

## EVRE II-III İNVAZİV DUKTAL KARSİNOM OLGULARINDA c-erbB-2, PCNA, p53, bcl-2, FVIII İMMUNREAKTİVİTESİ

### Immunohistochemical Expression Of c-erbB-2, PCNA, p53, bcl-2, FVIII in Stage II-III Invasive Ductal Carcinoma

Işın Soyuer<sup>1</sup>, Serdar Soyuer<sup>2</sup>, Özlem Canöz<sup>1</sup>, Metin Özkan<sup>3</sup>,  
Figen Öztürk<sup>1</sup>, Turhan Ökten<sup>1</sup>

#### Özet

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı; invaziv meme karsinomlarında; p53 tümör baskılayıcı gen, proliferasyon cell nuclear antigen (PCNA), c-erbB-2, bcl-2, FVIII'in immunohistokimyasal (IHK) olarak belirlenmesi ve sonuçların diğer prognostik belirleyiciler ile karşılaştırılarak değerlendirilmesidir.

**Gereç ve Yöntem:** Primer meme karsinomu olan 55 olgu çalışmaya alındı ve histopatolojik olarak modifiye Bloom ve Richardson kriterlerine göre sınıflandırıldı. Parafin kesitler monoklonal antikolar, p53 protein, PCNA, c-erbB-2, bcl-2, FVIII ile İHK olarak boyandı. **Bulgular:** Olgularımızın 23'ü (%41,8) p53 pozitif ve 41'i (%74,54) PCNA pozitif boyandı. Ortalama PCNA boyanma indeksi (PCNA LI +/- SD) 58.21 +/- 25.12 olarak bulundu. İHK olarak p53 ve PCNA pozitifliği en yoğun, evre III tümörlerde (%52,43 ve %85,45) izlendi. Aynı zamanda ortalama PCNA LI evre III karsinomlarda en yüksek düzeyde saptandı (62.67 +/- 12.85). C-erbB-2 pozitifliği ile tümörün histolojik evresi ( $p = 0.024$   $p < 0.05$ ) ile sonuç evresi ( $p = 0.035$   $p < 0.05$ ) arasında ve bcl-2 pozitifliği ile tümörün sonuç evresi ( $p = 0.044$   $p < 0.05$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu ( $p < 0.05$ ). Anjiyogenezis, FVIII ilişkili antijen ile çalışıldı, İHK olarak boyanan kesitlerde mm<sup>2</sup> başına düşen damar yoğunluğu; mikro damar sayısı (MDS) saptandı. MDS ile diğer prognostik faktörler arasında ilişki bulunamadı.

**Sonuç:** Çalışmamız PCNA ve p53 immunreaktivitesinin, yüksek evreli invaziv duktal karsinom olgularının belirlenmesinde önemi olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** erbB-2 geni; Prolifere hücre çekirdek antijeni; p53 proteini; bcl-2 geni; Kausinom, duktal, meme.

#### Abstract

**Purpose:** The object of the present study is to detect the p53 tumor suppressor gene and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), c-erbB-2, bcl-2, FVIII related antigen (FVIIIIRA) expression in breast carcinoma by immunohistochemistry, and the correlation with prognostic parameters.

**Material and Methods:** A total of 55 cases with primary breast carcinoma were studied and classified histopathologically using modified Bloom and Richardson. Paraffin sections were stained by using monoclonal antibody p53 protein, PCNA, c-erbB-2, bcl-2, FVIIIIRA.

**Results:** Of the 55 cases, 23 (41.81%) were p53 positive and 41 (74.54 %) were PCNA positive. The mean PCNA labelling index (PCNA LI +/- SD) was 58.21 +/- 25.12. Maximum p53 and PCNA positivity was observed in grade III tumors (52.43% and 85.45%). The mean PCNA LI +/- SD was also highest in grade III carcinomas (62.67 +/- 12.85). No significant correlation was found between p53, PCNA, bcl-2, FVIIIIRA and c-erbB-2 status with morphological type, tumor size, estrogen and progesterone hormone receptor status except that multivariate and chi-square tests showed C-erbB-2 positive correlation with tumor histological grade ( $p = 0.024$   $p < 0.05$ ) and final grade ( $p = 0.035$   $p < 0.05$ ), and bcl-2 positive correlation with tumor final grade ( $p = 0.044$ ,  $p < 0.05$ ). Angiogenesis was assessed by performing FVIIIIRA, immunostaining and microvessel count (MVC) per mm<sup>2</sup>. The MVC was not found to be correlated with any of the other prognostic parameters.

**Conclusion:** Our results suggest that PCNA and p53 protein expression are markers of poor differentiation in breast cancer.

**Key Words:** Genes, erbB-2; Proliferating Cell Nuclear Antigen; Protein p53; Genes, bcl-2; Carcinoma, ductal, breast.

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD,

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi AD,

<sup>3</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Medikal Onkoloji AD,

Geliş tarihi: 30 Temmuz 2004

## **Giriş**

Meme kanserli hastalarda çok sayıda prognostik faktör çalışılmakta ve değişik serilerde yararlı sonuçlar elde edilmektedir. Bu çalışma sonuçları her ne kadar birbirleri ile tam uyumlu olmasa da üzerinde en çok ortaklığa varılan konu opere edilebilen meme kanserlerinde metastatik aksiller lenf nodunun varlığının prognozu en çok etkileyen faktör olduğudur. Bununla birlikte lenf nodu negatif hastalarda da nadir olmayarak tümör nüksleri izlenmektedir (1). Tümörün gelişiminin ve metastaz yapma potansiyelinin tümörün mikro damar sayısına (MDS) bağlı olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (2,3).

Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu tümörün gelişim süreci, histolojik evresi ve klinik evresi ile ilişkili olabilir. Tümör hücrelerinin nükleuslarında mutasyona uğrayan p53 proteini çok miktarda bulunabilir ve immunohistokimyasal yöntemler ile tesbit edilebilir. Mutasyona uğramış p53 proteini aynı zamanda invaziv duktal karsinom olgularında da bulunmaktadır (4,5). Wild-type p53 geninden elde edilen mutant p53 geninin insan meme karsinomundaki hücrelerin üzerine gelişmeyi baskılayıcı yönde etki ettiği bulunmuştur (6).

Meme kanserlerinde c-erbB-2 proteinin, immunohistokimyasal olarak saptanma oranının artması, hücrelerin proliferasyon hızı ve mevcut reseptörlerin durumuna bağlıdır (7-10). c-erbB-2 proteinin aksiller lenf nodu pozitif olan grupta olmayanlara göre daha fazla pozitif bulunduğu ve yine c-erbB-2 pozitifliğinin arttıkça hastaların prognozlarının da daha kötü bulunduğu bildirilmiştir (11,12).

Apopitozis genlerinden olan bcl-2 ve bax'ın tümör büyüklüğü, nükleer evreleme, östrojen ve progesteron hormon reseptörleri ile ilişkisi bilinmektedir (13). Evre II ve III primer meme tümörlerinde p53, PCNA, c-erbB-2, bcl-2, FVIII antikollarının immunreaktivitesinin saptanması ve bu sonuçlarla prognostik faktörlerin ilişkilerinin araştırılması amacıyla bu çalışma planlandı.

## **Hastalar ve Yöntem**

Bölümümüzde tanı alan 55 invaziv duktal karsinom olgusuna ait formalinde tesbit edilmiş parafin kesitlere p53, PCNA, c-erbB-2, bcl-2, FVIII antikolları streptavidin-biotin peroxidase kompleks tekniği ile uygulandı. Bu proteinlerle elde edilen immunohistokimyasal boyama sonuçları hastaların başta Bloom ve Richardson'nın histolojik evrelemesi olmak üzere östrojen/progesteron hormon reseptör durumu, tümör çapı, nodal metastaz, uzak metastazların varlığı ve klinik evreleme ile karşılaştırıldı. P53 immunreaktivitesi belirlenirken pozitif boyanan nükleuslar değerlendirildi. Her olgu için en az 200 tümör hücresi altı farklı alanda sayıldı ve tümör hücre nükleusları %10 ya da daha fazla pozitiflik gösteriyorsa pozitif, diğerleri negatif olarak değerlendirildi (Resim 1).

PCNA pozitifliğinin belirlenmesi için boyanmanın yoğun olduğu alanlarda 1000 hücre sayılarak boyanmanın şiddetine bakılmaksızın pozitif boyanan nükleusların ortalaması bulundu (Resim 2). c-erbB-2 protein pozitifliği değerlendirilirken tümör hücrelerinde sitoplazmik membran boyanması %80 üzerinde olanlar pozitif (Resim 3), diğerleri negatif kabul edildi.

İHK değerlendirmede bcl-2 ile sitoplazmik boyanması %10'un üzerinde olan olgular pozitif (Resim 4), diğerleri ise negatif olarak değerlendirildi. FVIII ile boyanan kesitlerin değerlendirilmesinde; x200 büyütme ile boyanmanın yoğun olduğu beş farklı alan sayıldı. Böylece her olgu için 0,25mm<sup>2</sup> lik alanda mikro damar yoğunluğu saptandı (Resim 5). İstatistiksel analizler "SPSS" programı ile yapıldı. Menapoz durumu, histopatolojik evreleme, aksiller lenf nodu tutulumu, evre ve östrojen/progesteron reseptör pozitifliği, Ki-kare testi ile karşılaştırıldı. İstatistiksel sonuçlarda, p değeri 0.05 ve küçük olanlar anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Çalışmaya dahil edilen tüm olgular Evre II-III invaziv duktal karsinomdu (Evre II- 34 olgu, Evre III-21 olgu). Kırk sekiz olguda modifiye radikal mastektomi, 7 olguda basit mastektomi+axiller disseksiyon uygulandı. Olgulara postoperatif dönemde günlük 200 cGy'lik fraksiyonlarla toplam 5000 cGy göğüs duvarı + periferik lenfatiklere radyoterapi uygulandı. Otuz dokuz olguda ağırlıklı olarak CMF (Cyclophosphamide-Methotrexate-Fluorourasil) olmak üzere adjuvan kemoterapi verildi. Hormonoterapi gören olgu sayısı 21'dir.

Hastalarımızın yaşları 27-78 arasında değişmektedir, yaş ortalaması 49'dur. Tümör boyutuna göre hastalar değerlendirildiğinde 8 olguda tümörün çapı 2 cm altında, 30 olguda 2-5 cm arasında, 12 olguda ise 5 cm üzerindedir.

Olgularımızın (55 olgu), 23'ü (%41,8) p53 pozitif ve 41'i (%74,54) PCNA pozitif boyandı. Ortalama PCNA boyanma indeksi (PCNA LI +/- SD) 58,21+/-25,12 olarak bulundu. IHK olarak p53 ve PCNA pozitifliği en yoğun evre III tümörlerde (%52,43 ve %85,45) izlendi. Aynı zamanda ortalama PCNA LI evre III karsinomlarda en yüksek düzeyde saptandı (62,67+/-12,85). Mitotik figürlerin sık izlendiği olgularda p53 immunreaktivitesinin de daha fazla bulunduğu görüldü.

bcl-2 sitoplamik boyanma olguların 17'sinde (%32,63) bulunmaktadır. FVIII ile boyanma oranı 0,1 ile 32,0 arasında bulunmaktaydı ve ortalama FVIII boyanma oranı 13,6 "cut off" değeri olarak alındığında olguların 29'unda (%53,4) ortalama üzerinde boyanma elde edildi.

c-erbB-2 pozitifliğiyle tümörün histolojik evresi (p= 0,024 p<0,05) ve sonuç evresi (p= 0,035 p<0,05) arasında ve bcl-2'nin tümörün sonuç evresi (p= 0,044 p<0,05) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı.

## Tartışma

Meme kanserlerinin prognozunun belirlenmesinde metastatik aksiller lenf bezinin varlığı ve sayısı, tümörün büyüklüğü, hormon reseptörlerinin durumu ve histolojik evre en yaygın kullanılan belirleyicilerdir. Bununla birlikte tedaviye yanıtın belirlenebilmesi için ek olarak çeşitli biyolojik belirleyicilere de ihtiyaç duyulmaktadır.

p53 genindeki değişiklikler ile insan karsinomları arasındaki ilişki bilinmektedir. Meme karsinomlarında p53 proteinin normalden fazla bulunması bu kanserin oluşumunda p53 geninde ortaya çıkan değişiklikleri düşündürmektedir. Bizim serimizde p53 ile boyanma oranı %32 olarak elde edilmiştir ve bu oran Suzuki ve arkadaşlarının (14) serisindeki % 35,9 ve Fukushima ve arkadaşlarının (15) % 33,9 olan p53 boyanma oranı ile uyumlu bulunmaktadır. Daha önceki yayınlarda p53 pozitifliği gösteren olguların çoğunda c-erbB-2 pozitifliği de bildirilmiştir (14) . Bizim olgularımızdan p53 pozitifliği gösterenlerin %51'inde c-erbB-2 pozitifliği de bulunmaktadır. P53 pozitifliği ile PCNA pozitifliği arasında da paralellik bulunmaktadır.

Meme karsinomlarının histolojik olarak evrelemesi son derece önemlidir. Nükleer evreleme ile bcl-2, p53, c-erbB-2, östrojen ve progesteron hormon reseptörlerinin ve MIB-1'in arasındaki ilişki çalışılmış nükleer evre ile bcl-2'nin negatif, c-erbB-2 ve MIB-1'nin pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. (15,16). Bizim çalışmamızda c-erbB-2 ile histolojik evre ve son evre arasında anlamlı ilişki bulunmaktadır (p<0,05).

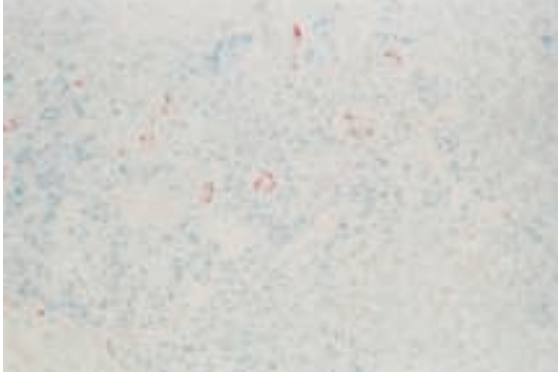
Tümör anjiyogenezi ve nodal durumun prognoz ile ilişkisi daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (1). Bazı çalışmalarda lenf noduna metastaz ile anjiyogenezinin ilişkili olduğu söylenmektedir (17). Bununla birlikte nodal metastazın anjiyogenezis ile ilişkisiz olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (18). Bizim çalışmamızda anjiyogenezis ile nodal metastaz ve diğer faktörler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmedi.

Evre III invaziv duktal karsinomlarda evre II invaziv duktal karsinoma göre bcl-2 protein ekspresyonunda azalma olduğu ve bcl-2 negatifliğinin kötü prognoz belirleyicilerinden olduğu bildirilmektedir (19). Bizim çalışmamızda evre II tümörlerde %21 olan bcl-2 pozitifliği, evre III tümörlerde %12'ye düşmektedir. c-erbB-2 proteinin overekspresyonu ile sağkalım arasında sıkı ilişki olduğunu bildiren çok sayıda yayın bulunmaktadır (20). Literatürdeki çalışmalarda c-

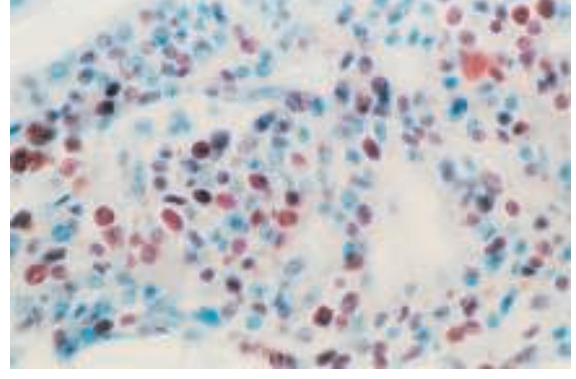
erbB-2 overekspresyonu %10 ile %50 arasında değişmektedir (21-23). Çalışmamızda bu oran %46 olarak belirlendi. Nodal metastaz ile ilişki bulunamazken, c-erbB-2 proteini ile yapısal (p= 0.024 p<0.05) ve nihai histolojik evre (p= 0.035 p<0.05) arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi. Bu çalışmada sonuçlarımız; c-erbB-2 ve bcl-2'nin invaziv duktal karsinom olgularında prognostik belirleyici olabileceğini düşündürmektedir.

**Tablo I.** Histolojik grade ile p53, c-erbB-2, PCNA, FVIII ve bcl-2 immunreaktivitesi arasındaki ilişki

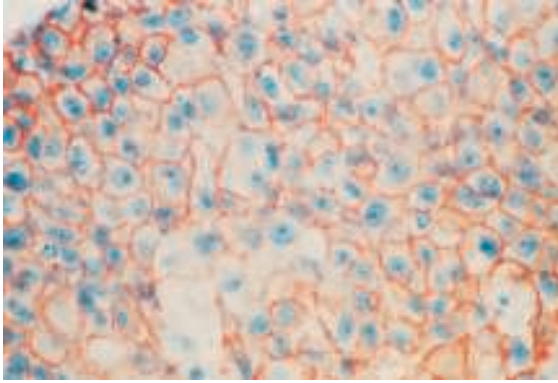
	No	p53		c-erbB-2		PCNA		FVIII		bcl-2	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<b>Yapısal evre</b>											
1	9	5	4	5	4	6	3	5	4	6	3
2	35	19	16	30	5	23	12	27	8	22	13
3	11	8	3	11	0	7	4	7	4	5	6
<b>Nükleer evre</b>											
1	8	4	4	6	2	5	3	2	6	6	2
2	42	24	18	35	7	29	13	28	14	26	16
3	5	4	1	5	0	2	3	4	1	1	4
<b>Mitotik evre</b>											
1	13	6	7	10	3	8	5	8	5	10	3
2	25	14	11	19	6	16	9	18	7	13	12
3	17	12	5	17	0	12	5	13	4	10	7
<b>Sonuç evre</b>											
1	9	5	4	5	4	4	5	8	1	7	2
2	41	23	18	36	5	29	12	27	14	25	16
3	5	4	1	5	0	3	2	4	1	1	4



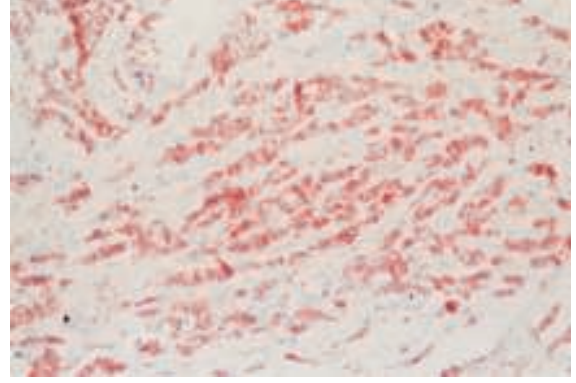
**Resim 1:** Invaziv duktal karsinom olgusunda p53 pozitifliği (x200).



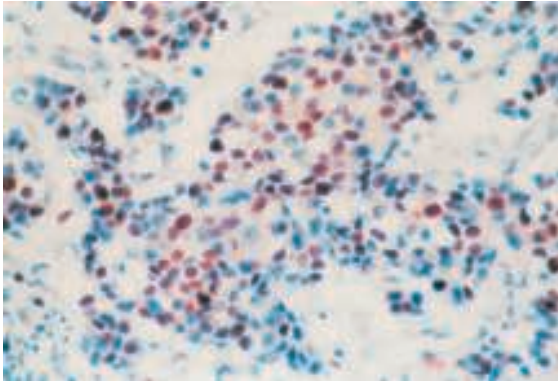
**Resim 2:** Invaziv duktal karsinom olgusunda PCNA pozitifliği (x200).



**Resim 3:** Invaziv duktal karsinom olgusunda c-erbB-2 pozitifliği (x200).



**Resim 4:** Invaziv duktal karsinom olgusunda bcl-2 pozitifliği (x200).



**Resim 5:** Invaziv duktal karsinom olgusunda FVIII pozitifliği (x200).

## KAYNAKLAR

- 1-Narita M, Nakao K, Ogino N, et al. Independent prognostic factors in breast cancer patients *Am J Surg* 1998; 175:73-75.
- 2- Jacquamier JD, Llorca FMP, Bertucci F, et al. Angiogenesis as a prognostic marker in breast carcinoma with conventional adjuvant chemotherapy. *J Pathol* 1998;184:130-135.
- 3-De Jong J, Van Diest PJ, Van Der Valk P, Baak JB. Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II. Correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol* 1998;184:53-57.
- 4-Prosser J, Thompson AM, Cranston G, Evans HJ. Evidence that p53 behaves as a tumor suppressor gene in a sporadic breast tumours. *Oncogene* 1990;5:1573-1579.
- 5-Thompson AM, Steel CM, Chetty U, et al. P53 gene mRNA expression and chromosome 17p allele loss in breast cancer. *Br J Cancer* 1990;61:74-78.
- 6-Casey G, Lo Hosueh M, Lopez ME, Vogeistein B, Stanbridge EJ. Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild type p53 gene. *Oncogene* 1991;6:1791-1797.
- 7-Bacus SS, Ruby SG, Weinberg DS, Chin D, Ortiz R, Bacus JW. HER-2/neu oncogene expression and proliferation in breast cancer. *Am J Pathol* 1990;137:103-111.
- 8-Maguire HC, Greene MI. The neu (c-erbB-2) oncogene. *Semin Oncol.* 1989;16:148-155.
- 9-Van De Vijver MJ, Petere JL, Mool VJ et al. Neu-protein overexpression in breast cancer. *N Engl J Med.* 1988;319:1239-1245.
- 10-Van Diest PJ, Baak JPA, Chin D, Theeuwes JW, Bacus SS. Quantitation of Her-2/neu oncoprotein overexpression in invasive breast cancer by image analysis:A study comparing fresh and paraffin-embedded material. *Anal Cell Pathol* 1991;3:195-202.
- 11-McCann AH, Dervan PA, O'Regan M et al. Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res* 1991;51:3296-3303.
- 12-Thor AD, Schwartz LH, Koerner FC et al. Analysis of c-erbB-2expression in breast carcinomas with clinical follow-up. *Cancer Res.* 1989;49:7147-7152.
- 13-Yang Q, Sakurai T, Jing X, et al. Expression of bcl-2, but not bax, correlates with estrogen receptor status and tumor proliferation in invasive breast carcinoma. *Pathol Int* 1999;49:775-780
- 14-Suzuki M, Okuyama T, Yoshikawa K, et al. Overexpression of p53, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor in human breast carcinomas. *Pathology Int* 1996;46:46-53.
- 15-Fukushima T, Urazumi K, Inoue N, et al. Significance of overexpression of p53 protein in human breast cancer:A clinicopathologic study. *Jpn J Cancer Clin* 1983;39:23-27.
- 16-Yang Q, Mori I, Sakurai T, et al. Correlation between nuclear grade and biological prognostic variables in invasive breast cancer. *Breast Cancer* 2001;8:105-110
- 17-Toi M, Inada K, Suzuki H, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma . *Int J Cancer* 1993;55:371-374.
- 18-Charpin C, Devictor B, Bergeret D, et al. CD 31 quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas. Correlation with current prognostic factors. *Am J Clin Pathol* 1995;103:443-448.
- 19-Bhatevdekar JM, Patel DD, Shah NG, et al. Prognostic significance of immunohistochemically localized biomarkers in stage II and stage III breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2000;7:305-311.
- 20-Gullick WJ, Love SB, Wright C, et al. C-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Cancer* 1991;63:434-438.
- 21-Zhou DJ, Ahuja H, Cline MJ. Proto-oncogene abnormalities in human breast cancer. *Oncogene* 1989;4:105-108.
- 22-Razumovic JJ, Petrovecki M, Uzarevic B, Gamulin S. Mutual predictive value of c-erbB-2 overexpression and various prognostic factors in ductal invasive breast carcinoma. *Tumori* 2000; 86:30-36.
- 23-Howard EM, Lau SK, Lyles RH, et al. Correlation and expression of p53, Her-2, vascular endothelial growth factor (VEGF), and e-cadherin in a high-risk breast cancer population. *Int J Clin Oncol* 2004;9(3):154-160.