VAN TIP DERGİSİ Medical Journal

KLİNİK ÇALIŞMA / CLINICAL RESEARCH

Van Tıp Derg 28(4): 513-515, 2021

DOI: 10.5505/vtd.2021. 45143

Van İli ve Çevresindeki Meme Neoplazilerinde Epstein-Barr Virüsünün Araştırılması

Investigation of Epstein-Barr Virus in Breast Neoplasms in and around the Van Province

İbrahim Aras[1*], Remzi Erten[1], Feyza Demir[2], Sadi Elasan[3]

[1]*Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye*

[2]*Özel Büyük Çukurova Patoloji Laboratuarı, Adana, Türkiye*

[3]*Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Van, Türkiye*

Özet

Amaç: Epstein Barr virüsü(EBV) insanda birçok kanser türüyle ilişkilendirilmiş bir virüs tipidir. EBV ile meme kanseri arasındaki ilişki birçok çalışmada değişkenlik göstermektedir. Biz de kendi bölgemizdeki meme neoplazilerinde EBV'nin varlığını araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada 57 hastanın parafin bloklara gömülü meme biyopsi örnekleri kullanıldı. Bu hastaların 20'si fibroadenom tanısı, 37'si ise invaziv duktal karsinom tanısı almıştı. Bu 37 invaziv duktal karsinom hastası Bloom Richardson sisteminin Nottingham modifikasyonuna göre 13'ü grade 1, 12'si grade 2 ve 12'si grade 3 olarak derecelendirildi. Tüm biyopsilere EBV varlığını araştırmak üzere Epstein-Barr Virus Early RNA (EBER) in situ hibridizasyon yöntemi uygulandı.

Bulgular: EBER in situ hibridizasyon yöntemi sonucunda 20 fibroadenomun 5'inde, 13 Grade 1 invaziv duktal karsinomun 4'ünde ve 12 Grade 2 invaziv duktal karsinomun 2'sinde pozitif boyanma izlendi. Grade 3 invaziv duktal karsinom tanılı vakaların tamamı negatifiti.

Sonuç: Bizim çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmasa da bazı tümör hücrelerinde boyanma izlendiğinden, EBV varlığını göstermede daha sensitif olabileceği düşünülen ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünüldü.

Anahtar kelimeler: EBV; meme neoplazileri; İn situ hibridizasyon

Abstract

Objective: Epstein Barr virus (EBV) is a type of virus associated with many types of cancer in humans. The relation between EBV and breast cancer varies in different studies. We also studied the presence of EBV in breast neoplasms, in our region.

Materials and Methods: In this study, breast biopsy samples from 57 patients embedded in paraffin blocks were used. Twenty of these patients were diagnosed with fibroadenoma. Thirty-seven of the patients were diagnosed with invasive ductal carcinoma. Out of the 37 invasive ductal carcinoma patients, 13 were graded as grade 1, 12 as grade 2 and 12 as grade 3 based on the Nottingham modification of the Bloom Richardson system. Epstein-Barr Virus Early RNA (EBER) in situ hybridization method was applied to all biopsies to research the presence of EBV.

Results: The EBER in situ hybridization method shows, positive staining in 5 of 20 fibroadenomas, 4 of 13 Grade 1 invasive ductal carcinomas and 2 of 12 Grade 2 invasive ductal carcinomas. All cases with grade 3 invasive ductal carcinoma were negative.

Conclusion: Although there was no statistically significant difference in our study, it was thought that further studies which are more sensitive on demonstrating the presence of EBV are needed, since staining was observed in some tumor cells.

Key words: EBV; Breast neoplasms; In situ hybridization

Giriş

Meme kanseri dünyada en sık görülen kanserlerden olup kanser ile ilişkili ölümlerin başında gelmektedir. Kanser kayıt birimi tarafından yayınlanan 2015 kanser raporu verilerine göre 2015'te 17 binden fazla kadına meme kanseri teşhisi konulmuştur. Türkiye'de ise 1994'te 100 bin kişide 24 kişide meme kanseri görülürken 2015'te bu sayı 43.8'e yükselmiştir (1). Meme kanseri gelişmekte olan ülkelerde ve genç yaş grubunda daha sık görülmekle birlikte şu ana kadar bilinen risk faktörleriyle bu ilişki tam olarak açıklanamamıştır (2). Epstein Barr virüsü (EBV) Human Herpes virüs ailesinden olup insanların yaklaşık %90-95'i çocukluk döneminde veya erken adolesan dönemde bu virüsle enfekte olmaktadır (3). EBV'nin Burkitt lenfoma, nazofarinks karsinomu ve Hodgkin lenfoma gibi birçok hastalıkla ilişkisi gösterilmiştir (2). EBV ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran birçok makale olup sonuçlar tartışmalıdır. Bunun nedeninin yapılan araştırmaların ırk, coğrafya, kullanılan yöntemler ve meme kanseri subtiplerinin

***Sorumlu Yazar:** İbrahim Aras Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Tuşba, Van, Türkiye 65080 **Tel:** 0 (432) 215 04 70, 0 (505) 724 07 43 **E-mail:** brahmaras@hotmail.com **Orcid:** İbrahim Aras 0000 0003 4911 3922, Remzi Erten 0000 0001 7775 5792, Feyza Demir 0000 0003 3553 7791, Sadi Elasan 0000 0002 3149 6462

Geliş Tarihi:30.01.2021, **Kabul Tarihi:**17.08.2021

farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir (4). Biz de yaptığımız bu çalışmada, Epstein-Barr Virus Early RNA (EBER) in situ hibridizasyon (ISH) yöntemini kullanarak, kendi bölgemizdeki farklı derecelerdeki meme kanserlerinin klinik, histopatolojik ve östrojen, progesteron ve cerbb2 gibi immünhistokimyasal bulgularının EBV ile ilişkisini ortaya çıkarmak ve literatür bilgileriyle karşılaştırmayı amaçladık.

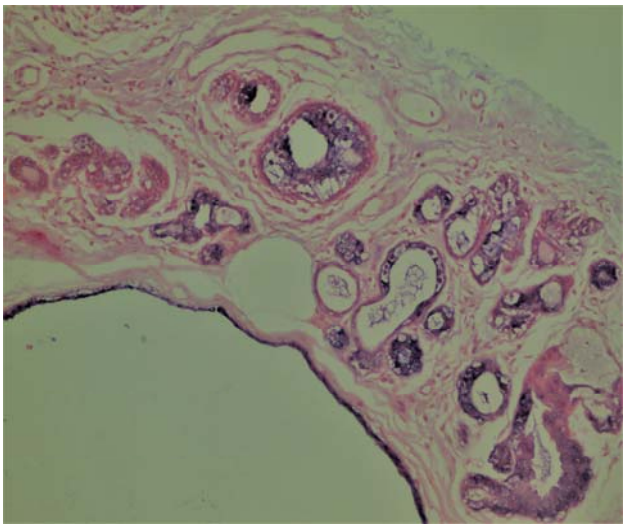
Gereç ve Yöntem

Bu çalışma için Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 22.05.2020 tarih 2020/03-14 nolu karar ile izin alınmıştır.

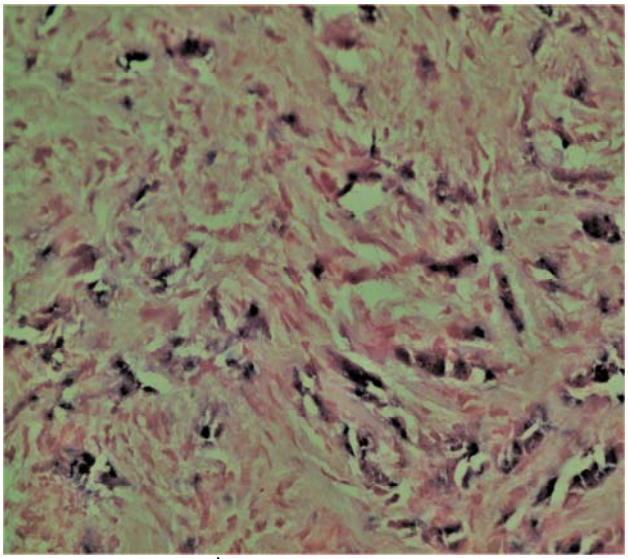
Hastalar ve örnekler: Bu çalışmada, ilimizde 2018-2019 yılları arasında invaziv meme kanseri ve fibroadenom tanısı almış, yaşları 29 ile 80 arasında değişen, 57 kadın hastanın meme trucut biyopsi dokularından elde edilmiş ve patoloji arşimizde mevcut olan parafin blokları kullanıldı. Dokuları seçerken hem mevcut çalışmaya yeterli olmasına, hem de çalışmada kullanılan dokunun ileri zamanda hasta veya hasta yakını tarafından başka bir merkezde tekrar değerlendirilmesi amacıyla teslim alınması durumunda yeterli miktarda doku bulunmasına özen gösterildi. Dokuların 37'si invaziv duktal karsinom, 20'si fibroadenom (Grup 1) tanısı almış hastaların dokularıydı. 37 invaziv duktal karsinom hastasının 13'ü Grade 1 (İyi diferansiye) (Grup 2), 12'si Grade 2 (Orta derecede diferansiye) (Grup 3) ve 12'si Grade 3 (Grup 4) (Az diferansiye) olarak derecelendirilmiştir. Derecelendirmede Bloom Richardson Sisteminin Nottingham modifikasyonu kullanıldı (5).

İn situ hibridizasyon: İn situ hibridizasyon için, rutin olarak işlenip %10'luk formaldehitte fikse edildikten sonra parafine gömülmüş arşiv dokularından 4 um kalınlığında kesitler alındı. In situ hibridizasyon, INFORM EBER probu (Ventana Medical Systems Inc) ve bu hibridize prob sinyalini tespit etmek için ISH iVIEW Blue plus kiti (Ventana) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Kesitler alındıktan sonra boyanma protokolüne geçildi. Boyanma protokolü, reaktiflerin belli sıcaklıklarda, önceden belirlenen sürelerde inkübe edildiği birçok adımdan oluşmaktadır. Her enkübasyon adımının sonunda, BenchMark ULTRA(Ventana) cihazı bağlanmayan materyali uzaklaştırmak için kesitleri yıkandı ve lamdan sulu reaktiflerin buharlaşmasını en aza indiren sıvı lamelleme çözeltisi uygulandı. Bu protokolün ardından ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirme yapıldı. Eğer bir tümör hücre nükleusunda veya stoplazmasında koyu mavi veya siyah boyanma izlenirse pozitif boyanma olarak kabul edildi (6). Pozitif kontrol için andiferansiye nazofarinks karsinomu doku kesiti kullanıldı.

İstatistiksel analiz: Klinikopatolojik parametreler ile immünhistokimyasal bulguların EBV varlığı ile arasındaki ilişkinin araştırılması amacıyla yapılan bu araştırmanın örnek genişliğini hesaplamada, her değişken için power (testin gücü) en az %80 ve 1. tip hata %5 alınarak belirlenmiştir. Çalışmadaki kategorik değişkenler için tanımlayıcı istatistikler sayı ve oran olarak ifade edilmiştir. "EBER pozitifliği" ile "gruplar" arasındaki ilişkiyi belirlemede Ki-kare testi kullanılmıştır. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi (a) %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS (IBM SPSS for Windows, ver.24) istatistik paket programı kullanılmıştır.



Resim 1. Fibroadenom tanılı hastadaki meme asinüslerinde EBER ile boyanma izlendi. (EBER x200)



Resim 2. Grade 1 İnvaziv duktal karsinom hücrelerinde EBER ile boyanma izlendi. (EBER x400)

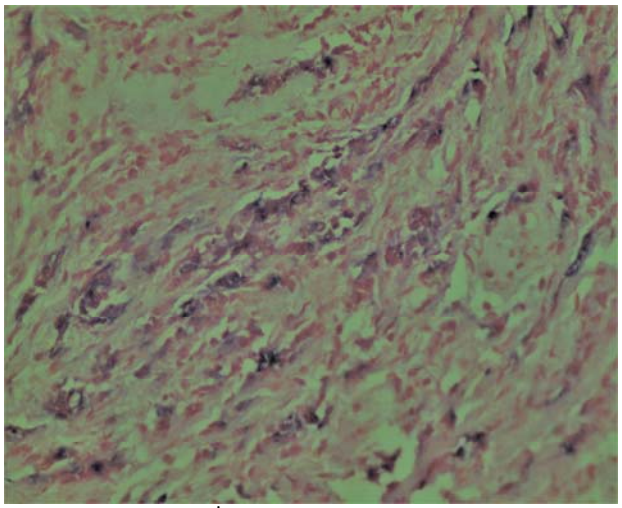
Tablo 1: Gruplara göre EBER pozitiflik oranlarının karşılaştırılması

EBER	Pozitif	Negatif	*p	*p
1. Grup (Fibroadenom)	5	15		
2. Grup Grade 1 İDC (Kanser)	4	9		0.423
3. Grup Grade 2 İDC (Kanser)	2	10	0.114	
4. Grup Grade 3 İDC (Kanser)	0	12		
Östrojen pozitif	4	24	0.574	
Östrojen negatif	2	7		
Progesteron pozitif	1	24	0.006	
Progesteron negatif	5	7		
Cerbb2 pozitif	1	9	0.532	
Cerbb2 negatif	5	22		
Kib7 %15 ve fazlası	4	23	0.704	
Ki67 %15 den az	2	8		
50 yaş altı	3	12	0.606	
50 yaş üstü	3	19		

* Ki-kare testi sonuçlarına göre anlamlılık düzeyleri İDC: İnvaziv Duktal Karsinom EBER: Epstein-Barr Virus Early RNA

Bulgular

EBV varlığının araştırılması: EBV varlığı, %64.9'u (n=37) invaziv duktal karsinom ve %35'i (n=20) fibroadenom olmak üzere 57 vakada araştırıldı. EBER in situ hibridizasyon yöntemi sonucunda 20 fibroadenomun %25'inde (n=5) (Resim 1) ve 37 invaziv karsinomun %16.2'sinde (n=6) pozitif boyanma izlendi. Bu invaziv karsinomlardan, 13 Grade 1 invaziv duktal karsinomun %30.7'sinde (n=4) (Resim 2) ve 12 Grade 2 invaziv duktal karsinomun %16.6'sında (n=2) (Resim 3) pozitif boyanma izlendi. Grade 3 invaziv duktal karsinom tanılı vakaların ise tamamı negatifti.



Resim 3. Grade 2 İnvaziv Duktal karsinom hücrelerinde EBER ile boyanma izlendi. (EBER x400)

EBER pozitif vakalarda klinik, histopatolojik ve immünhistokimyasal özellikler: Gruplara göre EBER pozitiflik oranları karşılaştırıldığında kanser olmayan 1.grubun Eber pozitiflik oranı (5/20) ile kanser olan 2.-3. ve 4. grupların toplam EBER pozitiflik oranları (6/37) arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık gözlenememiştir ($p>0.05$). Başka bir ifadeyle, kanser olan ve olmayan bu iki gruba göre EBER pozitiflik oranları birbirine benzer bulunmuştur. Farklı derecelerde meme kanseri tanısı almış 2., 3. ve 4. Grupların EBER pozitiflik oranları karşılaştırıldığında da istatistik olarak anlamlı bir farklılık gözlenememiştir ($p>0.05$). Ayrıca EBER pozitif ve negatif vakalar arasında yaş, Ki67 proliferasyonu indeksi, östrojen ve cerbb2 ekspresyonları arasında anlamlı ilişki izlenmedi ($p>0.05$). Bununla birlikte EBER pozitif ve negatif vakalar arasında progesteron ekspresyonun karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.05$). Progesteron ekspresyonu göstermeyen invaziv duktal karsinom vakalarında daha fazla EBER pozitifliği izlenmiştir. Klinikopatolojik bilgiler ve immünhistokimyasal sonuçlarla EBER pozitif ve negatif kanserler arasındaki ilişki Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tartışma

Bazı çalışmalar meme kanseri hücrelerinde EBV'nin varlığını göstermiş olsa da, meme kanserinde EBV'nin onkolojik rolü henüz tam olarak ortaya konmamıştır. Bununla birlikte birkaç çalışmada EBV'nin meme kanseri hücresinde

aptanmasının kötü prognozla ilişkili olabileceği de belirtilmiştir (7). Noha ve ark. (8) yaptığı çalışmada lenf nodu tutulumu ile EBV pozitif vakalar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin olduğu gösterildi. Hachana ve ark. (9) yaptığı çalışmada ise östrojen negatifliği ile EBV pozitif vakalar arasında anlamlı ilişki bulundu. Bu çalışmalar bu bulgularla EBV varlığının kötü prognozu gösterdiğini idda etmektedir. Bizim çalışmamızda ise EBER pozitif vakalar ile kötü prognoz faktörü sayılabilecek parametrelerden biri olan progesteron negatifliği arasında istatistiksel olarak ilişki izlenmekle birlikte iyi diferansiye (Grade 1) meme kanserlerinin %30.7'sinde(n=4), orta derecede diferansiye (Grade 2) meme kanserlerinin %16.6'sında (n=2) EBER pozitifliği izlenirken, az diferansiye (Grade 3) meme kanserli 12 olguda boyanma izlenmediğinden kötü prognozla kesin bir ilişki kurulamamıştır. EBV'nin onkoproteinin bazı farklı tipteki kanser hücrelerinde eksprese edildiği gösterilmiştir. Burkitt lenfomada Epstein Barr Nükleer Antigen (EBNA1) ve EBER, nazofarinks karsinomunda EBNA1, Latent membran protein (LMP1), LMP2, EBER, mide karsinomunda EBNA1, LMP2, EBER, T/Natural killer hücreli lenfomada EBNA1, LMP1, LMP2, EBER, hodgkin lenfomada EBNA1, LMP1, LMP2, EBER onkoproteinleri eksprese edilir (10). Biz de bu çalışmamızda EBV ile ilişkili kanser hücrelerinde yaygın olarak saptanan onkogen olan EBER'i araştırdık. Farklı ülkelerde yapılan araştırmalarda meme kanseri ile EBV arasındaki ilişki %1 ile %68 arasında ciddi değişkenlik göstermektedir (2,6,8,11,12,13,14,15). EBV ile ilişkili nazofarinks karsinomu, Burkitt lenfoma veya Hodgkin lenfoma gibi neoplazilerin coğrafik olarak dağılımının farklılık gösterdiği düşünülmektedir (6). Coğrafik farklılıkların da etkilediği düşünülen EBV-meme kanseri ilişkisini göstermek için bölgemizde(Van) yaptığımız çalışmada 37 meme kanser hastasının 6'sında EBER pozitifliği izledik fakat fibroedenom grubuyla istatistiksel fark izlemedik. Bununla birlikte retrospektif çalışma olması ve biyopsi örneklerinde bu çalışmanın yapılması sebebiyle lenf nodu metastazı ve tümör çapı gibi önemli parametreler çalışmaya dahil edilemedi. EBV ile ilişkili birçok kanser türünde, tümör hücrelerinde yaygın EBER pozitifliği izlenmesine karşın, bazı çalışmalar meme kanserinde EBV araştırılması için Polymerase Chain Reaction (PCR) yönteminin EBER'e göre daha sensitif olduğunu ileri sürer (9). Bizim çalışmamızda ise PCR yöntemi yapılmamasına rağmen, her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da meme kanseri vakalarında %16.2'sinde (n=6), fibroadenom vakalarının ise %25'inde (n=5) EBER pozitifliği görüldüğünden, bölgemizde ileride PCR yöntemiyle çalışma yapılmasının daha sağlıklı sonuçlar verebileceği düşünüldü.

Sonuç

İstatistiksel olarak benign ve malign neoplaziler arasında farklılık göstermemekle birlikte bölgemizdeki meme neoplazilerinin bazılarında tümör hücrelerinde EBER varlığı gösterildi. Bu yüzden bölgemizdeki meme neoplazilerinin patogenezinde EBV'nin rol oynayabileceğini düşünmekle birlikte EBV varlığını göstermede daha sensitif olabileceği düşünülen PCR yöntemi başta olmak üzere ileri çalışmaların yapılmasının bu konuda daha sağlıklı sonuçlar vereceği düşünüldü.

Çıkar çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal beyan: Herhangi bir finansal destek sağlanmamıştır.

Yazar katkıları: Makalenin ana fikrinin belirlenmesi, literatür taanması, makalenin yazımı ve materyallerin seçimi İbrahim Aras, Feyza Demir ve Remzi Erten tarafından yapıldı. İstatistik değerlendirme ve materyallerin seçimi Sadi Elasan tarafından yapıldı.

Etik onam: Bu çalışma için Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 22.05.2020 tarih 2020/03-14 nolu karar ile izin alınmıştır.

Kaynaklar

1. Özmen V, Özmen T, Doğru V. Breast Cancer in Turkey; An Analysis of 20.000 Patients with Breast Cancer. Eur J Breast Health 2019; 15(3): 141-146.
2. Bae JM, Kim EH. Epstein-Barr Virus Infection and Risk of Breast Cancer: An Adaptive Meta-Analysis for Case-Control Studies. Arch Clin Infect Dis 2016; 11(3):e34806.
3. Khabaz MN. Association of Epstein-Barr virus infection and breast carcinoma. Arch Med Sci 2013; 9(4): 745-751.
4. Khan G, Philip PS, Ashari MA. Is Epstein–Barr virus associated with aggressive forms of breast cancer? Br J Cancer 2011; 104(8): 1362-1363.
5. 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(5): 403-410.

6. Chu PG, Chang KL, Chen YY, Chen WG, Weiss LM. No Significant Association of Epstein-Barr Virus Infection with Invasive Breast Carcinoma. American Journal of Pathology 2001; 159(2): 571-578.
7. Mazouni C, Fina F, Romain S, Ouafik L, Bonnier P, Martin PM. Outcome of Epstein-Barr virus-associated primary breast cancer. Mol Clin Oncol 2015; 3(2): 295-298.
8. El-Naby NEH, Hassan Mohamed H, Mohamed Goda A, El Sayed Mohamed A. Epstein-Barr virus infection and breast invasive ductal carcinoma in Egyptian women: A single center experience. J Egypt Natl Canc Inst 2017; 29(2): 77-82.
9. Hachana M, Amara K, Ziadi S, Romdhane E, Gacem RB, Trimeche M. Investigation of Epstein–Barr virus in breast carcinomas in Tunisia. Pathol Res Pract 2011; 207(11): 695-700.
10. Sharifpour C, Makvandi M, Samarbafzadeh A, Talaei-Zadeh A, Ranjbari N, Nisi N, et al. Frequency of Epstein–Barr Virus DNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue of Patients with Ductal Breast Carcinoma. Asian Pac J Cancer Prev 2019; 20(3): 687-692.
11. McCall SA, Lichy JH, Bijwaard KE, Aguilera NS, Chu WS, Taubenberger JK. Epstein-Barr virus detection in ductal carcinoma of the breast. J Natl Cancer Inst 2001; 93(2): 148 -150.
12. Mohamed WS, Mohamed MA, Omar MM. Possible involvement of Epstein-barr Virus (EBV) in pathogenesis and prognosis of female breast infiltrating duct carcinoma: clinicopathological, immunohistochemical and molecular study. The Egy J Med Microbiol 2007; 16(2): 403 -414.
13. Glenn WK, Heng B, Delprado W, Iacopetta B, Whitaker NJ, Lawson JS. Epstein-Barr virus, human papillomavirus and mouse mammary tumour virus as multiple viruses in breast cancer. PLoS One 2012; 7(11): 48788.
14. Richardson AK, Currie MJ, Robinson BA, Morrin H, Phung Y, Pearson JF, et al. Cytomegal Epstein-Barr Virus Breast Cancer. PLoS One 2015; 10(2) : 118989.
15. Yahia ZA, Adam AA, Elgizouli M, Hussein A, Masri MA, Kamal M, et al. Epstein Barr virus: a prime candidate of breast cancer aetiology in Sudanese patients. Infect Agent Cancer 2014; 9(1): 9.