

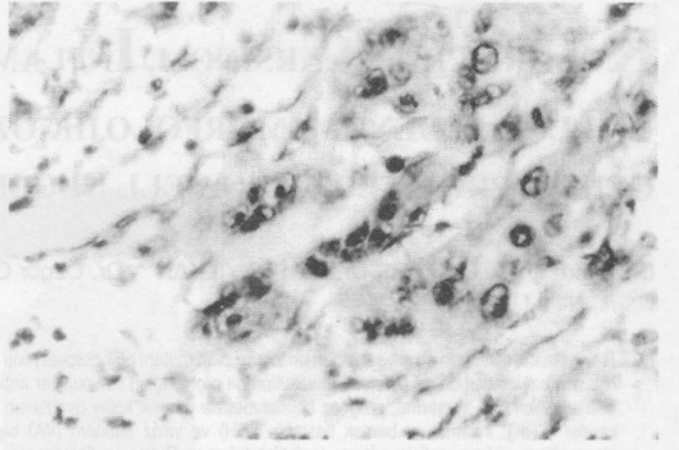
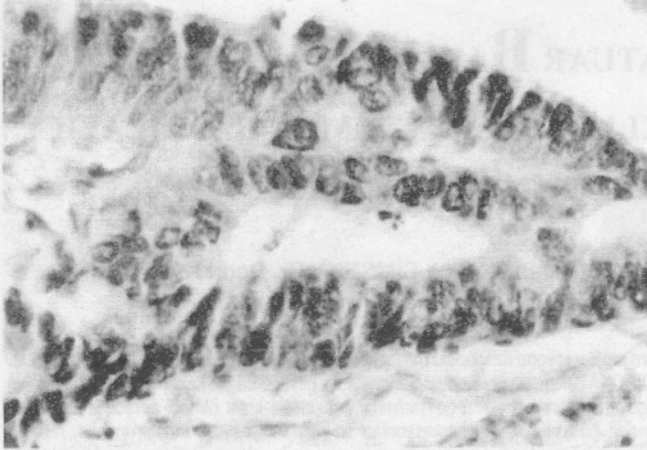
KOLOREKTAL KARSİNOM, İNFLAMATUAR BARSAK HASTALIĞI VE VİLLÖZ ADENOM: MORFOLOJİK ÖZELLİKLER, p53 TÜMÖR BASKILAYICI GEN VE PROLİFERATING CELL NUCLEAR ANTİGEN*

Dr. Şükrü O. ÖZDAMAR*, Dr. Esin ÖZYILKAN**, Dr. Özgür ÖZYILKAN**, Bio. Necla ŞİMŞEK*, Dr. Bedri KANDEMİR*, Dr. A. Naki ULUSOY***

ÖZET: Neoplastik dokuların en sık saptanan anomalisi olan mutant p53 ekspresyonu hücre proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkinin kalkmış olduğunun bir göstergesidir. Mitozun başlamasında rol oynayan moleküllerden proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ekspresyonunun gösterilmesi de gittikçe değer kazanan bir proliferasyon belirleyicisidir. Bu araştırma, prognoz belirlenmesine yönelik kolay uygulanan ve güvenilir parametrelerin geliştirilmesi çabalarına katkı olması amacıyla kolorektal kanser (KRK), inflamatuvar barsak hastalığı (İBH) ve villöz adenom (VA) olgularında p53 ve PCNA ekspresyonları ile diferansiyasyon, mitotik indeks, nükleer pleomorfizm, nekroz, gelişim paterni, lenfatik tutulum ve Duker sınıflaması arasındaki ilişkiler incelendi. Olgulara ait ve kontrol grubu olarak seçilen normal karakterde rektum mukoza doku örnekleri %10 tamponlu nötral formalin fikse parafin kesitlerinde hücre içi intranükleer p53 (clone: BP53.12) ve PCNA (clone: P10) immünohistokimyasal yöntemle (streptavidin biotin peroksidaz) araştırıldı. 30 KRK'lu hastanın hepsinde p53 (7 grade I, 8 grade II, 4 grade III ve 11 grade IV) ve yüksek PCNA ekspresyonları saptandı. VA'lu 5 hastada ve 9 kontrol olgusunda p53 ekspresyonu izlenmedi. 10 İBH hastasının 2'sinde grade I ve grade II p53 ekspresyonu, 4'ünde yüksek PCNA indeksleri bulundu. KRK'lu hastalarda p53 ile PCNA indeksleri arasında ($r=0.445$; $p=0.014$) ve sellülarite arasında ($r=0.562$; $p=0.001$) anlamlı korelasyon tesbit edilirken, p53 ile histolojik grade, mitotik indeks, nükleer pleomorfizm, nekroz, gelişim paterni, lenfatik tutulum, ve Duker sınıflaması arasında korelasyon tesbit edilemedi ($p>0.05$). Sonuç olarak, KRK olgularında proliferatif kapasite belirleyicisi olarak mitotik indekse güvenilemeyeceği, p53 ve PCNA ekspresyonlarının histolojik diferansiyasyondan bağımsız davrandığı, özellikle İBH olgularında p53 ve PCNA indekslerinin malign sürecin erken tanınmasında potansiyel bir önemi olduğu ortaya konuldu.

ANAHTAR KELİMELEER: Kolorektal karsinom, inflamatuvar barsak hastalığı, villöz adenoma, p53 tümör baskılayıcı gen, proliferating cell nuclear antigen.

SUMMARY: IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTIONS OF P53 TUMOR SUPPRESSOR GENE AND PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA) IN COLORECTAL CARCINOMA (CRC), INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD) AND VILLOUS ADENOMA (VA): The accumulated data suggested associations



Resim 1: Kolorektal karsinomada PCNA ekspresyonu

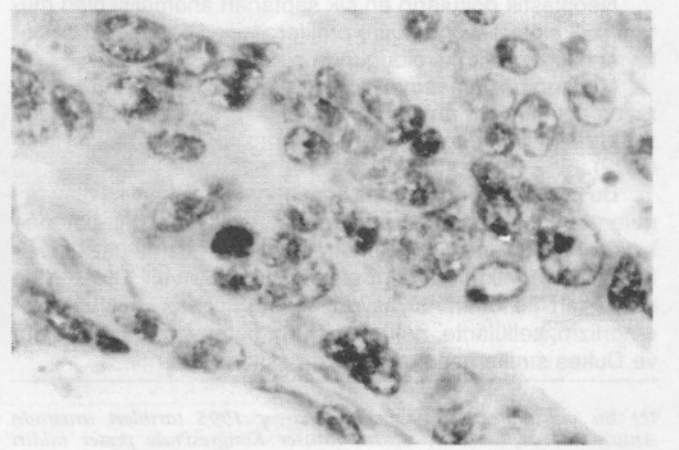
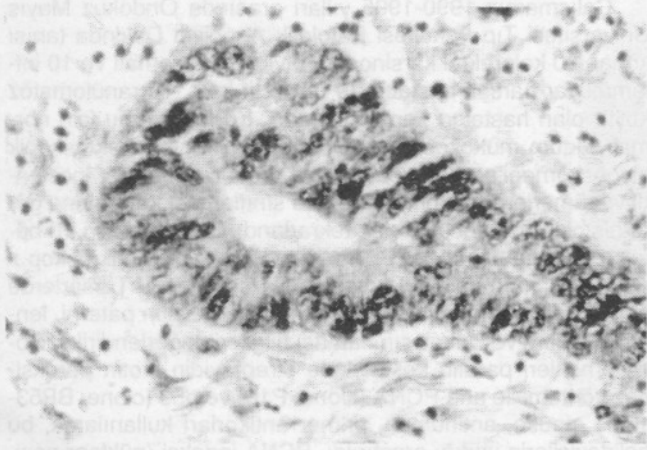
A: Tümör dokusunda intranükleer PCNA immünreaksiyonu (Vaka: 19; Pl:0890, biotin streptavidin peroksidad x630, imm. oil)

B: Tümör dokusunda invazyon alanında PCNA ekspresyonu, [Aynı olgu (A), biotin streptavidin peroksidad, x630, imm. oil)

lendirildi. Kolorektal kanser, inflamatuvar barsak hastalığı ve villöz adenom vakalarında saptanan değerler, kontrol grubu olarak seçilen doku örnekleri değerleri ile karşılaştırıldı. Belirleyici profilleri arasında ve mitotik indeks, nükleer pleomorfizm, sellülarite, nekroz gelişim paterni, lenfatik tutulum ve Dukess sınıflaması arasındaki ilişkiler SPSS (Windows 3.1 uyumlu) istatistik programı kullanılarak regresyon analizi yöntemiyle bilgisayar ortamında değerlendirildi.

BULGULAR

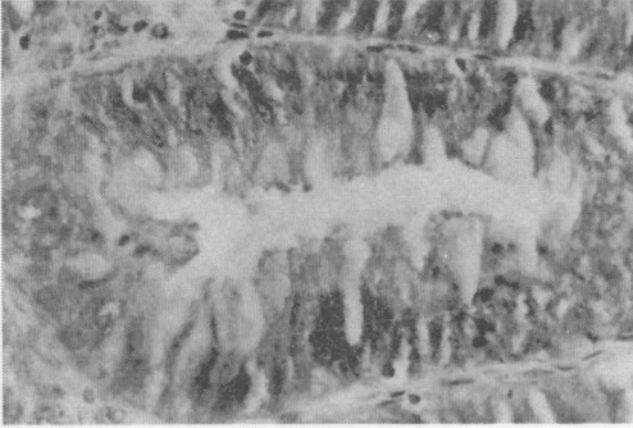
Kolorektal karsinomlu hastaların 12'si kadın (% 40), 18'i erkek (% 60) olup, ortalama yaşları sırasıyla ($\pm$ st. hata), 60.2 ± 4.9 ve 60.7 ± 2.5 yılı. Villöz adenomlu hastaların hepsi erkekti ve ortalama yaşları 58.2 ± 9.3 yılı. İnflamatuvar barsak hastalarının 8'i kadın (% 80), 2'si erkek (% 20) olup, ortalama yaşları, 38.4 ± 3.2 yılı. Kontrol grubu 3 kadın ve 6 erkekten oluşuyordu ve ortalama yaşları 45.9 ± 5.5 yılı. Kolorektal karsinom vakalarına ait klinik ve morfolojik parametreler tablo I-II'de gösterildi. Villöz adenom ve inflamatuvar barsak hastalığı olan vakalarımızda kolon mukoza epitelinde displazik değişiklikler izlenmedi. İnflamatuvar barsak hastalarında bilinen hastalık süresi 6 ay 12 yıl arasında değişiyordu. 30 kolorektal karsinomlu hastanın hepsinde p53 (7 grade I, 8 grade II, 4 grade III ve 11 grade IV) ve yüksek PCNA ekspresyonları saptandı. Villöz adenomlu 5 hastada ve 9 kontrol olgusunda p53 ekspresyonu izlenmedi. 10 inflamatuvar barsak hastasının 2'sinde grade I ve grade II p53 ekspresyonu, 4'ünde yüksek PCNA indeksleri bulundu (tablo I-IV) (resim 1-4). Kolorektal karsinomlu hastalarda p53 ile PCNA indeksleri arasında ($r=0.445$; $p=0.014$) ve sellülarite arasında ($r=0.562$; $p=0.001$) anlamlı korelasyon tesbit edilirken, p53 ile histolojik grade, mitotik indeks, nükleer pleomorfizm, nekroz, gelişim paterni, lenfatik tutulum ve Dukess sınıflaması arasında korelasyon tesbit edilmedi ($p>0.05$).



Resim 2: Kolorektal karsinomada intranükleer grade IV p53 protein ekspresyonu

A: T(Vaka: 2, biotin streptavidin peroksidad, x630, imm. oil)

B: Tümör dokusunda invazyon alanında izlenen immünreaksiyon (Vaka: 8, biotin streptavidin peroksidad, x1000, imm. oil)



Resim 3: Villöz adenomada intranükleer PCNA immünreaksiyonu, (Vaka: 2; Pl: 0.428, biotin streptavidin peroksidaz, x630, imm. oil).

TARTIŞMA

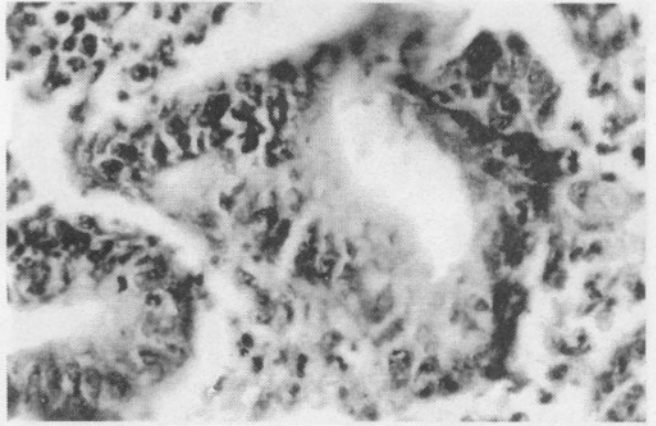
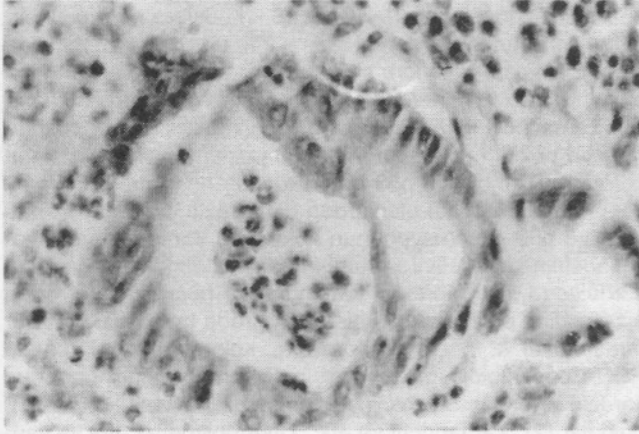
Wild tip (normal) p53 geni kolorektal epitel proliferasyonunun negatif regülasyonunda önemlidir. Kolon hücre kültürlerinde wild tip genin eklenmesi büyümeyi suprese eder, mutant gen eklenmesi ise suprese etmez. In vivo olarak p53 gen ürününün bir tek amino asitinde olan mutasyon bile normal p53 supresör etkisini ortadan kaldırır ve böylece kolorektal karsinogeneze etkili olur (1). p53 proteini iki değişik onkogen ürün ile stabil kompleksler oluşturur. Transforme olmayan hücrelerde p53 protein düzeyi düşüktür ve yarı ömrü 6-30 dakikadır, ancak transforme hücreler ve tümör hücrelerinde yarıömrü saatlere ulaşır ve tesbit edilebilir hale gelir. Mutant p53 büyümesi durmuş istirahatteki hücreleri aktif siklusa ilerletir ve normal hücreleri ölümsüz yapar. DNA eşleme yöntemleri ile yapılan çalışmalarda p53 mutasyonları kolorektal karsinomların yaklaşık % 90'ında gösterildi (1,3). Campo ve ark. da kolorektal karsinomların % 67'sinde, adenomların da % 11'inde p53 ekspresyonu buldular. Normal mukosa ise her zaman negatif, pozitif adenomlarda ise, birlikte ağır displazi veya karsinoma in situ vardı (4). Berg ve ark., kolorektal karsinomlarda % 55, adenomlarda % 8 sıklıkta p53 ekspresyonu saptadılar (5).

Kolorektal karsinoma hastalarının prognoz ve sağkalımı, serozal invazyon, lenf nod metastazı, karaciğer metastazı ve peritoneal metastazla belirlenen evreleme sistemine bağlıdır. Ayrıca tümörün DNA ploidi durumu, hücre proliferatif aktivitesi ve protoonkogen profili gibi parametreler de prognostik öneme sahiptir. Bazı çalışmalarda p53 protein ekspresyonu ile prognoz arasında ilişki gösterilmiştir. Yamaguchi ve ark., kolorektal karsinomların % 61'inde p53 reaktivitesi saptadılar. p53 reaktivitesi ile histolojik grade, tümör büyüklüğü, serozal invazyon, venöz invazyon, lenf nodu metastazı veya karaciğer metastazı arasında ilişki bulamadılar. Ancak p53 pozitif hastaların sağkalımının daha kısa olduğunu saptadılar (3,5).

Genellikle yüksek tümör proliferatif aktivitesi, kötü prognoz ve sağkalım ile ilişkilidir. Proliferatif aktivite mitotik indeks, Ki-67, BrDU, PCN immünhistokimyası ve DNA ploidi

analizleri ile incelenebilir. PCNA 36 kd nükleer bir proteindir, hücre siklusunda G1 den M fazına kadar toplanır ve mitozun sonunda kaybolur; hücre siklusu regülatuar proteinlerinden biri olup, bazı tümörlerde kontrolsüz ekspresyonuna rastlanır (2). Yamaguchi ve ark., başka bir çalışmada DNA polimeraz alfa pozitif hücre sıklığı ile p53 pozitif tümörler arasında korelasyon ile birlikte p53 pozitif tümörlerin hücre proliferasyonunun p53 negatif olanlardan daha fazla olduğunu saptadılar ve p53 ekspresyonunun kolorektal karsinomlarda malignansinin derecesini yorumlamada kullanılabileceğini ileri sürdüler (3,6). Kolorektal karsinomada hücre proliferasyon hızı, malign potansiyel ve histolojik grade arasındaki ilişkiler tartışmalıdır (2,3). Teixeira ve ark., kolorektal karsinomada PCNA ile histolojik grade, ven invazyonu ve lenf nodları ve karaciğer tutulumu potansiyeli arasında kuvvetli korelasyon buldular (2). Yamaguchi ve ark., DNA polimeraz alfa ile yaptıkları çalışmalarında proliferasyon indeksinin histolojik grade ve karaciğer metastazı durumu ile korelasyon gösterdiğini saptadılar (6). Purdie ve ark. ise p53 ekspresyonu ile histolojik grade Dukes evresi ve DNA ploidi arasında ilişki gösteremediler, çok az sayıda adenomda p53 ekspresyonu saptadılar, bunlar da ağır displazi gösteren örneklerdi. Malign değişimle birlikte olan bir villöz adenomda p53 ekspresyonu sadece malign dokuda olup komşu displazik epitelde yoktu (7). Ki-67 kullanılarak yapılan bir çalışmada proliferasyon indeksi, metastatik potansiyel ve histolojik grade arasında ilişki bulunamadı (8).

Normal fonksiyon gördüğü koşullarda p53; DNA'sında zedelenme olan hücrelerin S fazına geçmesine engel olarak DNA tamirine şans tanır, DNA'sı tamir edilemeyecek kadar hasar gören hücrelerin ise apoptozisini kolaylaştırır. Bu mekanizmaların ortadan kalkması ülseratif kolitte olduğu gibi zaten sürekli epitel zedelenmesi ve dönüşümü olan anormal epitelli olgularda malignensiye dönüşüme neden olabilir. Aktif kolitis - venöz rejenerasyon -displazi-karsinoma sırasını izleyerek neoplazm gelişimi ülseratif kolitte olabilmektedir. Bu sıra ile birlikte p53 mutasyonları neoplazm gelişimini sağlayabilir (9). Uzun süreli ülseratif kolit hastalarında kolorektal karsinom gelişme olasılığı 20-40 kat artar. Kolon mukozasında gözlenen displazi, neoplazma geçişin iyi bir belirleyicisidir. Ülseratif kolit ile ilişkili displazi ve bunun neoplazma ilerleyişinin moleküler patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Adenomdan karsinoma geçişte ras proto-onkogeni ve p53'ünde içinde olduğu bir kaç tümör supresör genin mutasyonlarının rolü vardır (10). Ayrıca prekanseröz ülseratif kolitte kolon mukozası displaziden bağımsız olarak, anormal karakterde DNA'ya sahip hücre klonları içerir. Sporadik kolorektal karsinomların çoğunluğunda saptanan p53 gen mutasyonları ülseratif kolit ile ilişkili neoplazmların da büyük bir kısmında saptanır ve hemen her olguda p53 alelinin kaybına bağlıdır. Ülseratif kolitte p53 geninde allel ve nokta mutasyonları displazi-karsinoma geçişinde oldukça erken dönemlerde saptanır, sporadik kansere ise bu saptama daha geç dönemlerde olur (9,11). Chaubert ve ark., çalışmalarında ülseratif kolit ile ilişkili neoplazmların %33'ünde p53 mutasyonları saptadılar (12). Taylor ve ark., ülseratif kolit ile ilişkili 21 kolorektal karsinomanın 11'inde p53 ekspresyonu buldular, ayrıca displazi ile birlikte olan 20 ülseratif kolit vakasının 6'sında benzer p53 ekspresyonu gösterdiler; yüksek derecede displazi olan 11 örnekten 5'inde p53 pozitiflik vardı, spo-



Resim 4: Ülseratif kolit reaksiyonları

A: p53 protein (grade II) reaksiyonu (Vaka:5, biotin streptavidin peroksidaz, x630, imm. oil).

B: Intranükleer PCN (0.307) immünreaksiyonu, [Aynı vaka (A), PL:0.307, biotin streptavidin peroksidaz, x630, imm. oil].

radik kolorektal kansinomların ise % 52'sinde anormal p53 ekspresyonu buldular ve her iki grup kansinomların moleküler biyolojilerinin farklı olmalarına karşın p53 ekspresyonlarının benzer olduğu sonucuna vardılar (13).

İmmünohistokimyasal olarak yüksek riskli ülseratif kolit hastalarında p53 saptanmasının hasta izlemindeki rolü net

değildir (9,12,13). Uzun süreli hasta izlemi ve endoskopik taramalar düşük dereceli displazisi olan veya hiç displazi göstermeyen hastalarda p53'ün prognostik değerini açıklığa kavuşturacaktır. İmmünohistokimyasal teknik, moleküler DNA tekniklerinden daha az hassas olsa da klinik uygulanabilirliği ve ekonomik olması nedeniyle daha avantajlıdır. Değişik p53

TABLO 1: KOLOREKTAL KARSİNOMLARDA KLİNİK ÖZELLİKLER

VAKA	YAŞ	CİNS	DUKES
1	69	E	B
2	31	K	?
3	63	E	?
4	64	E	C
5	65	E	C
6	68	E	C
7	68	E	C
8	65	K	B
9	75	E	B
10	50	E	C
11	42	E	B
12	70	E	B
13	60	E	B
14	67	K	C
15	81	K	B
16	40	E	B
17	66	K	C
18	60	K	B
19	60	E	B
20	41	K	C
21	65	E	C
22	80	E	C
23	50	E	C
24	54	E	?
25	85	K	?
26	50	E	C
27	75	K	C
28	38	K	C
29	64	K	C
30	50	K	B

TABLO II: KOLOREKTAL KARSİNOMLARDA MORFOLOJİK VE İMMÜNHİSTOKİMYASAL ÖZELLİKLER

ATİPİK MİTOZ	Yok	19
	Var	11
SELLÜLARİTE	Düşük	4
	Orta	19
	Yoğun	7
HİSTOLOJİK GRADE	I	20
	II	7
	III	3
P53 GRADE	I	7
	II	8
	III	4
	IV	11
PCNA	<250	5
	250-499	5
	500-750	9
	>750	11
MİTOTİK İNDEKS	0-3.9	18
	4+	12
NÜKLEER PLEOMORFİZM	Hafif	5
	Orta	21
	Belirgin	4
NEKROZ	Yok	15
	Hafif	8
	Belirgin	7
GELİŞİM PATTERNİ	Endofitik	2
	Ekzofitik	10
	Mikst	18
VASKÜLER İNVAZYON	Yok	18
	Var	12

TABLO III: VİLLÖZ ADENOMLARDA KLİNİK, MORFOLOJİK VE İMMÜNHİSTOKİMYASAL ÖZELLİKLER

VAKA	YAŞ	CİNS	MİTOTİK İNDEKS	P53	PCNA
1	67	E	2.6	0	0.345
2	60	E	3.1	0	0.174
3	22	E	2.3	0	0.264
4	67	E	2.1	0	0.428
5	75	E	1.8	0	0.405

epitoplarına karşı antikor geliştirilmesi ile immünohistokimyasal tekniklerin değeri daha da artmıştır. Ancak mutasyon olmadan da p53 proteininin sağlanabildiği (9); yorum yaparken buna dikkat edilmesi gerektiği akılda tutulmalıdır.

Çalışmamızda bütün kolorektal karsinom ve iki ülseratif kolit vakasında p53 protein ekspresyonu saptadık. Ayrıca karsinom vakalarının hepsinde PCNA reaksiyonu izleniyordu. Hiçbirinde displazi izlenmeyen villöz adenom vakalarımızda PCNA ekspresyonu saptandı, ancak p53 reaktivitesi izlenmedi. Vaka sayısının azlığı ve yeterli klinik izlem süresinin olmaması nedeniyle bulgunun önemi ve prognostik anlamı üzerinde yorum yapılması doğru bulunmamıştır, ancak bulgularımız literatürdeki bazı seriler ile uyumludur. Gerek karsinom gerekse ülseratif kolit vakalarında p53 ve PCNA aktivitesi paralellik gösteriyordu. Ülseratif kolit vakalarımızda displazi izlenmedi. Ancak her iki belirleyicinin de pozitif izlendiği vakalarda hastalığın başlangıcı 8 ile 10 yıl arasındaydı. Bu durum bu belirleyicilerin karsinogenezde olası ortak rollerinin olduğu yaklaşımını destekledi. Ancak vakaların çoğunun 6 aydan uzun süre ek izlemlerinin bulunamaması nedeniyle bu belirleyicilerin prognoza yönelik önemi hakkında yorum yapılamadı. Kolorektal karsinomlu hastalarda p53 ve PCNA indeksleri ile sellülarite arasında anlamlı ilişki belirlendi, buna karşın p53 ile histolojik grade, mitotik indeks, nükleer pleomorfizm, nekroz, gelişim paterni, lenfatik tutulum ve Duker sınıflaması arasında korelasyon bulunamadı. İnflamatuvar barsak hastalığı olgularında p53 ve PCNA indekslerinin malign sürecin erken tanınmasında potansiyel bir önemi olduğu, kolorektal karsinom olgularında proliferatif kapasite belirleyicisi olarak mitotik indekse güvenilemeyeceği, p53 ve PCNA ekspresyonlarının histolojik diferansiyasyondan bağımsız davranışları ortaya konuldu.

Tüm literatür incelendiğinde, kolorektal kanser, inflamatuvar barsak hastalığı ve villöz adenom olgularında, p53 ve PCNA ekspresyonlarının birlikte değerlendirildiği ve aralarındaki korelasyonların araştırıldığı bir çalışmaya rast-

lanılmamıştır. Araştırmamız ve bu konuda yapılacak diğer çalışmalar sonucunda tümör gelişimi sürecini anlamakta ve tedavi programını belirlemede, ayrıca prognoz tayininde somut ipuçları elde edileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Chang F, Syrjänen S, Kurvinen K, et al. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993;88:174-186.
2. Teixeira CR, Tanaka S, Hamura K, et al. Proliferating cell nuclear antigen expression at the invasive tumor margin predicts malignant potential of colorectal carcinomas. *Cancer* 1994;73:575-579.
3. Yamaguchi A, Kurosaga Y, Fushida S, et al. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. *Cancer* 1992;70:2778-2784.
4. Campo E, de la Calej-Martin O, Miquel R, et al. Heterozygosity of p53 gene and p53 protein expression in human colorectal carcinomas. *Cancer Res* 1991;51:4436-4442.
5. van den Berg FM, Tigges AJ, Schipper ME, et al. Expression of the nuclear oncogene p53 in colon tumours. *J Pathol* 1989;157:193-199.
6. Yamaguchi A, Takegawa S, Ishida T, et al. Detection of the growth fraction in colorectal tumours by a monoclonal antibody against DNA polymerase α . *Br J Cancer* 1990;61:390-393.
7. Purdie CA, O'Grady J, Piris J, et al. p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 1991;138:807-813.
8. Porschen R, Lohe B, Hengels KJ, Bochar F. Assessment of cell proliferation in colorectal carcinomas using the monoclonal antibody Ki-67. *Cancer* 1989;64:2501-2505.
9. Harpas N, Peck A, Yin J, et al. p53 protein expression in ulcerative colitis-associated colorectal dysplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 1994;25:1069-1074.
10. Burner GC, Rabinovitch PS, Haggitt RC, et al. Neoplastic progression in ulcerative colitis: Histology, DNA content, and loss of a p53 allele. *Gastroenterol* 1992;103:1602-1610.
11. Yin J, Harpaz N, Tong Y, et al. p53 point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions. *Gastroenterol* 1993;104:1633-1639.
12. Chaubert P, Benhattar J, Saraga E, Costa J. K-ras mutations and p53 alterations in neoplastic and nonneoplastic lesions associated with longstanding ulcerative colitis. *Am J Pathol* 1994;144:767-775.
13. Taylor HW, Boyle M, Smith SC, et al. Expression of p53 in colorectal cancer and dysplasia complicating ulcerative colitis. *Br J Surg* 1993;80:442-444.

TABLO IV: İNFLAMATUAR BARSAK HASTALIĞI VAKALARINDA KLİNİK, MORFOLOJİK VE İMMÜNHİSTOKİMYASAL ÖZELLİKLER

VAKA	YAŞ	CİNS	MİTOTİK İNDEKS	P53	PCNA
1	39	K	1.3	0	0.012
2	62	K	1.1	0	0.004
3	38	E	1.5	0	0.072
4	45	K	1.2	0	0.007
5	30	K	5.1	II	0.307
6	27	E	1.2	0	0.003
7	38	K	1.7	0	0.009
8	31	K	2.3	0	0.017
9	31	E	2.1	0	0.337
10	43	K	2.4	I	0.299