

MEME KARSİNOMLARINDA "PROLİFERATING CELL NUCLEAR ANTİGEN"İN (PCNA) KEMOTERAPİ DUYARLILIĞI İLE İLİŞKİSİ

Uzm. Dr. Ekrem Yavuz*, Doç. Dr. Sıtkı Tuzlalı*, Prof. Dr. Rıdvan İlhan*, Prof. Dr. Altan İplikçi*

ÖZET: İnsizyonel biyopsi ile histopatolojik tanıları belirlenmiş, neoadjuvan kemoterapi uygulandıktan sonra cerrahi girişim uygulanmış 15 meme karsinomu vakasında, Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) boyanma indeksi ile kemoterapi duyarlılığı arasındaki ilişki değerlendirildi. Geniş tümör rezeksiyonu veya mastektomi materyallerindeki tümör alanında kemoterapiye bağlı hücresel değişiklikler araştırıldı. PCNA indeksi ile kemoterapi duyarlılığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ancak kemoterapiye duyarlılık gösteren vakalarda PCNA indeksinde anlamlı bir azalma olduğu belirlendi.

ANAHTAR KELİMELE: Meme karsinomu, Kemoterapiye bağlı değişiklikler, PCNA

SUMMARY: The relationship between PCNA index and chemosensitivity was searched on 15 cases of breast carcinoma which were initially diagnosed by microscopic examination of incisional biopsy material and applied neoadjuvant chemotherapy. Chemotherapy-induced cellular changes were searched on resection or mastectomy specimens. Statistical results revealed that Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) staining index was not correlated to chemosensitivity, but chemosensitivity was correlated to a decrease in PCNA staining index.

KEY WORDS: Breast carcinoma, Chemotherapy-induced changes, PCNA

GİRİŞ

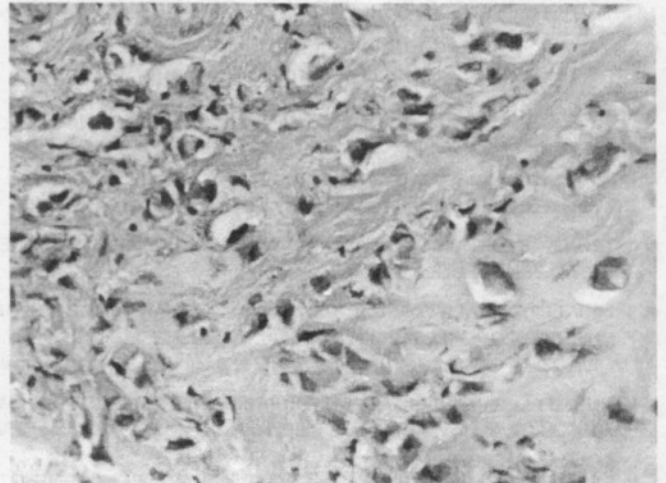
Lokal ileri meme karsinomlarının tedavisinde cerrahi girişimde önce neoadjuvan kemoterapi (KT) uygulanımı sayesinde, patoloğlar meme karsinomları ve meme dokusundaki KT'ye bağlı morfolojik değişiklikleri öğrenme fırsatı yakalamışlardır (1). Günümüzde, KT'ye bağlı olarak memedeki karsinoma ait hücrelerde nükleusta irileşme, belirgin hiperkromazi, nükleolus irileşmesi, sitoplazmada ise genişleme, makro ya da mikrovakuolizasyon, koyu eozinofilik granuler görünüm ortaya çıkabileceği bilinmektedir. Normal meme dokusunda ise KT'ye bağlı olarak tümör hücrelerindeki benzer epitel hücresi değişiklikleri, lobuler atrofi ve stromal fibrozis görülebilmektedir (2,3,4,5). Mikroskopik incelemede KT'ye bağlı histopatolojik değişiklik saptanan vakaların prognozunun oldukça iyi olduğu da bildirilmiştir.

PCNA, 36 kD ağırlığında, DNA polimeraz delta'nın kofaktörü olan bir nükleer asidik fosfoproteindir ve hücre siklusunun S fazında daha yüksek bir oranda bulunmaktadır. Proliferatif aktiviteyi göstermesinden dolayı PCNA'nın meme kanserlerinde prognoz belirleyicisi olarak kullanılıp kullanılamayacağı konusunda çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (7,8,9,10). Parafin bloklarda çalışılan anti PCNA antikorlarından en uygun olanının PC 10 monoklonal antikoru olduğu bildirilmiştir (7,8).

GEREÇ VE YÖNTEM:

Ocak 1992-Eylül 1995 tarihleri arasında İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilen, ilk tanısı insizyonel biyopsi ile konmuş, cerrahiden önce KT uygulanmış 13, KT+Radyoterapi (RT) uygulanmış 2 (Toplam 15) meme karsinomu vakası çalışma kapsamına alındı. Vakaların KT öncesi ve sonrasında ait parafin bloklarından elde edilen 3-5 mikronluk kesitlere Hematoksilen-Eozin ve immunhistokimyasal olarak PCNA boyaları uygulandı.

İmmunhistokimyasal boyama için; distile suya ve tris buffer'a getirilen kesitlere sırasıyla hidrojen peroksit ile peroksidad, goat nonimmun serum ile nonspesifik blokaj yapıldıktan sonra mouse anti PCNA (Dako kod no: M879 anti Dako PCNA, PC 10; 1/300 sulandırma, 30 dk inkübasyon süresi)



Resim 1: Kemoterapiye bağlı nükleer ve sitoplazmik değişiklikler gösteren bir invaziv duktal karsinom (Prot no: 14050/93, HEx310).

uygulandı. Amplifikasyon ve enzim sistemi olarak biotinli rabbit anti mouse sekonder antikoru ve streptavidin-peroksidad molekülü, kromojen olarak AEC sistemi (DAKO LSAB Universal kit, K 680) kullanıldı. Son olarak 1 dk süreyle Mayer Hematoksilende tutularak hafif nükleer zemin boyanması sağlandı ve kesitler aqueous kapatma maddesi ile kapatıldı. Tüm işlemler oda sıcaklığında yapıldı.

H&E ile boyalı, tedavi öncesine ait preparatlarda tümörün histolojik tipi ve grade'i belirlendi. Tedavi sonrasına ait preparatlarda ise tümördeki KT'ye bağlı hücresel değişiklikler değerlendirildi.

PCNA ile boyalı preparatlarda ise x10 büyütme oküler ve x40 büyütme objektif kullanılarak en az 200 hücre sayıldı ve invaziv tümör alanındaki PCNA boyanma indeksi belirlendi. Tedavi sonrasına ait değerlendirme kısmında 4 vakada yeterli tümör hücresi kalmadığından bu değerlendirme yapılamadı.

Tüm mikroskopik incelemeler Olympus BH2 mikroskop kullanılarak yapıldı. İstatiksel değerlendirmeler Ki kare ve Student's testleri ile yapıldı. Bu değerlendirme için parametreler şu şekilde gruplandırıldı:

* İst. Üniv. İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

TABLO 1: VAKALARIN GENEL ÖZELLİKLERİ

SIRA	HİSTOLOJİK TİP	GRADE	TED.ÖN. PCNA	TED.SON. PCNA	TED.DEĞ
1	İLK	II	%43.2	%0	V(B)
2	İDK	II	%0	%0	V(H)
3	İDK	III	%65	%7	V(H)
4	İDK	II	%16	%65	Y
5	İDK	II	%16	%44	Y
6	İDK	II	%43	%41	V(B)
7	İLK	II	%11	%0	V(B)
8	İDK	II	%7	D	D
9	İDK	II	%53	D	D
10	İDK	I	%43	%33	Y
11	İDK	II	%9	%6	V(H)
12	İLK	II	%4	%39	Y
13	İDK	II	%66	%14	V(B)
14	İDK	III	%56	D	D
15	İDK	II	%58	%9	V(B)

TED: Tedavi, ÖN: Öncesi, SON: Sonrası, DEĞİŞ: Değişikliği, V: Var, Y: Yok, B: Belirgin, H: Hafif, D: Değerlendirilemedi, İDK: İnvasiv duktal karsinom, İLK: İnvasiv lobuler karsinom.

kanın gradi'i II, 2 vakanın ise III olarak saptandı (Tablo 1). Kemoterapi sonrasına ait preparatlarda ise 4 vakada KT'ye bağlı hücresel değişiklik görülmezken, 3 vakada hafif derecede, 5 vakada belirgin derecede KT değişikliği gözlemlendi, 3 vakada ise tedavi sonrasında yeterli tümör hücresi kalmadığı için bu morfolojik parametre belirlenemedi (Tablo 1).

KT'ye bağlı olarak tümör hücrelerinin nukleuslarında görülen değişiklikler; boyut artışı, belirgin kromatin yoğunlaşması, sınır düzensizliği, nukleolus irileşmesiydi. Sitoplazmik değişiklikler ise; boyut artışı, makro ya da mikrovakuolizasyon ya da koyu eozinofilik boyanma özelliğiydi (Resim 1).

KT öncesi ve sonrasına ait PCNA boyanma yüzdeleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Tedavi öncesi tümör histolojik grade'i ile tedaviye bağlı hücresel değişiklikler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 2). Aynı şekilde, KT öncesi grade ile KT öncesi PCNA boyanma yüzdesi arasında anlamlı ilişki bulunmadı (Tablo 3). Tedavi öncesi PCNA boyanma yüz-

Histolojik Grade: I, II, III

KT'ye bağlı hücresel değişiklik (Ki Kare için):

Yok, Hafif, Belirgin

(Student's t için): Var, yok

PCNA boyanma yüzdesi (Ki Kare için):

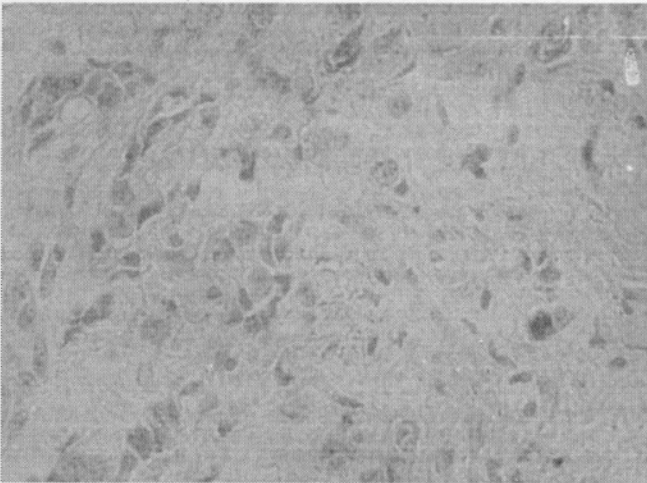
<%10, >%10 ve <%50, >%50

PCNA boyanma yüzdesinde tedaviye bağlı azalma: % 25'den az ise yok

% 25'den çok ise var

BULGULAR

KT öncesine ait vakaların 12'sinin histolojik tipi invaziv duktal karsinom (İDK), 3'ünün tipi ise invaziv lobuler karsinom (İLK) idi (Tablo 1). 1 vakanın histolojik grade'i I, 12 va-



Resim 2: Kemoterapi öncesine ait bir invaziv duktal karsinom vakasında PCNA ile nükleer boyanma (Prot no: 13982/92, PCNAx500).

TABLO 2: GRADE İLE HÜCRESEL DEĞİŞİKLİK DERECESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

HÜCRESEL DEĞİŞİKLİK DERESESİ			
GRADE	YOK	HAFİF	BELİRGİN
I	1	0	0
II	3	2	5
III	0	1	0

0.2<P<0.3

desi (Resim 2) ile tedaviye bağlı hücresel değişiklik arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 4,5). Ancak tedaviye bağlı hücresel değişiklik gözlenen vakalarda PCNA boyanma yüzdesinde anlamlı bir azalma olduğu dikkati çekti (Tablo 6).

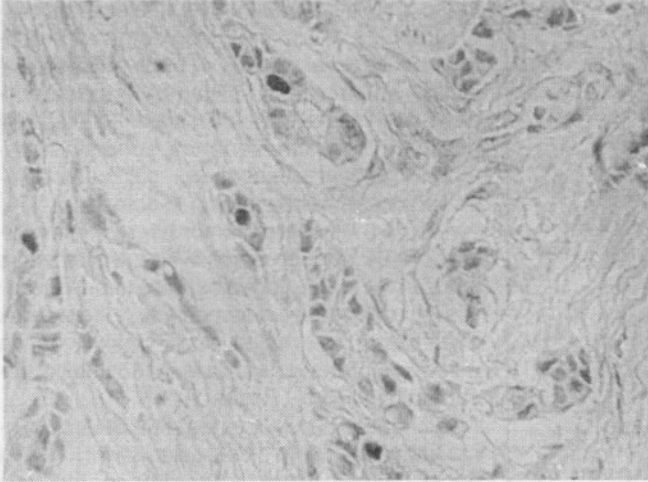
TARTIŞMA

Meme karsinomlarında histolojik grade'in önemli bir prognostik belirleyici olduğu bilinmektedir (11). Meme karsinomlarının neoadjuvan KT'sinde kullanılan ilaçların yüksek grade'li vakalarda kabaca daha başarılı olacağı düşünülebilir. Çalışmamızda grade'i I olan vakada KT'ye bağlı hücresel değişiklik görülmezken, Grade III olanda bu değişiklikler mev-

TABLO 3: GRADE İLE PCNA BOYANMA YÜZDESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

PCNA BOYANMA YÜZDESİ			
GRADE	<%10	>%10 VE<%50	>%50
I	0	1	0
II	4	5	3
III	0	0	2

0.2<P<0.3



Resim 3: Resim 2'deki vakanın kemoterapi uygulanımından sonra kemoterapi değişiklikleri gösteren invaziv duktal karinom alanında PCNA ile nükleer boyanma (Prot no: 18036/96, PCNAx500).

cuttu. Bu vakalarda KT duyarlılığı ile grade arasında beklenen bir ilişki vardır. Ancak, asıl geniş grubu oluşturan grade II karinomlarının bir kısmında KT'ye bağlı değişiklik görülürken bir kısmında bu değişiklikler saptanmadı. Genel olarak meme karinomlarının daha büyük bir oranda Grade II tümörler olduğu düşünülürse; grade ile KT duyarlılığı arasında anlamlı bir ilişki olabileceğini ileri sürmek olası değildir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre histolojik tümör grade'nin KT duyarlılığını belirlemek için tek başına yeterli bir parametre olmadığı ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmada yer alan vakalarda PCNA boyanma yüzdesi ile histolojik grade arasında anlamlı bir ilişki saptamadık. Daha önceki çalışmalarda bu sonuçla uyumlu bilgiler yer aldığı gibi (9), Grade ile PCNA boyanma yüzdesinin doğru orantılı bir ilişki gösterdiğini ileri süren bilgiler de yer almaktadır (7,8,10). Ayrıca tedavi öncesi PCNA boyanma yüzdesi ile tedaviye bağlı değişiklik derecesi arasında anlamlı ilişki saptamadık. Bu sonuç PCNA boyanma yüzdesinin KT duyarlılığını önceden tahmin etmek için yeterli bir parametre olmadığını düşündürmüştür. Tedaviye bağlı değişiklikler olan vakalarda PCNA boyanma yüzdesinin azalması ise tedaviden etkilenen tümörlerde proliferatif aktivitenin azaldığı fikrini oluşturmuştur.

PCNA'nın fiksasyon süresine çok duyarlı ve hücre siklusunun son yarısındaki tüm hücrelerde pozitif olduğu ve DNA tamirinde de artış gösterdiği ileri sürülmüştür (12). Bu çalışmada KT'ye bağlı hücresel değişiklikler KT duyarlılığını gös-

TABLO 4: PCNA BOYANMA YÜZDESİ İLE TEDAVİYE BAĞLI HÜCRESEL DEĞİŞİKLİĞİN KARŞILAŞTIRILMASI

TEDAVİ DEĞİŞİKLİĞİ	PCNA BOYANMA YÜZDESİ			
	<%10	>10 VE <%50	>%50	
YOK	1	3	0	
HAFİF	2	0	1	
BELİRGİN	1	2	2	
0.2<P<0.3				

TABLO 5: PCNA BOYANMA YÜZDESİ İLE TEDAVİYE BAĞLI HÜCRESEL DEĞİŞİKLİĞİN KARŞILAŞTIRILMASI
(Student's t)

TEDAVİ DEĞİŞİKLİĞİ	PCNA BOYANMA YÜZDESİ ORTALAMASI	PCNA BOYANMA YÜZDE STANDART SAPMASI
VAR	%20	%16
YOK	%36	%27
0.3<P<0.5		

TABLO 6: TEDAVİ DEĞİŞİKLİĞİ İLE TEDAVİ SONRASI PCNA BOYANMA YÜZDESİNDE AZALMANIN KARŞILAŞTIRILMASI.

TEDAVİ DEĞİŞİKLİĞİ	PCNA BOYANMA YÜZDESİNDE AZALMA	
	%25'TEN ÇOK	% 25'TEN AZ
YOK	4	0
HAFİF	0	2
BELİRGİN	1	3
0.02<P<0.05		

teren bir parametre olarak ele alınmıştır. Prognostik yönelik çalışmalarda; KT'ye bağlı hücresel değişiklik gözlenen vakaların prognozunun çok iyi olduğu ileri sürülmüşse de (3,5,6) bu konu henüz tam açıklık kazanmamıştır. Bu bilgilerle, meme karinomlarında KT duyarlılığını tahmin etmek için hem prognoza yönelik hem de daha fazla sayıda parametrenin yer alacağı araştırmalar yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

- Swain SM, Sorace RA, Bagley CS, et al: Neoadjuvant chemotherapy in the combined modality of locally advanced nonmetastatic breast cancer. *Cancer Res* 1987;47:3889-3894.
- Briffod M, Spyrtos F, Tubiana-Hulin M, et al: Cytopunctures during preoperative chemotherapy for primary breast carcinoma. Cytomorphologic changes, initial tumor ploidy, and tumor regression. *Cancer* 1989;63:631-637.
- Kennedy S, Merino MJ, Swain SM, Lipmann ME: The effects of hormonal and chemotherapy on tumoral and nonneoplastic breast tissue. *Hum Pathol* 1990;21:192-198.
- Rosai J: Breast, In: Ackerman's Surgical Pathology. 8th ed. St Louis, Missouri, Mosby, vol II, 1996:1565-1660.
- Satallof DM, Mason BA, Prestipino MJ, et al: Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast. A determinant of outcome. *J Am Coll Surg* 1995;180:297-306.
- Feldman LD, Hortobagyi GN, Buzdar AU, et al: Pathological assessment of response to induction chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res* 1986;46:2578-2581.
- Bianchi S, Paglierani M, Zampi G: Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in lymph-node negative breast cancers. *Cancer* 1993;72:120-125.
- Frierson HF: Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in infiltrating ductal carcinomas. *Mod Pathol* 1993;6:290-294.
- Leonardi E, Girlando S, Serio G: PCNA and Ki 67 expression in breast carcinoma: Correlation with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 1992;45:416-419.
- Siitonen SM, Isola 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;99:226-231.
- Tavassoli FA: General considerations. In: Pathology of the Breast. First ed. Connecticut. Appleton and Lange, 1992:25-63.
- Thomas M, Noguchi K, Kitagawa H, et al: Poor prognostic value of proliferating cell nuclear antigen labelling index in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1993;46:525-528.