

Ispartada meme kanserli hastalarda BRCA1 ve BRCA2 ekspresyonu

Özden Çandır*, Nermin Karahan*, Mahmut Bülbül**, Fahriye Kılınc*,
Şirin Başpınar*,

*Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı,
**Cerrahi Anabilim Dalı

Özet

Amaç: BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar, kalıtsal meme kanserlerinde predispozan faktördür. Sporadik meme kanserlerinde de BRCA proteini ekspresyonunda kayıp olduğu görülmektedir. Bu çalışmada amacımız, Isparta'da meme kanserlerinde BRCA ekspresyonunu değerlendirmek ve prognostik faktörlerle korelasyonunu araştırmaktır. Materyal ve metod: 82 seçilmemiş meme kanserinden, formalinde fiske edilmiş ve parafine gömülmüş doku kesitlerine BRCA1 ve BRCA2 immunohistokimyasal boyaması yapıldı. Sonuç: 82 meme kanserli hastada 39(%47.57) BRCA1 ve 42(%50.12) BRCA2 ekspresyonunu pozitif bulduk. 40(%48.77) karsinomda BRCA ekspresyonu kayıp idi. Bu çalışmanın sonucunda BRCA proteinleri ekspresyonlarının immunhistokimyasal olarak tespiti ile familial olan ve olmayan meme kanserlerinin birbirinden ayıramayacağı, ancak histolojik ve nükleer grade yükseldikçe BRCA protein ekspresyonlarının da azalması, BRCA'nın diferansiyasyon belirleyici bir marker olarak kullanılabileceğini düşündürdü.

Anahtar kelimeler: meme karsinomu, BRCA1, BRCA2

Abstract

BRCA1 and BRCA2 expression in breast cancer patients in Isparta

Aim: Mutations in BRCA1 and BRCA2 genes predispose to hereditary breast cancer. Loss of expression of BRCA proteins have been seen in sporadic breast carcinomas. Our aim in this study, was to evaluate, expression of BRCA and its correlation with prognostic factors. Material and method: Immunohistochemical staining for BRCA1 and BRCA2 was performed on sections formalin-fixed and paraffin-embedded tissue from 82 unselected invasive breast carcinoma. Result: We found 39 (47.57%) BRCA1 and 42 (50.12%) BRCA2 positive in 82 breast carcinomas. Expression of BRCA was lost in 40(48.77 %) carcinomas. At the end of this study, with immunohistochemical evaluation of expression of BRCA proteins can not differentiate familial and nonfamilial breast carcinomas. As histological and nuclear grades are increased, expression of BRCA protein is decreased, therefore expression of BRCA can be used as a differentiation parameter.

Key words: Breast carcinoma, BRCA1, BRCA2

Giriş

Kadınlarda, kansere bağlı ölüm sebepleri içinde meme kanseri ilk sıralarda yer alır. Bu nedenle meme kanserleri ile ilgili etyolojik ve prognostik çalışmalar önem taşımaktadır. Prognoz, tedavi sonrası nükse kadar geçen hastalısız süre ve hastalısız + hastalıklı toplam sağkalım süresi ile değerlendirilir. Prognozu belirleyen pek çok neden vardır. Bunların içinde en önemli olanlardan biri hastalığın yakalandığı dönemdeki evresi yani vucutta yayılım derecesidir. Diğer prognostik faktörler ise, tümörün kendi özellikleridir. Meme kanserinde prognozu belirleyen pek çok özellik, patolog tarafından kolayca saptanabilir. Meme kanserinin erken evrede

yakalanabilmesi için, meme kanseri riski taşıyan kişilerin tespiti çok önemlidir. Mamografinin yaygın tarama amaçlı kullanımı hastalığın erken dönemde yakalanmasını sağlamakta ise de, meme kanseri için riskli grupların tespiti ve bunların düzenli kontrolleri hayat koruyucu bir tedbirdir(1).

Karsinogenezin temelinde hücreyi öldürmeyen genetik hasar vardır. Genetik hasar hücrenin düzenleyici genlerinde olduğu zaman, hücre kontrolsüzce çoğalarak kanseri oluşturur(1).

Hücrenin düzenleyici genleri üç grupta toplanır.

- 1-Büyümeyi sağlayan protoonkogenler
- 2-Büyümeyi inhibe eden tümör baskılayıcı genler
- 3- Apoptozisi kontrol eden genler.

Karsinogenez, çok basamaklı bir olaydır. Bu üç gen grubundan bir çok gende oluşan mutasyonların birikimi sonucunda ortaya çıkmaktadır(1).

BRCA1 17. kromozomun uzun kolunda (17q21) lokalize

Yazışma Adresi: Prof Dr Özden Çandır
SDÜ Isparta Sağlık Yüksek Okulu Md, Isparta
Tel: 0544 5811705-0532 3811705
Fax: 0246 2182081
E-mail: ozdencandir@superonline.com

tümör baskılayıcı bir genidir. Babadan veya anneden geçen bir BRCA1 allelinde mutasyonu olan bir kadın, meme ve over kanserine predispozitedir ve bu kadının normal yaşam süresi içinde meme kanserine yakalanma riski % 80 civarında olduğu bildirilmektedir(2).

BRCA2 geni, 13. kromozomun uzun kolunda (13q12) lokalizedir. BRCA2 mutasyonu taşıyan kadınlarda da meme kanseri riski artmıştır(3).

Biz bu çalışmada, meme kanserlerinde BRCA ekspresyonunun immunohistokimyasal tespitinin, lobuler ve duktal karsinomlardaki dağılımını, histolojik ve nükleer grade ile ilişkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Ocak 1998- Aralık 2001 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda meme kanseri tanısı almış 82 hasta çalışmaya alındı. Bütün olgular, histolojik olarak Bloom Richardson'un(4), nükleer açıdan Lash ve arkadaşlarının(5) önerdiği sistemlere göre derecelenip, Grade I ve II olgular düşük dereceli, Grade III olgular yüksek dereceli olarak ele alındı.

%10 luk formalinde fiske edilmiş ve parafine gömülmüş dokulardan hazırlanan 5 mikron kalınlığındaki kesitlere immunohistokimyasal BRCA1 ve BRCA2 boyamaları yapıldı.

BRCA1 için primer antikor olarak SG11(Zymed Lab Inc., USA) ve D-20 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) kullanıldı. Bu iki antikor saf Mouse ve rabbit poliklonal olup, sırası ile BRCA1 in karboksi ve aminouçlarındaki aminoasitlere bağlanmaktadır. BRCA2 için primer antikor olarak Ab-2(Oncogene Res Pro.,UK) ve C-15 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.,USA) kullanıldı. Her iki antikor saf rabbit poliklonal olup, sırası ile amino ve karboksi uçlarındaki aminoasitlere bağlanmaktadır. Sekonder antikor olarak Ultra-V-block (Labvision, USA) kullanıldı. Primer antikorlar PBS ile 1/100 oranında dilüe edildi. Kromojen olarak diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Zymed Lab Inc.,USA) ve zıt boyama için Mayer's hematoksilen kullanıldı. Pozitif kontrol için 10 adet normal meme dokusu kesitlerine de tümörlere yapılan boyama yapıldı. Negatif kontroller için her hastanın eş kesitine primer antikor uygulanması yapılmadan diğer prosedürler aynı olacak şekilde boyama yapıldı.

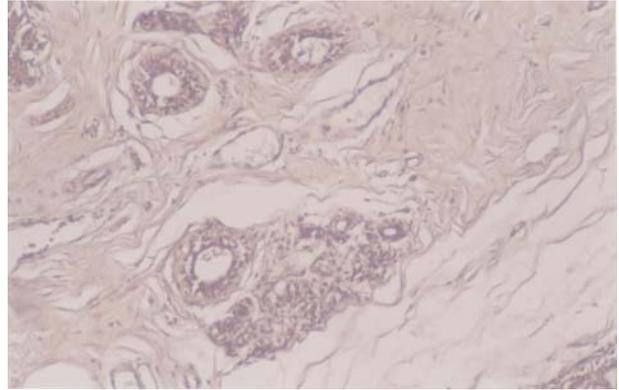
Antikor reaktivitesinin şiddeti, her doku kesitinde iki ayrı gözlemci tarafından değerlendirildi. Reaktivite 0 dan 2+ liğe kadar skorlandı. Hiç boyanmayanlara 0, normal epitelle aynı şiddette boyananlara 2+, normal epitele göre daha zayıf boyanma gösterenlere 1+ verildi. Sonuçlar Fisher'in ki kare testi ile

değerlendirildi.

Bulgular

82 meme kanserli hastanın yaşları 23 ile 80 arasında idi. 26 hasta lobuler karsinom, 56 hasta duktal karsinom tanısı almıştı. Lobuler karsinomların biri insitu diğerleri infiltratif tipte, duktal karsinomların ikisi insitu, diğerleri infiltratif tipte idi. İnfiltratif lobuler karsinomların subgruplarına göre dağılımında, birinin tubululobuler, birinin alveoler, 23ünün klasik tipte lobuler karsinom oldukları tespit edildi. Duktal karsinomların subgruplara göre dağılımında, birinin kribriiform, birinin histiositoid, ikisinin papiller, ikisinin tubuler, üçünün müsinöz, yedisinin medüller, 39 unun NOS patern gösterdiği saptandı. Lobuler karsinomlu olgularda yaş ortalaması, 54,84 ve duktal karsinomlu olgularda yaş ortalaması 52,95 idi.

Olguların 32 sinde histolojik grade (HG) yüksek(grade III), 50sinde düşük (grade I,II), ve nükleer grade (NG), 20 olguda yüksek (grade III) ve 62 olguda düşük (grade I,II) idi.ü



Şekil 1: Normal meme asini ve duktus epitel hücrelerinde nükleer ve sitoplazmik BRCA1 ekspresyonu (BRCA1x40)

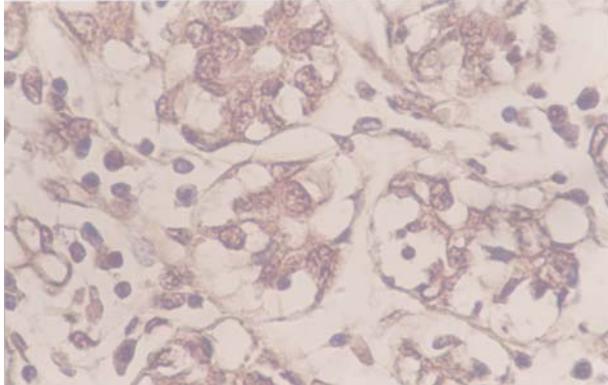
Immunohistokimyasal boyama sonuçlarında, pozitif kontrol amacı ile kullanılan normal meme dokusu asini ve duktus epitelinde BRCA1 ve BRCA2 ekspresyonu 2+ şiddette saptandı (resim 1 ve 2). 39 (%47,57) hastada BRCA1 ve 42 hastada BRCA2 pozitifliği görüldü. Hastaların 3 ünde sadece BRCA1, 6 sında sadece BRCA2 ve 36 hastada hem BRCA1, hem de BRCA2 pozitifliği bulunduğu görüldü (resim 5 ve 6). 40 (%48,77) hastada BRCA ekspresyonu hiç görülmedi (resim 7 ve 8). BRCA1 ve BRCA2 nin 2+ olarak izlendiği 3 olgunun ikisi müsinöz karsinom (resim 3 ve 4) ve birisi papiller karsinom idi. BRCA1 protein ekspresyonuna göre, düşük histolojik grade gösteren meme kanserli hasta grubu (HG I-II) ile yüksek histolojik grade gösteren meme kanserli hasta

grubu (HG III) arasında anlamlı fark bulundu ($x^2=6.68$ olup, $p<0.05$). BRCA2 protein ekspresyonuna göre HG I-II ve HG III grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). BRCA1 proteinine göre düşük nükleer grade (NG I-II) gösteren hasta grubu ile yüksek nükleer grade gösteren (NG III) hasta grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu ($x^2=14.95$, $p<0.05$). BRCA2 protein ekspresyonuna göre NG I-II hasta grubu ile NG III hasta grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu ($x^2=7.40$, $p<0.05$). Bulgular Tablo 1 de özetlendi.

Tablo 1: Histolojik ve nükleer gradelerine göre BRCA1 ve BRCA2 ekspresyonu

| | BRCA1 | | | BRCA2 | | |
|-------------------------|-------|----|----|-------|----|----|
| | - | + | ++ | - | + | ++ |
| HG I ve II (50 olgu) | 18 | 29 | 3 | 17 | 30 | 3 |
| HG III (32 olgu) | 25 | 7 | 0 | 23 | 9 | 0 |
| NG I ve II (62 olgu) | 25 | 37 | 0 | 23 | 39 | 0 |
| NG III | 18 | 2 | 0 | 17 | 3 | 0 |

HG: Histolojik grade, NG: Nükleer grade
 HG I-II, HG III ve BRCA1 için $x^2=6.68$, $p<0.05$, HG I-II, HG III ve BRCA2 için $p<0.05$
 NG I-II, NG III ve BRCA1 için $x^2=14.95$, $p<0.05$, NG I-II, NG III ve BRCA2 için $x^2=7.40$, $p<0.05$



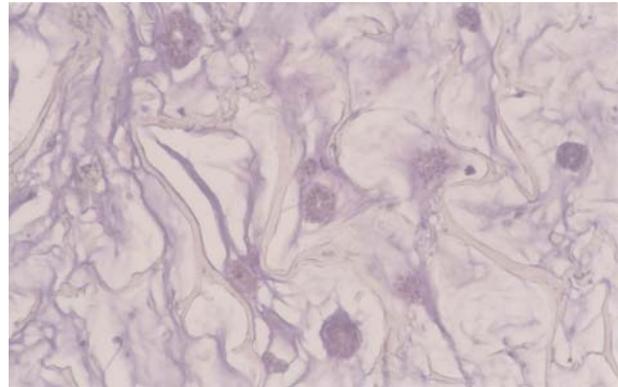
Şekil 2: Normal meme asini epitel hücrelerinde nükleer ve sitoplazmik BRCA2 ekspresyonu (BRCA2x400)

Tartışma ve Sonuç

BRCA proteinleri normal meme epitel hücrelerinin nükleuslarında eksprese edilirler. Hücre siklusunda negatif regülatör etkileri vardır. BRCA mutasyonları familial meme kansinomları ile birlikte görülürler. Sporadik meme kansinomlarında somatik mutasyon gösterilememiştir. Ancak yapılan çalışmalar BRCA ekspresyonunun meme kanserlerinde kaybolduğunu bildirmektedir(2,6,7). Biz 82 hastanın meme kansinomunda yaptığımız immunhistokimyasal boyamalarda BRCA ekspresyonunu 3 hastada normal doku ile aynı şiddette, 47 hastada değişen derecelerde azamış ve 32 hastada tam kaybolmuş olarak tespit ettik.

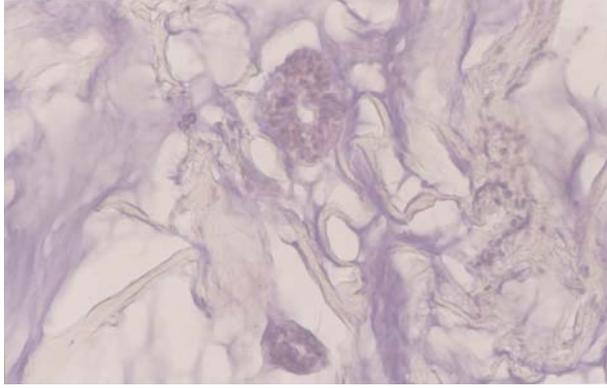
Familiyal geçiş gösteren BRCA1 mutasyonu tespit edilmiş bir kadında normal yaşam süresi içinde meme kanseri gelişme riski %80 dir. Bu riskin oranı sporadik meme kansinomlarında şu sırada bilinmemektedir ve çalışma konusudur. Bu nedenle familial BRCA mutasyonlarının hastalığın ortaya çıkışından önce tespiti, hayat kurtarıcı tedbirlerin alınması bakımından çok önem taşımaktadır. Belki de, BRCA mutasyonları sporadik meme kansinomları açısından da benzer bir anlam taşıyabilir. Çeşitli mutasyon tespit modelleri geliştirilmiştir.

Ancak bu modellerin tümü genetik mutasyon analiz çalışmaları olup, oldukça pahalı ve tarama testi olarak kullanılamayacak modellerdir. Byrne ve arkadaşları (8), bu çalışmada kullandığımız yöntemleri kullanarak önceden DNA analizi yapılmış mutasyon olup olmadığı belirlenmiş iki grupta bu yöntemle de aynı mutasyonları belirlediklerini bildirmektedirler. Bizim çalışma grubumuzda önceden mutasyon tespiti yapılmamış 82 hasta bulunuyordu. 82 hastanın 40(%48,77) ında BRCA ekspresyonu görülmedi.

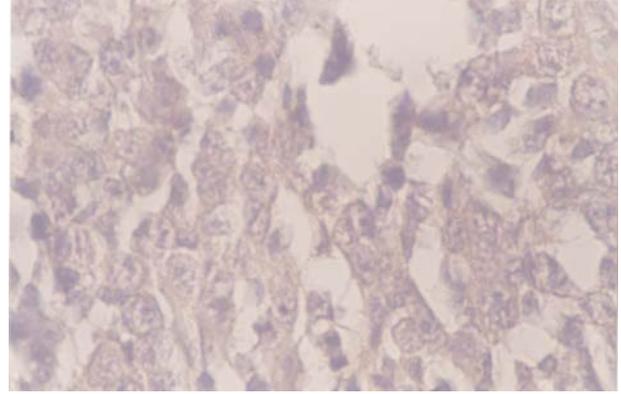


Şekil 3: HG I ve NG I müsinöz kansinomda 2+ nükleer ve sitoplazmik BRCA1 ekspresyonu (BRCA1x40)

Familiyal meme kanserlerinin tüm meme kanserlerinin %5-10 unu oluşturduğu düşünülürse bu çalışmada familial olanlar yanı sıra familial olmayan meme

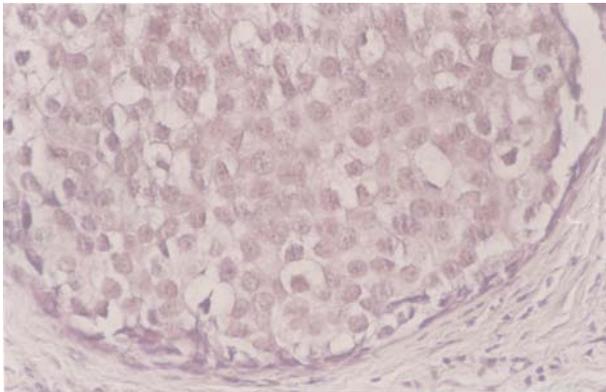


Şekil 4: HG I ve NG I müsinöz karsinomda 2+ nükleer ve sitoplazmik BRCA2 ekspresyonu (BRCA2x100)



Şekil 6: HG III ve NG II infiltratif duktal karsinomda 1+ BRCA2 ekspresyonu (BRCA2x400)

kanserlerinin de BRCA ekspresyonunda kayıp gösterdiği anlaşılmaktadır. Sun ve arkadaşları 26 hastalık serilerinde tüm karsinomlarda, normal meme epitelini ile kıyaslandığında BRCA ekspresyonunda azalma tespit etmişlerdir. Biz düşük dereceli üç olguda BRCA ekspresyonunu normal epitel ile aynı bulduk. Ancak yüksek dereceli tümörlerde ekspresyon şiddeti azalmakta idi ve çoğunda ise tam kayıp görüldü. Histolojik derecesi yüksek tümörlerde düşük dereceli tümörlere göre belirgin kayıp vardı. Sonuçlarımız yüksek histolojik ve nükleer grade gösteren tümörlerde BRCA ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığını gösterdi.



Şekil 5: HG I ve NG II infiltratif lobuler karsinomda 1+ BRCA1 ekspresyonu (BRCA1x200)

Bu çalışmanın sonucunda, BRCA proteinleri ekspresyonlarının immunhistokimyasal olarak tespiti ile familial olan ve olmayan meme kanserlerinin birbirinden ayrılamayacağı, ancak histolojik ve nükleer grade yükseldikçe BRCA protein ekspresyonunun azalması, BRCA'nın diferansiyasyon belirleyici bir parametre olarak kullanılabileceğini düşündürdü.

Kaynaklar

1. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic Basis of Disease. WB Saunders Comp. 6th ed. 1999: 260-329.
2. Lee WY, Jin YT, Chang TW, Lin PW, Su IJ. Immunolocalisation of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinoma : a correlation with other biological parameters. Histopathology 1999 Feb;43(2): 106-12.
3. Meindl A. Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population. Int J Cancer 2002 Feb; 97(4):472-80.
4. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. Br J Cancer 1957; 11:39-77.
5. Lash RH, Bauer TW, Herman RE, Esselstyn CB. Partial mastectomy: Pathologic findings and prognosis. Hum Pathol 1986; 17:813-822.
6. Taylor J, Lymboura M, Pace PE, et al. An important role for BRCA1 in breast cancer progression indicated by its loss in large proportion of non-familial breast cancers. Int J Cancer 1998 Aug 21; 79(4): 334-42.
7. Sun X, Gong Y, Rao MS, Badve S. Loss of BRCA1

expression in sporadic male breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2002 Jan;71(1):1-7.

8. Byrne TJ, Reece MT, Adams LA, Hoffman DE, Lane MA, Cohn GM. A rapid immunoassay predicts BRCA1 and BRCA2 mutations in buccal cells. *Oncol Rep* 2000; 7: 1203-7.