

# Memenin infiltratif duktal karsinomlarında P53, östrojen reseptör proteini, PCNA ve Ki-67 ekspresyonu ile AgNOR indeksi özelliklerinin araştırılması

Mustafa Cihat AVUNDUK\*, Şakir TEKİN\*\*, Şakir TAVLI\*\*

\* S.Ü.T.F. Patoloji Anabilim Dalı, \*\*S.Ü.T.F. Genel Cerrahi Anabilim Dalı, KONYA

## ÖZET

Memenin infiltratif duktal karsinomu olgularında proliferasyon belirleyicileri olan PCNA, Ki-67 ve AgNOR indeksi ile östrojen reseptör proteini ve P53 ekspresyonu arasındaki ilişkileri araştırmak istedik. Bu amaçla Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi kliniğinde opere edilmiş 25 infiltratif duktal karsinom olgusu çalışmaya alındı. Tümör yapıyı bulduran kesitler PCNA, Ki-67, östrojen reseptör proteini, P53 ile immünohistokimyasal olarak boyandı. Bin tümör hücresi içerisinde pozitif ekspresyon gösteren hücre sayıları toplanıp 1000'e bölünerek her bir boyama için indeksler hesaplandı. Ayrıca 100 tümör hücresinde gümüş impregnasyon yöntemi ile belirlenen NOR cisimleri sayılıp 100'e bölünerek AgNOR indeksi saptandı. Tüm indeksler birbirleri ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Östrojen reseptör proteini pozitifliği ile P53 ekspresyonu arasında negatif bir ilişki gözlemlendi. Östrojen reseptör proteini pozitifliği gösteren hücre sayıları artarken, PCNA, Ki-67 ve AgNOR indekslerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük değerlerde seyrettiği görüldü. Sonuç olarak memenin infiltratif duktal karsinomlarında tüm bu belirleyicilerin istatistiksel olarak anlamlı ilişkiler içerisinde olduğunu, dolayısıyla, tanı sonrası prognozun belirlenmesinde de yol gösterici olabileceğini gösterdik.

**Anahtar Kelimeler:** AgNOR, PCNA, Ki-67, P53, östrojen reseptör proteini, meme, infiltratif duktal karsinoma.

## SUMMARY:

**The investigation of P53, oestrogen receptor protein, PCNA, Ki-67 expression and AgNOR index in infiltrating ductal carcinoma of breast**

In this study, we investigated the relationships between tumour proliferating determinants (PCNA, Ki-67, and index of AgNOR) in infiltrating ductal carcinoma of breast both oestrogen receptor protein and P53. Twenty-five cases whose were operated and diagnosed as infiltrating ductal carcinoma were included in the study. The tumour containing slides were stained immunohistochemically with PCNA, Ki-67, estrogen receptor protein and P53. One thousand cells were counted and the indexes for each staining were established as the number of positive cells was divided to 1000. Additionally, the NOR corpuscles which were established by silver impregnation technique in 100 tumour cells were counted and the AgNOR index was determined by dividing this count to 100. All indexes were compared to each other by statistical means. We found that oestrogen receptor positiveness was negatively linked to the expression of P53 and the indexes of PCNA, Ki-67, and AgNOR. In conclusion, we demonstrated that all of above mentioned indexes had close relationships to each other, so they may have prognostic values.

**Key Words:** AgNOR, PCNA, Ki-67, P53, estrogen receptor protein (ERP), breast, infiltratif ductal carcinoma.

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malign tümördür. Kadınlarda görülen karsinomlar içerisinde de en sık görülen ölüm nedenidir. Coğrafi bölgelere göre farklı insidanslarla karşımıza çıksa da tüm dünyada önemli bir sağlık sorununu oluşturmaktadır

(1). Meme kanserleri morfolojisi, invaziv davranışı, metastatik kapasitesi, hormon reseptör ekspresyonu ve klinik gidişyle oldukça heterojen bir grubu oluşturur (2). Son zamanlarda meme karsinomlarında teşhis, tedavi ve prognozu belirleyecek



markerlerin pratikte rutin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (3). Bu çalışmamızda formaldehid ile tespit edilmiş, parafine gömülmüş dokulardan hazırlanan kesitlere immünohistokimyasal yöntemlerle östrojen reseptör proteini (ERP), P53, AgNOR, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki-67 boyaması uyguladık. Ayrıca gümüş impregnasyon yöntemi ile intranükleer NOR cisimciklerini belirledik. Tüm bu boyanma özellikleri arasındaki ilişkileri istatistiksel olarak incelemek istedik.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Hematoksilen eozin ile boyanmış preparatlar gözden geçirilerek uygun bloklar tespit edildi. Bu bloklardan hazırlanan 5 mikronluk kesitlere immünohistokimyasal olarak PCNA, Ki-67, P53 ile ERP boyaması yapıldı. Ayrıca gümüş impregnasyon yöntemiyle de nucleolar organiser regions (NOR) cisimcikleri belirlendi.

Immünohistokimyasal boyamada Streptavidin-Biotin Peroksidaz yöntemi uygulandı. PCNA boyaması için Clone PC10, Dako belirleyicisi kullanıldı. Ki-67 için de Dako tercih edildi. PCNA için pozitif kontrol olarak yoğun lenfoid doku içeren tonsil preparatları, Ki-67 için ise bazal tabakasında nükleer pozitiflik gösteren epitel dokusu kullanıldı. Negatif kontrol olarak her iki immün boyama için aynı preparatlar primer negatif kontrol ajanı damlatılarak hazırlandı. Preparatların hazırlanmasında DAB kromojen kullanıldı.

P53 için Monoclonal Anti-Human P53 Protein Clone DO-7 hazır formülü kullanıldı. Pozitif kontrol preparatı olarak daha önceden pozitifliği saptanmış meme karsinomu preparatı seçildi. Negatif kontrol için primer antikora ait olan negatif kontrol solüsyonu tatbik edildi.

ERP pozitifliğini saptamak için antijen retrieval metodu ile mikrodalga fırın kullanılarak Dako Estrogen Receptor Clone 1D5 uygulandı.

Immünohistokimyasal olarak PCNA, Ki-67 ve P53 boyamasından sonra 1000 tümöral hücre içerisindeki pozitif ekspresyon gösteren hücrelerin sayısı belirlendi. Elde edilen sayılar 1000'e bölündü ve böylelikle her bir boyama için boyanma indeksleri saptandı.

AgNOR değerlerini belirlemek için 100 tümöral

hücre rasgele seçilerek gümüş ile pozitif boyanan küçük kumsu tanecikler halindeki NOR bölgeleri sayıldı. NOR bölgeleri sayılırken tüm beneklerin ayrı ayrı sayılmasına özen gösterildi (4). Elde edilen sayının 100'e bölümü ile her olgunun hücre başına düşen ortalama partikül sayıları belirlendi ve böylelikle AgNOR indeksleri elde edildi.

ERP değerlerini belirlemek için 1000 adet tümör hücresi seçildi. Seçilen hücreler boyanmayan, zayıf, orta ve kuvvetli boyanma gösteren hücreler olmak üzere ayrı ayrı toplandı. Toplanan hücrelerin 1000 hücre içerisindeki oranları belirlendi. Bu oranlar zayıf pozitif boyanmada 1 ile, orta pozitif boyanmada 2 ile ve kuvvetli pozitif boyanmada 3 ile çarpıldı. Boyanmayan hücreler dikkate alınmadan elde edilen sayılar toplanarak ERP indeksi belirlendi.

Her bir boyama özelliği için saptanılan sayıların toplanıp, olgu sayısı olan 25 e bölünmesi ile, o boyama özelliği için ortalama indeks elde edildi. Ayrıca standart sapmaları hesaplandı. Her bir olgunun boyanma özelliklerinin birbiri ile istatistiksel olarak karşılaştırılması için ise Spearman sıra korelasyonu kullanıldı.

## BULGULAR

Gümüş impregnasyon metodu ile boyanan NOR cisimcikleri küçük, kumsu, koyu tanecikler şeklinde görüldü. Ortalama AgNOR indeksini  $6.312 \pm 1,3$  partikül/hücre olarak belirlendi. P53, ERP, PCNA ve Ki-67 ile pozitif ekspresyon gösteren hücreler ise açık-koyu kahverengi olarak boyandı. Sadece östrojen reseptör proteini için yapılan immünohistokimyasal boyamada boyanma tonunu da dikkate alarak çalışıldı. Ortalama ekspresyon indekslerini P53 için  $0,394 \pm 0,2$ , ERP için  $134,041 \pm 99$ , PCNA için  $0,621 \pm 0,1$  ve Ki-67 için ise  $0,287 \pm 0,1$  olarak saptandı.

Boyanma özellikleri birbirleri ile karşılaştırılınca P53 indeksleri ile ERP indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişkinin varlığı belirlendi ( $r_s = -0,835$ ). Ayrıca P53 indeksleri ile AgNOR ( $r_s = 0,817$ ) ve Ki-67 indeksleri ( $r_s = 0,526$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi. AgNOR indeksleri ile tümör proliferasyon belirleyicileri olan Ki-67 ( $r_s = 0,767$ ) ve PCNA ( $r_s = 0,629$ )



arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin varlığı gözlenirken, ERP indeksleri ile proliferasyon belirleyicileri arasında da çeşitli anlamlılık düzeylerinde negatif ilişkilerin varlığı dikkatimizi çekti. Tüm bu boyama özelliklerinin Spearman sıra korelasyonu ile karşılaştırılması Tablo I'de topluca gösterilmektedir.

## TARTIŞMA

NOR cisimciklerinin tümörün proliferatif durumunun belirlenmesinde bir araç olduğundan söz edilmektedir. Kullanımının kolaylığı ile diğer proliferasyon belirleyicilerine göre daha ekonomik olması da tümöral olgularda prognostik özelliklerin belirlenmesinde AgNOR değerlerinin önemini artırmaktadır (5,6). AgNOR indeksinin meme karsinomlarında prognostik faktör olduğunun bir göstergesi de tümörün çapının artması, lenf nodu ve uzak metastazın varlığında, indeksin de artış göstermesi olmuştur. Meme karsinomu olgularında yapılan çalışmalardan birinde ortalama AgNOR indeksi  $6,61 \pm 1,75$  olarak verilmiştir (7). Bizim çalışmamızda da buna çok yakın olan bir değer ( $6,312 \pm 1,3$  partikül/hücre) saptanılmıştır. Tabiidir ki çalışmamızda daha fazla miktarda yüksek gradeli meme infiltratif duktal karsinom olgusu buldursaydık, bu değeri daha da yüksek bulacaktık. AgNOR indeksi diğer proliferasyon belirleyicileri olan PCNA ( $rs=0,629$ ) ve Ki-67 ( $rs=0,767$ ) indeksleri ile istatistiksel olarak kuvvetli ilişki göstermektedir. Bu bulgu da AgNOR indeksinin memenin infiltratif duktal karsinomlarında proliferatif durumunun belirlenmesinde yol gösterici olduğunun bir kanıtıdır. Ayrıca meme tümörleri dışındaki dokularda yapılan çalışmalarında da AgNOR değerlerin hücre kinetiğini ölçmek için kullanılan 3H-timidin otoradyografisi ile PCNA ve Ki-67 değerlerinin bir paralellik gösterdiği bildirilmektedir (8).

Meme karsinomlarında PCNA ve Ki-67 nin önemli prognostik faktörler olduğundan söz edilmektedir. Yüksek gradeli ve lenf nodu metastazı bulduran infiltratif duktal karsinom olgularında da AgNOR indeksi ile birlikte hücre proliferasyon belirleyicilerinin yükseldiği bildirilmektedir. Ayrıca meme karsinomu olgularında bu iki proliferasyon belirleyicisi arasında istatistiksel olarak önemli ilişkinin

varlığından da söz edilmektedir (9-11). Bizim çalışmamızda da PCNA ve Ki-67 indeksleri arasında, istatistiksel olarak kuvvetli bir ilişkinin varlığı belirlendi ( $rs=0,836$ ). Ayrıca Ki-67 ekspresyonunun PCNA ekspresyonundan daha düşük olduğu gözlemlendi. Ortalama PCNA indeksi  $0,621 \pm 0,1$  iken, ortalama Ki-67 indeksi  $0,287 \pm 0,1$  idi. Zaten memenin karsinomlarında Ki-67 nin PCNA dan daha düşük ekspresyon gösterdiği de diğer çalışmalarda sunulmaktadır (12).

Bir çok kanser türünde olduğu gibi memenin infiltratif duktal karsinomlarında da P53 gen anormallikleri kabul görmüş bir gerçektir. Wild tip protein çok küçük yarı ömrü olmasına karşın, immünohistokimyasal olarak gösterilebilmektedir. DNA hasarına bağlı olarak seviyesi artmaktadır. P53 ekspresyonu kötü prognoz ve differansiyasyonun azalması ile paralellik gösterir (13-15). Tümü ile infiltratif duktal karsinoma olgularını içeren çalışma grubumuzda ortalama P53 indeksini  $0,394 \pm 0,2$  olarak belirledik. Olguların P53 indeksleri AgNOR indeksi ve diğer proliferasyon belirleyicileri olan PCNA ve Ki-67 indeksleri ile karşılaştırıldığında AgNOR indeksi ile diğerlerinden istatistiksel olarak daha kuvvetli bir ilişki gösterdiği dikkat çekiciydi. Ki-67 ise PCNA dan istatistiksel olarak daha kuvvetli bir ilişki göstermekteydi (Tablo I). Bu farkın az sayıda olguyla çalışmamıza bağlı olduğunu sanıyoruz. Nitekim daha geniş serilerde P53 ile PCNA ve Ki-67 nin kuvvetli ilişkisi olduğundan söz edilmektedir. Herhangi birinin yüksek veya düşük olduğu durumlarda diğerlerinin de ona göre yüksek veya düşük seviyelerde seyrettiği bildirilmektedir (16,17).

Meme tümörlerinde hormon reseptörlerinin tetikinin yapılabilmesi ile hormonoterapi ve kemoterapiden daha iyi sonuçlar alınmaya başlandığı bildirilmektedir (18). ERP pozitifliği gösteren olgularda PCNA ve Ki-67 gibi proliferasyon belirleyicilerin indekslerinin düşük seyrettiği vurgulanmaktadır. (19-21). Tablo I'de de görülebileceği gibi ERP ile PCNA ve Ki-67 arasında negatif bir ilişkinin varlığı dikkati çekmektedir. Ayrıca çalışmamızda başka bir proliferasyon belirleyicisi olan AgNOR ile de istatistiksel olarak oldukça anlamlı ilişkinin varlığını belirledik ( $rs=-0,835$ ). ERP ile Ki-67 arasındaki negatif ilişki istatistiksel olarak an-



**Tablo 1:** Memenin infiltratif duktal karsinomlarında boyanma özelliklerinin Spearman sıra korelasyonu ile istatistiksel olarak karşılaştırılması.

PCNA				rs = 0.836
AgNOR		rs = 0.629		rs = 0.767
ERP	rs = 0.872		rs = 0.391	rs = 0.533
P53	rs = -0.835	rs = 0.817	rs = 0.490	rs = 0.526
	ERP	AgNOR	PCNA	Ki-67

lamli düzeyde olmasına karşılık (rs=-0,533), PCNA ile daha az anlamlılık taşımaktadır. ERP ile P53 arasında da negatif bir ilişki bildirilmektedir (17,22). Olgularımızda ERP ile P53 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak önemli, kuvvetli negatif ilişkinin varlığını literatür ile uyumlu olarak belirledik (rs=-0,835). Bütün bu sonuçlardan da anlaşılacağı üzere Yüksek oranlarda ERP pozitifliği gösteren olgularda daha iyi prognoz beklemekteyiz. Buna karşın yüksek proliferasyon indeksi gösteren dedifferansiye ve metastaz varlığı ile seyreden tümörlerde daha az miktarlarda ERP ekspresyonu beklemeliyiz.

## KAYNAKLAR

- 1) Sondik EJ. Breast cancer trends. Incidence, mortality and survival. Cancer 1994; 74: 995-9.
- 2) Lanberg G, Roos G. The cell cycle in breast cancer. APMIS 1997; 105(8): 575-89.
- 3) Biesterfeld S, Kluppel D, Koch R, Schneider S, Steinhagen G, Mihalcea AM, et al. Rapid and prognostically valid quantification of immunohistochemical reactions by immunohistochemistry of the most positive tumour focus. A prospective follow-up study on breast cancer using antibodies against MIB-1, PCNA, ER, and PR. 1998; 185(1): 25-31.
- 4) Crocker J, Boldy DA, Egan Mj. How should we count AgNORs? Proposals for a standardised approach. J Pathol 1998; 158(3): 185-8.
- 5) Bargiani L, Cogorno P, Oliviero J, Toso F, Gambini G, Tunesi G, et al. AgNORs in ductal breast cancer: correlation with ploidy and S-phase fraction by DNA flow cytometry. Eur J Histochem 1994; 38(2):171-6.
- 6-) Leek RD, Alison MR, Sarraf CE. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organiser regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. J Pathol 1991; 165(1):43-51.
- 7) Kumar A, Kushawa AK, Kumar M, Gupta S. Argrophilic nucleolar organiser regions; their value and correlation with clinical prognostic factors in breast carcinoma. J Surg Oncol 1997; 65(3):201-4.
- 8) Helpap B. Cell kinetic studies on prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and atypical adenomatous hyperplasia (AAH) of the prostate. Pathol Res Pract 1995; 191(9): 904-7
- 9) Carpin C, Bonnier P, Piana L, Kouzhami H, Devictor B, Lavanut MN, et al. Correlation of nucleolar organiser regions and nuclear morphometry assessed by automatic image analysis in breast cancer with aneuploidy. Ki-67 immunostaining, histopathologic grade and lymph node involvement. Pathol Res Pract 1992; 188(8):1009-17.
- 10) Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. Am J Clin Pathol 1995; 104(1): 42-9.
- 11) Leonardi E, Giraldo S, Serio G, Mauri FA, Perrone G, Scampini S, et al. PCNA and Ki-67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. J Clin Pathol 1992; 45(5):416-9.
- 12) Tuccari G, Rizzo A, Muscara M, Giuffre G, Barresi G. PCNA/cyclin expression in breast carcinomas: its relationships with Ki-67, ER, PgR immunostainings and clinico-pathologic aspects. Pathologica 1993; 85 (1095):47-55.
- 13) Barnes DM, Dubli EA, Fisher CJ, Levinson DA, Millis RR. Immunohistochemical detection of P53 protein in mammary carcinoma. An important new independent indicator of prognosis. Hum Pathol 1993; 24(5):469-76.

## SONUÇ

Memenin infiltratif duktal karsinomlarında prognozun belirlenilmesinde ve tedaviye yaklaşım amacı ile rutin pratikte kullanılan AgNOR, PCNA, Ki-67, P53 ve ERP indekslerinin istatistiksel olarak çeşitli anlamlılık düzeylerinde birbirleri ile uyumlu seyrettiğini belirledik.

- 14) Fisher CJ, Gillett CE, Vojtesek B, Barnes DM, Millis RR. Problems with P53 immunohistochemical staining: the effect of fixation and variation in the methods of evaluation. *Br J Cancer* 1994; 69:26-31.
- 15) Hurlimann J. Prognostic value of P53 protein expression in breast carcinomas. 1993; 189(9):996-1003.
- 16) Ioachim E, Kamina S, Athanassiadou S, Agnantis NJ. The prognostic significance of epidermal growth factor receptor (EGFR), c-erbB-2, Ki-67, PCNA expression in breast cancer. *Anticancer Res* 1996; 16(5):3141-7.
- 17) Lanzafame S, Emmanuele C, Torrisi A, Magro G. Correlated expression of BCL-2 protein, estrogen receptor, cathepsin D and low growth fraction (PCNA) in intracystic papillary breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 1998; 194(8):541-7.
- 18) Hawkins RA, Roberts MM, Forrest AMP. Oestrogen receptors and breast cancer. Current status. *Br J Surg* 1980; 67(3):162-5.
- 19) Aranda FI, Laforga JB. Cellular proliferation in breast ductal infiltrating carcinoma. Correlation with clinical and histopathological variables. *Pathol Res Pract* 1997; 193(10):683-8.
- 20) Omar WS, Eissa S, Moustafa H, Frag H, Ezzat I, Abdel-Dayem HM. Role of thallium-201 chloride and Tc-99m methoxyisobutyl-isonitrite (sesta MIBI) in evaluation of breast masses: correlation with the immunohistochemical characteristic parameters (K, 67, PCNA, Bcl, and angiogenesis) in malignant lesions. *Anticancer Res* 1997; 17(3):1639-44.
- 21) Pleosi G, Bresaola E, Rodella S, Manfrin E, Piubello Q, Schiavon I, et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 antigen, estrogen reseptor protein, and tumor suppressor P53 gene in cytologic samples of breast cancer: an immunochemical study with clinical, pathobiological, and histologic correlations. *Diagn Cytopathol* 1994; 11(2):131-40.
- 22) Moriki T, Takahashi T, Kataoka H, Hiroi M, Yamane T, Hara H. Proliferate marker MIB-1 correlates well with proliferative activity evaluated by BrdU in breast cancer: an immunohistochemical study including correlation with PCNA, P53, c-erbB-2 and estrogen receptor status. *Pathol Int* 1996; 46(12):953-61.