

MEME KARSİNOMLARINDA PROLİFERATING CELL NUCLEAR ANTİGEN'İN (PCNA) PROGNOSTİK ÖNEMİ

Uzm. Dr. Füsün FİLİZEL (*), Biolog Semahat ERTEK (*), Uzm. Dr. Şennur İLVAN (**), Öğr. Görv. Dr. Zerrin CALAY (**), Prof. Dr. Nafi ORUÇ (**), Uzm. Dr. Sait BAKIR (***)

ÖZET: Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), son yıllarda gelişen ve parafin bloklarda immunhistokimyasal yöntemlerle çalışma olanağı sağlayan, DNA polimeraz deltanın kofaktörü olarak fonksiyon gören nükleer nonhiston proteindir. Çalışmamıza yaşları 30 ile 75 arasında değişen 42'si invaziv duktal karsinom, 5'i invaziv lobüler karsinom, 1'i medüller karsinom, 1'i atipik medüller karsinom, 1'i müsinöz karsinom olan toplam 50 adet meme karsinomu olgusu alındı. Olgular prognostik faktörler olan histolojik grade, aksiller lenf düğümü tutulumu ve tümör çapı açısından incelendi ve PCNA ile boyandı. 42 adet invaziv duktal karsinom olgusunun PCNA değerleri ile tümör grade'i karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.01$). Tümör çapı ve aksiller lenf düğümü tutulumu ile PCNA değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0.5$).

ANAHTAR KELİMELE: Meme karsinomu, PCNA, prognoz

SUMMARY: Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), a non-histon nuclear protein and cofactor of DNA polymerase delta is an immunohistochemical method which works on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections 50 breast carcinoma cases with age range 30 to 75 years were included in this study. They consisted of 42 invasive ductal carcinoma, 5 invasive lobular carcinoma, 1 medullary carcinoma, 1 atypical medullary carcinoma and 1 mucinous carcinoma cases with age range 30 to 75 years were included in this study. All cases were evaluated according to the well-known prognostic factors such as histological grade, axillary nodal involvement and tumor size. The PCNA score of 42 invasive ductal carcinoma showed a significant correlation with the histological grade of the tumor ($p<0.01$). However the PCNA score did not correlate with tumor size and axillary nodal involvement. ($p>0.5$).

KEY WORDS: Breast carcinoma, PCNA, prognosis.

GİRİŞ

Meme karsinomlarında, tümörün proliferatif aktivitesinin prognostik önemi gösterilmiştir (1,2,3).

Tümörlerdeki proliferatif aktivite mitoz sayımı, AGNOR değerinin tayini, DNA flow sitometri, tritiated thymidine gibi yöntemler ve proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki-67 gibi proliferasyonla ilişkili nükleer antijenlerin immunohistokimyasal olarak gösterilmesi ile belirlenmektedir (4,5,6,7,8).

İlk defa 1978 yılında Miyachi tarafından sistemik lupus eritematosuslu hastaların serumunda proliferan hücre antijenleriyle reaksiyon veren otoantikörlerin varlığı bildirilmiştir (7,8,9).

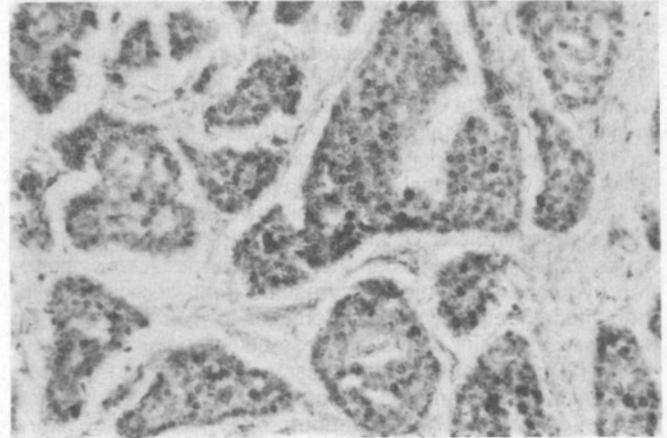
Siklin olarak da bilinen PCNA; proliferan hücrelerde, hücre siklusunun özellikle S fazında nüvede bulunan, immunohistokimyasal yöntemlerle gösterilen bir proliferasyon belirleyicisidir (4,8). 36000 molekül ağırlığında nonhiston bir protein olan PCNA, geç G1 fazında ortaya çıkar, S fazında artar, G2 ve M fazında azalır (4,5,7,8). PCNA'nın esas rolü, DNA polimeraz deltanın kofaktörü olarak DNA sentezini ve hücre proliferasyonunu düzenlemektir (7).

Bu çalışmada, meme karsinomlarında kantitatif olarak saptanan PCNA değerleri ile önemli prognostik faktörler olan grade, tümör çapı, lenf düğümü tutulumu ve izlenen hastalarda nüks ve yaşam süreleri karşılaştırıldı.

MATERYAL VE METOD

50 adet primer meme karsinomu olgusunun tümünde mastektomi ve aksiller küretaj materyali değerlendirildi. 50 olgunun 42'si invaziv duktal karsinom, 5'i invaziv lobüler karsinom, 1'i medüller karsinom, 1'i atipik medüller karsinom, 1'i müsinöz karsinom idi.

Olgulara ait klinik bilgiler (yaş, tümörün yerleşim yeri, tümör çapı) patoloji raporlarından elde edildi.



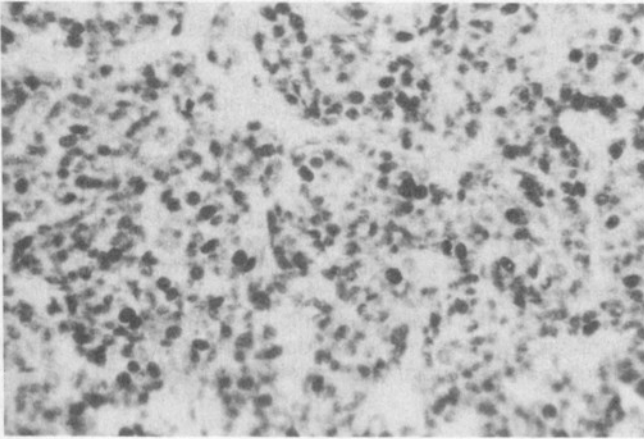
Resim 1 : PCNA değeri orta olan Grade II invaziv duktal karsinom (APAAPX200)

Olguların tümü biri bu konuda deneyimli 3 patolog tarafından tekrar değerlendirildi. İnvaziv duktal karsinomlarda grade'leme Elston'un önerdiği tubul oluşumu, mitoz sayısı ve tümör hücrelerindeki pleomorfizm gözönüne alınarak yapıldı (10). 12 adet olgunun nüks ve mortalite açısından 3 ile 5 yıl arasında takibi vardı. % 10 luk formalinde tesbitli parafin gömülü bloklardan elde edilen 5 mikronluk kesitler poly-L-lysine (Sigma, P8920) ile kaplı lamalar üzerine alındı. Kesitler 37°C da 1 gece, 60°C da 1 saat etüvde bekletilerek deparafinizasyon ve hidrasyon aşamalarından geçirildikten sonra % 3 hidrojen peroksidadza oda ısısında 10 dakika bekletilip antijen açığa çıkaran solüsyon (antigen retrieval Citra HKO 86-5K Biogenex) içinde 90°C da 10 dakika benmaride bırakıldı. Lamlar distile su ve fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) ile yıkanıp nemli bir ortama yerleştirildi. Her kesite 50 mikrolitre PCNA antikor (PCNA, AM 206-5M, Biogenex) damlatıldı. 2 saat bekletildi. Daha sonra 20 dakika bağlayıcı antikor (link antibody), 5 dakika PBS, 20 dakika Label, 5 dakika PBS, 30 dakika kromojen substürat (alkalen

* PTT Hastanesi Patoloji Bölümü

** İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Patoloji Bölümü

*** Bursa Yüksek İhtisas Hastanesi Cerrahi Kliniği



Resim 2 : PCNA değeri yüksek olan Grade III invaziv duktal karsinom (APAPX200)

fosfataz bağlı streptavidin) uygulandı. Kontrast boya olarak Mayer hematoksilin kullanıldı ve (glycerol gelatin, GG1 Sigma) mounting media ile kapatıldı. Pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanıldı.

PCNA ile çekirdeği koyu kırmızı boyanan hücreler pozitif, zayıf boyananlar ve sadece sitoplazmik boyananlar negatif kabul edildi.

Her olguda tümör hücreleri ve bu alanlardaki pozitif hücreler, x400 büyütmede, en az 1000 hücre olacak şekilde sayıldı. Bunların ortalaması alınarak PCNA değerleri % olarak bildirildi. Olgular PCNA değerlerine göre düşük (< 21.8), orta (21.9-57.0) ve yüksek (57.1-73.0) olacak şekilde 3 alt gruba ayrıldı. Olguların 2 ayrı gözlemci tarafından saptanan PCNA değerlerinin bu alt gruplara göre dağılımı 38 olguda uyumlu idi. Uyumsuz olan 4 olgu 2 gözlemci tarafından aynı anda yeniden değerlendirilerek PCNA değeri belirlendi.

Rastgele seçilen 20 olgu gözlemcilerden biri tarafından bir ay sonra tekrar değerlendirildi.

Olgular PCNA değerleri açısından SPSS istatistik paket programında Percentile Values'e göre üç gruba ayrıldı. İstatistiksel işlemlerde Ki-kare ve Fisher's Exact Test kullanıldı.

SONUÇLAR

Bu çalışmada PCNA değeri ile tümör grade'i korelasyonu karşılaştırıldığından yalnız invaziv duktal karsinomlu olguların sonuçları incelendi. Lobüler karsinom ve diğer tiplerin PCNA değerleri ayrıca belirtildi.

Hastaların median yaşı 53 olup, yaş sınırı 30 ile 77 arasında değişmekteydi. 42 invaziv duktal karsinom, 5 invaziv lobüler karsinom, 1 medüller karsinom, 1 atipik medüller karsinom, 1 musinöz karsinom olmak üzere toplam 5 adet primer meme karsinomu vardı. Tümör çapı 0.8 cm ile 12 cm arasında değişmekte olup, çapı 1 cm'den küçük ve eşit olan 3 olgu; 1 cm'den büyük olan 39 olgu vardı. 42 invaziv duktal karsinomdan 23'ünde lenf düğümü metastazı saptandı; 19 olguda lenf düğümü metastazı görülmedi.

42 invaziv duktal karsinomun 5'i grade 1, 27'si grade 2 ve 10'u grade 3 idi. Takibi olan 12 hastadan 1'inde nüks görüldü. 1 hasta meme karsinomu nedeni ile öldü. İnvaziv duktal karsinomların PCNA değerleri 1.75 ile 73.7 arasında değişmekte olup, median değeri 31.2 idi.

PCNA değeri 21.8 den az olanlar düşük, 21.9-57.0 arasında olanlar orta, 57.1-73.0 arasında olanlar yüksek olarak kabul edildi.

TABLO 1 : HİSTOLOJİK GRADE VE PCNA DEĞERLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

PCNA DEĞERİ				
Histolojik grade	Düşük	Orta	Yüksek	Toplam
1	4	1	0	5
2	10	11	6	27
3	0	2	8	10
TOPLAM	14	14	14	42

TABLO 2 : LENF DÜĞÜMÜ METASTAZI VE PCNA DEĞERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

PCNA DEĞERİ				
Lenf Düğümü Metastazı	Düşük	Orta	Yüksek	Toplam
Var	7	5	11	23
Yok	7	9	3	19
TOPLAM	14	14	14	42

TABLO 3 : TÜMÖR ÇAPI VE PCNA DEĞERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

PCNA DEĞERİ				
Tümör Çapı	Düşük	Orta	Yüksek	Toplam
<1cm	1	1	1	3
>1cm	13	13	13	39
TOPLAM	14	14	14	42

Tümörlerin histolojik grade'leri ile PCNA değerleri karşılaştırıldığında (Tablo 1) grade 1 5 olgunun 44'ü düşük, 1'i orta; grade 2 27 olgunun 10'u düşük, 11'i orta (Resim 1) 6'sı yüksek; grade 3 10 olgunun 2'si orta, 8'i yüksek PCNA değerine sahipti (Resim 2). Grade III olgular arasında düşük PCNA değeri saptanmadı. Tümör grade'i ile PCNA değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($P < 0.01$).

Lenf düğümü metastazı ile PCNA değerleri karşılaştırıldığında (Tablo 2) 23 metastazlı olgunun 7'sinde düşük, 5'inde orta 11'inde yüksek; 19 metastazsız olgunun 7'sinde hafif, 9'unda orta, 3'ünde yüksek PCNA değeri saptandı. Lenf düğümü metastazı ile PCNA değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($P > 0.5$).

Tümör çapı ile PCNA değerleri karşılaştırıldığında (Tablo 3) çapı 1 cm'den küçük ya da eşit olan 3 olgunun 1'i hafif, 1'i orta, 1'i yüksek; çapı 1 cm'den büyük 39 olgunun 13'ü hafif, 13'ü orta, 13'ü yüksek PCNA değerine sahipti. Tümör çapı ile PCNA değeri arasında anlamlı fark bulunmadı ($P > 0.5$).

Nüks ve yaşam süreleri açısından 3-5 yıl takip edilen 12 invaziv duktal karsinom olgusunun PCNA değerleri 1.8 ile 65.6 arasında değişiyordu. Nüksüz yaşayan 10 olgunun 6'sının PCNA değeri düşük, 1'inin PCNA değeri orta, 3'ünün PCNA değeri yüksek bulundu. Ölen olgunun PCNA değeri yüksek, nüks olan olgunun PCNA değeri orta idi. Nüks ve sağ kalım ile PCNA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($P > 0.5$).

Olguların PCNA değerleri alt gruplarına göre dağılımında gözlemciler arası uyum % 90.48, gözlemci içi uyum % 96 bulundu.

5 adet invaziv lobüler karsinomda PCNA değerleri 1.18 ile 30.12 arasında değişmekte idi.

PCNA değeri medüller karsinomda 67.65; atipik medül-

ler karsinomda 30.97; koloidal karsinomda 2.87 olarak saptandı.

TARTIŞMA

PCNA tüm patoloji laboratuvarlarında özel bir alet gerekmez, parafin bloklara uygulanabildiğinden ve dokunun yapısı korunduğundan diğer proliferasyon belirleyici yöntemlerden daha avantajlıdır.

Yapılan bir çok çalışmalarda formaldehitte tesbit süresi uzadıkça PCNA immunoreaktivitesinin zorlaştığı ve bunu önlemek içinde antijen açığa çıkaran solüsyonların kullanılması gerektiği bildirilmiştir (2). Ancak elde edebildiğimiz literatürlerde bu uygulama microwave fırın kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada microwave fırın yerine 90°C. da benmaride 10 dakika antijen açığa çıkaran solüsyon uygulandı ve böylece microwave olmayan merkezlerde de bu yöntemin uygulanabileceği gösterildi.

PCNA'nın değerlendirilmesinde bir çok soru işaretleri vardır. Pozitif hücreleri saymak için en iyi metod nedir? Sayılacak kalan seçilirken daha çok pozitif hücre içeren alanlar mı seçilmeli, gelişigüzel alanlar mı? Kaç hücre, kaç büyük büyütme alanı sayılmalı ve ne miktarda doku değerlendirmeli? Tüm pozitif hücreler mi yoksa yalnız kuvvetli pozitif hücreler mi sayılmalı? Bu güvenilir ve uygulanabilir bir metod mu?

Visuel sayımlar ve image analiz sayımları birbirine paralel midir? Tüm bu soruların hepsi sadece PCNA için değil tüm kantitatif immunohistokimyasal çalışmalar için geçerlidir. Bazı araştırmacılar bu belirsizliklere değinmişlerdir (12, 13). Ancak henüz belirli bir karara varılmamıştır.

Bu çalışmada memenin invaziv duktal karsinomlarında PCNA değerleri ile tümör grade'i arasında istatistiksel anlamlı fark bulundu ve PCNA'nın prognostik önemi vurgulandı. Lenf düğümü metastazı ve tümör çapı ile PCNA değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı. Betta (14) ve arkadaşları 60 invaziv meme karsinomu vakasında, Lanzafame ve arkadaşları (15) 42 invaziv meme karsinomu vakasında tümör grade'i ile PCNA değerleri arasında anlamlı fark bulmuş ancak lenf düğümü metastazı ve tümör çapı arasında anlamlı fark bulamamıştır. Ölen olgunun PCNA değerinin yüksek, nüks olan olgunun PCNA değerinin orta ve nüksüz yaşayan olguların çoğunun PCNA değerinin düşük olmasına rağmen nüks ve sağ kalım ile PCNA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. Bu takibi olan olguların sayısının çok az olmasına bağlı olabilir.

5 invaziv lobüler karsinom vakasının 4'ünün PCNA değeri düşük, 1'inin de orta derecedir. Vakası sayısı az olduğundan istatistiksel anlamlılık bakılamadı ancak genelde düşük değerli PCNA değerlerine sahip olmaları klinik olarak da invaziv lobüler karsinomların daha yavaş seyirli olmaları ile uyumludur.

Çalışmamızda olguların PCNA değerlerine göre gruplandırılmasında gözlemciler arası ve gözlemci içi uyumun yüksek bulunması PCNA'nın güvenilir ve uygulanabilir bir metod olduğunu kanıtlamıştır.

Kemoterapi bölünen hücrelere etki etmektedir ve meme karsinomlarında yüksek proliferatif aktiviteye sahip olanların

adjuvan kemoterapiye iyi cevap verdiği gösterilmiştir (8). Bu tedaviden fayda görece hastaların belirlenmesi için ve ayrıca gereksiz yere yapılacak kemoterapinin yan etkilerinden korunmak için PCNA iyi bir proliferatif aktivite belirleyicisidir.

Uluslararası Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health) bir uzlaşma toplantısında klinisyenlerin meme karsinomunun tedavisi için faydalı olabilecek yeni bir prognostik faktöre ihtiyaçları olduğunu belirtmiştir (13). Bunun bağımsız, kolay uygulanabilir, gözlemciler arası ve gözlemci içi uyumu yüksek olan ve klinisyenler tarafından kolayca değerlendirilebilen bir yöntem olması gerekmektedir.

PCNA tüm bu özelliklere sahip bir prognostik faktör olabilir ancak ilerde daha çok sayıda olgu içeren, yaşam süreleri belli olan çalışmalar yapılarak bu kanıtlanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Siitonen SM, Isol JJ, Rantala IS, Helin HJ. Intratumor variation in cell proliferation in breast carcinoma as determined by antiproliferating cell nuclear antigen monoclonal antibody and automated image analysis. *Am J Clin Pathol* 1993; 99:226-31.
2. Tahan SR, Neuberg DS, Dieffenbach A, Yacoub L. Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. *Cancer* 1993; 71:3552-9.
3. Weidner N, Moore II DH, Vartanian R. Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin" reactive MIB 1 antibody. *Hum Pathol* 1994; 25:337-42.
4. Al-Sheneber IF, Shibata H.R, Sampolis J, Jothys. Prognostic Significance of Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Colorectal Cancer. *Cancer* 1993; 71:154-9.
5. Fontanini G, Macchiarini P, Pepe SZ, et al. The expression of proliferating cell nuclear antigen in paraffin sections of peripheral, node-negative non-small cell lung cancer. *Cancer* 1992; 70:1520-7.
6. Garcia R.L, Coltrera M.D, Gown A.M Rapid Communication Analysis of Proliferative Grade Using Anti-PCNA/Cyclin Monoclonal Antibodies in Fixed, Embedded Tissues. Comparison with Flow Cytometric Analysis. *Am J Pathol* 1989; 134:733-739.
7. Kobayashi I, Matsua K, Ishibashi Y, Kanda S, Sakai H. The proliferative activity in dysplasia and carcinoma in situ of the uterine cervix analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and silver-binding argyrophilic nucleolar organizer region staining. *Hum Pathol* 1994; 25: 198-202.
8. Ogata K, Ogata Y, Takasaki Y, Tan E.M. Epitopes on proliferating cell nuclear antigen recognized by human lupus autoantibody and murine monoclonal antibody. *J. Immunol* 1987; 139: 2942-2946.
10. Tavassoli FA. *Pathology of the Breast*. 1 st ed. Norwalk, Connecticut, Appleton Lange 1992:25-62.
11. Taylor C.R, Shi S, Chaiun B, Young L, Imam A, Cate JR. Strategies for improving the immunohistochemical staining of Various intranuclear Prognostic Markers in Formalin-Paraffin Sections. *Hum Pathol* 1994; 25:263-270.
12. Dervan P.A, FRC Path, Magee H.M, Mamlis, Buckley C, Amls, Carney D.N. Proliferating Cell Nuclear Antigen Counts in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Correlate with Ki-67 in Fresh Tissue. *Am J Clin Pathol* 1992; 97 (Suppl 1):521-528.
13. Linden M.D, Torres FX, Kubus J, Zarbo R.J. Clinical Application of. Morphologic and Immunocytochemical Assesments of cell Proliferation. *Am J Clin Pathol* 1992; May (Suppl):S-4-S-13.
14. Betta PG, Bottero G, Pavesi M, Pastormerlo M, Bellinger D, Jallarida F. Cell proliferation in breast carcinoma assessed by a PCNA grading system and its relation to other prognostic variables. *Surg-Oncol* 1993; 2 (1):59-63 (Abstr).
15. Lanzafame S, Marge G, Broggi B. Minimal breast cancer: analysis of proliferating activity using a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and its relationship to histological grade and prognosis. *Pathologica*. 1994; 86 (2):150-156 (Abstr.).