

# PROSTAT ADENOKARSİNOMUNDA P53 EKSPRESYONU: HISTOPATOLOJİK PARAMETRELER VE APOPTOZ İLE İLİŞKİSİ

Dr. Çiğdem ATAİZİ ÇELİKEL\*, Dr. Handan KAYA\*, Bio. Msc. Gülsün EKİCİOĞLU\*\*, Dr. Sevgi KÜLLÜ\*

**ÖZET:** 40 prostat adenokarsinom olgusunda, p53 immünohistokimyasal ekspresyonunun, Gleason skoru, DSÖ gradı ve patolojik evre ile ilişkisi ve apoptozdaki rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. p53 pozitifliği ile Gleason skoru ve patolojik evre arasında ilişki kurulamamasına karşın, DSÖ gradı ile korelasyon saptanmıştır. Olgular evre ve derece gözönüne alınarak gruplandırıldığı zaman, erken evre ve düşük derecedeki tümörlerde p53 (-) olguların apoptotik indeksleri p53 (+) olgulara oranla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ancak yüksek evre ve derecede p53 (-) ve p53 (+) olgularda apoptotik indeks açısından anlamlı fark izlenmemiştir. Bulgularımız, p53 gen mutasyonunun genellikle geç dönemde oluştuğunu ancak p53'ün apoptozdaki etkisinin erken dönem prostat kanserinde belirgin olduğunu göstermektedir.

**ANAHTAR KELİMELEER:** Prostat adenokarsinomu, p53, apoptoz.

**SUMMARY:** p53 EXPRESSION IN PROSTATIC CARCINOMAS: ITS RELATION TO THE HISTOPATHOLOGICAL PARAMETERS AND APOPTOSIS: This study was designed to evaluate the immunohistochemical expression of p53 according to the stage, Gleason score, and WHO grade of the prostatic adenocarcinomas and to determine the association between the expression of p53 and apoptosis. p53 positivity was statistically related to the WHO grade but not to the Gleason score and pathological stage of the prostatic carcinomas. When the tumors were grouped according to the stage and grade there was a significant difference between p53(-) and p53(+) cases in respect to the apoptotic index in early stage and low grade tumors which could not be demonstrated in high grade and late stage. Our results revealed that although p53 mutations are usually late events in prostatic adenocarcinomas, the apoptotic role of p53 is evident only in early stage and low grade tumors.

**KEY WORDS:** Prostatic adenocarcinoma, p53, apoptosis.

## GİRİŞ

p53 geni farklı organ tümörlerinde en sık mutasyonu saptanan gen olması nedeniyle, son yıllarda çalışmaların odak noktasını oluşturmaktadır (1-3). 17. kromozomun kısa kolunda yer alan p53 geninin kodlandığı normal ("wild-type") p53 proteini, hücre siklusunda hücrenin G1 fazından S fazına geçişini önler. Hücrede DNA hasarı olduğu zaman p53 protein yapımının artışıyla birlikte DNA tamirine olanak sağlamaya yönelik hücre siklus duraklaması meydana gelmektedir (4). p53 gen mutasyon ve/veya delesyonu sonucu gelişen hücre siklusundeki normal regülasyonun bozulmasının, çok sayıda tümörün patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir (2,4-7).

Prostat adenokarsinom (PCa) olgularında yapılan çalışmalarda p53 gen mutasyonunun erken evre PCa'larında sık olmadığı, ancak p53 tümör baskılayıcı gen fonksiyon kaybının hastalığın progresyonunda önemli bir aşama olduğu belirtilmektedir (8-11).

p53 geninin yalnız hücre siklus kontrolü ve DNA tamirinde değil, aynı zamanda programlanmış hücre ölümünde (apoptoz) etkin rol aldığı bilinmektedir (5,6,11). Diğer hücre tiplerinde p53'ün apoptozdaki olası rolüne karşın, prostat epitel hücrelerinde p53'e bağımlı apoptozun sınırlı etkisinin olduğu öne sürülmektedir (6,12,13).

Çalışmamızda 40 PCa olgusunda p53 immünekspresyonu değerlendirilmiş ve bilinen prognostik parametrelerden tümör evre ve tümör derecesi ile ilişkisi araştırılmıştır. Aynı zamanda PCa'nda p53 gen mutasyonunun apoptozdaki rolünün belirlenmesi amacıyla p53 ile apoptoz arasındaki korelasyon belirlenmeye çalışılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi (MÜTF) Patoloji Anabilim Dalında 1992-1995 yılları arasında incelenen 40 radikal prostatektomi (RP) materyali çalışma kapsamına alınmıştır. Hiçbir olgu operasyon öncesi hormonal tedavi ve/veya rad-

yoterapi almamıştır. RP piyesleri %10'luk tamponlanmış formalinde fikse edildikten sonra prostat bezinin uzun eksenine paralel apekten vezikula seminalislere doğru 5 mm. aralıklarla kasitler hazırlanmış ve tüm materyal haritalanarak takibe alınmıştır. Olguların tüm bloklarından hazırlanan hematoksilen-eozin boyalı kesitler 2 patolog tarafından birlikte değerlendirilmiştir. Patolojik evrelemede AJCC ("American Joint Committee for Cancer"-1993) sınıflamasına göre prostat lokalize tümörler T2, prostat dışına lokal invazyon gösteren tümörler T3 olarak değerlendirilmiştir. Olgularda Gleason ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) derecelendirme sistemleri kullanılmıştır. Total Gleason skoruna (TGS) göre TGS <7 olgular düşük dereceli, TGS ≥7 olgular yüksek dereceli olarak gruplanmıştır.

Her olgu için PCa alanlarını en iyi temsil eden bloktan immünohistokimya (IHK) uygulamak amacıyla 5'er mikronluk 3 seri kesit alınmıştır. Deparafinizasyon, rehidrasyon işlemlerinden sonra 750 watt'lık mikrodalga fırında 15 dakika tutulan kesitlere oda ısısında 30 dakika süre ile normal ve mutant p53 proteinine karşı geliştirilmiş primer antikor (Biogenex AM1955M) uygulanmıştır. Kromojen olarak fast-red-substrat-levamizol kullanılmıştır. Zemin boyaması için Mayer hematoksilen kullanılmıştır.

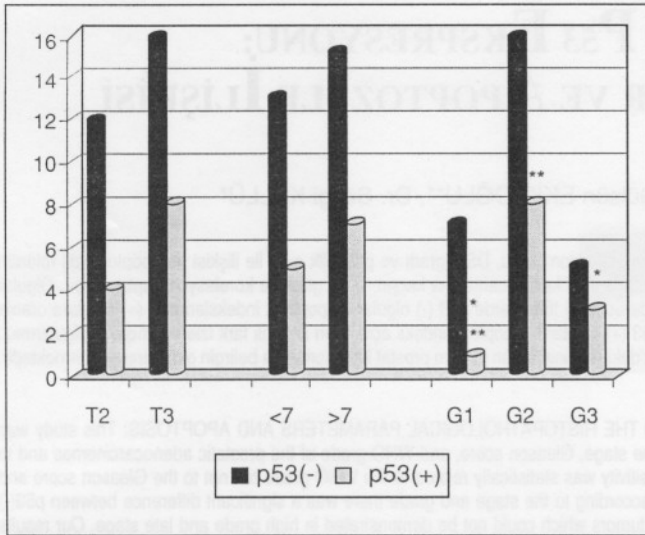
Apoptoz'u belirlemek amacıyla nukleozomal DNA fragmentasyonunu saptamak için bir in-situ işaretleme yöntemi olan terminal transferaz reaksiyonu (TUNEL) kullanılmıştır. Bunun için ApopTag Kit (Oncor 7100) üretici firmanın önerdiği şekilde kesitlere uygulanmıştır. Negatif kontrol seri kesitlerden birine TdT enzimi çıkartılarak benzer yöntemin uygulanması ile elde edilmiştir.

p53 ekspresyonunu değerlendirmek için yalancı pozitifliği önlemek amacıyla literatür gözönüne alınarak %5 eşik değeri kullanılmıştır (14,15). ApopTag ekspresyonu ışık mikroskopisinde X400 büyütmede immünekspresyonun yüksek olduğu 4 farklı alanda toplam 1000 hücre sayılarak belirlenmiştir. Nükleer boyanma gösteren hücre sayısının total hücre sayısına bölünmesi ile elde edilen yüzde değer apoptotik indeks (AI) olarak kabul edilmiştir.

P53 ekspresyonu ile histopatolojik parametreler ve AI değerleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için eşleştirilmemiş t testi kullanılmıştır.

\* Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı

\*\* Marmara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Yüksek Okulu



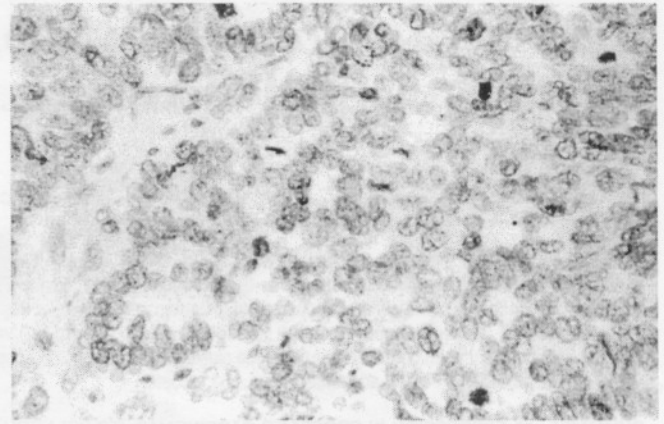
Şekil 1: 40 radikal prostatektomi olgusunda evre, Gleason grad'ı ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) derecesine göre p53 (-) ve p53 (+) olgularının dağılımı. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,001$ .

## BULGULAR

Çalışma kapsamına alınan 40 RP olgusunda yaş dağılımı 58-73 (ortalama 66.05)'tür. On altı olgu T2, 24 olgu T3'tür. TGS'a göre 22 olgu yüksek, 18 olgu düşük dereceli olarak değerlendirilmiştir. DSÖ'ne göre 8'i iyi, 24'ü orta, 8'i kötü farklılaşma gösteren tümörlerdir.

p53 ekspresyonu olguların %30'unda saptanmıştır. p53 ekspresyonu saptanan 12 olgunun %66.7'si T3, %33.3'ü T2 tümörlerdir. Ancak olgular evreye göre sınıflandırıldığı zaman evre ve p53 arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. TGS ile p53 pozitifliği arasında ilişki bulunmamıştır. DSÖ derecelendirme sistemi göz önüne alındığı zaman p53 ekspresyonu açısından orta ve kötü farklılaşma gösteren PCa'lar arasında anlamlı farklılık gözlenmemesine karşın, her iki grup ile iyi farklılaşma gösteren PCa'lar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (Şekil 1).

Al ile evre, Gleason derecesi ve DSÖ derecesi arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmamıştır. Al, p53 (-) olgularda, p53 (+) olgulara oranla daha yüksek bulunmasına



Resim 1: Total Gleason Skoru (TGS)=9, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Derecesi G3 prostat adenokarsinomunda p53 immunhistokimya pozitifliği (x200).

karşın p53 ekspresyonu ile Al arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki gösterilememiştir. Ancak olgular evre, TGS ve DSÖ derecesi gözönüne alınarak gruplandırıldığı zaman düşük evre ve derecedeki tümörlerde p53 (-) olguların Al'leri p53 (+) olgulara oranla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 1).

## TARTIŞMA

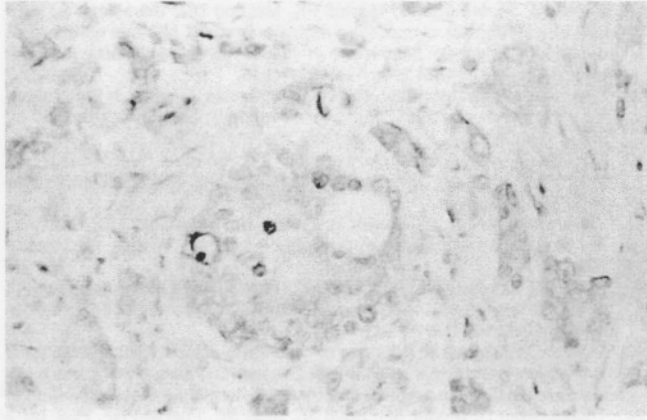
PCa'larında literatürde bildirilen p53 pozitiflik oranı %0 ile %80 arasında dağılım göstermektedir (9,10,14-22). Bu geniş dağılım, olgu seçiminin ötesinde çalışma kapsamına alınan materyal (TUR, iğne biyopsisi, RP), uygulanan primer antikor ve İHK yönteminin yansıması olarak kabul edilmektedir (6,23). Visakorpi ve ark., 137 TUR ve iğne biyopsisinde %17 (19); Bookstein ve ark., 140 RP ve TUR biyopsisinde %12 (20) oranında p53 (+) liği saptamışlardır. Çalışmamızda izlediğimiz %30 p53 (+)'lik oranının bu çalışmalardan yüksek olması, çalışma kapsamına yalnız RP spesmenlerinin alınmasına ve İHK yöntemi uygularken mikrodalga fırında antiijen geri kazanım işleminin yapılmasına bağlanmıştır. Son yıllarda RP olgularında yapılan çalışmalarda yüksek p53 immünekspresyon değerleri saptanmıştır. (16,18,21,24). Striker ve ark., 40 RP olgusunda %80 oranında p53 (+)'liği saptamıştır (16). Ancak bu çalışmada bizim çalışmamızda kullandığımız %5 eşik değeri kullanılmamıştır. Veldhuizen ve ark.'nin saptadığı %79 oranında (+)'lik sitoplazmik boyanma şeklindedir (21). Bauer ve ark., klinik olarak prostata lokalize 175 olgunun RP spesmeninde %65 oranında pozitiflik saptamışlardır. Bu oran fokal olgular gözönüne alınmaksızın değerlendirilirse %10'a kadar düşmektedir (18).

p53 (+)'liğinin yüksek Gleason skoru, DSÖ skoru, DSÖ derecesi ve patolojik evre ile korelasyon gösterdiği bildirilmektedir (8,17,18,22). Çalışmamızda p53 (+) olguların %66.7'sinin prostat dışına lokal invazyon gösteren PCa olguları olduğu saptanmıştır. Buna karşın evre ve p53 ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlılık ortaya konulamamıştır. Matsushima ve ark., T2 olgularda %22, T3 olgularda %29 oranında p53 (+)'liği belirlemişlerdir (17). Bu çalışmada da p53 (+)'liği lokal tümör ekstansiyonu ile ilişkisiz bulunmuştur. Çalışmamızda saptadığımız T2 PCa'da %25 ve T3 PCa'da %33.3 oranları bu çalışma ile korelasyon göstermektedir. p53 (+)'liği ile DSÖ derecesi karşılaştırıldığı zaman p53 (+)'liği saptanan olguların yalnız 1 tanesinin iyi farklılaşma gösteren PCa olduğu gözlenmiştir. İyi farklılaşmış PCa'larda sap-

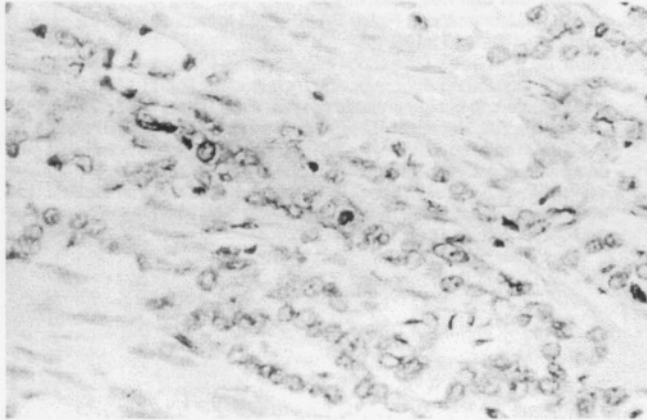
TABLO 1: EVRE, TOTAL GLEASON SKORU (TGS) VE DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ (DSÖ) DEREÇESİNE GÖRE p53 (-) ve p53 (+) OLGULARINDA APOPTOTİK İNDEKS DEĞERLERİ

	APOPTOTİK İNDEKS DEĞERLERİ ortalama (dağılım)		
	p53 (-) olgular	p53 (+) olgular	p değeri
<b>Evre</b>			
T2	6.06 (0.40 - 14.40)	2.36 (0.91 - 5.78)	$p < 0.05$
T3	4.31 (0.60 - 14.24)	4.14 (0.60 - 9.22)	$p > 0.05$
<b>TGS</b>			
<7	4.62 (0.40 - 14.40)	2.01 (0.60 - 5.78)	$p < 0.05$
≥7	5.44 (0.60 - 14.24)	4.50 (1.80 - 9.22)	$p > 0.05$
<b>DSÖ</b>			
İyi	5.34 (0.40 - 14.40)	1.16	$p < 0.05$
Orta	5.19 (0.40 - 14.24)	3.05 (0.60 - 8.13)	$p < 0.05$
Kötü	4.25 (0.80 - 10.40)	5.95 (1.97 - 9.22)	$p > 0.05$





**Resim 2:** Total Gleason Skoru (TGS)=8, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Derecesi G3, p53 (-) prostat adenokarsinomunda apoptoz, ApopTag, (x200).



**Resim 3:** Total Gleason Skoru (TGS)=10, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Derecesi G3, p53 (+) prostat adenokarsinomunda apoptoz, ApopTag (x200).

tanan pozitiflik oranı (%12.5) ile orta (%33.3) ve kötü farklılaşma gösteren (%37.5) PCa'lardaki pozitiflik oranları arasında anlamlı farklılık belirlenmiştir. Stattin ve ark.'nın çalışmasında, DSÖ derecesi ile p53 ekspresyonu arasında korelasyon gösterilmiştir (8). Ancak bu çalışmada iyi, orta, kötü farklılaşma gösteren PCa'larda sırasıyla %2, %8 ve %21 oranlarında p53 (+)'liği bulunmuştur. Bizim saptadığımızdan oldukça düşük olan bu oranlar çalışmadaki tüm olguların TUR materyeli olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda TGS ile p53 (+)'liği arasında ilişki kurulamamıştır. Düşük-yüksek dereceli olarak olguları sınıflandıran daha agresif tümörler olarak kabul edilen TGS'u 5-6 olguları düşük dereceli tümörlere dahil etmemiz bu ilişkisizliğin nedeni olabilir. Bauer ve ark.'nın çalışmasında TGS'u 2-4 olan olgularda %11, 5-7 olan olgularda %71 ve TGS'u 8-10 olgularda %86 oranında pozitiflik saptanmıştır (25). Ancak TGS'a göre dağılımın çalışmamızdakine benzer şekilde yapıldığı Matsushima ve ark.'nın çalışmasında, TGS'u ile p53 ekspresyonu arasında ilişki kurulmuştur (17).

Çalışmamızda kullandığımız primer antikör mutant ve normal p53 protein'ine bağlanabilen bir antikördür. Normal p53'ün kısa yaşam süresi olması nedeni ile genellikle immünreaksiyon vermediği kabul edilmektedir. Ancak yüksek miktarlarda ve diğer proteinlere bağlanarak stabilize olduğu zaman immünreaksiyon verebilir. Buna karşın uzun yaşam süresi olması nedeni ile mutant p53 protein'i immünhistokim-

yasal olarak tespit edilebilir (4,26). Bu nedenle çalışmamızda saptadığımız immünreaksiyonun normal p53 protein'i ve/veya inaktif proteine mi bağlı olduğunu anlamak olası değildir. Greenblatt ve ark., immünhistokimya ve mutasyon analizi uyguladıkları 84 farklı tümörde IHC yönteminin duyarlılığını %75, pozitif belirleyicilik değerini ise %63 olarak bildirmişlerdir (1). Prostat dokusunda immünhistokimya ve genetik yöntemlerin karşılaştırıldığı çalışmada p53 mutasyonu taşıyan hücre ve/veya benign-malign prostat dokularının %93'ü immünhistokimyasal olarak saptanmıştır. Buna karşın p53 mutasyonu içermeyen olguların %86'ında immünreaksiyon gözlenmiştir (27). IHC ve genetik analizler arasındaki korelasyonu gösteren bu çalışmaların ışığında çalışmamızda 12 olguda saptadığımız p53 immünreaksiyonunu inaktif p53 proteinine bağlamak doğru olacaktır. Ayrıca genetik analizlerle IHC'ın çok iyi korelasyon gösterdiği tümörlerde bile %20-30 oranında mutasyon olduğu halde immünreaksiyon saptanamadığı öne sürülmektedir (6). Bu nedenle çalışmamızda gerçekte olduğundan daha az oranda p53 mutasyonu göstermiş olma olasılığımız vardır. Bu da belki p53 ekspresyonu ile evre ve TGS arasındaki korelasyonu belirlememizi engellemiş olabilir.

p53 geninin apoptoz üzerindeki rolü bilinmektedir (11). Donehower ve ark., radyasyon ve kemoterapiye son derece duyarlı olan immatür timositlerin p53-geni taşıyan farelerden alındığı zaman radyasyona dirençli olduklarını göstermişlerdir (28). Myeloid hücre kültürlerinde de normal p53 proteinine bağlı apoptoz gösterilmiştir (29). Diğer hücre tiplerindeki olası role karşın, p53'ün prostat tümör hücrelerinde apoptoz açısından sınırlı rolü olduğu düşünülmektedir (5,6,11). Mutant p53 geni olan PCa hücre kültürlerinde radyasyonun apoptoz oluşmasına karşı, duyarlılıkta azalma oluşturmadığı belirlenmiştir (13). Colombel ve ark.'nın yaptıkları deneysel çalışmada ise p53'ün apoptoz için gerekli olmadığı ancak kastre edilen hayvanlarda apoptozu arttırdığı gözlenmiştir (12). Çalışmamızda, yüksek evre ve düşük derecedeki PCa'da apoptotik indeks değerleri p53 (+) ve (-) olgular arasında istatistiksel anlamlı farklılık göstermektedir. Ancak yüksek evre ve derecedeki tümörlerde p53 (+) ve p53 (-) olgularda birbirine çok yakın apoptotik indeks saptanmıştır. Bu doğrultuda, p53 proteininin yalnız erken dönem PCa'larda apoptoz üzerinde etkin olduğu ancak ileri dönem PCa'larında farklı faktörlerin rolünün olası olduğu öne sürülebilir.

Bulgularımız, PCa'larında p53 gen mutasyonunun genellikle geç evre ve yüksek derecede ortaya çıktığını ancak p53'ün apoptoz üzerindeki etkisinin erken evre ve düşük derecedeki PCa'larda belirgin olduğunu göstermektedir. Yüksek evre ve derecedeki PCa'da bir antiapoptotik faktör olan bcl-2 bax gibi apoptoz üzerine etkili diğer proteinlerin rolünü ortaya koymak için geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim olduğu kanısındayız.

## KAYNAKLAR

1. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;48:55-4878.
2. Nagao T, Kondo F, Sato T, Nagato Y, Kondo Y. Immunohistochemical detection of aberrant p53 expression in hepatocellular carcinoma: correlation with cell proliferative activity indices, including mitotic index and MIB-1 immunostaining. *Hum Pathol* 1995; 26:326-333.
3. Kuczyk MA, Serth J, Hervatin C, Arndt H, Derendorf L, Thon WF, et al. Detection of p53 tumor-suppressor-gene protein in bladder tumors and prostate cancer: possible clinical implications. *World J Urol* 1994;12:345-351.
4. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;28:1318-1327.
5. Wick MR. Oncogene analysis in diagnostic pathology: a current perspective [editorial]. *Am J Clin Pathol* 1992;97 (5 Suppl 1): S1-3.

