

# Epitelial Over Kanserli Olgularda Anjiyogenez ve C-ErbB-2 Ekspresyonunun Kemosenitivite ile İlişkisi

## THE CORRELATION OF ANGIOGENESIS AND C-ErbB-2 EXPRESSION WITH THE CHEMOSENSITIVITY IN EPITHELIAL OVARIAN CANCER

Dr. Oğuzhan ALPAYDIN,<sup>a</sup> Dr. İbrahim GÜLHAN,<sup>a</sup> Dr. Mert GÖL,<sup>a</sup> Dr. Uğur SAYGILI,<sup>a</sup>  
Dr. Merih GÜRAY,<sup>b</sup> Dr. Meral KOYUNCUOĞLU<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, <sup>b</sup>Patoloji AD, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İZMİR

### Özet

**Amaç:** Primer cerrahi uygulanan over kanserinde, tedavi sonrası bir yıldan önce ve bir yıldan sonra nüks gösteren hastaların tümör dokularındaki anjiyogenez parametrelerini ve c-erbB-2 ekspresyonunu karşılaştırmak ve kemosenitivite ile olan ilişkisini ortaya koymak.

**Gereç ve Yöntemler:** 1993 ile 2003 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde IC ve daha ileri evrelerde opere edilen, 43 epitelial over tümörlü hastanın parafin bloklarında, anjiyogenez değerlendirmesi için immunohistokimyasal olarak CD-34 antijen yoğunluğu ve c-erbB-2 ekspresyonu dereceleri değerlendirildi. CD-34 ile vasküler epitel döşeyen endotel hücreleri görülebilir hale getirildikten sonra morfolometrik olarak vasküler yüzey yoğunluğu (VSD=Vascular Surface Density), mikrodamar sayısı (NVES=Number of Vessels), ve her olgu için sayılan 10 alandaki muskuler duvarı olmayan, birim alan içinde kalan toplam kapiller damar sayısı (NV= total capillary vessel number) değerlerinin en yüksek üçünün aritmetik ortalaması alınarak (NVES-MAX) hesaplandı. Bu hastalar, postop dönemde adjuvan tedavi olarak cisplatin-karboplatin/siklofosfamid-paklitaksel almış olup, adjuvan tedavi sonrası ilk on iki ay içinde nüks görülen 14 hasta kemorezistan, oniki ay sonrası rekürrens gelişen 29 hasta ise kemosenitif olarak kabul edildi.

**Bulgular:** Kemorezistans olgular ile kemosenitif olgular arasında; anjiyogenez parametreleri ve c-erbB-2 ekspresyonu için hücresel boyanma dereceleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ). Yaş, evre, histolojik tip, grade, asit sitolojisi, lenf nodu metastazı durumu ve preoperatif CA-125 değerleri ile anjiyogenez parametreleri ve c-erbB-2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $p > 0.05$ ).

**Sonuç:** Bizim çalışmamızda c-erbB-2 ekspresyonunun ya da anjiyogenez parametrelerinin medikal tedavi öncesi immunohistokimyasal tespitinin, kemoterapiye yanıtı önceden belirlemede etkili olmadığı tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Over kanseri, anjiyogenez, c-erbB-2, kemosenitivite

Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst 2005, 15:249-258

### Abstract

**Objective:** To investigate the difference in tumor tissue expression of c-erbB-2 and angiogenesis parameters between patients with ovarian carcinoma who had tumor recurrence before and after one year of the operation and to demonstrate the correlation with chemosensitivity.

**Materials and Methods:** The expression of CD-34 and c-erbB-2 levels were analyzed by immunohistochemically in paraffin tissues of 43 ovarian carcinoma patients with Stage IC or more advanced disease who were operated at our department between 1993 and 2003. The NVES-MAX value was analyzed morphometrically by calculating the mean number of the highest values for vascular surface density, number of vessels, and total capillary vessel number which was assessed by counting of amascular vessels in 10 fields at microscopic examination of each patient, after visualizing the endothelial cells by CD-34 antigen. All patients received postoperative adjuvan chemotherapy (Cysplatin-carboplatin/cyclophosphamide-paclitaxel). Fourteen patients who had tumor recurrence before 12 months after adjuvan chemotherapy were accepted as chemoresistant, whereas 29 patients with tumor recurrence after 12 months were accepted as chemosensitive.

**Results:** There were no significant differences in angiogenesis parameters and c-erbB-2 expression between chemoresistant and chemosensitive patients ( $p > 0.05$ ). There were no significant correlations between patients' age, stage, histology, grade, peritoneal cytology, lymph node metastasis, preoperative CA-125 level and angiogenesis parameters and c-erbB-2 ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** Detection of the expression of c-erbB-2 and angiogenesis parameters before the adjuvan chemotherapy don't seem to correlate with tumor chemosensitivity.

**Key Words:** Ovarian carcinoma, angiogenesis, c-erbB-2, chemosensitivity

Geliş Tarihi/Received: 24.03.2005 Kabul Tarihi/Accepted: 01.09.2005

**Yazışma Adresi/Correspondence:** Dr. Mert GÖL  
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, İnciraltı, İZMİR  
mertgol@deu.edu.tr

Copyright © 2005 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst 2005, 15

Over kanserleri, kadınlarda genital sistemin diğer kanserlerinden daha fazla ölüme sebep olmakta ve kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır.<sup>1-3</sup>

Hastalığın prognozunun bu kadar kötü seyretmesinin sebebi geç evrelerde tanı konulabilmesi ve hastalığı erken evrede tanı koydurabilecek etkili bir tarama yönteminin bulunmamasıdır. Bu nedenle hastaların üçte ikisinden fazlası tanı konulduğu sırada ileri evrede bulunmaktadır. Bu hastaların çoğunda ilk tedavi sonrasında klinik olarak tam remisyona elde edilse bile genellikle ortalama 18-24 ay sonrasında nüks görülmektedir.

Her-2/NEU ya da c-erbB-2 onkogen aktivasyonu hücre proliferasyonunda rol oynamaktadır. Klinik çalışmalarda c-erbB-2 aktivasyonu olan tümör dokularında neoangiogeneze süreçlerinin daha aktif olduğu belirtilmekte ve platin rezistansının ortaya çıkmasında bu genin rol oynadığı savunulmaktadır.<sup>4-6</sup>

Angiogeneze, önceden var olan damarlardan yeni damarların gelişmesi olup (neoangiogeneze), over kanserlerinde asit ve metastaz gelişmesinde kritik rol oynar. Tümörlerde avasküler fazdan vasküler faza geçiş, kanser progresyonunda kilit rol oynar. Bir tümör kitlesinin sirkülasyon için neovaskülarizasyon olmadan difüzyon kapasitesi sınırlı hale gelen maksimal büyüklüğü, yaklaşık 2 mm<sup>3</sup>'tür.<sup>7</sup>

Prognoz esas olarak hastalığın evresine bağlı olmakla beraber, arta kalan tümör hacmi, sitolojik olarak malign asit varlığı, tümörün farklılaşma derecesi, histolojik tipi ve hastanın yaşı ile ilişkilidir.<sup>2,3,8</sup> Özellikle ileri evrede tanı konan hastalar için ilave prognostik değişkenlerin tespit edilmesi tedaviyi planlamada yararlı olabilir.

Bu çalışmada amaç; primer epitelyal over kanserli hastalarda bir protoonkogen olan c-erbB-2 ile birlikte, tümör yayılımında ve metastazında rol alan angiogenezin, kemosensitivite ile olan ilişkilerini ortaya koymaktır.

### Gereç ve Yöntemler

Araştırma 1993 ile 2003 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü'nde epitelyal over kanseri nedeni ile cerrahi tedavi

uygulanıp adjuvan kemoterapi alan 43 hastayı içermektedir. Bu hastaların hepsi evre IC veya daha ileri evrelerde tanı almış ve cerrahi tedavi sonrasında sisplatin-karboplatin/siklofosfamid-paklitaxel almışlardır. Rekürrens gelişen hastalara da klinik olarak anlamlı olduğunda kemoterapi ve/veya sekonder cerrahi uygulanmıştır. Kullanılan veriler Patoloji Anabilim Dalı, Medikal Onkoloji Anabilim Dalı ve Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Onkoloji Bölümü kayıtlarından elde edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilme kriteri olarak; hastalar hakkında yeterli klinik bulguların olması ve histopatolojik inceleme için de c-erbB-2 ve CD34 angiogeneze analizi yapabilmek için yeterli parafine gömülü tümör dokusunun bulunması şartları arandı. Bu preparatlara ait ulaşılabilen %10'luk formalinde fikse parafine gömülü doku bloklarından 4-5 mikron kalınlığında kesitler alınarak polylisin ile kaplandı.

Patolojik inceleme için, parafine gömülü polylisin ile kaplı lamlardan 3 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, ksilen ve %100 alkol serilerinden geçirilerek deparafinize edildi. Azalan alkol serilerinden geçirilerek çeşme suyunda yıkandı. Lamlar tris-tamponlu salin içinde yıkandıktan sonra kesitlerin etrafı kurularak kullandığımız solusyonlardan etkilenmeyen, damlatılacak antikorların ve solusyonların dokuların üzerinde kalmasını sağlamak amacı ile sınırlayıcı hidrofobik bir kalemle çerçevesi yapıldı. Lamlar %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de 15 dk bekletildi. Isıtma kaplarına sitrat tampon (pH:6) konuldu. Lamlar bu kaplara sıralandı. Kaplar mikrodalga fırına yerleştirilerek 15 dk kaynatıldı. Kaynatma sırasında sitrat tampon azaldıkça üzerine distile su eklendi. Süre sonunda mikrodalgadan çıkarılan kaplar oda ısısında 1 saat kadar bekletildi. Tris-tamponla (Hidroksi metil-amino-metan) yıkandı. Large volume Ultra V Blok solusyonu (LabVision-Lot:AUB31215) damlatıldı, 7dk kadar bekletildi. c-erbB-2 primer antikoruna (c-erbB-2/HER-2/neuAb-17 Neomarker's MS-730-P lot:730P307A) 1/400 dilüsyonunda hazırlandı. Takiben CD34 primer antikoruna (CD34-

Neomarker's MS-363-P Lot:363P211) 1/200 dilusyonunda çalışıldı Preparatlardaki blok solusyon dökülerek primer antikorlar damlatıldı. 30 dk bekletildi. Tris tamponda 3 kez yıkandı. Sonra Large Volume Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (Lab Vision-Lot:PBN31216) damlatıldı, 10 dk bekletildi ve ardından Tris tampon ile 3 kez yıkandı. Takiben Large Volume Streptavidin peroksidaz (Lab Vision-Lot:SHR31210) damlatıldı, 10dk bekletildikten sonra yine tris tampon ile 3 kez yıkandı. 10cc tris tampon içinde bir tablet DAB (3,3-diaminobenzidintetraklorür, Sigma Chemical, St. Louis, Mo) çözdürüldü üzerine 3 damla %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilerek DAB solüsyonu hazırlandı. Lamlardaki kesitlere damlatılarak 5 dk bekletildi ve 5dk kadar çeşme suyuyla yıkandı. Mayer Hemotoksileninde 20-30 sn bekletilerek zıt boyama yapıldı takiben preparatlar yükselen alkol serilerinden ve ksilolden geçirildi.

İmmunohistokimyasal değerlendirmede neoplastik hücrelerde c-erbB-2 için sadece hücre membranının boyanması pozitif kabul edildi. İmmunohistokimyasal reaktivitenin değerlendirme ve derecelendirmesi boyanma paterni ve yoğunluğuna göre negatifle kuvvetli arasında yapıldı.<sup>9</sup>

CD34 antijeni ile vasküler yapıları döşeyen endotel hücreleri görülebilir hale getirildikten sonra morfometrik olarak vasküler yüzey yoğunluğu (VSD= Vascular Surface Density), mikrodamar sayısı (NVES=Number of Vessels) ve her olgu için sayılan 10 alandaki muskuler duvarı olmayan grid alan içinde kalan toplam kapiller damar sayısı (NV) değerlerinin en yüksek üçünün aritmetik ortalamaları alınarak NVES-MAX, VSD, NVES belirli formüllere göre hesaplandı.<sup>10,11</sup>

İstatistiksel analiz SPSS yazılım programı (version 11.0 for Windows; SPSS INC., Chicago, IL) kullanılarak yapıldı. Anjiogenez değerlendirmesi sonucu ortaya çıkan mikrovasküler damar sayımları (NVES, NVES-MAX, VSD) ve c-erbB-2 hücresele boyanma oranları ile, çalışmaya alınan

hastaların demografik verileri arasındaki ilişkiyi saptamada Mann-Whitney Test veya Kruskal-Wallis Test kullanıldı, p değeri 0.05'ten küçük bulunduğunda sonuçlar anlamlı kabul edildi.

Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, evre, grade ve preop CA-125 değerleri ile c-erbB-2 ve anjiogenez parametrelerinin korelasyonu için Spearman Correlation Coefficients Test kullanıldı. p<0.05 anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Araştırmaya dahil edilen hastaların yaş ortalamaları 53.6±13.0 (32-83) olup, 60 yaş altı grup hastaların %65.1'ni, 60 yaş üstü grup ise hastaların %34.9'unu oluşturmaktadır. Çalışmaya dahil edilen hasta sayısının az olması nedeni ile hastalar FIGO evrelerine göre Evre1-2 erken evre, Evre 3-4 ileri evre olarak kabul edildi. Erken evre olarak kabul edilen hastalar grubun %32.6'sını, ileri evredeki hastalar ise %67.4'ünü oluşturmaktaydı. CA125 değerleri 300 IU/ml'den küçük ve 300 IU/ml'den büyük olarak iki gruba ayrıldı.

**Tablo 1.** Hastaların demografik özellikleri.

	Sayı (n)	Yüzde (%)
<b>YAŞ</b>		
<60 Yaş	27	65.1
>60 Yaş	16	34.9
<b>EVRE</b>		
Erken Evre ( 1-2 )	14	32.6
İleri Evre ( 3-4 )	29	67.4
<b>GRADE</b>		
1	2	4.6
2	13	30.2
3	28	65.1
<b>SİTOLOJİ</b>		
Malign hücre var +	28	65.1
Malign hücre yok -	15	34.9
<b>LENF NODU METASTAZI</b>		
LNM Var +	10	23.3
LNM yok -	33	76.7
<b>CA125</b>		
<300U/ml	23	53.5
>300U/ml	20	46.5
<b>HİSTOLOJİ</b>		
Seröz tümör	23	53.4
Nonseröz tümör	20	46.6

**Tablo 2.** c-erbB-2'nin bağımsız değişkenler ile ilişkisi.

	c-erbB-2				p
	Zayıf boyananlar		Kuvvetli boyananlar		
	n	(%)	n	(%)	
<b>YAŞ</b>					
<60 Yaş	13	48.1	14	51.9	P=0.49
>60 Yaş	6	37.5	10	62.5	
<b>EVRE</b>					
Erken Evre ( 1-2 )	5	35.7	9	64.3	P=0.43
İleri Evre ( 3-4 )	14	48.3	15	51.7	
<b>GRADE</b>					
1	2	100	0	0	P=0.14
2	7	53.8	6	46.2	
3	10	35.7	18	64.3	
<b>SİTOLOJİ</b>					
Malign hücre +	16	51.7	12	42.9	P=0.01
Malign hücre -	3	20.0	12	80.0	
<b>LENF NODU METASTAZI</b>					
LNM +	6	60.0	4	40.0	P=0.25
LNM -	13	39.4	20	60.6	
<b>CA125</b>					
<300 U/ml	11	47.8	12	52.2	P=0.60
>300 U/ml	8	40.0	12	60.0	
<b>HİSTOLOJİ</b>					
Seröz tümör	10	41.7	14	58.3	P=0.70
Nonseröz tümör	9	47.4	10	52.6	

CA125<300 IU/ml olan hastalar grubun %53.5'ini, CA125>300 IU/ml olan hastalar ise %46.5'ini oluşturmaktadır. Araştırmaya dahil edilen epitelial over tümörleri seröz tümörler ve nonseröz tümörler olarak iki gruba ayrıldı. Seröz tümörler hastaların %53.4'ünü, nonseröz tümörler ise %46.6'sını oluşturmaktadır. Hastaların lenf nodu metastazı, asit mayindeki malign hücre varlığı ve tümör grade dereceleri ve diğer özellikleri Tablo 1'de belirtilmiştir.

c-erbB-2 immünreaktivitesinde araştırmaya dahil edilen hastaların yaş, evre, grade, asit mayindeki malign hücre varlığı, lenf nodu metastazı, preop CA125 düzeyleri ve epitelial over tümörlerinin histolojik alt tiplerine göre dağılımı Tablo 2'de belirtilmiştir.

Hastaların patolojik preparatları araştırmaya katılan hasta sayısı az olduğu için, hücresel membranın immünohistokimyasal boyanma dereceleri 0-1 zayıf boyanma, 2-3 kuvvetli boyanma olarak değerlendirilmiştir. 60 yaş altı 14 hasta

(%51.9), 60 yaş üstü 10 hasta (%62.5) c-erbB-2 için kuvvetli boyanmış olup, 60 yaş altı ve üstü grup hastalar c-erbB-2 hücresel boyanma dereceleri ile karşılaştırıldığında yaş faktörü için istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır (p> 0.05).

Hastalar, nükleer diferansiyasyon derecelerini gösteren grade 1,2,3 olarak gruplandırılmış, ve her bir grup c-erbB-2 için zayıf ve kuvvetli boyanma dereceleri ile karşılaştırıldığında nükleer grade açısından c-erbB-2 boyanma derecesinin istatistiksel bir anlamı bulunamamıştır (p> 0.05). Nükleer grade-1 olan sadece 2 hasta olup, iki hastada da c-erbB-2 için hücresel immün reaktivite zayıf bulunmuştur. Bu grupta kuvvetli boyanma gösteren hasta yoktur.

Erken evredeki 14 hastanın 9'u (%64.3) c-erbB-2 kuvvetli boyanırken, ileri evredeki 29 hastanın 15'i (%51.7) c-erbB-2 için kuvvetli boyanma göstermiştir. Erken ve ileri evrede, c-erbB-2 immünreaktivite düzeyleri bakımından istatis-

**Tablo 3.** Hastaların demografik değişkenlere göre NVES ve NVES-MAX sonuçlarının karşılaştırması.

	n	NVES $\pm$ SD	p	NVES-MAX $\pm$ SD	p
<b>Yaş</b>					
<60	27	39.5 $\pm$ 30.8	0.11	16.1 $\pm$ 8.6	0.48
>60	16	29.4 $\pm$ 22.3		16.1 $\pm$ 12.0	
<b>Evre</b>					
Erken evre	14	30.2 $\pm$ 17.8	0.73	16.4 $\pm$ 8.7	0.67
İleri evre	29	38.5 $\pm$ 31.9		16.0 $\pm$ 10.5	
<b>Histoloji</b>					
Seröz	23	40.5 $\pm$ 34.5	0.60	17.1 $\pm$ 11.7	0.10
Nonseröz	20	30.2 $\pm$ 17.6		14.5 $\pm$ 7.4	
<b>Grade</b>					
1	2	25.6 $\pm$ 12.6	0.93	15.8 $\pm$ 1.2	0.18
2	13	32.7 $\pm$ 24.9		17.4 $\pm$ 6.8	
3	28	37.9 $\pm$ 30.6		15.5 $\pm$ 11.4	
<b>Sitoloji</b>					
Malign h.+	28	41.0 $\pm$ 32.7	0.25	16.6 $\pm$ 10.8	0.71
Malign h. -	15	25.8 $\pm$ 12.3		15.3 $\pm$ 8.2	
<b>Lenf nodu met.</b>					
Met.+	10	46.3 $\pm$ 30.9	0.14	13.7 $\pm$ 4.7	0.70
Met. -	33	32.6 $\pm$ 26.9		16.8 $\pm$ 10.9	
<b>CA-125</b>					
<300 U/ml	23	37.2 $\pm$ 30.6	0.58	14.4 $\pm$ 7.3	0.50
>300 U/ml	20	34.2 $\pm$ 25.7		18.1 $\pm$ 12.1	

tiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p> 0.05).

50 yaşın üzerinde, CA-125 düzeyleri 300 U/ml'den büyük olan ve pelvik kitleye sahip hastaların malign çıkma olasılığı yüksek olduğu düşüncesi ile bu değeri sınır olarak, hastalar CA-125 düzeylerine göre gruplandırıldı. CA-125>300 olan 20 (%46.5) hasta olup, bunların 12 (%60) tanesi c-erbB-2 için kuvvetli immün reaktivite göstermekte idi. CA-125<300 olan 23 (%53.5) hastanın 12 (%52) tanesi kuvvetli immünreaktivite göstermekte idi. Sonuçta bu çalışmada c-erbB-2 immünboyanma derecesi istatistiksel olarak CA-125 düzeyleriyle karşılaştırıldığında anlamlı bulunmadı (p> 0.05).

Hastalar cerrahi evreleme sonrası lenf nodu metastazı açısından değerlendirilmiş 10 (%23) hastada lenf nodu metastazı saptanmış olup, bu hastaların 6'sında (%60) c-erbB-2 için zayıf immünreaktivite, 4'ünde (%40) kuvvetli immün reaktivite saptanmıştır. Hastalar c-erbB-2 reak-

**Tablo 4.** Hastaların demografik değişkenlerine göre VSD sonuçlarının karşılaştırması.

Hasta	n	VSD $\pm$ SD	p
<b>Yaş</b>			
<60	27	491.6 $\pm$ 328.0	0.07
>60	16	395.9 $\pm$ 337.4	
<b>Evre</b>			
Erken evre	14	408.9 $\pm$ 300.9	0.58
İleri evre	29	478.8 $\pm$ 347.1	
<b>Histoloji</b>			
Seröz	23	507.0 $\pm$ 400.0	0.71
Nonseröz	20	397.3 $\pm$ 223.5	
<b>Grade</b>			
1	2	351.3 $\pm$ 103.3	0.90
2	13	441.7 $\pm$ 360.6	
3	28	470.2 $\pm$ 333.1	
<b>Sitoloji</b>			
Malign h. +	28	519.1 $\pm$ 377.0	0.20
Malign h. -	15	338.3 $\pm$ 177.4	
<b>CA-125</b>			
<300 U/ml	23	476.4 $\pm$ 338.0	0.37
>300 U/ml	20	432.6 $\pm$ 329.4	
<b>Lenf nodu metastazı</b>			
Met. +	10	615.1 $\pm$ 378.9	0.06
Met. -	33	407.8 $\pm$ 304.9	

**Tablo 5.** Kemoterapi sonrası, kemorezistan olgular ile kemosensitif olguların anjiogenez parametreleri açısından karşılaştırılması.

	N (%)	NVES±SD	p	NVES-MAX±SD	p	VSD±SD	P
<b>K.rezis.</b>	19(44.2)	29.3±19.6	0.3	14.8±12.3	0.1	383.4±230.2	0.5
<b>K.sens.</b>	29(55.8)	38.9±31.2		16.7±8.6		491.0±368.3	

**Tablo 6.** Kemoterapi sonrası, kemorezistan olgular ile kemosensitif olguların c-erbB-2 İmmünreaktivitesi açısından karşılaştırılması.

	n	%	c-erbB-2 (zayıf)	c-erbB-2 (kuvvetli)	p
			n (%)	n (%)	
<b>K.rezis.</b>	14	44.2	5 (35.7)	9 (64.3)	0.52
<b>K.sens</b>	29	55.8	14 (48.3)	15 (51.7)	

ktivitesi ve lenf nodu metastazı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel anlam bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).

Seröz tipteki 14 (%58.3) hasta c-erbB-2 için kuvvetli boyanma gösterirken, nonseröz tipteki 10 (%52.6) hastanın c-erbB-2 için kuvveti immunreaktif olduğu saptandı. Sonuçta c-erbB-2 immunreaktivitesi istatistiksel olarak seröz ve nonseröz hücre tipleri açısından karşılaştırıldığında anlamlı bulunmadı ( $p > 0.05$ ).

Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik değişkenlere göre anjiogenez parametrelerinin NVES, NVES-MAX ortalamaları standart deviasyonları ile birlikte aşağıda Tablo 3'de belirtilmiştir. Aynı demografik değişkenlerin VSD ortalamaları ve standart deviasyonları Tablo 4'de gösterilmiştir. Sonuç olarak yaş, FIGO evresi, tümör histolojisi, lenf nodu metastazı, grade, asit sıvısında malign hücre varlığı, preop CA-125 düzeyleri için her bir grubun, anjiogenez düzeylerini gösteren NVES, NVES-MAX, VSD sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir sonuç bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).

Cerrahi tedavi sonrası adjuvan kemoterapi uygulanan hastaların ilk oniki ay içinde nüks görülenler (hastaliksız geçen süre=disease-free survival-DFS<12 ay) kemorezistan grup, oniki ay sonrası nüks gelişen hastalar (DFS>12ay) ise kemosensitif hastalar olarak gruplandırılmıştır. Her iki grubun NVES, NVES-MAX, VSD gibi anjiogenez değerleri ve bunların c-erbB-2 immünreaktivite dereceleri Tablo 5 ve Tablo 6'da gösterilmiştir. Kemorezistan ve kemosensitif gruplar arasında anjiogenez değerleri ve c-erbB-2 immünreaktivite sonuçları arasında istatistiksel bir anlam bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).

Hastaların yaş, evre, grade ve preop CA-125 değerleri ile c-erbB-2 hücreyel boyanma dereceleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır. ( $p > 0.05$ ).

### Tartışma

Normalde gerçekleşen anjiogenik proseslerin regülasyonunun bozulması, kanser hücrelerinin proanjiogenik faktörleri sekrete edebilme yeteneğini kazanmasına bağlıdır. Proanjiogenik faktörlerin değerlendirilmesi ve tümör ilişkili mikrodamarlanmanın over kanserlerinde prognostik faktör

olabileceği gösterilmiştir. Fizyolojik anjiogenez genelde kendini sınırlar ve endojen anjiyo inhibitörlerin üretimi ve salınımı ile regüle edilir. Bu dengenin kanser anjiogenezini sürecinde regülasyonu bozulmuştur.<sup>12</sup>

Primer ve metastatik over tümörlerinde immünohistokimyasal metod ile faktör VIII boyama metodu kullanılarak mikrodamar sayımları değerlendirildiğinde, omental metastazlardaki mikrodamar sayımları, preoperatif CA125 ve hasta yaşam süresi ile korele bulunmuştur.<sup>13</sup>

c-erbB-2'nin, epitelyal over kanserli vakaların yaklaşık %25'inde ekspresyona uğradığı bulunmuş olmasına rağmen bu durum tartışmalıdır.<sup>4,14</sup> c-erbB-2 reseptörü onkogenik bir potansiyele sahip olup, nokta mutasyonlar veya nonmutant genin amplifikasyonu gibi multiple genetik mekanizmalar, bu genin aktivasyonuna sebep olabilir.<sup>5</sup> Over kanserleri ile ilgili yapılan çalışmalarda da c-erbB-2 ekspresyonu insidansları farklı olmakla beraber, kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu ile borderline over tümörlerinin %15'inde, invaziv kanserlerin ise %48'inde c-erbB-2 amplifikasyonu gösterilmiştir.<sup>15</sup> Seröz papiller over kanserlerinde, evre I kanserlerin %22'sinde evre III kanserlerin %71'inde c-erbB-2 amplifikasyonun olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar diğer çalışmalar ile uyumlu olup, aynı zamanda evre I-II kanserler için c-erbB-2 amplifikasyonu %21 oranında tespit edilmiştir.<sup>16</sup> Over kanserli hastaların %25-30'unda c-erbB-2 amplifikasyonu olduğu ve bununla klinik sonuçlar arasında direkt bir bağlantının olduğu da belirtilmektedir.<sup>17</sup> Farklı amplifikasyon düzeylerinin tümör fenotipini ortaya koyup koyamayacağı belirsiz olmamakla beraber, ilk cerrahi sırasında c-erbB-2 amplifikasyonunun değerlendirilmesi, özellikle kötü prognoza sahip hastaların tanımlanması açısından önemli olabilir. Bu hastalar için etkili bir tedavi olmamasına rağmen, daha iyi bir takip mümkün hale getirilebilir.<sup>16</sup>

İleri evre epitelyal over kanserli hastaların %70'i, platinum-taxan kemoterapi kombinasyonuna yanıt verirken, bu hastaların %20-30'u kemoterapiye rezistans gelişmesinden dolayı tedavi edi-

lememektedir.<sup>18</sup> İleri evre epitelyal over kanserlerinde ilaç rezistansı, önceden yada ilk uygulanan kemoterapi esnasında gelişebilir.<sup>19</sup> Başlangıçta kullanılan etkili kemoterapi protokolleri başarısız olursa, göreceli olarak ikincil bir tedavi veya kombinasyondan anlamlı bir cevap elde etmek zordur.<sup>20</sup> Klinik çalışmalarda kemorezistansı tanımlayan belirleyiciler önemlidir.

Epitelyal over kanserinin kemorezistansını önceden belirlemede immünohistokimyasal metod ile p53, c-erbB-2, epidermal growth faktör, tümör nekroz faktör-alfa, ve bir hücre proliferasyon markerı olan Ki-67 ekspresyonları değerlendirilmiş, Ki-67 ekspresyonunun kemoterapiye yanıt ile korole olduğu fakat diğerlerinin kemoduyarlılık için prediktif bir değer taşımadığı saptanmıştır.<sup>21,22</sup> Bizim çalışmamızda da c-erbB-2'nin immünohistokimyasal boyanma dereceleri ile kemorezistan ve kemosensitif hastalar arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Hengstler ve ark. tümör hücrelerindeki c-erbB-2 overekspresyonunun; rezidüel hastalık, yaş, kemoterapi ve FIGO evresi için bağımsız prognostik faktör olduğunu belirtmektedirler.<sup>23</sup> Karboplatin ile nontoksik konsantrasyonlarda topoizomeraz 2-alfa (TOPOIIA) inhibitörü olan Etoposid ya da Novobiosin verilmesi tümör hücreleri üzerinde karboplatin toksitesini attırmakta iken, tirozin kinaz inhibitörü olan Emodin'in tümör hücreleri üzerinde kemosensitize edici etkisi görülmemiştir.<sup>23,24</sup> Bu çalışmaya göre, c-erbB-2 ile eksprese olan TOPOIIA kemoterapiye yanıtı olumsuz yönde etkilemektedir. Bu genetik lokusun önceden tespiti de, kemoseleksiyonda ve kemorezistansı azaltarak erken nükslerin önlenmesinde fayda sağlayabilir. Çalışmamızda, kemosensitif ve kemorezistan hastalardaki c-erbB-2 hücrel boyanma düzeyleri arasında fark saptayamayızın sebebi; bu genin farklı düzeylerde eksprese olmasından kaynaklanabilir.

Alaa ve ark.nın bir çalışmasında, c-erbB-2 overekspresyonunun epitelyal over kanserlerinin

ancak %20-30'unda meydana geldiği belirtilmektedir.<sup>16</sup> Bu düşük oranı da dikkate alarak, çalışmamızdaki olgu sayımızın az olması, kemorezistan ve kemosensitif olgulardaki c-erbB-2'nin immünohistokimyasal boyanma düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşamamızın sebebi olabilir.

Epitelyal over kanserinde c-erbB-2 amplifikasyonunun evre yada grade ile güçlü bir ilişkisinin bulunmaması ve olguların %25'inden daha azında ortaya çıkmasına rağmen, bir çalışmada c-erbB-2 overekspresyonu olup, kötü sağkalım oranlarına sahip ileri evre over kanserli hastaların ancak %32'sinde kuvvetli derecede hücresele immün boyanma tespit edilmiştir.<sup>25-27</sup> Rubin SC ve ark., c-erbB-2 ekspresyonunun ileri evre over kanserlerinde prognostik bir öneminin olup olmadığını araştırmışlar; sonuç olarak bu onkogenin aktivasyonu ile klinik değişkenler arasında yaş, evre, grade, tümör hücre tipi ve rezidüel tümör arasında bir korelasyon saptayamamışlar ve epitelyal over kanserleri için c-erbB-2 ekspresyonunun önemli bir prognostik faktör olmadığını belirtmişlerdir.<sup>26</sup> Biz de çalışmaya dahil ettiğimiz hastaların yaş, tümör hücre tipi, grade ve klinik evreleri ile c-erbB-2 immünboyanma dereceleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulamadık.

Araştırmamızda hastalara ait prognostik değişkenler ile c-erbB-2'nin immünohistokimyasal boyanma düzeyleri arasında ve kemorezistan ve kemosensitif kabul edilen gruplarda, anjiogenez parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. İntratumoral mikrodamar sayımı, kantitatif tümör anjiogenez için en yaygın kullanılan yöntemdir.<sup>28</sup> Faktör-8 ile ilişkili antijen, CD-31 ve CD-34 antijeni vasküler endoteli belirgin bir şekilde açığa çıkarmaktadır.<sup>29</sup> Araştırmacılar arasında en yoğun neovaskülarizasyon alanının seçimi ve araştırma sürecindeki metodolojik problemlerin yanısıra, tümör heterojenitesi de immünohistokimyasal çalışmaların sonuçlarını etkileyebilir.<sup>28</sup> Nitekim çalışmamızda alınan histolojik kesitlere c-erbB-2 için immünboyanma yapılmış ve mikrodamar sayımları da, hastaların kli-

nik sonuçlarından habersiz olan farklı bir patoloj tarafından değerlendirilmiştir. Bu tarz yaklaşım Weidner<sup>30</sup> tarafından ana hatları ile belirtilmektedir. Schoenfeld ve ark.<sup>31</sup> çalışmasında over tümör vaskülaritesinin anlaşılmasında değişiklikler gösterdiği, kayotik düzenlenmeleri içeren arteriovenöz şantlar, bifurkasyon noktalarında aşırı dallanmalar olduğu gözlemlenmiştir. Bir hastadan elde edilen tek bir histolojik kesit içinde farklı mikrodamar yoğunluklarının bulunması, mikrodamar yoğunluğunun, over kanserleri çalışmalarında zayıf bir prognostik önemi olmasının nedenini açıklayabilir.<sup>31,32</sup> Yaptığımız çalışmada da prognostik değişkenler (yaş, evre, grade, histolojik tip, vs.) ile anjiogenez parametreleri arasında anlamlı bir sonuca, yukarıdaki nedenlerden dolayı ulaşamamış olabiliriz. Bu sonuçların yanı sıra Gasparini ve ark. elli yaşın üzerindeki hastalarda mikrodamar sayımlarının, elli yaşın altındakilerine oranla %30 daha fazla olduğunu, yüksek damar sayımlarının münöz tümörlerde diğer histolojik tiplere nazaran da daha fazla olduğunu gösterdi.<sup>33</sup> İlginç olarak, düşük mikrodamar sayımları ve hastaların performans durumları göz önüne alındığında, evre III-IV hastaların kemoterapiye yanıt oranları daha fazla idi. Hollingsworth ve ark. evre III-IV epitelyal over kanserli 43 hastada, bağımsız prognostik faktör olarak mikrodamar sayımlarının ortalamasını daha yüksek bulmuştur.<sup>31</sup> CD34 histokimyasal boyamadan sonra, evre III tümör dokularında mikrodamar sayımlarını evre IV'deki hastalardan belirgin olarak daha düşük bulmuşlardır. Fakat bu çalışmada da olgu sayısı az olduğu için, sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.<sup>31</sup> Bizim araştırmamızdaki olgu sayısı da bu çalışmadaki olgu sayısına eşittir. Bu nedenle 43 olguluk serimizde, vaka sayımızın az olması, kemosensitif ve kemorezistan hastalar arasında, anjiogenez parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edemememizin bir nedeni olabilir.

Sonuç olarak, c-erbB-2 overekspresyonu olan tümörlerde platin rezistansının daha fazla görüldüğü daha önceki çalışmalarda gösterilmekle-



birlikte; bu onkogenin ya da anjiyogenez parmetrelerinin medikal tedavi öncesi immünohistokimyasal tespitinin, bizim çalışmamızda kemoterapiye yanıtı önceden belirlemede etkili olmadığı tespit edilmiştir. Ancak vaka sayısının azlığı dolayısıyla sonuçlarımızın geniş vaka içeren çalışmalarla teyit edilmesi gereklidir. Çünkü kemoterapide kullanılan standart protokollere verilecek yanıtın tedavi öncesi belirlenmesi, kemoseleksiyon şansını arttıracak ve erken nükslerin önlenmesi için yeni tedavi protokollerinin oluşmasına katkıda bulunacaktır.

### KAYNAKLAR

1. Sepp N, Fritsch P, Luger TA. Endothelial cell and angiogenesis. *Experimental Dermatology* 1997;6:272-3.
2. Baillieres Clinical Obstetrics and Gynaecology. Angiogenesis in ovarian cancer 2000;14:901-18.
3. Westerlund A, Apaja-Sorkkinen M, Hayhtya M, Gelatinase A et al. Immunoreactive protein in ovarian lesions: prognostic value in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 1999;75:91-8.
4. Jammato T, Ikava S, Akiyama T, Semba K. Similarity of protein encoded by the human c-erbB2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986;319:230-4.
5. Olagione MA, Meve RM, Lane HA, Hynes NE. The erb-B signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000;19:3159-67.
6. Baker CH, Kedar P, Mc Carty MF, et al. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling on tumor cells and tumor associated endothelial cells for therapy of human carcinomas. *Am J Pathol.* 2002;161:929-38.
7. Jores A, Haris AL. New developments in angiogenesis: a major mechanism for tumor growth and target for therapy. *Cancer J of Scientific American* 1998;4:209-17.
8. Volpert OV, Dameran KM & Bouck N, Sequential development of an oncogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumor genesis. *Oncogene* 1997; 14: 1495-502.
9. Prema PP, William AC, Lubinecki G. HER-2/neu expression in ovarian cancer: pre and post exposure to platinum chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2003;89:99-104.
10. Barth PJ, Weingartner K, Kohler HH. Assessment of the vascularization in prostatic carcinoma: a morphometric investigation. *Hum Pathol* 1996;27:1306-10.
11. Ak D, Canda T. Erken evre duktal karsinomlarda anjiyogenez ve fibronektin ekspresyonunun lenf düğümü metastazı ile ilişkisi ve prognostik önemi. *Türkiye Ekopatoloji Dergisi* 1999;5:91-9.
12. Gasparini G, Bonoldi E, Viale G, et al. Prognostic and predictive value of tumour angiogenesis in ovarian carcinomas. *Int.J.Cancer* 1996;69:205-11.
13. Abulafia O, Triest WE, Shere DM. Angiogenesis in primary and metastatic epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet and Gynecol* 1997;177:541-7.
14. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti HER-2 monoclonal antibody in women. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-48.
15. Wong YF. Prevalence of cancer HER-2/neu amplification in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest.* 1995;40:209-12.
16. Alaa MA, Bruce AW, Hon Fong LM. HER-2/neu oncogene amplification in stage 1 and 3 ovarian papillary serous cancer. *Experimental and Molecular Pathology.* 1999;66:163-9.
17. Slaman PJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast cancer and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-11.
18. Ozols RF, Rubin SC, Thomas F, Roby S. Epithelial ovarian cancer. In: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC. Principles and practice of gynecologic oncology. 2nd edition Philadelphia: Lippincott-Raven 1997:919-86.
19. Young RC. Principles of chemotherapy in gynecologic cancer. In: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC. Principles and practice of gynecologic oncology. 2nd edition Philadelphia: Lippincott-Raven 1997:919-86.
20. DiSaia PJ, Creasman WT. Clinical Gynecologic Oncology. Mosby, Inc. 2003;322-34.
21. Goff BA, Shy K, Greer BE, Muntz HG, et al. Overexpression of HER-2/neu, epidermal growth factor receptor, P53, Ki 67 and tumor necrosis factor in epithelial ovarian cancer. *Eur J Gynecol Oncol* 1996;17:487-92.
22. Goff BA, Ries JA, Els LP, et al. Immunophenotype of ovarian cancer as predictor of clinical outcome: evaluation at primary surgery and second look procedure. *Gynecol Oncol* 1998;70:378-85.
23. Hentgler JG, Lange J, Kett A, et al. Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase-2 alpha to chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 1999;59(13):3206-14.
24. Jarvinen TA, Liu ET. Effects of HER-2/neu on chemosensitivity of tumor cells. *Drug Resist Updat.* 2000;3:319-24.
25. Goff BA, Muntz HG, Greer BE, et al. Oncogene expression: long term compared with short term survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1998;92:88-93.

26. Rubin SC, Finstad CL, Wong GY, Almadrones L, et al. Prognostic significance of HER-2/neu expression in advanced epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168:162-9.
27. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, et al. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 1990;50:4087-91.
28. Obermair A, Wasicky R, Kaider A, et al. Prognostic significance of tumor angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Cancer Letters* 1999;138:175-82.
29. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, et al. Expression of the CD 34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990;75:2417-26.
30. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36:169-80.
31. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, et al. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian cancer. *Am J Pathol* 1995;147:33-41.
32. Schonfeld A, Levavi H, Breslavski D, et al. Three dimensional modelling of tumor induced ovarian angiogenesis. *Cancer Letters* 1994;87:79-84.
33. Gasparini G, Benoldi E, Viale G, et al. Prognostic and predictive value of tumor angiogenesis in advanced stage ovarian cancer. *Am J Pathol* 1996;69:205-11.