

# Wilms' Tümörlerinde p53 Tümör Baskılayıcı Gen ve PCNA Ekspresyonları ile Klinik Evre İlişkileri\*

Dr. Şükrü O. Özdamar\*\*, Dr. Mithat Günaydın\*\*\*, Dr. Rıza Rızalar\*\*\*, Dr. Ender Arıttürk\*\*\*, Dr. Ferit Bernay\*\*\*, Dr. Filiz Karagöz\*\*, Dr. Bedri Kandemir\*\*, Dr. Naci Gürses\*\*\*

## ÖZET

Wilms' tümörü çocukluk çağında en sık görülen metanefrik blastem artıklarının malign transformasyonu sonucu gelişen epitelyal, blastemal ve stromal hücre tiplerinin birini veya hepsini içeren bir renal embriyonal neoplazmdir. Neoplastik dokuların en sık saptanan anomalisi olan mutant p53 ekspresyonu hücre proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkinin kalkmış olduğunun bir göstergesidir. Wilms' tümörlerinde p53 tümör baskılayıcı gen ekspresyonunun sık görüldüğü bildirilmektedir. Mitozun başlamasında rol oynayan moleküllerden proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ekspresyonunun gösterilmesi de, gittikçe değer kazanan bir proliferasyon belirleyicisidir. Bu çalışmada 11 Wilms tümörü olgusunda retrospektif olarak p53 ve PCNA ekspresyonları ile histolojik pattern ve klinik evre arasındaki ilişkiler incelendi. Olgulara ait doku örneklerinin %10 tamponlu nötral formalinde fikse parafin kesitlerinde hücre içi intranükleer p53 (clone:BP53.12) ve PCNA (clone:P10) ekspresyonları immünohistokimyasal yöntemle (streptavidin biotin peroksidaz) araştırıldı. Tanı konulduğunda evre I olan olgumuz yoktur. Evre II olan beş olguda PCNA indeksi (PI) epitelyal ve blastemal komponentlerde yüksek bulunurken, stromal komponentte düşük bulunmuştur. p53 ekspresyonu dört olguda epitelyal komponentte ve bir olguda ise blastemal komponentte (grade I) olarak bulunmuştur. Evre III'de tanı konulan üç olguda bütün komponentlerde PI düşük bulunurken,blastemal komponentte yüksek bulunmuştur. p53 bir olguda saptanmış (grade I), diğer ikisinde negatif olarak bulunmuştur. Evre IV olan bir olguda PI ve p53 varlığı blastemal komponentte yüksek bulunurken, epitelyal ve stromal komponentte negatif saptanmıştır. Evre V iki olguda ise PCNA ekspresyonu epitelyal ve stromal komponentte görülmezken, blastemal komponentte yüksektir. p53 varlığı her iki olguda da negatiftir. Bu tümörlerde yüksek epitelyal ve blastemal PCNA ve p53 blastemal komponent ekspresyonu görülmesinin klinik evre belirleyicisi niteliği ortaya konulmuştur.

**Anahtar kelimeler :** Wilms tümörü, p53 tümör baskılayıcı gen, proliferating cell nuclear antigen

## SUMMARY

Wilms' tumor develops as a result of malignant transformation in metanepic blastem remnants which are most common in childhood and has epithelial, blastemal and stromal type cells or a mixture of these cells. The most common abnormality in tumor cells is the mutant p53 expression and it shows the loss of suppressor activity in cell proliferation. p53 tumor suppressor gene expression was reported in Wilms' tumors. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) which has a role in mitosis is a new proliferation marker. We studied p53 and PCNA expressions and their relations with histological pattern and clinical stage in 11 Wilms tumors. p53 and PCNA expressions were studied by immunohistochemical method (streptavidin biotin peroxidase) in 10 % neutral buffered formalin fixed, paraffin embedded tissue sections. None of the cases was in stage I. In five stage II cases, while high PCNA index in epithelial and blastemal components was found the same index was low in stromal component. p53 expression (grade I) were found in epithelial component in four cases and in blastemal component in one case. In three stage III cases, PCNA index was low in all components, and high in blastemal components. There was p53 expression (grade I) in one of the three cases. In one stage IV case PCNA index and p53 expressions were found high in blastemal component and negative in epithelial and stromal components. In two stage V cases while there were not PCNA expressions in epithelial and stromal components, there were high expressions in blastemal component, and p53 expressions were negative in all cases. This study showed that epithelial and blastemal PCNA index and blastemal p53 expression might be clinical stage markers in Wilms' tumors.

**Key Words:** Wilms' tumor, p53 tumor suppressor gene, proliferating cell nuclear antigen

## GİRİŞ

Wilms' tümörü en sık çocukluk çağında görülen veya metanefrik blastem artıklarının malign transformasyonu sonucu gelişen; epitelyal, blastemal ve stromal hücre tiplerinin birini ve hepsini içeren heterojen bir renal embriyonal neoplazmdir. Bu tümörlerin evrelemesi NWTs-2,3 ve 4 sistemlerine göre yapılmaktadır<sup>(1-3)</sup>.

p53 geni hücresel proliferasyonun kontrolünde önemli bir

\* Bu çalışma 1-5 Mayıs 1995 tarihleri arasında Mersin'de yapılan VIII. pediatrik tümörler ve tıpta yenilikler 1995 kongresi'nde poster bildiri olarak sunulmuştur.

\*\* Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

\*\*\* Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı

rolü olduğu düşünülen bir nükleer fosfoproteini kodlar. Bu protein, hücre çoğalmasında potent bir baskılayıcı olarak hareket eder. Normalde p53 proteini, hücrede çok düşük konsantrasyonlarda olması nedeniyle konvansiyonel immünohistokimyasal yöntemlerle saptanamaz, ancak mütasyona uğramasıyla hücre içi yarı ömrünün uzaması sonucu saptanabilir hale gelir. Son yıllarda yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda bazı malign tümörlerde p53 gen ekspresyonu gösterilmiş, bunun prognostik önem taşıyabileceği ileri sürülmüştür<sup>(4)</sup>.

Proliferating cell nuclear antigen [PCNA/Cyclin (P10)] mitozu hazırlanan G1-S fazındaki hücre nükleuslarında, hücre proliferasyonunun başlamasında rol oynayan DNA polimeraz-delta yardımcı proteini olup; pozitifliğinin gösterilmesi ve dağılım patterni çeşitli benign ve malign lezyonlarda proliferasyon indeksi olarak kabul edilmektedir<sup>(5)</sup>.

Bu araştırmada, Wilms tümörlerinde p53 ve PCNA ekspresyonları ile histolojik pattern ve klinik evre arasında ilişkileri incelemek amaçlanmıştır.

### GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız 1984-1994 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanısı konan

EVRE I	Tümör böbrekte sınırlıdır ve tam olarak çıkarılmıştır. Renal kapsül yüzeyi sağlamdır. Tümör çıkarılırken veya öncesinde zedelenmemiştir. Rezeksiyon sınırları dışında rezidü tümör dokusu gözlenmez.
EVRE II	Tümör böbrek dışına uzanmıştır. Ancak tam olarak eksize edilmiştir. Perirenal yumuşak doku ve böbrek dışı damarlar tümör tarafından infiltrate edilmiş olabilir. Rezeksiyon sınırları dışında rezidü tümör dokusu gözlenmez.
EVRE III	Abdomen içinde lenf nod tutulumu, diffüz peritoneal kontaminasyon vardır ve/veya tümör tam olarak çıkarılamamıştır, rezeksiyon sonrası gros veya mikroskobik rezidü tümör saptanır.
EVRE IV	Hematojen yayılım-uzak metastaz gözlenir.
EVRE V	Tanı sırasında bilateral tutulum saptanır

Tablo 1 : NWTS-3 Evreleme Sistemi

ve Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından takip ve tedavisi yapılan 11 Wilms' tümörü olgusunu kapsamaktadır. Evrelemesi NWTS-3 sistemine göre yapılan (tablo 1) olgulara ait preparatlar tekrar incelendi, anaplazi odakları araştırıldı ve histolojik patternler yeniden belirlendi. Tümör dokularının %10 formalinde fikse parafin kesitlerine streptavidin biotin peroksidaz yöntemi ile p53 (clone: BP53-12-1) ve PCNA (clone : P10) anti-human, mouse, primer antikorları kullanılarak, bu belirleyicilerin varlığı araştırıldı. Her olgu için epitelyal, blastemal ve stromal komponentlerdeki p53 ekspresyonu, boyanma görülen hücrelerin oranlarına göre (%1-25=(+);%26-50=(++); %51-75=(+++)) ve >%75=(++++)) derecelendirildi. PCNA indeksi (nükleer pozitivite gösteren hücreler/1000 neoplastik hücre) de hesaplandı ve p53 değerlendirilmesine benzer şekilde 4 gruba ayrılarak sınıflandırıldı (tablo 2). Olgular tanı konulduğu sıradaki evrelerine göre gruplara ayrıldı. Çeşitli evrelerdeki tümörlerin belirleyici değerlerinin baskın olduğu histolojik pattern değerleri karşılaştırıldı. Gruplararası ilişkiler, Kruskal-Wallis varyans analizi ve Spearman korelasyon testleri kullanılarak değerlendirildi ve yorumlandı.

### BULGULAR

Tanı konulduğunda en küçüğü 6/12, en büyüğü 12 yaşında olan yedisi kız (%63.6), dördü erkek (%36.4) hastanın; beşi evre II, üçü evre III, biri evre IV diğer ikisi de evre V olarak değerlendirildi. Yedi olguda sol, iki olguda sağ böbrekte iki olguda ise bilateral tutulum olduğu saptandı. Unilateral olgulara tümörün olduğu tarafa nefrektomi, bilateral olgulara ise fonksiyon gören tarafa heminefektomi, diğer tarafa total nefrektomi yapılmasını takiben tüm hastalara kemoterapi uygulanmıştı. Tanı konulduğunda evre I olan olgumuz yoktu. Evre II ve evre V olan iki olgumuzda anaplazik odaklar izleniyordu, bu evre I olgumuz postoperatif 1. yılını geride bırakmıştı. Evre V olgumuz ile bir evre III olgumuz operasyonu takiben 1.5 yıl içerisinde eksitus olmuştu. Diğer olguların sağkalım bilgileri edinilemedi.

Olgularımızın hepsi trifazik karakterde Wilms' tümörü idi. Bütün tümörlerde epitelyal ve blastemal komponent hakimiyeti izleniyordu. Histolojik patternler ile evre özellikleri arasında ilişki belirlenemedi.

Tablo 2 : Olgularımızda Histolojik pattern, PCNA ve p53 ilişkileri

OLGU	EVRE	HISTOLOJİK PATTERN			PCNA			p53		
		EPİTELYAL	BLASTEMAL	STROMAL	EPİTELYAL	BLASTEMAL	STROMAL	EPİTELYAL	BLASTEMAL	STROMAL
1	II	++	+	+	+++	++	-	+	-	-
2 (KHK)*	II	++	+	+	+++	++	++	+	-	-
3	II	++	++	+	++	+++	+++	+	+	-
4	II	+	++	+	-	++	-	-	-	-
5	II	++	++	+	+++	+++	+	+	-	-
6	III	++	+	+	++	-	-	+	-	-
7	III	+	++	+	-	++++	-	-	-	-
8	III	++	+	+	+	-	+	-	-	-
9	IV	+	++	+	-	++	-	-	+	-
10 (KHK)	V	++	++	+	-	+++	-	-	+++	-
11	V	+	++	+	-	+++	-	-	-	-

\* Kötü Histolojik karakter

Evrelerin PCNA ve p53 ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında evre II ve III olgularının PCNA ve p53 değerleri arasındaki fark anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ).

p53 ekspresyonu, evre II dört olguda ve evre III bir olguda epitelyal komponentte; evre II ve evre IV olan birer olguda blastemal komponentte (gradel: (+)) kötü histolojik karaktere sahip evre V olguda ise yine blastemal komponentte (grade III; (+++)) olarak bulundu; diğer olgularda negatifti.

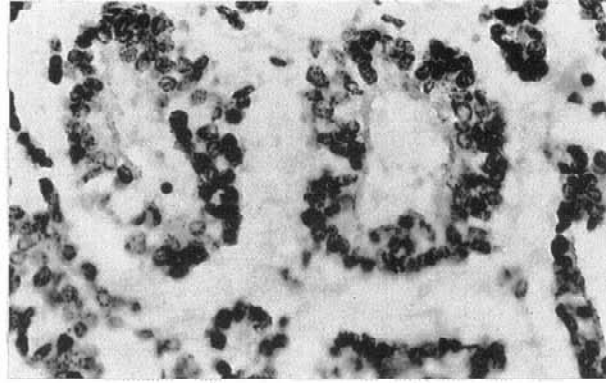
PCNA ekspresyonu ise tüm olgularda çeşitli histolojik patternlerde değişken karakterde pozitif olarak izlendi. Erken evredeki olgularımızda özellikle epitelyal ve blastemal komponentlerde varlığı dikkat çeken PCNA, ileri evre olgularımızda blastemal komponentte pozitif olarak izlendi. Kötü histolojik karakter gösteren evre II olguda da blastemal ekspresyon gösteren proliferating cell nuclear antigen'in; evre II olgularda komponentler arası indeksler farkı anlamlı bulunmadı ( $p > 0.05$ ). Ancak epitelyal ve blastemal PI değerleri arasında yakın (SCM : 0.700); bu değerler ile stromal değerler arasında zayıf ilişki varlığı (SCM: -0.200) dikkati çekti. Evre III olan iki olguda diğer komponentlerde PI izlenmezken, bir olguda sadece blastemal komponentte yüksek değerde (grade IV; (+++)) saptandı. Bu grupta da epitelyal ve blastemal PI değerleri arasında yakın (SCM: -0.866); bu değerler ile stromal değerler arasında zayıf ilişki varlığı (SCM: -0.500) dikkati çekti. Evre IV olan olguda PI varlığı blastemal komponentte yüksek bulunurken, epitelyal ve stromal komponentlerde izlenmedi. Evre V iki olguda da PCNA ekspresyonu, blastemal komponentte saptandı (resim 1), (tablo 2). Veri yetersizliği nedeniyle olgularımızın sağkalım bilgileri ile elde ettiğimiz sonuçlar karşılaştırılmadı.

### TARTIŞMA

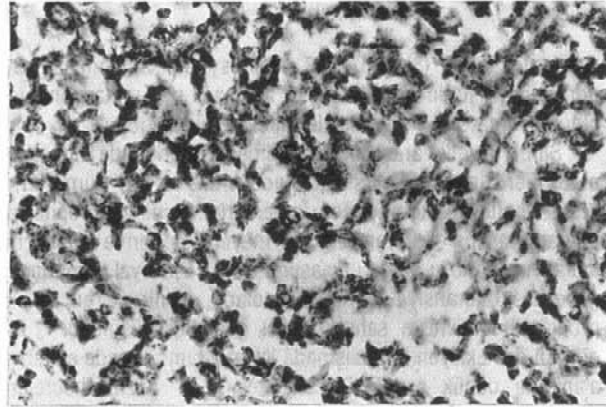
Metanefrik blastem kökenli olması nedeniyle Wilms' tümörlerinin histolojik spektrumu geniştir. Bazen abortif glomerüller yapan epitelyal hücrelerin oluşturduğu tubul yapılarını çevreleyen andiferansiye içsi hücreler ile karakterli epitelyal, blastemal ve stromal hücrelerden oluşan trifazik bir histolojik pattern gösterir. Bifazik patternde tümör, blastemal ve stromal hücreleri içerir. Monofazik tümörlerde ise tek tip hücre bulunur.

Ortalama boyutların 3-4 katına erişen iri ve hiperkromatik nükleuslara sahip hücreler ile hiperdiploid mitotik figürlerin izlendiğini tümörler, kötü histolojik karaktere sahip olarak nitelendirilir<sup>(1,6)</sup>. Tümörler, %4-5 olguda bu nitelikteki anaplazi odaklarını içerebilir, bu hastalarda evre, I, II ve III'de tedavi sonrası relaps %55 kaddır; anaplazi odakları gözlenmeyen (iyi histolojik grup) olgularda ise bu oran %14'dür. Bu grup hastalarda 4 yıllık sağkalım Evre I olgularda % 95.6 iken evre IV %78.4 olarak bildirilmiştir (NWTSS)<sup>(3,4,7)</sup>. Çalışma grubumuzda izlenen anaplazik odak içerme oranı % 18'dir. Bu olgulardan biri (evre II olgumuz) postoperatif 1. yılını geride bırakmış; evre V olgu ise 1 yıl sonra eksitus olmuştur.

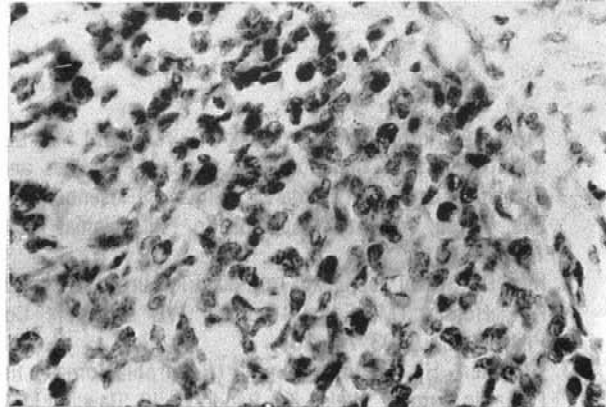
p53 geni delesyon ve/veya mutasyonunun, bugün için insan neoplazmalarında saptanan en sık genetik anormallik olduğu ileri sürülmektedir. p53 gen mutasyonları erişkinlerde görülen çeşitli tümörlerde, özellikle karsinomlarda sıklıkla saptanmasına



Resim 1 a: Tubuler/epitelyal komponentte intranükleer(+++) PCNA ekspresyonu, (Olgu : 1).

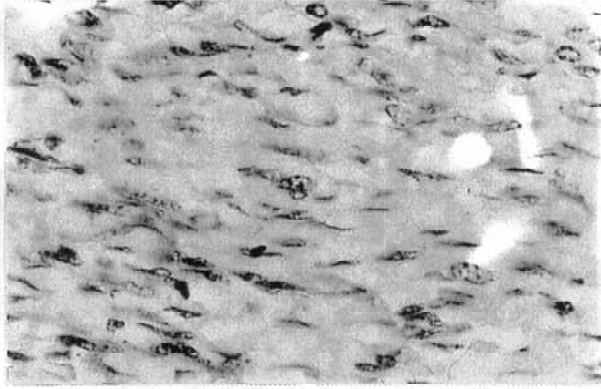


Resim 1 b: Blastemal komponent ve (+++) PCNA ekspresyonu, (Olgu : 10).



Resim 1 c: Blastemal komponentte intranükleer (+++) p53 ekspresyonu, (Aynı olgu (B)),

karşın, çocukluk çağında görülen tümörlerde daha az izlenmektedir<sup>(4,5)</sup>. Bildirilen çalışmalarda Wilms' tümörlerinde saptanan p53 ekspresyonları değişkendir; Waber ve ark, 44 olgu içeren serilerinde p53 ekspresyonunu hiç gösterememişlerdir. Buna karşın Lemaine ve ark. ise 34 olguluk serilerinde bütün tümörlerde p53 ekspresyonunu saptamışlardır<sup>(8,9)</sup>. Serimizde, 11



**Resim 1 d:** İntarnükleer (+++) PCNA ekspresyonu gösteren stroma hücreleri, (Olgu: 3). (Biotin streptavidin peroksidaz; A, B&D: x630, C: x1000, imm.oil)

olgunun 7'sinde (%63.6) p53 ekspresyonu saptanmıştır. Bu tümörün gelişiminde herhangi bir aşamada p53 mutasyonunun olduğu varsayımını<sup>(7,9)</sup> destekler nitelikte bir bulgudur.

Sınırlı sayıda araştırmada Wilms' tümörlerinde histolojik patternler ile PCNA ilişkileri incelenmiştir. Bu tümörlerin tubuler/epitelyal komponent içerenlerinin, minimal epitelyal diferansiyasyon gösteren ve göstermeyen diğerlerine oranla çok daha iyi prognozu olduğu anlaşılmıştır<sup>(6,10)</sup>. Epitelyal komponent genellikle diferansiye komponent olarak bilinir ve en düşük proliferatif aktiviteye sahip olması gerektiği düşünülür<sup>(6)</sup>. Bu görüşü destekleyen bir çalışmada Wilms' tümörlerinde epitelyal alanlarda düşük proliferatif aktivite (Ki-67 pozitif hücreler) gözlenmesine karşın, blastemal alanlarda yüksek derecede proliferatif aktivite saptanmıştır<sup>(10)</sup>. Literatürde Wilms'

tümörlerinde PCNA ekspresyonuna ilişkin çalışmalar çok sınırlı sayıdadır; bu konudaki ilk çalışmada Benjamin, bu tümörlerde PCNA ekspresyonunun çok düşük olduğunu bildirmiştir<sup>(11)</sup>. Ancak Khine ve ark., bu sonucu ekspresyon değerlendirilmesindeki blastem ve stroma değerlerine oranla daha yüksek bulmuşlardır<sup>(6)</sup>. Serimizde, PCNA ekspresyonu erken evredeki olgularımızda özellikle epitelyal ve blastemal komponentlerde, ileri evre olgularımızda ise blastemal komponentte olmak üzere bütün olgularımızda pozitif olarak izlendi.

Bu tümörlerin tek klonal türedikleri varsayılırsa içerdikleri proliferatif aktivite açısından blastemal komponentin immatür, stromanın matür karakterde yapılar olduğu düşünülebilir, ancak bu yaklaşım organogenez kuramlarına ters düşer. Wilms tümörlerinde epitelyal komponent, blastemal komponentin diferansiyasyonu sonucu gelişiyor görünmekte, prognostik parametre incelemeleri de bunu desteklemektedir<sup>(10)</sup>. Ancak aynı tümörlerde blastemal komponente oranla epitelyal diferansiyasyon alanlarındaki yüksek proliferatif aktivite (PCNA) açıklanamamaktadır. Bazı araştırmacılar da, diiferansiyasyon ve proliferasyonun birbirinden bağımsız olduklarını, bazılarında bu tümörlerin farklı proliferasyon ve diferansiyasyon potansiyeli taşıyan farklı hücre klonları içerdiklerini ileri sürmekte çelişkili görünen bu durumu açıklamaya çalışmaktadırlar<sup>(6,10)</sup>. Serimizde gözlenen proliferating cell nuclear antigen ekspresyonu niteliği, bu tümörün poliklonal kökenli olabileceği savını desteklemektedir.

Ayrıca erken evrelerde epitelyal; yanısıra evre IV ve evre V olgularımızda blastemal p53 varlığı ile ileri evre olgularımızda blastemal PCNA ekspresyonlarının izlenmesi, bu iki belirleyici arasında bir ilişki olabileceğini de düşündürmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Pizzo PA, Horowitz ME, Poplack DG, Hays DM, Kun LE. Solid Tumors of Childhood. In; Cancer, Principles and Practice of Oncology. Devita VT, Helman S, Rosenberg SA. Eds, 4th ed, Vol II, JB Lippincott Co, Philadelphia, 1993, 1738-1791.
2. King DR. Renal neoplasm. In; Pediatric Surgery. Ashcraft KW, Holder TM, Eds, 2 nd ed, WB Saunders Co, Philadelphia, 1993; 784-801.
3. Othersen HB. Wilms' tumor (Nephroblastoma). In; Pediatric Surgery. Welch KJ, Randolph JQ, Rawitch MM, O'Neill JA, Rowe JA. Eds, 4 th ed, Vol I, Year Book Medical Publishers Inc, Chicago, 1986; 293-300.
4. Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K, Syrjanen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. Am J Gastroenterol 1993; 88: 174-186.
5. Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J Pathol 1990;162:285-294.
6. Khine MM, Aung W, Sibbons PD, et al. Analysis of relative proliferation rates of Wilms' tumor components using proliferating cell nuclear antigen and MIB-1 (Ki-67 equivalent antigen) immunostaining and assesment of mitotic index. Lab Invest 1994; 70: 125-129.
7. Re GG, Hazen-Martin DJ, Sens DA, et al. Nephroblastoma (Wilms' Tumor): A model system of aberrant renal development. Sem Diag Pathol 1994; 11:126-135.
8. Waber PG, Chen J, Nisen PD. Infrequency of ras, p53, WT1, or RB gene alterations in Wilms tumors. Cancer 1993; 72:3732-3738.
9. Lemoine NR, Hughes M, Cowell CK. Aberrant expression of the tumour suppressor gene is very frequent in Wilms' tumours. J Pathol 1992; 168: 237-242.
10. Droz D, Rousseau-Merck M-F, Jaubert F, et al. Cell differentiation in Wilms' tumor (Nephroblastoma): An immunohistochemical study. Hum Pathol 1990; 21:536-544.
11. Benjamin DR. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and paediatric tumours: assesment of proliferative activity. Paed Pathol 1991; 11:507-19.