

## Mesanenin Değişici Epitel Hücreli Karsinomlarında p53 Ekspresyonu ve Prognozla İlişkisi

### Relationship of p53 Expression and Prognosis in Transitional Cell Carcinoma of the Bladder

Kemal Bakır <sup>1</sup>, Kemal Sarıca <sup>2</sup>, Ramazan Uçak <sup>1</sup>, Faruk Yağcı <sup>2</sup>, Ahmet Erbağcı <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Gaziantep

<sup>2</sup>Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Gaziantep

Mesanenin değişici epitel hücreli karsinomlarında nüks sık görülen bir bulgudur. Bu nedenle hastaların iyi izlenebilmesi amacıyla grade, evre, tümör büyüklüğü ve prognoz arasındaki ilişkiye ek olarak tümör süpressör gen olan p53'ün de prognozla ilişkisi araştırılmıştır. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne başvuran mesane karsinomlu 40 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu olguların tamamına immünohistokimyasal yöntemle p53'ü göstermek için D07 monoklonal antikoru uygulandı. 15 olguda p53 immünoaktivitesi saptandı. p53 pozitifitesi; grade, mitoz sayısı ve nüks ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Grade, mitoz ve nüks ile anlamlı ilişki saptanamadı. Ancak p53 pozitif olguların % 55'inde, p53 negatif olguların ise sadece % 21'inde nüks gözlenmesi, p53 pozitifitesi olan olguların prognozunun daha kötü olacağını düşündürülebilir.

**Anahtar kelimeler :** p53 , tümör süpressör gen, değişici epitel hücreli karsinom, mesane

The recurrences was oftenly seen on transitional cell carcinoma(TCC) of the bladder. With this purpose recent studies have investigated the possibility that p53 protein and grade,stage,diameter of the tumor and recurrences play a significant role in bladder cancer progression. p53 expression was evaluated on 40 TCC of the bladder using the immunohistochemical method. In this study, when a p53 threshold of > 0 % was considered positively. Fifteen of 40(37.5 %) TCC showed p53 expression. There was no statistically significant relationship between p53 expression and grade,mitosis and recurrences. Our results lead to the conclusion that p53 expression has no prognostic value in tumoral progression. But we can also say that p53 positivity reflecting a high cellular proliferation could afford an additional but useful information when predicting survival in patients with TCC of bladder.

**Key words :** p53, tumor supressor gene, transitional cell carcinoma, bladder.

Mesane karsinomları sıklıklarına göre Amerika Birleşik Devletlerinde 5. , Türkiye'de ise 4. sıradadır <sup>(1-3)</sup>. Mesane karsinomlu olguların yaklaşık olarak % 80'inde sık rekürrens gösteren ve bu nedenle dikkatli bir izlem gerektiren süperfisiyel tümörler bulunur. İnvaziv tümörlerde ise radikal cerrahi, radyasyon ve kemoterapiye karşın hastalar yüksek risk altındadırlar. Bu nedenlerle hastaların izlenmeleri ve prognozu belirleyen parametrelerin ortaya konması önemlidir. Mesane tümörlerindeki prognostik parametrelerden olan moleküler defektler ileri teknikler kullanılarak araştırıldığında , onkogenlerin aktivasyonu ve çeşitli tümör süpressör genlerin inaktivasyonu ile karşılaşılmaktadır<sup>(4,5)</sup>. Araştırılan tümör süpressör genlerin başında p53 gelmektedir.

p53 geni 17p 13.1 kromozomunda lokalize olup, hücre proliferasyonunun kontrolünde rol oynar <sup>(6-10)</sup>. Normal veya "wild" tip p53 proteini hücrelerin, hücre siklusunun G1 fazında kalmalarına ve böylece DNA ve/veya apoptozisin düzenlenmesine olanak verir<sup>(9,11)</sup>. Yarı ömrü kısa olan (5-45 dakika) normal p53'ün standart immünohistokimyasal yöntemlerle saptanması olanaksızdır<sup>(12)</sup>. p53 genindeki mutasyon, yarı ömrünün uzamasına (bir kaç saat), stabil hal almasına ve immünohistokimyasal olarak saptanmasına olanak verir <sup>(9,13)</sup>.

p53 geni başta meme, kolon ve akciğerler olmak üzere bir çok tümörde immünohistokimyasal yöntemle nükleer pozitifite şeklinde gösterilmektedir. Bir çok neoplazın için nükleer boyanmanın prognoz ile birlikteliği vurgulanırken, bir çalışmada kolorektal adenokarsinomlarda p53'ün sitoplazmik pozitifitesi ile prognoz arasında ilişki olduğu saptanmıştır<sup>(4,14)</sup>.

Mesane karsinomlarında yapılan çalışmalarda p53 geninin mutasyonlarının evre ve grade ile ilişkili olduğu gösterilmiş, bazı çalışmalarda ise bağımsız bir parametre olarak gözlenmiştir <sup>(5,9,12,15)</sup>.

Bu çalışmada p53 tümör süpressör geni ekspresyonunu ve bununla rekürrens, grade ve mitoz sayısı arasındaki ilişkinin gösterilmesi planlandı. p53 pozitif ve p53 negatif değişici epitel hücreli karsinomlardaki nüks oranı değerlendirildi.

#### GEREÇ VE YÖNTEM

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim

Dalina başvuran ve materyalleri Patoloji Anabilim Dalında incelenen 40 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların 4'üne total sistektomi, 28'ine TUR-M ve 8'ine biyopsi yapıldı. Hastalara ait parafin bloklardan mikrotomla 5 mikronluk kesitler alınarak hematoksilin eozin(H.E.) ile boyandı ve tamamına değişici epitel hücreli karsinom tanısı konuldu. H.E. boyalı preparatlar incelenirken, mitoz sayısı ve nekroz değerlendirildi. Her 10 büyük büyütme düşen mitoz sayısı saptandı. Ancak sadece mitozun varlığı veya yokluğu göz önünde bulundurularak değerlendirilme yapıldı. Gradeleme Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterlerine göre yapıldı.

İmmünohistokimyasal çalışma yapmak amacıyla tüm hastaların parafin bloklarından adezivli lamlara(poly-L-lysin ile işleminden geçirilmiş) 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Tüm kesitler antijen retrieval citra(Biogenex) solüsyonu içinde mikrodalga fırına yerleştirildi. Kesitler mikrodalga fırında önce 500 W'ta 3 dakika bırakıldı. Daha sonra fırın ısısı düşürülerek 160 W'ta aralıklarla 10-15 saniye sürelerle bir kaç kez kaynamaya bırakıldı. Daha sonra p53 için D07 monoklonal antikoru(Biogenex) ve super sensitive HRP (Biogenex) kiti kullanılarak immünohistokimyasal boyanma uygulandı. İmmünohistokimyasal olarak diaminobenzidin ile kahverengi boyanan nükleuslar pozitif olarak değerlendirildi. Sitoplazmik boyanma gözlenmedi. Boyanan nükleus sayısına bakılmaksızın olgular pozitif olarak değerlendirilirken, hiç boyanma olmayan olgular negatif olarak değerlendirildi.

İstatistiksel olarak student t testi kullanılarak, p53 pozitivitesi ile grade, mitoz sayısı ve nüks arasındaki ilişki araştırıldı.

## BULGULAR

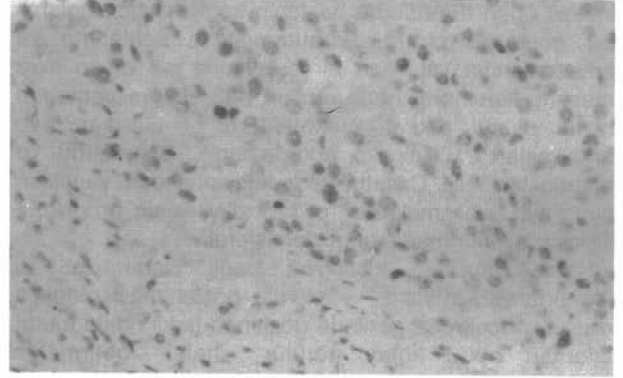
Hastaların tamamında H.E. ile boyalı preparatlarda mitoz sayısı, grade, nekroz ve p53 immünoreaktivitesi araştırıldı. En az 6 ay süreyle izlenebilen 28 olgu nüks yönünden değerlendirildi. Onbeş hasta 1 yıldan az, 13 hasta ise 1 yıldan daha uzun süre takip edildi. En uzun izlem süresi 55 ay ve ortalama izlem süresi 21.35 aydır. Hastaların izlenmesi sırasında bir olgu tanısından 23 ay sonra exitus oldu.

Olguların % 57.5'i(23) grade 1, % 30'u(12) grade 2 ve %12.5'i(5) grade 3 olarak değerlendirildi. Grade 1 olguların % 35'inde, grade 2 olguların % 50'sinde, grade 3 olguların % 20'sinde, grade 2-3 olgular birarada değerlendirildiğinde ise % 42 oranında p53 pozitivitesi gözlenildi (p=0.93).

Mitoz olguların % 52.5'inde gözlenirken, % 47.5'inde saptanmadı. Aşırı mitoz sayısı bulunan 2 olgunun(10 büyük büyütmede 28 ve 51 mitoz) birisinde p53 pozitif, diğerinde ise negatifti.

Nekroz olguların % 27.5'inde pozitif olarak bulundu. Geniş alanlarda nekroz bulunan 2 olgudan birinde p53 pozitif, diğerinde negatifti.

Tüm olguların % 37.5'inde(15) p53 immünoreaktivitesi gözlendi (Resim 1). Bir olguda ise tümör dokusunun % 50'sinden fazlasında p53 ile pozitif boyanma gözlen-



**Resim 1** :İmmünohistokimyasal olarak p53 monoklonal antikor ile zayıf ve focal nükleer boyanma gösteren bir olgu (X100)

di(Resim 2,3). p53 pozitif tümörlerin % 60'ında mitoz saptandı(p=0.87). p53 pozitif tümörlerin % 55.5'inde nüks gözlenmektedir.p53 negatif tümörlerin ise % 21'inde nüks saptanırken, % 79'unda nüks ortaya çıkmaktadır (p= 0.09).

## TARTIŞMA

Mesanenin değişici epitel hücreli karsinomlarında evre, grade ve tümör büyüklüğü ile prognoz arasındaki ilişki gösterilmiştir. Değişici epitel hücreli karsinomların prognozunda araştırılan diğer bir konu da başta p53 olmak üzere genetik değişikliklerdir. Tümör süpresör gen olan p53'teki genetik değişiklikler meme, kolon ve akciğer tümörleri başta olmak üzere bir çok tümörde araştırılmış ve mutasyone p53'ün tümörlerin prognozu ve gelişimi ile ilişkisi gösterilmiştir (6, 13, 14, 16). Aynı ilişki mesane tümörlerinde de araştırılmış ve farklı sonuçlar saptanmıştır (4,5, 9, 10, 16, 17-20).

p53 geni 17p13.1 kromozomunda lokalize olup, 393 amino asidlik 53 kd nükleer bir fosfoproteini kodlamaktadır. Hücre proliferasyonunun kontrolünde rol oynar (8-10). p53'ün ekspresyonunu düzenleyen kromozom ise 17p 13.3'tür. DNA replikasyonunda azalmaya bağlı olarak p53 geninin kodladığı nükleer fosfoprotein artar(5). Normal veya "wild" tip p53 proteini hücrelerin, hücre siklusunun G1 fazında kalmalarına ve böylece DNA ve/veya apoptozisin düzenlenmesine olanak verir(9,11). Yarı ömrü kısa olan (5-45 dakika) normal p53'ün standart immünohistokimyasal yöntemlerle saptanması olanaksızdır(12). p53 genindeki mutasyon, yarı ömrünün uzamasına (bir kaç saat), stabil hal almasına ve immünohistokimyasal olarak saptanmasına olanak verir (5,9,13). "Wild" tip p53 ekspresyonunun kaybı veya mutant p53'ün aşırı ekspresyonu, karsinojenlere yanıtta anormal hücre siklusu ile sonuçlanabilir (5). Büyük delesyonların veya insersiyonlar ve küçük nokta mutasyonlarının p53 genini onkogenik hale getirebileceği gösterilmiştir (8). p53 genindeki değişiklikler malignite gelişiminde geç dönemde oluşmaktadır (5).

Uchida ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada süperfiyel mesane tümörlerinde p53 ekspresyonunun prog-

nostik önemi olmadığı, buna karşılık papiller ve kasi invaze eden tümörlerde hastanın sağkalımında anlamlı bir gösterge olduğu saptanmıştır<sup>(4)</sup>. Schlechte ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise erken evre mesane karsinomlarında mutant p53 ekspresyonunun fazla oluşu dikkati çekmektedir<sup>(19)</sup>. Gardiner ve arkadaşları<sup>(9)</sup>, Glick ve arkadaşları<sup>(9)</sup>, Skopelitou ve arkadaşları<sup>(12)</sup> ile Casetta ve arkadaşlarının<sup>(16)</sup> yaptıkları ayrı ayrı çalışmalarda p53 pozitifitesinin prognozla ilişkisinin bulunmadığını gözlemişlerdir.

Yarı ömrünün kısalığına bağlı olarak, p53'ün immünohistokimyasal yöntemle gösterilmesi oldukça güçtür. Ancak p53 geninde gözlenen farklı nokta mutasyonları bunu kolay görülür hale getirmekle birlikte, bazı farkedilmeyen mutasyonlarda da p53 pozitifitesi saptanamamaktadır<sup>(15)</sup>. Çalışmamızda da kullandığımız DO 7 antikoru, hem "wild" hem de mutant formdaki p53 proteiniyle reaksiyona girmektedir.

Çalışmamıza dahil edilen ve grade I olarak değerlendirilen 23 olgunun % 35'inde p53 + iken, grade 2 olarak değerlendirilen 12 olgunun % 50'sinde, grade 2-3 birlikte değerlendirildiğinde toplam 17 olgunun % 42'sinde p53 pozitifitesi saptandı (p=0.93). Aynı şekilde mitoz sayısı ile p53 immünoaktivitesi arasında da

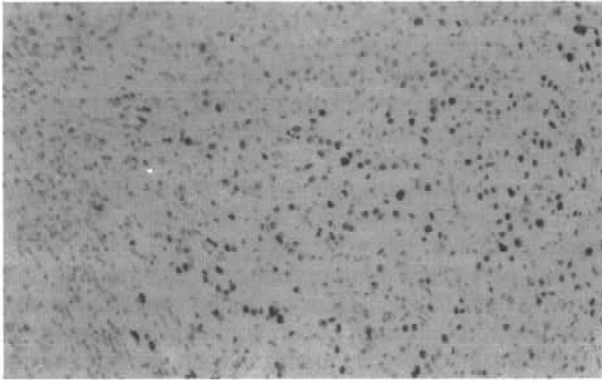
anlamlı bir ilişki saptanamadı (p= 0.87).

Mesanenin değişici epitel tümörlerinde sık nüks gözleendiği için, nüks ile p53 immünoaktivitesinin birlikteliği araştırıldığında, p53 + olguların % 55'inde, p53 - olguların ise sadece % 21'inde nüks gözlenmiştir (p= 0.09). İzlenebilen olguların sayısının az olması nedeniyle, p53 immünoaktivitesi ile prognoz arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterilememiştir. Ancak yine de başka çalışmalarda<sup>(4)</sup> olduğu gibi p53 gen mutasyonu olan ve immünohistokimyasal olarak p53 ekspresyonu gösterilebilen mesane karsinomlu olguların prognozunun daha kötü olacağı sonucuna varılabilir.

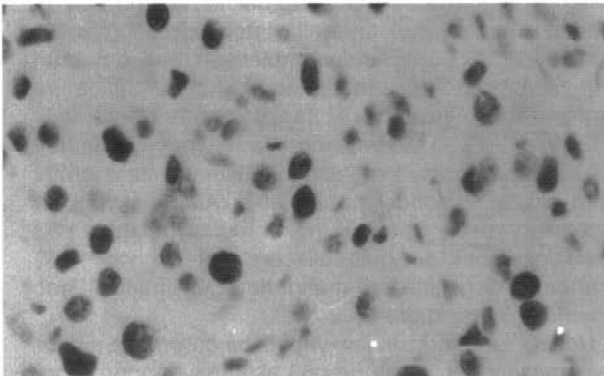
Bu amaçla takipli çok sayıda olguyla yapılabilecek çalışmaların yararlı olacağı ve p53 pozitifitesi gösteren mesane tümörlerinde prognoz daha kötü olacağının kanıtlanabileceği görüşündeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics, 1996. CA Cancer J Clin 1996;46:5-27.
2. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı. Kanser bildirimlerinin değerlendirilmesi 1991-1992. Kanser Savaş Daire Başkanlığı kanser bildirim kitabı 1994.
3. Burgut R ve arkadaşları. Türkiye'de 16 merkezin kanser verilerinin değerlendirilmesi. Editörler: Tuncer İ, Burgut R, Bozdemir N, Coşar EF. Türkiye'de Kanser Sıklığı 1994; sayfa 27-66.
4. Uchida T, Wada C, Ishida H, Wang C, Egawa S, Yokoyama et al. p53 mutations and prognosis in bladder tumors. J Urol 1995, 153: 1097-1104
5. Gardiner RA, Walsh MD, Allen V, Rahman S, Samaratunga MLTH, Seymour GJ, et al. Immunohistological expression of p53 in primary pT1 transitional cell bladder cancer in relation to tumour progression. Br J Urol 1994; 73:526-532
6. Coles C, Thompson AM, Elder PA, Cohen BB, Mackenzie IM, Cranston G, et al. Evidence implicating at least two genes on chromosome 17p in breast carcinogenesis. Lancet 1990; 336: 761-763
7. Malkin D, Jolly KW, Barbier N, Look AT, Friend SH, Gebhardt MC, et al. Germline mutations of the p53 tumor-suppressor gene in children and young adults with second malignant neoplasms. New Eng J Med 1992;326: 1309- 1315
8. Toguchida J, Yamaguchi T, Dayton SH, Beauchamp RL, Herrera. GE, Ishizaki K, et al. Prevalence and spectrum of germline mutations of the p53 gene among patients with sarcoma. New Eng J Med 1992; 326: 1301-1308
9. Glick SH, Howell LP, White RWD. Relationship of p53 and bcl-2 to prognosis in muscle - invasive transitional cell carcinoma of the bladder. J Urol 1996; 155: 1754-1757
10. Keeley FX, Bibbo M, McCue PA, Bagley DH. Use of p53 in diagnosis of upper - tract transitional cell carcinoma. Urology 1997; 49: 181-186
11. Lipponen PK, Aaltomaa S. Apoptosis in bladder cancer as related to standart prognostic factors and prognosis. J Pathol 1994; 173: 333-339
12. Skopelitou A, Hadjiyannakis M, Dimopoulos D, Kamina S, Krikoni O, Alexopoulou V, et al. p53 and c jun expression in urinary bladder transitional cell carcinoma; correlation with proliferating cell nuclear antigen(PCNA), histological grade and clinical stage. Eur Urol 1997; 31: 464-471
13. Yaman Ö, Özdiler E, Orhan D, Dizbay Sak S, Baltacı S, Tolunay Ö, Göğüş O. Immunohistochemical determination of p53 protein in prostatic cancer and prostatic intraepithe-



Resim 2 : Perivezikal yağ dokusunu da infiltrate eden karsinom olgusunda tümörün %50'den fazla alanında ve güçlü p53 immünoaktivitesi saptandı (x10).



Resim 3 : Hücrelerde belirgin p53 ekspresyonu (X200).

- lial neoplasms. *Urol Int* 1997; 58: 199-202
14. Sun XF, Carstensen JM, Zang H, Stall O, Wingren S, Hatschek T et al Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. *Lancet* 1992; 340: 1369-1373
  15. Casetta G, Gontero P, Russo R, Pacchioni D, Tizzani A. p53 expression compared with other prognostic factors in OMS grade-I stage Ta transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 1997; 32:229-236
  16. Lunec J, Challen C, Wright C, Mellon K, Neal DE. c-erbB-2 amplification and identical p53 mutations in concomitant transitional carcinomas of renal pelvis and urinary bladder. *Lancet* 1992; 339: 439-440
  17. Ick K, Schultz M, Stout P, Fan K. Significance of p53 overexpression in urinary bladder transitional cell carcinoma in situ before and after Bacillus Calmette - Guerin Treatment. *Urology* 1997;49: 541-547
  18. Özdemir E, Kakehi Y, Okuno H, Habuchi T, Okada Y, Yoshida O. Strong correlation of basement membrane degradation with p53 inactivation and /or mdm2 overexpression in superficial urothelial carcinomas. *J Urol* 1997; 158: 206-211
  19. Schlechte HH, Schnorr D, Löning T, Rudolph BD, Pohrt UM, Loening SA. Mutation of the tumor suppressor gene p53 in human prostate and bladder cancers - Investigation by temperature gradient gel electrophoresis(TGGE). *J Urol* 1997; 157: 1049-1053
  20. Shiina. H, Igawa M, Urakami S, Shirakawa H, Ishibe T, Kawanishi M. Clinical significance of immunohistochemically detectable p53 protein in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 1997; 31: 73-80