



İnvaziv Duktal Karsinomda Modifiye Scarff-Bloom-Richardson Gradeleme Sistemi ile p16 ve bcl-2 Ekspresyonunun Karşılaştırılması

Comparison of Modified Scarff-Bloom-Richardson Grading System with p16 and bcl-2 Expression in Invasive Ductal Carcinoma

Selma Erdoğan Düzcü, Mihriban Gürbüz*, Saime Gül Barut*

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, İzzet Baysal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, Bolu, Türkiye

*Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

Özet

Amaç: Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir. p16INK4a ve bcl-2 genleri hücre siklus kontrolündeki major yollarla ilişkilidir. Aynı zamanda meme karsinogenesinde de rol oynarlar. Bu çalışmada invaziv duktal karsinom olgularında "Modifiye Scarff-Bloom-Richardson" mikroskopik derecelendirme sistemindeki histopatolojik parametreler ile p16 ve bcl-2 ekspresyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Yöntemler: Çalışmamızda 2011-2013 yılları arasında Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji kliniğinde invaziv duktal karsinom tanısı konulan 88 olgu incelenmiştir. p16 ve bcl-2 immünohistokimyasal boyaları uygulandı.

Bulgular: Olgularımızda p16 ekspresyonundaki artış ile tubül yapısı, pleomorfizm ve mitoz sayısı ve histolojik grade artışı arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki bulundu ($p=0,008$, $p=0,001$, $p=0,005$, $p<0,001$). bcl-2 ekspresyonundaki artış ile mitoz ve histolojik gradenin azalması arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ($p=0,026$, $p=0,024$).

Sonuç: Modifiye Scarff-Bloom-Richardson gradeleme sistemi parametreleri ile p16 arasında pozitif bir ilişki varken, bcl-2 ile negatif yönde bir ilişki bulundu. p16 ve bcl-2 meme kanserinde önemli prognostik parametrelerdir. (*Haseki Tıp Bülteni 2015; 53: 229-36*)

Anahtar Sözcükler: Memenin invaziv duktal karsinomu, p16 (Ink4a), bcl-2

Abstract

Aim: Breast cancer is the most frequent cancer among women. The p16INK4a and bcl-2 genes are the two major pathways involved in control of the cell cycle. They also play key roles in breast carcinogenesis. In this study, we investigated the relationships between the histopathologic parameters in the "Modified Scarff-Bloom-Richardson" microscopic grading and expression of p16 and bcl-2 gene in cases with invasive ductal carcinoma.

Methods: We examined 88 patients who were diagnosed with invasive ductal carcinoma between 2011 and 2013 in Haseki Educational and Research Hospital Pathology Department. Immunohistochemical staining for p16 and bcl-2 was performed.

Results: Increased expression of p16 gene was statistically significantly related with increased tubule formation, pleomorphism, mitosis rate and histological grade ($p=0.008$, $p=0.001$, $p=0.005$, and $p<0.001$, respectively). We found a statistically significant relationship of the rise of the expression of bcl-2 gene with decreased mitosis rate and histological grade ($p=0.026$ and $p=0.024$, respectively).

Conclusion: As a result, it was observed that there was a positive correlation between parameters included in Modified Scarff-Bloom-Richardson grading system with p16 in addition to negative correlation with bcl-2 expression. p16 and bcl-2 are important prognostic biomarkers in human breast cancer. (*The Medical Bulletin of Haseki 2015; 53:229-36*)

Key Words: Invasive ductal carcinoma of the breast, p16 (ink4a), bcl-2

Giriş

Meme kanseri kadınlarda Türkiye’de ve dünyada görülen en sık kanserdir (1-4). Meme kanseri çevre dokulara invazyon ve uzak organlara metastaz yapabilen bir grup malign epitelyal tümördür (5). İnvaziv duktal karsinom (İDK) meme karsinomlarının %75-80’ini oluşturan özel tiplerin herhangi biri içinde sınıflandırılmayan malign meme tümörlerinin en önemli grubudur (6).

Günümüzde invaziv duktal karsinomun gradelemesinde en çok kullanılan Bloom’un 1950 yılında yaptığı, 1957’de Bloom ve Richardson tarafından kullanılan Elston and Ellis’in modifiye ettiği skorlama sistemidir (7-11). Bu gradeleme sisteminde tümör hücrelerinin nükleer özellikleri, oluşturdukları tubül yapılarının oranı ve mitoz sayıları ayrı ayrı 1-3 arasında skorlanarak elde edilen toplam skora göre grade belirlenmektedir (9,11,12). Grade 1-iyi diferansiye (3-5 puan), grade 2-orta derecede diferansiye (6-7 puan) grade 3-kötü diferansiye (8-9 puan) olarak derecelendirilir. Bloom ve Richardson histolojik gradenin potansiyel malignite derecesini yansıttığını belirtmiştir (7,8). Histolojik grade prognostik faktör olarak da değerlendirildiğinden, grade ile birçok faktörün ilişkisi araştırılmıştır (13).

İnsanlarda görülen kanserlerin çoğu hücre siklus kontrolünün bozulmasıyla ortaya çıkmaktadır (14). Hücre siklus kontrolünde ve meme kanseri patogenezinde de rol oynayan iki önemli gen p16INK4a (siklin bağımlı kinaz inhibitörü) ile bcl-2’dir (B hücreli lenfoma-2) (14). Hücre siklusu siklinler, siklin bağımlı kinazlar (SBK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (SBKİ) gibi birçok genle düzenlenir (14). p16INK4a protein ailesinin bir üyesi olan, 9p21 kromozomunda kodlanan, SBK-4 ve SBK-6’yı inaktive eden üç eksondan oluşan bir tümör supresör genidir (15,16).

bcl-2; bcl-2 gen ailesinin bir üyesi olan, kromozom 18q21’de lokalize, normal dokuda sıkça eksprese edilen apoptozu zıt yönde etkileyen bir onkogendir (17-20). bcl-2 antiapoptotik rolüne ilaveten hücre siklus kontrolünde de rol alır (21). bcl-2 ekspresyonu meme kanserli hastalarda prognostik göstergedir (22). Meme karsinomunda dediferansiasyonu baskıladığı, diğer prognostik faktörler ile birlikte hormon tedavisi ve kemoterapiye yanıtı etkilediği bildirilmiştir (23).

Aynı tedaviyi almış hastalarda tümör davranışının değişken olmasından dolayı; sağkalım durumunun öngörülmesi, relapsları önleme ve tedavi rejimlerini daha etkin kullanabilmek için yeni prognostik faktörlere ihtiyaç artmaktadır (24).

Araştırmamızda 2011-2013 tarihleri arasında 88 İDK tanısı almış olguya p16INK4a ile bcl-2 immünohistokimyasal boyalarını uyguladık.

Çalışmamızın amacı, Modifiye Scarff-Bloom-Richardson gradeleme sistemindeki tubül formasyonu, nükleer

pleomorfizm, mitoz oranları ve bunların toplamından oluşan grade ile p16 ve bcl-2 boyanma paternlerini karşılaştırarak anlamlı bir ilişki olup olmadığını değerlendirerek p16 ve bcl-2’nin prognostik önemini kavramaktır.

Yöntemler

Çalışmamıza 2011-2013 yılları arasında Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi bölümünde ameliyat edilip Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji bölümünde inceleme sonrasında İDK tanısı alan 88 hasta alındı. Olgulara ait patoloji kayıtları ve tüm preparatlar (parafin blok ve lamlar) iki patoloğ tarafından tekrar değerlendirildi.

Tümörler modifiye Scarff-Bloom-Richardson gradeleme sistemi kullanılarak skorlandı. Tümörün içerdiği tubül formasyonu, mitoz sayısı ve nükleer pleomorfizm tesbit edilerek 1-3 olarak puanlama yapıldı. Buna göre tubül formasyonu değerlendirilirken tümörün %75’inden fazlasında lümenleri belirgin tubül yapısı görülüyorsa 1 puan, solid alanlarla birlikte %10-75 arasında tubül yapısı varsa 2 puan, %10’un altında tubül yapısı var ya da hiç yoksa 3 puan verildi. Nükleer pleomorfizm değerlendirilirken tümör hücrelerinin nükleusları uniform, düzenli ve küçük ise 1 puan, nükleuslar orta derecede farklılık gösteriyor ve yer yer nükleoller seçilebiliyorsa 2 puan, ileri derecede farklılık gösteriyor ve bir ya da birkaç belirgin nükleol içeriyorsa 3 puan verildi. Mitoz sayısı 10 büyük büyütme alanında (0,59 mm) 0-9 ise 1 puan, 10-19 ise 2 puan, 20 ve üzeri ise 3 puan verildi. Bu parametrelere göre elde edilen toplam skor 3-5 ise grade 1, 6-7 ise grade 2, 8-9 puan ise grade 3 olarak değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal inceleme için; tümörlere ait bloklardan internal kontrol içeren en uygun parafin blok seçildi. Primer antikor olarak purified mouse anti-human p16 (dilüsyon: 1/20, kod: G175-405, no: 550834, BD Biosciences, ABD) ve BCL-2 alpha Ab-1 (kod: 100/D5, no: MS-123-R7-7,0 ml, Thermo Scientific, ABD) kullanıldı.

Materyallerin arşivdeki parafin bloklarından mikrotom aracılığı ile 3 µ kalınlığında kesitler poly-L-Lizin’li lamlara alındı. Kırk dakika 80 °C etüvde bekletildi. Lamlar immünohistokimyasal boyama için BenchMark XT IHC/ISH Boyama Modülü’ne (Ventana Medikal Sistemler, Inc., 1910, Tucson, Arizona, ABD) takıldı.

p16 immünohistokimyasal boyanması sırasında preparat deparafinizasyon için EZ prep solüsyonunda 4 dakika inkübe edildi. Reaction Buffer ile 37 °C’de yıkama yapıp LCS ile kapatıldı ve bu işlem her basamaktan önce tekrarlandı. Sitrat solüsyonu ile 100 °C’de 60 dakika hücre iyileştirme yapıldı. UV inhibitör ile 4 dakika inkübe edildi. Manuel p16 damlatılarak 40 dakika antikor titrasyonu yapıldı. HRP UNIV MULT’de 8 dakika inkübe edildi. Amplifier kiti ile antikor anijen bağlantısı artırıldı.

Kromojenle (UV DAB) substrat ardışık damlatılıp 8 dakika beklendi. UV Copper damlatılıp 4 dakika beklenecek reaksiyon hızı sağlandı. Arka plan boyaması 8 dakika boyunca hematoksinle yapıldı. Bluing reagent ile 4 dakika inkübe edildi.

bcl-2 immünohistokimyasal boyanırken p16 prosedüründeki işlemlerin benzeri uygulandı. Farklı basamakları ise; ikinci basamakta sitrat yerine EDTA'lı solüsyon kullanıldı. Dördüncü basamakta bcl-2 boyası damlatıldı.

İmmünohistokimyasal değerlendirme Olympus ışık mikroskopunda 400x büyütme kullanılarak yapıldı. İki ayrı araştırmacı, klinik ve patolojik parametreleri önceden bilmeksizin olgu sırasına göre kodlanmış immun boyalı lamların tüm alanlarını taradı.

p16 için; nükleer boyanma oranı esas alınarak 0-3 arası puanlama yapıldı. Tümör hücrelerindeki boyanma %0-10 olduğunda negatif, %11-20'sinde nükleer boyanma olduğunda 1+, %21-50'sinde nükleer boyanma olduğunda 2+, %50'den fazlasında nükleer boyanma olduğunda 3+ olarak değerlendirildi.

Bcl-2 için sitoplazmik boyanma esas alınarak 0-3 arası puanlama yapıldı. Tümör hücrelerinin 1/3'den azında sitoplazmik boyanma görülmesi 1+, 1/3-2/3'ünde sitoplazmik boyanma görülmesi 2+, 2/3'ünden fazlasında sitoplazmik boyanma görülmesi 3+ olarak değerlendirildi.

Her iki marker için 0 ve 1+ değer alanlar negatif, 2+ ve 3+ değer alanlar pozitif kabul edilerek ayrıca karşılaştırılma yapıldı. p16 için pozitif internal kontrol olarak fibroblastlar, eksternal kontrol olarak serviks skuamöz hücreli karsinomu değerlendirildi. bcl-2 için pozitif internal kontrol olarak lenfositler, eksternal kontrol olarak lenf nodu dikkate alındı.

İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde, sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, minimum, maksimum olarak verildi. Bağımsız gruplarda kategorik değişkenlerin oranları Ki-kare analizi ile test edildi. Gruplarda oranların ilişkileri Mantel-Haenszel test ile değerlendirildi. Koşulların sağlanmadığı durumda Monte-Carlo simülasyonu uygulandı. Ordinal değişkenlerin ordinal ve sayısal değişkenlerle ilişkisi Spearman Korelasyon analizi ile incelendi. İstatistiksel alfa anlamlılık düzeyi p değerinin 0,05'ten küçük olması durumu olarak kabul edildi.

Bulgular

Çalışmaya alınan hastaların yaşları 39-89 arasında olup, yaş ortalamaları 57,9±11,6 yıldır. Olguların 87'si kadın, 1'i erkektir. Erkek hasta 51 yaşındadır. Kırk dört sağ, 44 sol meme kanseri tanılı hastadan, 40 olguda lumpektomi, 48 olguda ise radikal mastektomi uygulanmıştır. Tümörlerin çapı 0,7-15 cm arasında değişkenlik göstermekle birlikte

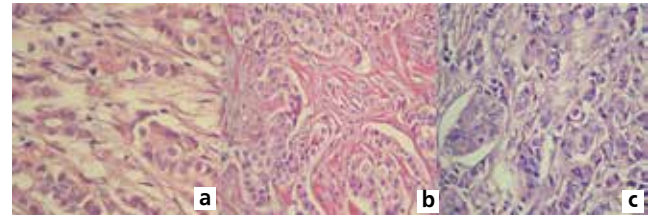
ortalama 3,1±1,9 cm olup 7 olguda birden fazla odak halinde yerleşim izlendi.

Tübül formasyonu 3 (%3,4) olguda 1, 35 (%39,8) olguda 2, 50 (%56,8) olguda 3 puan verilmiştir. Nükleer pleomorfizm için 2 (%2,3) olguda 1 puan, 43 (%48,9) olguda 2 puan, 43 (%48,9) olguda 3 puan verilmiştir. Mitoz ise 36 (%40,9) olguda 1 iken, 23 (%26,1) olguda 2, 29 (%33,0) olguda 3 olarak değerlendirilmiştir. Histolojik grade 11 (%12,5) olguda 1, 43 (%48,9) olguda 2, 34 (%38,6) olguda 3 bulunmuştur (Resim 1a, 1b, 1c).

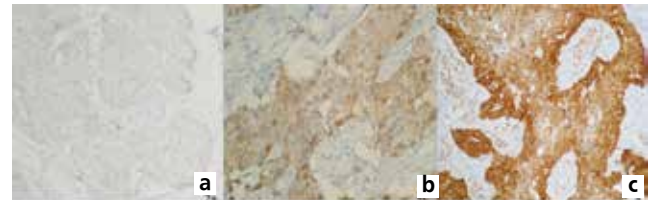
Olgularımıza uyguladığımız p16 ve bcl-2 İHK boyama sonucunda p16 için; 34 (%38,6) olguda 0, 27 (%30,7) olguda 1+, 14 (%15,9) olguda 2+, 13 (%14,8) olguda 3+ boyanma görüldü (Resim 2a, 2b, 2c). bcl-2 ise 17(%19,3) olguda 0, 11 (%12,5) olguda 1+, 25 (%28,4) olguda 2+, 35 (%39,8) olguda ise 3+ boyanma izlendi (Resim 3a, 3b, 3c).

p16 düzeyi ile mitoz, pleomorfizm, tübül, grade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardı (sırası ile p=0,005 p=0,001, p=0,008, p<0,001). Mitoz, pleomorfizm, tübül, grade 3'te p16 düzeylerindeki artış dikkat çekiciydi. Bu ilişki Tablo 1'de verilmiştir.

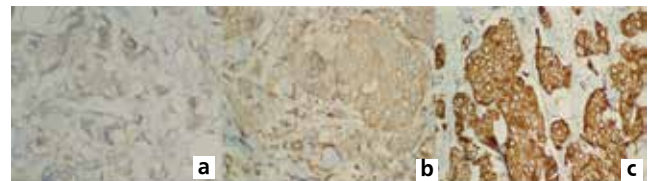
p16 0-1 düzeyi negatif, 2-3 düzeyi pozitif kabul edilerek yapılan değerlendirmemizde mitoz, pleomorfizm, tübül, grade düzeylerinde gruplar arasında pozitiflik oranlarında fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,007, p=0,005, p=0,027, p=0,006). Mitoz, pleomorfizm, tübül, grade 3



Resim 1. a) HEx200, grade 1 tümör, **a)** HEx400, grade 2 tümör, **c)** HEx400, grade 3 tümör



Resim 2. a) Hp16 ile 1+ boyanma (x100), **b)** p16 ile 2+ boyanma (x400), **c)** p16 ile 3+ boyanma (x200)



Resim 3. a) bcl-2 ile 1+ boyanma (x400), **b)** bcl-2 ile 2+ boyanma (x400), **c)** bcl-2 ile 3+ boyanma (x400)

düzeyinde p16 pozitiflik oranlarındaki yükseklik dikkat çekiciydi (Tablo 2).

bcl-2 düzeylerinin mitoz, pleomorfizm, tubül, grade düzeylerinde sadece mitoz ve grade ile ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,026, p=0,024). Mitoz ve grade düzeyi artıkça bcl-2 düzeyindeki düşüş dikkat çekiciydi (Tablo 3).

bcl-2 0 ve 1+ düzeyinin negatif, 2+ ve 3+ düzeyini pozitif kabul ettiğimizde mitoz, tubül, grade düzeylerinde gruplar arasında pozitiflik oranlarında fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,036, p=0,034, p=0,014). Düzey 3'te bcl-2 oranlarındaki düşüklük dikkat çekiciydi (Tablo 4).

p16 boyanma oranları ile bcl-2 boyanma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (p=0,153). p16 düzeylerinde bcl-2 pozitiflik oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (p=0,025). p16'nın en yüksek oranda boyandığı olgularda bcl-2 düşüklüğü dikkat çekiciydi.

Tartışma

Kadınlarda en sık görülen kanser meme kanseridir (10,24). Meme kanseri etiyojisi multifaktöriyel olup; hormonal durum, diyet, reproduktif faktörler, alkol, vücut ağırlığı, fiziksel aktivite gibi pek çok etken rol oynamaktadır

Tablo 1. p16'nın mitoz, pleomorfizm, tubül ve grade ile karşılaştırması

		p16								p
		0		1		2		3		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Mitoz	1	18	52,9	9	33,3	6	42,9	3	23,1	0,005
	2	10	29,4	10	37,0	2	14,3	1	7,7	
	3	6	17,6	8	29,6	6	42,9	9	69,2	
Pleomorfizm	1	1	2,9	1	3,7	0	0,0	0	0,0	0,001
	2	23	67,6	13	48,1	4	28,6	3	23,1	
	3	10	29,4	13	48,1	10	71,4	10	76,9	
Tubül	1	2	5,9	1	3,7	0	0,0	0	0,0	0,008
	2	16	47,1	13	48,1	4	28,6	2	15,4	
	3	16	47,1	13	48,1	10	71,4	11	84,6	
Grade	1	7	20,6	3	11,1	1	7,1	0	0,0	<0,001
	2	20	58,8	14	51,9	5	35,7	4	30,8	
	3	7	20,6	10	37,0	8	57,1	9	69,2	

Tablo 2. p16'nın pozitiflik oranlarının mitoz, pleomorfizm, tubul ve grade ile karşılaştırılması

		p16				n
		Negatif (0-1)		Pozitif (2-3)		
		n	%	n	%	
Mitoz	1	27	44,3	9	33,3	0,007
	2	20	32,8	3	11,1	
	3	14	23,0	15	55,6	
Pleomorfizm	1	2	3,3	0	0,0	0,005
	2	36	59,0	7	25,9	
	3	23	37,7	20	74,1	
Tubul	1	3	4,9	0	0,0	0,027
	2	29	47,5	6	22,2	
	3	29	47,5	21	77,8	
Grade	1	10	16,4	1	3,7	0,006
	2	34	55,7	9	33,3	
	3	17	27,9	17	63,0	

Tablo 3. bcl-2'nin mitoz, pleomorfizm, tubül ve grade ile karşılaştırılması

		bcl-2								p
		0		1		2		3		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Mitoz	1	4	23,5	2	18,2	11	44,0	19	54,3	0,026
	2	7	41,2	2	18,2	6	24,0	8	22,9	
	3	6	35,3	7	63,6	8	32,0	8	22,9	
Pleomorfizm	1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	5,7	0,055
	2	7	41,2	3	27,3	14	56,0	19	54,3	
	3	10	58,8	8	72,7	11	44,0	14	40,0	
Tubül	1	1	5,9	0	0,0	0	0,0	2	5,7	0,079
	2	5	29,4	1	9,1	12	48,0	17	48,6	
	3	11	64,7	10	90,9	13	52,0	16	45,7	
Grade	1	2	11,8	0	0,0	3	12,0	6	17,1	0,024
	2	7	41,2	2	18,2	13	52,0	21	60,0	
	3	8	47,1	9	81,8	9	36,0	8	22,9	

Tablo 4. bcl-2'nin pozitiflik oranlarının mitoz, pleomorfizm, tubül ve grade ile karşılaştırılması

		bcl-2				p
		Negatif (0-1)		Pozitif (2-3)		
		n	%	n	%	
Mitoz	1	6	21,4	30	50,0	0,036
	2	9	32,1	14	23,3	
	3	13	46,4	16	26,7	
Pleomorfizm	1	0	0,0	2	3,3	0,122
	2	10	35,7	33	55,0	
	3	18	64,3	25	41,7	
Tubül	1	1	3,6	2	3,3	0,034
	2	6	21,4	29	48,3	
	3	21	75,0	29	48,3	
Grade	1	2	7,1	9	15,0	0,014
	2	9	32,1	34	56,7	
	3	17	60,7	17	28,3	

(10). Genetik eğilim ise etiyolojide rolü olan önemli faktördür (10). BRCA1 ve BRCA2 genleri herediter meme kanser olgularının önemli bir kısmından sorumlu olan duyarlılık genleridir (10).

Tedavi ve sağkalım açısından en önemli prognostik faktörler aksiller lenf nodu metastazı, tümör evresi, tümör boyutu, diferansiyasyon derecesi, lenfatik invazyon, hormonal durum ve uzak metastaz olarak sayılabilir (24).

Meme tümörlerinden en sık görüleni invaziv duktal karsinomdur (24). Çalışmamızda ülkemizde de en sık görülen kanser olan meme kanserini incelemeyi amaçladık.

p16 ve bcl-2 meme karsinomu patogeneğinde önemli

rol almaktadır (25). p16 meme kanserinde tümör progresyonunda ve prognozunda kullanılabilecek bağımsız prognostik bir faktördür (16).

Geradts and Wilson'un 1996 yılında 104 meme karsinomlu olgu üzerinden yaptıkları çalışmada p16 nükleer grade, histolojik grade ve mitoz ile ilişkili bulunmamakla birlikte, hasta sağkalımını ve tedaviye cevabı tahminde önemli rol aldığı vurgulanmıştır (14).

Çin'de 2001 yılında yapılan bir çalışmada normal duktal epitelde p16 ekspresyonu izlenmezken, grade 1 ve grade 2 tümörlerde belirgin artış, grade 3 tümörlerde azalma izlenerek p16 ile grade arasında zıt bir ilişki olduğu

gösterilmiştir (26). Çalışmamızda ise p16 ile negatif olguların 7'si (%20,6) grade 1, 20'si (%58,8) grade 2 iken p16'nın 3+ olduğu olguların 9'u (%69,2) grade 3 idi. Grade arttıkça p16 pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdi ($p<0,001$).

Araştırmamızda p16 ekspresyon düzeyi 0 ve 1+ negatif, 2+ ve 3+ olgular pozitif kabul ederek yaptığımız karşılaştırmada pozitiflik oranları; mitoz 1 iken 9 (%33,3), mitoz 2 iken 3 (%11,1), mitoz 3 iken 15 (%55,6) idi. Mitozun 3 olduğu olgularda ekspresyonun fazla görülmesi anlamlıydı ($p=0,007$). Pleomorfizmin 1 olduğu olgularda p16 pozitifliği görülmedi. Pleomorfizm 2 iken 7 olguda (%25,9), pleomorfizm 3 iken 0 olguda (%74,1) pozitiflik izlendi. Hücrelerdeki pleomorfizm oranı arttıkça p16 ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir artış izlendi ($p=0,005$). Tubül formasyonu 1 olduğunda p16 negatif iken, tubül formasyonu 2 iken 6 olgu (%22,2), tubül formasyonu 3 iken 21 olgu (%77,8) pozitif boyanma göstermiştir. Tubül formasyonunun derecesi arttıkça ya da diğer bir ifade ile tubül oluşumu azaldıkça p16 pozitiflik oranında anlamlı bir artış görülmüştür ($p=0,027$). p16 ekspresyon oranında mitoz, pleomorfizm, tubül formasyonu ve grade arttıkça anlamlı bir artış göstermiştir.

bcl-2; bcl-2 gen ailesinin bir üyesi olan, kromozom 18q21'de lokalize, normal dokuda sıkça eksprese edilen apoptozu zıt yönde etkileyen bir onkogendir (17,18,20,27). Meme kanserinde bcl-2 %40-80 eksprese edilir (28).

Çalışmamızda bcl-2 düzeylerinin mitoz ve grade ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,026$, $p=0,024$). Mitoz ve grade düzeyi arttıkça bcl-2 düzeyindeki düşüş dikkat çekiciydi.

Çalışmamızda bcl-2 için 0 ve 1+ boyanma negatif, 2+ ve 3+ boyanma pozitif kabul edilerek karşılaştırma yapıldı. Mitoz 1 iken, bcl-2 pozitifliği 30 olguda (%50), mitoz 2 iken 14 olguda (%23,3), mitoz 3 iken 16 olguda (%26,7) görülmüştür. Mitoz görülme sıklığı arttıkça bcl-2 ekspresyon oranlarında düşüklük görülerek bu fark anlamlı olarak değerlendirilmiştir ($p=0,036$). Pleomorfizm 1 olduğunda bcl-2 pozitifliği 2 olguda (%3,3), pleomorfizm 2 iken 33 olguda (%55,0), pleomorfizm 3 iken 25 olguda (%41,7) görülmüştür. Nükleer pleomorfizm derecesi ile bcl-2 arasında anlamlı bir ilişki bulunmamakla beraber pleomorfizm 2 ve 3 iken daha fazla pozitiflik izlenmiştir ($p=0,122$). Tubül formasyonu ile yapılan karşılaştırmada tubül 1 iken 2 olguda (%3,3), tubül 2 iken 29 olguda (%48,3), tubül 3 iken 29 olguda (%48,3) bcl-2 pozitifliği saptanmıştır. Tubül ile bcl-2 arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0,034$). Grade 1 tümürlü olgulardan 9'unda (%15,0), grade 2 olguların 34'ünde (%56,7), grade 3 olguların 17'sinde (%28,3) bcl-2 pozitifliği görülmüştür. Grade için yapılan bu karşılaştırmada gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmakla birlikte grade 3'de

bcl-2 ekspresyon oranındaki düşüş dikkat çekici olarak bulunmuştur ($p=0,014$).

Rochaix ve ark.'nin (29) yaptığı çalışma bizim çalışmamızla uyumaktadır. Çalışmalarında yüksek gradeli tümörlerin yarısından fazlası bcl-2 ve yüksek apoptotik aktivite ile ilişkili görülmüştür (29).

Lee ve ark.'nin (23) 1997 yılında 91 invaziv duktal karsinom ve in situ karsinomlu hastada yaptığı bir çalışmada bcl-2 ekspresyonu histolojik grade ($p<0,05$), nükleer grade ($p<0,01$), pozitif korelasyon göstermiştir. Bu çalışmada olguların %52,72'si bcl-2 pozitif boyanmıştır, çalışmamızda ise %68,2 pozitiflik izlenmiştir. Aynı çalışmanın sonucunda bcl-2 pozitif tümürlü hastaların daha uzun hastaliksiz yaşadığı görülmüştür. Agresif biyolojik davranışın bcl-2 ekspresyon kaybıyla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

2002 yılında 55 meme kanser olgusunda yapılmış çalışmada bcl-2 ekspresyonu yavaş büyümeyle pozitif ilişkili bulunurken, artmış histolojik grade ve ki-67 ile negatif ilişkili bulunmuştur (30). Literatürde invaziv duktal karsinomda bcl-2 pozitifliği %61-70, bu çalışmada %61,4, çalışmamızda ise %68,2'dir. Çalışmalarında bcl-2'nin az ekspresyonu yüksek nükleer ve histolojik grade ile ilişkili bulunmuştur ($p<0,05$) (30).

2006'da meme kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada grade arttıkça bcl-2 pozitifliğinin azaldığı saptanmış, pozitiflik oranı grade 1'de %44,4, grade 2'de %48,64, grade 3'te ise %18,1 olarak bildirilmiştir (17). Çalışmamızda ise grade 1'de pozitiflik %15,0, grade 2'de %56,7, grade 3'de ise %28,3 olup gruplar arasında farklılık anlamlı idi ($p=0,014$). Bu sonuçlar ileri evre tümörlerde bcl-2 salınımının azaldığını göstermektedir.

2007'de yapılan bir çalışmada literatürle uyumlu olarak yüksek bcl-2 ekspresyonu çalışmamızdaki sonuçla örtüşerek düşük histolojik grade ile ilişkili bulunmuştur (20).

2013 yılında Libya'da 200 hasta üzerinden yapılan bir tez çalışmasında olguların %62,4'ünde bcl-2 pozitifliği saptanmıştır. Ayrıca bcl-2 pozitifliğinin erken evre ($p=0,001$), düşük tümör gradesi, düşük metastaz riski ve negatif lenf nodu ($p<0,0001$) ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (28). Ayrıca bcl-2 pozitif hastalarda hastalık rekürrensi ve hastalıktan ölüm daha az görülmüştür (28).

İki yüz kırk dokuz invaziv duktal karsinom olgusunun değerlendirildiği bir çalışmada bcl-2 negatifliği yüksek nükleer grade, mitoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (31). Bizim çalışmamızda ise bu çalışma ile uyumlu olarak bcl-2 düzeyi mitozla negatif ilişki gösterirken, nükleer grade ile ilişki izlenmemiştir.

Soyuer ve ark.'nin 2004 yılında yapılan bir çalışmada bcl-2'nin İDK prognostik belirleyici olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada bcl-2'nin negatifliğinin kötü prognostik olduğu belirtilmiş ve evre 2 tümörlerde %21 olan bcl-2 pozitifliğinin evre 3 tümörlerde %12'ye düştüğü

gösterilmiştir (32). Çalışmamızda grade 1'de %15 pozitiflik, grade 2'de %56,7 pozitiflik, grade 3'de ise %28,3 pozitiflik bulunarak bu çalışmayla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç

Meme kanseri tedavi sürecinde benzer özelliklere sahip hastaların prognozu farklılık göstermektedir. Bu da yeni prognostik faktörlere ihtiyacı gündeme getirmiştir. Çalışmamızda literatürle benzer sonuçlar elde edilmiştir. p16 ve bcl-2'nin meme tümörünün prognozunda kullanılabilecek prognostik faktör olabileceği düşünülmele birlikte birtakım kısıtlılıkların olması çalışmanın suboptimal şartlarda yapılmasını sağlamıştır. Çalışmanın retrospektif yapılması, makroskopi sırasında fiksasyonun yeteri kadar yapıp yapılmadığının bilinmemesi, meme dokusunun yağlı natürü olması bizi kısıtlayan nedenlerdir.

Olgu sayımızın sınırlı olması da göz önüne alındığında p16 ve bcl-2'nin prognostik önemini anlamak için daha geniş seriler halinde ve daha çok olgu üzerinden prospektif çalışma yapılması gerekliliği kanaatindeyiz.

Etik Kurul Onayı: Çalışmada etik kurul onayına gerek olmadığından onay alınmamıştır, **Hasta Onayı:** Çalışmada hasta onayına gerek olmadığından onay alınmamıştır, **Yazarlık Katkıları:** Selma Erdoğan Düzcü, Mihriban Gürbüz, Saime Gül Barut, **Konsept:** Selma Erdoğan Düzcü, Mihriban Gürbüz, Saime Gül Barut, **Dizayn:** Selma Erdoğan Düzcü, Mihriban Gürbüz, Saime Gül Barut, **Veri Toplama veya İşleme:** Selma Erdoğan Düzcü, **Analiz veya Yorumlama:** Selma Erdoğan Düzcü, Mihriban Gürbüz, Saime Gül Barut, Literatür Arama: Selma Erdoğan Düzcü, **Yazan:** Selma Erdoğan Düzcü, **Hakem Değerlendirmesi:** Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir, **Çıkar Çatışması:** Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir, **Finansal Destek:** Çalışmamız için hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.

Kaynaklar

1. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı İstatistikleri . Türkiye'de Kanser Kayıtçılığı ve Dünya Kanser İstatistikleri <http://www.kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-kayitciligi.html> <http://www.kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanseristatistikleri.html>.
2. Ozdag H, Tez M, Sayek I, et al. Germ line BRCA1 and BRCA2 gene mutations in Turkish breast cancer patients. Eur J Cancer 2000;36:2076-82.
3. Güldür ME, Özgönül A, Özardalı İ, Bitiren M, Metineren MH, Sizgen A. İnfiltratif duktal karsinom olgularında c-erbB-2 ekspresyonu ile modifiye Nottingham-Bloom-Richardson Grade sisteminin parametreleri arasındaki ilişki. Genel Tıp Derg 2009;19:157-60.
4. Soerjomataram I, Louwman MW, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2008;107:309-30.
5. Tavasoli FA, Deville P. Pathology and genetics: tumors of the breast and female genital organs; WHO classification of tumours, Lyon, IARC Press; 2003. p. 9-112.
6. Erkinüresin T. Yaygın insitu duktal karsinomlu invaziv duktal karsinomlar ile insitu duktal karsinomsuz invaziv duktal karsinomların normal meme epitelinde östrojen reseptör ekspresyonunun karşılaştırılması (Uzmanlık Tezi) İstanbul: Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2009.
7. Bloom HJ, 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;11:359-77.
8. Bloom HJ. Prognosis in carcinoma of the breast. Br J Cancer 1950;4:259-88.
9. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer.I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology 1991;19:403-10.
10. Güveloğlu E. Meme, over ve tuba karsinomlarında BRCA1 ve BRCA2 protein ekspresyonlarının prognostik önemi: immünohistokimyasal ve kinikopatolojik çalışma (Uzmanlık Tezi). Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2006.
11. Meyer JS, Alvarez C, Milikowski C, et al. Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index. Mod Pathol 2005;18:1067-78.
12. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. Breast Cancer Res 2010;12:207.
13. Dağlar G, Yüksek YN, Gözalan AU, Tütüncü T, Güngör Y, Kama NA. The prognostic value of histological grade in the outcome of patients with invasive breast cancer. Turk J Med Sci 2010;40:7-15.
14. Geradts J, Wilson PA. High frequency of aberrant p16(INK4A) expression in human breast cancer. Am J Pathol 1996;149:15-20.
15. Özyalvaçlı G. Kınığimizde tanı alan gastrointestinal ve pankreatik nöroendokrin tümörlerin prognostik parametreler ile p16 ve siklin D1 ekspresyonu değerlendirilmesi (Uzmanlık Tezi) İstanbul: İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2009.
16. Chae SW, Sohn JH, Kim DH, et al. Overexpressions of Cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in human breast cancer: the clinicopathologic correlations and prognostic implications. Yonsei Med J 2011;52:445-53.
17. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer.I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology 1991;19:403-10.
18. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella P, Gatter KC, Harris AL. Bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ cancer. Br J Cancer 1994;69:135-9.
19. Lopes-Costa PV, Dos Santos AR, Dos Santos LG, da Silva BB. Evaluation of Ki-67 and Bcl-2 antigen expression in breast carcinomas of women treated with raloxifene. Cell Prolif 2010;43:124-9.
20. Trere D, Montanaro L, Ceccarelli C, et al. Prognostic relevance of a novel semiquantitative classification of Bcl2 immunohistochemical expression in human infiltrating ductal carcinomas of the breast. Ann Oncol 2007;18:1004-14.
21. Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C. Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. BMC Cancer 2008;8:153.

22. Kristek J, Dmitrovic B, Kurbel S, et al. Tumor growth fraction, expression of estrogen and progesterone receptors, p53, Bcl-2 and cathepsin D activity in primary ductal invasive breast carcinoma and their axillary lymph node metastases. *Coll Antropol* 2007;31:1043-7.
23. Lee HD, Koo JY, Jung WH. Correlations of bcl-2 expression with clinicopathological features in breast cancer. *Yonsei Med J* 1997;38:206-11.
24. Kaya Z. Meme kanserinde matriks metalloproteinaz 1 ve 2 ekspresyonunun diğer prognostik faktörlerle ilişkisi (Uzmanlık Tezi) İstanbul: Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2008.
25. Peurala E, Koivunen P, Haapasaari KM, Bloigu R, Jukkola-Vuorinen A. The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2013;15:5.
26. Wong SC, Chan JK, Lee KC, Hsiao WL. Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast. *J Pathol* 2001;194:35-42.
27. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. The breast. In: Lester SC, editor. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Company; 2010. p. 1073-95.
28. Ermiah EEA. Libyan breast cancer: Health services and biology. Diagnosis delay and prognostic value of DNA ploidy, S-phase fraction, and Ki-67 and Bcl-2 immunohistochemistry (thesis) Turku: Turun Yliopisto University of Turku; 2013.
29. Rochaix P, Krajewski S, Reed JC, Bonnet F, Voigt JJ, Brousset P. In vivo patterns of Bcl-2 family protein expression in breast carcinomas in relation to apoptosis. *J Pathol* 1999;187:410-5.
30. Park SH, Kim H, Song BJ. Down regulation of bcl2 expression in invasive ductal carcinomas is both estrogen- and progesterone- receptor dependent and associated with poor prognostic factors. *Pathol Oncol Res* 2002;8:26-30.
31. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, et al. Bcl-2 protein expression is associated with p27 and p53 protein expressions and MIB-1 counts in breast cancer. *BMC Cancer* 2006;6:187.
32. Soyuer I, Soyuer S, Canöz Ö, Özkan M, Özürc F, Ökten T. Evre II-III invaziv duktal karsinom olgularında c-erbB-2, PCNA, bcl-2, FVIII immunreakivitesi. *Erciyes Tıp Dergisi* 2005;27:141-6.