

Memede Kitle Tespit Edilen Kadınlarda Doku ve Serum VEGF-A, Endostatin ve S100A4 Düzeyleri

Tissue and Serum VEGF-A, Endostatin and S100A4 Levels in Women with Breast Tumour

Yılmaz Özalp*

Merih Güray Durak**

Sezer Uysal***

Ali Sevinç****

Serdar Saydam****

Tülay Canda**

Banu Önvural***

*Elbistan Devlet Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, Kahramanmaraş

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, İzmir

***Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir

****Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İzmir

ÖZET

Amaç: Meme kanseri gibi solid tümörlerin gelişim, invazyon ve metastaz yeteneğine sahip olabilmeleri, anjiyogenez varlığına bağlıdır. Bu çalışmanın amacı, benign meme hastalıklı, aksiller metastaz yapmış ve yapmamış meme kanseri hastalarında anjiyogenez düzenleyicilerinden vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A) ve endostatinin (ES) ve S100A4 proteininin doku ekspresyonlarının ve serum düzeylerinin saptanması ve klinikohistopatolojik değişkenler ile ilişkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma grupları benign meme hastalığı olan 32 hasta, aksiller lenf nodu metastazı olmayan 39 meme kanseri hastası ve aksiller metastazı olan 18 meme kanseri hastasında oluşmaktaydı. VEGF-A, ES, S100A4 proteinlerinin doku ekspresyonları immunhistokimyasal yöntemle, serum düzeyleri ELISA ile saptandı.

Bulgular: VEGF-A, ES ve S100A4'ün doku ekspresyonlarında hasta grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Serum VEGF-A ve VEGF-A/ES oranı metastazlı grupta benign gruba göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0.006$ ve $p=0.010$). Ayrıca serum VEGF-A/ES oranı metastazlı grupta, metastazsız malign gruptan anlamlı yüksek idi ($p=0.048$). Serum VEGF-A ve VEGF-A/ES oranı 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 ($p=0.034$).

Sonuç: Serum ve doku S100A4 düzeylerinin memede kitle saptanan hastalar için metastaz olup olmadığını belirlemede kullanılamayacağını; bu amaçla serum VEGF-A/ES oranının kullanılabileceğini, artmış serum VEGF-A düzeylerinin metastatik sürece geçişin bir göstergesi olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Meme kanseri, VEGF-A, endostatin

ABSTRACT

Objective: Growth, invasion and metastase potential of solid tumours like breast cancer depends on the presence of angiogenesis. 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. Correlation of tissue and serum parameters with clinicohistopathological variables and angiogenic balance in predicting metastasis were also investigated.

Materials and Methods: 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.

Results: 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 ratio 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 ratio was significantly higher in the metastasis group than the non-metastasis malign group ($p=0.048$). Serum VEGF-A and VEGF-A/ES ratio 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 ($p=0.034$).

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 ratio 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, VEGF-A, endostatin

GİRİŞ

Anjiyogenezin çeşitli malign tümörlerin gelişimi, ilerlemesi ve tümör hücrelerinin yayılımında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Anjiyogenez ve lenfanjiyogenez bu kritik süreçte tümör hücrelerince salınan çeşitli moleküller tarafından indüklenirler (1,2). Bunlar; çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, proanjiyogenik ve antianjiyogenik moleküllerdir. Bu faktörlerin etkilerinin arasındaki net denge anjiyogenezin derecesini belirlemektedir. Hem proanjiyogenik hem de anti-anjiyogenik sitokinler dolaşımda bulunabilmekte ve serum düzeyleri antitümör tedaviye tümör cevabının izlenmesinde yardımcı olabilmektedir (3). Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) bilinen en etkili pro-anjiyogenik faktörlerden biridir ve anjiyogenezin kontrolünde önemli rol oynar (4,5). 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) (4,5). VEGF, anjiyogenezin farklı basamaklarında etkili olup çok fonksiyonludur (4). Endotel hücre (EC) per-

meabilite ve sağkalım artışı, göçü, proliferasyonunun düzenlenmesi ve invazyon bu fonksiyonlardandır (6,7). VEGF ailesine dahi olan moleküller farklı reseptörler aracılığı ile anjiyogenik etkilerini göstermektedirler (8). VEGF ekspresyonunun artışı birçok tümör tipinde hastalığın progresyonu ile ilişkili bulunmuştur (9).

Antianjiyogenik bir molekül olan endostatin (ES) ilk kez O'Reilly ve arkadaşları tarafından 1996 yılında, kollajen tip XVIII'in 20 kDa'luk proteolitik fragmanı olarak mürin hemanjiyoendotelyoma (EOMA) hücrelerinden izole edilmiştir (10,11). Endostatin, endotel hücrelerinin proliferasyonunu önleyici direkt etkisi yanında, VEGF'nin sentez ve sekresyonunu azaltarak ya da VEGF reseptörü ile etkileşip VEGF sinyal iletimini bozarak da anjiyogenezi ve tümör gelişimini önlemektedir (12,13).

S100A4, kalsiyum bağlayıcı proteinlerden S100 ailesinin bir üyesi olup, intraselüler ve ekstraselüler fonksiyonlara sahiptir (14,15). S100A4'ün ekstraselüler matriksin yeniden düzenlenmesine, anjiyogenez ve tümör invazyonunu kolaylaştırarak tümörün ilerle-

mesine ve metastaza yol açması nedeniyle çeşitli tümörlerde prognostik faktör olabileceği düşünülmektedir (16,17). S100A4'ün erken evre meme kanserinde metastatik potansiyeldeki kritik değişikliklerin belirleyicisi olabileceği de bildirilmektedir (18).

Literatürde bu üç parametrenin (VEGF-A, ES, S100A4) meme kanserinde dokuda ve serumda birlikte incelendiği çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada; benign meme hastalıklarında, aksiller metastaz yapmış ve yapmamış meme kanserlerinde S100A4, VEGF-A, ve endostatinin doku ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak incelenmesi, metastazi öngörmedeki yarı ve seruma yansımalarının olup olmadığı incelendi. Ayrıca doku S100A4 ekspresyonunun anjiyogenik düzenleyicilerden doku ve serum VEGF-A, ES ve serum VEGF-A/ES oranı ile ilişkisi, sözü edilen parametrelerin serum değerlerinin klinikohistopatolojik parametrelerle olan ilişkisi araştırılarak anjiyogenik dengenin prognozu öngörmedeki yeri tartışıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Genel Cerrahi Polikliniğine Ekim 2008-Haziran 2009 arasında memede kitle ön tanısıyla gelen, elektif şartlarda meme biyopsisi planlanan kadın hastalardan anestezi öncesi 6-8 ml venöz kan alındı. Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik kurulu onayı alındıktan sonra başlatılan çalışma için tüm hastalardan bilgilendirilmiş onamlar alındı. Primer tanıda malign ve benign lezyon tespit edilen toplam 89 hasta çalışmaya dahil edildi. Daha önce meme kanseri öyküsü olan, neo-adjuvan kemoterapi veya radyoterapi alanlar çalışmaya alınmadı.

Histopatolojik olarak değerlendirilen hastaların histolojik tipleri invaziv duktal karsinom (n=21), invaziv lobüler karsinom (n=9), miks (invaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom) veya farklı bir tümörle birlikte (n=13), duktal veya lobüler karsinoma in situ (n=10), diğer malign tümörler (n=4), fibro-

kistik değişiklikler (n=10), fibroepitelyal tümörler (n=20) ve diğer benign tümörlerden (n=2) oluşmakta idi.

Tümör boyutunun medyanı 1.4 cm olup 0.2-4 cm arasında değişmekte idi. Tüm karsinomalar histolojik olarak Elson ve Ellis tarafından modifiye edilmiş Scarf Bloom ve Richardson's metodu kullanılarak derecelendirildi.

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, lenf damarı invazyon varlığı, tümörün östrojen ve progesteron reseptörü ve c-erbB2 durumu değerlendirildi.

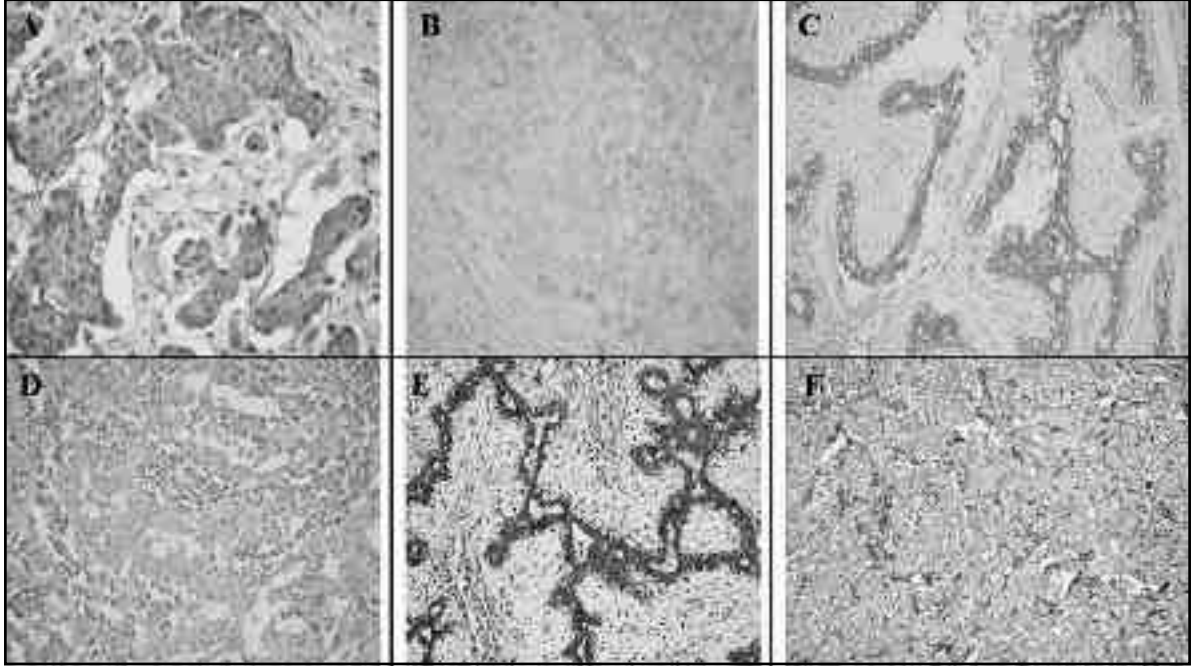
Serum Parametrelerinin Analizi

Hasta serumlarında VEGF-A düzeyi ölçümü Bender MedsSystems (Katolog no: BMS277/2 ve BMS277/2TEN, Vienna, Austria) marka ELISA kiti ile, serum endostatin düzeyi ölçümü R&D Quantikine Human Endostatin İmmunoassay (Katolog No: DNST0, United States of America) marka ELISA kiti ile, serum S100A4 düzeyi ölçümü CircuLex's S100A4 (Katolog No: CY-8059, Japan) ELISA kiti ile gerçekleştirildi.

İmmunohistokimyasal Analizler

Çalışmaya dahil edilen hastaların doku örneğinde VEGF-A (M727, DakoCytomation, Denmark), Endostatin (ab3453, Abcam, United States of America) ve S100A4 (A5114, DakoCytomation, Denmark) proteinlerinin ekspresyonları, immunohistokimyasal olarak streptavidin biotin peroksidaz yöntemi ile çalışıldı.

Parafin bloklardan 4 mikron kalınlığında kesilen doku örnekleri deparafinize edilip azalan alkol serilerinden geçirilerek suda yıkandı. 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



Şekil 1. İmmunohistokimyasal boyanma örnekleri. (A).VEGF-A ekspresyonu (x200 büyütme) (pozitif sonuç). (Boyanma yoğunluğu: orta şiddette=2, boyanma yaygınlığı: %25-50=2; toplam skor: 2+2=4: pozitif) (B). VEGF-A ekspresyonu (x400 büyütme) (negatif sonuç). (Boyanma yoğunluğu: hiç boyanma yok=0, boyanma yaygınlığı: %0=0; toplam skor: 0+0=0: negatif) (C). Endostatin ekspresyonu (x200 büyütme) (pozitif sonuç). (Boyanma yoğunluğu: güçlü boyanma=3, boyanma yaygınlığı: %1-25=1; toplam skor: 3+1=4: pozitif) (D). Endostatin ekspresyonu (x400 büyütme) (negatif sonuç). (Boyanma yoğunluğu: hiç boyanma yok=0, boyanma yaygınlığı: %0=0; toplam skor: 0+0=0 negatif) (E). S100A4 ekspresyonu (x200 büyütme) (pozitif sonuç). (Boyanma yoğunluğu: güçlü boyanma=3, boyanma yaygınlığı: %51-75=3; toplam skor: 3+3=6: pozitif) (F).S100A4 ekspresyonu (x200 büyütme) (negatif sonuç). (Boyanma yoğunluğu: hiç boyanma yok=0, boyanma yaygınlığı: %0= 0; toplam skor: 0+0=0 negatif).

işlem uygulanmadı. Tüm kesitler Tris tamponu ile yıkandıktan sonra %3'lük H₂O₂ ile endojen peroksidaz ile bloke edildi. Kesitler üzerine önce primer antikolar, daha sonra ise sekonder antikolar damlatıldı. Boyanmanın görünür hale getirilmesi için diaminobenzidin kullanıldı. Zıt boyama Mayer's hematoksilen ile yapıldı.

İmmunohistokimyasal boyanma x100, x200, x400 büyütmeli 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 (19). Boyanma yaygınlığı değerlendirilirken boyayı pozitif olarak tutan bölgenin tüm preparat yüzeyine olan oranı temel alındı. Bu oran; hiç

boyanma yok ise '0' (Şekil 1.B, D), %1-25 arası boyanma var ise '1' (Şekil 1.C), %26-50 arası boyanma var ise '2' (Şekil 1.A), %51-75 arası boyanma var ise '3' (Şekil 1.E) ve %76-100 arası boyanma var ise '4' olarak değerlendirildi. Boyanma yoğunluğu ise; hiç boyanma olmamışsa '0' (Şekil 1.B, F), zayıf boyanma olmuşsa '1', orta şiddette boyanma olmuşsa '2' (Şekil 1.A) ve güçlü boyanma olmuşsa '3' olarak değerlendirildi (Şekil 1.E).

Boyanma yaygınlığı ve boyanma yoğunluğu skorlarının toplamı ≤ 2 ise negatif, 2'nin üzerinde ise pozitif olarak değerlendirildi. İHK bulgularının serum parametreleriyle korelasyonu araştırılırken boyanma yoğunluğu ve yaygınlığının toplam skoru esas alındı. Değerlendirmenin tamamı tek bir uzman patolog tarafından yapıldıktan sonra her gruptan rastgele seçilen hastalar (toplamın

%22.5'i) ikinci bir uzman patoloğ tarafından tekrar değerlendirildi. Tutarlılığın %90'ın üzerinde olduğu gözlemlendi.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirmeler için 'SPSS for Windows 15.0' programı kullanıldı. 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 ile, kategorize edilen nonparametrik parametreler için Ki kare testi ile yapıldı. Grup parametreleri arasındaki korelasyonu belirlemek için Spearman Korelasyon testi kullanıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışma Grubu

Histopatolojik inceleme sonuçlarına göre çalışmaya dahil edilen 89 hastanın 18'i (%20.2) aksiller metastaz yapmış (metastazlı grup: Grup A) ve 39'u (%43.8) yapmamış (malign grup: Grup B) meme kanseri hastası, 32'si (%36.0) benign meme hastalığı (benign grup: Grup C) olan kadınlardan oluşmaktaydı.

Hasta gruplarının yaş ortalamaları ve menapoz durumları Tablo 1'de görülmektedir. Yaş ortalamaları karşılaştırıldığında, metastazsız

malign grubun yaş ortalaması metastazlı malign ve benign gruba göre anlamlı yüksek saptandı (sırasıyla $p=0.009$ ve $p<0.001$).

Menapoz durumlarına göre değerlendirildiğinde, premenapozdaki hasta oranı metastazlı malign grupta metastazsız malign gruba göre daha yüksek bulundu ($p=0.019$). Aynı zamanda metastazsız malign grupta postmenapozdaki hasta oranı benign gruptakinden anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0.001$).

Hasta Gruplarında Serum ve Dokuda VEGF-A, ES, S100A4; Serum VEGF-A/ES Oranı

Hasta gruplarında doku VEGF-A, ES ve S100A4 ekspresyonları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

Serum konsantrasyonları Tablo 2'de verilmiştir. Serum VEGF-A düzeyleri metastazlı malign grupta benign gruba göre anlamlı yüksek idi ($p=0.006$). Üç farklı hasta grubundaki serum endostatin ve S100A4 düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

Serum VEGF-A konsantrasyonu ES konsantrasyonuna oranlanarak (VEGF-A/ES) anjiyogenik denge değerlendirildi. Metastazlı malign grupta serum VEGF-A/ES oranı 4.7; metastazsız malign grupta 2.7 ve benign grupta 2.9 olarak saptandı. Oran metastazlı malign grupta metastazsız malign grup ve benign gruptan anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.048$; $p=0.010$). Farklı patolojik tanılar için her üç parametrenin de serum düzey-

Tablo 1. Hasta gruplarında yaş ve menapoz durumunun karşılaştırılması.

Hasta grupları	Yaş		Menapoz Durumu			
			Premenapoz		Postmenapoz	
	n	Ort± ss - (min-max)	Sayı	%	Sayı	%
Metastazlı malign grup	18	47.7 ± 9.3 (31-63)	12	66.7 ^c	6	33.3
Metastazsız malign grup	39	55.8 ± 9.9 (34-76) ^{a,b}	13	33.3	26	66.7 ^d
Benign grup	32	41.0 ± 12.3 (15-64)	26	81.3	6	18.8

a: Metastazsız malign grupta yaş ortalaması metastazlı malign gruba anlamlı yüksek $p=0.009$

b: Metastazsız grupta yaş ortalaması benign gruba göre anlamlı yüksek $p<0.001$

c: Metastazlı grupta premenapoz oranı malign gruba göre anlamlı yüksek $p=0.019$

d: Metastazsız malign grupta postmenapoz oranı benign gruptan anlamlı yüksek $p<0.001$

Tablo 2. Üç grupta serum VEGF-A, ES, S100A4 düzeylerinin ve VEGF-A/ES oranının karşılaştırılması.

	Metastazlı malign grup		Metastazsız malign grup		Benign grup		p*
	Ortanca	% 25-75	Ortanca	% 25-75	Ortanca	%25-75	
VEGF-A (pg/mL)	331.2 ^a	240.6-372.4	208.3	130.8-410.0	193.5	109.5-300.4	0.042
ES (ng/mL)	69.6	55.9-79.7	78.7	66.6-102.8	74.3	54.8-93.8	0.111
S100A4 (ng/mL)	8.7	4.02-28.6	7.8	4.84-17.82	12.0	5.87-24.1	0.568
VEGF-A/ES	4.7 ^{b,c}	3.0-6.3	2.7	1.0-5.2	2.9	1.2-4.0	0.042

* Kruskal Wallis test sonucu

a: Metastazlı malign grupta VEGF-A düzeyleri benign gruptan anlamlı yüksek (p=0.006)

b: Metastazlı malign grupta VEGF-A/ES oranı metastazsız malign gruptan anlamlı yüksek (p=0.048)

c: Metastazlı malign grupta VEGF-A/ES oranı benign gruptan anlamlı yüksek (p=0.010)

leri, doku eksp resyonları ve serum VEGF-A/ES oranında anlamlı farklılık gözlenmedi.

Serum ve Doku Parametrelerinin Korelasyon Sonuçları

Tüm hastalar birlikte ve ayrıca gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde serum VEGF-A, ES ve S100A4 konsantrasyonları arasında anlamlı korelasyon saptanmadı.

Doku ekspresyonları incelendiğinde sadece metastazsız malign grupta her üç parametrenin birbiri ile korele olduğu gözlemlendi (Tablo 3).

Her bir grup için VEGF-A, ES, S100A4'ün serum düzeyleri ve serum VEGF-A/ES oranı ile doku ekspresyonlarının korelasyonları araştırıldı. Sadece metastazlı malign grupta serum VEGF-A/ES oranı değerleri ile doku S100A4 ekspresyonu arasında iyi derecede, anlamlı pozitif korelasyon saptandı (r=0.629; p=0.007).

Klinikohistopatolojik Değişkenler ve Araştırılan Parametreler ile İlişkileri

Klinikohistopatolojik değişkenler olarak patolojik evre, tümör boyutu, ER, PR, c-erbB2 ekspresyonları, histolojik derece, mitoz ve nükleer derece, lenf damarı invazyonu, kan

Tablo 3. Metastazsız malign grupta doku VEGF-A, ES ve S100A4 ekspresyonları arasındaki korelasyon.

		VEGF-A	S100A4
VEGF-A	r	-	0.420
	p	-	0.008
ES	r	0.512	0.412
	p	0.001	0.009

damarı invazyonu ve metastatik lenf nodu sayısı değerlendirildi. Tümör boyutu, ER, PR, c-erbB2 ekspresyonları, histolojik derece, mitoz ve nükleer derece açısından hasta grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Patolojik Evre

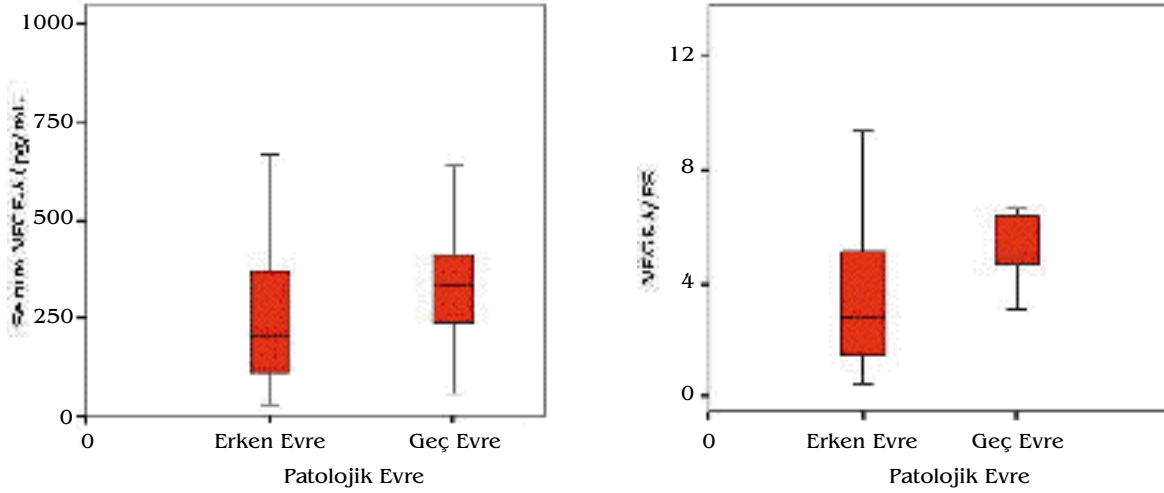
Toplam 57 meme kanseri olgusunun 55'inde patolojik evrelendirme yapıldı. Hastaların 29'u (%52.8) evre I, 14'ü (%25.4) evre II, 11'i (%20) evre III ve 1'i (%1.8) evre IV olarak değerlendirildi. Metastazsız malign gruptaki hastaların %78.4'ü evre I'de bulunmaktaydı. Metastazlı hastaların bir tanesi evre IV, diğerleri evre II ve III'te yer almaktaydı.

Tüm malign hastalar erken evre (evre I-II) ve geç evre (evre III-IV) olarak gruplandırıldığında, erken evrede bulunan hastaların serum VEGF-A düzeyleri ortancası 228.7 pg/mL, geç evrede bulunanların ise 343.7 pg/mL saptandı. Geç evrede olan hastalarda serum VEGF-A düzeyleri erken evre hastalarına göre anlamlı yüksek bulunurken (p=0.033) erken evrede bulunan hastaların serum VEGF-A/ES oranı ortancası 2.81; geç evredeki hastaların 5.07 olarak bulundu; aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (p=0.014) (Şekil 2).

Hastaların erken veya geç evrede olmaları doku ekspresyonlarında anlamlı farklılık oluşturmadı.

Hasta Gruplarında Lenf Damarı ve Kan Damarı İnvazyon Durumları

Lenf ve kan damarı invazyonu 57 meme kanseri hastasında değerlendirildi. Lenf ve



Şekil 2. Serum VEGF-A düzeyleri ve VEGF-A/ES oranının karşılaştırılması.

kan damarı invazyonunun var ya da yok oluşu gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi.

Kan damarı invazyonu varlığı ile VEGF-A konsantrasyonları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Metastaz olup olmadığına bakılmaksızın malign hastalarda, lenf damarı invazyon durumu ile serum ve doku VEGF-A ilişkisi Tablo 4'te gösterilmiştir. Lenf damarı invazyonu bulunanların VEGF-A serum düzeyleri bulunmayanlara göre anlamlı yüksek saptandı ($p=0.034$). Lenf damarı invazyonu bulunmayanlarda doku VEGF-A ekspresyonu invazyon bulunanlardan anlamlı yüksek saptandı ($p=0.015$).

Metastatik Lenf Nodu Sayısı

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

Tablo 4. Lenf damarı invazyonu ile serum VEGF-A düzeyleri ve doku VEGF-A ekspresyonlarının tüm malign hastalarda karşılaştırılması.

Lenf Damarı İnvazyonu (n)	Serum VEGF-A (pg/mL) (ortanca)	Doku VEGF-A Ekspresyonu (+) (%)
Yok (35)	225.0	82.9
Var (22)	343.4	52.4
p	0.034	0.015

gorize edilen gruplar arasında VEGF-A, ES, S100A4 düzeyleri, VEGF-A/ES oranı ve doku ekspresyonları açısından anlamlı fark bulunmadı. MLN sayısı ile serum VEGF-A düzeyleri arasında iyi derecede, anlamlı, pozitif korelasyon saptandı ($r=0.596$; $p=0.012$).

TARTIŞMA

Genç yaştaki hastalarda az diferansiye (grade III) meme karsinoma oranlarının daha yüksek görüldüğü ve agresif seyrettiği bildirilmektedir (20,21). Çalışmamızda lenf nodu metastazı gösteren meme kanseri hastalarının yaş ortalamasının metastaz bulunmayan kanserli hastalardan anlamlı düşük bulunması, genç yaştaki hastalarda meme kanserinin daha agresif seyrettiği ile ilgili literatür bilgilerini desteklemektedir.

Kanser hücrelerinde VEGF-A'nın fazla ekspresyonu çoğu tümör tipinde kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (22-24). Metastazlı dokunun da primer kanser dokusu gibi VEGF-A'yı aşırı eksprese ettiği bildirilmiştir (25). VEGF-A ekspresyonunun sadece invaziv kanser hücrelerinde değil aynı zamanda meme, serviks ve kolon gibi bazı kanserlerin prekürsör lezyonlarında da artış gösterdiği bildirilmektedir (26,27). Çalışmamızda benign meme hastaları grubunda doku VEGF-A ekspresyonları meme kanseri olanlarla benzer sap-

tanmıştır. Bu sonuç Boneberg ve arkadaşlarının sonuçlarına benzemektedir (28).

Bir çalışmada (29) İHK yöntemiyle meme kanseri biyopsi örneklerinde %95 VEGF pozitifliği saptanırken bir başkasında (30) bu oran %28 olarak bulunmuştur. Ayrıca, noninvaziv lezyonlarda da VEGF ekspresyonu gözlenmiştir. İHK'sal yöntemle doku VEGF ekspresyonunun değerlendirildiği iki çalışmada, VEGF'nin prognostik faktör olarak uygun bulunmadığı ifade edilmiştir (30,31). Çalışmamızda VEGF-A'nın doku ekspresyonu bütün gruplarda %70'ler civarında saptanmış olup hasta grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Tümör yükü artmış, yaygın metastazlı olan hastalarda dolaşımda VEGF-A'nın arttığı bildirilmiştir (25). Yüksek serum VEGF-A düzeyleri kanser progresyonu, kemoterapiye kötü yanıt, kötü sağkalım ile ilişkili bulunmuştur (32,33). Meme kanserli bir hastada serum VEGF-A düzeylerinin artışının tümörün büyümesi, rekürrensi, metastatik yayılımı belirlemede klinik olarak yararlı olabileceği, ancak minimal hastalığı olan kişilerde tarama aracı olarak yardımcı olamayacağı bildirilmektedir. Ek olarak Granato ve ark.'nın çalışmasında sağlıklı kadınlarda ve meme kanseri hastalarında saptanan serum VEGF düzeylerinin benzer olması nedeniyle meme kanserinde tanısız bir belirteç olarak yararlı olmayacağı bildirilmiştir (34).

Serum VEGF düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada benign meme tümörlü, lokalize ve metastatik meme kanseri hastalarında serum VEGF düzeyi ortancaları sırası ile 57, 104, 186 pg/mL saptanmıştır (35). Başka bir çalışmada benign lezyonlularda VEGF ortalaması 52.2 pg/mL, malign hastalarda 2136.3 pg/mL saptanmıştır (36). Çalışmamızda üç grubun ortancaları 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. Serum VEGF-A

düzeylerinin aksiller metastazlı hastalarda benign hastalara göre artmış olması, ayrıca metastatik lenf nodu sayısı ile korele bulunması prognostik faktör olarak kullanılabilirliğini, VEGF'nin metastatik süreçte rolü olabileceğini desteklemektedir.

Çalışmamızda doku ekspresyonu ile serum düzeylerinin korele olup olmadığı araştırılmış ancak korelasyon bulunmamıştır. Benzer şekilde literatürde birçok çalışmada korelasyon bulunmadığı saptanmıştır (32,34,37).

Anjiyogenezin regülasyonunda antianjiyogenik moleküller de yer almaktadır ve meme kanserinde upregüle oldukları ileri sürülmektedir (38). Çalışmamızda, anjiyogenezin negatif düzenleyicilerinden olan endostatinin doku ekspresyonları her üç grupta benzer bulunmuştur.

Bir çalışmada ES serum düzeyleri primer meme kanserli hastalarda sağlıklı kontrollere göre yüksek bulunurken, benign meme hastalığı olanlardan farklı olmadığı bildirilmiştir (38). Başka bir çalışmada ise preoperatif meme kanseri hastalarında serum endostatin düzeyleri hem benign meme hastalığı olanlardan hem de sağlıklı kontrollerden anlamlı yüksek bulunmuştur (9). Çalışmamızda ise serum endostatin düzeyleri her üç grupta benzer olup, klinikopatolojik parametreler ile herhangi bir ilişki saptanmamıştır.

ES'nin ve dolaşımdaki anjiyogenez aktivatör/inhibitör oranlarının meme kanserinde klinik önemi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (3,38,39). Shaarawy ve ark. (40) VEGF/ES'yi ileri evre endometriyal karsinomada erken evreye göre daha yüksek bulmuşlardır. Anjiyogenez uyarıcı ve önleyici moleküller arasındaki dengenin (VEGF-A/ES) tümörün ilerlemesinin değerlendirilmesinde ve metastazın kontrolünde yeni ve değerli bir gösterge olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda tedavi öncesi varolan anjiyogenik dengenin (VEGF-A/ES) aksiller metastazlı grupta, metastazsız malign ve benign

gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunması bu durumu desteklemektedir. Metastazlı malign grupta anjiyogenik denge anjiyogenezi uyarılar lehinde saptanmıştır.

Birçok çalışmada tümör evresi ile serum VEGF arasında çelişkili sonuçlar bulunmaktadır (28,36,41). Çalışmamızda anjiyogenik faktörlerin serum düzeyleri ve doku ekspresyonları ile klinikohistopatolojik parametrelerden yaş, menapozal durum, patolojik tanı, tümör boyutu, ER, PR, c-erbB2, histolojik derece, mitoz derecesi, nükleer derece ile arasında korelasyon bulunmamıştır. 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 oranı yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar serum VEGF-A ve VEGF-A/ES oranının hastalık progresyonu ile ilişkili olduğunu desteklemektedir.

Tümörlerde anjiyogenezin uyarılması yanında yeni lenfatik damarların oluşumu, yani lenfanjiyogenez de uyarılmaktadır. Lenfanjiyogenez başlıca VEGF-C, VEGF-D tarafından ve ayrıca VEGF-A ile de uyarılmaktadır (25,42). Meme kanserinde lenfatik yayılımın kanser yayılımında baskın yollardan biri olduğu bilinmektedir (43). Kamal ve ark.'nın (44) çalışmalarında serum VEGF düzeyleri ile lenf damarı yayılımı (permeation) arasında ilişki saptanmamıştır. Çalışmamızda tüm meme kanseri hastaları birlikte değerlendirildiğinde, serum VEGF-A düzeyleri lenf damarı invazyonu olanlarda olmayanlardan anlamlı yüksek çıkmıştır. Ancak, kan damarı invazyonu olanlarda anlamlı farklılık bulunmamıştır. Aksiller metastazlı grupta 18 hastanın 10'unda lenf damarı invazyonu 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 (29,44).

S100A4, metastazla ilişkili bir protein olarak kabul görmektedir (45,46). İHK yöntemi ile S100A4 ekspresyonu değerlendirilen bir çalışmada, opere edilebilir evre I-II meme kanseri hastalarının %56'sında S100A4 pozitif boyanma saptanmıştır (47). S100A4(+) boyanma ile hasta ölümü arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Meme kanseri hastalarında yapılan başka bir çalışmada ise S100A4 %80 negatif, %11 pozitif saptanmıştır. On dokuz yıllık izlem yapılan bu hastaların sağkalım analizinde medyan sağkalım S100A4 negatif grupta >228 ay olmasına karşın S100A4 pozitif grupta 47 ay olarak saptanmıştır (48). Takip eden çalışmalarda S100A4'ün metastaz ve mortalitenin güçlü bir prediktörü olduğu doğrulanmıştır (15,18). Çalışmamızda doku S100A4 protein ekspresyonu üç grup arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. Ayrıca doku ekspresyonları ile serum S100A4 düzeyleri arasında korelasyon saptanmamıştır. Öte yandan, metastazlı grupta serum VEGF-A/ES oranı ile doku S100A4 proteini ekspresyonu arasında iyi derecede, pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu durum, metastazlı grupta varolan anjiyogenik denge ile yine anjiyogenik fonksiyonu olduğu düşünülen S100A4 proteininin uyumunu göstermektedir. Bu bulgumuz Ambartsumian ve ark.'nın (49) S100A4'ün tümör progresyonunu anjiyogenezi uyararak indüklediği görüşleri doğrultusundadır.

Çalışmaya dahil edilen hasta sayısı toplamda yeterli olsa da olguların dağılımındaki heterojenitenin ve bazı hastalarda histopatolojik verilerin elde edilememiş olmasının sonuçlarımızı etkilemiş olabileceğini ve anjiyogeneze ilişkili İHK'sal çalışmalarda rapor edilen çelişkili sonuçların, immunoreaktivite değerlendirme kriterlerinin standardize edilememiş olmasından kaynaklanabileceğini

düşünmekteyiz (29,48,50). Bu konuda standardizasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda VEGF, ES ve S100A4 proteinleri için aynı değerlendirme kriteri kullanılmıştır (19). Çalışmanın kısıtlılıklarından biri de dahil edilen meme kanseri hastalarının tümör boyutunun küçük olması ve tüm evrelerde aynı sayıda hasta bulunmamasıdır.

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 oranının kullanılabileceğini, artmış serum VEGF-A düzeylerinin metastatik sürece geçişin bir göstergesi olabileceğini düşünmekteyiz. Yüksek serum VEGF-A/ES oranına sahip hastaların metastaz gelişimi açısından izlendiği, bu oranın tedaviye yanıtındaki öneminin değerlendirildiği prospektif çalışmaların yapılması uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Yan G, Zhou XY, Cai SJ, Zhang GH, Peng JJ, Du X. Lymphangiogenic and angiogenic microvessel density in human primary sporadic colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14(1): 101-7.
2. Kitadai Y. Angiogenesis and lymphangiogenesis of gastric cancer. *J Oncol* 2010; 2010: 468725.
3. Bono P, Teerenhovi L, Joensuu H. Elevated serum endostatin is associated with poor outcome in patients with non-hodgkin lymphoma. *Cancer* 2003; 97(11): 2767-75.
4. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23(5): 1011-27.
5. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (vegf). *J Cell Mol Med* 2005; 9(4): 777-94.
6. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 1: 2-10.
7. Grothey A, Ellis LM. Targeting angiogenesis driven by vascular endothelial growth factors using antibody-based therapies. *Cancer J* 2008; 14(3): 170-7.
8. Wollenhaupt K, Welter H, Einspanier R, Manabe N, Brüssow KP. Expression of epidermal growth factor receptor (egf-r), vascular endothelial growth factor receptor (vegf-r) and fibroblast growth factor receptor (fgf-r) systems in porcine oviduct and endometrium during the time of implantation. *J Reprod Dev* 2004; 50(3): 269-78.
9. 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(1): 87-95.
10. 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(2): 277-85.
11. Ribatti D. Endogenous inhibitors of angiogenesis: A historical review. *Leuk Res* 2009; 33(5): 638-44.
12. 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(13): 1802-4.
13. Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaisse J. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett* 2000; 486(3): 247-51.
14. Koshelev Iu A, Georgiev GP, Kibardin AV. (functions of protein mts1 (s100a4) in normal and tumor cells). *Genetika* 2008; 44(2): 149-62.
15. 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(32): 30063-73.
16. Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. S100a4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* 2006; 281(2): 677-80.
17. 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(11): 1499-504.
18. Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M. The metastasis associated protein s100a4: Role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* 2005; 92(11): 1955-8.
19. 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(10): 4064-8.
20. 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(8): 1838-43.
21. Rabau MY, Avigad I, Dreznik Z, Wolfstein I. Carcinoma of the breast in women 30 years of age or younger. *Am Surg* 1980; 46(10): 548-50.

22. Eppenberger U, Kue ng W, Schlaeppi 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(9): 3129-36.
23. Hazelton D, Nicosia RF, Nicosia SV. Vascular endothelial growth factor levels in ovarian cyst fluid correlate with malignancy. *Clin Cancer Res* 1999; 5(4): 823-9.
24. 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(2): 251-7.
25. 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(21): 4368-80.
26. 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(1): 86-91.
27. 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(6): 845-50.
28. Boneberg EM, Legler DF, Hoefler MM, Ohlschlegel C, Steining H, Fuzesi L, et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis are downregulated in primary breast cancer. *Br J Cancer* 2009; 101(4): 605-14.
29. 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(1): 49-55.
30. 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(2): 159-68.
31. 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(2): 228-33.
32. 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(11): 2898-905.
33. 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(11): 1425-31.
34. Granato AM, N anni 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(1): R38-45.
35. 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(2): 161-6.
36. 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(4): 627-36.
37. 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(7): 897-902.
38. Kuroi K, Toi M. Circulating angiogenesis regulators in cancer patients. *Int J Biol Markers* 2001; 16(1): 5-26.
39. 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(3): 193-9.
40. 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(4): 513-8.
41. Callagy G, Dimitriadis E, Harmeý 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(2): 104-9.
42. Karpanen T, Alitalo K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 367-97.
43. Cao Y. Opinion: Emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(9): 735-43.
44. 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 (11): 3491-4.
45. 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.

Özalp Y. ve ark.

46. 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(5): 539-45.
47. 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(2): 198-208.
48. 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(6): 1595-603.
49. Ambartsumian N, Klingelhofer J, Grigorian M, Christensen C, Kriajevska M, Tulchinsky E, et al. The metastasis-associated mts1(s100a4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* 2001; 20(34): 4685-95.
50. 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(12): 1931-5.

Yazışma adresi:

Dr. Yılmaz Özalp
Elbistan Devlet Hastanesi,
Tıbbi Biyokimya, Kahramanmaraş
Tel : 0 344 413 80 01
E-posta: yozalp20@yahoo.com
