

Lokal İleri Meme Karsinomunda Kemoterapiye Yanıtın Apoptosis İle İlişkisi

Relationship of Chemotherapy Response and Apoptosis in Locally Advanced Breast Carcinoma

Nilgün Kapucuoğlu¹, Esin Cengiz Boduroğlu¹, Ersoy Ercihan², Fatma Aktepe³, Işın Pak¹

¹SB Ankara Onkoloji Hastanesi Patoloji Bölümü, Ankara ²SB Polatlı Devlet Hastanesi Patoloji Bölümü, Ankara

³SB Aydın Doğumevi Patoloji Bölümü, Aydın

SB Onkoloji Hastanesinde tedavi olan 53 lokal ileri meme karsinomlu kadın hastanın kemoterapi öncesi biyopsi ve kemoterapi sonrası mastektomi materyalleri incelenmiştir. Mitoz sayısı, ışık mikroskopik ve "terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling" (TUNEL) yöntemiyle saptanan apoptotik indeks ve bunlarda kemoterapiye bağlı olarak meydana gelen değişiklikler araştırılmıştır. Işık mikroskopunda tümör perifer ve merkezinde ayrı ayrı değerlendirilen apoptotik hücre sayılarında artış saptanmıştır. TUNEL yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayımı ve mitoz sayımlarında azalma görülmüştür. Apoptosis sayısındaki kemoterapi sonrası artış, kemoterapötiklerin apoptosisi induklüyerek etki gösterdikleri görüşü ile uyumludur. Bulgularımız apoptosis sayısındaki değişikliklerin kemoterapi etkisini değerlendirmede kullanılabilir parametrelerden biri olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Apoptosis, hücre proliferasyonu, kemoterapi, TUNEL, meme karsinomu

Pre-chemotherapy biopsies and post-chemotherapy mastectomies of 53 women with locally advanced breast carcinoma who were treated at Ankara Oncology Hospital were evaluated.

Mitotic count, apoptotic indices determined by light microscopy and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling (TUNEL) technique and changes in the values of these parameters after chemotherapy were investigated. Apoptotic cell counts which was carried out on tumor periphery and center were increased. There were decreases in the apoptotic cell counts with TUNEL technique and decreases in mitotic counts. The increase in the apoptotic counts in post-chemotherapy specimens were consistent with the idea that chemotherapeutics exert their effects by inducing apoptosis. Our findings suggest that changes in apoptosis count could be used as one of the parameters in the evaluation of chemotherapy effect.

Key words: Apoptosis, cell proliferation, chemotherapy, TUNEL, breast carcinoma

Lokal ileri meme kanseri (evre III) tüm meme kanserleri arasında %20-30 oranında görülmektedir⁽¹⁾. Neoadjuvant kemoterapi lokal ileri meme karsinomu tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır^(2,3,4).

Son yıllarda farklı etki mekanizmaları olan pek çok kemoterapötiklerin etkilerini apoptosis ile gösterdiği anlaşılmıştır^(5,6).

Yüksek proliferatif aktivite gösteren ve anöploid tümörlerin kemoterapiye daha iyi yanıt verdikleri ileri sürülmekle birlikte^(7,8), günümüzde meme kanserinde kemoterapiye yanıtı belirleyecek net kriterler henüz ortaya konmuş değildir^(4,8-11).

Bu çalışmada neoadjuvant kemoterapi verilen lokal ileri meme kanserli hastalarda tümör kinetiğinin başlıca parametrelerinden olan mitoz, apoptosis, TUNEL yöntemiyle saptanan apoptosisde kemoterapiye bağlı olarak meydana gelen değişiklikler ve kemoterapiye yanıt arasındaki ilişki araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ankara Onkoloji Hastanesi, Genel Cerrahi Klinikleri ve Patoloji Bölümü'nde 1996-1999 yılları arasında tanı ve tedavi protokolleri belirlenen 53 kadın hastaya ait kemoterapi öncesi meme biyopsisi ve kemoterapi sonrası mastektomi materyalleri incelenmiştir. "American Joint Committee of Cancer" (AJCC) evrelendirme sisteminde göre hastaların 6'sı evre IIIA, 42'si evre IIIB'dir.

Hastalara en az 2 en çok 6 olmak üzere ortalama 3.83 ± 33 kür FAC (5-flourourasil, adriamisin, siklofosfamid), CMF (5-flourourasil, metotraksat, siklofosfamid), FEC (5-flourourasil, epirubisin, siklofosfamid) kombinasyonu verilmiştir. Kemoterapiye yanıt fizik muayene ve radyolojik bulgular ışığında "Union International Contre Cancer" (UICC)⁽¹²⁾ kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Olgular tam regresyon, %50'den fazla regresyon, %50'den az regresyon ve progresyon gösterenler olmak üzere değerlendirilmiştir. İstatistiksel analiz için tam ve %50'den fazla regresyon gösteren

olgular bir grup, %50'den az regresyon ve progresyon gösteren olgular bir başka grup olmak üzere 2 grupta toplanmıştır.

Kemoterapi bitiminden en az 7 en çok 21 gün sonra hastalara mastektomi uygulanmıştır. Bu materyalden alınan örneklerin formalinde fikse edilmiş parafine gömülmüş bloklarından hazırlanan kesitlerde apoptosiz ve mitoz sayımları yapılmış ve TUNEL işaretleme yöntemi uygulanmıştır.

Apoptotik hücreleri tanımlamada aşağıdaki kriterler kullanılmıştır: a) hücrelerde kromatin içeren sitoplazmik fragmanlar, b) iki mikrometreye kadar intraselüler ve ekstraselüler kromatin parçaları apoptotik hücre olarak değerlendirilmiştir⁽¹³⁾ (Resim 1).

Histolojik grade'lemede Bloom Richardson'un Nottingham modifikasyonu kullanılmıştır (14). Mitotik figür ve apoptotik hücre sayımı hematoksilin-eozin boyalı kesitlerde tümör merkezi ve periferinde en aktif alandan başlanarak ardışık 10 büyük büyütme alanında yapılmıştır. Merkez ve periferin belirlenemediği örneklerde tek bir sayım yapılmış ve perifer olarak kabul edilmiştir.

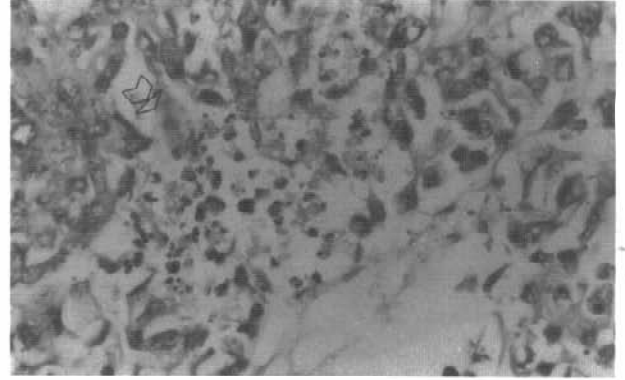
TUNEL yöntemi

Apoptosisin in situ tespiti için ApopTag Plus Peroxidase Kit (Oncor, Inc) kullanılmıştır. (Formalinde fikse edilmiş parafine gömülmüş bloklardan hazırlanan kesitler poly-L lizin (Sigma, St. Louis, USA) ile kaplı

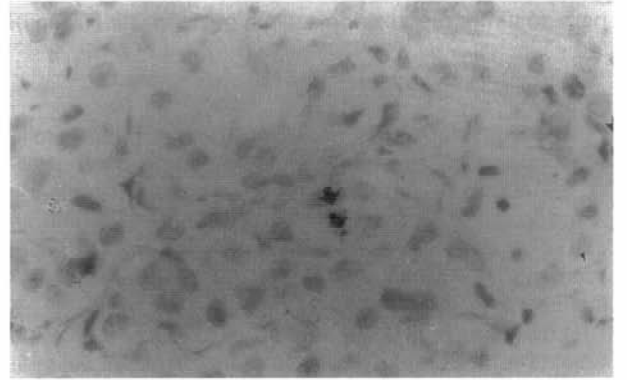
lamlara alınmıştır. 37°C etüvde bir gece bekletilmiş, deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra TUNEL yöntemi ile işaretlemeye geçilmiştir. Kesitler proteinaz K ile (DNA tespiti için liyofilize, BioGenex, USA) 30 dk. 37°C'de nemli ortamda inkübe edilmiştir. Distile suda yıkandıktan sonra PBS (pH 7.6) ile hazırlanan %3'lük H2O2 ile 5 dk oda ısısında tutulmuştur. Kesitler üzerine 15 sn süre ile oda ısısında "equilibration buffer" damlatılmıştır, daha sonra kesitler 16 saat 37°C'de terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) ve digoksinin-dUTP içeren solusyon ile inkübe edilmiştir. Reaksiyon kesitlerin önceden ısıtılmış "working strength stop/wash buffer" solusyonu ile 37°C'de 10 dk inkübe edilmesi ile sona erdirilmiştir. Kesitler 3 kez PBS'de yıkandıktan sonra nemli ortamda oda ısısında anti-digoksinin-peroksidaz ile inkübasyona bırakılmıştır. Preparatlar PBS'de yıkandıktan sonra %0.05'lik diaminobenzidin (DAB) ile renk gelişimi sağlanarak ışık mikroskopunda incelenebilir hale gelmiştir. Zıt boyama "methyl green" ile yapılmıştır. Boyanma elde edilemeyen olgularda Negoescu ve arkadaşlarının (15) önerdiği şekilde, kesitler TdT ile muameleden önce 200ml 0.01 M, pH 6 sitrat tamponda, güç 6'da 10 dk mikrodalga fırında tutulmuştur. Kesitler küçük büyütme ile incelendikten sonra boyanmanın en yoğun olduğu alanlarda 10 büyük büyütme alanında TUNEL pozitif hücreler sayılmıştır (Resim 2).

İstatistiksel değerlendirme

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS paket programı kullanılmıştır. Bağımlı çoklu grup ortancalarının karşılaştırılması "Kruskal-Wallis" tek yönlü varyans analizi testi ile değerlendirilmiştir.



Resim 1 : Bir grup apoptotik hücre (okla işaretli) (x400, H&E)



Resim 2 : TUNEL yöntemi ile nükleer boyanma gösteren iki adet apoptotik hücre (okla işaretli) (x400, TUNEL)

BULGULAR

Tümü kadın olan 53 hastanın yaş ortalaması 49.40 ± 1.50 (aralık 30-72)dir.

TUNEL yöntemiyle olguların 25'inde boyama yapılmıştır. Boyanan olguların 19'unda standart boyanma elde edilmiş, 6 olguda tekrarlanan boyamalara rağmen suboptimal boyanma elde edilebilmiştir. Işık mikroskopunda ise TUNEL yöntemi uygulanan bu 25 olgunun 3'ü hariç hepsinde apoptotik hücre görülmüştür.

Kemoterapiye klinik yanıtları hakkında bilgi edinilebilen 48 olgunun 19'unda (%39.6) kemoterapiye klinik yanıt yoktur, 29 (%60.4) olguda ise tümör boyutunda %50 veya daha fazla küçülme tespit edilmiştir. Bu 29 olgunun 3'ünde ise tam regresyon saptanmıştır.

Elli üç hastanın 44'ü (%84.4) invaziv duktal karsinom, 6'sı (% 11.5) invaziv lobüler karsinom, 1'i medüller karsinom, 1'i de mikst karsinom (invaziv duktal karsinom + invaziv lobüler karsinom) olarak değerlendirilmiştir. Konsültasyon materyali olan 1 olgunun biyopsi materyali histolojik tip açısından değerlendirilememiştir.

Tümör periferi ve merkezinde ayrı ayrı değerlendirilen apoptotik hücre sayımında kemoterapi son-

	kemoterapi öncesi ortalama SH (aralık)	kemoterapi sonrası ortalama SH (aralık)
apoptosis merkez	33.36 ± 6.07(0-100)	35.58 ± 6.41(0-100)
apoptosis perifer	18.75 ± 5.00(0-100)	23.16 ± 5.37(0-100)
TUNEL apoptosi	10.00 ± 6.72(0-30)	9.81 ± 6.58(0-24)
mitoz merkez	14.06 ± 2.25(0-84)	8.04 ± 1.35(0-45)
mitoz perifer	13.5 ± 2.03(0-66)	8.60 ± 1.02(0-29)
tümör boyutu	5.52 ± 0.33(1.5-12)	4.33 ± 0.47(0-15)

SH : Standart hata

Tablo 1 : Kemoterapi öncesi ve sonrası apoptosis, TUNEL apoptosis, mitoz sayımları ve tümör boyutunun özellikleri

rası, hem perifer hem de merkezde artış saptanmıştır. Alan gözetmeksizin TUNEL yöntemiyle değerlendirilen apoptosis ve mitoz sayımlarında ise hem tümör periferi hem de tümör merkezinde azalma gözlenmiştir (Tablo I).

TARTIŞMA

Bilindiği gibi tümör boyutundaki artış hücre proliferasyonu ve hücre kaybı arasındaki dengenin sonucudur. Günümüzde kullanılan farklı etki mekanizmalarına sahip kemoterapötiklerin de apoptotik hücre ölümü ile etki gösterdikleri öğrenildikten sonra tümör kinetiği konusundaki çalışmalar apoptosis üzerinde yoğunlaşmıştır^(4,5).

Lokal ileri meme kanserinde indüksiyon tedavisine objektif yanıt literatürde %46-90 oranında bildirilmektedir⁽⁶⁾. Serimizde elde edilen %60.4 oranındaki klinik yanıt literatür verileri ile uyumludur.

Genelde hızlı büyüyen tümörler daha az agresif olanlara göre daha yüksek oranda apoptosis gösterirler⁽¹⁶⁾. Yüksek S-faz fraksiyonu ve mitotik indeks ile yüksek apoptotik indeks arasında pozitif korelasyon bildirilmiştir⁽¹⁵⁾. Hücre kültüründe yapılan bir çalışmada tümör büyümesini kontrol eden başlıca parametrenin apoptosis oranı olduğu ve genelde mitoz ile ters orantılı olduğu tespit edilmiştir⁽¹⁷⁾.

Ellis ve arkadaşları⁽¹⁸⁾ 27 olguluk erken meme kanserli hastalardaki çalışmalarında kemoterapi sonrası ilk 24 saate alınan biyopsilerde apoptosis oranında belirgin artış saptamışlardır. Fakat Ki67 skorunda istatistiksel olarak değişiklik olmamıştır⁽¹⁸⁾. Lokal ileri meme kanserli hastaları içeren başka bir çalışmada kemoterapinin proliferatif aktivite ve apoptotik indekste anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı bildirilmekle birlikte, genel olarak proliferatif aktivitede azalma eğilimi ve multipl regresyon analizi sonucunda da apoptosisin, mitotik indeks ile korele olduğu tespit edilmiştir⁽¹⁹⁾. Frassoldati ve arkadaşları⁽²⁰⁾ ise lokal ileri meme kanserinde kemoterapi sonrasında apoptotik indeks ve PCNA ile tespit edilen proliferatif aktivitede artış kaydetmişlerdir. Yapılan çalışmalar tümör gelişiminde, hücre proliferasyonu ve apoptosis arasındaki denge bozukluğunun önemli olduğuna işaret etmekle birlikte ikisi arasındaki ilişkinin

hangi yönde değiştiği netleşmemiştir. Serimizde kemoterapi sonrası apoptotik indekste hem tümör periferinde hem de merkezinde artış görülmüştür. TUNEL yöntemiyle yapılan apoptosis sayımında ve mitoz sayılarında azalma görülmüştür. Apoptotik indekste artış belirgindir. Kemoterapi sonrası gözlenen bu değişiklikler kemoterapötiklerin yüksek proliferatif aktivite gösteren hücreleri etkiledikleri ve etkilerini apoptosis indükleyerek gösterdikleri görüşünü destekler yöndedir. TUNEL yöntemi apoptotik hücrelerin insitu olarak işaretlenmesini sağlayan bir tekniktir. Apoptosiste karakteristik olarak, parçalanmış DNA'nın 3-OH uçları açığa çıkar. Yöntem apoptotik hücredeki açık 3-OH uçlarına, DNA polimeraz I veya deoksiniükleotidil transferaz (TdT) enzimi yoluyla işaretlenmiş biyotinize deoksüridin trifosfat (dUTP) molekülünün eklenmesi temeline dayanır. Bağlayıcı enzime bakılmaksızın bu yöntemlerin tümü "in situ end-labeling (ISEL)", DNA polimeraz I veya Klenow fragmanı kullanılıyorsa "in situ nick translation (ISNT)" veya terminal transferaz kullanılıyorsa "TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)" olarak adlandırılır⁽¹⁶⁾. Çalışmamızda apoptosis sayımında, ışık mikroskopu ve TUNEL yöntemi ile farklı sonuçlar elde edilmiştir. Aynı TUNEL yöntemi uygulanan 25 olgunun 22'sinde ışık mikroskopu ile apoptotik hücre görülmüştür fakat 6 olguda TUNEL tekniği ile boyanma olmamıştır. Bu TUNEL yönteminin apoptosisin in situ tespitinde yaygın olarak kullanılmakla birlikte tek başına çok güvenilir olmadığı, rutin morfoloji veya apoptosis tespitinde kullanılan diğer yöntemlerle birlikte kullanılması gerektiği görüşünü destekler yöndedir^(6,16). Ayrıca TUNEL yönteminin apoptosisin belirli bir evresine özgün olmasına da bağlanabilir⁽²¹⁾.

İkeda ve arkadaşları⁽²¹⁾ TUNEL yöntemiyle inceledikleri 39 nöroblastomun 16'sında boyanma tespit etmişlerdir. Tüm olgularda ışık mikroskopuyla karyotipik hücreler görmüşler ve agaroz jel yöntemi ile incelenen 19 olgunun 18'inde apoptosis için tipik olan merdiven patternini saptamışlardır. Yöntemler arasındaki bu sonuç farklılığını TUNEL tekniğinin duyarlılığının düşük olmasına bağlamışlardır⁽²¹⁾.

Çalışmamızda olduğu gibi, yapılan çalışmaların çoğunda da kemoterapi sonrası apoptosiste artış gözlenmiştir^(18,20). Apoptosisteki artış tüm çalışmalarda olmasa da⁽²⁰⁾ bazılarında⁽¹⁶⁾ kemoterapiye yanıtla ilişkili bulunmuştur. Bu nedenle kemoterapiye yanıtı değerlendirmede kullanılan parametrelerden biri olabilir. Büyük hasta gruplarında yapılacak çalışmalar konunun aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Swain SM. Selection of therapy for stage III breast cancer. Surg Clin North Am 1990; 70: 1061-1079.
- Hortobagyi GN, Ames FC, Buzdar AU, Kau SW, McNees MD, Pauls D, et al. Management of stage III primary breast cancer with primary chemotherapy, surgery and radiation therapy. Cancer 1988; 62: 2507-2516.
- Jacquillat C, Weil M, Ballet F, Borel C, Auclerc G, de Maubanc MA, et al. Results of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in breast-conserving treatment of 250

- patients with all stages of infiltrative breast cancer. *Cancer* 1990; 66: 119-129.
4. Calais G, Descamps P, Chapet S, Turgeon V, Reynaud-Bougnoux A, Lemarie E, et al. Primary chemotherapy and radiosurgical breast-conserving treatment for patients with locally advanced breast cancers. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1993; 26: 37-41.
 5. Dive C, Hickman JA. Drug-target interactions: only the first step in commitment to a programmed cell death? *Br J Cancer* 1991; 64: 192-196.
 6. Thatte U, Dahanukar S. Apoptosis. Clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs* 1997; 54: 511-532.
 7. O'Reilly SM, Camplejohn RS, Millis RR, Rubens RD, Richards MA. Proliferative activity, histological grade and benefit from adjuvant chemotherapy in node positive breast cancer. *Eur J Cancer* 1990; 26: 1035-1038.
 8. O'Reilly SM, Camplejohn RS, Rubens RD, Richards MA. DNA flow cytometry and response to preoperative chemotherapy for primary breast cancer. *Eur J Cancer* 1992; 28: 681-683.
 9. Anderson EDC, Forrest APM, Hawkins RA, Anderson TJ, Leonard RCF, Chetty U. Primary systemic therapy for operable breast cancer. *Br J Cancer* 1991; 63: 561-566.
 10. Bonadonna G, Veronesi U, Brambilla C, Ferrari L, Luini A, Greco M, et al. Primary chemotherapy avoid mastectomy in tumors with diameters of three centimeters or more. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1539-1545.
 11. Robertson JFR, Ellis IO, Pearson D, Elston CW, Nicholson RI, Blamey RW. Biological factors of prognostic significance in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29: 259-264.
 12. Hayward JL, Carbone PP, Heusan J-C, Kumaoka S, Segaloff A, Rubens D. Assessment of response to therapy in advanced breast cancer. *Cancer* 1977; 39: 1289-1294.
 13. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma V-M, Syrjänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 2068-2073.
 14. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillerniet C. In situ apoptotic cell labeling by TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 959-968.
 15. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403-410.
 16. Stuanton MJ, Gaffney EF. Apoptosis. Basic concepts and potential significance in human cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 310-319.
 17. Arends MJ, Mc Gregor AH, Wyllie AH. Apoptosis is inversely related to necrosis and determines net growth in tumors bearing constitutively expressed myc, ras and HPV oncogenes. *Am J Pathol* 1994; 144: 1045-1057.
 18. Ellis PA, Smith IE, Mc Carthy K, Detre S, Salter J, Dowsett M. Preoperative chemotherapy induces apoptosis in early breast cancer. *Lancet* 1997; 349: 849.
 19. Rasbridge SA, Gillet CE, Seymour AM, Patel K, Richards MA, Rubens RD, et al. The effects of chemotherapy on morphology, cellular proliferation, apoptosis and oncoprotein expression in primary breast carcinoma. *Br J Cancer* 1994; 70: 335-341.
 20. Frassoldati A, Adami F, Banzi C, Criscuolo M, Piccinini L, Silingardi V. Changes of biological features in breast cancer cells treated by primary chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 44: 185-192.
 21. Ikeda H, Hirato J, Akami M, Suzuki B, Takahashi A, Kuroiwa I, et al. Massive apoptosis detected by in situ DNA nick end-labeling in neuroblastoma. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 649-655.