van Marck E, Van Daele A, Van Dam P, et al. The association between vascular endothelial growth factor, microvessel density and clinicopathological features in invasive cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;92:251-7.
122. Toi M, Hoshina S, Takayanagi T, Tominaga T. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1994;85:1045-9.
123. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 1995;26:86-91.
124. Wong MP, Cheung N, Yuen ST, Leung SY, Chung LP. Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression. *Int J Cancer* 1999;81:845-50.
125. Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:1782-90.
126. Boneberg EM, Legler DF, Hoefler MM, Ohlschlegel C, Steininger H, Fuzesi L, et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis are downregulated in primary breast cancer. *Br J Cancer* 2009;101:605-14.
127. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1998;16:3121-8.
128. Ludovini V, Sidoni A, Pistola L, Bellezza G, De Angelis V, Gori S, et al. Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel density in stages I and II breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2003;81:159-68.
129. De Paola F, Granato AM, Scarpi E, Monti F, Medri L, Bianchi S, et al. Vascular endothelial growth factor and prognosis in patients with node-negative breast cancer. *Int J Cancer* 2002;98:228-33.
130. Fuckar D, Dekanic A, Stifter S, Mustac E, Krstulja M, Dobrila F, Jonjic N. VEGF expression is associated with negative estrogen receptor status in patients with breast cancer. *Int J Surg Pathol* 2006;14:49-55.
131. Toi M, Kondo S, Suzuki H, Yamamoto Y, Inada K, Imazawa T, et al. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer* 1996;77:1101-6.

132. Greb RR, Maier I, Wallwiener D, Kiesel L. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) mRNA expression levels decrease after menopause in normal breast tissue but not in breast cancer lesions. *Br J Cancer* 1999;81:225-31.
133. Duranyildiz D, Camlica H, Soydinc HO, Derin D, Yasasever V. Serum levels of angiogenic factors in early breast cancer remain close to normal. *Breast* 2009;18:26-9.
134. Fuhrmann-Benzakein E, Ma MN, Rubbia-Brandt L, Mentha G, Rufenacht D, Sappino AP, Pepper MS. Elevated levels of angiogenic cytokines in the plasma of cancer patients. *Int J Cancer* 2000;85:40-5.
135. Chin KF, Greenman J, Gardiner E, Kumar H, Topping K, Monson J. Pre-operative serum vascular endothelial growth factor can select patients for adjuvant treatment after curative resection in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000;83:1425-31.
136. Ogura S, Ohdaira T, Hozumi Y, Omoto Y, Nagai H. Metastasis-related factors expressed in pT1 pN0 breast cancer: assessment of recurrence risk. *J Surg Oncol* 2007;96:46-53.
137. Granato AM, Nanni O, Falcini F, Folli S, Mosconi G, De Paola F, et al. Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients and healthy women: useful as diagnostic tools? *Breast Cancer Res* 2004;6:R38-45.
138. Shivakumar S, Prabhakar BT, Jayashree K, Rajan MG, Salimath BP. Evaluation of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD) as prognostic indicators in carcinoma breast. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:627-36.
139. Balsari A, Maier JA, Colnaghi MI, Menard S. Correlation between tumor vascularity, vascular endothelial growth factor production by tumor cells, serum vascular endothelial growth factor levels, and serum angiogenic activity in patients with breast carcinoma. *Lab Invest* 1999;79:897-902.
140. Dreisbach LP, Ianonne M, Vahedian M, McGrain A, Villar H, Bellamy W, Stopeck A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) plasma levels and tumor expression in breast cancer: A comparison of random pre-operative VEGF plasma levels in malignant and benign breast disease. *ASCO Annual Meeting 2002*; Abstract Number 2986
141. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby PJ. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998;77:956-64.
142. Gunsilius E, Petzer A, Stockhammer G, Nussbaumer W, Schumacher P, Clausen J, Gastl G. Thrombocytes are the major source for soluble vascular endothelial growth factor in peripheral blood. *Oncology* 2000;58:169-74.
143. Alba E, Llombart A, Ribelles N, Ramos M, Fernandez R, Mayordomo JI, et al. Serum endostatin and bFGF as predictive factors in advanced breast cancer patients treated with letrozole. *Clin Transl Oncol* 2006;8:193-9.
144. Kuroi K, Toi M. Circulating angiogenesis regulators in cancer patients. *Int J Biol Markers* 2001;16:5-26.
145. Teh SH, Hill AD, Lee AW, Foley D, Kennedy S, Young L, et al. Raised plasma endostatin levels correlate inversely with breast cancer angiogenesis. *J Surg Res* 2004;116:165-71.
146. Ohlund D, Ardnor B, Oman M, Naredi P, Sund M. Expression pattern and circulating levels of endostatin in patients with pancreas cancer. *Int J Cancer* 2008;122:2805-10.

147. Vaananen A, Ylipalosaari M, Parikka M, Kainulainen T, Rehn M, Heljasvaara R, et al. Collagen XVIII modulation is altered during progression of oral dysplasia and carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2007;36:35-42.
148. Kuroi K, Tanaka C, Toi M. Circulating levels of endostatin in cancer patients. *Oncol Rep* 2001;8:405-9.
149. Feldman AL, Alexander HR, Jr., Yang JC, Linehan WM, Eyler RA, Miller MS, et al. Prospective analysis of circulating endostatin levels in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 2002;95:1637-43.
150. Feldman AL, Alexander HR, Jr., Bartlett DL, Kranda KC, Miller MS, Costouros NG, et al. A prospective analysis of plasma endostatin levels in colorectal cancer patients with liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2001;8:741-5.
151. Takeshita S, Kawamura Y, Takabayashi H, Yoshida N, Nonoyama S. Imbalance in the production between vascular endothelial growth factor and endostatin in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 2005;139:575-9.
152. Morelli D, Lazzerini D, Cazzaniga S, Squicciarini P, Bignami P, Maier JA, et al. Evaluation of the balance between angiogenic and antiangiogenic circulating factors in patients with breast and gastrointestinal cancers. *Clin Cancer Res* 1998;4:1221-5.
153. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:883-93.
154. Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, et al. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 1997;57:963-9.
155. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 2008;8:579-91.
156. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358:2039-49.
157. Nishimura R, Nagao K, Miyayama H, Matsuda M, Baba K, Yamashita H, Fukuda M. Higher plasma vascular endothelial growth factor levels correlate with menopause, overexpression of p53, and recurrence of breast cancer. *Breast Cancer* 2003;10:120-8.
158. Heer K, Kumar H, Read JR, Fox JN, Monson JR, Kerin MJ. Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer: its relation with cancer type and estrogen receptor status. *Clin Cancer Res* 2001;7:3491-4.
159. Callagy G, Dimitriadis E, Harmey J, Bouchier-Hayes D, Leader M, Kay E. Immunohistochemical measurement of tumor vascular endothelial growth factor in breast cancer. A more reliable predictor of tumor stage than microvessel density or serum vascular endothelial growth factor. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000;8:104-9.
160. Konecny GE, Meng YG, Untch M, Wang HJ, Bauerfeind I, Epstein M, et al. Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:1706-16.
161. Yen L, You XL, Al Moustafa AE, Batist G, Hynes NE, Mader S, et al. Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. *Oncogene* 2000;19:3460-9.
162. Erdogan S, Ergin M, Tuncer İ. Meme Karsinomunda c-erbB-2 (HER/2 neu) Ekspresyonunun Diğer Prognostik Faktörlerle Karşılaştırılması 2002;18 (3-4):48-52.

163. Ali SH, O'Donnell AL, Balu D, Pohl MB, Seyler MJ, Mohamed S, et al. Estrogen receptor-alpha in the inhibition of cancer growth and angiogenesis. *Cancer Res* 2000;60:7094-8.
164. Bausero P, Ben-Mahdi M, Mazucatelli J, Bloy C, Perrot-Applanat M. Vascular endothelial growth factor is modulated in vascular muscle cells by estradiol, tamoxifen, and hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H2033-42.
165. Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov N, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Geurts-Moespot A, et al. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:5407-14.
166. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. CD31, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Basic Fibroblast Growth Factor (BFGF) Discriminate Between Subgroups of 827 Patients-Different Angiogenic Pathways in Human Breast Cancer? . 2000 ASCO Annual Meeting Abstract number 2546.
167. Karpanen T, Alitalo K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol* 2008;3:367-97.
168. Tobler NE, Detmar M. Tumor and lymph node lymphangiogenesis--impact on cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 2006;80:691-6.
169. Iosifidou R, Galactidou G, Ananiadis A, Bladika N, Patakiouta F. VEGF-A, VEGF-C, VEGF-R2, EGFR and HER2 in serum plus EGFR in tissue of patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009;11:13-7.
170. Ismail NI, Kaur G, Hashim H, Hassan MS. S100A4 overexpression proves to be independent marker for breast cancer progression. *Cancer Cell Int* 2008;8:12.
171. Ebralidze A, Tulchinsky E, Grigorian M, Afanasyeva A, Senin V, Revazova E, Lukanidin E. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. *Genes Dev* 1989;3:1086-93.
172. Platt-Higgins AM, Renshaw CA, West CR, Winstanley JH, De Silva Rudland S, Barraclough R, Rudland PS. Comparison of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9ka) with other prognostic markers in human breast cancer. *Int J Cancer* 2000;89:198-208.
173. Lee WY, Su WC, Lin PW, Guo HR, Chang TW, Chen HH. Expression of S100A4 and Met: potential predictors for metastasis and survival in early-stage breast cancer. *Oncology* 2004;66:429-38.
174. Pedersen KB, Nesland JM, Fodstad O, Maelandsmo GM. Expression of S100A4, E-cadherin, alpha- and beta-catenin in breast cancer biopsies. *Br J Cancer* 2002;87:1281-6.
175. Hernan R, Fasheh R, Calabrese C, Frank AJ, Maclean KH, Allard D, et al. ERBB2 up-regulates S100A4 and several other prometastatic genes in medulloblastoma. *Cancer Res* 2003;63:140-8.
176. Missiaglia E, Blaveri E, Terris B, Wang YH, Costello E, Neoptolemos JP, et al. Analysis of gene expression in cancer cell lines identifies candidate markers for pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Int J Cancer* 2004;112:100-12.
177. Cui JF, Liu YK, Pan BS, Song HY, Zhang Y, Sun RX, et al. Differential proteomic analysis of human hepatocellular carcinoma cell line metastasis-associated proteins. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:615-22.

178. Cho YG, Nam SW, Kim TY, Kim YS, Kim CJ, Park JY, et al. Overexpression of S100A4 is closely related to the aggressiveness of gastric cancer. *APMIS* 2003;111:539-45.
179. Gongoll S, Peters G, Mengel M, Piso P, Klempnauer J, Kreipe H, von Wasielewski R. Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2002;123:1478-84.
180. Chen XL, Zhang WG, Chen XY, Sun ZM, Liu SH. [Correlations of S100A4 protein expression to invasion and metastasis of non-small cell lung cancer]. *Ai Zheng* 2006;25:1134-7.
181. Zou M, Al-Baradie RS, Al-Hindi H, Farid NR, Shi Y. S100A4 (Mts1) gene overexpression is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer* 2005;93:1277-84.
182. Merzak A, Parker C, Koochekpour S, Sherbet GV, Pilkington GJ. Overexpression of the 18A2/mts1 gene and down-regulation of the TIMP-2 gene in invasive human glioma cell lines in vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994;20:614-9.
183. Ai KX, Lu LY, Huang XY, Chen W, Zhang HZ. Prognostic significance of S100A4 and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2008;14:1931-5.
184. El-Abd E, El-Tahan R, Fahmy L, Zaki S, Faid W, Sobhi A, et al. Serum metastasin mRNA is an important survival predictor in breast cancer. *Br J Biomed Sci* 2008;65:90-4.
185. Cabezon T, Celis JE, Skibshoj I, Klingelhofer J, Grigorian M, Gromov P, et al. Expression of S100A4 by a variety of cell types present in the tumor microenvironment of human breast cancer. *Int J Cancer* 2007;121:1433-44.

Üç gruptaki İHK'sal yöntem boyanma yoğunluk ve yaygınlık sonuçları

METASTAZLI GRUP (Aksiller metastaz yapmış)							
		S100A4 yoğunluk	S100A4 yaygınlık	VEGF-A yoğunluk	VEGF-A yaygınlık	ES yoğunluk	ES yaygınlık
1	YÇ	1	1	1	3	2	3
2	ÜS	0	0	2	1	2	4
3	DÖ	2	4	1	2	0	0
4	HY	3	1	1	1	0	0
5	GG	2	1	1	3	0	0
6	SK	0	0	1	1	0	0
7	ZÇ	3	3	2	2	1	1
8	FM	0	0	2	2	0	0
9	HH	0	0	2	1	2	1
10	MY	-	-	-	-	-	-
11	ŞG	0	0	1	1	0	0
12	SK	2	1	2	2	3	2
13	MÜ	1	1	1	1	0	0
14	ZG	0	0	2	2	2	1
15	BT	0	0	1	1	0	0
16	GG	0	0	1	3	1	1
17	RE	3	1	2	1	1	2
18	İD	1	2	2	4	1	1
MALİGN GRUP (Aksiller metastaz yapmamış)							
		S100A4 yoğunluk	S100A4 yaygınlık	VEGF-A yoğunluk	VEGF-A yaygınlık	ES yoğunluk	ES yaygınlık
19	NÇ	2	3	1	2	1	2
20	GT	1	1	1	1	1	3
21	FK	1	1	1	2	1	1
22	MD	1	1	0	0	0	0
23	NU	1	1	1	4	2	1
24	TE	2	1	1	4	1	2
25	MY	0	0	0	0	1	1
26	AT	1	1	0	0	0	0
27	SB	2	4	2	2	1	1
28	TK	2	2	1	2	1	1
29	RK	2	1	1	3	3	2
30	BT	2	4	2	3	1	2
31	CÖ	1	1	1	2	1	3
32	NÜ	0	0	1	2	0	0
33	TB	1	1	1	3	0	0
34	CS	0	0	2	1	0	0
35	GG	3	3	1	2	1	1
36	EE	3	1	1	1	0	0
37	MH	0	0	1	4	0	0
38	ŞNÖ	1	1	1	2	1	1
39	HA	0	0	1	1	1	1
40	EB	2	4	1	3	1	3
41	NŞ	1	2	1	3	2	3
42	FB	3	1	1	3	1	1
43	SO	2	1	1	4	2	2
44	ŞA	1	1	1	3	1	2

45	NB	3	1	1	4	2	3
46	SA	3	1	1	4	1	1
47	HK	2	1	2	2	1	2
48	FÖ	2	1	1	3	1	2
49	NK	1	2	1	2	2	1
50	HM	1	2	1	1	1	2
51	AT	2	1	1	1	1	1
52	MİA	1	2	1	3	1	4
53	NT	1	1	2	2	2	3
54	Dİ	0	0	0	0	0	0
55	SP	1	1	0	0	0	0
56	NE	0	0	1	1	0	0
57	MA	3	1	2	3	2	2
BENİGN GRUP							
		S100A4 yoğunluk	S100A4 yaygınlık	VEGF-A yoğunluk	VEGF-A yaygınlık	ES yoğunluk	ES yaygınlık
58	FU	1	2	1	3	1	1
59	BŞ	2	1	2	3	2	1
60	İD	1	1	3	3	2	2
61	ÜE	3	3	2	1	2	1
62	NA	3	3	1	1	1	1
63	AK	1	3	1	1	2	1
64	ÖY	1	1	0	0	0	0
65	AŞ	3	2	2	4	2	1
66	AA	3	3	1	1	1	1
67	SK	1	1	1	2	2	1
68	PA	1	1	1	2	1	1
69	NA	0	0	3	1	1	1
70	VA	0	0	1	4	0	0
71	GBA	0	0	2	3	1	4
72	NÜ	2	1	1	2	1	2
73	NŞ	2	1	2	1	2	1
74	NM	2	1	1	1	1	1
75	ME	3	4	3	1	3	2
76	ND	1	1	3	3	1	1
77	MT	0	0	3	3	3	2
78	EM	3	4	2	1	1	1
79	SG	0	0	1	1	0	0
80	OK	2	1	1	3	0	0
81	NE	1	3	1	2	1	1
82	ZB	2	1	2	1	1	1
83	AG	1	1	1	2	2	3
84	FA	1	2	2	1	1	1
85	ME	0	0	1	1	1	3
86	FS	1	1	2	4	0	0
87	GU	3	3	2	2	3	1
88	RA	0	0	0	0	0	0
89	ŞK	3	1	3	1	1	1

S100A4, VEGF-A, ES ELISA Sonuçları

METASTAZLI GRUP (Aksiller metastaz yapmış)				
		S100A4 (ng/mL)	VEGF-A(pg/mL)	ES(ng/mL)
1	Y Ç	188,1	430,0	82,1
2	Ü S	33,2	130,4	64,9
3	D Ö	37,0	633,3	58,9
4	H Y	6,2	335,8	52,4
5	G G	27,1	428,3	39,8
6	S K	52,4	232,5	55,8
7	Z Ç	4,2	353,8	56,0
8	F M	2,3	55,4	78,7
9	H H	11,9	291,7	78,5
10	M Y	4,1	326,7	78,7
11	Ş G	9,2	243,3	129,2
12	S K	3,4	225,0	78,9
13	M Ü	9,3	343,4	51,9
14	Z G	3,8	523,3	90,3
15	B T	4,9	351,3	72,9
16	G G	3,0	344,2	111,1
17	R E	18,8	306,7	66,4
18	İ D	8,37	319,2	64,9
MALİGN GRUP (Aksiller metastaz yapmamış)				
		S100A4 (ng/mL)	VEGF-A(pg/mL)	ES(ng/mL)
19	N Ç	3,26	142,1	95,4
20	G T	3,26	410,0	72,4
21	F K	7,5	44,2	102,6
22	M D	58,7	495,0	78,7
23	N U	7,26	59,2	61,3
24	T E	18,8	644,2	83,5
25	M Y	3,06	1017,5	76,5
26	A T	13,64	130,8	112,3
27	S B	11,84	90,0	87,9
28	T K	6,2	165,8	72,4
29	R K	13,4	181,7	99,0
30	B T	7,06	480,0	69,5
31	C Ö	7,8	365,8	92,0
32	N Ü	12,3	503,3	102,8
33	T B	4,69	42,5	179,9
34	C S	43,7	378,3	55,8
35	G G	6,58	165,0	62,0
36	E E	8,9	108,4	120,2
37	M H	2,0	208,3	60,4
38	Ş N Ö	7,5	308,3	71,7
39	H A	4,84	432,5	127,5
40	E B	18,48	160,8	65,7
41	N Ş	17,28	208,3	116,1
42	F B	5,29	299,2	71,0
43	S O	1,62	307,5	110,6

44	ŞA	5,95	161,7	65,7
45	NB	9,05	36,7	68,8
46	SA	23,47	82,9	81,1
47	HK	42,4	237,1	94,2
48	FÖ	37,6	336,7	63,3
49	NK	7,22	347,5	93,7
50	HM	16,28	364,2	68,8
51	AT	14,8	153,3	239,5
52	MİA	1,85	190,8	51,7
53	NT	0,24	663,3	70,7
54	Dİ	13,2	480,0	66,6
55	SP	46,4	697,5	135,4
56	NE	17,48	67,1	116,4
57	MA	2,72	29,6	46,4
BENİGN GRUP				
		S100A4 (ng/mL)	VEGF-A(pg/mL)	ES(ng/mL)
58	FU	30,7	252,5	82,1
59	BŞ	20,7	379,2	55,0
60	İD	24,1	65,8	77,5
61	ÜE	25,0	151,7	39,6
62	NA	3,5	139,2	118,3
63	AK	24,1	14,0	80,4
64	ÖY	7,1	40,0	59,9
65	AŞ	12,5	108,3	129,4
66	AA	13,0	294,2	79,4
67	SK	106,8	213,3	76,3
68	PA	45,2	255,0	52,6
69	NA	4,6	216,7	139,5
70	VA	15,77	175,0	45,4
71	GBA	58,4	67,9	56,5
72	NÜ	13,7	0,0	205,0
73	NŞ	5,3	475,8	51,7
74	NM	6,1	319,2	78,7
75	ME	10,72	475,0	147,5
76	ND	3,4	230,0	54,8
77	MT	25,48	176,7	101,2
78	EM	2,31	27,1	64,2
79	SG	5,8	125,4	97,8
80	OK	10	150,8	81,1
81	NE	27,6	83,8	62,8
82	ZB	2,65	352,5	47,1
83	AG	15,16	113,3	50,0
84	FA	6,46	426,7	49,0
85	ME	3,83	302,5	79,4
86	FS	14,2	190,4	68,1
87	GU	7,8	542,9	100,4
88	RA	11,5	196,7	56,3
89	ŞK	7,77	292,5	72,4

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Amacımız, araştırmaya alınacak, memede kitle tespit edilen 90 hastada tanı için alınan biyopsi materyallerinde araştıracağımız belirteçler ile kandaki belirteçlerin ilişkisini saptamak ve hastalığın seyrini öngörmeye bu serum göstergelerinin yararlı olup olamayacağını belirlemektir. Bu nedenle rahatsızlığınız nedeniyle sizin memenizden alınan ve incelenmek üzere patolojiye gönderilen doku örneğinizin tanı ve tedavisinin planlanmasında yapılacak standart tüm incelemeler yanı sıra bu hastalığın tedavisini ve izlenmesine katkı sağlayabileceğini düşündüğümüz diğer incelemelerin yapılması ve ayrıca ameliyat öncesi rutin kan testleriniz için alınacak kanın bir bölümünü (1 tüp; 8 ml) bu araştırmaya yardımcı olmak üzere kullanabilmemiz için müsaadenizi istiyoruz. Bu çalışma için kan ve doku örneği bir kez alınacaktır. Kan alınırken oluşabilecek hemotoma (cilt altı kanamaya bağlı şişlik) karşı alkollü pamukla bası yapılacaktır. Biyopsi sonrası oluşabilecek kesi veya enfeksiyon kontrol edilerek tedavisi verilecektir.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışmada yer aldığımız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın;

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Tel:

İmza:

Olur Alma İşlemine Basından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin;

Adı:

Soyadı:

Tarih:

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının

Adı: Yılmaz

Soyadı: ÖZALP

Tarih:

Tel: 0 505 748 43 03, 0 232 412 25 59

İmza:



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

Tel : 0 232 - 259 87 73 - 259 87 74

Fax : 0 232 - 259 05 41

İnciraltı 35340-İzmir

Sayı : B.30.2.DEÜ.0.01.00.00 / 4240

31 MART 2008

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Fakültemiz Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Başkanlığının 28 Mart 2008 tarih ve 124 sayılı yazılılarıyla Dekanlığımıza iletilen: 112/2008 Protokol numaralı Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Banu ÖNVURAL'ın proje yöneticisi ve Araş.Gör.Yılmaz ÖZALP'in sorumlusu olduğu, "Memede benign ve malign kitle tespit edilen kadınlarda doku ve serum S100A4, VEGF-A ve endostatin protein düzeyleri arasındaki ilişki" isimli proje ile ilgili Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Kararı ve sonuç ek'te sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve ilgiliye iletilmesi hususunda gereğini rica ederim.

Prof.Dr. Hakan ABACIOĞLU
Dekan

Ek: Etik Kurul Kararı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Tarih ve Sayı: 28.03.2008/ 124

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Prof.Dr.Mustafa SEÇİL
Prof.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
İğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Zunus KARSLI

Etik Kurul Başkanı

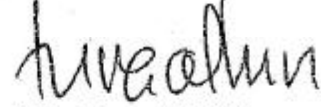
Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 27 Mart 2008 tarih ve 20/07/2008 no.lu toplantısında; 112/200 Protokol numaralı Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Bar ÖNVURAL'ın proje yöneticisi ve Araş.Gör.Yılmaz ÖZALP'in sorumlusu olduğu "**Memede benign ve malign kitle tespit edilen kadınlarda doku ve serum S100A VEGF-A ve endostatin protein düzeyleri arasındaki ilişki**" isimli projed Bilgilendirilmiş Onam Formunda (BOF) 1-c, 4. ve 5-a maddelerin gereklerin yerine getirilmesinden sonra projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



Prof. Dr.Tunç ALKIN
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkan Yrd.

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

Etik Kurul Sekreteri

Latice İĞCI