

# Astrositomalarda BCL-2 ve Cyclin A Ekspresyonu ve Prognoz ile İlişkisi

## The Relationship of BCL-2 and Cyclin A Expression and Prognosis in Astrocytomas

### ÖZ

**AMAÇ:** Yüksek gradeli astrositomalar cerrahi, radyoterapi, kemoterapiye rağmen; major mortalite ve morbidite nedeni olmaktadır. Bu çalışmada, astrositomalarda Cyclin A ve bcl-2 düzeylerini belirleyerek, yüksek grade'li (grade III-IV) olgularda sağkalıma etkisini araştırdık.

**YÖNTEMLER:** Çalışmaya toplam 28 supratentorial diffüz astrositoma olgusu dahil edilmiştir. Çalışmada, retrospektif dosya bilgileri kullanılmıştır. Parafin bloktaki doku örnekleri kullanılarak biotin-streptavidin immünoenzimatik antijen gösterme sistemiyle cyclin A ve bcl-2 düzeyleri saptanmış ve sonuçlar istatistiksel olarak Mann Whitney U, Kruskal-Wallis ve Spearman korelasyon testleri ile değerlendirilmiştir.

**BULGULAR:** Grade II astrositomalarda saptanan % 3.4(±1.7) cyclin A oranı ile grade III %18.4(±10.1) ve grade IV %15.5(±8.8) astrositomalarda saptanan cyclin A oranları arasında belirgin farklılık bulundu. Bcl-2 düzeyleri grade II (1.6±0.9), grade III 1.8(±0.8), grade IV %2.2±(0.6) olarak saptandı. Sağkalım grade III astrositomalarda 85.6 ±26.1 hafta, grade IV astrositomalarda 43.1 ±12.2 hafta olarak bulundu.

**SONUÇ:** Çalışmada, grade II astrositomalarda cyclin A ve bcl-2 düzeyleri arasında saptanan korelasyon, grade III ve IV astrositomalarda izlenmedi. Ortalama bcl-2 düzeylerinin histolojik malignite ile ilişkili olduğu görüldü.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Astrositoma, bcl-2, cyclin A, immunohistokimya, prognoz

### ABSTRACT

**OBJECTİVE:** Although the combined surgery, radiotherapy and chemotherapy treatments, high grade astrocytomas are still cause for major mortality and morbidity. In our study, concentrations of cyclin A and bcl-2 were measured in astrocytoma cases and morbidity effect were examined in high grade (grade III-IV) cases.

**METHODS:** In our study 28 supratentorial diffuse astrocytoma cases were included. Retrospective details were collected from the personal files. Cyclin A and bcl-2 levels were measured with biotin streptavidin immuno-enzymatic antigen staining system from tissue paraffin blocks. Results were evaluated with Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis and Spearman correlation tests.

**RESULTS:** Cyclin A concentrations were measured in all groups showed significant differences especially between grade II (3.4±1.7%), grade III (18.4±10.1%), grade IV (15.5±8.8%). Bcl-2 levels were measured as grade II (1.6±0.9%), grade III (1.8±0.8%), grade IV (2.2±0.6%). Postoperative survival for grade III were 85.6± 26.1 weeks and 43.1±12.2 weeks for grade IV astrocytomas.

**CONCLUSION:** In our study, grade II astrocytomas showed significant correlation between cyclin A and bcl-2 levels, but not for grade III and IV astrocytomas. Mean bcl-2 levels showed correlation with histological malignity.

**KEY WORDS:** Astrocytoma, bcl-2, cyclin-A, immunohistochemistry, prognosis

Kenan KOÇ<sup>1</sup>  
Çetin EVLİYAOĞLU<sup>1</sup>  
Cengiz ERÇİN<sup>2</sup>  
Konuralp İLBAY<sup>1</sup>  
Savaş CEYLAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı  
<sup>2</sup> Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Patoloji Anabilim Dalı

Geliş Tarihi: 04.04.2002  
Kabul Tarihi: 10.03.2004

Yazışma adresi:  
**Kenan KOÇ**  
Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Nöroşirürji A.D. KOCAELİ  
E-posta:kenankoc01@hotmail.com

## GİRİŞ

Nöroepitelyal grup içindeki astrositomalar; inkomplet rezeke edilebilmeleri ve bazılarının hızlı proliferasyonları nedeniyle, kombine onkolojik yaklaşımlara rağmen tedaviye dirençlidir. Astrositomalar biyolojik davranışlarında değişim göstermeleri, hızlı proliferasyonları, neden oldukları morbidite ve mortalite nedeniyle araştırma konusu olmaya devam etmektedir. Moleküler biyolojideki gelişmeler, tümör oluşumunda tümör baskılayıcı genlerdeki allel kaybını ortaya çıkarmıştır. Buna göre; P 53 tümör baskılayıcı genin apoptozu (programlanmış hücre ölümü) regüle ettiği, Rb gen mutasyonunun retinoblastoma ve sarkomlara yol açtığı (4), apoptotik hücre sayısında azalma ve bcl-2 (B Cell lenfoma-2) yüksekliğinin malignite ile ilişkili olduğu(14) ve cyclin A ve B1 in astrositomalarda malignite derecesini yansıttığı gösterilmiştir(1).

Yüksek grade'li astrositomalarda radikal cerrahi; hastanın yaşı, fonksiyonel durumu ve tümör lokalizasyonuna göre planlanır. Postoperatif eksternal radyoterapi, tedaviye eklenir. Kombine yaklaşımlara rağmen ortalama sağkalım glioblastomada 50 haftayla sınırlıdır. Yüksek gradeli astrositomalarda 2 yıllık % 20 olan sağkalım, tanı anında 40 yaş altında olan, postoperatif rezidü tümörü olmayan, postoperatif Karnofsky performansı yüksek olan hastalarda daha iyidir. Ancak agresif tedavi yapılan oldukça iyimser serilerde bile 36 aylık sağkalım %20'yi geçmemektedir (4,6).

Cyclin A ve bcl-2 ekspresyonunun; glioblastoma (grade IV) grubundaki hastalarda prognostik değeri; yaş, preoperatif semptom süresi, postoperatif performans skoru, yaşam süresi ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

## GEREÇLER VE YÖNTEM

Bu çalışmada,1996-2001 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi (23 hasta) ve Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsünde opere edilen (5 hasta) toplam 28 supratentorial diffüz astrositoma olgusunun dosya bilgileri retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Olguların 9'u grade II (% 32.1), 5'i grade III (%17.9), 14'ü grade IV (%50) olarak tespit edilmiştir. 15'i kadın (%53.5), 13'ü erkek

(%46.5) olan toplam 28 hastanın yaşları 10-74 arasında (ortalama yaş 42.2) değişmektedir. Olguların hepsine öncelikle cerrahi tedavi uygulanmış, grade III-IV hastalara postoperatif dönemde total 50-60 Gy radyoterapi uygulanmıştır. Grade IV hastalarda ise, takip süresi 24-64 hafta, ortalama 42.7 haftadır.

Parafin doku bloklarında immunohisto-kimyasal çalışma, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi patoloji laboratuvarında yapılmıştır. Biotin-Streptavidin immüno-enzimatik antijen gösterme yöntemi (Ultravision mouse HRP-AEC kit detection system) ile bcl-2 antibody (MS-123-R7 Neomarker Labvision, USA), cyclin-A antibody (MS-1061-R7 Neomarker Labvision, USA) kullanılmıştır. Parafin doku bloklarından alınan 4 mikron kalınlığında kesitler, ksilen ile deparafinize edildikten sonra etanol ile hidrate edilmiş, biotin ve streptavidin ile yapılan işlem sonrası cyclin A ile nükleer boyanma ve bcl-2 ile stoplazmik boyanma ışık mikroskopunda 400 büyütmede manuel olarak değerlendirilmiştir. 200 büyütme ile 500 hücre sayılarak (nekroz, lenfosit, damar duvarları değerlendirme dışında tutulmuştur) boyanma yüzdesi saptanmıştır.

İstatistiksel sonuçlar, bilgisayarda Windows altında SPSS 10.1 istatistik programında Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis ve Spearman korelasyon testleri ile değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

Olgulara ait veriler Tablo-I'de özetlenmiş, prognostik değerlendirmeye sadece grade IV olan hastalar dahil edilmiştir. Tümör hücrelerinin immunohistokimyasal boyanmaları resimlerde görülmektedir. Şekil-1,2,3,4,5,6.

Glioblastomalarda (grade IV) ortalama sağkalım 43.14 ±12.2 hafta olarak bulundu.

Bcl-2 boyanma yüzdesi; grade II 1.6 (±0.9), grade III 1.8 (±0.8), grade IV 2.2 (±0.6) olarak bulundu. Histolojik olarak malignite ile bcl-2 boyanma düzeyleri arasında ilişki istatistiksel olarak gösterilemedi (p=0.077).

Cyclin A oranları, grade II % 3.4 (±1.7), grade III % 18.4 (±10.1), grade IV %15.4 (±8.8) bulundu. Cyclin A oranları grade II ile grade III-IV arasında anlamlı farklılık saptandı (p=0001).

**Tablo-I: Olgulara ait klinik ve immunohistokimyasal sonuçlar**

	PATOLOJİ	YAŞ	CİNS	SEMPATOM SÜRESİ HAFTA	KPS	SAĞKALIM HAFTA	BCL-2	CYCLİN A
1	GRADE II	23	K				%2.6	% 6.8
2	GRADE II	22	E				%2.2	% 4.1
3	GRADE II	16	E				%1.4	% 1.28
4	GRADE II	45	K				%0.8	% 3.57
5	GRADE II	26	K				%1.2	% 3.36
6	GRADE II	66	K				%1.8	% 3.63
7	GRADE II	43	K				%1.0	% 1.13
8	GRADE II	46	K				%0.8	% 2.56
9	GRADE II	10	E				%2.2	% 3.74
10	GRADE III	65	K	18	90	84	%0.8	% 19.01
11	GRADE III	39	E	6	80	64	%0.4	% 20.51
12	GRADE III	42	K	14	60	64	%1.0	% 33.33
13	GRADE III	29	E	40	100	128	%1.6	% 13.27
14	GRADE III	40	K	20	90	88	%1.4	% 5.88
15	GRADE IV	48	K	6	80	44	%2.8	% 11.37
16	GRADE IV	46	E	10	90	56+	%0.8	% 7.89
17	GRADE IV	64	E	8	60	28	%1.4	% 19.53
18	GRADE IV	60	E	10	90	40	%1.8	% 11.76
19	GRADE IV	70	K	5	90	28	%2.8	% 18.09
20	GRADE IV	65	E	2	90	40	%3.6	% 10.11
21	GRADE IV	28	E	8	80	64	%1.2	% 3.40
22	GRADE IV	71	E	5	70	32	%0.6	% 10.41
23	GRADE IV	53	E	18	100	48	%1.4	% 7.74
24	GRADE IV	20	K	4	60	24	%1.2	% 32.45
25	GRADE IV	13	K	16	100	56	%4.2	% 13.84
26	GRADE IV	74	K	7	80	40	%0.4	% 13.30
27	GRADE IV	20	E	12	100	48	%5.2	% 24.52
28	GRADE IV	39	E	10	100	56	%2.8	% 32.07

Kruskal-Wallis testiyle cyclin A oranları karşılaştırıldığında anlamlı farklılık tespit edildi. Mann Whitney U testi ile yapılan ikili karşılaştırmalarda farklılığın Grade II grubundan kaynaklandığı saptandı.

Grade II astrositomalarda bcl-2 ve cyclin A arasında anlamlı korelasyon bulundu. Spearman korelasyon katsayısı  $r = 0.83$  ( $p=0.005$ ) Grade III ve IV arasında benzer ilişki saptanmadı. Tablo-II

Grade IV astrositomalarda; Yaş ile sağkalım arasında negatif korelasyon  $r=0.526$  ( $p=0.05$ ), preoperatif semptom süresi ile sağkalım arasında

**Tablo-II: Histolojik grade ile BCL-2 ve Cyclin A oranlarının karşılaştırılması**

	GRADE II (N=9) Ortalama (SD)	GRADE III (N=5) Ortalama (SD)	GRADE IV (N=14) Ortalama (SD)	P
BCL-2	1,56 (0,88)	1,80 (0,84)	2,21 (0,58)	0,077
CYCLIN A	3,36 (1,68)	18,4 (10,1)	15,4 (8,8)	0,001*

\* $p < 0,05$

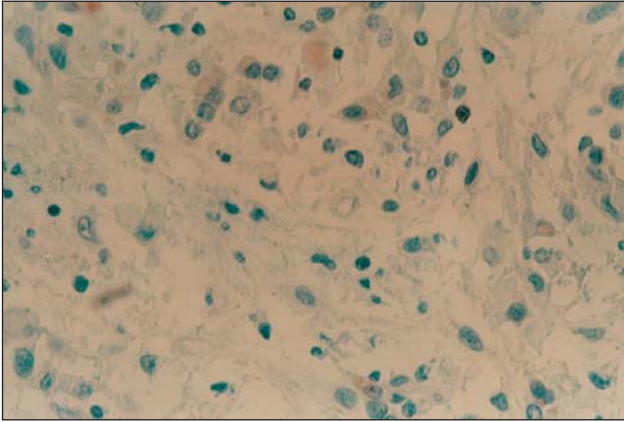
pozitif korelasyon  $r=0.653$  ( $p=0.01$ ), postoperatif Karnofsky performans skalası ile sağkalım arasında pozitif korelasyon  $r=0.606$  ( $p=0.022$ ) bulundu. Tablo-III

**Tablo-III: Grade IV olgularda yaşam süresinin prognostik parametrelerle korelasyonu**

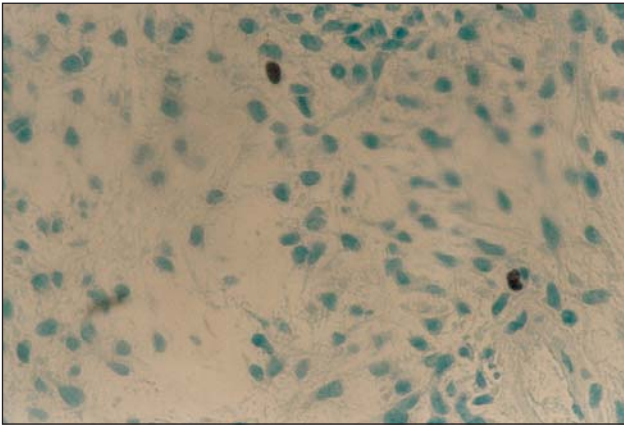
N=14

YAŞAM SÜRESİ	Spearman Korelasyon katsayısı (r)	P
YAŞ	-0,52	0,05*
SEMPATOM SÜRESİ	0,65	0,011*
POSTOP KPS	0,6	0,022*
BCL2	-0,04	0,88
CYCLIN A	-0,4	0,14

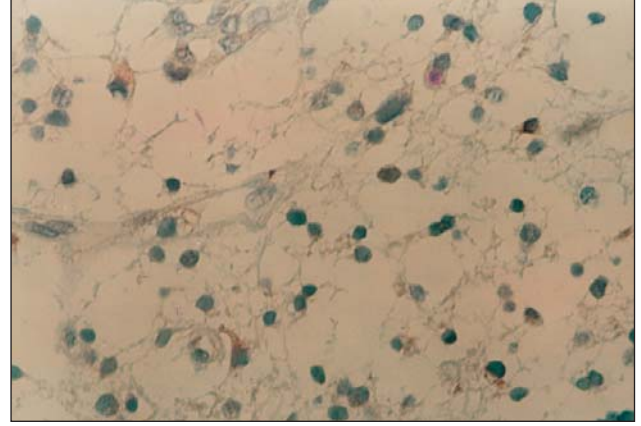
\* $p \leq 0,05$



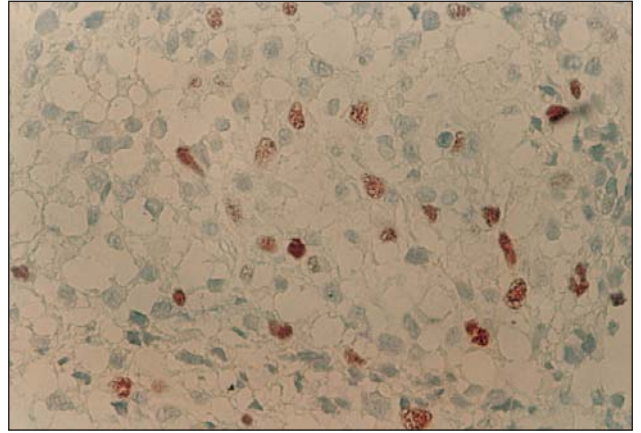
**Şekil 1:** Grade II astrositoma; bcl-2 immunohistokimyasal boyanma, mikroskopik 400 büyütme



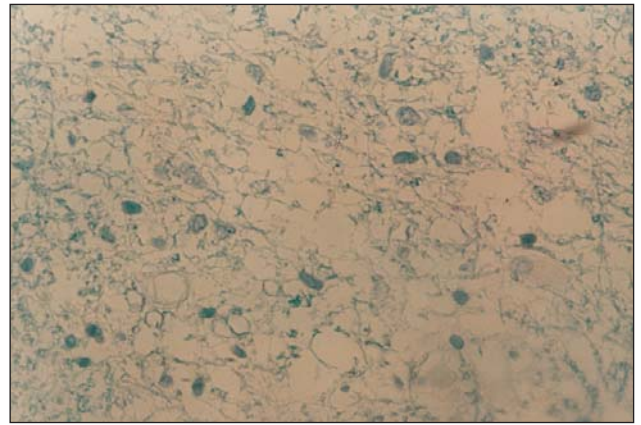
**Şekil 2:** Grade II astrositoma; cyclin A immunohistokimyasal boyanma, mikroskopik 400 büyütme



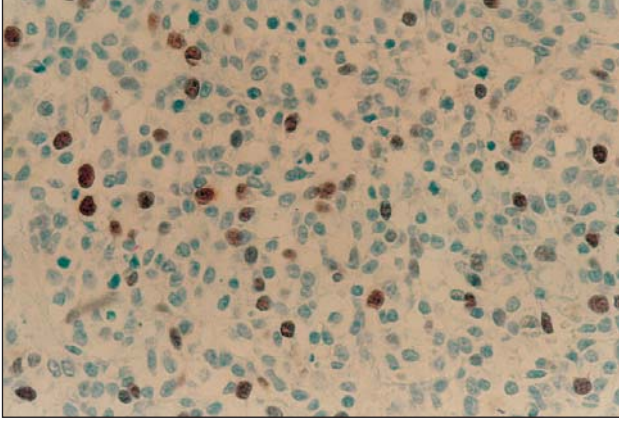
**Şekil 3:** Grade III astrositoma; bcl-2 immunohistokimyasal boyanma, mikroskopik 400 büyütme



**Şekil 4:** Grade III astrositoma; cyclin A immunohistokimyasal boyanma, mikroskopik 400 büyütme



**Şekil 5:** Grade IV astrositoma; bcl-2 immunohistokimyasal boyanma, mikroskopik 400 büyütme



Şekil 6: Grade IV astrositoma; cyclin A immunohisto-kimyasal boyanma, mikroskopik 400 büyütme

## TARTIŞMA

Cyclin'ler hücre döngüsü kontrolünde görev alan düzenleyici proteinlerdir. Hücre döngüsü; p16, CDK (cyclin-depended kinase), cyclin ve pRB kontrolündedir(4). Cyclin A, B<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, E siklus regülatörü iken, diğer cyclinlerin hücre maturasyonu dışındaki rolleri bilinmemektedir. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), MIB-1 ve S fazı flow sitometri başlıca proliferasyon göstergeleridir. Cyclinler ve CDK tümör baskılayıcı genlerin kontrolündedir. Cyclin A geç G<sub>1</sub> fazında S fazı (DNA sentezi) öncesindeki bir moleküldür. Hematolojik tümörler, meme karsinomu ve kolorektal karsinomunda yüksek olarak saptanmıştır. Normal beyin dokusunda, cyclin A ekspresyonu saptanmazken, astrositik tümörlerde çeşitli serilerde histolojik grade'e göre farklı oranlarda boyanma yüzdeleri saptanmıştır (1, 2, 11). Cyclin A düzeyini etkileyen diğer faktörler P53, pRB, CDK2 düzeyidir (2). Cyclin D<sub>1</sub> erken G<sub>1</sub> fazında fonksiyoneldir. 46 glial kitleli hasta grubunda cyclin D<sub>1</sub> grade IV astrositomada en yüksek bulunmuş, sonuçta gen amplifikasyonu olmadan cyclin D<sub>1</sub> düzeyinin glial tümörde agresif biyolojik davranışla ilişkili olduğu gösterilmiştir (13).

Son yıllardaki yayınlarda genel olarak astrositomalarda farklı proliferasyon göstergelerinin histolojik grade ile korelasyonu gösterilmesine karşı, olguların sağkalımı ile korelasyonu tartışma konusudur. Bizim çalışmamızda, S fazına spesifik proliferasyon göstergesi olarak cyclin A düzeyi

grade II astrositomalarda %3.4 bulundu. Grade III-IV hastalarda cyclin A düzeyinin yüksekliği dikkat çekiciydi, ancak bu çalışmaların tersine bizim çalışmamızda grade III astrositomada %18.4 olan cyclin A oranı grade IV hastalarda %15.4 bulundu. Cyclin A oranları ile yaşam süreleri arasındaki negatif korelasyon, istatistiksel olarak glioblastoma olgularında gösterilemedi.

Bcl-2 geni programlanmış hücre ölümünü kontrol eden kompleks grup genlerden birisidir. Apoptozu bloke ederek hücrenin yaşam süresini uzatır, bu yüzden tümör prognozunu etkileyen bir genidir. Bcl-2 ekspresyonu ilk kez B hücreli lenfomada gösterilmiştir. Bcl-2 varlığı gliomlarda invazyon ve migrasyonu artırmaktadır. Bcl-2 yüksekliği düşük gradeli astrositomalarda da gösterilmiş, ancak prognoza etkisi gösterilememiştir (3, 5). Bcl-2 ekspresyonuyla ilişkili apoptoz ile proliferasyon arasındaki dengenin tümör prognozundaki önemi vurgulanmıştır. Bcl-2 aşırı ekspresyonu adjuvan tedaviye dirençle ilgilidir. Apoptoz ana kontrol noktası p53 kontrolü altındadır. Bununla ilişkili wild tip p53 ekspresyonu ile bcl-2 ekspresyonun yüksekliği gösterilmiştir. Nakasu ve arkadaşları tarafından tekrarlayan gliomalarda bcl-2 yüksekliği gösterilmiş ancak sağkalım ile korelasyon bulunamamıştır (10).

168 glioblastoma olgusunu içeren çalışmada PCNA, bcl-2, EGFR, p53 değerleri araştırılmış; p53 ile bcl-2 değerleri prognozla ilişkili bulunmamıştır (6). Bcl-2 boyanma yüzdesi grade IV astrositomalar için ortalama %9.5 olarak belirtilmiştir.

Bizim çalışmamızda, apoptotik sürecin inhibitör proteinlerinden bcl-2, Grade II olgularda 1.56 (±0.88), Grade III olgularda 1.80 (±0.84), Grade IV olgularda 2.21 (±0.58) olarak bulundu. Çalışmamızda, histolojik grade ile bcl-2 düzeyleri arasında korelasyon izlendi. Ayrıca Grade II astrositomalarda bcl-2 ve cyclin A arasında anlamlı korelasyon bulundu. [Spearman korelasyon katsayısı 0.83 (p=0.005)]. Proliferasyon yüksekliği ile apoptozdaki inhibisyonun korelasyonu anlamına gelen bu ilişki Grade III ve IV astrositomalarda gösterilemedi.

## SONUÇ

28 astrositoma olgusunu içeren çalışmamızda, grade II ile grade III ve IV astrositomalar arasında cyclin A düzeyleri arasında belirgin farklılık saptadık. Ancak grade III astrositomalarda cyclin A

düzeği grade IV astrozitomalardan daha yüksek bulundu. Bu sonucun gruplardaki hasta sayılarındaki farklılıktan dolayı kaynaklandığı düşünöldü. Ortalama bcl-2 düzeyleri ile histolojik grade arasında korelasyon izlendi. Grade II astrozitomalarda bcl-2 ve cyclin A düzeyleri arasında istatistiksel olarak gösterilen korelasyon grade III ve IV astrozitomalarda gözlenmedi.

Grade IV astrozitomalarda proliferasyon göstergesi olarak cyclin A ile sağkalım arasında ilişki saptanmadı. Apoptoz inhibitörü olan bcl-2 düzeyi ile sağkalım arasında ilişki izlenmedi.

Cyclin A ve bcl-2'nin histolojik gradelemede bilinen parametrelere ek olarak kullanılabileceği; apoptoz inhibitörü olan bcl-2'nin tek başına apoptoz sürecini yansıtmadığı, bu nedenle daha geniş hasta grubunda özellikle kompleks bir süreç olan apoptozis ile ilişkili diğer proteinleri de içeren çalışmaların yapılması gerektiği düşünöldü. Ancak literatürdeki diğer çalışmalarda göröldüğü gibi bizim çalışmamızda prognoza ilişkin olarak anaplastik astrozitoma dışında glioblastomada prognostik faktör olarak anlamlılık gözlenmemiştir.

## KAYNAKLAR

- Allan K, Jordan RC, Ang LC, Taylor M, Young B: Overexpression of cyclin A and cyclin B1 proteins in astrocytomas. Arch Pathol Lab Med. 124(2):216-220, 2000
- Chakrabarty A, Bridges LR: Immunohistochemical analysis of cyclin A in astrocytic tumours. Neuropathol Appl Neurobiol. 24(3):239-245, 1998
- Fels C, Schafer C, Huppe B, Bahn H, Heidecke V, Kramm CM, Lautenschlager C, Rainov NG: Bcl-2 expression in higher-grade human glioma: a clinical and experimental study. J Neurooncol. 48(3):207-16, 2000
- Gonzales MF: Classification and pathogenesis of brain tumors. Kaye AH, Laws Jr ER.(ed) Brain Tumors An encyclopedic approach, ikinci baskı, London. Churchill Livingstone 2001: 29-49
- Krishna M, Smith TW, Recht LD: Expression of bcl-2 in reactive and neoplastic astrocytes; lack of correlation with presence or degree of malignancy. J Neurosurg. 83(6):1017-1022, 1995
- Korshunov A, Golanov A, Sycheva R, Pronin I: Prognostic value of tumour associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas; an analysis of 168 cases. J Clin Pathol. 52(8):574-580, 1999
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R: PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. Science. 28;275(5308):1943-1947, 1997
- Mizoguchi M, Inamura T, Shono T, Ikezaki K, Inoha S, Ohgami S, Fukui M: A comparative study of apoptosis and proliferation in germinoma and glioblastoma. Neuro-oncol. 2(2):96-102, 2000
- Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Deimling A, Poustka A: DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. Nat Genet. 17(1):32-39, 1997
- Nakasu S, Nakasu Y, Nioka H, Nakajima M, Handa J: bcl-2 protein expression in tumors of the central nervous system. Acta Neuropathol (Berl). 88(6):520-526, 1994
- Ren Y, Munyer P, Kepes JJ, Cansler M, Collins J, Gayed B, Tawfik O: Comparison of cyclin A and MIB-1 expression in astrocytic tumors using image based cell analysis system. Appl Immunohistochem Mol Morphol 9(1): 14-18, 2001
- Sallinen PK, Haapasalo HK, Visakorpi T, Helen PT, Rantala IS, Isola JJ, Helin HJ: Prognostication of astrocytoma patient survival by Ki-67 (MIB-1), PCNA, and S-phase fraction using archival paraffin-embedded samples. J Pathol. 174(4):275-282, 1994
- Sallinen SL, Sallinen PK, Kononen JT, Syrjäkoski KM, Nupponen NN, Rantala IS, Helen PT, Helin HJ, Haapasalo HK: Cyclin D1 expression in astrocytomas is associated with cell proliferation activity and patient prognosis. J Pathol.188(3):289-293, 1999
- Yew DT, Wang HH, Zheng DR: Apoptosis in astrocytomas with different grades of malignancy. Acta Neurochir (Wien). 140(4):341-347, 1998