

MEME KARSİNOMLARINDA PCNA VE AGNOR DEĞERLERİNİN MITOTİK İNDEKS, ERRP EKSPRESYONU, ELASTİK İNDEKS VE KLİNİK EVRE İLE İLİŞKİSİ

Dr. Şükrü O. ÖZMADAR (*), Dr. Levent YILDIZ (*), Dr. İnci YAVUZ (*), Dr. Filiz KARAGÖZ (*), Dr. Bedri KANDEMİR (*), Dr. Ali ÇALIKUŞU (**), Dr. A. Naki ULUSOY (**)

ÖZET: Bu çalışmada meme karsinomlarında tümör proliferasyon yeteneği ile diferansiyasyon, elastik indeks ve estrogen reseptör profilleri ile klinik evre arasındaki ilişkiler incelenmiştir. 20 infiltratif duktal karsinom olgusu parafin kesitlerinde B-SA peroksidaz yöntemi kullanılarak proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ve estrogen reseptör related protein (ERRP) varlığı araştırıldı. Bir bölüm kesitlere de standart AgNOR ve VE/VG yöntemleri uygulandı. Tüm olgularda histopatolojik diferansiyasyon, mitotik indeks, elastik indeks ve klinik özellikler (tümör çapı, aksiller lenf nod durumu ve evre) saptandı. Elde edilen değerler karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak PCNA ve AGNOR indeksleri arasında anlamlı ilişki saptandı. PCNA değerleri ile histolojik grade, mitotik aktivite, ERRP profili ve elastik lif dağılımları arasında da anlamlı ilişki gözlemlendi. AGNOR indeksi ile ERRP profili ve elastik indeks arasında ters orantılı kuvvetli ilişki dikkati çekti. Mitotik indeks ile ERRP değerleri arasında doğru orantılı ilişki gözlemlendi. Mitotik indeks ve PCNA indeksi arasında kuvvetli ilişki saptandı. AGNOR indeksinin klinik evre ile ilişkisi diğer parametrelerden daha kuvvetli olarak belirlendi ($p<0.05$). PCNA ve AGNOR indeksi ile birlikte ERRP ve elastik indeks profillerinin tümör diferansiyasyon göstergesi olarak güvenilir parametreler oldukları sonucuna varıldı. Mitotik indeksin de diferansiyasyon göstergesi olarak güvenilir parametreler oldukları sonucuna varıldı. Mitotik indeksin de diferansiyasyon göstergesi olarak önemini koruduğu anlaşıldı.

ANAHTAR KELİMELEER: Meme karsinomları, PCNA, AgNOR, ERRP, prognostik parametreler

SUMMARY: In this study, we investigated tumor proliferation differentiation, elastic index, oestrogen receptor profiles and their correlations in breast carcinomas. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and oestrogen receptor related protein (ERRP) were investigated by B-SA peroxidase method in paraffin sections of 20 infiltrative ductal carcinomas. In addition, AgNOR and VE/VG methods were used. Histopathological differentiation, mitotic and elastic index and clinical parameters (tumor size, axillary lymph node status, and stage) were evaluated in all patients. There is statistically significant correlation between PCNA and AgNOR indexes. There were significant correlation between PCNA values and histologic grade, mitotic index, ERRP and elastic index. There was positive correlation between, mitotic index and ERRP values and PCNA index. The correlation between AgNOR and clinical stage was significant ($p<0.05$). In conclusion, we suggest that PCNA, AgNOR index, ERRP values and elastic index are reliable parameters in the evaluation of tumor differentiation in breast carcinomas. In addition, mitotic index is also valuable as a differentiation parameter.

KEY WORDS: Breast carcinomas PCNA, AgNOR, ERRP, prognostic parameters

GİRİŞ

Kadınların yaklaşık %7'sinde görülen ve kanser nede- niyle ölümlerinin %20'sinden sorumlu olan meme kanseri için güvenilir ve tekrarlanabilir prognostik testlerin geliştirilmesi her vakada optimal tedavinin seçilmesi açısından önemlidir (1,9). Son yıllarda, çeşitli benign lezyonlarda ve tümörlerde, proliferasyon karakterinin saptanması için klasi- mitotik indekse oranla daha objektif bir kriter gibi görü- nen ve kolay uygulanan yeni proliferatif indeksler olan PCNA indeksi ve AgNOR skorlaması yoğun olarak kullanı- lmaktadır (3,6-8,10-12). PCNA/Cyclin (P10), mitozu hazırla- nan G1-S fazındaki hücre nükleuslarında hücre proliferas- yonunun başlamasında rol oynayan DNA polimeraz-delta yardımcı proteini olup; pozitifliğinin gösterilmesi ve dağılım patterni proliferasyon indeksi olarak kabul edilmektedir (7,10,14,15). Yanısıra, AgNOR yöntemi de ribozomal RNA sentezine kaynaklık eden ribozomal DNA segmentlerinde yer alan non-histon yapısındaki bazı nükleolar asidik fos- foproteinlerin (AgNOR proteinleri), gümüş ile boyanarak ışık ve elektron mikroskobunda incelenmesini sağlar, proli- feratif aktivite farklılıkları gösteren hücreler arasında Ag- NOR sayı ve dağılımı da farklı bulunur (6,8,16). Bu çalış- ma PCNA indeksi ve AgNOR skorlamasının, meme karsi- nomlarında konvansiyonel olarak kullanılan ve pronostik açıdan değerli parametreler olan; histolojik grade, mitotik

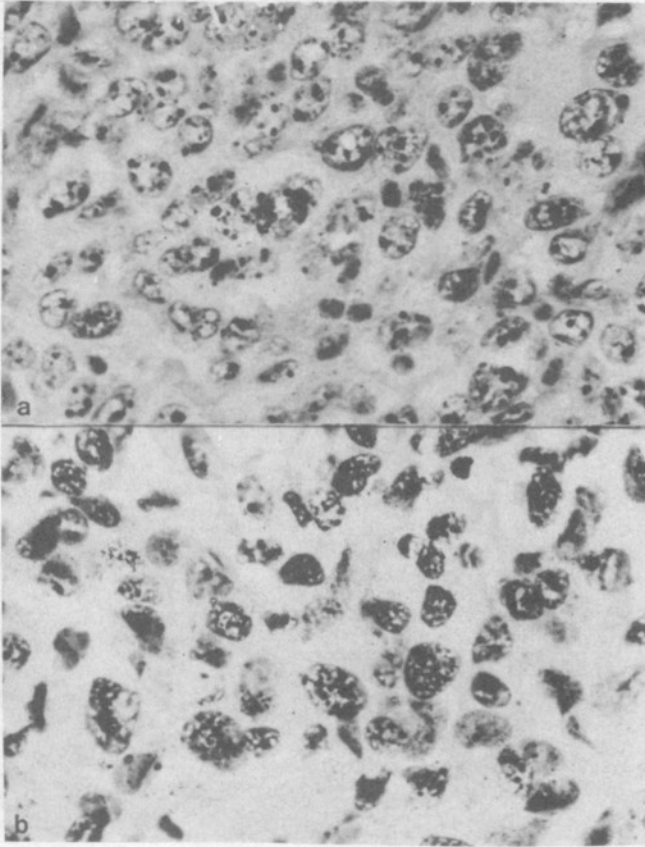
aktivite, elastozis, tümör büyüklüğü, lenf nodu tutulumu ve estrogen reseptör içeriği ile ilişkisi araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

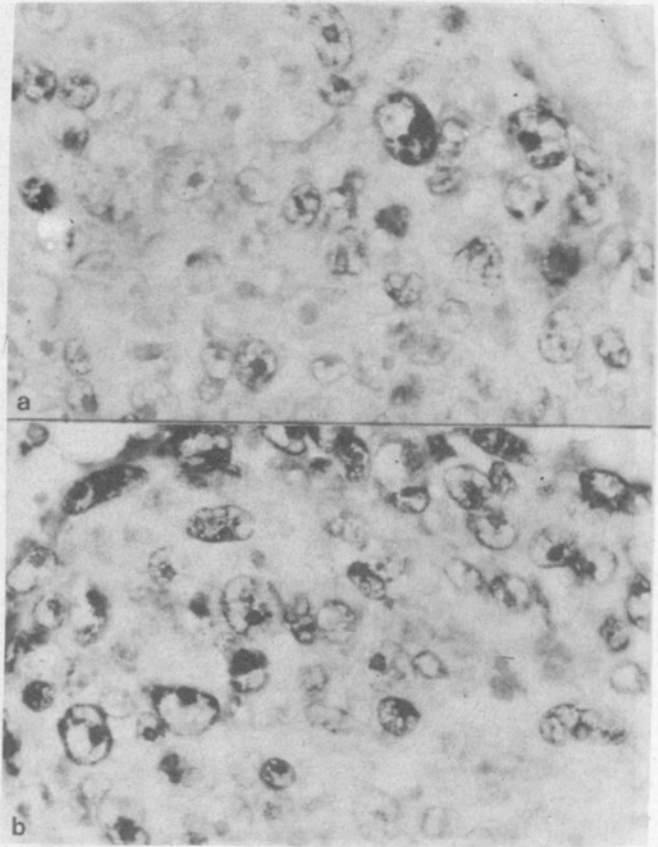
Çalışmamız Ocak-Haziran 1994 tarihleri arasında On- dokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı konan 20 infiltratif duktal karsinomlu kadın hastayı kapsamaktadır. Vakalara ait preparatlar tekrar ince- lendi, Bloom-Richardson kriterlerine göre (4) histolojik der- celendirme tekrarlandı ve her vaka için 10 büyük büyütme alanında (BBA) (Nikon Optiphot-2 mikroskop, x10 oküler, x40 objektif) mitoz sayıları saptandı. Doku örnekleri parafin kesitlerinin bir bölümünde Streptavidin biotin peroksidaz (Supersensitive multilink immunodetection system, Bioge- nex, USA; Histostain-SP(peroxidase) kit, Zymed, USA) yön- temi kullanılarak anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA, clone: P10, Zymed, USA) ve anti-estrogen receptor related protein (ERRP, clone: p29, Biogenex, USA) primer antikorları ile bu belirleyicilerin varlığı araştırıldı. Bir bölüm kesitler, standart AgNOR yöntemi (6) olan gelatin formik asit-gümüş nitrat solüsyonu ile karanlıkta 45 dakika boyan- dı. PCNA indeksi (nükleer pozitivite gösteren hücreler/1000 neoplastik hücre) ve AgNOR skoru (ışık mikroskobunda her olgu için 100 tümör hücresi nükleusunda AgNOR benekleri sayılarak ve nükleus başına düşen ortalama değer alınarak (1000x, imm.oil)) hesaplandı (8,10). ERRP ekspresyonu, boyanmanın olduğu lokalizasyonda konvansiyonel yöntem- le 0 ile 4 derece arasında değerlendirildi (9,17). Bir bölüm seri kesitlere de, Verhoeff elastica-Van Gieson boya yöntemi uygulanarak tüm olgularda, elastik indeks (periduktal, perivasküler ve stromal lokalizasyonlarda 0-3 derece altın-

* Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Samsun

** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Samsun



Resim 1 : Tumor Hücreleri Nükleuslarında AgNOR benekleri (Colloidal Ag,x100, imm.oil) A:Grade I, AS:2.400; B:Grade III, AS:3.500,



Resim 2 : Tumor Hücrelerinde İntranükleer PCNA Ekspresyonu (Biotin-Streptavidin peroksidaz) A:Grade I, PI:0.060 (x400); B:Grade III, PI: 0.336(x200),

da skorlandı ve her vaka için ortalama değerler hesaplandı, klinik özellikler (tümör çapı; cerrah tarafından hastalara ait taze mastektomi spesmenleri üzerinde ölçülen en büyük boyut alınarak; aksiller lenf nod durumu; metastaz varlığı ve yokluğuna göre ve klinik evre; AJCCS'e göre) saptandı (2-4,9,13,15,18). Elde edilen tüm veriler Systatw5 (Windows 3.1 uyumlu) istatistik programı kullanılarak bilgisayar ortamında değerlendirildi ve yorumlandı. Gruplararası ilişki Pearson correlation matrix ile sınılandı ve gruplararası farklar Student t testi ile araştırıldı; $p < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Hastaların yaş ortalaması 45.8 olup, 39-70 yaşları arasındaydılar. Tümör çaplarının boyutları (TÇ) 1.5-10 cm arasında değişiyordu (ortalama; 3.637 cm, standart hata (SH): 0.886). 11 vakada (%55) aksiller tutulum (AKS) mevcuttu. Vakaların çoğu erken evrede idi (KE; 9 vaka evre I (%45), 9 vaka evre II (%45), 1 vaka evre III (%5), 1 tanesi de evre IV (%5) olarak saptandı) ve bir vaka dışında tanı konulduğu sırada uzak metastaz saptanmadı. Mitotik indeks (Mİ) değerleri 1-50 arasında idi (ortalama 13, SH:0.327). Pİ sayımı sonucunda 11-336 arasında (ortalama;131, SH:22) değerler saptandı. AgNOR skoru(AS) için bu değerler 1.460-10.400,3.212, SH:0.448 bulunmuştur. ERRP ekspresyonu (ER) neoplastik dokularda intrasitoplazmik lokalizasyonda değişen derecelerde gözlemlendi, grade II ve III birer olguda negatif olarak değerlendirildi. Elastosis değerleri (EI) 0.110-0.770 arasında değişmekteydi. (ortalama 0.462, SH: 0.041), (resim 1-4).

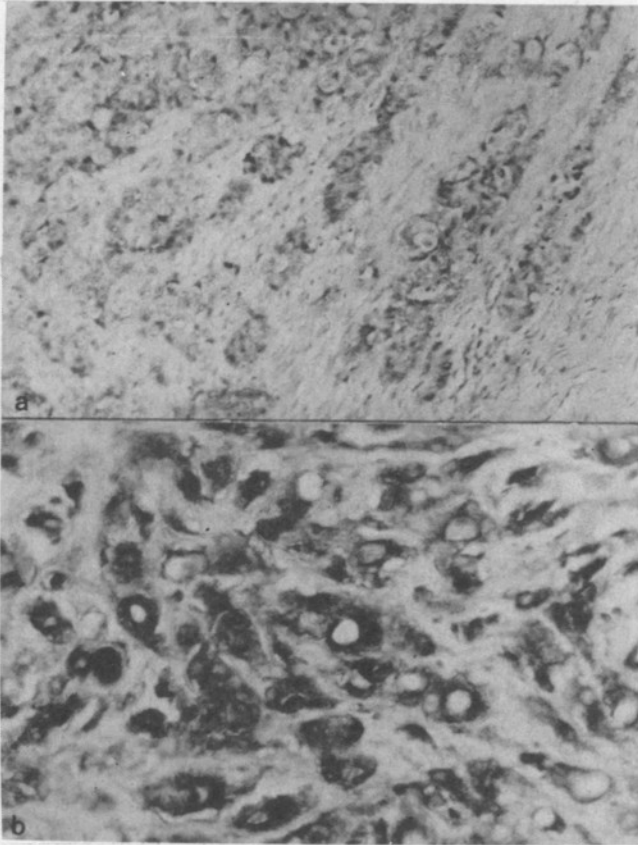
Vakaların 5 tanesi grade I (%25), 11 tanesi grade II (%55), 4 tanesi grade III (%20) olarak saptandı. Grade I tümörlerde TÇ, Mİ, Pİ, AS, EI ve ER ortalama değerleri sırasıyla; 4.875,0.0021 0.036, 2.133, 0.548, 2.500 (SH: 1.760, 0.0009, 0.014, 0.323, 0.074, 0.645); grade II tümörler için bu değerler; 3.136, 1.455, 0.173, 3.701, 0.445, 2.364 (SH: 0.364, 2.609, 0.029, 0.770, 0.064, 0.364); grade III tümörler için ise 9, 0.020, 0.115, 2.998, 0.430, 2.200 (SH: 0.534, 0.009, 0.038, 0.345, 0.066, 0.800) olarak saptandı.

Grade I tümörlerde AS ile Pİ ve AS ile Mİ arasında doğru yönde (PCM: 0.499, 0.310) ve AS ile KE, TÇ ve AKS arasında aynı doğrultuda, çok kuvvetli ilişki gözlemlendi (PCM:0.975, 0.848, 0.837) AS ile ER arasında ters (PCM:-0.186), AS ile EI arasında kuvvetli ve ters yönde (PCM:-0.952) ilişki saptandı.

Grade II grubunda AS ile Pİ ilişkisi en kuvvetli olarak izlendi (PCM:0.980). EI ile AS, Pİ ve Mİ ilişkileri ters yönde ve kuvvetliydi (PCM:-0.751, -0.653 ve -0.268). Pİ ile ER arasında ters yönde zayıf ilişki dikkati çekti (PCM:-0.074).

Grade III tümörlerde AS ile Pİ arasında ters yönde ilişki saptandı (PCM:-0.355). AS ile KE ve AKS ilişkisi en kuvvetli olarak bu grupta izlenirken (PCM:0.984 ve 0.984); AS-TÇ ilişkisi de kuvvetliydi (PCM:0.664). AS ve Mİ ilişkisi doğru yönde AS ile EI ilişkisi ters yönde ve zayıf olarak izlendi. AS ve ER ilişkisi çok zayıftı. Pİ ile Mİ ilişkisi en kuvvetli olarak bu grupta izlendi (PCM:0.874). Pİ ve EI arasında doğru yönde ilişki, Pİ ile KE ve AKS arasında ters yönde ilişki saptanırken (PCM:0.324;-0.319,-0.319), Pİ ile TÇ arasında doğru yönde kuvvetli ilişki saptandı (PCM:0.436).

Yapılan t testi sonuçlarına göre; PCNA indeksi incelendi-

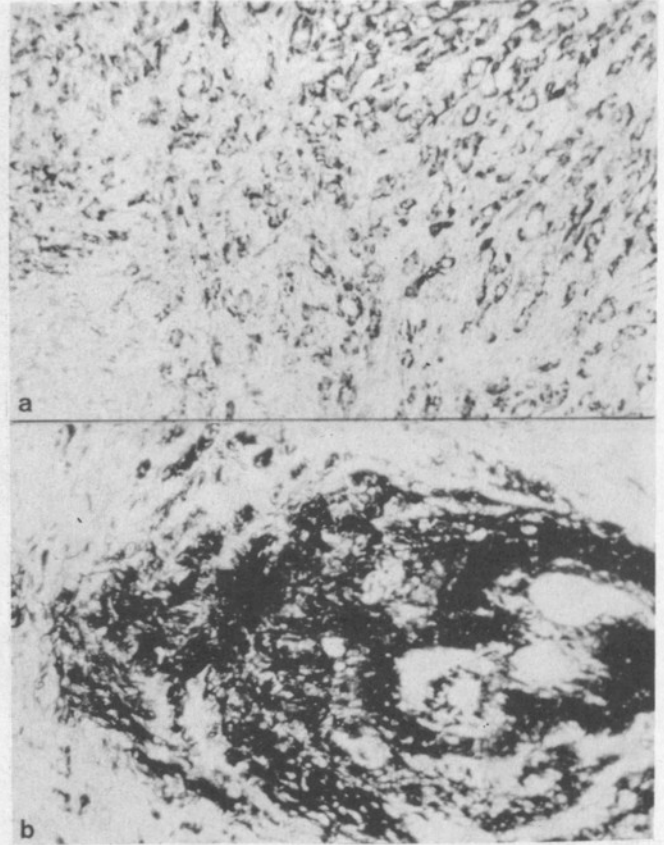


Resim 3 : Estrogen receptor Related Protein immünreaksiyonu (Biotin-Streptavidin Peroksidaz) A:Grade II, ERRP: (++) (x100); B:Grade I, ERRP:(++++); (x200);

ğinde; grade I ve II tümörler arasındaki fark önemli bulundu ($t_{1-2}-3:226$, $p<0.05$). Grade II ve III ile I ve III arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($t_{2-3}:0.674$, $t_{1-3}:1.797$, $p>0.05$). AgNOR skoru açısından ise, grade I ve II ile II ve III tümörler arasında anlamlı fark saptanmadı ($t_{1-2}:3.053$, $t_{2-3}:0.971$, $p>0.05$); buna karşın grade I ve III arasındaki fark önemli bulundu. ($t_{1-3}:3.886$, $p<0.05$).

TARTIŞMA

Hücre kinetiğinin histolojik derecelendirme, tedaviye olan yaklaşımın şekillendirilmesi ve relaps belirlenmesinde önemli bir yardımcı olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (1,7,15). Meme tümörlerinde tümör hücre kinetiği; hastaliksız ve toplam sağkalım süresinin belirlenmesinde önceleri flow cytometry ve Ki 67 ekspresyonu ile araştırılmıştır (4,11). Proliferasyon indeksi yeterliliği açısından 1989 da Dervan tarafından Ki 67 ve AgNOR skorları ilişkisi; Garcia ile Giri tarafından da, flow cytometry ile PCNA immünreaksiyonu ve AgNOR skorlaması arasındaki ilişkiler ortaya konmuştur(6,8). 1991 de van Dierendonck tarafından Ki 67, BrdU ve PCNA indeksi ilişkileri incelenmiş ve PCNA boyanmasının hücrelerdeki S faz DNA kontentinin en iyi belirleyicisi olduğu ileri sürülmüştür (7). Shrestha, meme infiltratif duktal karinsinomlarında %2 ile %36 oranları arasında saptadıkları PCNA varlığının histolojik dediferansiyasyonla ilişkisini ortaya koymuş, ancak Pİ ile tümör boyutu ve aksiller lenf nodumetastazı arasında ilişki bulamamıştır (15). Leonardı'nın çalışmasında ise, PCNA indeksi ile histolojik grade, mitoz sayısı, tümör büyüklüğü, klinik evre ve estrogen



Resim 4 : Tümörlerde Elastik Lif Dağılımı (Verboeff Elastica-Van Gieson) A:Grade III, El:0.220(x100); B: Grade II, El: 0.660(x200)

reseptör içeriği arasında herhangi bir ilişki bulunamadığı belirtilmiştir (14).

DNA looplarından olan nucleolar organizmer regions (NORs), rRNA üretimi için kodlanmış olup içerdiği proteinlerin argirofilisinden yararlanılarak, AgNOR reaksiyonu ile demonstre edilir (6,8,16). 1988 de Smith ve Crocker, benign meme lezyonları ile meme kanserlerinde yaptıkları çalışmada malign lezyonlarda AgNOR değerlerini belirgin olarak yüksek bulmuşlar, ancak mitoz frekansı ile direkt ilişki gösterememişlerdir (16). Yapılan diğer çalışmalarda intraduktal ve infiltratif duktal karinsinomlarda yüksek AgNOR skorları saptanmıştır (3,6,8,216).

Kanser hücrelerinin proliferatif aktivitesini yansıtan mitotik indeks de, meme karinsinomlarında iyi tanımlanmış diğer bir prognostik faktördür (1,15). Aksiller nodal metastazı saptanmayan vakaların %20 ile %30'u sırasıyla 5 ile 10 yıl içerisinde metastatik tümör nedeniyle kaybedilmektedir (11). Aksiller nodal tutulumu olmayan, hormon reseptörü pozitif tümörlerde DNA ploidy, tümör çapı ve histolojik özelliklere göre prognoz için bazı tahminlerde bulunabilir; ancak literatürdeki bulgular çelişkilidir (1,15,17). Yine de mitotik indeks kullanılarak hastaliksız yaşam ve toplam sağkalım konusunda güvenilir bir tahmin yapılabileceği görüşü genellikle kabul görmektedir (1,7). Mitotik aktivite ER negatif tümörlerde, ER pozitif olanlara göre yaklaşık olarak 2 kat fazladır (12). Bu da, hormon reseptörleri varlığının sağkalım üzerindeki etkisini açıklar (1,12). Flow cytometric çalışmalar, ER negatif vakalarda S faz fraksiyonunun ve proliferatif aktivitenin ER pozitif vakalara oranla daha yüksek olduğunu kanıtlamıştır (12). ER içeren tümörler düşük histolojik grade ve düşük proliferatif aktivite göstermektedirler. Estrogen resept-

tör varlığı ile Ki 67 profili arasında kuvvetli ters ilişki bulunduğunu bildirilmiştir (11). Yapılan çok sayıdaki araştırmada histolojik dediferansiyasyon, sellülarite ve elastozis ile ilişkisi gösterilen ERRP ekspresyonunun; konağın inflamatuvar cevabı, tümör büyüklüğü ve aksiller nodal metastaz ile herhangi bir ilişkisi bulunamamıştır (3,17).

Periduktal, perivasküler ve stromal elastik lif artımı, iyi ve orta derecede diferansiye meme karsinomlarında daha belirgindir ve elastozis düşük mitotik aktivite ile paralel seyir gösteren bir parametre gibi görünmektedir (2,13,18). İyi diferansiye tümörlü hastalarda aksiller nodal metastaz saptanma oranı düşmekte, klinik evre I-II hastalarda elastozis ve yüksek ER profili saptanmaktadır (17). Baloğlu ve Öztekin, elastik lif artımı ve lokalizasyonu ile primer tümör çapı arasında zayıf negatif ilişki bulmuşlardır (3). Buna karşın Giri, serisinde primer tümör çapı ile elastik lif artımı arasında ilişki olmadığını bildirmiştir (2).

Çalışmamızda tüm tümörlerde (%100) PCNA varlığı gözlenmiştir. PCNA indeksi bütün grade gruplarında mitotik indeks ve AgNOR skoru ile yakın ilişki göstermektedir. Grade I grubunda bütün parametreler ile yakın ilişki göze çarpan AgNOR skorunun Grade II ve III grubunda da klinik evre, tümör çapı ve aksiller nodal tutulum ile yakın ilişkisi devamlılık gösteriyordu PCNA indeksinin grade I grubunda elastik indeks ile ters yönlü ilişkisi, tümör çapı ve klinik evre ile doğru yönde ilişkisi göze çarpıyordu. PCNA indeksi ile mitotik indeks arasındaki ilişki grade II ve III tümörlerde daha belirgin bulunmuştur. Grade II grubunda AgNOR skoru ile PCNA indeksinin çok kuvvetli ilişkisi ve her ikisinin de elastik indeks ile ters yönlü kuvvetli ilişkisi dikkati çekti. PCNA varlığı ile tümör çapı ile ilişkisi, grade III grubunda da devamlılık gösteriyordu. Grade III grubunda ise özellikle PCNA indeksinin daha sonra da AgNOR skorunun mitotik indeks ile ve mitotik indeksin tümör çapı ile çok yakın ilişkisi göze çarpıyordu. Bu sonuçlar, PCNA indeksi ve AgNOR skorlamasının bir hücre kinetiği ve dediferansiyasyon belirleyicisi olarak güvenilirliğini desteklemektedir. Ayrıca mitotik indeksin de önemini koruduğu görülmektedir. ancak hücre kinetiği ile diğer parametrelerin ilişkisinin geniş serilerde detaylı incelenmeye devam edilmesinin gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Aaltomaa S, Liponen P, Eskelinen M, et al. Hormon Receptor Status and Mitotic Activity as Risk Factors for Recurrence and death in Female Breast Carcinoma Anticancer RES 11:1701-1706, 1991
2. Azzopardi JG, Laurini RN. Elastosis in Breast Cancer. Cancer 33:174-183, 1974
3. Baloğlu H, Öztekin İ. Kadın memesi Klasik Tip İnvaziv Duktal Karsinomlarında Prognostik Parametrelerin Dinamik ilişkisi. Türk Neoplazi Dergisi 1:75-82, 1993
4. Bears OH. Staging of Cancer of the Breast as a Guide to Therapy. Cancer 53:592-598, 1984
5. Celis JE, Bravo R, Larsen PM, et al. Cyclin: A Nuclear Protein Whose Level Correlates Directly with the Proliferative State of Normal as well as Transformed Cells. Leukemia Res 3:143-157, 1984
6. Dervan PA, Gilmartin LG, Loftus BN, et al. Argrophilic Nucleolar region Counts Correlate with Ki 67. Am J Clin Pathol 92:401-407, 1989
7. Dierendonck CH van Wicsman JH, Keijzer R, et al. Cell cycle related staining patterns of the anti-Proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Am J Pathol 138:1165-1172, 1991
8. Giri DD, Nottingham JF, Lawry J, et al. Silver-Binding Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: Correlations with polidy and growth phase by DNA flow cytometry. J Pathol 157:307-313, 1989
9. Graham DM, Jin L, Lloyd RV. Detection of Estrogen receptor in Paraffin-Embedded Sections of Breast Carcinoma by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. Am J Surg Pathol 15:475-485, 1991
10. Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Immunolocalization in Paraffin Sections: An index of Cell Proliferation with Evidence of Deregulated Expression in Some Neoplasms. J Pathol 162:285-294, 1990
11. Hanna WM, Kahh HJ, Chapman JAW. The Correlation of ki 67 Growth Factor and Erica in Breast Cancer. Mod Pathol 5:220-223, 1992
12. Hori M, Furusato M, nikaidoh T, et al. Immunohistochemical demonstration of Cell Proliferation and Estrogen Receptor Status in Human Breast Cancer. Analyses of 45 Cases. Acta Pathol Jpn 40:902-907, 1990.
13. Kuşkonmaz İ. Memeinin Benign ve Malign Hastalıklarında Stromal Değişiklikler (Histokimyasal Çalışma). T.C. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Uzmanlık tezi. Samsun, 1992
14. Leonardi E, Girlando S, Mauri FA, et al. PCNA and Ki-67 Expressions in Breast Carcinoma: Correlations with clinical and biological Variables. J Clin Pathol 45:416-19, 1992
15. Shrestha P, Yamada K, Wada T, et al. Proliferating Cell Nuclear Antigen in Breast Lesions: Correlation of C-erbB-2 Oncoprotein and EGF Receptor and its Clinicopathological Significance in Breast Cancer. Virch Arch Pathol Anat (A) 421:193-202, 1992
16. Smith R, Crocker J. Evaluation of Nuclear Organizer Region Associated Proteins in Breast Malignancy. Histopathol 12: 113-125, 1988
17. Wong SY, Kernohan NM, Walker F. Breast Cancers with Extremely High Oestrogen receptor Protein Status. Histopathol 16:125-132, 1990
18. Yalçın ZN, Öztekin İ, Uçmaklı E. Meme Kanserlerinde Elastik İndeksin Tipi Göre Durumu ve Diferansiyasyonla ilgisi. Türk Patoloji Dergisi 6:50-59, 1990