

BEKÇİ LENF DÜĞÜMÜ METASTAZLARINI, PERİTÜMÖRAL LYVE-1 İMMUNREAKTİVİTESİ ÖNGÖRÜR MÜ?

Hilal Koçdor¹, Mehmet Ali Koçdor², Tülay Canda³, Recep Bekiş⁴, Ali Sevinç², Serdar Saydam², Ömer Harmancıoğlu²

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye

²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi, İzmir, Türkiye

³Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji, İzmir, Türkiye

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp, İzmir, Türkiye

LYVE-1 lenfatik endotele özgü, yeni keşfedilmiş bir hücre yüzeyi reseptörüdür. Hyaluronan'ın extrasellüler matrixten lenf düğümüne aktarılma işlevinde rol alır. Sınırlı sayıda çalışma lenfatik invazyon ve metastazda LYVE-1/Hyaluronan ilişkisinin rol oynadığını göstermiştir. Malign meme tümörlerinde peritümöral ve intratümöral LYVE-1 pozitifliğinin, bölgesel lenfatik metastaz varlığını ne derecede öngörebileceği iyi bilinmeyen bir konudur. Bu çalışmada meme kanserli olup, bekçi lenf düğümü biyopsisi yapılan 25 olguda immunohistokimyasal (IHK) olarak LYVE-1 boyanmasının bölgesel lenf düğümü yayılım varlığını ne derecede gösterdiği incelendi. Bekçi lenf düğümü biyopsisi T1 ve T2 invaziv meme kanseri olgularında gamma dedeksiyon ve vital boyanma yöntemlerinin birlikte kullanımı ile belirlendi. Tüm olgularda lenfosintigrafi elde olundu. Bekçi lenf düğümündeki yayılım, Hematoksilin-Eosin (HE) ve standart İHK boyaması ile belirlendi. Analiz için, tümör ve çevresini içeren HE boyalı kesitler seçildi. Bunların parafin bloklarından polilizinli lamplara 4 mikronluk kesitler alındı. LYVE-1, "LYVE1 antibody - Lymphatic Vessel Marker" ı kullanılarak immunohistokimyasal yöntemle incelendi. Yöntemin özgüllüğü % 71, duyarlılığı %67, pozitif öngörüsü % 60, negatif öngörüsü % 77 olarak belirlendi. İmmunreaktivitenin % 85 i peritümöral, % 15 i intratümöral bölgede belirlendi. Sonuç olarak, lenfanjiogenetik bir belirteç olan LYVE-1'in , meme kanserli olgularda bölgesel lenfatik metastazın belirlenmesinde sınırlı bir etkinliğe sahip olduğu düşünüldü.

DOES PERITUMORAL LYVE-1 IMMUNOREACTIVITY PREDICT THE SENTINEL LYMPH NODE METASTASIS?

LYVE-1 is a -recently identified- selective lymphatic endothelial surface receptor which plays mainly role on transportation of hyaluronan from extracellular matrix to the regional lymph nodes. In a few cancer studies, relationships between LYVE-1/Hyaluronan and lymphatic invasion and metastasis has been shown. However, predictive values of peritumoral or intratumoral LYVE-1 positivity for the assesment of regional lymphatic invasion is unknown. In the present study, we aimed to investigate whether the peri/intratumoral LYVE-1 immunoreactivity related to sentinel lymph node status in 25 breast-cancer-patients. Sentinel lymph node (SLN) biopsy was performed by using combined technique with vital blue dye and hand-held gamma probe dedection in patients with early breast cancer. Lymphoscintigraphy was performed in all patients. Metastases to sentinel lymph nodes was evaluated both Hematoxyline/Eosine (HE) and immunohistochemical (IHC) staining. Serial sections which contain both invasive tumor and peri-tumoral area from the original block were cut (4 um) and stained with HE and LYVE-1. "LYVE1 antibody-lymphatic vessel marker" was used for IHC analysis. The sensitivity and specificity of the method were established as 67% and 71% respectively. The LYVE-1 positivity was mostly peritumoral (85 %) Negative and positive predictive values of LYVE-1 immunostaining were 77% and 60% respectively. On conclusion, as a novel lymphangiogenesis marker LYVE-1, has limited predictive values for the evaluation of sentinel lymph node metastasis in patients with early breast cancer.

Bugünkü bilgilerimize göre, bölgesel lenf bezi tutulumunun varlığı invaziv bir meme kanseri için en önemli prognostik belirleyicidir (1). Son 2 dekada geliştirilen Bekçi lenf düğümü biyopsisi (BLDB) bu tutulumu doğru olarak belirleyen klasik aksilla diseksiyonuna alternatif, morbiditesi düşük cerrahi bir uygulamadır. Özellikle erken evre meme kanserli olgularda endike olan bu yöntem, yüksek saptanma oranına rağmen hala kabul edilen ötesinde yanlış negatif sonuçlara sahiptir. Farklı tekniklerin birlikte kullanımı ve çok büyük hasta sayılarına ulaşan deneyimlere rağmen bu oran % 8-10 lar civarındadır (2). Bu nedenle bölgesel lenfatik yayılımını sağlıklı öngörecektir, yanlış negatif oranları azaltılmasında katkı sağlayacak histopatolojik ya da biyokimyasal belirteçlere şiddetle ihtiyaç vardır. Lymphatic vessel endothelial receptor-1 (LYVE-1) son birkaç yılda keşfedilen, bu amaçlarda kullanılabilir lenfatik endotele özgü bir biyo-belirteçtir.

LYVE-1, hyaluronan adı verilen glukozaminoglikan yapısında bir ekstrasellüler matriks proteinine bağlanan, lenfatik endotelinin lüminal bölümünde sınırlandırılmış bir membran reseptörüdür (3). Hüresel adezyon ve migrasyonda çok önemli rolü olan hyaluronan, esas olarak bölgesel lenf düğümünde yıkıma uğramaktadır (3). Çalışmalar, LYVE-1 in metastatik fonksiyonlu CD44 molekülü ile homoloji gösterdiğini ortaya koymuştur (3,4). Kısıtlı sayıda araştırma, bu belirtecin çeşitli solid kanser türlerinde lenfatik metastazı öngörebileceğini ve prognostik önemi olduğunu ortaya koymaktadır (5,6). Özellikle peritümöral gözlenen bu immunreaktivite olası bölgesel lenfatik yayılımı ön görebilir. Böylece, bu çalışmada BLDB uygulanan erken evrede meme kanserli olgularda peritümöral ve intratümöral LYVE-1 immureaktivitesinin BLD metastazını ne derecede öngördüğünü belirlemek amaçlanmıştır.

Tablo 1. Çalışmada yer alan olguların özellikleri

Yaş	29-74 (Ort. 53,5)
Cins	24 Kadın, 1 Erkek
Tümör büyüklüğü	
T1b	4 (%17)
T1c	9 (%37)
T2	11 (%46)
Tümör Tipi	
İnvaziv duktal karsinom	13 (%52)
İnvaziv lobuler karsinom	6 (%24)
Atipik medüller karsinom	2 (%8)
Müsinöz karsinom	1 (%4)
Papiller karsinom	1 (%4)
Mikst karsinom (kistik-medüller)	1 (%4)
Paget	1 (%4)
Bekçi lenf düğümünde metastaz	
Var	9 (%36)
Yok	16 (%64)

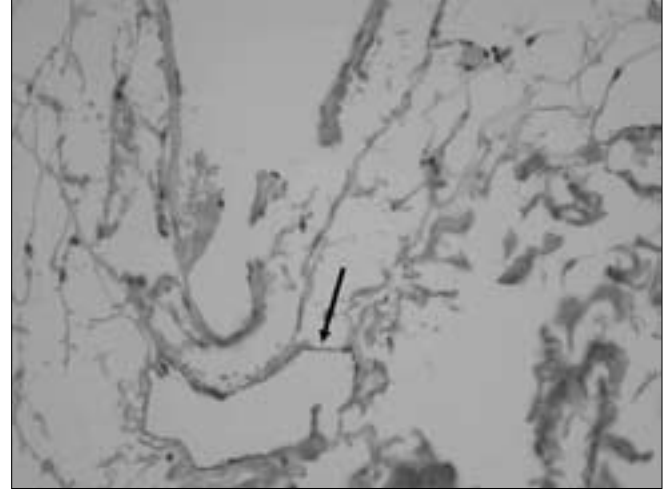
Tablo 2. LYVE-1 in lenfovasküler invazyona kıyasla öngörü değerleri

	LYVE-1	Lenfovasküler invazyon
Özgüllük	% 71	% 60
Duyarlık	% 67	% 89
Pozitif öngörü	% 60	% 57
Negatif öngörü	% 77	% 90

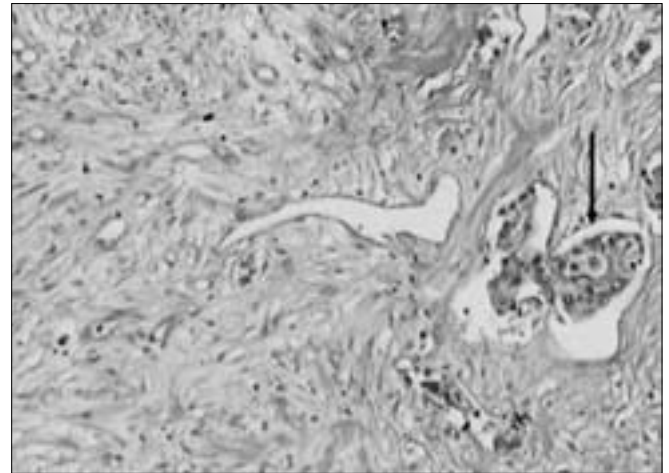
Gereç ve Yöntemler

Ocak 1999 ve Haziran 2005 tarihleri arasında, bekçi lenf düğümü biyopsisinin ardından klasik aksilla disseksiyonu uygulanan 25 olguya ait histopatolojik kesitler incelenme kapsamına alındı. Olgular ve tümöral özellikleri Tablo 1 de sunuldu.

Lenfatik Haritalama ve bekçi lenf düğümü biyopsisi: Birleşik yöntem kullanılarak BLDB sağlandı. Ameliyatlardan ortalama 3 saat önce Tc99m-Nanokolloid tümör bölgesinde 0,5 cc 200 µCi intradermal ve intraparakimal uygulandı. Tüm olgularda lenfosintigrafi yapılarak dinamik ve statik görüntüler elde edildi. İnsizyondan 15 dakika önce periareolar/intradermal, 2-3 ml lenfözürin/Patent mavisi (%1) enjeksiyonu yapıldı. Gamma sayaç ile en çok aktivite belirlenen alandan insizyon yapıldı. Maviye boyalı lenf kanalları disseke edildi. Sıcak ve mavi lenf düğümleri BLD kabul edilerek disseke edildi. Bu işlemin ardından klasik aksilla disseksiyonu uygulandı.



Resim 1. Peritümöral LYVE-1 boyanması (X400). Belirteç, boyalı lenfatik endotel göstermektedir.



Resim 2. Lenfovasküler invazyon (LVI) (HEX200), Belirteç, lenf damarı içerisindeki tümör embolisini göstermektedir.

Histopatolojik, İmmunohistokimyasal (İHK) inceleme: Bekçi lenf düğümlerindeki yayılım standart hematoksil-eosin ve İHK boyama ile belirlendi. Analiz için, tümör ve çevresini içeren HE boyalı kesitler seçildi. Bunların parafin bloklarından polilizinli lamplara 4 mikronluk kesitler alındı. Xylende çözülerek ve etanol serilerinden geçirilerek rehidrate edilen preparatlar, H₂O₂ tamponda bloklandı ve sitrat tamponda (pH 6) kaynatıldı. Daha sonra 0,1% Tween solusyonu ile yıkanarak, primer antikora (LYVE1 antibody - Lymphatic Vessel Marker (ab10278) 1/ 200) maruz bırakıldı. Sekonder antikor olarak "Goat Anti Rabbit Ab" (Santa Cruz®), nonspesifik bağlanmaların engellenmesi için ise "Non-Fat Dried milk" (Sigma) kullanıldı. Sekonder boyama kiti (LAB VISION®) ve DAB solusyonunu takiben Mayer Hematoksil ile boyanan kesitler yükselen alkol serilerinden geçirilip dehidrate edildikten sonra lamel ile kapatıldı. Bekçi lenf düğümü durumuna bakılmaksızın tümör içinde ve tümör çevresinde lenfatik damarlarda belirginlik ve artış olup olmadığı araştırıldı. Daha sonra bekçi lenf düğümlerinde

metastaz varlığı ile karşılaştırıldı. Sonuçlar 4 gözlü Ki-kare testi ile değerlendirildi.

İstatistiksel inceleme: İstatistiksel ölçütler aşağıdaki formüllere göre hesaplandı.

- Özgüllük: Gerçek negatif / gerçek negatif + yanlış pozitif
- Duyarlık: Gerçek pozitif / gerçek pozitif + yanlış negatif
- Pozitif öngörü: Gerçek pozitif / gerçek pozitif + yanlış pozitif
- Negatif öngörü: Gerçek negatif / gerçek negatif + yanlış negatif

Bulgular

Bekçi lenf düğümünün standart incelemesi sonucunda olguların % 36 (9 olgu) sında metastaz belirlendi. LYVE-1 boyanmaları olguların % 4 ünde intratümöral (2 olgu), %44 (11 olgu) peritümöral olarak belirlendi (Resim 1). Standart histopatolojik kesitlerde ise olguların % 56 (14 olgu) sında lenfovasküler invazyon (LVİ) gözlemlendi (Resim 2). İmmunoreaktivitenin bölgesel metastaz öngörüsüne ilişkin parametreler Tablo 2'de özetlendi. Peri/intratümöral LYVE-1 boyanmalarına ait özgüllük % 71, duyarlık % 67, pozitif öngörü % 60, negatif öngörü %77 olarak bulundu. Buna karşın klasik histopatolojik incelemede LVİ'a ait özgüllük % 60, duyarlık % 89, pozitif öngörü % 57, negatif öngörü % 90 olarak belirlendi.

Tartışma

Tümör büyüklüğü, hormon reseptörünün varlığı, tümörün derecesi gibi klasik histopatolojik parametreler, nomogram çalışmalarında ve sistematik derlemelerde olası bekçi-dışı lenf düğümü metastazı riskini kuvvetle işaret etmekle beraber, BLD metastazını öngörmeye tek başlarına sınırlı etkilidirler (7). Bunlar içerisinde en belirgin olanları tümör büyüklüğü ve LVİ varlığıdır. Bu çalışmadaki sonuçlara göre, LYVE-1 immunoreaktivitesinin LVİ'a ait parametrelerden daha belirleyici olduğu söylenemez. Özellikle LVİ nun "ne-

gatif öngörüsü" dikkat çekici olarak belirgindir ve sadece 1 olguda LVİ yanlış-pozitif sonuçlanmıştır. Ayrıca meme kanserli olgularda olumsuz prognozun bir göstergesi olduğu iddia edilen LYVE-1 bu yönüyle çalışmada değerlendirilmemiştir. Çünkü sağlıklı ilişim sağlamak için çok sayıda niceleyici histopatolojik parametrelere, yüksek olgu sayısına gereksinim vardır. Ayrıca çalışmada yer alan hiçbir olguda henüz bölgesel yineleme mevcut değildir ve olguların tamamı hastalısız yaşamaktadır. Bazı araştırmacılar, meme kanserli olgularda intratümöral LYVE-1 immunoreaktivitesinin olmasını, tümör embolisi içeren LYVE-1 boyalı lenfatikleri prognostik ve anlamlı kabul etmektedir (8). Oysa bu çalışmada olguların % 4 ünde intratümöral boyanmaya rastlandı ve olumsuz prognozu olduğu düşünülen olgularda LYVE-1 ile LVİ birlikteliğine rastlanmadı. Çalışmada LYVE-1 e ait öngörü sonuçlarının yeterince yüksek olmamasının bir diğer nedeni ise tümör türü olabilir. Örneğin LYVE-1 immunoreaktivitesi lenfanjiogenezle birlikte yoğun anjiogenezin olduğu akciğer ve endometrium kanserlerinde çok daha belirgin olarak gözlemlenmiştir (6). Dahası, Vieguel ve arkadaşları (9) içerisinde malign olgular da taşıyan çeşitli meme patolojilerini incelemişler ve meme kanserli olgularda daha düşük LYVE-1 immunoreaktivitesine rastlamışlardır. Sonunda meme karsinogenezinde diğer bazı kanser türlerinin aksine lenfanjiogenezin olmadığı, anjiogenezin belirgin olduğunu gözlemişlerdir. Benzer bir gözlem de prostat tümörlerinden elde edilmiştir. Bu olgularda peritümöral yeni lenf damarı yapımından çok yıkımına rastlanmıştır (10).

Sonuç olarak peritümöral LYVE-1 immunoreaktivitesi, meme kanserli olgularda bekçi lenf düğümü metastazını öngörmeye yeterince güçlü değildir. Yeni lenf damarı yapımını gösteren belirteçlerden çok, olasılıkla lenf damarı *tahribatını* gösteren yeni belirteçlere gereksinim vardır.

Kaynaklar

1. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63:181-187.
2. Kelley MC, Hansen N, McMasters KM. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Am J Surg*, 2004; 188:49-61.
3. Jackson DG. Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *APMIS*, 2004;112:526-538.
4. Banerji S, Ni J, Wang SX et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999;144:789-801.
5. Bono P, Wasenius V-M, Heikkilä P, Lundin J, Jackson D, Joensuu H. High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer. *Clin Cancer Research*, 2004; 10: 7144-7149.

6. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in endometrial and lung cancer. *J Clin Pathol*. 2005 Feb; 58(2):202-206.
7. Soni NK, Carmalt HL, Gillett DJ, Spillane AJ. Evaluation of a breast cancer nomogram for prediction of non-sentinel lymph node positivity. *Eur J Surg Oncol*, 2005 (Baskıda).
8. Cory CSM, Leek RD, Robson AM et al. Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol*, 2003;200:195-206.
9. Vieguel MM, Bos R, van der Groep et al. Lack of lymphangiogenesis during breast carcinogenesis. *J Clin Pathol*, 2004; 57:746-751.
10. Trojan L, Michel MS, Rensch F, et al. Lymph and blood vessel architecture in benign and malignant prostatic tissue: Lack of lymphangiogenesis in prostate carcinoma assessed with novel lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (LYVE-1). *J Urol*, 2004;172:103-107.

İletişim

Hilal Koçdor
E-mail : hilal.kocdor@deu.edu.tr