

ERKEN EVRE MEME KANSERİNDE İN VİTRO BROMODEOKSİRÜDİN İŞARETLEME İNDEKSİNİN (BRDU-İİ) STANDART PROGNOSTİK VE PREDİKTİF FAKTÖRLERLE KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Ersin Selçuk Ünal¹, Dr. Beyza Özçınar¹, Dr. Vahit Özmen¹, Dr. Ayhan Bilir², Dr. Abdullah İçci¹, Dr. Mahmut Müslümanoğlu¹, Dr. Mustafa Keçer¹, Mesut Parlak¹

¹Istanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi, İstanbul, Türkiye

²Istanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve embriyoloji, İstanbul, Türkiye

AMAÇ: Erken evre meme kanserinde lokal ve sistemik nüks oranlarının ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesi için değişik prognostik ve prediktif faktörler değerlendirilmiştir. Bu çalışmada amaç, Brdu-İİ'nin erken evre meme kanserinde prognostik değerini araştırmak ve bunu diğer klinik ve biyolojik olarak tespit edilmiş prognostik ve prediktif faktörlerle karşılaştırmaktır.

MATERYAL VE METOD: Bu çalışmada, erken evre meme kanseri tanısı konulan, tedavi ve takip edilebilen 81 meme kanserli hastada Brdu-İİ saptanarak, bunun diğer prognostik/prediktif faktörlerle karşılaştırması yapılmıştır.

BULGULAR: Hastalarda ortanca ve ortalama Brdu-İİ, %6,22 ve %5,18 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizde; lokal ($p=0,026$) ve sistemik nüks ($p=0,004$) saptanan hastalarda Brdu-İİ'nin anlamlı olarak yüksek olduğunu gösterilmiştir.

SONUÇ: Erken evre meme kanseri tanısı konulup, yüksek Brdu-İİ saptanan hastalarda lokal nüksün daha fazla olduğunu ve adjuvan tedavi seçiminde Brdu-İİ'nin prognostik bir faktör olarak kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

IN VITRO BROMODEOXYURIDINE LABELING INDEX : PROGNOSTIC ROLE IN EARLY STAGE BREAST CANCER

ABSTRACT

AIM: Various putative prognostic factors were studied in early breast cancer to evaluate local and systemic recurrence rates and make a decision for adjuvant treatments. In this study, the prognostic value of bromodeoxyuridine labeling index (Brdu LI) has been investigated in patients with early breast cancer and compared with other established clinical and biological factors.

PATIENTS AND METHODS: After a staging work-up, the Brdu LI has been prospectively analysed in primary tumor fragments obtained from 81 consecutive patients with early breast cancer.

RESULTS: The mean and median Brdu LI values for the whole group of patients were 6.22% and 5.18% (range: 0-27.33), respectively. Further analysis revealed that the Brdu LI rate was significantly higher in patients who had local recurrence ($p= 0.026$), or systemic metastases ($p= 0.004$).

CONCLUSION: Our results suggest that the Brdu LI might be used as a prognostic marker to identify of patients at higher risk of relapse and to select the most appropriate adjuvant treatment for an individual patient.

Meme kanseri tanısı, hasta ve hekim için birçok soruyu beraberinde getirmektedir. Hangi tedavilerin hangi birleşimle ve hangi sırayla uygulanacağı en önemli sorudur. Bunun belirlenmesi için, önce adjuvan tedavi uygulanmayan durumlarda hastalığın nüks ihtimali tespit edilmeli, adjuvan tedavi verilecek ise yararı, olası yan etkileri ile birlikte değerlendirilerek karar verilmelidir. Ancak, doğal seyri çok değişken olan meme kanserinde, nüks riskini hesaplayabilmek ve kötü seyirli hasta alt gruplarını belirlemek için biyolojik belirteçlere gereksinim vardır (1). Bromodeoksiüridin İşaretleme İndeksi (Bromodeoxyuridine Labeling Index= BLI, Brdu-İİ), erken evre meme kanserli hastalardan alınan tümör dokusunun in vitro bromodeoksiüridin ile işaretlenmesiyle elde edilen statik bir hücre kinetiği parametresidir.

Bu çalışmada amaç, Bromodeoksiüridin İşaretleme İndeksinin (Brdu-İİ) belirlenmesi, bunun standart prognostik ve prediktif fak-

törlerle olan ilişkisinin araştırılması, bağımsız bir prognostik ve/veya prediktif faktör olarak değerinin tespitidir.

Yöntem ve gereçler

Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Meme Hastalıkları Araştırma ve Tedavi Ünitesi'ne Mart 1999-Kasım 2002 tarihleri arasında başvuran 81 erken evre meme kanserli hasta çalışmamıza alınarak, immünohistokimyasal yöntemle Brdu-İİ bakıldı ve bu prognostik parametrenin diğer standart prognostik faktörlerle olan ilişkisi araştırıldı. Histopatolojik tanı için, ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB), tru-cut biyopsi veya ameliyat esnasında frozen kesiti tanısı kullanıldı. Cerrahi tedavi olarak, seçilmiş olgularda meme koruyucu cerrahi veya mastektomi yapıldı. Klinik olarak aksillası negatif olanlarda, mavi boya +/- radyoizotopla sentinel lenf nodülü biyopsisi (SLNB) yapıldı. SLNB sonucu pozitif olanlarda, level 1,2 aksiller disseksiyon eklendi. Östrojen(ER) ve progesteron (PR) reseptörleri, c-erb B2 değerleri

Tablo 1. Hasta Karakteristikleri

	n	%
Evre		
I	25	30.8
II	56	69.2
Menapoz durumu		
Premenapozal	23	28.4
Postmenapozal	58	71.6

Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında, Brdu-İl değerleri ise Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doku Kültürü Laboratuvarı'nda immünohistokimyasal yöntemlerle belirlendi.

Brdu-İl'nin belirlenmesi için ameliyatta çıkarılan tümörden alınan 8-10 mm³lük materyal bir saat içerisinde Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doku Kültürü Laboratuvarı'na iletildi. Preperatlar ışık mikroskopunda, immersiyon objektifi ile değerlendirildi. Bu değerlendirmede nükleusları bütün olarak görülen boyanmış ve boyanmamış tümör hücreleri dikkate alındı. Bu hücreler sayılarak kırmızı renkte boyananlar Brdu-İl pozitif olarak kabul edildiler. Kırmızı boyanmış hücre sayıları toplam tümör hücrelerine oranlanarak yüzdeleri hesaplandı. Elde edilen bu değer % Brdu-İl olarak verildi. Mikroskopik inceleme, 3000-5000 hücre sayılarak yapıldı. Nükleusları kırmızı boyanmayan hücreler Brdu-İl negatif olarak kabul edildi. Diğer bağ doku hücreleri değerlendirme dışı tutuldu. Preperatların tamamı aynı kişi tarafından değerlendirildi. Elde edilen veriler Windows-SPSS 10.0 programı kullanılarak analiz edildi. Hasta grupları arasında Brdu-İl açısından farklılıklar non-parametrik Mann-Whitney U Testi kullanılarak karşılaştırıldı. p<0,05 anlamlı, p<0,01 çok anlamlı olarak kabul edildi.

Patolojik değerlendirme sonrası hastalar, multidisipliner meme kanseri konseyine çıkarıldılar. Adjuvan tedavileri planlanarak başlandı. Tedavi sonrası düzenli olarak takip edildiler.

Bulgular

Bu çalışmada, erken evre (evre 1 ve 2) meme kanseri olan toplam 81 hastanın ortalama takip süresi 71 ay olarak saptandı. Ortalama Brdu-İl değeri %5.18 olarak bulundu. Hastanın yaşı, menopoz durumu, hormon replasman tedavisi (HRT) alıp almaması, histolojik tip, tümör çapı, nükleer ve histolojik grad, ER, PR ve c-erb B2 değerleri, uygulanan cerrahi tedavi, adjuvan tedavi alıp almaması, lenf nodülü tutulumu ve hastalığın evresi ile Brdu-İl değerleri karşılaştırıldı (Tablo 1, 2).

Olgularda ortalama yaş 55 olup, hastalar 35 yaş altı ve üstü olmak üzere iki gruba ayrıldı. Bu yaş grupları arasında, Brdu-İl değerleri bakımından fark saptanmadı (p=0,443).

Histopatolojik olarak; hastaların 62'sinde (%76.5) invazif duktal karsinom, 11'inde (%13.5) mikst tip kanser, ikisinde (%2.4) invazif

Tablo 2. Tümör Karakteristikleri

	n	%
Histoloji		
İnvaziv duktal	62	76.5
Mikst (duktal+lobüler)	11	13.5
İnvaziv lobüler	2	2.4
Medüller	2	2.4
Müsinöz	3	3.7
Tübüler	1	1.2
Östrojen reseptörü		
Pozitif	57	70.3
Negatif	24	29.7
Progesteron reseptörü		
Pozitif	39	48.2
Negatif	42	51.8
Histolojik Grad		
Grad I	10	12.0
Grad II	24	30.0
Grad III	47	58.0
Nükleer grad		
Grad I	12	14.8
Grad II	31	38.2
Grad III	38	47.0
Tümör çapı		
T1	29	35.8
T2	52	64.2
Lenf nodu durumu		
N0	50	61.7
N1	31	38.3

lobüler karsinom vardı. İnvazif duktal karsinom ve diğer kanserler arasında Brdu-İl değerleri açısından istatistiksel anlamlılık saptanmadı (p=0,664).

Hastalar tümör çaplarına göre T1 ve T2 olarak gruplandırıldı. Tümör çapı, 33 hastada (%40.7) 2 cm'nin altında (T1), 48 hastada (%59.3) 2 cm'nin üstünde (T2) idi. T1 ve T2 olan hasta grupları arasında Brdu-İl değeri açısından istatistiksel anlamlı fark görülmedi (p=0,072).

Aksilla, 55 hastada (%68) pozitif, 26 hastada ise negatifti. Bu iki grup arasında Brdu-İl değerleri açısından anlamlı fark bulunamadı (p=0,279). Aksillası histopatolojik olarak pozitif ve kapsül invazyonu olan (31 hasta), kapsül dışı yayılım olan (27 hasta) ve lenfovasküler invazyonu pozitif olanlarda (21 hasta) Brdu-İl değerleri anlamlı olarak yüksek bulunamadı (p değerleri sırası ile 0,677 ; 0,930 ; 0,325).

Tablo 3. Brdu-İl'nin Altgrup Analizleri (S- Anlamlı; NS-Anlamsız)

	n	Ortanca BrdU LI (%)	p-değeri
Nükleer Grad			
Grad I + II	43	4.62	S
Grad III	38	8.04	0.007
Östrojen reseptörü			
Pozitif	57	5.13	S
Negatif	24	8.82	0.012
Evre			
I	22	5.77	NS
II	59	5.05	0,068
Tümör çapı			
T1	33	5.40	NS
T2	48	5.30	0,072
Lenf nodu durumu			
N0	55	5.47	NS
N1	26	4.64	0,279
Adjuvan Tedavi			
Kemoterapi (+)	51	7.11	S
Kemoterapi (-)	30	4.72	0.043
Tümör yeri			
Üst dış kadrın	49	5.39	NS
Diğer	32	7.50	0.061

Nükleer grad(NG); 12 hastada(%15) 1, 31 hastada (%38) 2, 38 hastada (%47) ise 3 olarak bulundu. Olgular NG1+2 ve NG3 olarak iki gruba ayrıldı. NG3 olan grupta Brdu-İl değeri ortalama %8,04 olarak bulundu ve bu değerler NG1+2 olan grubun Brdu-İl değerinden yüksekti (%4.62). İstatistiksel olarak bu yükseklik anlamlı olarak saptandı (p=0,007). Histolojik grad (HG); 10 hastada(%12) 1, 24 hastada(%30,0) 2, 47 hastada(%58,0) 3'tü. HG1+2 ve HG3 grupları arasında Brdu-İl değerleri açısından fark yoktu (p=0,743).

Östrojen reseptörü (ER) pozitif olan 57 (%70,3) hastada Brdu-İl değeri (%5,13), ER (-) olan 24 hastadaki Brdu-İl değerinden (%8,82) anlamlı olarak daha düşüktü(p=0,012). Hastaların %48'inde progesteron reseptörü pozitif bulunmuş olup, progesteron reseptörü pozitif ve negatif olan hastalar arasında proliferatif indeks ortalama değerleri bakımından fark bulunmadı (p=0.765).

C-erb B2 (+) olan hasta grubunda, c-erb B2 (-) olan gruba göre Brdu-İl değerleri anlamlı olarak yüksek saptandı (p<0,001).

Çalışmamızdaki 36 hastaya (%44,4) modifiye radikal mastektomi (MRM), 45 hastaya (%55,6) ise meme koruyucu cerrahi (MKC) ameliyatı yapıldı. Bu iki grup arasında, Brdu-İl değerleri açısından anlamlı fark saptanmadı (p=0,297).

Hastaları kemoterapi alan (51 hasta) ve kemoterapi almayan (30 hasta) olmak üzere iki gruba ayırdığımızda, Brdu-İl değerleri kemoterapi alan grupta kemoterapi almayan gruba göre anlamlı olarak daha düşüktü.

Tartışma

Meme kanserinde uygulanacak olan tedavinin belirlenmesinde ve başarısında prognostik ve prediktif faktörlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu amaçla pek çok biyolojik faktör araştırılmış, ancak hormonal reseptörler ve yakın zamanda kullanılan cerb-B2 dışında rutin kullanıma girememişlerdir. Yeni biyolojik faktörlerin belirlenmesi ve uygulanması yapılacak olan araştırmalarla mümkün olabilecektir (2,3).

Meme kanserinde DNA sentez (S) fazındaki hücrelerin oranı güçlü bir prognostik belirteçtir. Özellikle aksillası negatif olan hastalarda tedavi kararını vermek için tümör proliferasyonu hızının ölçülmesine gereksinim vardır. S-fazı fraksiyonu (SFF) tespitinde kullanılan yöntemler otoradyografik olarak Timidin işaretleme indeksi (Tİİ), Brdu-İl ve flow sitometridir. In vitro olarak Tİİ ve Brdu-İl tespitinin birbirine benzer sonuçlar verdiği klinik ve deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak Brdu-İl tespiti, Tİİ'den daha basit, daha güvenilir ve daha hızlı olarak yapılabilir (4,5).

İmmünohistokimyasal yöntem ile materyallerin arşivlenip yeniden değerlendirilebilmesi diğer yöntemlerde olmayan bir avantajdır. Ancak incelemenin taze doku ve sayma işlemi için uzman eleman gerektirmesi bu yöntemin dezavantajlarıdır. Waldman ve arkadaşlarının(4) yapmış oldukları 33 hasta içeren bir seride, iki yöntem arasında birbirine benzer ve etkin sonuçlar elde edilmiştir (4).

Primer meme kanserli hastada yaş ve menapoz durumunun prognoza etkisi tartışmalıdır. Genç hastalarda meme kanserinin seyrini inceleyen Albain ve Arkadaşları(6), 30-35 yaş arasındaki kadınlarda; lenf nodülü tutulumu, tümör büyüklüğü, hormon reseptör negatifliği, S-fazı fraksiyonu ve p53 değerlerinde artış saptamışlardır (6). Bu çalışmada genç yaşın nüks ve ölüm açısından kötü prognostik anlam taşıdığı gösterilmiştir. Meyer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (7), 70 yaş ve üzeri hastaların daha düşük SFF indeksine sahip olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise, yaş ile ortalama Brdu-İl değerleri arasında anlamlı istatistiksel bir ilişki saptanmamıştır.

Meme kanseri genellikle postmenapozal dönemde görülmektedir (6). Gentili ve arkadaşları (8), premenapozal hastalarda Brdu-İl'nin daha yüksek ve daha kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir. Rew ve arkadaşlarının (9) çalışmasında ise, bu ilişki gösterilememiştir. Biz de çalışmamızda menapoz durumu ile Brdu-İl arasında ilişki saptamadık.

Literatürde tümörün histolojik tipi ile SFF indeksi arasındaki ilişkiyi inceleyen az sayıda çalışma vardır. İnvazif lobüler karsinomda düşük SFF indeksi, medüller karsinomda ise yüksek SFF indeksi saptanmıştır (10). Tümör çapı ile SFF indeksi arasında ilişki olmadığını

gösteren çalışmalar olduğu gibi tümör çapı arttıkça SFF indeksinin arttığını gösteren çalışmalarda mevcuttur (11,12). Çalışmamızda tümör çapı ve histolojik tip ile Brdu-İİ ilişkili bulunmamıştır.

Winters ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (13), nükleer grad(NG) yüksekliği ile SFF arasında anlamlı bir ilişki görülemedi (13). Meyer'in çalışmasında ise (7), NG ile SFF indeksi arasında güçlü bir pozitif ilişki saptanmıştır. Çalışmamızda, Meyer'in bulgularına paralel olarak NG3 olan hasta grubunda Brdu-İİ, NG1+2 olan gruptan daha yüksek ve anlamlı olarak bulundu.

Winters ve arkadaşlarının çalışmasında (13), ER (-) olgularda Brdu-İİ anlamlı olarak yüksek bulunmuş, adjuvan tedavi de daha fazla uygulanmıştır. Brdu-İİ değeri yüksek olan hastalarda, sistemik yayılım riskinin daha fazla olduğu ve kemoterapiye daha iyi yanıt alındığı bildirilmektedir (14,15). Bizim çalışmamızda kemoterapi alan hasta grubunda, kemoterapi verilen hastalarda Brdu-İİ istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir.

Tommasi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (16), c-erb B2 pozitifliği ile proliferatif aktivite artışı arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Kallioniemi ve arkadaşlarının (17) belirttiği gibi, c-erb B2 pozitifliği ile sıklıkla aksiller lenf nodülü pozitif ve yüksek gradlı hastalarda karşılaşılmaktadır. Yüksek tümör proliferasyon hızı ve DNA anaploidisi ile artmış c-erb B2 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki mevcuttur (17). Bu bulguların tersine Stanton ve arkadaşları(18), c-erb B2 düzeyi ile SFF indeksi arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda, c-erb B2 (+) olan hasta grubunda,

c-erb B2 (-) olan gruba göre Brdu-İİ değerleri anlamlı olarak yüksek saptandı.

1990 yılındaki National Institutes of Health (NIH) Konsensus Konferansından beri meme kanseri ile ilgili prognostik faktör arayışları aksillası negatif olan hastalar üzerinde yoğunlaşmıştır (19). Amaç, bu hastalar içerisinde daha kötü prognozu olan %25'lik hasta grubunun belirlenmesidir. Bu grup, aynı zamanda kemoterapiden gerçek anlamda fayda görecektir hastaları içermektedir (20). Nükleer grad ve proliferatif indeks tayini bu amaçla önerilmiştir (21). Proliferatif indeks olan Brdu-İİ, bu grubun tayininde büyük bir rol oynamaktadır. SFF, aynı zamanda aksillanın tutulumuna bakılmaksızın sağkalm belirleyicisidir (22).

Meme kanserinde SFF ölçümleri (SFF indeksi veya DNA flow sitometri), prognostik önem taşır ve hastalığın evresinden bağımsızdır (7). Meme kanserli hastaların takiplerinin ilk beş yılı içinde, hızlı proliferasyon gösteren tümörlerin nüks ve ölüm oranları yüksektir (7,23). Bunun aksine, SFF'nin meme kanserli hastada hiçbir prognostik değeri olmadığını ileri süren yayınlar da vardır (24-26). Çalışmamızda, evre 1 ve 2 hasta grupları arasında Brdu-İİ açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Sonuç olarak, çalışmamızda yaş, menapoz durumu, hastanın HRT alması, histopatolojik tipi, tümör çapı, HG, PR, uygulanan cerrahi tedavi, lenf nodu durumu ve evre ile Brdu-İİ arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Belirlenmiş diğer kriterlere göre NG, ER, kemoterapi almış hastalar ile c-erb B2 pozitif olan hastalarda Brdu-İİ anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

Kaynaklar

1. Ünal M. Meme Hastalıklarına giriş ve tarihçe. Genel Cerrahi Cilt-1, Nobel Tıp Kitabevleri. 2002; 41:533-536.
2. Merkel DE, McGuire WL. Ploidy, proliferative activity and prognosis. Cancer 1990; 65:1194-1205.
3. Clark GM. Prognostic factors: Is there a real progress? In: The Secvond European Congress on Senology Congress Book, 1994; 77-82.
4. Waldman FM, Chew K, Ljung BM, Goodson W, Hom J, Duarte LA, Smith HS, Mayall B. A comparison between bromodeoxyuridine and H³ thymidine labeling in human breast tumors. Modern Patol 1991; 4:718-722.
5. Bilir A, Ozmen V, Kecir M, Eralp Y, Cabioglu N, Ahishali B, Camlica H, Aydinler A. Thymidine labeling index: prognostic role in breast cancer. Am J Clin Oncol. 2004; 27:400-6.
6. Spratt JS, Donegan WL, Sigdestad CP. Epidemiology and etiology. In Donegan WL, Spratt JS (eds). Cancer of the Breast. Philadelphia, WB Saunders Co, 1995; 356-377.
7. Meyers JS, Province MA. S-phase fraction and nuclear size in long term prognosis of patients with breast cancer. Cancer 1994; 74:2287-2289.
8. Gentili C, Sanfilippo O, Silvestrini R. Cell proliferation and its relation to clinical features and relapse in breast cancer. Cancer 1981; 48:974-979.
9. Rew DA, Campbell ID, Taylor I, Wilson GD. Proliferation indices of invasive breast carcinomas after in vivo 5-bromo-2-deoxyuridine labeling: a flow cytometric study of 75 tumors. Br J Surg 1992; 79:335-339.
10. Berg JW, Robbins GF. Factors influencing short and long term survival of breast cancer patients. Surg Gynecol Obstet 1996; 122:1311-1316.

11. Spyrtos F, Martin PM, Hacene K, Romain S, Andrieu C, Ferrero-Paus M, Deytieu S, Le Doussal V, Tubiana- Hulini M, Brunet M. Multiparametric prognostic evaluation of biological factors in primary breast cancer. J Natl Cancer Inst 1992; 84:1266-1272.
12. Beerman H, Kluin M, Hermans J, van de Velde CJH, Cornelisse CJ. Prognostic significance of DNA ploidy in a series of 690 primary breast cancer patients. Int J Cancer 1990; 45:34-39.
13. Winters Z, Mohube P, Gray C, Wright C, Teare J, Lange M, Manell A, Myburgh JA. Tumors kinetics in breast cancer. South African Journal of Surgery 1994; 32:135-140.
14. Bonetti A, Zaninelli M, Rodella S, Molino A, Sperotto L, Piubello O, Bonetti F, Nortilli R, turazza M, Cetto GL. Tumor proliferative activity and response to first line chemotherapy in advanced breast carcinoma. Breast Cancer Research and Treatment 1996; 38:289-297.
15. MacGrogan G, Mauriac L, Durand M, Bonichon F, Trojani M, de Mascarel I, Coindre JM. Primary chemotherapy in invasive breast carcinoma: Predictive value of the immunohistochemical detection of hormonal receptors, p53, c-erb B2, MIB, pS2 and GST. Br J Cancer 1996; 74:1458-1465.
16. Tomassi S, Paradiso A, Mangia A, Barletta A, Simone G, Slamon DJ, DeLena M. Biological correlation between HER2/neu and proliferative activity in human breast cancer. Anticancer Research 1991; 11:1395-1400.

İletişim

Vahit Özmen
E-posta : vozmen@istanbul.edu.tr