

Klinik Araştırma

Meme Karsinomunda VEGF ve CD44 Ekspresyonunun Aksiller Lenf Nodu Metastazına Etkisi

İlknur ÇALIK^{1,a}, Muhammet ÇALIK¹, Sare ŞİPAL², Betül GÜNDOĞDU²

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, CD44 ve VEGF ekspresyonunun meme karsinomunda önemli prognostik faktörlerinden biri olan aksiller lenf nodu metastazı ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu retrospektif çalışmaya, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi (FÜTF) Patoloji Anabilim Dalı'nda 1990-2000 yılları arasında modifiye radikal mastektomi ve aksiller lenf nodu diseksiyonu yapılan 62 invaziv meme karsinomu hastası dahil edildi. Bu hastalara ait patolojik örnekler meme karsinomunun prognostik faktörleri açısından değerlendirildi. Daha sonra tümör hücrelerinde CD44 ve VEGF ekspresyonunu belirlemek için streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi uygulanarak immunohistokimyasal boyama yapıldı.

Bulgular: Hastaların ortalama yaşı 50.7±10.66 olarak belirlendi. Olguların 17'sinde (%27.4) lenf nodu metastazı saptanmadı. Lenf nodu tutulumu olan 45 hastanın 21'inde (%33.9) 1-3 metastaz, 24'ünde ise (%38.7) 4-9 metastaz vardı. Yaş, makroskopik tümör çapı, lenfovasküler invazyon ve inflamatuvar reaksiyon gibi bazı klasik prognostik faktörler ile CD44 ve VEGF ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon yoktu. Bununla birlikte, lenf nodu metastazı ile CD44 ve VEGF ekspresyonu istatistiksel olarak ilişkili bulunmuştur (sırasıyla, Anova p <0.001, p =0.013). Dahası CD44 ve VEGF ekspresyonunun histolojik tip, histolojik derece ve evre ile de korele olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak; meme karsinomunda, CD44 ve VEGF ekspresyonu, prognoz göstergesi olarak araştırmaya değer niteliktedir.

Anahtar Sözcükler: Meme Karsinomu, CD44, VEGF, Lenf Nodu Metastazı.

ABSTRACT

The Effect of VEGF and CD44 Expressions on Axillary Lymph Node Metastasis in Breast Carcinoma

Objective: In this study, it was aimed to investigate the relationship of CD44 and VEGF expression to axillary lymph node metastasis that is one of the most important prognostic factors in invasive breast carcinoma.

Material and Method: This retrospective study included 62 invasive breast carcinoma patients who underwent modified radical mastectomy and axillary lymph node dissection between 1990-2000 in Atatürk University Faculty of Medicine (FUTF) Department of Pathology. The pathological specimens of these patients were evaluated in terms of classical prognostic factors of breast cancer. Afterwards, immunohistochemical staining was performed using the streptavidin-biotin peroxidase method to determine CD44 and VEGF expression in tumor cells.

Results: The mean age at the time of diagnosis was 50.22±11.57 years for patients. Seventeen of the cases (32.2%) had no lymph node metastasis. Twenty-one (33.9%) of 42 patients with lymph node involvement had 1 to 3 metastases and 24 (38.7%) had 4 to 9 metastases. There was no significant correlation between CD44 and VEGF expression and some classical prognostic factors such as age, macroscopic tumor diameter, lymphovascular invasion, and inflammatory reaction. However, lymph node metastasis and CD44 and VEGF expression were found to be statistically related (Anova p <0.001, p =0.013, respectively). Furthermore, CD44 and VEGF expression were determined to correlate with histological type, histological grade and stage.

Conclusion: As a result; in breast carcinoma, the expression of CD44 and VEGF is of interest as a prognostic indicator.

Keywords: Breast Carcinoma, CD44, VEGF, Lymph Node Metastasis.

Bu makale atıfta nasıl kullanılır: Çalık İ, Çalık M, Şipal S, Gündoğdu B. Meme Karsinomunda VEGF Ve CD44 Ekspresyonunun Aksiller Lenf Nodu Metastazına Etkisi. Fırat Tıp Dergisi 2019; 24 (3): 137-144.

How to cite this article: Calik I, Calik M, Sibal S, Gundogdu B. The Effect of VEGF and CD44 Expressions on Axillary Lymph Node Metastasis in Breast Carcinoma. Fırat Med J 2019; 24 (3): 137-144.

Meme karsinomu (MK), kadın sağlığını en fazla etkileyen kanser türüdür (1-5). Dünyada her yıl görülen 10 milyon yeni kanser olgusunun bir milyonunu oluşturur (3, 4). Bu kansere bağlı ölümler, yılda 400.000 civarındadır (4, 5). ABD'de yılda 211.000 yeni vaka görülmekte ve 40.000'i bu sebeple ölmektedir (6). Ülkemizde de MK kadınlar arasında görülen kanserler içinde 41.6/100.000 oranı ile ilk sırada yer almakta olup görülme yaşı giderek düşmektedir (7).

MK oluşumundan sorumlu birçok risk faktörü tanım-

lanmıştır (4, 5, 8). En önemli risk faktörleri; yaş (50 yaş üstü) ve cinsiyettir. Diğer iyi tanımlanmış faktörler; coğrafik etkiler, aile öyküsü, menstrüel öykü, gebelik durumu, benign meme hastalıkları ve diğer memede karsinom bulunmasıdır (4, 8).

Diğer kanserlerde olduğu gibi MK'da da, tedaviyi yönlendirmek, hastalığın klinik seyrini ve prognozunu önceden tahmin edebilmek için; yaş, tümör çapı, histolojik tip, histolojik derece, aksiller lenf nodlarının durumu, östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörleri-

nin varlığı, C-erb B2 ekspresyonu gibi birçok prognostik belirleyici kullanılmaktadır. Ancak buna rağmen her olgunun seyrini belirlemek mümkün olamamaktadır. Tedavi oranlarını artırabilmek ve hastalığın seyrini öngörebilmek için daha belirleyici prognostik parametrelere ihtiyaç vardır (1, 3, 9). CD44, transmembran proteinleri ailesinden önemli bir adezyon molekülüdür (10-12). CD44, inflamasyon ve yara iyileşmesi gibi savunma mekanizmalarında, embriyonel gelişim ve lenfosit göçü gibi önemli biyolojik olaylarda rol alır. Hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonu ile hücre göçü üzerinde önemli etkileri vardır (13-17). Bu nedenle embriyonik hücreleri ve aktive lenfositleri taklit edebilen kanser hücrelerinin de benzer reseptör-ligand eşleşmeleri sonucu ekstrasellüler matriks (ESM) içerisindeki göçleri ve metastazlarını etkilediği düşünülmektedir (11, 15). Over kanseri ve kolorektal karsinomlarda, bozulmuş CD44 ekspresyonu, metastaz ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. Özellikle son çalışmalarda; bozulmuş CD44 ekspresyonunun MK'da kötü prognoz göstergesi olduğu belirtilmektedir (11).

Anjiyogenez, tümörlerin büyüme, invazyon ve metastaz yapabilmesi için son derece önemli bir basamaktır (18-21). Tümör hücrelerinin anjiogenik aktivite kazanmalarının altında yatan mekanizmalar henüz net olarak bilinmemektedir. Ancak tümörlerin anjiogenik aktivitesinden pro-ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki net dengenin zaman içindeki modifikasyonları sorumlu görünmektedir (18). İn vivo ve in vitro anjiogenik aktiviteye sahip çok sayıda biyolojik faktör vardır. Bunların en önemlilerinden biri vasküler endotelial growth faktördür (VEGF). Endotelial hücre büyümesini ve anjiogenezi direkt uyarır (20, 21). Vasküler sistemin gelişim ve farklılaşması için temel faktördür. VEGF, endotel hücreleri için seçici ve spesifik mitojenik etkiye sahiptir. Apoptozisi inhibe ederken, endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü uyarır. Birçok çalışmada, VEGF'nin aşırı ekspresyonunun, belirgin tümör büyümesi ve neovaskülarizasyon ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, çeşitli hayvan modellerinde, VEGF'nin terapötik olarak bloke edilmesinin primer ve metastatik tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (18). Aynı şekilde, yapılan bazı retrospektif çalışmalar, MK'nun progresyonunda VEGF'nin anahtar biyolojik role sahip olduğunu göstermiştir (18, 20, 21).

Bu çalışmada; MK olgularında VEGF ve CD44 ekspresyonunun diğer klasik prognostik faktörler ile ilişkisinin belirlenmesi yanı sıra özellikle aksiller lenf nodu metastazı üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya 1990-2000 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi (AÜTF) Patoloji Anabilim Dalında infiltratif meme karsinomu tanısı alarak modifiye radikal mastektomi ve aksiller lenf düğümü diseksiyonu uygulanan 62 hasta dahil edilmiştir. Çalışmaya

dahil edilen hastalara ait preparatlar, histolojik tümör tipi, histolojik derece, evre ve aksiller lenf düğümlerinin durumu açısından iki patolog tarafından ayrı zamanlarda yeniden değerlendirildi. Histolojik dereceleme için Bloom-Richardson sisteminin Nottingham modifikasyonu kullanıldı. Evreleme için AJCC'nin 2017'de revize ettiği TNM evreleme sistemi kullanıldı. Arşivdeki parafin bloklardan alınan yeni kesitlere tümör hücrelerinde CD44 ve VEGF ekspresyonunu göstermek için streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi kullanılarak immünohistokimyasal (İHK) boyama uygulandı. İHK'sal incelemede, literatür göz önüne alınarak sitoplazmik ve/veya sitoplazmik membrandaki sarı-kahverenkte boyanma, şiddet ve yaygınlık açısından değerlendirildi. Yaygınlık için doku kesitlerindeki tüm tümöral hücreler kontrol edildi. CD44'teki immünreaktivite incelenirken hiç ekspresyon olmayan olgular negatif (0), tümör hücrelerinin %5'inden azında zayıf boyanma olanlar 1+, %5-75 hücrede orta derecede ya da heterojen boyanma olanlar 2+, %75'ten fazla hücrede güçlü ve homojen boyanma olanlar ise 3+ olarak değerlendirildi. VEGF ekspresyonu değerlendirilirken boyanma olmayan olgular negatif; tümör hücrelerinin %10'undan azında boyanma olanlar 1+, %10'undan fazlasında zayıf sitoplazmik boyanma olanlar 2+ ve %10'undan fazla tümör hücresinde kuvvetli sitoplazmik boyanma olanlar 3+ olarak belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen tüm bulgular arasında anlamlı ilişki olup olmadığını araştırmak için "Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 20.0 for Windows, USA" programından faydalanıldı. Verilerin değerlendirilmesinde sayı ve yüzdeler yanı sıra tanımlayıcı istatistiksel yöntemler (ortalama, standart sapma) kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluklarının belirlenmesi için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Ayrıca verilerin çarpıklık ve basıklık değerlerine de bakılarak bu değerleri -1.5 ile +1.5 arasında olanlar normal dağılıma uygun olarak kabul edildi. Normal dağılıma uyan verilerin değerlendirilmesinde parametrik testlerden "Tek yönlü ANOVA (Post-Hoc test olarak Duncon ve Tukey)", normal olmayan dağılıma sahip verilerin değerlendirilmesinde ise non-parametrik testlerden "Kruskal-Wallis" testi kullanıldı. Yanılma düzeyi olarak 0.05 değeri seçildi. Bu değere eşit ya da küçük p değerleri için "istatistiksel olarak önemli (anlamlı) farklılığın / ilişkinin olduğu" yorumu yapıldı.

BULGULAR

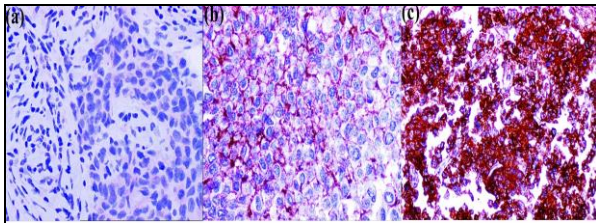
Olgularda tanı sırasında en küçük yaş 30, en büyük yaş 75 olup, ortalama yaş 50.70±10.66 idi. Olguların 26 tanesi (%41.9) 50 yaş altında iken, 36 tanesi (%58.1) 50 yaş ve üzerinde idi. Tümör boyutları 1-9 cm arasında değişmekte olup, ortalama çap 4.56±1.99 idi. Olguların yedisinde (%11.3) makroskobik tümör çapı 1-2 cm arasında, 35'inde (%56.5) 2-5 cm arası, 20'sinde

(%32.3) ise 5 cm'nin üzerinde idi. Olgularda göğüs duvarına veya cilde yayılım tespit edilmedi. Olguların 41'i (%66.1) invaziv duktal karsinom (İDK), dokuzu (%12.9) invaziv lobuler karsinom (İLK), dördü (%6.5) müsinöz (kolloid) karsinom, dördü (%6.5) medüller karsinom ve dördü (%6.5) mixt (İDK + İLK) meme karsinomu olarak tespit edildi. Aksillada en az dört en çok 30 lenf nodu diseksiyonu yapılmıştı. Lenf nodu metastazı, olguların 45'inde (%72.6) izlenirken, 17'sinde (%27.4) izlenmedi. Lenf nodu tutulumu olanların 21'inde (%33.9) 1-3, 24'ünde ise (%38.7) 4-9 lenf nodu metastaz tespit edildi. Olgulara ait klinikopatolojik özelliklerin detayları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Olguların klinikopatolojik özellikleri.

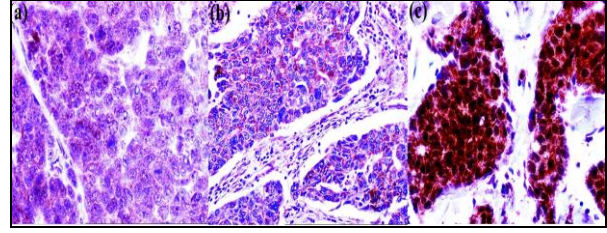
		n	(%)
Yaş	50 yaş altı	26	41.9
	50 yaş ve üzeri	36	58.1
Tümör Çapı	1-2 cm	7	11.3
	2-5 cm	35	56.5
	5 cm	20	32.3
Histolojik Tip	İDK	41	66.1
	İLK	9	14.5
	MEK	4	6.5
	Mixt Meme Karsinomu	4	6.5
	Müsinöz Karsinom	4	6.5
Histolojik Grade	Grade 1	8	12.9
	Grade 2	37	59.7
	Grade 3	17	27.4
Lenf nodu met.	yok	17	27.4
	1-3	21	33.9
	4-9	24	38.7
TNM	IA	4	6.5
	IIA	10	16.1
	IIB	18	29.0
	IIIA	30	48.4

İHK'sal olarak CD44 ekspresyonu değerlendirildiğinde; olguların sekizi (%12.9) negatif, 20'si (%32.3) 1+ (Şekil 1a), 27'si (%43.5) 2+ (Şekil 1b) ve yedisi (%11.3) 3+ (Şekil 1c) olarak belirlendi.



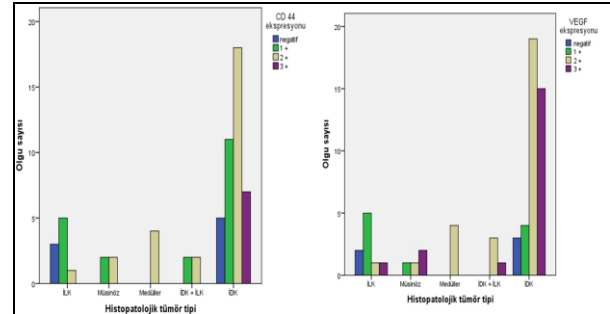
Şekil 1. a, b, c. Örneklerde meme kanserli olgularda immunohisto-kimyasal olarak CD44 ekspresyonu görülmektedir. Olguların %32.3'ünde 1+ immünreaktivite vardı (a, CD44 X200). Olguların %43.5'inde 2+ (b, CD44 X200) ve %11.3'ünde 3+ immünreaktivite (c, CD44 X200) elde edildi.

VEGF ekspresyonuna bakıldığında ise olguların beşinde (%8.1) boyanma izlenmezken 10'u (%16.1) 1+ (Şekil 2a), 28'i (%45.2) 2+ (Şekil 2b) ve 19'u (%30.6) 3+ (Şekil 2c) olarak tespit edildi.



Şekil 2. a, b, c. Şekilde meme kanserli olgularda immunohisto-kimyasal yöntemle VEGF ekspresyonu görülmektedir. Olguların %16.1'inde 1+ (a, VEGF X200), %45.2'sinde 2+ (b, VEGF X200) ve %30.6'sında 3+ immünreaktivite (c, VEGF X200) elde edildi.

Histolojik tümör tipine göre CD44 ekspresyonuna bakıldığında; İLK'lı olguların üçünde (%33.3) boyanma izlenmezken, beşi (%55.6) 1+, biri ise (%11.1) 2+ olarak tespit edildi. İDK'lı olguların ise beşinde (%12.2) boyanma izlenmezken, 11'i (%26.8) 1+, 18'i (%43.9) 2+ ve yedisi (%17.1) 3+ olarak belirlendi. En yoğun boyanma (3+) sadece İDK'lu hastalarda görüldü. Benzer şekilde VEGF ekspresyonu da İDK'lu olguların çoğunda 2+ ve 3+ olarak tespit edildi (Şekil 3). Histolojik tümör tipi ile CD44 ve VEGF ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu görüldü (Kruskal Wallis, sırasıyla $p < 0.001$, $p = 0.007$) (Şekil 3).



Şekil 3. Histolojik tümör tipine göre CD44 ve VEGF ekspresyonu. Tümör tipleri arasında ekspresyonlar açısından belirgin farklılık mevcuttur (Kruskal Wallis, sırasıyla $p < 0.001$, $p = 0.007$). İLK olgularının çoğu negatif ya da 1+ immünreaktivite gösterirken, İDK olgularında genellikle 2+ ve 3+ ekspresyon görülmüştür.

Diğer yandan yaş, makroskopik tümör çapı ve inflamatuvar reaksiyon gibi diğer bazı klasik prognostik faktörler ile de CD44 ve VEGF ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon yoktu.

Bu serideki olgularda histolojik derece ile CD44 ve VEGF ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu tespit edildi (Anova, sırasıyla $p = 0.012$ $p = 0.003$). Histolojik derece arttıkça immünreaktivite şiddetinin de arttığı tespit edildi. Ekspresyon yoğunluğunda, özellikle histolojik derece 1 tümörlerle derece 3 tümörler arasında belirgin farklılık olduğu görüldü (Tablo 2).

Tablo 2. Histolojik dereceye göre CD44 ve VEGF ekspresyonunun değişimi. Derece 3 tümörlerde daha yoğun ekspresyon tespit edilmiştir.

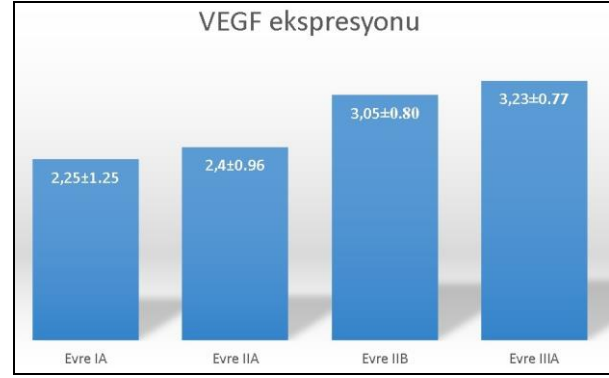
	Histolojik derece 1	Histolojik derece 2	Histolojik derece 3	p
CD 44 ekspresyonu	2.0±0.75	2.43±0.80	3.0±0.86	0.012
VEGF ekspresyonu	2.37±1.18	2.86±0.82	3.52±0.62	0.003

Olguların CD44 ekspresyonuna göre lenf nodu metastazına bakıldığında; CD44 negatif olguların yedisinde hiç lenf nodu metastazı görülmezken sadece bir olguda 1-3 lenf nodu metastazı izlendi. Şiddetli ekspresyona (3+) sahip olgularda ise lenf nodu metastazı olmayan vaka yoktu. Bu olguların %57.1'inde 4-9 lenf nodu metastazı izlendi. CD44 ekspresyonu ile lenf nodu metastazı arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi (Anova p <0.001). Özellikle 4-9 lenf nodu metastazı olan olgularda diğer gruplardan farklı olarak daha yoğun CD44 ekspresyonu olduğu dikkat çekti (Tablo 3). Aynı şekilde VEGF ekspresyonu arttıkça metastatik lenf nodu sayısının arttığı görüldü (Tablo3). Bu çalışmada, lenf nodu metastazı ile VEGF ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu belirlendi (Anova p =0.013).

Tablo 3. CD44 ve VEGF ekspresyonu ile aksiller lenf nodu metastazı arasındaki ilişki. Ekspresyon şiddeti arttıkça lenf nodu metastazı sayısının arttığı görülmektedir.

	Lenf Nodu Metastazı			p
	negatif	1-3 pozitif	4-9 pozitif	
CD44 ekspresyonu	1.82±0.80	2.61±0.80	2.95±0.62	<0.001
VEGF ekspresyonu	2.58±1.06	2.85±0.8	3.37±0.64	0.013

Olguların CD44 ekspresyonuna göre TNM evresine bakıldığında; evre IA ve IIA olguların %87.5'inde ekspresyon izlenmediği görüldü. İleri evre 48 olgunun ise 32'sinde (%66.7) 2+ ve 3+ immünreaktivite elde edildi. Özellikle evre IA ile evre IIB ve IIIA olgular arasında CD44 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak belirgin farklılık olduğu görüldü (Anova, p <0.001). VEGF ekspresyonuna bakıldığında; benzer şekilde ileri evre 48 olgunun (evre IIB ve IIIA) 41'inde (%85.4) şiddetli ekspresyon tespit edildi. Tümörün evresi arttıkça VEGF ekspresyonunun da arttığı görüldü (Şekil 4).



Şekil 4. Tümörün TNM evresi ile VEGF ekspresyonu arasındaki ilişki. İleri evre tümörlerde VEGF ekspresyonunun daha fazla olduğu görülmektedir (Anova, p =0,021).

Bu çalışmada evre ile VEGF ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu belirlendi (Anova, p =0.021).

TARTIŞMA

MK dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümördür ve kansere bağlı ölümlerde dördüncü sıradadır (22-24). MK'nda hastalığın seyrini önceden belirleyebilmek ve en iyi tedavi seçeneğine karar verebilmek için kullanılan klasik prognostik faktörler: yaş, tümör boyutu, lenf nodu durumu, histolojik derece, lenfovasküler invazyon ve tümörün evresidir (25). Bunlar içinde en güçlü prognostik belirleyiciler lenf nodu tutulumu, tümör boyutu ve histolojik grade'dir (25, 26). Özellikle tümör boyutuyla birlikte lenf nodu metastazının varlığı hastalığın en önemli prognostik belirleyicilerinden olan TNM evresinin temelini oluşturur (25-27). Sağkalım, tekrarlayan hastalık, tekrarlama aralığı ve tedavi başarısı, pozitif aksiler lenf nodu sayısı ile doğrudan ilişkilidir. Pozitif lenf nodu sayısı arttıkça prognoz kötüleşmektedir. Lenf nodu metastazların varlığı ve lenf düğümlerinin sayısı, adjuvan sistemik tedavi kararına önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (25).

Bu klasik ve önemli parametreler yanı sıra bu gün için tedavi protokollerini belirleyen ER ve PR hormon reseptörlerinin durumu, yine c-erb-B2 ekspresyonunun varlığı son derece önemli prognostik belirleyiciler olarak karşımızda durmaktadır. Ancak yeni hedef tedaviler için daha güncel parametrelere de ihtiyaç vardır. Bu amaçla, bu çalışmada CD44 ve VEGF ekspresyonlarının klasik prognostik belirleyicilerle ve özellikle de lenf nodu metastazı ile ilişkisini araştırdık.

Birçok malignitede olduğu gibi, MK'nun ilerleme sürecinde de, mortalitenin primer sebebi lenf nodu metastazı ve uzak metastazlardır. Tümör hücrelerinin metastaz yapabilmeleri için öncelikle adezyonun kaybı gereklidir. Hücreler daha sonra kendini çevreleyen ECM penetre olur, oradan vasküler sisteme geçip uzak organlara yayılımı gerçekleştirirler. Adezyon moleküllerinin ekspresyon veya fonksiyonundaki bozulma, malignitelerin gelişim ve progresyonu ile yakından ilişkilidir (28). CD44, adezyon molekülleri ailesinin

önemli bir üyesidir. Ekstrasellüler glikozaminoglikanlardan Hyaluronan (H) için primer bağlanma bölgesini oluşturur. Hücre içi sinyalizasyon için CD44 - H eşleşmesi son derece önemlidir. Bu etkileşme sayesinde hücre-hücre, hücre-matriks adezyonu ve hücrelerin göçü gerçekleşir (11, 28). Bu yüzden CD44 tümör hücrelerinin diferansiasyon, invazyon ve metastazında önemli role sahiptir (11). CD44, sadece tümörlerde değil, aynı zamanda inflamasyon ve yara iyileşmesi gibi savunma mekanizmalarında, embriyonel gelişim ve apoptozis gibi önemli biyolojik olayda da hücre-matriks ilişkisi ve hücre göçü üzerinden rol alır (11, 14). Diğer yandan birçok kanserde CD44 ekspresyonunda belirgin artışı olduğu bilinmektedir (28, 29). Son yıllarda -birbirine zıt sonuçlar elde edilse de- C44 ekspresyonu ile kanserlerin metastaz ve progresyonu arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için birçok çalışma yapılmıştır (28-31). MK'nda da durum farklı değildir. Hem aşırı ekspresyonun hem de ekspresyonundaki kaybın prognostik değeri olduğunu belirten çalışmalar vardır. Ancak sonuçta; bozulmuş CD44 ekspresyonu agresif biyolojik davranışla ilişkili gözükmektedir (32, 33). Sun ve ark. (33) 120 olguluk serilerinde CD44 ekspresyonu hem lenf nodu metastazı hem de kötü prognozla yakın ilişkili bulunmuştur. Qiu ve ark. (34) 144 olguluk çalışmalarında CD44 ekspresyonu ile tümör çapı, lenf nodu metastazı, klinik evre ve ilk cerrahi sonrası uzak metastaz oranları arasında belirgin bir korelasyon olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda tümör boyutu ile CD44 ekspresyonu arasında ilişki görülmezken literatür ile uyumlu olarak CD44 ekspresyonu arttıkça lenf nodu metastazının da arttığı görülmüştür (Anova, $p < 0.001$).

Oliveira ve ark. (35) 188 vakalık çalışmalarında CD44 ekspresyonu ile 40 yaş üzerinde ve tümör çapı 2 cm'nin altındaki hastalarda ölüm riskinin diğer hastalara göre 4 kat arttığı gösterilmiştir. Yine bu hastalarda ekspresyon arttıkça tedaviye direnç oranlarının arttığı ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise yaş ve makroskobik tümör boyutu ile CD44 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki olmadığı belirlenmiştir. Çalışmamızda CD44 ekspresyonu ile lenf nodu tutulumu arasında oldukça anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür (Anova, $p < 0.001$). CD44 ekspresyonu arttıkça lenf nodu metastazı da belirgin olarak artmaktadır. Aynı şekilde histolojik derecesi yüksek hastalarda CD44 ekspresyonu daha fazla ve bu olgularda TNM evresi de daha yüksek olarak tespit edilmiştir.

VEGF, endotel hücrelerinin mitoz sürecinde tanımlanan önemli bir anjiyogenez düzenleyicisidir. VEGF'nin aşırı ekspresyonu, vasküler endotel hücrelerinin çoğalmasına ve göçüne neden olur. Anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2'yi uyararak endotel hücrelerinde apoptozisi inhibe eder. VEGF, neovaskülarizasyon ile tümör anjiyogenezini teşvik eder (18, 36). Bu nedenle tümör büyümesiyle yakından ilişkilidir ve yeni bir prognostik araç olarak kabul edilebileceği öngörülmektedir (37). Ayrıca son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda anti-VEGF ajanların klasik kemoterapi protokollerine ilave edilmesinin, patolojik remisyon oranlarını ve

hastalıklı sağ kalımı artırdığı ifade edilmektedir (36). VEGF'nin tümör hücrelerindeki artmış anjiyogenik aktivitesinin moleküler temeli net olarak anlaşılamamıştır. Ancak, tümöral dokudaki hipoksik ortam, p53 gibi bazı tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, interlökin-1beta ve interlökin-6 gibi sitokinlerin varlığı gibi faktörlerin, gerek VEGF ekspresyonu artırarak gerekse VEGF'nin reseptör miktarını değiştirerek neovaskülarizasyon ile tümör anjiyogenezini uyardığı düşünülmektedir (18, 36). Son yıllardaki çalışmalarda, birçok malignitede VEGF aşırı ekspresyonu gösterilmiştir (38-41). Kitadai ve ark. (41) özefagusun yassı epitel hücreli karsinomlarında yaptıkları bir çalışmada; VEGF ekspresyonu ile tümör invazyon derinliği, lenfovasküler invazyon, lenf nodu metastazı ve evre'nin yakından ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. VEGF ekspresyonunun prognostik değerini araştıran çalışmalar, MK'lu olgularda da yapılmıştır. Bunların çoğu, MK'nun anjiyogenez bağımlı bir tümör olduğunu göstermiştir (38-40, 44-46). Artmış VEGF ekspresyonu, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz ile koreledir. Özellikle uzak metastaz sıklığı, tümörün vasküler yoğunluğu ile doğrudan ilişkili bulunmuştur. Literatürle uyumlu olarak bizim çalışmamızda da VEGF ekspresyonu ile lenf nodu metastazı arasında anlamlı ilişki olduğu görülmüştür (Anova, $p = 0.003$).

Yang ve ark. (38) 129 meme materyali üzerinde yaptıkları çalışmada yaş, tümör çapı, histolojik derece ve lenf nodu metastazı ile VEGF ekspresyonu arasında anlamlı ilişki olmadığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da yaş ve tümör boyutu ile VEGF ekspresyonu arasında korelasyon izlenmezken, VEGF ekspresyonu arttıkça lenf nodu tutulumunun arttığı görülmüştür.

Choi ve ark. (44) 1'i papiller, 6'sı lobuler, 22'si duktal olmak üzere toplam 29 invaziv MK olgusunda yaptıkları çalışmada VEGF ekspresyonu, lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Benzer bir çalışmada Tsutsui ve ark. (47) 249 olguluk bir seride VEGF'nin lenf nodu tutulumu, hastalıklı ve genel sağkalım oranları ile yakından ilişkili olduğunu belirtmiştir. Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak lenf nodu metastazı ile VEGF ekspresyonu arasında anlamlı ilişki mevcuttur. Ancak literatürdeki bazı serilerden farklı olarak bizim çalışmamızda histolojik derece ile de VEGF ekspresyonu arasında anlamlı ilişki olduğu tespit edilmiştir. Yüksek dereceli tümörlerde VEGF ekspresyonunun şiddeti düşük dereceli tümörlerden daha fazladır.

Bu konuyla ilgili diğer bazı çalışmalarda, Matilla ve ark. (48) östrojen bağımlı MK hücrelerinde VEGF aşırı ekspresyonu ile tümör içi lenfanjiyogenez ve lenf nodu metastazı arasında anlamlı ilişki olduğunu belirtmiştir. Yine Stacker ve ark. (49) VEGF'nin metastatik tümör hücrelerinin lenfatikler içerisine yayılmasını sağladığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak lenf nodu metastazı ve histolojik derecenin VEGF ekspresyonu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Yüksek dereceli ve lenf nodu metastazı bulunan olgularda daha yüksek oranda VEGF ekspresyonu bulunduğu dikkat çekmiştir.

Sonuç olarak, bulgularımız, MK hücreleri tarafından yüksek düzeyde VEGF ekspresyonunun anjiogenezise neden olabileceğini düşündürmektedir. CD44 ile birlikte VEGF ekspresyonu, lenfatik damar invazyonuna ve lenf düğümlerine metastatik yayılmaya katkıda bulunmaktadır. Hastalığın TNM evresi ve tümörün histolojik

derecesi ile CD44 ve VEGF ekspresyonu yakından ilişkilidir. Bu nedenle MK'da hastalığın seyrini önceden belirleyebilmek ve yeni tedavi protokolleri bulabilmek için CD44 ve VEGF ekspresyonu, araştırılmaya değer niteliktedir.

KAYNAKLAR

- Berner HS, Suo Z, Risberg B et al. Clinicopathological associations of CD44 mRNA and protein expression in primary breast carcinomas. *Histopathology* 2003; 42: 546-54.
- Seemayer CA, Breuer E, Kroll G et al. Incidence and tumour stages of the breast cancer in the region of Aachen, Germany. *Eur J Cancer Care* 2002; 11: 16-24.
- Rosai J. Breast. in: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Ninth Edition, London: Elsevier Inc 2004: 1763-76.
- İrgil E: Meme kanseri epidemiyolojisi. İçinde: Ünal G, Ünal H (Editörler). Meme Hastalıkları. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd 2001: 227-33.
- Üskent N. Meme kanserinin doğal seyri, gelişimi, risk faktörleri dünyadaki dağılımı ve epidemiyolojisi. İçinde: Olgular Işığında Meme Kanseri. İzmir. Turgut Yayıncılık ve Tic. A.Ş 2003: 1-15.
- Jemal A, Murray T, Ward E et al. Cancer Statistics 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 259.
- Özmen V, Fidaner C, Aksaz E et al. Türkiye'de meme kanseri erken tanı ve tarama programlarının hazırlanması "Sağlık Bakanlığı meme kanseri erken tanı ve tarama alt kurulu raporu". *Meme Sağlığı Dergisi* 2009; 5: 125-34.
- Fentiman IS. Fixed and modifiable risk factors for breast cancer. *Int J Clin Pract* 2001; 55: 527-30.
- Weidner N. Breast. In: Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM (Editors). *Modern Surgical Pathology*. First Edition, Philadelphia: Elsevier 2003: 539-628.
- Sinn HP, Heider KH, Skroch-Angel P et al. Human mammary carcinomas Express homo logues of rat metastasis-associated variants of CD44. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 307-13.
- Bankfalvi A, Terpe HJ, Breulemann D et al. Gains and losses of CD44 expression during breast carcinogenesis and tumour progression. *Histopathology* 1998; 33:107-16.
- Tse GMK, Tan PH, Ma TKF et al. CD44 is useful in the differentiation of benign and malignant papillary lesions of the breast. *J Clin Pathol* 2005; 58; 1185-8.
- Price EA, Coombe DR, Murray JC. Endothelial CD44 mediates adhesion of a melanoma cell line a quiescent human endothelial cells in vitro. *Int J Cancer* 1996; 65; 513-8.
- Ruiz P, Schwarzler C, Gunthert U. CD44 isoforms during differentiation and development. *BioEssays* 1994; 17; 17-24.
- Haynes BF, Liao HX, Patton KL. The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple functions, multiple forms. *Cancer Cells* 1991; 3; 347-50.
- Gunthert U: CD44: a multitude of isoforms with diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 1993; 184; 47-63.
- Jansen RHL, Joosten ASR, Arends JW et al. CD44v6 is not a prognostic factors in a primary breast cancer. *Ann Oncol* 1998; 9; 109-11.
- Gasparini G: Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 2000; 5; 37-44.
- Jacqueline A, Pauline JC, Downey S 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.
- Ersöz ŞA: Meme karsinomlarında anjiogenezin histopatolojik veriler ile karşılaştırılması. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD. Uzmanlık Tezi. Trabzon 2002.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386; 671-4.
- Urru SAM, Gallus S, Bosetti C et al. Clinical and pathological factors influencing survival in a large cohort of triple-negative breast cancer patients. *BMC Cancer* 2018; 18: 56.
- Sengal AT, Haj-Mukhtar NS, Elhaj AM, Bedri S, Kantelhardt EJ, Mohamedani AA. Immunohistochemistry defined subtypes of breast cancer in 678 Sudanese and Eritrean women; hospitals based case series. *BMC Cancer* 2017; 17: 804.
- Luo A, Wu F, Han R et al. Clinicopathological features and prognostic evaluation of bone metastasis in triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Ther* 2017; 13: 778-84.

25. Peiris H, Mudduwa L, Thalagala N, Jayatilake K. The value of Nottingham grade in breast cancer revisited in the Sri Lankan setting. *Malays J Pathol* 2017; 39: 141-8.
26. Freitas R Júnior, Nunes RD, Martins E et al. Prognostic factors and overall survival of breast cancer in the city of Goiania, Brazil: a population-based study. *Rev Col Bras Cir* 2017; 44: 435-43.
27. Kondov B, Isijanovska R, Milenkovic Z et al. Impact of size of the tumour, persistence of estrogen receptors, progesterone receptors, HER2Neu receptors and Ki67 values on positivity of axillary lymph nodes in patients with early breast cancer with clinically negative axillary examination. *Open Access Maced J Med Sci* 2017; 5: 825-30.
28. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Front Cell Dev Biol* 2017; 5: 18.
29. Lopez JI, Camenisch TD, Stevens MV et al. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res* 2005; 65: 6755-63.
30. Franchi A, Moroni M, Paglierani M, Santucci M: Expression of CD44 standard and variant isoforms in parotid gland and parotid gland tumours. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 564-8.
31. Hosford S, Elliott J, Ma ZW et al. CD44 expression in papillary serous endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13: 480-4.
32. Sanmartín E, Ortiz-Martínez F, Pomares-Navarro E et al. CD44 induces FOXP3 expression and is related with favorable outcome in breast carcinoma. *Virchows Arch* 2017; 470: 81-90.
33. Sun H, Liu T, Zhu D et al. HnRNPM and CD44s expression affects tumor aggressiveness and predicts poor prognosis in breast cancer with axillary lymph node metastases. *Genes Chromosomes Cancer* 2017; 56: 598-607.
34. Qiu Y, Pu T, Guo P et al. ALDH(+)/CD44(+) cells in breast cancer are associated with worse prognosis and poor clinical outcome. *Exp Mol Pathol* 2016; 100:145-50.
35. Oliveira RV, Souza VB, Souza PC et al. Detection of Putative Stem-cell Markers in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast by Immunohistochemistry: Does It Improve Prognostic/Predictive Assessments? *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2018; 26: 760-8.
36. Jiang W, Li Y, Ou J et al. Expression analysis of E-cad and vascular endothelial growth factor in triple-negative breast cancer patients of different ethnic groups in western China. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96: 42.
37. Wang Q, Sun L, Yan J, Wang S, Zhang J, Zheng X. Expression of vascular endothelial growth factor and caspase-3 in mucinous breast carcinoma and infiltrating ductal carcinoma-not otherwise specified, and the correlation with disease-free survival. *Oncol Lett* 2017; 14: 4890-6.
38. Yang W, Klos K, Yang Y et al. Erb B2 overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A, C, and D in human breast carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 2855-61.
39. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG et al. Induction of lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nature Medicine* 2001; 7: 192-8.
40. Gasparini G: Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 2000; 5: 37-44.
41. Kitadai Y, Amioka T, Haruma K et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93: 662-6.
42. Guang-Wu H, Sunagawa M, Jie-En L et al. The relationship between microvessel density, the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), and the extension of nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2000; 110: 2066-9.
43. Jiang JB, Li XM, Zhang WD et al. Relationship of vascular endothelial growth factor-C and lymphangiogenesis with development and prognosis of colon cancer. *Cancer* 2005; 8: 516-9.
44. Choi WL, Lewis MM, Lawson D et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Modern Pathology* 2005; 18: 143-52.
45. Linderholm B, Lindahl T, Holmberg L et al. The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 2256-60.
46. Linderholm B, Grankvist K, Wilking N et al. 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.
47. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K et al. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol Rep* 2005; 14: 425-31.
48. Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T et al. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *Int J Cancer* 2002; 98: 946-51.
49. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001; 7: 186-91.

İlknur ÇALIK	0000-0003-2160-7453
Muhammet ÇALIK	0000-0003-4553-6282
Sare ŞİPAL	0000-0002-5369-5251
Betül GÜNDOĞDU	0000-0002-3786-3286