

MEME KANSERİNDE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK CATHEPSİN-D EKSPRESYONU: DİĞER PROGNOSTİK FAKTÖRLERLE VE SAĞKALIMLA İLİŞKİSİ

Immunohistochemical cathepsin-d expression in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and survival

Özlem CANÖZ¹, Serdar SOYUER², Hülya AKGÜN³, Kemal DENİZ³, Metin ÖZKAN⁴,
Can KÜÇÜK⁵, Figen ÖZTÜRK⁶

Özet

Amaç: Meme kanseri kadın popülasyonunda önemi günden güne artan hastalık ve ölüm nedenidir. Son yıllarda Cathepsin-D (CD) gibi çeşitli prognostik belirleyiciler önem kazanmıştır.

Gereç ve yöntem: CD protein immunreaktivitesi 64 meme kanserli hastada immünohistokimyasal olarak belirlendi.

Bulgular: CD ekspresyonu vakaların %68.7'sinde izlendi, %45.3'ünde ise immünreaksiyon şiddetli idi. CD ekspresyonu ile tümör evresi ($p=0.01$) ve c-erbB-2 immünreaktivitesi ($p=0.017$) arasında anlamlı ilişki elde edildi. Ortalama 33 ay izlem sonrası CD ekspresyonu ile hastalısız sağ kalım arasında anlamlı ilişki elde edildi ($p=0.011$). Genel sağ kalım süresi ile CD ekspresyonu anlamlı bir ilişki göstermedi.

Sonuç: CD ekspresyonunun nüks ve metastatik potansiyel ile yakından ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca kuvvetli immünreaksiyon gösteren tümörlerin komşu in-situ duktal karsinom sahalarında da immünreaksiyon olması, meme karsinomlarında CD ekspresyonunun preinvaziv dönemde kazanılmış olabileceğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Cathepsin D; İmmünhistokimya; Meme karsinomu; Prognoz

Meme kanseri; kadınlarda en sık görülen ve ikinci sırada ölüme yol açan kanserdir. Meme kanserlerinde çok sayıda biyolojik parametre çalışılmıştır ve bu çalışmalar, gelişiminde çok

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi 38039 KAYSERİ
Patoloji. Y.Doç.Dr.¹, Öğr.Gör.Dr.³, Prof.Dr.⁶.
Radyasyon Onkolojisi. Y.Doç.Dr.².
Medikal Onkoloji. Uzm.Dr.⁴.
Genel Cerrahi. Y.Doç.Dr.⁵.

Geliş tarihi: 14 Nisan 2004

Abstract

Purpose: Breast cancer is an increasingly important cause of illness and death among women. In recent years, several prognostic determinants of breast cancer have been identified, including Cathepsin-D (CD).

Material and methods: CD protein expression was analysed immunohistochemically in tumor specimens of 64 breast cancer patients.

Results: CD expression was determined in 68.7% of the cases, and immunoreaction was strong in 45.3% of the cases. There was a significant correlation between stage ($p=0.01$) and c-erbB-2 immunoreactivity ($p=0.017$). After a median follow up of 33 months, CD positivity showed significant correlation with disease free survival ($p=0.011$) but not with overall survival.

Conclusions: CD expression is related to recurrence and metastatic potential of breast cancer. In addition, CD expression may be acquired in the preinvasive stage of the carcinoma, since there was CD immunoreactivity in adjacent in-situ ductal carcinoma areas of strongly immunoreactive invasive carcinomas.

Key Words: Breast, neoplazm; Cathepsin D; Immunohistochemistry; Prognosis

çeşitli biyolojik olayın rol oynadığını göstermiştir. Bunlar arasında Cathepsin-D (CD) en popüler olanlardan biridir. İlk defa 1980'de tanımlanmış proteolitik bir enzim olup, kanser hücreleri ve stromal hücreler tarafından salgınır (1). Stromanın sindirilmesi ve bazal membranın yıkılmasına katkıda bulunur. Bu özellikleri sayesinde tümör hücreleri göç ve invazyon yeteneğini artırır ve daha sonra metastaz geliştirirler (2). CD proteininin aynı zamanda mitojenik rolü olduğu bulunmuştur (3).

Daha önce yapılan çalışmaların çoğunluğunda CD

yüksek ekspresyonunun hastalısız sağkalım ve genel sağ kalım süresinde kısalma ile ilişkili olduğu bulunmuştur (1, 4). Bir diğer çalışmada ise östrojen reseptörü (ÖR) pozitif veya lenf nodu tutulumu olan hastalarda CD overekspresyonunun, uzun sağ kalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (5).

Bu şekilde çelişkili sonuçlar olması nedeniyle, bu çalışmada, bizim toplumumuzdaki meme kanserli hastalarda CD overekspresyonunun bilinen prognostik faktörlerle ve c-erb-B2 ile ilişkisini ve dolayısıyla prognostik değerini belirlemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 1998-2001 yılları arasında tedavi olan 64 meme kanseri olgusu çalışmaya alındı. Hastalar küratif cerrahi tedavi uygulanan hastalardı. Hastaların % 87.6'sına modifiye radikal mastektomi uygulanmıştı. Endikasyonu konulan hastalara postoperatif radyoterapi ve östrojen reseptörü pozitif veya bilinmeyen hastalara hormonoterapi uygulandı. Hastaların %46.9'u adjuvan radyoterapi, %87.5'si adjuvan kemoterapi almıştı. Bunlardan %42.8'i CMF (Siklofosamid, Metotreksat, Fluorourasil), %21.4'ü ise antrasiklin içeren rejimlerle adjuvan tedavi almışlardı. Sekiz hastanın ise adjuvan kemoterapi aldıkları bilinmesine rağmen kemoterapi protokolü net olarak ortaya konulamadı.

Yaş, grade, tümör tipi, lenf nodu durumu, tümör büyüklüğü, damar ve lenfatik invazyonu gibi morfolojik değişkenler kaydedildi. Menapoz durumu, parite, uzak metastaz, tedavi protokolü ve sağ kalım durumu gibi diğer değişkenler hasta dosyalarından elde edildi. Doku tespit ve takip işlemleri rutin metodlarla yapıldı ve daha sonra dokulara parafine gömme işlemi uygulandı. İmmünohistokimya için hematoksilen-eosin ile değerlendirmeye alınan aynı bloklar kullanıldı. Bloklardan hazırlanan 5µm kalınlığında kesitler polilizin-L ile kaplı lamlara alındı. Kesitler etüv içinde 60 °C'de 1 saat bekletildi. Üç defa 10'ar dakikalık ksilol ile deparafinize edildi. Her biri 3

defa olmak üzere önce 10 dakika absolü alkolde sonrada 5 dakika %96'lık alkolde bekletildi. Çeşme suyu ile 5 dakika ve tamponlanmış yıkama solusyonunda ile 5 dakika yıkandıktan sonra bir damla bloke edici solüsyon damlatıldı ve 5 dakika beklenildi. On dakika mikrodalga cihazında retrieval solusyon içinde (dilüe sitrat buffer 1/10) %50 güç seviyesinde bekletildi. Daha sonra tavşan poliklonal Anti-CD (Dako-Denmark) ve Anti-c-erbB-2 (Dako-Denmark) primer antikoru damlatıldı ve 30 dakika beklenildi. Yıkama solusyonunda 5 dakika yıkandı ve 2-3 damla polikolonal tavşan serumu damlatılarak 30 dakika beklendi. Yıkama solusyonunda 5 dakika bekletildikten sonra 2-3 damla streptoavidin enzimi damlatıldı ve 30 dakika beklendi. Tekrar 5 dakika yıkama solusyonu ile yıkandı. AEC kromojeni damlatılarak 15-20 dakika beklendi. Çeşme suyu ile yıkandıktan sonra Mayer hematoksilen içinde bir dakika tutularak zıt boyanma sağlandı. Menekşe rengi oluşana kadar çeşme suyu ile, daha sonra distile su ile yıkandı. İşlemin son aşamasında lamlar gliserin jel ile kaplandı.

Tüm preperatlarda CD pozitif hücreler semi kantitatif olarak hafif, orta ve şiddetli olarak derecelendirildi. Derecelendirilme işleminde CD pozitif tümör hücrelerinin yüzdesi (%0-10:1, %10-50:2, >%50:3) ve reaksiyonun yoğunluğu (negatif:0, +:1, ++:2, +++:3) birlikte değerlendirildi. Her ikisinden toplam puanı 0-1 olan negatif, 2 olan zayıf, 3-4 olan orta, 5-6 olan şiddetli immünreaktif olarak skorlandı.

C-erbB-2 için hazırlanan preperatlar ışık mikroskopisinde hücrenin membran boyanma özelliklerine göre değerlendirildi. Sonuçlar; negatif ve 1+ skorlar negatif, diğerleri 2+ ve 3+ olarak raporlandı.

İstatistiksel analizler "SPSS" yazılımı kullanılarak yapıldı. Yaşın, gruplar arası karşılaştırılması nonparametrik testlerden Mann-Whitney U testi ile, menopoz durumu, histopatoloji, aksiller lenf nodu tutulumu, evre ve östrojen reseptör pozitifliği Ki-kare testi ile karşılaştırıldı. Tanıdan ilk nükse kadar geçen süre hastalısız yaşam süresi ve ölüme kadar

geçen süre genel yaşam süresi olarak kabul edildi. Sağkalım süreleri ve oranları Kaplan-Meier testi ile hesaplandı ve Log rank testi ile karşılaştırıldı. İstatistiksel sonuçlarda, p değeri 0.05 ve küçük olanlar anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Hasta Özellikleri

Hastaların ortalama yaşı 48 yıl ve sınırları 24 ile 76 arasında değişmekteydi. Otuzbeş yaş altı 10 (% 15) hasta vardı. Hastaların %51.4'ü postmenapozaldı. Vakaların %92'si invaziv duktal karsinom morfolojisine sahipti, % 5 vaka invaziv lobüler karsinom tanısı almıştı. Vakaların %2'sinde ise diğer morfolojik tipler söz konusu idi. Tümör büyüklüğüne göre vakalar üçe ayrıldı; <2 cm (n=8), 2-5 cm (n=30), >5 cm (n=12). Vakaların % 21,9'unda tümör büyüklükleri, çeşitli nedenlerden dolayı (eksizyonel biyopsilerinin başka bir merkezde yapılması gibi) bilinmiyordu. Vakaların %71.4'ünde lenf nodu metastazı vardı ve %48.9'u ileri evredeydi. Reseptör pozitifliği vakaların % 70.4'ünde tespit edildi. Hastaların özellikleri Tablo1 'de verildi.

İmmünohistokimyasal Özellikler

Vakaların %70.3'ünde c-erbB-2 boyaması uygulanabildi, bunlardan %37.8'inde c-erbB-2 ile kuvvetli immünreaksiyon elde edildi.

Tümör hücrelerinde CD ekspresyonu vakaların % 68.7'sinde izlendi. Bunlardan %45.3'ünde immünreaksiyon şiddetli idi. Vakaların %71.3'ünde stromal hücrelerde de CD ile immünreaksiyon izlendi. Vakaların % 32.8' inde tümöre eşlik eden in-situ duktal karsinom sahaları vardı. CD ekspresyonu gösteren ve birlikte in-situ duktal karsinom alanlarının bulunduğu vakaların % 80.5'inde bu alanlarda da pozitif reaksiyon görüldü. Oysa CD ekspresyonu göstermeyen vakalarda, in-situ duktal karsinom sahalarında ekspresyon izlenmedi.

CD ekspresyonu ile tümör evresi (p=0.01) ve c-erbB-2 immünreaktivitesi (p=0.017) arasında anlamlı ilişki elde edildi. CD ekspresyonu ile histopatolojik özellikler arasındaki ilişki Tablo 2 de verildi.

Sağ Kalım Analizi

Ortalama olarak 33 ay takip (6 ay ile 71 ay arası) sonrası meme kanserli hastalarda genel sağ kalım oranı % 56, hastalısız sağ kalım oranı %44 olarak bulunmuştur.

CD ekspresyonu ile genel yaşam süresi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamakla birlikte (p=0.368), hastalısız sağ kalım ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu (p=0.011) (Tablo 3).

Tablo I. Hasta özellikleri

Özellikler	<i>n</i>	%
Hasta sayısı	64	100
Yaş (ortanca ve sınırlar)	48 (24-76)	
Menapoz		
<i>Premenapoz</i>	31	48.4
<i>Postmenapoz</i>	33	51.6
Meme yerleşimi		
<i>Sağ</i>	40	62.5
<i>Sol</i>	24	37.5
Histopatoloji		
<i>İDC</i>	59	92.2
<i>İLC</i>	3	4.7
<i>Diğerleri</i>	2	3.1
Lenf nodu tutulumu		
<i>Bilinen</i>	49	76.6
0	14	28.6
1-3	13	26.5
4-9	9	18.4
>10	13	26.5
<i>Bilinmeyen</i>	15	23.4
Evre		
<i>Bilinen</i>	47	73.4
<i>Evre 1</i>	1	2.1
<i>Evre 2A</i>	12	25.5
<i>Evre 2B</i>	11	23.4
<i>Evre 3A</i>	23	48.9
<i>Bilinmeyen</i>	17	26.6
Östrojen ve/veya progesteron reseptörü		
<i>Bilinen</i>	54	84.4
<i>Pozitif</i>	38	70.4
<i>Negatif</i>	16	29.6
<i>Bilinmeyen</i>	10	15.6
c-erbB-2		
<i>Bilinen</i>	45	70.3
<i>Kuvvetli Pozitif</i>	17	37.8
<i>Zayıf Pozitif</i>	16	35.5
<i>Negatif</i>	12	26.7
<i>Bilinmeyen</i>	19	29.7

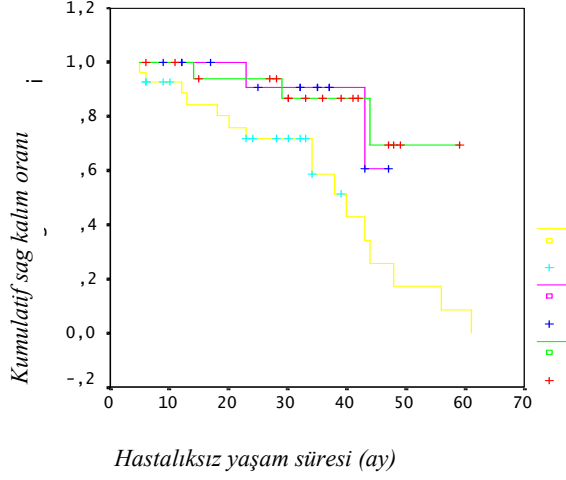
Meme kanserinde immünohistokimyasal olarak cathepsin-D ekspresyonu: Diğer prognostik faktörlerle ve sağkalımla ilişkisi

Tablo II. CD ekspresyonu ve histolojik özellikler

Histopatolojik parametreler	Hasta sayısı	CD immünreaktivitesi		P değeri
		Negatif	Pozitif	
Grade:				
<i>I</i>	19	7	12	0.086
<i>II</i>	32	10	22	
<i>III</i>	13	3	10	
Tümör büyüklüğü:				
<2 cm	8	2	6	0.753
2-5 cm	30	8	22	
>5 cm	13	6	7	
Lenf nodu:				
<i>Negatif</i>	13	4	9	0.512
<i>Pozitif</i>	40	14	26	
Reseptör durumu				
<i>ÖR/PgR-negatif</i>	15	3	12	0.332
<i>ÖR/PgR-pozitif</i>	38	15	23	
Evre				
<i>Evre 1-2</i>	24	6	17	0.001
<i>Evre 3-4</i>	23	10	13	
c-erbB-2				
<i>Negatif</i>		6	6	0.017
<i>Zayıf pozitif</i>		5	11	
<i>Kuvvetli pozitif</i>		1	16	

Tablo III. CD Ekspresyonuna Göre Ortalama Hastalısız Yaşam Süreleri

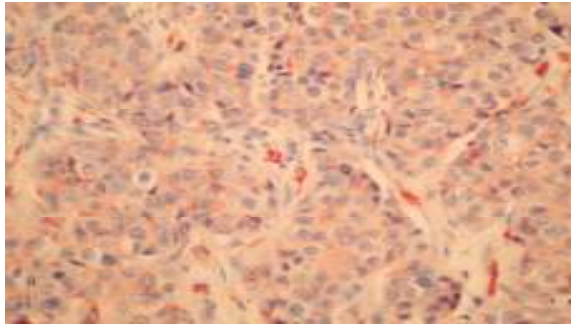
CD	Olgu sayısı	Ortalama HYS	p
<i>Negatif</i>	19	51.57±3.76	<0.011
<i>Pozitif</i>	15	43.61±2.20	



Şekil 1. Hastaliksız yaşam süresi ile CD negatif ve pozitif hastalar arasındaki anlamlı ilişki görülüyor.



Resim 1. İnvaziv duktal karsinomda granüler CD ekspresyonu (X400, İmmunoperoksidaz)



Resim 2. Tümör hücreleri yanında stromal hücrelerde de CD ekspresyonu izleniyor (X400, İmmunoperoksidaz)

TARTIŞMA

CD, bazal membranlar ile reaksiyona girebilen ve meme karsinogenezinde ve metastaz potansiyelinde rol alabilen lizozomal bir proteindir (6). Aynı zamanda CD, plazminojen aktivatör sistem ile birlikte ekstrasellüler matriksin sindirilmesinde de önemli role sahiptir (7). Bu biyolojik özellikleri nedeniyle CD'nin meme kanserinin prognozunu belirlemede önem taşıması muhtemeldir.

Literatürdeki çalışmalardan bazılarında CD seviyesi enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (8) yöntemi ile, bazılarında Western-Blot yöntemi ile (9) bazılarında ise immünohistokimya ile (2) belirlenmiştir. İmmünohistokimyasal çalışmaların, özellikle son yıllarda sıklığı artan küçük tümörlerde ve daha fazla vakanın araştırılabileceği immünohistokimyasal çalışmalarda üstünlüğü vardır. Ayrıca CD ekspresyonunun stromal hücrelerde mi, tümör hücrelerinde mi yoksa in-situ alanlarda mı olduğu gibi, lokalizasyonu immünohistokimya ile net bir şekilde belirlenebilmektedir.

Mevcut çalışmada CD ekspresyonu immünohistokimya ile belirlendi. Tümör hücrelerinin yanında stromal hücrelerde ve makrofajlarda da pozitiflik bulunması literatür ile uyumlu idi. Ayrıca, kuvvetli immünreaksiyon gösteren tümörlerin komşu in-situ duktal karsinom sahalarında kuvvetli immünreaksiyon olması, meme karsinomlarında CD ekspresyonunun preinvaziv dönemde kazanılmış olabileceğini desteklemektedir. İn-situ duktal karsinomlarda CD ekspresyonunu değerlendiren az sayıdaki çalışmalardan birinde, yüksek dereceli in-situ karsinomlarda artmış CD ekspresyonunun azalan ÖR-alfa ile birlikte olduğu, ve ÖR-alfa negatif meme kanserlerinin direkt yüksek dereceli in-situ duktal karsinomlardan gelişebileceği öne sürülmüştür (10).

Literatürdeki CD ile ilgili çalışmalar, 4000'den fazla meme kanseri hastasını kapsamakta olup, bu çalışmaların çoğunda artmış CD seviyesi azalan

sağ kalım süresi ile ilişkili bulunmuştur. Losch ve arkadaşları, tümör hücrelerinde CD ekspresyonunun, evre, nükleer derece, genel yaşam süresi ve hastaliksız yaşam süresi ile ilişkili olduğunu bulmuştur. Yine Westley ve arkadaşları (1) immünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde CD ekspresyonunun univaryete testlerde kötü sağ kalım ile ilişkili olduğunu, oysa Henry ve arkadaşları (5) immunhistokimya ile belirledikleri CD ekspresyonunun iyi prognoz ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Aziz ve arkadaşlarının çalışmasında ise CD ekspresyonu ile sağ kalım arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (11). Bizim çalışmamızda CD ekspresyonu ile hastaliksız sağ kalım arasında univaryete testlerde anlamlı bir ilişki bulunmuş, ancak genel sağ kalım ile anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bunun yanında kötü prognozla ilişkili bir diğer molekül c-erbB-2 ile CD ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Meme kanserinde hem hastaliksız hem de genel sağkalım c-erbB-2 overekspresyonu gösteren hastalarda daha düşüktür. c-erbB-2'nin meme kanserli hastalarda kemoterapi ve endokrin tedavi için prediktif bir faktör olabileceğini düşündüren veriler mevcuttur. Literatürde bu iki molekülün meme kanserlerindeki rolü ile ilgili veriler çelişkilidir. Yayınların çoğunda birbirleri ile ilişkisiz oldukları bildirilmişse de (12, 13) bazılarında c-erbB-2 pozitif vakaların çoğunluğunun CD pozitif olduğu ve bu grubun CD negatif olanlara göre farklı davrandığı vurgulanmıştır (14).

Bu veriler ışığında, bizim çalışmamızda da CD ekspresyonunun nüks ve metastatik potansiyel ile yakından ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Meme kanserlerinde günümüzde de en önemli prognostik faktörlerin lenf nodu tutulumu ve tümör büyüklüğü olduğu göz önüne alınarak, CD immünreaktivitesinin özellikle lenf nodu pozitifliği göstermeyen ve/veya küçük tümörlerde c-erbB-2 ekspresyonu ile birlikte kullanılabilir ve bu tip vakalarda prospektif çalışmalar yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Westley B, Rochefort H. A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines. *Cell*. 1980; 20: 353-62.
2. Isola J, Weitz S, Visakorpi T, et al. Cathepsin D expression detected by immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 1993;11: 36-43.
3. Takei Y, Higashira H, Yamamoto T, Hayashi K. Mitogenic activity toward human breast cancer cell line MCF-7 of two bFGFs purified from sera of breast cancer patients: co-operative role of cathepsin D. *Breast Cancer Res Treat*. 1997; 43: 53-63.
4. Losch A, Tempfer C, Kohlberger P, et al. Prognostic value of cathepsin D expression and association with histomorphological subtypes in breast cancer. *Br J Cancer*. 1998; 78: 205-9.
5. Henry JA, McCarthy AL, Angus B, et al. Prognostic significance of the estrogen-regulated protein, cathepsin D, in breast cancer. An immunohistochemical study. *Cancer*. 1990; 15: 65: 265-271.
6. Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factors in node negative breast cancer A review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Annals of Surgery*. 2002; 235:10-16.
7. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer*. 1997; 3;72: 1-22.
8. Ferrandina G, Scambia G, Bardelli F, Benedetti Panici P, Mancuso S, Messori A. Relationship between cathepsin-D content and disease-free survival in node-negative breast cancer patients: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 1997; 76: 661-666.

9. Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, Meijer-van Gelder ME, van Putten WL, Klijn JG. Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* 1999; 79: 300-307.
10. Roger P, Daures JP, Maudelonde T, et al. Dissociated overexpression of cathepsin D and estrogen receptor alpha in preinvasive mammary tumors. *Hum Pathol.* 2000; 31: 593-600.
11. Aziz S, Pervez S, Khan S, Kayani N, Rahbar M. Immunohistochemical cathepsin-D expression in breast cancer: correlation with established pathological parameters and survival. *Pathol Res Pract* 2001;197: 551-557.
12. Zhao H, Morimoto T, Sasa M, Tanaka T, Izumi K. Immunohistochemical expression of uPA, PAI-1, cathepsin D and apoptotic cells in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer.* 2002; 9: 118-126.
13. Korkolis D, Ardavanis A, Yotis J, Kyroudi A, Gorgoulis V, Kittas C. HER-2/neu overexpression in breast cancer: an immunohistochemical study including correlations with clinicopathologic parameters, p53 oncoprotein and cathepsin-D. *Anticancer Res.* 2001; 21: 2207-212.
14. Xu L, Shen Z, Zhu W. The expression of Cath-D, c-erbB-2 and EGFR in breast cancer and its correlation to lymphatic metastasis. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 1995;17: 60-63.