

NÖROENDOKRİN FENOTİP VE BUNUN MEME KARSİNOMLARINDAKİ ÖNEMİ (BİR ARDIŞIK İKİLİ BOYAMA VE GÖRÜNTÜ ANALİZİ ÇALIŞMASI)

Dr. Hüseyin BALOĞLU, Dr. Dilaver DEMİREL, Dr. Şükrü YILDIRIM, Dr. İbrahim ÖZTEK

ÖZET: Nöroendokrin diferansiasyon; tanım kriterlerine göre değişmekle birlikte, meme karsinomalarının yaklaşık 1/3'ünde saptanan bir özelliktir. Meme karsinomalarında nöroendokrin fenotipin natürü ve klinik önemi ise halen araştırma konusudur. Bu konudaki verilerin çoğu ışık mikroskopik ve flow sitometrik sonuçlara dayalıdır. Bu çalışmada ardışık ikili boyama ve görüntü analizi teknikleri birleştirilerek, hem nöroendokrin hücrelerin hem de eşlik ettiği karsinoma hücrelerinin morfonükleer özellikleri incelenerek, nöroendokrin fenotip ve bunun invaziv duktal ve invaziv lobuler karsinomadaki önemi araştırılmıştır. Çalışmada 43 invaziv duktal ve 21 invaziv lobuler karsinoma olgusunun (pT1-2 No Mo/AJCC-1994) materyalinden örneklenen imprintler kullanılmıştır. Nöroendokrin fenotipi saptamak için, insan nöron spesifik enolazına karşı fareden elde edilmiş monoklonal antikorlar ve avidin-biotin immünohistokimya tekniği kullanılmıştır. DNA içeriği ve diğer morfometrik parametreler, feulgen pararosanilin boyalı imprintlerde SAMBA 4000 görüntü analiz sistemi ile yapılmıştır. Sonuçlarımız, nöroendokrin fenotipin diploid bir DNA içeriğine sahip olduğunu, homojen bir kromatin paterni gösterdiğini ve yuvarlak üniform bir nükleus şekline sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, nöroendokrin diferansiasyon göstermeyen grupla karşılaştırıldığında, nöroendokrin diferansiasyon gösteren karsinomaların baskın olarak öploid öploid tümör hücresinden oluştuğu saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: Meme karsinoması, Nöroendokrin fenotip, Görüntü sitometresi, Ploidi.

SUMMARY: NEUROENDOCRINE PHENOTYPE AND ITS SIGNIFICANCE IN BREAST CARCINOMAS (A STUDY OF CONSECUTIVE DOUBLE STAINING AND IMAGE ANALYSIS): Neuroendocrine differentiation; although its meaning varies in order to the descriptive criteria, is found 1/3 of breast carcinomas. The nature of neuroendocrine phenotype and its clinical significance in breast carcinomas are still subjects to investigation.*Most of the data on this subject is based on light microscopic and flow cytometric results. In this study, morphonuclear features of neuroendocrine cells and associated carcinoma cells were analyzed by combining consecutive double staining and image analyzes techniques and neuroendocrine phenotype and its significance in invasive ductal and lobular carcinomas were investigated. Imprints of 43 invasive ductal and 21 invasive lobular carcinoma (pT1-2 No Mo/AJCC-1994) were used in this study. Monoclonal mouse antibodies against human neuron specific enolase were used to identify neuroendocrine phenotype by applying avidin biotin immunocytochemistry technique. DNA content and other morphonuclear parameters were detected on Feulgen pararosanilin stained imprints by SAMBA 4.000 image analyzer. Our results revealed neuroendocrine phenotype has a diploid DNA content with a homogenous chromatin pattern and round, uniform nuclear shape. Furthermore, carcinomas with neuroendocrine differentiation are predominantly composed of euploid tumor cells when compared the tumors which do not show neuroendocrine differentiation.

KEY WORDS: Breast carcinoma, Neuroendocrine phenotype, Image cytometry, Ploidy.

GİRİŞ

Meme dokusunda tipik endokrin karsinoma indisensi çok düşük olmakla birlikte, non-endokrin meme karsinomalarında nöroendokrin fenotip (NEF) sık karşılaşılan bir özelliktir. NEF tanım kriterlerine bağlı olarak, meme karsinomalarının % 5-30'unda görülür (1,2,3). NEF tanımında arjirofilik reaksiyon, membranla çevrili küçük elektron-dens granüllerin varlığı, çeşitli polipeptit ve hormonların ekspresyonu kriter olarak kullanılmıştır (1). Bunlardan nöron spesifik enolaz (NSE) immünohistokimya yöntemi tarama amaçlı uygulamalarda spesivitesi düşük olmakla birlikte sensitif bir yöntem olarak öne çıkarılmıştır (1). Değişik yöntemlerle tanımlanmış NEF'in meme karsinomalarındaki önemi halen araştırma konusudur.

Bu çalışmada NEF ile eşlik ettiği ve etmediği non-endokrin meme karsinoma hücrelerinin morfonükleer özellikleri image cytometry (ICM) yöntemiyle incelenerek, meme karsinomalarında NEF'in karyometrik özellikleri ve klinik önemi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1995-1996 yıllarında opere edilen 36-68 yaşlarında (ort: 51.4), pT1-2 No Mo/AJCC - 1994 evreli, 43 klasik tip invaziv duktal karsinoma (İDK) ve 21 invaziv lobuler karsinoma (İLK) olgusunun donmuş ($n_{İDK}=21$; $n_{İLK}=8$) ve taze ($n_{İDK}=22$; $n_{İLK}=13$) tümör dokularından hazırlanan imprintler değerlendirilmiştir. Imprintler ardışık ikili boyama işleminin ilk aşamasında; NEF tayini için standart NSE-avidin-biotin/HRP im-

münohistokimya yöntemi ile boyanmıştır (DAKO-Danimarka). 11 tümörde (3 İDK + 8 İLK) sitoplazmik immünoaktivite gösteren hücreler saptanmıştır. NEF gösteren 11 tümörden seçilen 213 (105 İDK + 108 İLK) nöroendokrin hücre lamlarda işaretlenip görüntüleri bilgisayara kaydedilmiştir. Ardışık ikili boyama işleminin ikinci aşamasında seçilen tüm lamlar aynı seansda standart Feulgen pararosanilin tekniği ile boyanarak, önceden lamlarda işaretlenmiş ve görüntüleri bilgisayara kaydedilmiş olan 213 NSE pozitif (nöroendokrin) hücre ile NEF içeren (250 İDK + 250 İLK) içermeyen (250 İDK + 250 İLK) tümörlerden rastgele seçilmiş 1000 nonendokrin tümör hücresinde (toplam 1213 hedef hücre) DNA içeriği, kromatin dağılımı, kromatin heterojenitesi, nükleus form faktörü ve nükleus alanı saptanmıştır (Resim 1).

İncelemeler Zeiss axiophote mikroskopa integre CCD 3 chip color kamera (Panasonic), özel hazırlanmış kompitür ve SAMBA 4000 ploidy-morphometry-texture analyzes yazılımı (Uniloc, Grenoble-Fransa) kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar Stat 2005 SAMBA istatistik programında irdelenmiştir. Aynı ardışık ikili boyama yöntemiyle hazırlanmış normal meme dokusu imprintlerindeki epitelial hücreler, 2c (diploid) referansı olarak kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmamızda NSE (+)'liği ile tanımladığımız NEF, İDK'ların % 6.97'sinde ($n=3/43$), İLK'ların ise % 38.09'unda ($n=8/21$) saptanmıştır. Karyometrik parametreler değerlendirildiğinde, nöroendokrin hücrelerin ortalama nükleus alanının, hem İDK hem de İLK hücrelerinin ortalama nükleus alanlarının daha küçük olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). İDK hücreleri NEF dikkate alınsa da alınmasa da, İLK hücrele-

TABLO 1: GRUBA AİT KARYOMETRİK VERİLER

	İDK (n=43)			İLK (n=21)		
	NEF gösteren		NEF göstermeyen	NEF gösteren		NEF göstermeyen
	Nöroendokrin hücreler	Non-endokrin tümör hücreleri	Tümör hücreleri	Nöroendokrin hücreler	Non-endokrin tümör hücreleri	Tümör hücreleri
1. Nükleus alanı (µm ²)	52.41±3.08	58.07±11.73	57.09±9.91	51.24±2.98	53.81±9.78	54.41±8.24
2. Nükleus form faktörü	ort: 0.86±0.31 min:0.79 mak:0.98	ort:0.81±0.11 min:0.68 max:0.93	ort:0.63±0.16 min:0.51 max:0.92	ort:0.89±0.26 min:0.81 max:0.99	ort:0.83±0.12 min:0.54 max:0.96	ort:0.71±0.14 min:0.57 max:0.89
3. Kromatin heterojenitesi (Optik dansite varyansı)	ort:0.98±0.12 min:0.74 max:1.22	ort:2.04±0.98 min:0.68 max:3.12	ort:3.09±1.04 min:0.71 max:4012	ort:1.04±0.10 min:0.68 max:1.31	ort:1.62±0.38 min:0.78 max:2.18	ort:2.47±0.78 min:0.69 max:3.14

rinden daha büyük ve polimorfiktir (nükleus alanlarının standart deviasyonu ve nükleus form faktörü karşılaştırması: $p<0.05$). NEF, İDK ve İLK hücreleriyle karşılaştırıldığında yuvarlağa daha yakın bir hücre morfolojisi göstermiştir (nükleus form faktörü $pDK, pILK < 0.05$). Nükleus optik dansitesi varyansı ile tanımlanan kromatin heterojenitesi açısından NEF, İDK ve İLK hücrelerinden daha homojen bir kromatin paternine sahiptir ($p<0.05$). NEF gösteren ve göstermeyen İDK ve İLK hücreleri karşılaştırıldığında, NEF içeren tümörlerde nonendokrin tümör hücrelerinin daha heterojen bir kromatin dağılımı gösterdikleri saptanmıştır ($p<0.05$). Yine İDK hücreleri NEF gösterme özelliği dikkate alınsa da alınmasa da İLK hücrelerine göre daha heterojen bir kromatin yapısına sahiptir ($p<0.05$). Çalışma grubunda yer alan NEF içeren ve içermeyen İDK ve İLK olgularından seçilen hücrelere ait karyometrik bulgular Tablo 1'de gösterilmiştir.

İDK ve İLK'larda saptanan NEF'in DNA histogramları incelendiğinde diploid bir patern gösterdikleri ve proliferatif indekslerinin düşük olduğu görülmüştür (Tablo 2). NEF gösteren İDK ve İLK'larda, non-endokrin tümör hücrelerinin kendi gruplarında DNA histogram özellikleri ise Tablo 3'de görülmektedir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

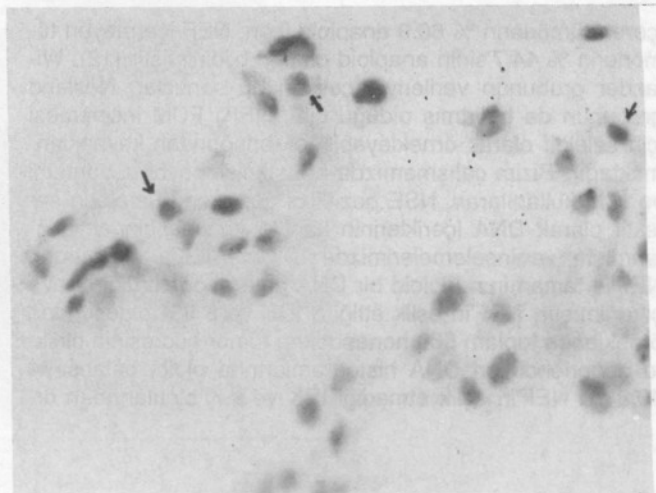
Bu çalışma, kadın memesi klasik tip İDK ve İLK'larında izlenen NEF'in morfonükleer özelliklerinin ortaya konulması ve NEF'in tümörün biyolojik davranışında belirleyici bir faktör olup olmadığının araştırılması amacıyla yapılmıştır.

NEF Grimelius arjirofilik reaksiyonu, elektron mikroskopi, antikromogranin immün reaksiyonu, NSE immün reaksiyonu ve substance P, ACTH, leu enkephalin, gastrin, PP, beta endorfin, bombesin, serotonin, HCG, prolaktin VIP ve LHPP gibi diğer peptit yapıları hormonların gösterimine dayalı immün reaksiyonlarla tanımlanabilmektedir (1,7,8,9). Meme kansinomalarda nöroendokrin diferansiasyonu gösteren en iyi yöntemin bunlardan hangisi olduğu henüz belli değildir. Ancak değişik yöntemler kullanılarak yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada, NSE'in peptit yapıları hormon içeren hücrelerin büyük çoğunluğunda spesifik immün reaksiyon verdiği ve peptit hormon içermeyen hücrelerin de hiçbir şekilde spesifik immün reaksiyon vermediği saptanan bir çalışmada, yeteri kadar spesifik ve sensitif olduğu vurgulanan NSE'in meme kansinomalarda NEF taraması için kullanılabilir ideal bir yöntem olduğu belirtilmiştir (1). Biz de çalışmamızda NEF identifikasyonu için NSE immün reaksiyonunu kullandık. Myoepitel hücrelerin NSE ile pozitif sitoplaz-

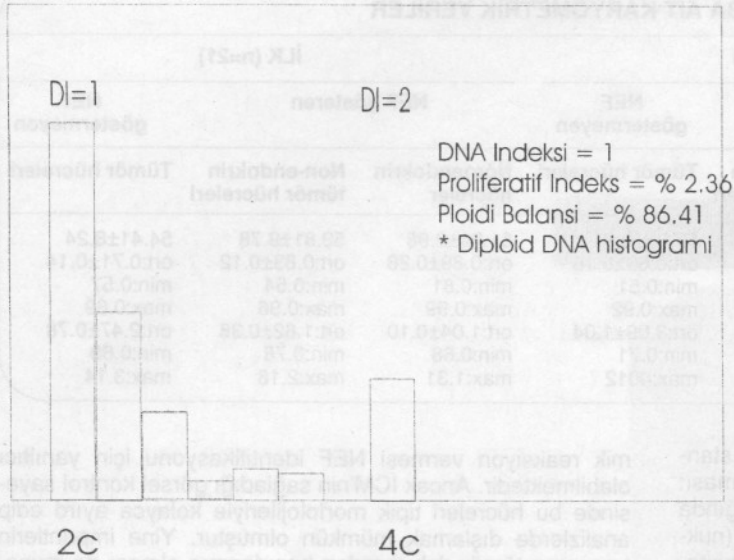
mik reaksiyon vermesi NEF identifikasyonu için yanıltıcı olabilmektedir. Ancak ICM'nin sağladığı görsel kontrol sayesinde bu hücreleri tipik morfolojileriyle kolayca ayırd edip analizlerde dışlamak mümkün olmuştur. Yine imprintlerin tamamen tümör dokusundan hazırlanmış olması da myoepitelial hücrelerin görülme sıklığını azaltmıştır.

İD ve İL kansinomalarda NEF'in karyometrik özelliklerine ilişkin bir görüntü analizi (ICM) çalışması bizim ulaşabildiğimiz ingilizce literatürde rastlanmamıştır. Çalışmamızda NEF'in meme kansinoma hücrelerinden daha küçük bir nükleus alanı, daha yuvarlak bir nükleus şekli ve daha homojen bir kromatin paterni gösterdiği saptanmıştır. Bu veriler rutin patoloji pratiğinde NEF identifikasyonu için özel yöntemlerin uygulanmasında daha selektif davranılması ve özel yöntemlerin kullanılmadığı durumlarda ise, rölâtif kriterler olarak değerlendirilebilir olması açısından önemlidir.

Daha önce yapılmış sitometrik DNA çalışmalarında, meme kansinomalara sadece % 20-40'ının diploid olduğu bildirilmiştir (10,11,12). Wilander ve arkadaşlarının Grimelius'un argirofilik reaksiyonu ile tanımladıkları NEF çalışmasında, NEF içeren 4 tümörün tamamının da diploid DNA histogram özelliği gösterdiği bildirilmiştir (13). Nesland ve arkadaşlarının FCM yöntemiyle yaptıkları çalışmada, NEF



Resim 1. Sitoplazmik NSE immün reaktivitesi gösteren (işaretli) ve göstermeyen hücrelerin karyometrik ve kantitatif DNA ölçümleri için hazırlanmış görüntüsü (Feulgen pararosanilin; RGB'den alınan Green channel dijital görüntü, x100 planapochromat-yaglı-objektif. NA:1.4).



Tablo 2. Nöroendokrin fenotipin DNA histogramı (İDK ve İLK birlikte değerlendirilmiştir).

TABLO 3: NÖROENDOKRİN FENOTİPİN EŞLİK ETTİĞİ (*) VE ETMEDİĞİ () İDK VE İLK HÜCRESİNİN ORTAK DNA HİSTOGRAM VERİLERİ**

n=1000	* (n=500)	** (n=500)
Euploid hücre sayısı	352	205
Ploidi balansı (%)	+40.8	-18
1. Anaploid Pik'in DNA indeksi	1.3	1.2
2. Anaploid Pik'in DNA indeksi	2.4	1.8
3. Anaploid Pik'in DNA indeksi	-	2.3
Toplam Anaploid Pik sayısı	2	4

içeren tümörlerin % 60.9 anaploid iken, NEF içermeyen tümörlerin % 44.7'sinin anaploid olduğu bildirilmiştir (12). Wilander grubunun verileriyle çelişen bu sonuçlar, Nesland grubunun da belirtmiş olduğu gibi, NEF'i FCM incelemesi için selektif olarak örnekleyebilme zorluğundan kaynaklanmaktadır. Bizim çalışmamızda ardışık ikili boyama yöntemi ve ICM kullanılarak, NSE pozitifliği gösteren hücrelerin selektif olarak DNA içeriklerinin kantitasyonuna olanak sağlanmıştır ve incelemelerimizde İDK ve İLK'a eşlik eden NEF'in tamamının diploid bir DNA paterni gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. NEF'in eşlik ettiği 3 İDK ve 8 İLK olgusundan örneklenen toplam 500 nonendokrin tümör hücresinin birlikte değerlendirilen DNA histogramlarında ploidi balansı % 40.8'dir. NEF'in eşlik etmediği İDK ve İLK olgularından ör-

neklenen 500 nonendokrin tümör hücresinin birlikte değerlendirilen DNA histogramlarında ise, ploidi balansı - % 18'dir. Bu veriler, NEF'in daha çok euploid hücre popülasyonuna eşlik ettiğini göstermektedir. Nesland grubu FCM çalışmaları bizim sonuçlarımızın tersine, NEF'in daha çok anaploid tümörlere eşlik ettiğini bildirmişlerdir (12). Aynı grup FCM ile inceledikleri materyali tekrar ICM ile incelemeye aldıklarında, ön verilerinin FCM bulgularının tam tersi yönde olduğu, aynı gruptan başka bir araştırmacı olan Falkmer tarafından ön bilgi olarak bildirilmiştir (14). Bu durum ICM'nin FCM'den farklı olarak sağlamış olduğu görsel kontrolle açıklanmaktadır.

Sonuç olarak, NEF'in eşlik ettiği meme karsinomaları euploid, daha çok da diploid DNA paterni gösterirken, NEF'in eşlik etmediği meme karsinomaları daha çok anaploid DNA paterni gösterirler. Bu nedenle NEF tümör biyolojik davranışının bir göstergesi olarak pratik histopatolojik ve terapötik yaklaşımda değerlendirilebilecek önemli bir özelliktir.

KAYNAKLAR

1. Nesland JM, Holm R, Johannessen JV.: A study of different markers for neuroendocrine differentiation in breast carcinomas. Path Res Pract. 1986; 181: 524-530.
2. Papotti M, Macri L, Finzi G, et al.: Neuroendocrine differentiation in carcinoma of the breast. A study of 51 cases. Semin Diag Pathol. 1989; 6: 174-188.
3. Partanen S, Syrjänen K.: Argrophilic cells in carcinoma of the female breast. Virchows Arch (A). 1981; 391: 45-51.
4. Falkmer UG, Falkmer S.: The value of cytometric analysis as a prognostic tool in neuroendocrine neoplastic diseases. Path Res Pract. 1995; 191: 281-303.
5. Falkmer S, Askensten U, Nesland JM.: Tumor pathology of neuron-paraneuron system and its evaluation dry background with special attention to neuroendocrine differentiation in prostatic and mammary carcinomas. Arch Histol Cytol. 1989; 52: 225-232.
6. Tavassoli FA.: Pathology of the breast. Appleton and Lange, Norwalk-Connecticut, 1992; pp: 330-333.
7. Nesland JM, Memoli LA, Holm R, et al.: Breast carcinomas with neuroendocrine differentiation. Ultrastruct Pathol. 1985; 8: 225-240.
8. Nesland JM, Holm R, Johannessen JV, et al.: Neuron specific enolase immunostaining in the diagnosis of breast carcinomas with neuroendocrine differentiation. Its usefulness and limitations. J Pathol. 1986; 148: 35-44.
9. Raju U, Fine G.: The controversial mammary carcinoid tumor. Lab Invest. 1983; 48: 69A.
10. Bichel P, Skougaard Poulsen H, Andersen AJ.: Estrogen receptor content and ploidy of human mammary carcinoma. Cancer 1982; 50: 1771-1774.
11. Olszewski W, Dar Zyniewicz Z, Rosen PP, et al.: Flow cytometry of breast carcinoma. 2. relation of tumor cell cycle distribution to histology and estrogen receptor. Cancer. 1981; 48: 985-988.
12. Nesland JM, Petersen EO, Fossa SD, et al.: Nuclear DNA content in breast carcinomas with neuroendocrine differentiation. J Pathol. 1986; 150: 181-185.
13. Wilander E, Lindgren A, Nister M, et al.: Nuclear DNA and endocrine activity in carcinomas of the breast. Cancer 1984; 54: 1016-1018.
14. Costa J, Nesland JM: Pathology update. An educational series of the European Society of Pathology. 1995, Vol 2. pp: 17-19.