

OVER KARSİNOMLARINDA c-erbB-2 ONKOPROTEİNİNİN PROGNOSTİK DEĞERİ

Dr. Sıtkı TUZLALI*, Dr. Pınar SAİP**, Dr. Ekrem YAVUZ*, Dr. Faruk TAŞ**, Dr. Yavuz SALİHOĞLU***

ÖZET: Literatürde c-erbB-2 onkoproteinin over, karsinomlarının prognozu ile ilişkisi konusunda uzun süreli hasta takipli geniş vaka serileri sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada, 39 over karsinomu vakasında immunhistokimyasal olarak incelenen c-erbB-2 aşırı ekspresyonunun prognoz ile ilişkisi araştırıldı. Vakalarımızda % 20.5 (8/39) oranında c-erbB-2 immünreaktivitesi saptandı. c-erbB-2 ekspresyonunun sağkalım, progresyonsuz sağkalım, evre ve histopatolojik grade ile ilişkisi değerlendirildi. c-erbB-2 immünreaktivitesinin sağkalım ile anlamlı biçimde korelasyon gösterdiği, progresyonsuz sağkalım, evre ve grade ile ilişkili olmadığı saptandı. Tümör evresi ve second look laparotomide malignite varlığının en önemli prognostik parametreler olduğu görüldü. Histopatolojik grade 'in sağkalım ile anlamlı bir korelasyonu izlenmedi. Sonuç olarak tümör evresi ve second look durumu, en önemli prognostik parametrelerdir. c-erbB-2 de, ek bir prognostik gösterge olarak kullanılabilir.

ANAHTAR KELİMELEER: Over karsinomu, c-erbB-2, Her-2/neu, prognoz.

SUMMARY: THE PROGNOSTIC VALUE OF c-erbB-2 IN OVARIAN CARCINOMAS: There is a limited number of studies in the literature concerning the prognostic value of c-erbB-2 oncogene in ovarian carcinomas. We performed an immunohistochemical study with c-erbB-2 on 39 ovarian carcinomas with follow-up to determine the relationship between the overexpression of c-erbB-2 and survival, stage and grade of tumors. c-erbB-2 immunoreactivity was identified in 8 of the 39 (% 20.5) carcinomas and correlated with survival but not progression- free survival, stage and grade. The most important prognostic parameters appeared to be the stage of the tumor and the presence of the tumor in second-look laparotomy. Histopathological grade did not correlated with survival. In conclusion, the most important parameters in ovarian carcinomas are the stage and the presence of tumor in second-look laparotomy. Immunohistochemical assessment of c-erbB-2 overexpression can be used as an additional marker in the prediction of outcome.

KEY WORDS: Ovarian carcinoma, c-erbB-2, Her-2/neu, prognosis.

GİRİŞ

Protoonkogen c-erbB-2, epidermal growth factor receptor (EGFR) ile kısmen homolog olan bir transmembran glikoproteini kodlar (1). Tirozin kinaz aktivitesi gösteren (2) bu genin aşırı ekspresyon ve / veya amplifikasyonunun, tümör prognozu ile ilişkisi ile ilgili çalışmalar en çok meme karsinomları üzerinde yoğunlaşmıştır. Overin karsinomlarında ise daha sınırlı sayıda çalışmalar yapılmış ve bunlarda birbiri ile çelişen sonuçlar elde edilmiştir (3-13).

Bu çalışmada immunhistokimyasal teknikle over karsinomlarında saptanan c-erbB-2 immünreaktivitesinin tümör prognozu ile ilişkisi araştırıldı.

MATERYEL VE METOD

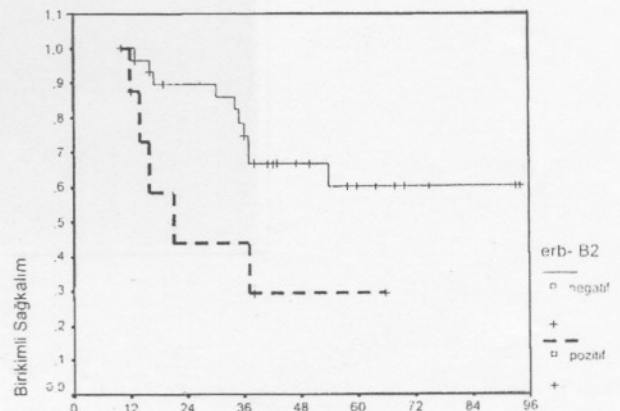
1991-1999 yılları arasında İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları-Doğum Anabilim Dalı ve İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü 'nde tedavi ve takipleri yapılan ve İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı konan over karsinomlarından 39'u çalışma kapsamına alındı.

Hastaların yaşları 29-70 arasında değişmekteydi ve ortalama yaş 50.7 idi. 27 (% 69.3) vaka seröz, 6 (% 15.3) vaka endometrioid, 4 (% 10.2) vaka müsinöz ve 2 (% 5.2) vaka berrak hücreli karsinom olarak sınıflandırıldı. Histopatolojik grade değerlendirilirken solid kısımların oranı, nükleer pleomorfizm, sitolojik atipi, mitoz sayısı gibi özellikler göz önüne alındı (14). Histolojik grade'lerine göre 12 vaka (% 30.7) grade I, 20 vaka (% 51.3) grade II, 7 vaka (% 18) ise grade III kategorisinde yer aldı. İki berrak hücreli karsinom grade III vakalar arasında değerlendirildi. Hastalar FIGO (14) evresine göre evrelere ayrıldıklarında 7 vaka 1c, 1 vaka 2b, 4 vaka 2c, 3 vaka 3b, 23 vaka 3c, 1 vaka da evre 4 olarak kate-

gorize edildi. Vakalara TAH + BSO+ omentektomi uygulandı.

21 vakada intravenöz (İV) sisplatinli kombinasyonlar, 13 vakada İV(Paklitaksel veya İfosfamid ya da Siklofosfamid)+ intraperitoneal (Sisplatin), 4 vakada peroral Altretamine tedavisi uygulandı. Bir vakada kemoterapi-radyoterapi uygulandı. Vakalarda tedavi sonrası takip süreleri 7 ay ile 125 ay arasında değişmekteydi. 28 vakada second look (SL) laparotomi yapıldı, bunların 16'sında (%57.2) SL pozitif, 12'sinde (% 42.8) ise SL negatif bulundu. Takip sırasında 20 vakada (% 51) klinik ya da patolojik nüks görüldü.

İmunhistokimyasal inceleme: Arşiv lamaları ve bloklar-dan yeniden hazırlanan kesitler tekrar değerlendirildi. İmunhistokimyasal inceleme için 5 mikronluk kesitler, ksilen-de deparafinize edilip azalan konsantrasyonda alkollerden geçirilerek suya getirildi. 1000 ml 0.01 M sodyum sitrat buf-



Şekil 1: C-erb B-2 immünreaktivitesi ile sağkalım ilişkisi (p=0.029)

* İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

** İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü

*** İ.Ü. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

TABLO 1: C-erb B-2 AŞIRI EKSPRESYONUNUN HİSTOPATOLOJİK TİPLERE GÖRE DAĞILIMI

c-erbB-2	Seröz (27)	Müsinöz (4)	Endometrioid (6)	Berrak hücreli (2)
+	3 (% 11)	2	2	1
-	24 (% 88.9)	2	4	1

TABLO 2: EVRELERE GÖRE c-erb B-2 EKSPRESYONU

c-erbB-2	Evre I-II (12 vaka)	Evre III-IV (27 vaka)
+	3	5
-	9	22

TABLO 3: EVRELERE GÖRE TÜMÖR GRADE'İ

	Evre I-II	Evre III-IV
Grade I-II	6	6
Grade III	5	22

fer (pH=6) solüsyonu kullanılarak düdüklü tencerede kaynatmak suretiyle antijen retrieval uygulandı. Yirmi dakika % 3'lük H₂O₂ inkübasyonu ile endojen peroxidase aktivitesi bloktan sonra kesitlere 15 dak. Ultrablock nonspesifik blocking agent (Labvision Co.) uygulandı. Primer antikor olarak 'DAKO A 0485 Rabbit anti human c-erbB-2 oncoprotein' poliklonal antikor (1/400 dilüsyonda 1 saat inkübasyon ile) kullanıldı. Daha sonra kesitler biotinli sekonder antikor (Ultravision - Labvision Co.) ve peroxidase labeled streptavidin (Ultravision- Streptavidin/ HRP, Labvision Co.) ile 25'er dak. inkübe edildi. AEC kromojeni ve zıt boya olarak Mayer hematoksileni kullanıldı.

Değerlendirmede membranöz boyanma pozitif olarak kabul edildi. Sitoplazmik boyanmalar ile membranın sadece küçük bir bölümünü tutan ve / veya çok zayıf belli belirsiz boyanmalar negatif olarak değerlendirildi. Tümör hücrelerinin % 10'ndan fazlasında boyanma görülen vakalarda, c-erbB-2 immunreaktivitesi bakımından (+), % 10'undan az olan vakalar ise (-) olarak değerlendirildi.

c-erbB-2 pozitifliği ile tümör evresi, histopatolojik tip, tümör grade'i ilişkisi, tümör evresi ile tümör grade'i ilişkisi Fisher'in kesin ki-kare testi ile araştırıldı.

SPSS 7.5 paket programında da Kaplan-Meier yöntemi ile sağkalım analizleri yapıldı. Log-rank yöntemi ile sağkalım ve progresyonsuz sağkalım farklılıkları saptandı.

SONUÇLAR

c-erbB-2 pozitifliğinin histopatolojik tiplere göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. 27 seröz karsinom vakasının üçünde (Resim 1), 6 endometrioid karsinom vakasının ikisinde (Resim 2), 4 müsinöz karsinom vakasının ikisinde (Resim 3) ve 2 berrak hücreli karsinom vakasının birinde pozitif boyanma görüldü.

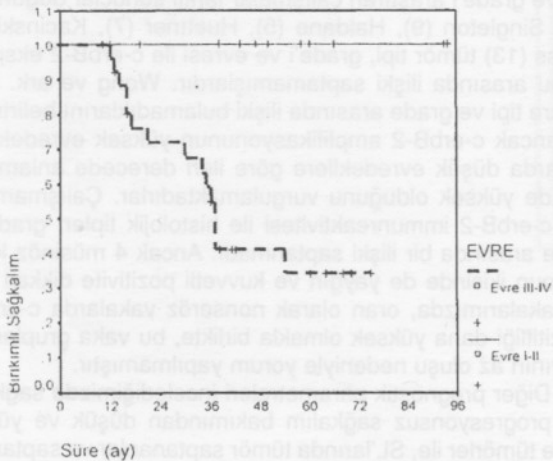
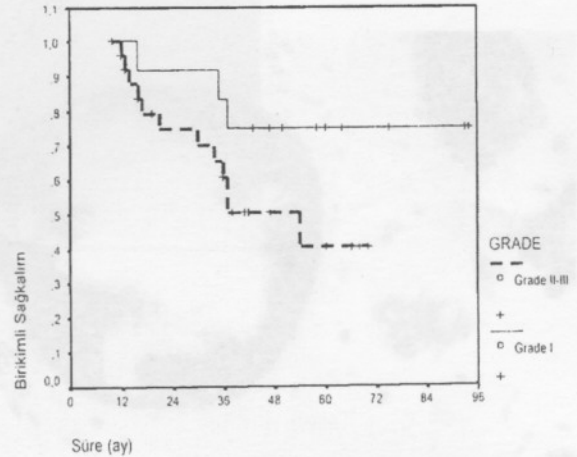
Seröz ve müsinöz over karsinomu vakaları arasında c-erbB-2 immunreaktivitesi bakımından anlamlı bir sonuç bulunmadı (p=0.079). Tümör evresi (p=0.68) (Tablo 2) ve histopatolojik grade'i ile (p=0.39) c-erbB-2 ekspresyonu ve SL laparotomi durumu (p=0.48) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Tümörlerde evre ve grade kıyaslaması yapıldığında da tümör evresi ile grade'i arasında anlamlı bir ilişki görülmedi (p=0.06) (Tablo 3).

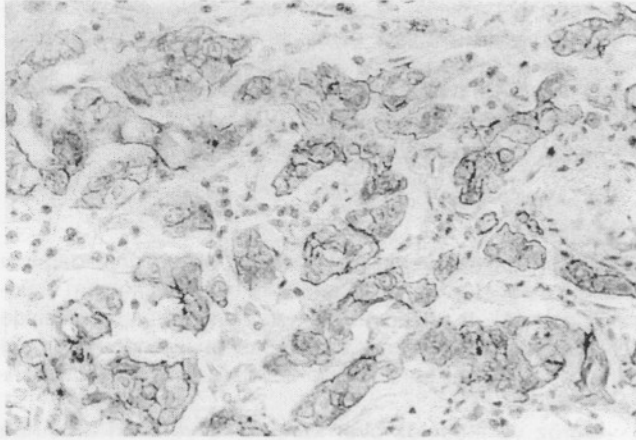
Kaplan-Meier istatistik analizlerinde vakalarımızda genel sağkalım 64.3 ay±5.89 (aritmetik ortalama ± standart hata) olarak bulundu. Mediana ulaşılamadı. Ortalama 5 yıllık sağkalım ise % 53.81±9.25 olarak bulundu.

c-erbB-2 (+) olan 8 vakada sağkalım 33.8ay ± 8.38 (median 21), c-erbB-2 (-) olan 31 vakada ise 69.69 ay ± 6.16 (mediana ulaşılamadı) olarak bulundu. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (0.029) (Şekil 1).

Progresyonsuz sağkalım hesaplamalarında ise c-erbB-2 (+) olan 8 vakada progresyonsuz sağkalım 37.89±11.45 (median 24) iken, c-erbB-2 (-) olan 31 vakada 48.74±6.51 (median 44) olarak saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0.84).

Diğer parametreler sağkalım açısından değerlendirildiğinde düşük evredeki (I-II) 12 vaka ile (tümü yaşıyor), yüksek evredeki (III - IV) 27 vaka (44.65 ay ± 5.4, median 37 ay) arasında ileri derecede anlamlı bir fark (p= 0.0019) bulundu (Şekil 2). SL (+)16 vaka ile (33.84 ± 5.13 ay, median 34 ay) SL ±12 vaka arasında (76.53 ± 8.66 ay, mediana ulaşılamadı) ileri derecede anlamlı fark bulundu (p= 0.0053).

**Şekil 2: Evre ile sağkalım ilişkisi (p=0.0019)****Şekil 3: Histopatolojik grade ile sağkalım ilişkisi (p=0.098)**



Resim 1: Orta derecede diferansiye seröz karsinomda c-erb B-2 antikoru ile membranöz boyanma (10620 / 94, c-erbB-2 X 310)

Seröz (63.41 ± 6.75 ay, mediana ulaşılmadı) ve nonseröz (65.16 ± 11.18 ay, mediana ulaşılmadı) karsinomlar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.89$). Grade I vakalar ile (77.83 ± 8.2), grade II-III vakalar arasında (46.16 ± 4.86 , median 54) sağkalım farkı olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.098$) (Şekil 3).

Progresyonsuz sağkalımın değerlendirildiği 38 vakada ortalama değer 48.45 ± 6.16 ay olarak bulundu. 5 yıllık progresyonsuz sağkalım $\% 41.62 \pm 9.13$ olarak bulundu. Düşük evre (I-II) vakalar (81.75 ± 7.50) ile yüksek evre (III-IV) vakalar (31.62 ± 5.15 , median 24 ay) arasında ($p=0.0008$) ve SL (+) (25.55 ± 5.98 , median 18 ay) ile SL (-) (65.42 ± 9.97 , mediana ulaşılmadı) olan vakalar arasında ($p=0.0035$) ileri derecede anlamlı fark bulundu.

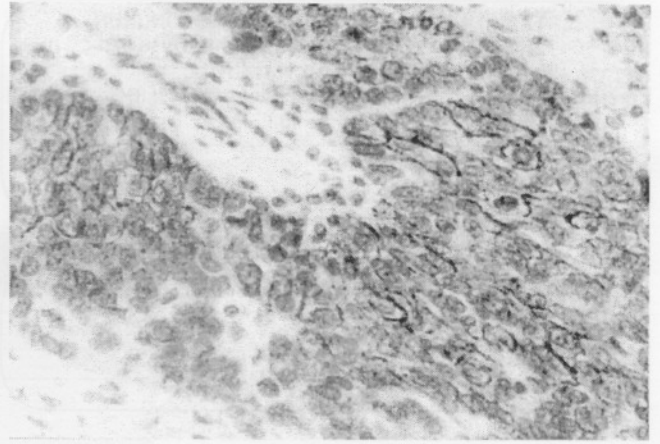
Seröz (48.7 ± 6.81 , median 42 ay) ve nonseröz (48.19 ± 12.77 , median 44 ay) karsinomlar arasında progresyonsuz sağkalım farkı görülmedi. Düşük grade (I-II) (64.17 ± 10.37 , median 64) ve yüksek grade (III-IV) (34.45 ± 4.97 , median 32) vakalar arasındaki fark anlamsız ($p=0.06$) bulundu.

TARTIŞMA

Serimizde c-erbB-2 pozitifliği vakaların $\% 20.5$ 'inde saptanmıştır. Ortalama olarak over karsinomlarının yaklaşık $\% 30$ 'unda c-erbB-2 aşırı ekspresyonu bildirilmektedir



Resim 2: Bir müsinöz karsinom vakasında yaygın ve kuvvetli immünreaktivite (10862 / 96, c-erb B-2 X 500)



Resim 3: Az diferansiye endometrioid karsinom vakasında hücrelerin çoğunluğunun c-erb B-2 ile membranöz boyanması görülmektedir (16206 / 96, c-erb B-2 X 500)

(15). Yayınlar da bu oran $\% 0-72$ arasında değişmektedir (9). Bu farklılık, çalışmalarda metodoloji ve yorum farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Aynı farklılık, borderline tümörler için de geçerlidir. Ancak bazı yazarlar karsinomlarda saptanan aşırı ekspresyona borderline tümörlerde hiç rastlamadıklarını (9), bazıları da daha düşük oranda rastladıklarını belirtmektedirler (11,13). Polimeraz zincir reaksiyonu ile yaptıkları çalışmada Wong ve ark. (10) da normal overlerde amplifikasyon görülmezken, borderline tümörlerde $\%15$ ve invaziv karsinomlarda ise $\% 48$ oranında amplifikasyonun varlığını saptamışlardır. Bu çalışmalar c-erbB-2 onkogen aşırı ekspresyon ya da amplifikasyonunun tümör geninde rol oynayabileceği ve bu yolun karsinogenezin erken evrelerinde söz konusu olmadığı fikrini düşündürmektedir (10,13).

Çeşitli çalışmalarda c-erbB-2 aşırı ekspresyonu ile prognoz ve tedaviye yanıt arasındaki ilişki kurulmaya çalışılmıştır. Bazı araştırmacılar (3,4) c-erbB-2 aktivasyonunun kötü prognoz ile ilişkisini öne sürmüşlerdir. Ancak kimi çalışmalar bunu doğrulamamıştır (6,8,9,13). Hatta aksine iyi prognoz ile ilişkisini öne süren çalışmalar mevcuttur (5). Vakalarımızda c-erbB-2 pozitifliğinin sağkalım oranındaki belirgin azalma ile ilişkili olduğu görüldü. Ancak bunun progresyonsuz sağkalıma yansımadağı saptandı.

c-erbB-2 aşırı ekspresyonu ile tümör evresi ve histolojik tip ve grade'i araştırarak çalışmalar farklı sonuçlar doğurmuştur. Singleton (9), Haldane (5), Huettner (7), Kacinski (8), Ross (13) tümör tipi, grade'i ve evresi ile c-erbB-2 ekspresyonu arasında ilişki saptamamışlardır. Wong ve ark. (10), hücre tipi ve grade arasında ilişki bulamadıklarını belirtmekte ancak c-erbB-2 amplifikasyonunun yüksek evredeki vakalarda düşük evredekilere göre ileri derecede anlamlı biçimde yüksek olduğunu vurgulamaktadırlar. Çalışmamızda da c-erbB-2 immunreaktivitesi ile histolojik tipler, grade ve evre arasında bir ilişki saptanmadı. Ancak 4 müsinöz karsinomun ikisinde de yaygın ve kuvvetli pozitivite dikkati çekti. Vakalarımızda, oran olarak nonseröz vakalarda c-erbB-2 pozitifliği daha yüksek olmakla birlikte, bu vaka gruplarında sayının az oluşu nedeniyle yorum yapılmamıştır.

Diğer prognostik parametreleri incelediğimizde sağkalım ve progresyonsuz sağkalım bakımından düşük ve yüksek evre tümörler ile, SL'larında tümör saptananlar ve saptanmayanlar arasında anlamlı fark bulunmuştur. Birçok çalışmada evre ve histopatolojik grade prognoz ile ilişkili bulunmuştur

(9,16,17,18). Çalışmamızda evre prognoz ile ileri derecede ilişkili bulunurken, prognoz ile histopatolojik grade arasında bu ilişki saptanmamıştır. Ancak progresyonsuz sağkalımda grade-prognoz ilişkisi sınıra yakın anlamsız bulunmuştur. Bu nedenle bu ilişkinin daha geniş vaka serileriyle araştırılması gerekmektedir.

Sonuç olarak 39 vakalık serimizde sağkalım ve progresyonsuz sağkalımın en önemli parametreleri tümör evresi ve SL laparatomide tümör var olup olmamasıdır. c-erbB-2 pozitifliği de sağkalım bakımından olumsuz bir parametre olarak karşımıza çıkmıştır. Bu sonuç c-erbB-2 immunhistokimyasının en azından ek bir prognostik gösterge olarak daha geniş seriler ve daha çok sayıda çalışmalarda araştırılmasının gerekliliğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ ve ark. : The neu oncogene: An erb-B-related gene encoding a 185.000-MW tumour antigen. *Nature* 1984; 312: 513-516.
- Coussens L, Yang-Fen TL, Liao YC, Chen E ve ark. : Tyrosine kinase receptor with extensive homology of EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230: 1132-1139.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA ve ark. : Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-712.
- Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B ve ark. : Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 4087-4091.
- Haldane JS, Hird V, Hughes CM, Gullick WJ: c-erbB-2 oncogene expression in ovarian cancer. *J Pathol* 1990; 162: 231-237.
- Garuti G, Genazzani AR: Human neu oncogene is expressed in endometrial but not ovarian adenocarcinoma. *Cancer* 1991; 67: 1713.
- Huettner PC, Camey WP, Naber SP, Delellis RA: Neu oncogene expression in ovarian tumors: a quantitative study. *Mod Pathol* 1992; 5: 250-256.
- Kacinski BM, Mayer AG, King BL, Carter D ve ark. : NEU protein overexpression in benign, borderline, and malignant ovarian neoplasms. *Gynecol Oncol* 1992; 44: 245-253.
- Singleton TP, Perrone T, Oakley G, Niehans GA ve ark. : Activation of c-erbB-2 and prognosis in ovarian carcinoma. Comparison with histologic type, grade and stage. *Cancer* 1994; 73: 1460-1466.
- Wong YF, Cheung TH, Lam SK, Lu HJ ve ark. : Prevalence and significance of HER-2/neu amplification in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest* 1995; 40 (3): 209-212.
- Khalifa MA, Lacher DA, Lage JM, Mannel RS ve ark. : Immunohistochemical assessment of proliferation markers and altered gene expression in archival specimens of ovarian epithelial tumors. *Cancer Detect Prev* 1997; 21: 532-539.
- Caduff RF, Svoboda-Newman SM, Ferguson AW, Frank TS.: Comparison of alterations of chromosome 17 in carcinoma of the ovary and of the breast. *Virchows Arch* 1999; 434 (6): 517-522.
- Ross JS, Yang F, Kallakury BV, Sheehan CE ve ark. : HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in epithelial tumors of the ovary. *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 311-316.
- Russel P: Surface epithelial-stromal tumors of the ovary. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, ed. R J Kurman, 4th ed., Springer-Verlag, New York, 1994; 705-782.
- Berchuck A, Camey M : Human ovarian cancer of the surface epithelium. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 541-544.
- Guthrie D, Davy MLJ, Philips PR : A study of 656 patients with 'early' ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1984; 17: 1653-1664.
- Richardson GS, Scully RE, Nicrui N, Nelson JH Jr: Common epithelial cancer of the ovary. *N Engl J Med* 1985; 312: 415-424.
- Sorbe B, Frankendal BO, Veress B: Importance of histologic grading in the prognosis of epithelial ovarian carcinoma. *Obstet Gynecol* 1982; 59: 576-582.