

Mesane Tümörünün Yüzeyel ve Derin Tabakalarında PCNA Ekspresyonu Farkı

Dr. Mesut Çetinkaya *, Dr. Fehmi Aksoy **, Dr. Öztuğ Adsan *, Dr. Sevil Günçe **, Dr. Ercüment Ulusoy *, Dr. Murat Koşan *, Dr. Ali Memiş *

ÖZET

Bu çalışmada kasa invaze mesane değişici epitel karsinomu (TCC) nedeniyle radikal sistektomi uygulanan 17 vakanın tümörlerinin yüzeyel ve derin tabakalarından elde edilen örneklerde "proliferating cell nuclear antigen" (PCNA) araştırıldı.

Yüzeysel ve derin tümör tabakalarının doku örnekleri streptavidin biotin metoduyla, 1:100 dilüsyonda PC-10 monoklonal antikor (DAKO, M0879, Denmark) kullanılarak immünohistokimyasal olarak boyandı.

İmmünohistokimyasal PC-10 monoklonal antikor boyanması sonucunda tümör yüzeyinde ortalama PCNA indeksi % 21.9 ± 12.4 bulunurken, derin tabakada % 40.3 ± 22.8 bulundu ve aradaki fark istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p=0.006$). Buna ek olarak gerek yüzeyel gerekse derin tabakaların PCNA indeksleri ile tümör grade'i arasında anlamlı korelasyon tespit edildi ($r=0.469$, $P=0.047$; $r=0.505$, $p=0.038$).

Sonuçlarımız mesane TCC'unun gradeleme ve proliferatif aktivitesi ile ilgili çalışmalarında örneklerin alındığı bölgenin bildirilmesi ve bütün vakalarda aynı bölgenin örneklenmesinin daha uygun olacağını ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mesane neoplazileri, tümör belirleyiciler, proliferating cell nuclear antigen.

GİRİŞ

Mesane kanserlerinin yaklaşık % 90'ı TCC'dur. Transüretral komplet rezeksiyon sonrası % 50-80 rekürens görülürken, bunların % 30'u tümör grade ve evresine bağlı olarak progresyon gösterir (1).

Tümörün klinik seyri veya prognozu patolojik evre ve grade ile ilişkilidir (2,3). Birçok vakada kanserin biyolojik davranışı konvansiyonel metodlarla belirlenemez. Bu nedenle son zamanlarda hücre proliferasyon belirleyicileri flow sitometri ve mitotik indeks gibi birçok prognostik araç kullanılmaktadır.

Mesane TCC'unda prognostik bir belirleyici olarak kullanılan PCNA nükleer bir proteindir ve DNA sentezi ve hücre proliferasyon oranı ile direk korelasyon gösterir (4-7). PCNA ekspresyonu hücre siklusunun G1 fazında başlar ve S fazında en üst düzeye ulaşır (4-7).

Bu çalışmada kasa invaze mesane TCC'unda yüzeyel ve derin tabakalarda PCNA indeksi farkının ve tümör grade'i ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya kasa invaze mesane kanseri (pT2-PT4a) nedeniyle radikal sistoprostektomi veya anterior

SUMMARY

The difference of PCNA expression in superficial and deep layers of bladder carcinoma

In this study we aimed to investigate proliferating cell nuclear antigen (PCNA) index in the specimens of superficial and deep layers of 17 patients who underwent radical cystectomy due to muscle invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder.

Tissue specimens that resembles deep and superficial layers of the tumor were stained immunohistochemically with 1:100 dilution PC-10 monoclonal antibody (DAKO, M0879, Denmark) by streptavidin biotin method.

In the results of immunohistochemical staining with PC-10 monoclonal antibody dye, mean value of PCNA index was found $21.9\% \pm 12.4$ in the surface of the tumor and $40.3\% \pm 22.8$ in the deep layer and the difference was statistically significant ($p=0.006$). In addition, a significant correlation was found between PCNA index and grade of the tumor both in superficial and deep layers of the tumor ($r=0.469$, $p=0.047$, $r=0.505$, $p=0.038$).

Our results revealed that in the studies about grading and proliferative activity of the bladder TCC, the region that the samples are taken must be mentioned and it will be proper to sample the same regions in all cases.

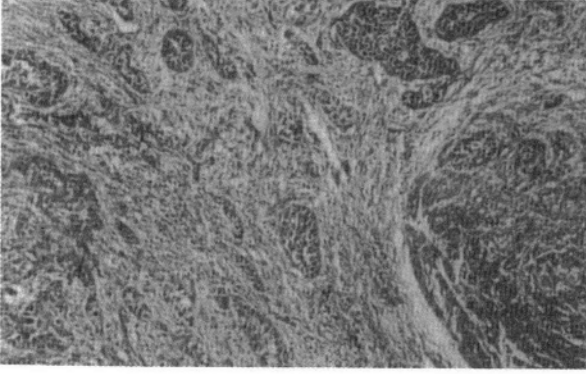
Key words: Bladder neoplasms, tumor markers, proliferating cell nuclear antigen

pelvik ekzanterasyon uygulanan 17 hastanın histolojik kesitleri dahil edildi. Operasyondan hemen sonra sistektomi materyalinden taze olarak 0.5 cm kalınlıkta kesitler alındı. Bütün örnekler % 10 luk formaldehit ile fikse edilerek parafinde boklandı. Yüzeyel ve derin (tümörün histolojik olarak pozitif olduğu yüzeye en uzak nokta) tümör tabakalarının doku örnekleri immünohistokimyasal olarak streptavidin biotin metodu ile, 1:100 dilüsyonda PC-10 monoklonal antikorla (DAKO, M0879, Denmark) boyandı.

Her bir tabaka için (yüzeyel ve derin) 1000 nükleus olmak üzere toplam 2000 nükleus değerlendirildi. Bütün belirlenebilen boyanmalar pozitif kabul edildi. PCNA boyanması nükleusda sınırlı granüler ve diffüz boyanma paternleri göstermekteydi. Nükleer boyanmanın kuvvetle pozitif olduğu hücrelerin çevresinde nükleer boyanma yoğunluğunda bazı varyasyonlar olduğundan, zayıf PCNA boyanmış nükleuslar negatif olarak skorlandı. PCNA boyanmış nükleus yüzdesi her

* S.B. Ankara Numune Hastanesi Üroloji Kliniği

** S.B. Ankara Numune Hastanesi Patoloji Bölümü



Resim 1: Kasa invaziv mesane değişici epitel karsinomunun histolojik görünümü

vaka için her iki tabakadan da 1000 nükleus kaydedilerek belirlendi.

Tümörün yüzeysel ve derin tabakaları arasında PCNA boyanma farkı, tümör grade'ine göre (Mostofi grade'leme sistemi) PCNA boyanma farkı ve tümör grade'i ile PCNA boyanması arasındaki korelasyon araştırıldı.

İstatistiksel analizlerde Student's t, Mann-Whitney U ve Pearson korelasyon testleri kullanıldı.

BULGULAR

Hastaların yaş ortalaması 58.11 (45-72) ve erkek/kadın oranı 1/16 idi. Hastaların patolojik evreleri pT2-PT4a arasında değişmekteydi (T2: 2 hasta, T3a: 1 hasta, T3b: 8 hasta, T4a: 6 hasta). Konvansiyonel formalin ile fikse edilip, hematoksilin ve eosin ve PC-10 monoklonal antikor ile boyanmış kesitler şekil 1 de gösterilmiştir.

Tümör yüzeysel ve derin tabakalarının ortalama PCNA indeksleri sırasıyla 21.9 ± 12.4 ve 40.3 ± 22.8 olup fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.006$). Histolojik grade'i yüksek tümörlerde PCNA pozitif hücre sayısı daha fazla bulundu. Grade I, II ve III tümörlerin yüzeysel ve derin tabakalarının PCNA indeksleri ve istatistiksel değerlendirmeleri tablo 1 de gösterilmiştir.

Tümör grade'i ile gerek derin gerekse yüzeysel tabakaların PCNA indeksleri arasında anlamlı korelasyon tespit edildi (sırasıyla, $r=0.5059$, $p=0.038$; $r=0.4693$, $p=0.047$). Yine yüzeysel ve derin tabakalar arası PCNA indeksleri arasında da iyi bir korelasyon tespit edildi ($r=0.7128$, $p=0.001$).

TARTIŞMA

Bu güne kadar mesane TCC'unda PCNA'nin prognostik değeri ile ilgili birçok araştırma yapılmış olup, bunlarda PCNA'nin önemli bir prognostik gösterge olduğu bildirilmiştir (8-13).

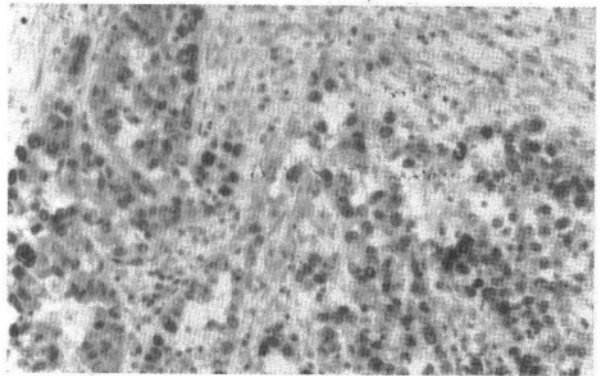
Mesane kanserinin patolojik grade'lemesinde subjektiflik rol oynayabilmektedir. Proliferatif belirleyicilerin kullanılmasının bir amacı da bunu ortadan kaldırmaktır. Literatürde mesane kanseri grade'lemesinde kişiden

kişiyeye farklar olduğu bildirilmiştir (14-17). Biz literatürde proliferatif aktivitenin değerlendirildiği çalışmalarda örneklemenin tümörün hangi bölgesinden yapıldığına dair bir bilgiye rastlamadık. Bu çalışmalarda tümör örneklemesi yüzeysel, yüzeysel altından veya derin tabakadan yapılmış olabilir. Bu çalışmanın amacı, radikal sistektomi spesmenlerinde değişik tümör bölgelerinde proliferatif aktivitenin nasıl değiştiğini araştırmaktır.

Sonuçlarımıza göre PCNA indeksi tümörlerin derin tabakalarında, yüzeysel tabakasına oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (tablo 1). Yüzeysel tabakada grade I ve II, grade I ve III grupların PCNA indeksleri arasında anlamlı fark bulunurken, grade II ve III gruplar arasında fark saptanmamıştır. Derin tümör tabakasında grade I ve III gruplar arasında anlamlı fark bulunurken, grade I ve II, grade II ve III grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir. Bunun nedeni muhtemelen gruplardaki vaka sayısının azlığıdır. PCNA indeksi ile tümör grade'i arasında gerek yüzeysel gerekse derin tabakalar arasında korelasyon tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızla doğrudan ilişkili olmamakla birlikte literatürde iki çalışma dikkatimizi çekmiştir. Igawa ve arkadaşları mesane TCC'unda tümöre yakın müköz membranlarda PCNA pozitif hücre sayısının, tümörden uzak membranlardakine oranla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (18). Koga ve arkadaşları özafagus patolojilerinde derin tümör tabakasında PCNA boyanmasının yüzeysel tabakalara oranla daha koyu olduğunu ileri sürmüşlerdir (19). Bu çalışmaların ve bizim sonuçlarımıza göre tümörün değişik bölgelerinde proliferatif aktivite değişebilmektedir. Sonuç olarak mesane TCC'unda proliferatif aktivite derin tümör tabakalarında daha fazla olup, PCNA indeksi gerek yüzeysel gerekse derin tabakalarda grade ile paralel olarak artmaktadır.

Sonuçlarımız mesane TCC'unda proliferatif aktivite ve grade'leme ile ilgili çalışmalarda örneklerin alındığı bölgelerin belirtilmesinin ve bütün vakalarda örneklemenin aynı bölgeden yapılmasının uygun olacağını ortaya koymaktadır.



Resim 2: Yüksek gradeli mesane değişici epitel karsinomunun derin tabakasında PCNA pozitif görünüm (PCNA, x100)

Tablo I: Yüzeyel ve derin tümör tabakalarının PCNA indekslerinin tümör gradelerine göre karşılaştırmaları

PCNA İndeks (% mean $\pm$ SD)	Grade I (n=3)	Grade II (n=4)	Grade III (n=10)	p1	p2	p3
Yüzeyel	4.20 $\pm$ 3.21	29.85 $\pm$ 11.88	24.01 $\pm$ 9.40	0.033	0.011	0.320
Derin	10.53 $\pm$ 9.78	48.30 $\pm$ 22.41	46.01 $\pm$ 19.28	0.070	0.011	0.880

p1 Grade I ile Grade II gruplarının istatistiksel farkı

p2 Grade I ile Grade III gruplarının istatistiksel farkı

p3 Grade II ile Grade III gruplarının istatistiksel farkı

KAYNAKLAR

- Heney NM, Nocks BN, Daly JJ, Prout GR, Newall JB, Griffin P, Perrone TL, Szyfelbein WA. Ta and T1 bladder cancer: Location, recurrence and progression. *Br J Urol* 1982;54:152-157.
- Loening S, Narayama A, Yoder L, Sleyden D, Weinstein S, Penick G, Culp D. Factors influencing the recurrence rate of bladder cancer. *J Urol* 1980;123:29-31.
- Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Coder MP, Hafermann MD, Hawkins IR. Superficial bladder cancer: Progression and recurrence. *J Urol* 1983;130:1083-1086.
- Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation: Its distribution in synchronized cells. *J Exp Med* 1981;154:1899-1909.
- Bravo R, Fey SJ, Bellantin S, Bellatin J, Larsen PM, Arevalo J, Celis JE. Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation. *Exp Cell Res* 1981;136:311-319.
- Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Garrels JL. Identity of the proliferating nuclear antigen and cyclin. *Nature* 1984;309:374-376.
- Celis JE, Celis A. Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin/proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: Subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:3262-3266.
- Lipponen PK, Eskelinen MJ. Cell proliferation of transitional cell bladder tumours determined by PCNA/cyclin immunostaining and its prognostic value. *Br J Cancer* 1992;66:171-176.
- Lipponen PK, Eskelinen MJ. Cell proliferation of transitional cell bladder cancer determined by PCNA/cyclin immunostaining. A histopathological description. *Anticancer Res* 1992;12:577-584.
- Skopelidou A, Korkolopoulou P, Papanicolaou A, Christodoulou P, Thomas-Tsagli E, Pavlakis K. Comparative assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and of nucleolar organizer region staining in transitional cell carcinomas of urinary bladder. *Eur Urol* 1992;22:235-240.
- Iizumi T, Tanaka W, Okada E, Kamiyama Y, Okana Y, Sato S, Yazaki T, Umeda T, Imamura T. Immunohistochemical studies of proliferating cell nuclear antigen and cathepsin D in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urol Int* 1997;59:81-87.
- Chen G, Lin MS, Li RC. Expression and prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urol Res* 1997;25:25-30.
- Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CCW, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillet CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalisation in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990;162:285-294.
- Ooms ECM, Anderson WA, Alons CL, Boon ME, Veldhuizen RW. Analysis of the performance of pathologists in the grading of bladder tumors. *Hum Pathol* 1983;14:140-143.
- Ooms ECM, Kurver PHJ, Veldhuizen RW, Alons CL, Boon ME. Morphometric grading of bladder tumors in comparison with histologic grading by pathologists. *Hum Pathol* 1983;14:144-150.
- Ooms ECM, Blok APR, Veldhuizen RW. The reproducibility of a quantitative grading system of bladder tumors. *Histopathol* 1985;9:504-509.
- Cohen MB, Waldamn FM, Carroll PR, Kerschmann R, CheW K, Mayall BH. Comparison of five histopathologic methods to assess cellular proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol* 1993;24:772-776.
- Igawa M, Urakami S, Shirakawa H, Shiina H, Usui T, Moriyama H. A mapping of histology and cell proliferation in human bladder cancer: an immunohistochemical study. *Hiroshima J Med Sci* 1995;44:93-97.
- Koga Y, Kuwano H, Sugimachi K. Biologic characteristics of esophageal epithelial dysplasia assessed by proliferating cell nuclear antigen. *Cancer* 1996;77:237-244.